

**ESTUDI DE LA PRESENILINA 1 COM A
INHIBIDOR DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL
DE LA β -CATENINA**

Imma Raurell Saborit



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Biofísica, Facultat de Medicina

ESTUDI DE LA PRESENILINA 1 COM A INHIBIDOR DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE LA β -CATENINA

Imma Raurell Saborit

Memòria presentada per optar al grau de Doctora en Bioquímica i Biologia
Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Abril 2007

Directora de la Tesi Doctoral:

Dra. Mireia Duñach Masjuan

Siempre es preciso saber cuándo se acaba una etapa de la vida. Si insistes en permanecer en ella más allá del tiempo necesario, pierdes la alegría y el sentido del resto. Cerrando círculos, o cerrando puertas o cerrando capítulos. Lo importante es poder cerrarlos y dejar ir momentos de la vida que se van terminando.

Paulo Coelho

INDEX

INTRODUCCIÓ	1
1. LA MALALTIA DE L'ALZHEIMER	3
1.1. Aspectes generals.....	3
1.2. Histopatologia: els cabdells neurofibril·lars i les plaques senils.....	3
1.3. L'Alzheimer esporàdic i l'alzheimer familiar	5
1.4. Gens responsables de l'Alzheimer familiar precoç	6
1.4.1. El gen de la proteïna precursora β -amiloide (APP).....	6
1.4.2. Els gens de les presenilines	6
1.4.3. El gen de susceptibilitat a l'AD: l' APOE	7
2. LES PRESENILINES	8
2.1. Característiques generals de les presenilines	8
2.2. Models animals i cel·lulars de les presenilines	9
2.3. La presenilina 1 (PS1).....	10
2.3.1. Topologia de la PS1.....	10
2.3.2. Modificacions postraduccional de la PS1.....	11
2.3.3. Interacció de la PS1 amb altres proteïnes	14
3. FUNCIONS DE LA PS1	15
3.1. La PS1: component del complex γ -secretasa	15
3.1.1. El complex γ -secretasa	15
3.1.2. Processament de l'APP	20
3.1.3. Processament de Notch.....	22
3.2. Regulador negatiu de l'activitat transcripcional del complex Tcf4- β -catenina	24
3.2.1. La β -catenina	24
3.2.2. La via de senyalització Wnt	27
3.2.3. La PS1 com a regulador negatiu de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina.....	29
3.3. La PS1 interacciona amb components de les unions adherents	30
3.3.1. L'adhesió cel·lular: les unions adherents	30
3.3.2. Regulació de les unions adherents.....	33
3.3.3. La PS1 interacciona amb components de les unions adherents.....	34

OBJECTIUS	37
RESULTATS	41
ÀNALISI DE L'EFECTE DE LA PS1p EN L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEPENDENT DE TCF-4•β-CATENINA	
1. LA PS1p MODULA ELS NIVELLS DE LES CADHERINES, I INDIRECTAMENT EL D'ALTRES PROTEÏNES DE LES UNIONS ADHERENTS	49
1.1. La disminució dels nivells de l'E-cadherina no és deguda a un efecte transcripcional	50
1.2. La disminució dels nivells de l'E-cadherina és deguda a l'activitat γ -secretasa	51
1.3. L'E-cadherina és menys estable en les cèl·lules MEFs PS(+/-) que en les MEFs PS(-/-)	53
1.4. La PS1p regula l'estabilitat de l'E-cadherina	54
1.5. La PS1p interacciona amb l'E-cadherina <i>in vitro</i> i en línies cel·lulars en cultiu	56
1.6. La p120-catenina competeix amb la PS1p i regula l'estabilitat de l'E-cadherina	57
2. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1p EN L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEX TCF4• β -CATENINA, ÉS DEGUT A LA FORMACIÓ DELS FRAGMENTS CADH/CTF2	59
2.1. Els fragments cadh/CTF2 inhibeixen l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4• β -catenina	59
2.2. Per què els fragments E-cadh/CTF2 inhibeixen l'activitat transcripcional de Tcf-4• β -catenina?	62
2.2.1. La β -catenina facilita la localització nuclear del fragment E-cadh/CTF2	62
2.2.2. El fragment E-cadh/CTF2 no impedeix la interacció Tcf4• β -catenina	63
2.2.3. El fragment E-cadh/CTF2 interacciona amb la CBP	64

ÀNALISI DE L'EFECTE DE LA PS1np SOBRE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEX TCF-4• β -CATENINA

1. LA PS1np INHIBEIX L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEX TCF-4• β -CATENINA.....	73
1.1. La PS1np inhibeix l'activitat dels promotors TOP i LEF-1.....	73
1.2. La PS1np disminueix els nivells de la proteïna c-myc	74
2. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1np NO ÉS DEGUT A CANVIS EN ELS NIVELLS DE LA β -CATENINA EN CÈL·LULES EPITELIALS	75
3. LA PS1np INTERACCIONA AMB LA β -CATENINA I LA PLACOGLOBINA.....	78
3.1. Interacció de la PS1np amb la β -catenina i la placoglobina en cèl·lules en cultiu.....	78
3.2. Interacció in vitro de la PS1np amb la β -catenina i la placoglobina	79
3.3. La PS1np interacciona amb les últimes repeticions armadillo de la β -catenina.....	80
3.4. La fosforilació de la Tyr654 de la β -catenina, disminueix l'afinitat de la PS1np per la β -catenina.....	82
3.5. La PS1np interacciona amb la placoglobina d'una manera diferent a com ho fa amb la β -catenina.....	83
3.6. La fosforilació de la Tyr643 de la placoglobina augmenta l'afinitat per la PS1np	85
4. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1np NO ÉS DEGUT A LA INTERACCIÓ DIRECTA AMB LA β -CATENINA.....	87
5. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1np ÉS DEGUT A UNA DISMINUCIÓ DE LA UNIÓ DEL TCF-4 AL DNA.....	89
5.1. La PS1np i el Tcf-4 formen part del mateix complex	89
5.2. La placoglobina és la medidora de la unió entre la PS1np i el Tcf-4	91
5.3. La PS1np anul·la l'especificitat d'unió de la placoglobina al Tcf-4.....	92
5.4. La PS1np impedeix la unió del Tcf-4 al DNA	95
5.5. La interacció de la PS1np amb la placoglobina estabilitza al Tcf-4 fora del nucli.....	96
5.6. La sobreexpressió de Tcf-4 anul·la l'efecte inhibidor de la PS1np en l'activitat transcripcional depenent de la β -catenina.....	97
6. LA PS1np TÉ MÉS AFINITAT PER LA β -CATENINA I PLACOGLOBINA QUE LA PS1p	99

7. MUTANTS DE LA PS1 DE L'ALZHEIMER FAMILIAR PRECOÇ ES COMPORTEN COM LA PS1np	101
DISCUSSIÓ	105
1. EFECTE INHIBIDOR DE LA FORMA PROCESSADA DE LA PS1 SOBRE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE LA β -CATENINA	107
2. EFECTE INHIBIDOR DE LA FORMA NO PROCESSADA DE LA PS1 EN L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE LA β -CATENINA	116
CONCLUSIONS	125
MATERIALS I MÈTODES	129
1. TÈCNiques RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ DELS ÀCIDS NUCLEICS	131
1.1. Tècniques relacionades amb la manipulació del DNA	131
1.1.1. Preparació de bactèries competents i transformació	131
1.1.2. Aïllament del DNA plasmídic	132
1.1.3. Anàlisi del DNA en gels d'agarosa	132
1.1.4. Construcció de plàsmids	132
1.1.5. Mutagènesi dirigida	135
1.1.6. Seqüenciació del DNA	135
1.2. Tècniques relacionades amb la manipulació del RNA	136
1.2.1. RT-PCR	136
1.2.2. RT-PCR semiquantitativa	136
1.2.3. RealTime-PCR (quantitativa)	137
2. TÈCNiques RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES	137
2.1. Extracció o purificació de proteïnes	137
2.1.1. Expressió i purificació de proteïnes recombinants en <i>E.coli</i>	137
2.1.2. Obtenció de proteïnes a partir cultius cel·lulars	140
2.2. Tècniques electroforètiques per l'estudi de proteïnes	141
2.2.1. Electroforesi SDS-PAGE (Mètode de Laemmli)	141
2.2.2. Electrotransferència de proteïnes. Western blot	141
2.2.3. Immunodetecció	141

2.3.	Assaigs d'interacció proteïna-proteïna	143
2.3.1.	Assaig de Pull-Down	143
2.3.2.	Assaig de purificació amb níquel-agarosa	144
2.3.3.	Co-immunoprecipitació	145
2.4.	Assaig d'interacció proteïna-DNA	145
3.	CULTIUS CEL·LULARS	146
3.1.	Línies cel·lulars utilitzades	146
3.2.	Condicions dels cultius cel·lulars	146
3.3.	Recompte de cèl·lules	147
3.4.	Congelació i emmagatzematge	147
3.5.	Transfeccions transitòries	147
3.6.	Preparació d'extractes cel·lulars	148
3.7.	Assaig d'activitat transcripcional	148
3.8.	Preparació de les cèl·lules per fluorescència o immunofluorescència	149
4.	REACTIUS I TAMPONS UTILITZATS	151
5.	PLÁSMIDS	156
5.1.	Vectors d'expressió en procariotes	156
5.2.	Vectors d'expressió en eucariotes	159
5.2.1.	pcDNA 3.1, pcDNA 3.1 His, pcDNA 3.1 Myc-His (Invitrogen)	159
5.2.2.	Vectors pEGFP i pECFP	161
5.2.3.	Altres	162
	BIBLIOGRAFIA	163

INTRODUCCIÓ

1. LA MALALTIA DE L'ALZHEIMER

1.1. Aspectes generals

Ara fa 100 anys, el 1906, l'alemany Alois Alzheimer va descriure per primera vegada les característiques clíniques i neuropatològiques d'una inusual malaltia que anys més tard, Emil Kraepelin la va anomenar la malaltia de l'Alzheimer (AD) (revisat a [1]).

La malaltia de l'Alzheimer és la patologia més comú de demència senil en el món occidental, tant per la seva repercussió actual, ja que representa un 60-70% de les malalties neurodegeneratives, com pel previsible augment de la seva prevalència degut el constant envelliment de la població. S'estima que cada vint anys es doblarà el nombre de casos de demència en els països desenvolupats, amb 42 milions de persones afectades el 2020 i 81 milions al 2040 [2]. Pel que fa a la incidència, es considera que augmenta de forma exponencial a partir dels 65 anys. Actualment té una incidència de l'1% per sota dels 65 anys, del 5-10% a partir dels 65 i d'un 40% en persones majors de 85 anys [3].

Clínicament, aquesta malaltia es caracteritza per un deteriorament intel·lectual progressiu que afecta a la memòria, el llenguatge i l'orientació, entre altres facultats mentals, causat per un dany selectiu de les regions cerebrals i dels circuits neuronals implicats en aquestes funcions, com ara l'escorça cerebral i l'hipocamp [4]. El gran nombre de casos i el grau de deteriorament dels pacients en els estadis més avançats de la malaltia, l'han convertit en un dels problemes sanitaris més importants d'aquest segle.

1.2. Histopatologia: els cabdells neurofibril·lars i les plaques senils

Pel diagnòstic inequívoc de la malaltia de l'Alzheimer es requereix un anàlisi histopatològic *postmortem* del teixit cerebral: s'ha d'observar la presència dels cabdells neurofibril·lars formats per la proteïna Tau, i les plaques senils, formades pel pèptid β -amiloide ($A\beta$). Però, únicament els dipòsits de la proteïna β -amiloide apareixen de forma exclusiva en els malalts de l'Alzheimer. En l'estudi microscòpic, també es pot

veure una reducció del nombre de neurones i disminució de la densitat sinàptica en l'hipocamp, en l'escorça cerebral o en el loci coeruleus.

Els cabdells neurofibril·lars estan formats principalment per la proteïna Tau hiperfosforilada. La Tau és una proteïna associada als microtúbuls molt abundant en neurones on té un paper molt important ja que promou la formació i estabilització dels microtúbuls, regula el transport axonal i intervé en la polaritat neuronal. En el desenvolupament de l'Alzheimer, la Tau és anormalment hiperfosforilada per diferents quinases, i com a conseqüència es dissocia dels microtúbuls. Una vegada dissociada, esdevé insoluble i forma unes estructures filamentoses helicoïdals. Aquestes estructures intracel·lulars, que es troben als cossos neuronals i a les neurites, formen els cabdells neurofibril·lars (veure **Figura 1A**) [5, 6].

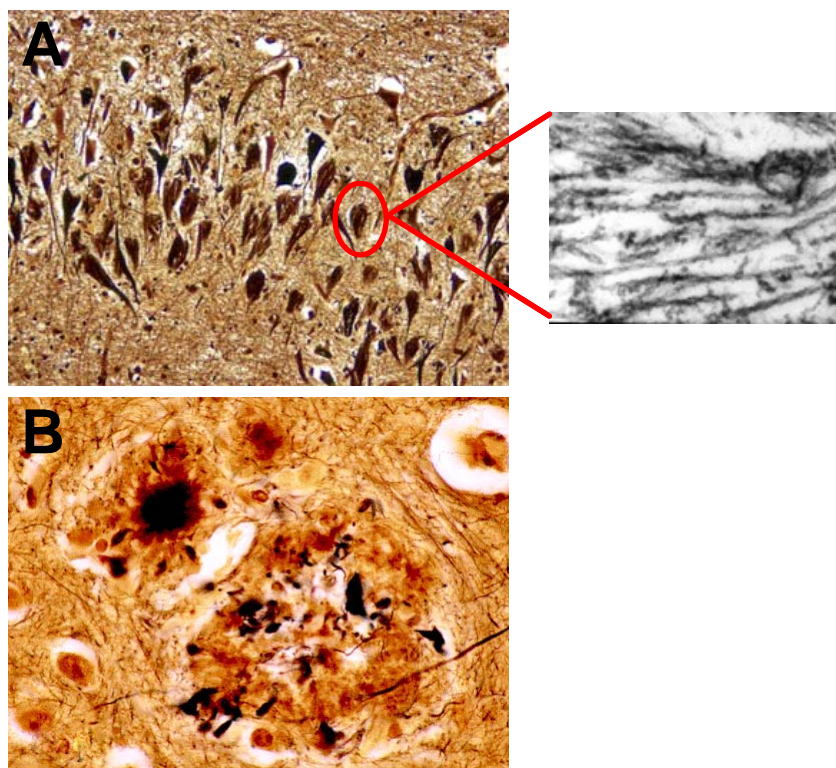


Figura 1. Estudi histopatològic de l'AD. Tinció en plata de les dues estructures característiques de l'estudi histopatològic: els cabdells neurofibril·lars i l'ampliació de les estructures filamentoses helicoïdals (A) i les plaques senils (B). Tret de www.neuropathologyweb.org/.../chapter9bAD.html.

Les plaques senils són unes estructures extracel·lulars formades per un nucli central amiloide envoltat d'axons i neurites degenerants (veure **Figura 1B**). Aquest nucli està envaït de cèl·lules glies com les microglies, i més externament d'astròcits, fet que indica l'existència d'un component inflamatori en el procés de neurodegeneració (revisat a [7]).

Els dipòsits amiloides són acumulacions insolubles del pèptid β -amiloide ($A\beta$). El pèptid β -amiloide es produeix a partir de la proteïna precursora del pèptid β -amiloide (APP) mitjançant uns talls proteolítics (veure l'apartat 3.1.2), que generen una sèrie de pèptids $A\beta$ de longituds variables (39-43 aminoàcids). En aquestes estructures majoritàriament es troben les espècies $A\beta(1-40)$ i $A\beta(1-42)$. Però, és el pèptid $A\beta(1-42)$ (el qual té dos aminoàcids hidrofòbics extra) el més insoluble i té tendència a dipositar-se i formar uns agregats que serveixen de nucli per al dipòsit d'altres formes d' $A\beta$ (revisat a [1]). A més, estudis *in vitro* demostren que, un cop s'ha format un nucli, el creixement de les plaques amiloides és ràpid i és un procés termodinàmicament favorable [8]. Alguns estudis indiquen que únicament les formes agregades d' $A\beta$ són neurotòxiques [9], mentre que altres autors afirmen que la capacitat neurotòxica dels pèptids $A\beta$ és independent de l'estat d'agregació en què es troben [10, 11]. Estudis més recents, asseguren que les espècies més citotòxiques són els oligòmers que es formen durant el procés d'agregació [12, 13].

1.3. L'Alzheimer esporàdic i l'alzheimer familiar

La malaltia de l'Alzheimer es classifica en:

- Alzheimer esporàdic: és el tipus més comú i generalment l'inici dels símptomes apareix en edats avançades (després dels 65 anys) i de desenvolupament lent. La seva causa es desconeix, tot i que s'han descrit diferents factors genètics, que augmentarien la susceptibilitat de desenvolupar la malaltia en presència de determinats factors externs o interns. Com per exemple, mutacions en l'al·lel $\epsilon 4$ de l'apolipoproteïna E (ApoE).
- Alzheimer familiar: es caracteritza per tenir un clar component genètic. Generalment és transmet amb una herència de caràcter dominant amb una elevada penetrància i afecta per igual a homes i a dones. Els símptomes es manifesten abans dels 60-65 anys i es desenvolupa ràpidament.

La majoria dels casos identificats com AD, aproximadament un 95%, són esporàdics i senils. Mentre que només un 1-3% dels casos tenen un clar component genètic i són d'aparició presenil. Aquesta variant minoritària de l'Alzheimer s'anomena Alzheimer familiar precoç.

1.4. Gens responsables de l'Alzheimer familiar precoç

L'estudi genètic de l'Alzheimer familiar precoç durant els últims 15 anys, ha permès identificar tres gens responsables d'aquesta variant de l'Alzheimer: el gen de la proteïna precursora β -amiloide (APP) i els gens de les presenilines 1 i 2 (PS1 i PS2) (veure la **Taula 1**). Les mutacions presents en el gen de la PS1 són les responsables del 50% dels casos d'Alzheimer familiar precoç [14].

Gen	Localització	Núm. de mutacions descrites	Edat d'inici (anys)	Referències
APP	Cromosoma 21q21.1	27	40-60	[15, 16]
PS1	Cromosoma 14q24.3	157	25-64	[17-19]
PS2	Cromosoma 1q42.1	10	40-65	[20, 21]

Taula 1. Resum dels gens implicats en l'Alzheimer familiar precoç.

1.4.1. El gen de la proteïna precursora β -amiloide (APP)

El primer gen associat a l'Alzheimer familiar precoç identificat va ser el gen de l'APP localitzat en el cromosoma 21, el qual es troba triplicat en el Síndrome de Down. Per això, molts pacients amb Síndrome de Down, manifesten l'AD a edats inferiors als 50 anys. Els anàlisis *postmortem* d'aquests individus, es caracteritzen per tenir només plaques senils i no presenten els cabdells neurofibril·lars, suggerint que els dipòsits $A\beta$ són esdeveniments temprants de l'AD (revisat a [22]). Actualment hi ha 27 mutacions descrites en les diferents famílies afectades per l'AD. Totes elles presenten mutacions puntuals que impliquen un canvi d'aminoàcid i es troben aprop dels llocs de tall de la α -, β - i γ -secretasa (veure l'apartat 3.1.2). Per tant, aquestes mutacions, com que afecten a les activitats secretases, tenen un efecte directe en el processament de l'APP i formació del pèptid amiloïdogènic $A\beta(1-42)$ [23]. Totes aquestes mutacions tenen una penetrància completa però amb una edat d'aparició molt variable [24].

1.4.2. Els gens de les presenilines

Els gens de les presenilines 1 i 2 (PS1 i PS2, respectivament) pertanyen a una mateixa família gènica i tenen una homologia del 67% en l'estructura primària.

Actualment s'han descrit 157 i 10 mutacions en els gens de la PS1 i PS2 respectivament [25].

Les mutacions en el gen de la PS1, tenen una edat promig de manifestació inferior als 50 anys. Totes tenen una penetrància del 100% a excepció de la mutació I143F trobada en una família anglesa, la qual té una penetrància incompleta [26]; i la mutació E318G que es considera un factor de risc, és a dir, juntament amb algun altre factor desenvoluparia l'AD [27], (revisat a [28]).

Pel que fa al tipus de mutacions, la majoria són mutacions puntuals que impliquen un canvi d'aminoàcid, que modifiquen residus conservats entre la PS1 i la PS2 humanes, i conservats en les presenilines de ratolí, rata entre d'altres [29]. Hi ha altres mutacions no puntuals identificades en la PS1, són les anomenades $\Delta 9$ (delta 9) i $\Delta 4$ (delta 4). La mutació $\Delta 9$ consisteix en una mutació en el lloc acceptor de *splicing* de l'exó 9, i com a conseqüència hi ha la deleció d'aquest exó acompanyada de la substitució d'un aminoàcid [30]. La mutació $\Delta 4$ consisteix en una deleció de la G de la seqüència consens donadora de *splicing* de l'intró 4. Com a conseqüència, es produeix una maduració aberrant del RNA missatger i es generen diferents trànscripats madurs. La majoria contenen delecions totals o parcials de l'exó 4 amb una pèrdua de la pauta de lectura [31].

El gen de la PS2, va ser identificat per la seva homologia de seqüència amb la PS1 [21], (revisat a [32]). El nombre de mutacions descrites en el gen de la PS2 són menys freqüents que amb la PS1, i totes elles són mutacions puntuals que impliquen un canvi d'aminoàcid. Degut a la baixa incidència de les mutacions de la PS2, es creu que alguns casos podrien passar com a esporàdics. A més, aquestes mutacions es manifesten en edats més tardanes que les mutacions de la PS1. Totes aquestes dades fan pensar que les mutacions de la PS2 desenvolupen formes molt menys agressives de l'Alzheimer familiar precoç [33].

1.4.3. El gen de susceptibilitat a l'AD: l' APOE

L'apolipoproteïna E (APOE) és una glicoproteïna sintetitzada principalment pel fetge, per les neurones, pels astròcits del cervell i altres tipus cel·lulars com els macròfags i monòcits (revisat a [34]). L'APOE actua com a proteïna transportadora de fosfolípids i colesterol en el sistema nerviós i participa en la regeneració nerviosa [35, 36].

L'APOE és el primer factor de risc o gen de susceptibilitat descrit per l'AD. Hi ha tres isoformes de la proteïna: E2, E3 i E4, les quals provenen de tres al·lels diferents $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$. Diferents estudis, han demostrat l'associació entre l'al·lel $\epsilon 4$ i

formes esporàdiques de l'AD (revisat a [34]). La presència de l' APOE $\epsilon 4$ és necessària però no suficient per desenvolupar l'AD, és a dir, cal associar-se amb altres factors genètics o ambientals. Els portadors de l'al·lel APOE $\epsilon 4$ tenen un major risc a desenvolupar l'AD depenent de dosi: els homozigots per l'al·lel APOE $\epsilon 4$ desenvolupen l'AD en edats molt més precoces que els heterozigots [23]. La presència de l'APOE $\epsilon 4$, augmenta els dipòsits β -amiloide, però es desconeix el mecanisme molecular mitjançant el qual exerceix aquesta funció amiloïdogènica (revisat a [1, 37]).

2. LES PRESENILINES

2.1. Característiques generals de les presenilines

Els gens humans de la PS1 i la PS2 codifiquen per unes proteïnes de 467 i 448 aminoàcids respectivament, d'aproximadament 50 kDa. Aquestes dues proteïnes tenen un alt grau d'homologia i el major número de divergències es localitzen en els extrems N- i C-terminal i en el gran loop hidrofílic, situat entre el sisè i setè domini transmembrana (revisat a [38]).

Homòlegs de les presenilines s'han descrit en diferents organismes, no només en mamífers i vertebrats, i mantenen un alt grau d'homologia. La PS1 i la PS2 només es diferencien en un 57% amb la seva homòloga en *Drosophila*, DPS [39]. En *Xenopus*, la PS- α i la PS- β tenen un 90% i un 86% de similitud amb la PS1 i PS2 respectivament [40].

A més, la funció de les presenilines està altament conservada entre els humans i *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). A partir d'un *screening* de supressors d'un mutant amb guany de funció de *lin-12* (Notch), es va identificar *sel-12*, la qual té un 48% d'homologia amb la PS1 humana [41]. L'expressió de la PS1 humana en mutants de *C.elegans* per *sel-12* era capaç de recuperar el fenotip de Notch, confirmant que *sel-12* era una PS [42]. A més, *C.elegans* té una segona PS, *hop-1*, la qual té un 33% d'homologia amb la PS1 humana [43] i també pot recuperar el fenotip de Notch en mutants de *sel-12* (revisat a [44]).

Les presenilines són detectades ubiquament en tots els teixits estudiats, i no només a nivell del sistema nerviós central (SNC) [45], on té una màxima expressió en neurones. Generalment la PS1, té uns nivells d'expressió més alts que la PS2 (revisat a [46]).

Diferents estudis de immunofluorescència han demostrat que les presenilines es localitzen en el reticle endoplasmàtic (RE) i en l'aparell de Golgi, ja que colocalitzen amb proteïnes del RE com la BiP o calnexina i amb marcadors de l'aparell de Golgi com la p210 o p58 [47-49]. També s'ha vist una localització en els endosomes primerencs i vesícules citoplasmàtiques [50], i en la regió perinuclear [51]. A més, un petit percentatge de les PS1, es localitzen a la membrana plasmàtica [51]. Per tant, es considera una localització de les presenilines en tota la via secretora fins a la membrana plasmàtica.

2.2. Models animals i cel·lulars de les presenilines

Hi ha diferents models animals per l'estudi fisiològic i funcional de l'AD. Els ratolins *konck-out* per la PS1, moren abans o immediatament després del naixement, degut a malformacions esquelètiques i neuronals [52, 53]. Aquests ratolins es caracteritzen per tenir malformacions en la columna vertebral, pes i mida reduïda, i una cua curta degut a que, a partir la regió pèlvica, no tenen esquelet caudal. Presenten una severa malformació a la caixa toràcica impedit la correcta funció mecànica dels pulmons. Degut a aquest fet, els ratolins moren per una insuficiència respiratòria en néixer. També presenten formes irregulars i una deficient alineació de les somites, hemorràgies intracraneals i pèrdua de progenitors neurals. Aquestes característiques esquelètiques i de les somites, també s'observen en els ratolins *knock-out* per Notch-1. Per tant, la similitud d'aquests fenotips, va fer pensar, que la PS1 estava implicada en la via de Notch [54], (revisat a [32]).

La reintroducció de la PS1 *wild type* o de formes mutades de la PS1 presents en l'Alzheimer familiar precoç, en els ratolins *knock-out* per la PS1, elimina la mort embrionària [55]. A més, els mutants de la PS1 augmenten els nivells del pèptid amiloide A β (1-42) [56], (revisat a [44]).

Estudis en cèl·lules en cultiu de cervell de ratolins PS1 $^{-/-}$, indiquen la relació entre el metabolisme de l'APP i la PS1. Cèl·lules en cultiu procedents d'embrions de 14 dies, mostren una reducció significativa dels pèptids A β , comparat amb cèl·lules procedents d'individus PS1 $^{+/+}$ [53, 57-59]. La producció residual dels pèptids A β en aquestes cèl·lules PS1 $^{-/-}$, podria ser deguda a la PS2 endògena [53].

Estudis en cèl·lules embrionàries deficientes de la PS1, també són deficientes en l'activitat que allibera el domini intracel·lular de Notch (NICD) [60].

Com que el *knock-out* per la PS1 és letal, diferents grups van utilitzar la tècnica de *Cre/loxP* per crear un *knock-out* condicional, i així, poder estudiar les funcions de la

PS1 en el SNC d'un individu adult [61-63]. A les 6 setmanes de vida, degut a una inactivació postnatal, aquests ratolins ja no expressen les presenilines. La pèrdua de l'activitat de les presenilines en un ratolí adult, té com a conseqüència una degeneració de la part anterior del cervell, un allargament del tercer ventricle, una reducció del gruix del còrtex, del *corpus callosum* i de l'hipocamp. També desenvolupen diferents anomalies cel·lulars com atrofia neuronal, astrogliosis, apoptosi i disminució de la producció dels pèptids A β . Aquests resultats indiquen que les presenilines també estan implicades en el manteniment de les estructures i funcions corticals [61, 62], (revisat a [46]).

El ratolí *knock-out* per la PS2, a diferència del *knock-out* per la PS1, és viable, fèrtil, no presenta anomalies en el metabolisme de l'APP i aparentment té un fenotip normal [64]. Amb l'edat, els ratolins PS2 $^{-/-}$ presenten fibrosis pulmonars i com a conseqüència desenvolupen hemorràgies pulmonars [65]. Es creu, que es manté el fenotip degut a la presència de la PS1.

El doble *knock-out* per la PS1 i la PS2, és letal ja en el dia 9.5 del desenvolupament embrionari i presenta malformacions més severes que el *knock-out* PS1 $^{-/-}$. Presenten anomalies molt greus en els pulmons, en el cor, en el tub neural, deficiències en la segmentació de les somites entre d'altres (revisat a [44]), indicant que les presenilines són essencials pel correcte desenvolupament embrionari.

Estudis en cèl·lules en cultiu procedents de ratolins PS1 $^{-/-}$:PS2 $^{-/-}$, demostren que amb la pèrdua total de les presenilines hi ha una absència de producció dels pèptids A β i una acumulació dels seus fragments precursors [60]. Aquests resultats indiquen una redundància funcional entre les presenilines. També suggereixen que les presenilines són el propi enzim γ -secretasa o un factor essencial en el tall depenent de l'activitat γ -secretasa, en el processament de l'APP (veure apartat 3.1.2).

2.3. La presenilina 1 (PS1)

2.3.1. Topologia de la PS1

A partir diferents estudis d'anàlisi d'hidrofobicitat de la seqüència aminoacídica de la PS1, es van identificar 10 regions hidrofòbiques i totes elles eren teòricament dominis transmembrana. Per tant, es va predir que la PS1 era una proteïna integral de membrana, que podia tenir de 7 a 10 dominis transmembrana (TM). Degut aquesta ambigüitat, s'han postulat diferents topologies per la PS1 [66-71].

La més acceptada és la topologia de vuit dominis TM. Es caracteritza per tenir els extrems amino i carboxiterminals, així com una gran regió hidrofílica entre els dominis TM VI i VII, tots situats en el citosol (veure la **Figura 2**). Aquesta predicció va sorgir de diferents estudis *in vivo* en *C.elegans* de diferents formes truncades de *sel-12* fusionades amb β -galactosidasa [72, 73] i per estudis d'immunocitoquímica amb anticossos envers la PS1 en cèl·lules semipermeabilitzades [74], (revisat a [68]).

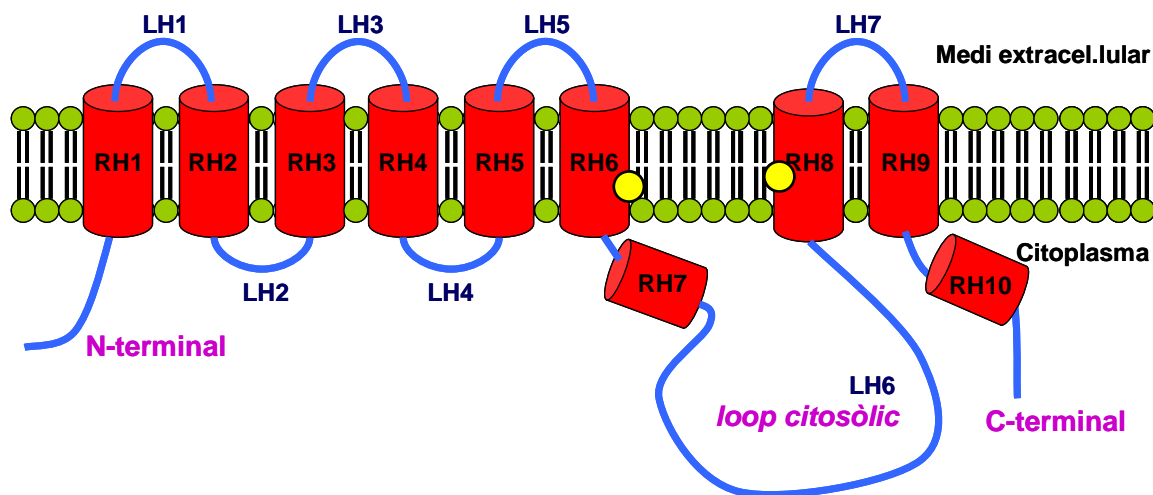


Figura 2. Representació de la topologia més acceptada de la PS1. RH, regió hidrofòbica; LH, loop hidrofílic; cercle groc, aspàrtics conservats.

2.3.2. Modificacions postraduccionals de la PS1

➤ Endoproteolisi

La PS1 és sintetitzada com un únic polipèptid de 50 kDa aproximadament, anomenat holoproteïna. L'holoproteïna és endoproteolitzada en el domini hidrofòbic 7, que forma part del gran loop hidrofílic, a partir d'unes "presenilinasas" no identificades. Com a conseqüència es generen dos fragments, de 30 i 20 kDa que corresponen a l'extrem N-terminal (NTF) i C-terminal (CTF), respectivament. Aquests fragments NTF i CTF es mantenen associats formant un heterodímer, amb una estequiometria 1:1 [75, 76] (veure la **Figura 3**).

En cèl·lules transfectades, només una petita part de la PS1 sobreexpressada es converteix en NTF i CTF; mentre que la majoria de la PS1 sintetitzada *de novo*, és ràpidament degradada via proteosoma, ja que hi ha un excés d'holoproteïna. Aquests resultats indiquen, que l'acumulació dels fragments NTF i CTF de la PS1 és un procés regulat i saturable [77], (revisat a [78]). En ratolins transgènics que expressen la PS1 humana, també es demostra que els nivells de NTF/CTF són saturables i que és

produeix el fenomen del reemplaçament. Aquest fenomen consisteix en la substitució dels fragments endògens de la PS1 de ratolí, pels fragments de la PS1 humana que s'està sobreexpressant [75], (revisat a [44]). Aquest fet també s'ha observat en cèl·lules en cultiu transfectades amb PS1 exògena [79]. Aquest reemplaçament es invers a la quantitat de PS1 exògena expressada [80]. Aquestes dades suggereixen que la PS1 exògena i endògena competeixen per un factor limitant, el qual regula la producció i/o estabilització dels fragments endoproteolítics [77], (revisat a [44]).

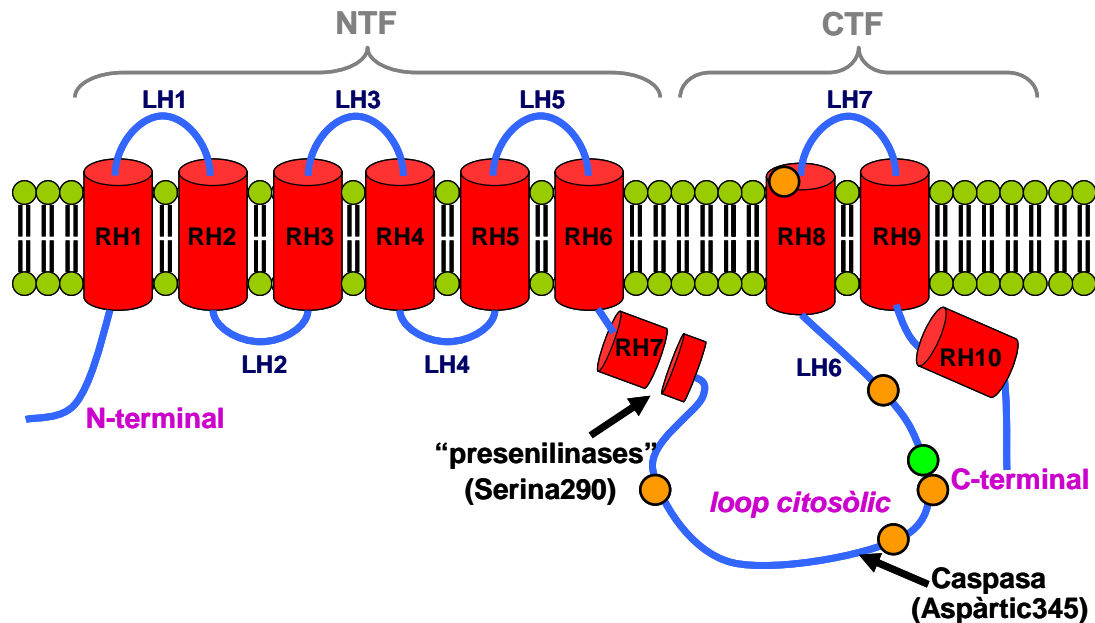


Figura 3. Esquema de les diferents modificacions postraduccionals de la PS1. Els cercles taronges, representen els residus serina que són fosforilats per la PKA, PKC i la GSK3 β . El cercle verd clar, representa el residu treonina fosforilat per la cdk5/p35.

Diferents estudis d'estabilitat, demostren que la vida mitja de l'holoproteïna és de 1-2 hores aproximadament. Mentre que, la vida mitja dels fragments NTF i CTF és superior a les 24 hores. Per tant, l'heterodímer és la forma estable de la PS1 [81, 82]. El mutant $\Delta 9$ de la PS1 es manté com a holoproteïna i té una vida mitja igual que els fragments endoproteolitzats [82, 83]. Aquests resultats suggereixen, que primer hi ha una estabilització de l'holoproteïna per la unió a un factor limitant, i després es produeix el procés d'endoproteolisi.

Algunes de les mutacions descrites en el gen de la presenilina 1, en la variant de l'Alzheimer anomenada Alzheimer familiar precoç, tenen com a conseqüència una pèrdua del processament de la PS1. Per exemple, el mutant $\Delta 9$ (mencionat anteriorment) que consisteix en la deleció de l'exó 9 acompanyada de la substitució de la serina 290 per una cisteïna amb la conseqüent pèrdua de la seqüència de tall de les

“presenilines”, no sofreix l'endoproteolisi. Per tant, no hi ha la formació dels fragments N- i C-terminals i es manté com a holoproteïna [30].

Altres mutacions artificials com per exemple les mutacions dels residus altament conservats Asp257 i Asp385, situats en els dominis transmembrana 6 i 7, respectivament, tampoc generen els fragments N- i C-terminals. A més, totes aquestes mutacions tenen alterada l'activitat γ -secretasa [84, 85]. També s'ha descrit que la integritat de l'extrem C-terminal és essencial pel correcte processament de la PS1. Deleccions dels últims aminoàcids o la incorporació d'un epítot en l'extrem C-terminal, disminueix el processament de la PS1 [86, 87].

➤ **Processament per les caspases**

La PS1 pot tenir un processament alternatiu a l'endoproteolisi, induït per les proteases de la família de les caspases [88].

Quan s'activa la via apoptòtica, s'activen diferents membres de la família de les caspases. Les caspases són cisteïna proteases, les quals generen un tall entre un aspàrtic i una serina. La PS1 és un substrat de la Caspasa 3, la qual talla la PS1 en el loop hidrofílic, a C-terminal del tall endoproteolític (veure **Figura 3**). No se sap si l'acció de la Caspasa 3 sobre la PS1 és important per regular l'apoptosi o només és un dels molts substrats innocents de la Caspasa 3, que no estan implicats en la via apoptòtica. Estudis preliminars indiquen que l'extrem C-terminal derivat de la caspasa podria tenir un efecte antiapoptòtic [89], (revisat a [90]).

➤ **Modificacions per fosforilació**

Les presenilines experimenten altres tipus de modificacions postraduccionals, independents als mecanismes de processament. Fins ara, no s'ha descrit cap modificació per glicosilació en la PS1, però, si s'han descrit modificacions per fosforilació en diferents residus situats en el loop hidrofílic (veure la **Figura 3**).

La fosforilació del residu serina 310, situat en el loop hidrofílic, tant *in vitro* com en cèl·lules en cultiu, és catalitzada per la proteïna quinasa A (PKA). Mentre que, la fosforilació del residu serina 346, situat en el lloc de reconeixement de les caspases, és fosforilat per la PKC. Aquesta fosforilació inhibeix el processament per les caspases durant l'apoptosi. Per tant, la fosforilació de la PS1 redueix la progressió de l'apoptosi [90].

També, s'han trobat diferents dianes consens de fosforilació per la glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) en el loop hidrofílic i en altres regions de la PS1. La

fosforilació en el residu serina 397 per la GSK3 β , promou la degradació del CTF [91, 92].

En canvi, tant en estudis *in vitro* com en cèl·lules en cultiu, la fosforilació del residu treonina 354, per la quinasa depenent de ciclina 5 (cdk5/p35), estabilitza el CTF. Aquesta quinasa, és la única de la seva família, que és activa en neurones madures [93].

2.3.3. Interacció de la PS1 amb altres proteïnes

Una manera d'estudiar la funció desconeguda d'una proteïna, és la recerca de les proteïnes que interaccionen, per així poder-la situar en un context cel·lular específic o via de senyalització. Les tècniques utilitzades en aquests estudis són les del doble híbrid i assaigs de coimmunoprecipitació [94], (revisat a [95]). Aquestes tècniques han permès identificar una cinquantena de proteïnes que interaccionen amb la PS1. A la taula següent és mostren algunes d'elles:

Nom	Regió d'unió en la PS1	Tipus d'assaig	Funció	Referències
APP	Loop hidrofílic	Co-IP	Senyalització i adhesió	[96]
β -catenina	Loop hidrofílic	Sistema 2H; co-IP	Senyalització i adhesió	[97]
NRAP	Loop hidrofílic	Sistema 2H; co-IP	Formació d'extensions cel·lulars	[98]
GSK3 β	Loop hidrofílic	Co-IP	Senyalització	[99]
Tau	Loop hidrofílic	Co-IP	Microtubular	[99]
Notch	Holoproteïna	Co-IP	Senyalització	[100]
Aph-1	Holoproteïna CTF	Co-IP	Complex γ -secretasa	[101]
Nicastrina	Holoproteïna CTF	Co-IP; Interacció directe	Complex γ -secretasa	[102]
Pen-2	Holoproteïna NTF	Co-IP	Complex γ -secretasa	[103]
Cadherines	Loop hidrofílic	Co-IP	Adhesió i senyalització	[104]
Ubiquilina	CTF	Sistema 2H; co-IP	Degradació	[105]

Taula 2. Algunes de les proteïnes que interaccionen amb la PS1. No totes les funcions associades a les proteïnes han estat demostrades. NTF, fragment N-terminal de la PS1; CTF, fragment C-terminal de la PS1; Co-IP, coimmunoprecipitació; sistema 2H, sistema del doble híbrid; APP, proteïna precursora β -amiloide; NRAP, proteïna armadillo relacionada amb la plakofilina neural; GSK3 β , glicogen sintasa quinasa 3 β ; Aph-1, *anterior pharynx defective*; Pen-2, *presenilin enhancer 2*.

3. FUNCIONS DE LA PS1

3.1. La PS1: component del complex γ -secretasa

3.1.1. El complex γ -secretasa

En assaigs de purificació parcial de l'activitat γ -secretasa amb diferents detergents, es va observar la presència dels fragments N- i C-terminals de la PS1 en uns complexos d'elevat pes molecular, de 200-2000 kDa aproximadament [106-109]. En els últims anys, a partir d'estudis bioquímics i d'aproximacions genètiques, s'han identificat quatre components presents en el complex γ -secretasa: la presenilina, la nicastrina, l'aph-1 (*anterior pharynx defective*) i el pen-2 (*presenilin enhancer 2*). Diferents estudis indiquen que restaurar l'activitat γ -secretasa, tant en *S.Cerevisiae*, que no té activitat γ -secretasa endògena, com en cèl·lules Sf9, només depèn de la coexpressió dels quatre components identificats [110, 111]. Per tant, la PS1, la nicastrina, l'aph-1 i el pen-2 són els responsables de l'activitat γ -secretasa. Es creu que es poden formar quatre o més complexos γ -secretasa segons la incorporació exclusiva de les subunitats de la presenilina (PS1 o PS2) i de l'aph-1 (aph-1A o aph-1B) [112], (revisat a [113]).

L'activitat γ -secretasa consisteix en el processament, en el domini transmembrana, de les proteïnes tipus I. Les proteïnes transmembrana de tipus I es caracteritzen per tenir un gran domini N-terminal extracel·lular, un únic domini transmembrana i un domini citosòlic curt corresponent a l'extrem C-terminal. Els primers substrats que es van descriure del complex γ -secretasa van ser la proteïna precursora β -amiloide (APP) i el receptor Notch.

➤ La PS1

Hi ha diferents evidències que indiquen que la PS1 és la subunitat catalítica de la γ -secretasa, tot i que no presenta les característiques típiques d'una proteasa. En l'Alzheimer familiar precoç, la majoria de mutacions presents en la PS1 presenten una sobreproducció del pèptid amiloide $A\beta(1-42)$ [114, 115]. Aquests resultats són la primera evidència que la PS1 facilita l'activitat γ -secretasa. La mutació dels dos residus aspàrtics altament conservats en els dominis transmembrana 6 i 7 de la PS1, té com a resultat una disminució de la producció dels pèptids $A\beta$ [84, 116], (revisat a [117]). A més, inhibidors i inhibidors anàlegs transitoris d'aspartil proteases s'uneixen

covalentment a la PS1 i bloquegen la formació dels pèptids A β (1-40) i A β (1-42) [76, 118, 119].

La PS1 és una proteïna transmembrana atípica respecte les aspartil proteases convencionals, ja que no presenta la seqüència D(T/S)G típica del centre actiu d'aquestes proteases (revisat a [120]). No obstant, si té dos residus aspàrtic (D257 i D385), essencials pel centre actiu del complex γ -secretasa [84, 121]. Estudis recents, han permès identificar una cavitat hidrofílica entre els dominis transmembrana 6 i 7, és a dir, davant els residus aspàrtic necessaris per l'activitat γ -secretasa [122], (revisat a [123]). Per tant, en el centre catalític del complex γ -secretasa hi ha molècules d'aigua, necessàries per la hidròlisi de l'enllaç peptídic que duu a terme sobre els seus substrats. Aquests resultats permeten explicar la controvèrsia establerta sobre com l'activitat γ -secretasa podia proteolitzar els seus substrats en un ambient totalment hidrofòbic, és a dir, en el domini transmembrana. Altres proteases com les aspartil proteasa bacterianes ancorades a la membrana, les proteases prepelins tipus 4 i les peptidases senyal, també tenen una seqüència aspartil atípica (GxGD) en el centre actiu. Totes elles tenen una certa homologia amb la PS1. Aquestes proteases produeixen un tall en el domini transmembrana de proteïnes tipus I (revisat a [124]). Aquestes proteïnes, tant per la topologia com per les característiques atípiques que presenten, serien un precedent de proteases a la PS1.

➤ La nicastrina

La nicastrina va ser descrita com a component del complex γ -secretasa quan es va trobar que coimmunoprecipitava amb la PS1 [102]. És una proteïna transmembrana de tipus I de 670 aminoàcids, amb un gran domini hidrofílic N-terminal, un domini transmembrana i un domini citosòlic C-terminal d'aproximadament 20 aminoàcids (veure la **Figura 4**). Té un pes molecular de 80 kDa que després de passar per la via secretora, on és glicosilada, es genera la forma madura de 150 kDa [125-127]. En l'aparell de Golgi és on es troba per primera vegada la forma madura de la nicastrina que és manté fins a la membrana plasmàtica [128]. Cal destacar, que deleccions en l'extrem C-terminal de la PS1 impedeixen avançar en la via secretora i per tant, hi ha una disminució de la glicosilació de la nicastrina [87, 129]. A més, aquests autors suggereixen que la glicosilació no és necessària per interaccionar amb el fragment CTF de la PS1. Diferents estudis indiquen que la nicastrina es essencial per la correcta formació del complex, des del RE, durant el transport intracel·lular i fins la superfície cel·lular [130]. La nicastrina interacciona amb l'extrem C-terminal de l'APP i de Notch, ambdós substrats de l'activitat γ -secretasa. Per tant, la nicastrina actuaria

com a receptor pels substrats de la γ -secretasa [130, 131]. A més, mutacions o la inhibició de la funció de la nicastrina en *Drosophila* o en cèl·lules en cultiu, té com a resultat la pèrdua total del tall γ -secretasa en l'APP i en Notch. Aquests resultats indiquen que la nicastrina és un component essencial del complex γ -secretasa [132, 133], (revisat a [117]).

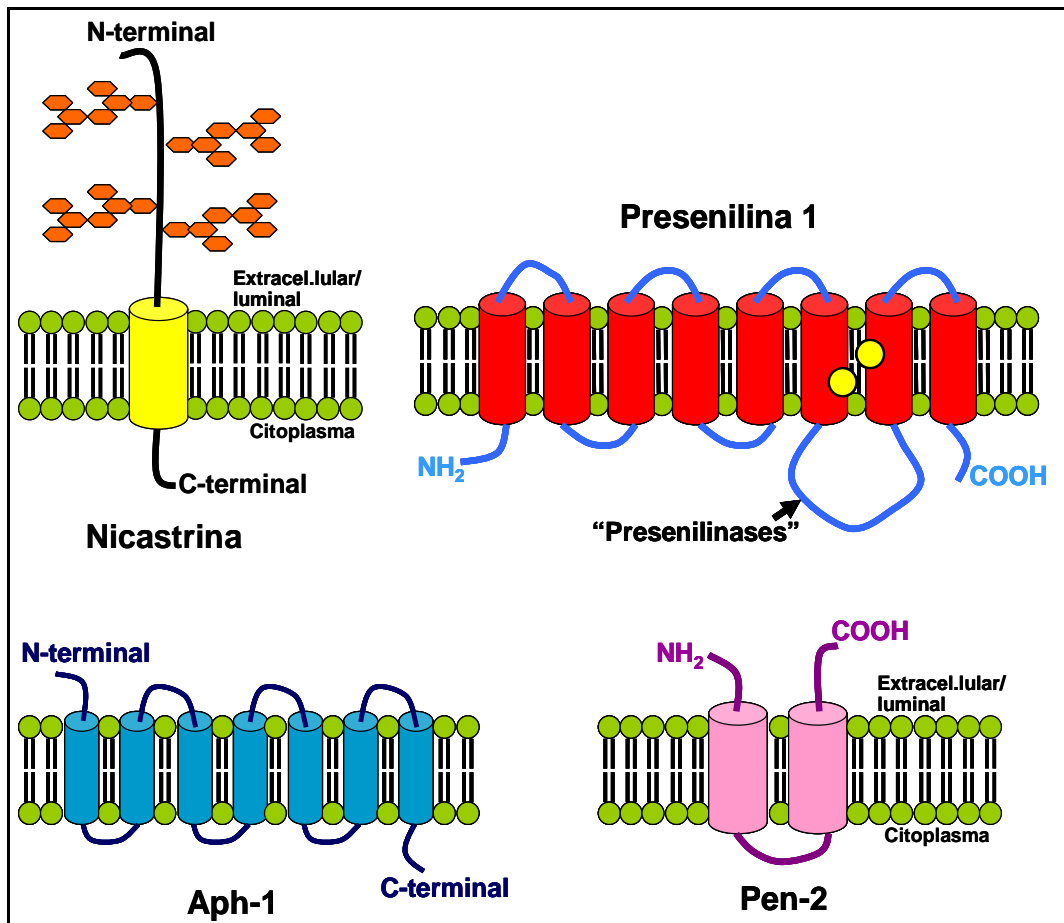


Figura 4. Components del complex γ -secretasa. Representació de la nicastrina madura (els hexàgons taronges de la nicastrina representen les molècules de sucres afegides després de la N-glicosilació). Els cercles grocs de la PS1 representen els dos aspàtics necessaris pel centre actiu. Aph-1, *anterior pharynx defective*; Pen-2, *presenilin enhancer 2*.

➤ L'aph-1

L'aph-1 va ser identificada a partir d'un rastreig genètic de mutacions que afectaven la funció de Notch o de la PS1 en *C.elegans* [134]. L'aph-1 és una proteïna de 30 kDa, 308 aminoàcids i 7 dominis transmembrana (veure la **Figura 4**). Existeixen dues formes homòlogues, localitzades en el cromosoma 1 i 15, l'aph-1A i l'aph-1B respectivament [135]. A partir d'un processament alternatiu d'aph-1A, es generen dues isoformes. La isoforma més curta és la més abundant en la majoria de teixits, però la

seva funció encara es desconeix. S'ha observat que la deleció de l'aph-1A redueix la formació dels pèptids A β durant el desenvolupament embrionari [136, 137]. S'ha descrit que l'aph-1 s'uneix a formes madures i immadures de la nicastrina i de la PS1 [101]. Diferents estudis demostren que la pèrdua de l'aph-1 desestabilitza la forma d'holoproteïna de la PS1 [138, 139], (revisat a [95]).

➤ Pen-2

Pen-2, igual que l'aph-1, va ser identificada per rastreig genètic de mutacions que afectaven la funció de Notch o de la PS1 en *C.elegans*. Pen-2 és una proteïna petita d'aproximadament 12 kDa, 101 aminoàcids, que presenta dos dominis transmembrana amb els extrems N- i C-terminals situats en l'espai luminal del RE (veure la **Figura 4**). No presenta homologia amb cap proteïna descrita (revisat a [117]). Pen-2 interacciona amb la nicastrina, l'aph-1 i la PS1. Quan no està interaccionant és degradada, possiblement via proteosoma [140]. La pèrdua de pen-2, redueix significativament l'endoproteolisi de la PS1 i la producció dels fragments A β , indicant que pen-2 és necessari tant per les presenilinas com per l'activitat γ -secretasa [135, 141]. El subcomplex format per la nicastrina, l'aph-1 i la PS1 ha estat identificat en cèl·lules que no expressen pen-2, suggerint que pen-2 és l'últim component incorporat al complex γ -secretasa [142]. Evidències recents, indiquen que pen-2 és incorporat al complex a través de la seva interacció amb la PS1 [103]. L'endoproteolisi de la PS1 té lloc en el loop hidrofílic, lluny del domini transmembrana 4 per on interacciona pen-2, suggerint que el domini d'interacció de pen-2 no seria responsable del processament de la PS1. Potser pen-2, només presenta la PS1 a les presenilinas, les quals podrien ser un altre membre del complex.

➤ Formació del complex γ -secretasa

La formació del complex γ -secretasa s'inicia a les membranes del RE, on la nicastrina actua com a proteïna adaptadora interaccionant amb l'aph-1 [143] (veure la **Figura 5**). Aquest subcomplex és estable i està format per una nicastrina immadura, no glicosilada. La PS1, en forma d'holoproteïna, és incorporada al complex nicastrina immadura-aph-1 i promou la translocació a l'aparell de Golgi, *trans*-Golgi i fins a la membrana cel·lular o compartiments endosomals/lisosomals. Amb la incorporació de la PS1, la nicastrina és modificada postranscripcionalment (N-glicosilada), ja que es promou el transport entre RE i Golgi/*trans*-Golgi.

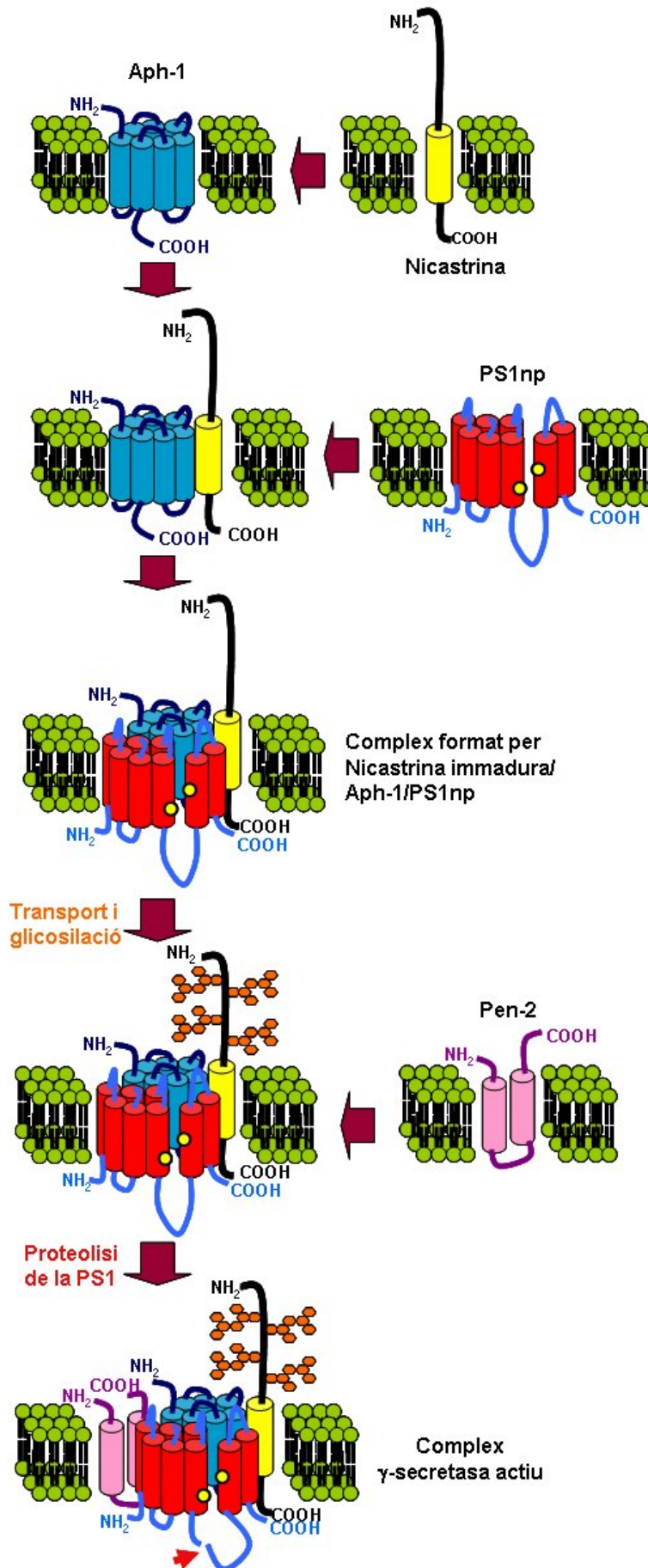


Figura 5. Formació del complex γ -secretasa. Incorporació seqüencial de la nicastrina, l'aph-1, la PS1 i finalment de pen-2. Els hexàgons taronges incorporats al domini extracel·lular de la nicastrina, són els sucres afegits després de la N-glicosilació. La fletxa vermella en el complex actiu indica l'endoproteolisi de la PS1, generant els fragments N- i C-terminals.

Una vegada format el complex nicastrina madura·aph-1·PS1 holoproteïna, s'incorpora pen-2, que promou l'endoproteolisi de la PS1 i la formació del complex γ -secretasa actiu. Pen-2 també estabilitza els fragments NTF i CTF de la PS1 [144]. Una vegada a la membrana plasmàtica, on és localitzen els seus substrats, el complex γ -secretasa ja està totalment format, activat i a punt per dur a terme la seva funció γ -secretasa (revisat a [91, 202]).

El complex nicastrina immadura·aph-1 que incorpora la PS1- Δ 9, incapaç de ser tallada per les presenilinas, permet una correcta maduració de la nicastrina, la incorporació de pen-2 i una activació completa del complex γ -secretasa [81, 198]. Per tant, l'endoproteolisi de la PS1 no sembla imprescindible per l'activació del complex γ -secretasa.

3.1.2. Processament de l'APP

La proteïna precursora β -amiloide (APP) és una proteïna transmembrana de tipus I, molt conservada en l'evolució. S'expressa ubiquament i presenta diferents isoformes produïdes per processaments alternatius, els quals generen pèptids de 695 a 770 aminoàcids.

Durant la traducció, l'APP és insertada en el reticle endoplasmàtic mitjançant un pèptid senyal. A continuació, en la via secretora, sofreix diferents modificacions postraduccionals com els processos de N- i O-glicosilació, de sulfatació i fosforilació (revisat a [7]).

Diferents estudis *in vitro*, han permès atribuir a l'APP diferents funcions com adhesió i migració de cèl·lules neuronals, creixement axonal, neuroprotecció, transport de vesícules axonals i transducció de senyals [145], (revisat a [34]).

El processament de l'APP té lloc en tots els teixits estudiats, no només en cèl·lules neuronals. La formació dels pèptids β -amiloide és el resultat de l'actuació de diferents proteïnes secretases sobre l'APP. El processament de l'APP té lloc per dues vies diferents: la via no amiloïdògena i la via amiloïdògena (revisat en [46]).

La via no amiloïdògena: l' α -secretasa talla el domini A β de l'APP, entre els residus 16 i 17, i genera un fragment soluble anomenat α -APP que és alliberat al medi extracel·lular, i un fragment carboxiterminal de 83 aminoàcids que queda retingut a la membrana. El fragment C83 és processat per l'activitat γ -secretasa en els residus 711 o 713, formant uns pèptids de 3 kDa, anomenats p3, de naturalesa soluble i de característiques no amiloïdògeniques (veure la **Figura 6A**).

El tall de l' α -secretasa és un procés constituït però regulat per la proteïna quinasa C (PKC) (revisat a [146]). S'han descrit diferents membres de la família ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) que podrien actuar com a α -secretasa; concretament les metal·loproteases TACE (enzim conversor del factor de necrosi tumoral α) o ADAM-17, i l'ADAM-10 [147], (revisat a [28]).

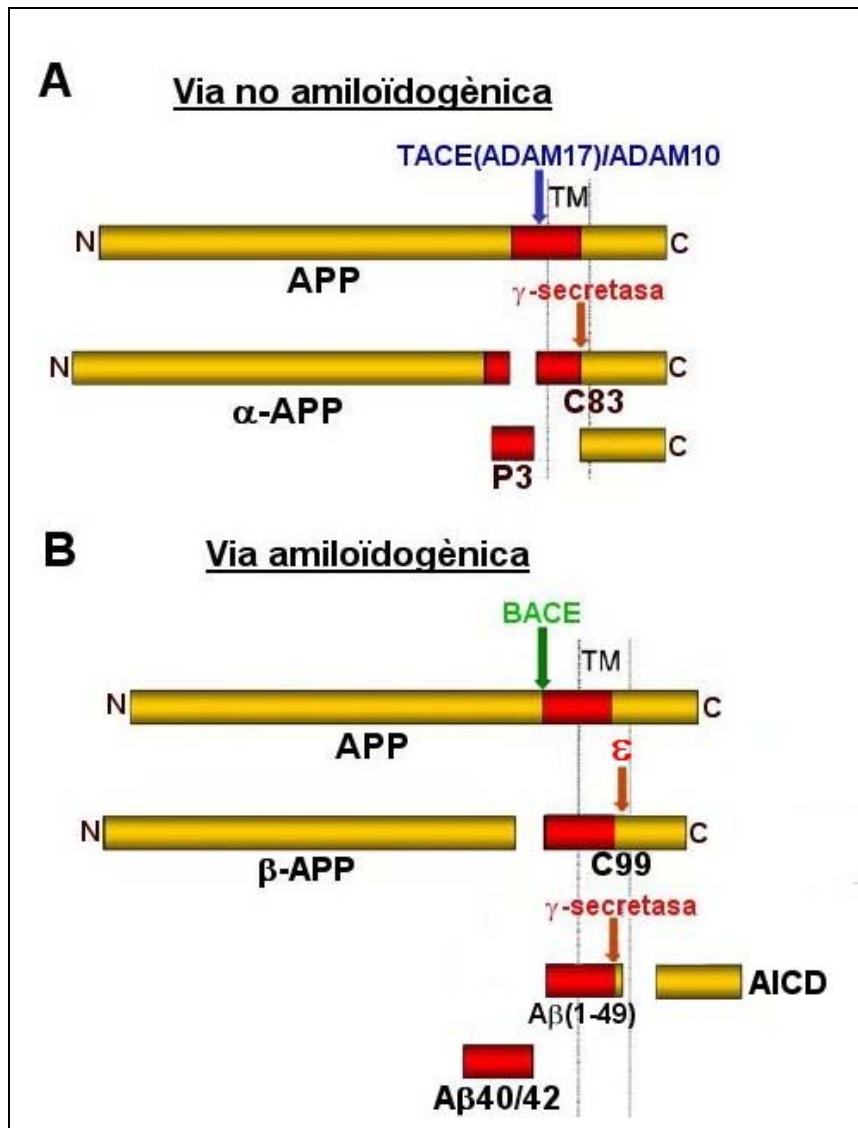


Figura 6. Esquema de les vies de processament de l'APP. **A.** Via no amiloïdògena caracteritzada per l'acció de la α - i γ -secretasa sobre l'APP i formació dels pèptids p3. **B.** Via amiloïdògena caracteritzada pel processament de l'APP per l'activitat β -secretasa (BACE) generant un fragment ancorat a la membrana anomenat C99. El fragment C99 és substrat de l'activitat γ -secretasa (tall epsilon) generant un fragment ancorat a la membrana $A\beta(1-49)$ i un fragment corresponent el domini intracel·lular de l'APP, anomenat AICD. El fragment $A\beta(1-49)$ és de nou substrat de la γ -secretasa formant el pèptid amiloïdògenic $A\beta(1-42)$. El fragment vermell correspon al domini $A\beta$.

La via amiloïdogenica: la β -secretasa talla en l'extrem aminoterminal del domini $A\beta$ de l'APP i genera un pèptid soluble anomenat β -APP, i un fragment ancorat a la membrana, C99, de 99 aminoàcids (veure la **Figura 6B**). Aquest fragment és potencialment amiloïdogenica ja que conté la totalitat del domini $A\beta$. A continuació, el C99 és processat en el residu 49 i es genera un pèptid amiloide anomenat $A\beta(1-49)$ i un fragment soluble intracel·lular (AICD). Aquest tall s'anomena ϵ , i depèn de l'activitat γ -secretasa [148, 149]. El pèptid $A\beta(1-49)$ és de nou substrat de l'activitat γ -secretasa, que talla inespecíficament en els residus 40 o 42, generant la forma curta $A\beta(1-40)$ o la forma llarga $A\beta(1-42)$, respectivament, dels pèptids amiloides [149, 150], (revisat a [22]).

L'enzim amb activitat β -secretasa és l'aspartil proteasa BACE (β -site APP cleaving enzyme). En condicions normals, aquesta via amiloïdogenica és minoritària. Normalment hi ha un producció d'un 90% del pèptid $A\beta(1-40)$ i només d'un 10% del pèptid amiloïdogenica $A\beta(1-42)$. Però totes les mutacions trobades en l'APP, prop dels llocs de tall de la α -, β - i γ -secretasa, tenen com a conseqüència un augment en la formació del pèptid amiloïdogenica $A\beta(1-42)$ [23], (revisat a [22]).

3.1.3. Processament de Notch

El receptor Notch també és una proteïna transmembrana de tipus I implicada en les fases inicials del desenvolupament embrionari i, en adults, en el manteniment de l'homeostasi. El gran domini extracel·lular de Notch, presenta repeticions en tàndem del factor de creixement epidèrmic (EGF) i tres llocs d'unió de Ca^{2+} . En mamífers, s'han descrit quatre homòlegs de Notch (Notch1-Notch4) i cinc lligands diferents (Delta1, Delta-like3, Delta-like4, Jagged1 i Jagged2) (revisat a [151]).

Notch és sintetitzat com un precursor de 300 kDa en el RE i processat per tres activitats proteasa diferents. Durant la via secretora, en el trans-Golgi, aquest precursor és processat en la part luminal per una convertasa de tipus furina (S1). Com a conseqüència es generen dos fragments, un fragment extracel·lular i un altre transmembrana/intracel·lular que es mantenen associats formant un heterodímer (veure la **Figura 7**). Aquest heterodímer és la forma majoritària del receptor Notch a la membrana cel·lular.

Els lligands de Notch són membres de la família Delta/Serrate/Jagged i també són proteïnes transmembrana tipus I. Per tant, la senyalització es realitza per contacte cèl·lula-cèl·lula. Una vegada el lligand ha interaccionat amb el receptor Notch, es produeix l'alliberament del domini extracel·lular de Notch degut a l'acció

d'una metal·loproteasa. La proteasa responsable d'aquest tall anomenat S2, és la TACE/(ADAM17). El fragment restant, anclat a la membrana, és processat a nivell del domini transmembrana (S3) per acció de la γ -secretasa (**Figura 7**). Com a resultat del tall S3, es genera un fragment corresponent al domini intracel·lular de Notch (NICD). Aquest fragment pot translocar al nucli on s'associa amb factors de transcripció de la família CSL (*C promoter binding factor/Suppressor of Hairless/Lag-1*) regulant l'expressió dels gens diana (revisat a [151, 152]). El NICD està implicat en diferents processos com per exemple la inhibició de la diferenciació neuronal, el creixement de les neurites i la regulació de la mort neuronal [153].

Aquests talls seqüencials, recorden els talls de les diferents secretases que actuen sobre l'APP [154].

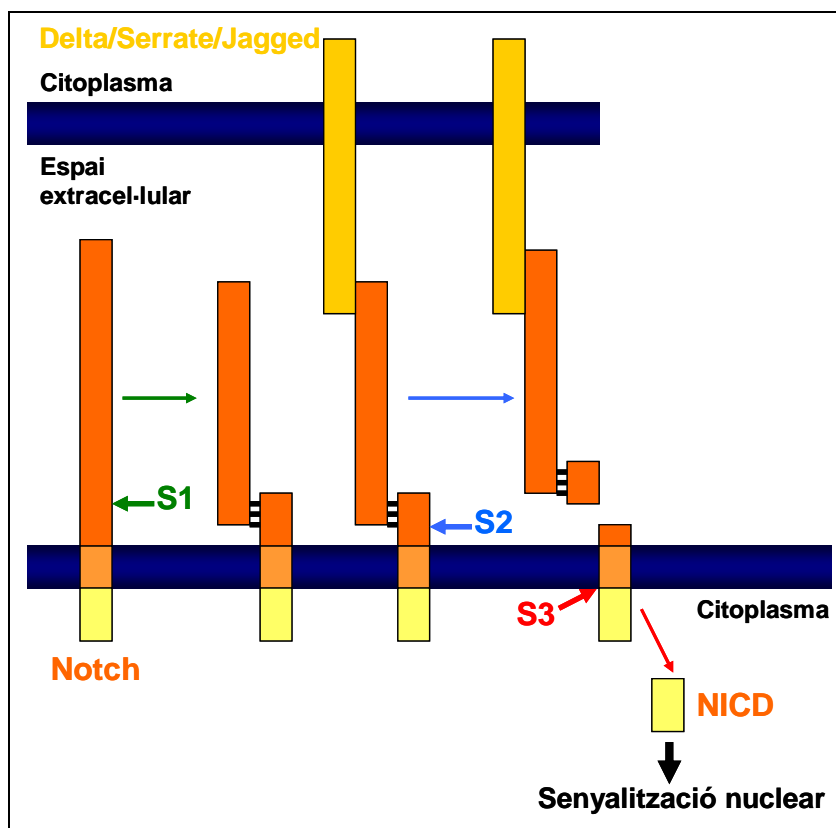


Figura 7. Esquema del processament seqüencial del receptor Notch. El precursor de Notch és processat per convertases de la família furina (S1) formant un fragment extracel·lular i un altre transmembrana que es mantenen associats no covalentment. Una vegada el lligand ha interaccionat amb Notch, per acció de TACE (S2) s'allibera el domini extracel·lular de Notch. El fragment restant ancorat a la membrana és processat per l'activitat γ -secretasa (S3), generant un fragment corresponent al domini intracel·lular de Notch (NICD).

3.2. Regulador negatiu de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina

Tal mostra la **Taula 2**, hi ha evidències que indiquen que la PS1 interacciona amb factors involucrats en la ruta Wnt, com la GSK3 β i la β -catenina. L'activació d'aquesta ruta origina la translocació al nucli de la β -catenina i l'activació de gens dependents del complex Tcf-4- β -catenina. Aquesta ruta de senyalització juga un paper clau en les etapes inicials del desenvolupament embrionari i es troba alterada en molts tumors epitelials, especialment de colon. En aquests tumors apareixen mutacions en elements de la ruta que causen un augment de la vida mitja de la β -catenina i com a conseqüència un augment en l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina [155-157].

3.2.1. La β -catenina

➤ Característiques generals

L'estructura de la β -catenina (781 aminoàcids) consisteix en tres dominis: un domini N-terminal d'uns 150 aminoàcids, un domini armadillo central de 550 aminoàcids i un extrem C-terminal format per uns 100 aminoàcids (veure la **Figura 8**) [158].

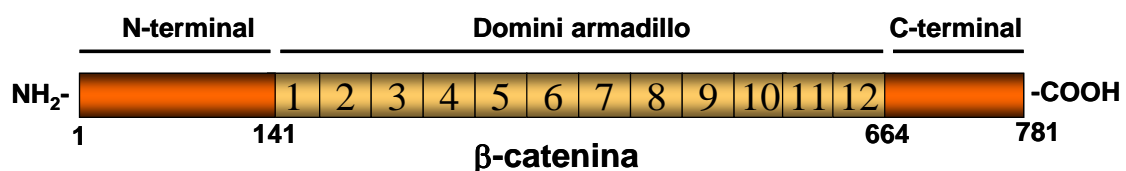


Figura 8. Representació esquemàtica dels dominis de la β -catenina.

L'extrem N-terminal té la zona d'unió a l' α -catenina (120-151 aa) [159], i llocs de fosforilació per la GSK3 β [160].

Per l'extrem C-terminal interaccionen molts factors de la maquinària transcripcional com CREB [161, 162], Sox 17 i 13 [163], SMAD4 [164] entre d'altres. A més, aquest domini és essencial per la transcripció mediada per factors de la família Tcf/LEF [165]. Així, l'extrem C-terminal de la β -catenina, fusionat a Lef-1, és suficient per promoure la transactivació gènica [166].

El domini central o domini armadillo, ha estat cristal·litzat [167] i es tracta d'una unitat molt estable formada per 12 repeticions de 42 aminoàcids cada una.

Cada repetició consta de tres petites hèlices α . Aquestes hèlices formen amb les hèlices adjacents, una superhèlice cilíndrica i molt rígida. La regió armadillo és un domini d'interacció proteïna-proteïna. En el cas de la β -catenina, d'unió a múltiples cofactors com l'E-cadherina, el Tcf-4, la TBP, l'APC i l'axina, amb la majoria dels quals forma complexos mútuament excloents. Resultats descrits pel nostre grup [168-170] demostren que els extrems terminals de la β -catenina interaccionen amb el domini armadillo i aquesta interacció limita la capacitat de factors, com l'E-cadherina i la TBP, d'unir-se a aquest domini armadillo.

➤ **Funció**

La β -catenina té dues funcions importants a la cèl·lula: està implicada en l'establiment i manteniment de l'adhesió cel·lular formant les unions adherents [171] (veure l'apartat 3.3.1), i té un paper en el nucli com a coactivador transcripcional [172, 173].

La fracció de β -catenina citosòlica, que no està formant part de les unions adherents, té la capacitat de translocar al nucli. A través de la interacció amb factors de transcripció de la família del Tcf/LEF, activa un gran nombre de gens, que contenen seqüències d'unió del complex Tcf-4- β -catenina en els seus promotors. Diversos gens activats pel complex Tcf-4- β -catenina han estat identificats [173-175] i la majoria estan relacionats positivament amb proliferació cel·lular, com per exemple el gen de la ciclina D1, c-myc, c-jun entre d'altres (veure la **Taula 3**). A l'inversa, la inhibició del complex Tcf-4- β -catenina estimula la síntesi de l'inhibidor del cicle cel·lular p21 [176]. Aquestes i altres evidències suggereixen que la transcripció mediada per β -catenina és necessària per mantenir la capacitat proliferativa de les cèl·lules. En molts tumors epitelials (especialment de colon), apareixen mutacions en l'APC o altres elements de la ruta de Wnt que impedeixen la degradació de la β -catenina i donen lloc a un augment de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina.

Els nivells citosòlics de β -catenina estan finament regulats per un complex multiproteic implicat en la seva degradació. Aquest complex està format per l'APC, l'axina, la serina-treonina quinases CK1 α i la glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) [177], (revisat a [178]). La CK1 α fosforila la serina 45 de la β -catenina, condició indispensable perquè la GSK3 β fosforili seqüencialment els residus treonina 41, serina 37 i serina 33. Com a conseqüència d'aquestes fosforilacions la β -catenina és

poliubiquitinitzada per la β -TrCP ubiquitina lligasa i degradada pel proteosoma [179] (veure la **Figura 9**).

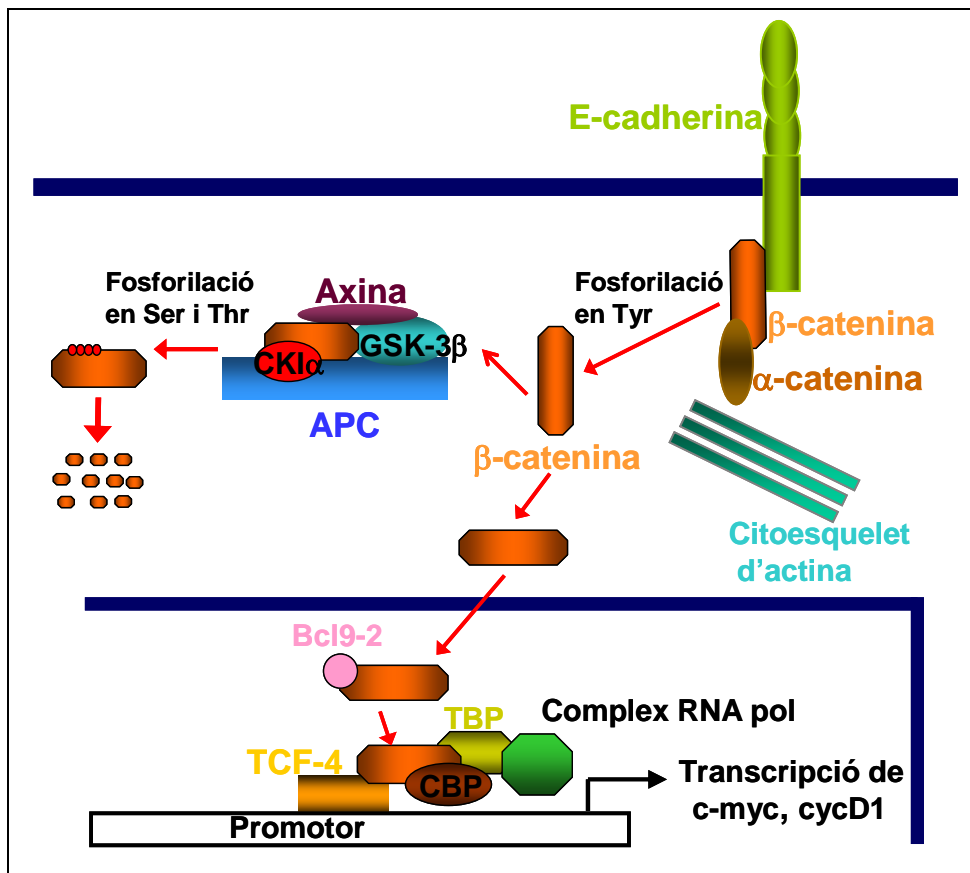


Figura 9. Regulació dels nivells de la β -catenina en cèl·lules epitelials. En condicions normals els nivells de la β -catenina estan regulats pel complex quaternari GSK-3 β -axin- β -catenina-APC. La CKI α fosforila la serina 45 de la β -catenina, condició indispensable perquè la GSK3 β fosforili els residus Thr41 i les Ser37 i 33. A conseqüència d'aquestes fosforilacions la β -catenina és degradada pel proteosoma. Quan s'actua la via de Wnt o s'altera el sistema de regulació dels nivells de β -catenina, aquesta catenina no és degradada i migra al nucli. Una vegada al nucli interacciona amb el factor transcripcional Tcf-4 i activa la transcripció dels gens diana del complex Tcf-4- β -catenina.

Existeix un mecanisme alternatiu de degradació de la β -catenina, que depèn de l'activitat del producte del gen Siah-1. Aquesta proteïna, l'expressió de la qual és activada per la p53, interacciona amb l'extrem carboxiterminal de l'APC i promou la degradació de la β -catenina, independent de la fosforilació per la GSK3 β , i sense necessitat que la β -catenina interaccioni amb la β -TrCP [180, 181].

Quan el sistema de regulació dels nivells de la β -catenina s'altera o s'actua la via de Wnt, la β -catenina no pot ser degradada i es transloca al nucli [172, 174] amb el conseqüent augment de la seva activitat transcripcional. Recentment, s'ha descrit

en humans una proteïna, Bcl9-2, que sembla necessària per estabilitzar la β -catenina al nucli [182]. Una vegada al nucli, la β -catenina interacciona a través del seu domini armadillo amb els membres de la família dels factors de transcripció Tcf (*T cell factor*)/Lef, Tcf-4 en l'epiteli intestinal [165, 175, 183]. Aquestes proteïnes s'uneixen al DNA a partir el seu domini HMG. Però, necessiten interaccionar pel seu extrem aminoterminal amb la β -catenina, per poder reclutar tots els coactivadors transcripcionals necessaris, per activar la transcripció dels gens diana del complex Tcf-4· β -catenina (veure **Taula 3**) (revisat a [184]). Es pot trobar una llista completa dels gens activats pel complex Tcf-4· β -catenina a l'adreça: <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>.

Gen	Funció	Referència
c-Myc	Proliferació	[185]
Ciclina D1	Proliferació	[186]
Tcf-1	Diferenciació	[187]
PPARdelta	Diferenciació/Proliferació	[188]
c-jun	Diferenciació/Proliferació	[189]
Fra-1	Diferenciació/Proliferació	[189]
uPAR	Adhesió/Migració/Invasió	[189]
Matrilisina	Invasió/Migració	[190]
Axina-2	Degradació de la β -catenina	[191]
Nr-CAM	Adhesió/Proliferació	[192]
ITF-2	Diferenciació/Proliferació	[193]
Gastrina	Proliferació	[194]
CD44	Adhesió	[195]
EphB	Establiment de límits cel·lulars	[196]
BMP4	Diferenciació	[197]
Claudina-1	Adhesió	[198]
VEGF	Proliferació	[199]

Taula 3. Alguns dels gens activats directe o indirectament pel complex Tcf-4· β -catenina. No totes les funcions associades als gens han estat demostrades.

3.2.2. La via de senyalització Wnt

La via de senyalització de Wnt intervé en el creixement cel·lular, diferenciació, organogènesi i oncogènesi [179]. Aquesta via consisteix en una cascada intracel·lular, en la qual participen les proteïnes de secreció Wnt (wingless en *Drosophila*), els receptors de membrana frizzled i LRP, la proteïna dishevelled (Dsh),

les serina-treonina quinases $CKI\alpha$ i $GSK3\beta$, l'axina i la β -catenina (veure **Figura 10**). Aquesta via va ser caracteritzada per primera vegada en *Drosophila* i és essencial per la formació dels eixos embrionaris tant en vertebrats com en invertebrats [200, 201].

Els factors Wnts, d'uns 350-400 aminoàcids, són una família de glicoproteïnes, de la qual s'han descrit 14 tipus diferents en mamífers. S'ha trobat homòlegs en un nombre elevat d'organismes i tots ells es caracteritzen per presentar una seqüència rica en cisteïnes. Els receptors de Wnt estan formats per dos membres: frizzled i LRP5/6. El receptor frizzled, presenta 7 hèlices transmembrana, una regió extracel·lular de 120 aminoàcids rica en cisteïnes per on interacciona amb els factors Wnt, i un llarg extrem citoplasmàtic amb dominis d'interacció PDZ. En canvi, el coreceptor LRP5/6 és una proteïna amb un sol domini transmembrana i també interacciona amb els factors Wnt pel domini extracel·lular.

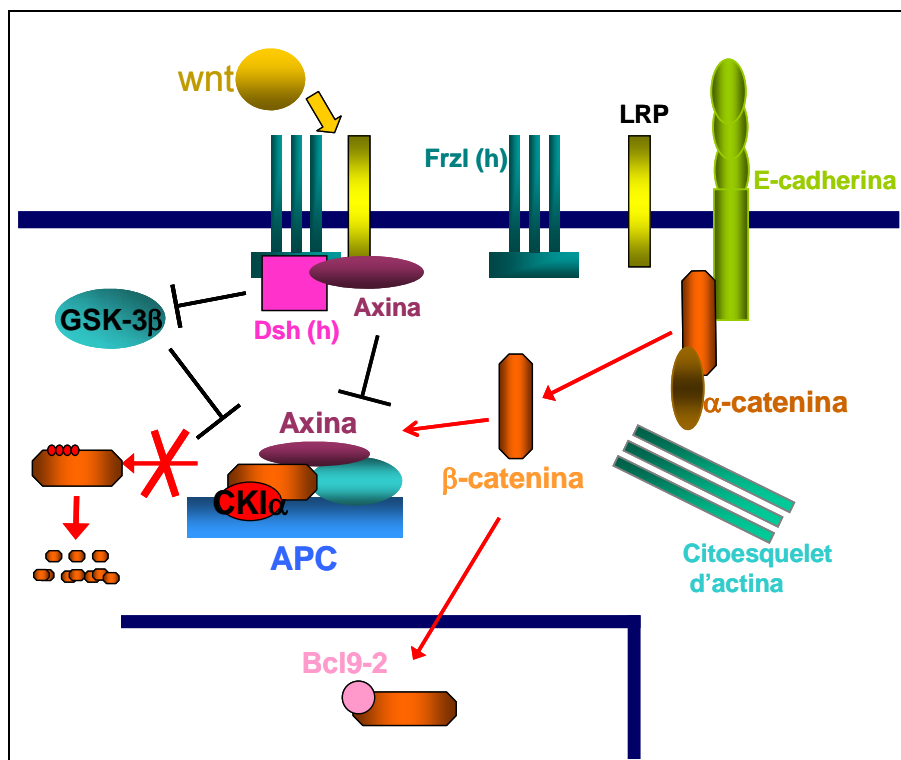


Figura 10. Esquema de la ruta de Wnt. Quan el factor Wnt interacciona amb els receptors frizzled i LRP5/6 aquests s'activen i heterodimeritzen. A continuació hi ha una fosforilació de dishvelled (Dsh), la qual promou l'alliberament de la glicogen sintasa quinasa 3β ($GSK3\beta$) del complex quaternari $GSK3\beta$ -axin- β -catenina-APC. Amb l'activació també es fosforila el domini intracel·lular del receptor LRP el qual recluta l'axina a la membrana. Per tant, el complex quaternari no és funcional i la β -catenina no és degradada i pot translocar al nucli.

Quan el factor Wnt interacciona amb els receptors frizzled i LRP5/6 aquests s'activen i heterodimeritzen. Com a conseqüència de l'activació, s'hiperfosforila dishevelled que llavors interacciona amb frizzled pel seu domini PDZ. També es fosforila el domini intracel·lular de LRP5/6 que promou el reclutament de l'axina a la membrana, on també pot interaccionar amb Dsh [202, 203]. Amb l'axina a la membrana i l'alliberament de la GSK3 β del complex APC·axina· β -catenina·GSK3 β que promou Dsh, s'anul·la la funcionalitat d'aquest complex. En aquestes condicions, la β -catenina no pot ser fosforilada en l'extrem N-terminal i per tant s'estabilitza al citosol (revisat a [178]). La β -catenina lliure té la capacitat de translocar al nucli i activar els gens diana del complex Tcf-4· β -catenina (veure la **Figura 10**).

3.2.3. La PS1 com a regulador negatiu de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4· β -catenina

Diferents evidències indiquen que la PS1 interacciona amb factors de la ruta de Wnt [204], s'ha demostrat que la PS1 interacciona amb la β -catenina i la GSK3 β [99, 205]. En el moment d'iniciar aquest treball es desconeixia amb certesa l'efecte de la interacció entre la β -catenina i la PS1 en la ruta de Wnt. Algunes dades indiquen que la PS1 és un regulador negatiu de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4· β -catenina. Mutants en *Drosophila* deficients de presenilina es caracteritzen per tenir una acumulació citoplasmàtica d'armadillo/ β -catenina [206]. Fibroblasts obtinguts de ratolins *knock-out* en PS1, mostren un augment en l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4· β -catenina, del gen de la ciclina D1 [207]. En ratolins transgènics, la pèrdua de la PS1 en queratinòcits augmenta la transcripció via Tcf-4· β -catenina i els animals desenvolupen hiperplàsies epidèrmiques i tumors [208]. Finalment, una sobreexpressió de la PS1 facilita la degradació de la β -catenina i s'observa una disminució de l'activitat de la β -catenina [205, 209, 210].

S'ha descrit també que la PS1 promou la degradació de la β -catenina a través d'una via independent al complex APC·axina·CKI α ·GSK3 β . En aquest cas, la PS1 actuaria com una proteïna adaptadora, formant un complex amb la PKA, la GSK3 β i la β -catenina. En aquest complex la PKA fosforila la serina 45 fet que facilita la següent fosforilació dels residus treonina 41 i serina 37 i 33 per la GSK3 β (veure fletxes negres, **Figura 11**) [211]. Per tant, la PS1 facilitaria la degradació de la β -catenina, una disminució dels seus nivells citosòlics i com a conseqüència menys β -catenina nuclear.

No obstant, altres grups han descrit que la formació de complexos PS1- β -catenina podria estabilitzar aquesta última proteïna [212]. Mentre que també hi ha autors que no detecten canvis en l'estabilitat de la β -catenina [213, 214].

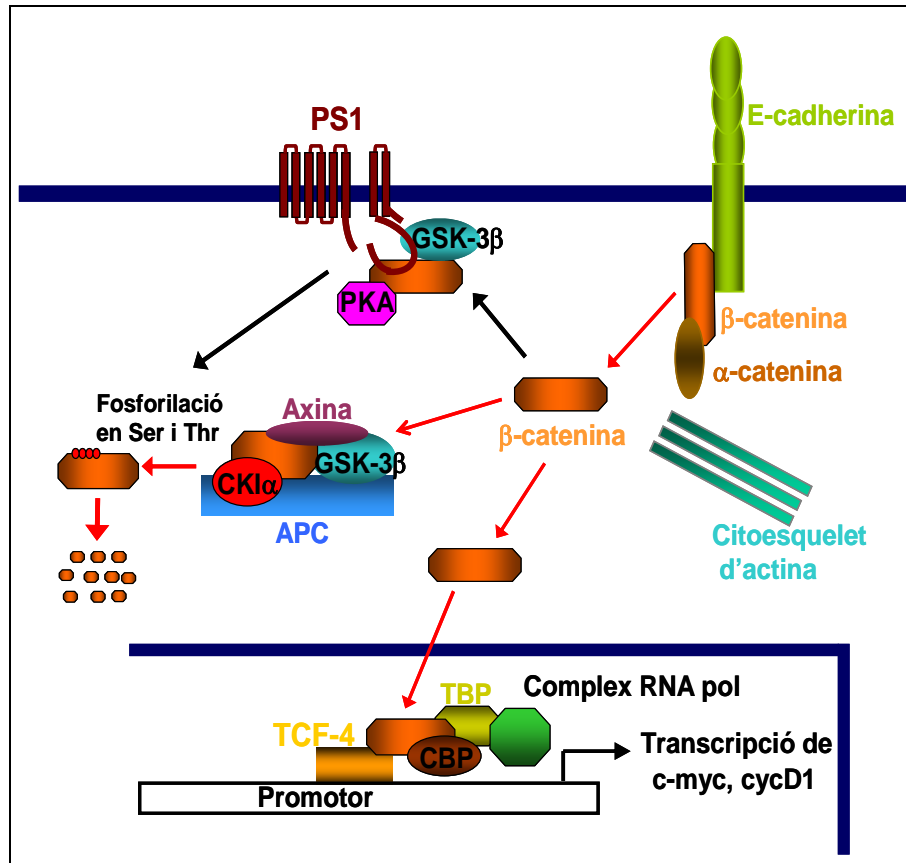


Figura 11. Esquema de dues vies de degradació de la β -catenina. Les fletxes vermelles corresponen a la via convencional dependent d'axina. La β -catenina és fosforilada seqüencialment per la CKI i la GSK3 β . Les fletxes negres corresponen a la via de degradació dependent de la PS1 i independent d'axina. En presència de la PS1 es forma un complex format per la GSK3 β , la PKA, la β -catenina i la PS1. La β -catenina és fosforilada en la Ser45 per la PKA i seguidament la GSK3 β fosforila els residus Thr41 i les Ser37 i 33. Com a conseqüència d'aquestes fosforilacions la β -catenina és degradada.

3.3. La PS1 interacciona amb components de les unions adherents

3.3.1. L'adhesió cel·lular: les unions adherents

L'adhesió cel·lular és essencial perquè les cèl·lules s'agrupin formant teixits i per això, és necessari que interaccionin entre elles i amb el medi que les envolta (matriu extracel·lular). La matriu extracel·lular ajuda a les cèl·lules i als teixits a mantenir-se units, i a més, proporciona una superfície per la qual les cèl·lules migren.

Les unions cel·lulars permeten la interacció cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular. La funció de les unions cel·lulars és l'ancoratge, el reconeixement i l'adhesió cel·lular. La seva pèrdua facilita la desdiferenciació i l'adquisició de la capacitat invasiva.

Hi ha diferents tipus d'unions en les cèl·lules epitelials: les unions estretes, els desmosomes i les unions adherents. Aquests complexos estan formats per receptors transmembrana, generalment glicoproteïnes, que interaccionen amb el citoesquelet de la cèl·lula mitjançant l'associació amb unes proteïnes citoplasmàtiques.

Les unions estretes (*tight junctions*) tenen la funció de prevenir la difusió de molècules entre les cèl·lules adjacents i la migració lateral de les proteïnes i lípids de membrana. A més, estan implicades en la formació i manteniment de la polaritat cel·lular.

Els desmosomes és caracteritzen per mantenir unides les cèl·lules de l'epiteli associant els filaments intermedis de cèl·lules veïnes i proporcionant una alta resistència a la tracció mecànica. Les cadherines desmosòmiques, la desmogleïna i la desmocolina, s'associen amb els filaments intermedis a través de la placoglobina, plakofilina i desmoplakina [215].

Les unions adherents són el tipus més abundant i important dels contactes cel·lulars. La seva formació és necessària per l'establiment de les unions estretes i els desmosomes [216]. Aquests contactes són essencials per l'arquitectura tissular, la polaritat cel·lular, el desenvolupament de l'epiteli embrionari, la limitació del moviment cel·lular i de la proliferació [217]. Aquestes unions depenents de calci, estan mediades per les cadherines, proteïnes transmembrana que formen interaccions homotípiques amb cadherines de les cèl·lules veïnes [218]. Existeixen diferents membres de la superfamília de les cadherines: l'E-cadherina n'és la principal del teixit epitelial i és essencial per la formació de les unions adherents; la N-cadherina és la cadherina del teixit neuronal i està implicada en la formació dels contactes sinàptics i la morfologia de les somites i dendrites [219].

Estructuralment presenten un gran domini extracel·lular format per 5 subdominis en tàndem d'unió a Ca^{2+} (EC1-EC5). El EC1 és el responsable de la dimerització homotípica (veure **Figura 12**). També presenten un domini transmembrana i un domini citoplasmàtic molt conservat, format per uns 150 aminoàcids on es poden diferenciar dues regions:

El Domini juxtamembrana (JMD) de l'E-cadherina és la regió citosòlica immediatament adjacent al domini transmembrana per on s'uneixen la p120-catenina i la PS1 de manera totalment exclouent. La p120-catenina, estructuralment similar a la β -catenina i a la placoglobina, també té un domini central de repeticions armadillo per

on interacciona amb l'E-cadherina [220]. Aquesta interacció no competeix amb la unió de la β -catenina a l'E-cadherina, la qual té lloc més cap a l'extrem C-terminal de la cadherina [221]. La unió de la p120-catenina, estabilitza l'E-cadherina i impedeix la seva internalització i degradació [222, 223]

El Domini d'unió a les catenines (CBD) per on les cadherines interaccionen amb la β -catenina o amb la placoglobina, en una proporció 1:1 i mútuament exclouent.

Per la correcta funcionalitat de les unions adherents, l'E-cadherina ha d'interaccionar amb la β -catenina i aquesta amb l' α -catenina. Sempre s'havia pensat que l' α -catenina interaccionava directament amb els filaments d'actina. Però recentment, s'ha demostrat que l' α -catenina no pot interaccionar simultàniament amb el complex E-cadherina- β -catenina i el citoesquelet d'actina. Per tant, l' α -catenina tot i ésser necessària, no confereix la unió estable entre les unions adherents i el citoesquelet d'actina [224-226].

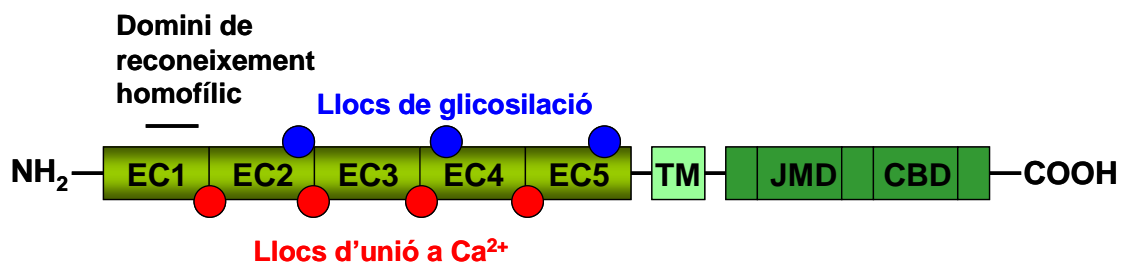


Figura 12. Esquema de les cadherines. Les cadherines es caracteritzen per tenir un domini extracel·lular format per 5 subdominis d'unió a Ca^{2+} (EC1-EC5), un domini transmembrana (TM) i un domini intracel·lular. El domini intracel·lular està format per dues regions: el domini jxtamembrana (JMD) per on s'uneix la PS1 i la p120-catenina, i el domini d'unió a les catenines (CBD) per on s'uneix la β -catenina o la placoglobina.

El domini citosòlic de l'E-cadherina no interacciona directament amb l' α -catenina, sinó que ho fa a través de la β -catenina. Per tant, la β -catenina actua com a proteïna pont entre l'E-cadherina i l' α -catenina (veure la **Figura 13**). La β -catenina pot ser substituïda a les unions adherents per una proteïna homòloga anomenada placoglobina (o γ -catenina), que té un paper específic en els desmosomes.

Els complexos β -catenina-cadherina no són exclusius de les cèl·lules epitelials, sinó que també es formen en neurones amb la N-cadherina.

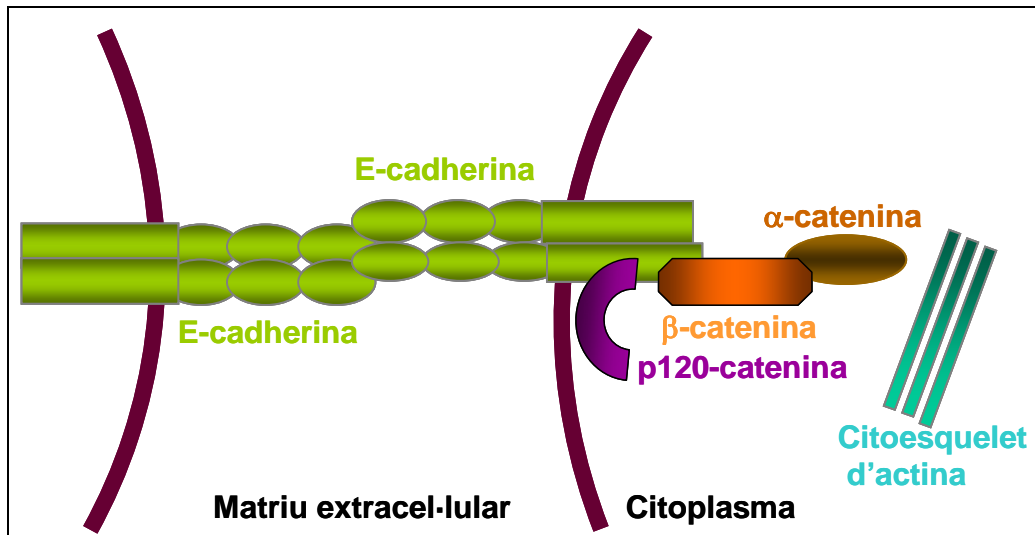


Figura 13. Esquema de les unions adherents. Les molècules d'E-cadherina de les cèl·lules adjacents estableixen contactes homotípics entre sí i mitjançant les catenines (β - o γ -) interaccionen amb l' α -catenina. L' α -catenina tot i ser necessària per la formació d'aquests tipus d'unions, no confereix la unió estable entre les unions adherents i el citoesquelet d'actina.

3.3.2. Regulació de les unions adherents

Les interaccions entre les cèl·lules i especialment les unions adherents no són estàtiques, sinó molt dinàmiques i estan finament regulades per permetre una correcta funcionalitat dels teixits. Les unions adherents es regulen tant a nivell transcripcional com també per canvis postranscripcionals (fosforilacions) que alteren ràpidament la funcionalitat de les unions. L'E-cadherina és la principal molècula d'adhesió i té un paper central en el procés de morfogènesi epitelial. Canvis en la seva expressió contribueixen a la progressió dels tumors epitelials i a l'adquisició de la seva capacitat metastàsica [227-229]. Aquesta desregulació a la baixa d'E-cadherina que es produeix en les cèl·lules epitelials tumorals és deguda a una inhibició transcripcional de l'expressió del gen d'E-cadherina. El repressor snail bloqueja l'activitat transcripcional del promotor d'E-cadherina [230]. A nivell postranscripcional s'ha descrit que el domini citosòlic de l'Ecadherina potser fosforilat en residus serina per la CKI i CKII, augmentant l'afinitat per la β -catenina [231, 232].

S'ha demostrat que l'activació de les quinases Src, el receptor d'EGF i erbB2 està implicada en la regulació negativa de les unions adherents [233-235] i correlaciona amb un augment en la fosforilació de la β -catenina [233]. Estudis previs del nostre grup han permès identificar els residus tirosina específics que en ser fosforilats inhibeixen la unió de l'E-cadherina amb la β -catenina, i d'aquesta amb l' α -catenina, i també com aquesta fosforilació afecta l'estructura dels diferents dominis

de la β -catenina implicats en la interacció. Així, la tirosina 654 de la β -catenina, localitzada en la última repetició armadillo (veure la **Figura 42**), és important per modular la seva interacció amb l'E-cadherina [168, 236, 237]. La fosforilació d'aquest residu té com a conseqüència una pèrdua d'afinitat amb l'E-cadherina. Aquesta fosforilació és catalitzada en cèl·lules epitelials per les tirosina quinases com el receptor EGF o erbB2 i menys eficientment per Src. La fosforilació de la tirosina 643 de la placoglobina (residu equivalent a la tirosina 654 de la β -catenina) per la quinasa Src, inhibia la interacció tant amb l'E-cadherina com amb l' α -catenina, desplaçant la placoglobina de les unions adherents als desmosomes [238].

El grup també va demostrar que la tirosina 142 de la β -catenina està implicada en la regulació de la interacció amb l' α -catenina, essent fosforilada específicament per les quinases Fyn o Fer [239]. Aquestes dues fosforilacions serien necessàries per tal d'alliberar la β -catenina de les unions i facilitar el seu pas al nucli (Casagolda et al., resultats no publicats).

Existeix una gran varietat de tirosina fosfatases que s'associen al complex d'adhesió, moltes d'elles amb activitat sobre la β -catenina (LAR, PTPK) [237, 240, 241]. Cada una d'aquestes fosfatases actua en unes condicions temporals, espaials i fisiològiques específiques, amb l'objectiu de mantenir l'adhesió mediada per les cadherines.

3.3.3. La PS1 interacciona amb components de les unions adherents

S'ha descrit que la PS1 interacciona a la vegada amb la β -catenina [205, 242] i amb el domini citosòlic de l'E-cadherina, en cèl·lules epitelials (veure la **Figura 14**) [104]. La interacció amb l'E-cadherina es produeix a través del mateix domini "juxtamembrana" [243], pel qual s'uneix la p120-catenina. Cal destacar que aquest mateix domini de la cadherina s'ha descrit que podria estar implicat en el procés d'agrupament lateral necessari perquè les unions adherents siguin totalment funcionals [171].

En un estudi recent, i a diferència d'estudis anteriors, els autors defensen la hipòtesi que no hi ha una interacció directa entre la β -catenina i la PS1, sinó que interaccionen a través de les cadherines [244].

Diferents treballs indiquen que la PS1 estabilitza el complex cadherina-catenina, promou l'associació al citoesquelet i estimula les unions cèl·lula-cèl·lula depenents de Ca^{2+} [104, 243]. Però en determinades condicions, com d'apoptosi o d'entrada de Ca^{2+} , durant el desenvolupament embrionari o remodelació

cel·lular, s'ha descrit que la PS1 desestabilitza les unions adherents [244, 245], (revisat a [246]).

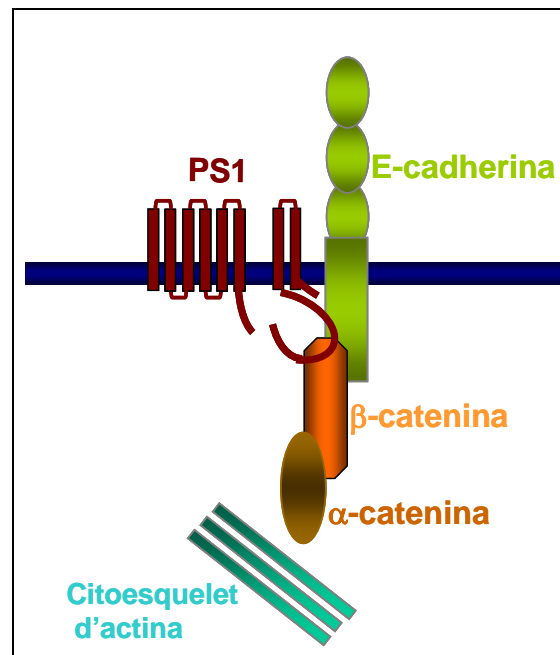


Figura 14. Representació esquemàtica de la interacció entre l'E-cadherina, la β -catenina i la PS1 en les unions adherents.

OBJECTIUS

A l'inici d'aquest treball ens vam plantejar com a objectiu determinar el mecanisme molecular pel qual la PS1 regulava l'activitat transcripcional depenent del complex Tcf-4- β -catenina i analitzar la rellevància dels components de les unions adherents en aquesta inhibició.

RESULTATS

Per tal d'estudiar els efectes de la PS1 sobre la funcionalitat de la β -catenina, vam utilitzar diferents plàsmids que permetien expressar la PS1. Com es pot veure en la **Figura 15**, un d'aquests plàsmids expressava una forma de PS1 *wild type* que no es podia processar (carril 2), donat que l'epítip *myc* en l'extrem C-terminal impedia el seu correcte processament, mentre que un altre plàsmid expressava una forma de PS1 *wild type* (sense cap epítip) que es processava correctament (carril 3). Aquestes formes de la PS1, la que es pot processar i la que no, seran utilitzades a partir d'ara i seran anomenades respectivament PS1p i PS1np.

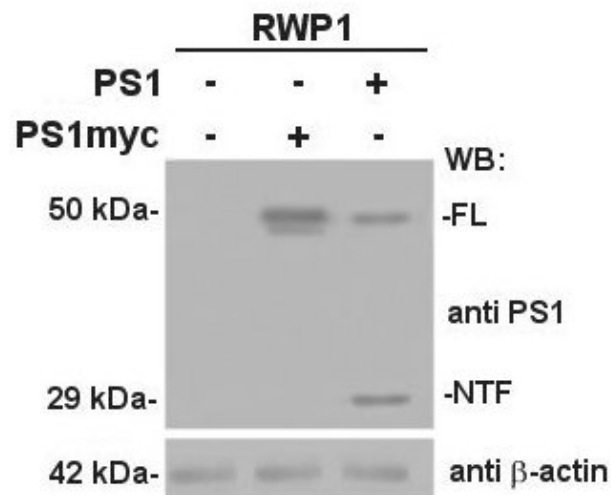


Figura 15. Expressió de la PS1 en cèl·lules epitelials. Es van transfectar de forma transitòria les cèl·lules epitelials de pàncrees RWP1 amb 5 μ g de pcDNA3.1-*Myc/His*-PS1, pcDNA3.1-PS1 o el vector sol com a control. A les 48h, es van preparar els extractes cel·lulars com es descriu en l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes. 50 μ g d'extracte total van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents formes de la PS1 van ser detectades amb l'anticòs anti-PS1(1-65).

S'havia descrit que la PS1 inhibia l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina [207] (revisat en [44]). Es va estudiar si el processament de la PS1 podia afectar aquesta activitat de la β -catenina en diferents línies cel·lulars. Es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules epitelials de colon SW480 i els fibroblast embrionaris de ratolí (MEF) *knock-out* per les presenilines (PS1 i PS2), amb diferents concentracions dels plàsmids que expressaven la PS1p i la PS1np, i el plàsmid reporter TOP-FLASH. Aquest plàsmid permet determinar l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina ja que conté el gen de la luciferasa sota el control d'un promotor sintètic que respon a Tcf-4- β -catenina. Aquest promotor té tres còpies de la seqüència d'unió del Tcf-4 al DNA i ha estat àmpliament utilitzat per analitzar aquest paràmetre.

Com mostra la **Figura 16**, la sobreexpressió de les dues formes de la PS1 inhibeix l'activitat transcripcional Tcf-4- β -catenina. Aquesta inhibició era dependent de la concentració de PS1: així, a major concentració de PS1, major inhibició de l'activitat transcripcional. Però, l'efecte inhibitor que s'observava per la PS1np, sempre era major que la inhibició induïda per la PS1p.

Aquests resultats suggerien, que la PS1 processada i la no processada podien estar inhibint, per un mecanisme diferent, l'activitat transcripcional de Tcf-4- β -catenina.

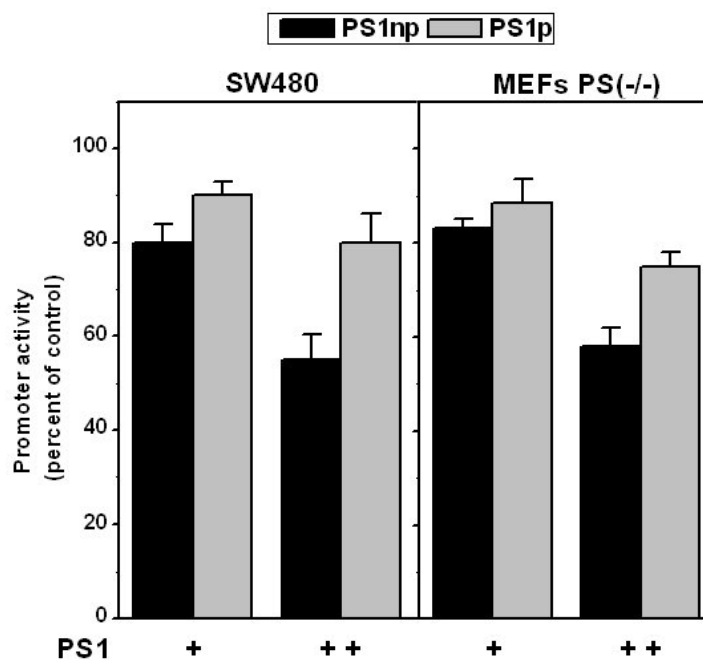


Figura 16. La PS1p i la PS1np inhibeixen l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4- β -catenina. Les cèl·lules SW480 i MEFs PS(-/-), es van cotransfectar amb el plàsmid pcDNA3.1-*Myc/His*-PS1 (PS1np) i pcDNA3.1-PS1 (PS1p) (+, 150ng; ++, 300ng), el plàsmid TOP-FLASH (50ng) i el plàsmid pTK-*Renilla* (20ng). Després de 48 h, es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra com es descriu en l'apartat 3.7 dels Materials i mètodes. El percentatge d'activitat es va calcular comparant els nivells d'activitat luciferasa obtinguts després de la transfecció amb el vector sol. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents.

La PS1 forma part d'un complex multiproteic que té activitat γ -secretasa i la PS1 és el centre catalític d'aquest complex. L'activitat γ -secretasa consisteix en tallar proteïnes transmembrana de tipus I pel seu domini transmembrana. Per això ens vam plantejar si les diferències en l'efecte inhibitor de la PS1 sobre l'activitat transcripcional de la β -catenina, podien ser originades per una activitat γ -secretasa diferent de les formes processada i no processada de la PS1.

Per abordar-ho es van fer diferents assaigs d'activitat transcripcional en les línies cel·lulars SW480 i MEFs. Es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules SW480 i les MEFs PS(-/-) amb els plàsmids que expressaven la PS1p o la PS1np i el plàsmid TOP. Les cèl·lules MEFs PS(+/+) no es van transfectar amb PS1 perquè ja expressaven constitutivament la PS1p (veure la **Figura 17A**), és a dir, són una font de PS1p endògena. Aquestes línies cel·lulars, es van tractar o no amb un inhibidor de l'activitat γ -secretasa, *L-685,458* [247], durant 24 hores. A continuació, es va determinar l'activitat del complex Tcf-4- β -catenina, utilitzant el promotor sintètic TOP.

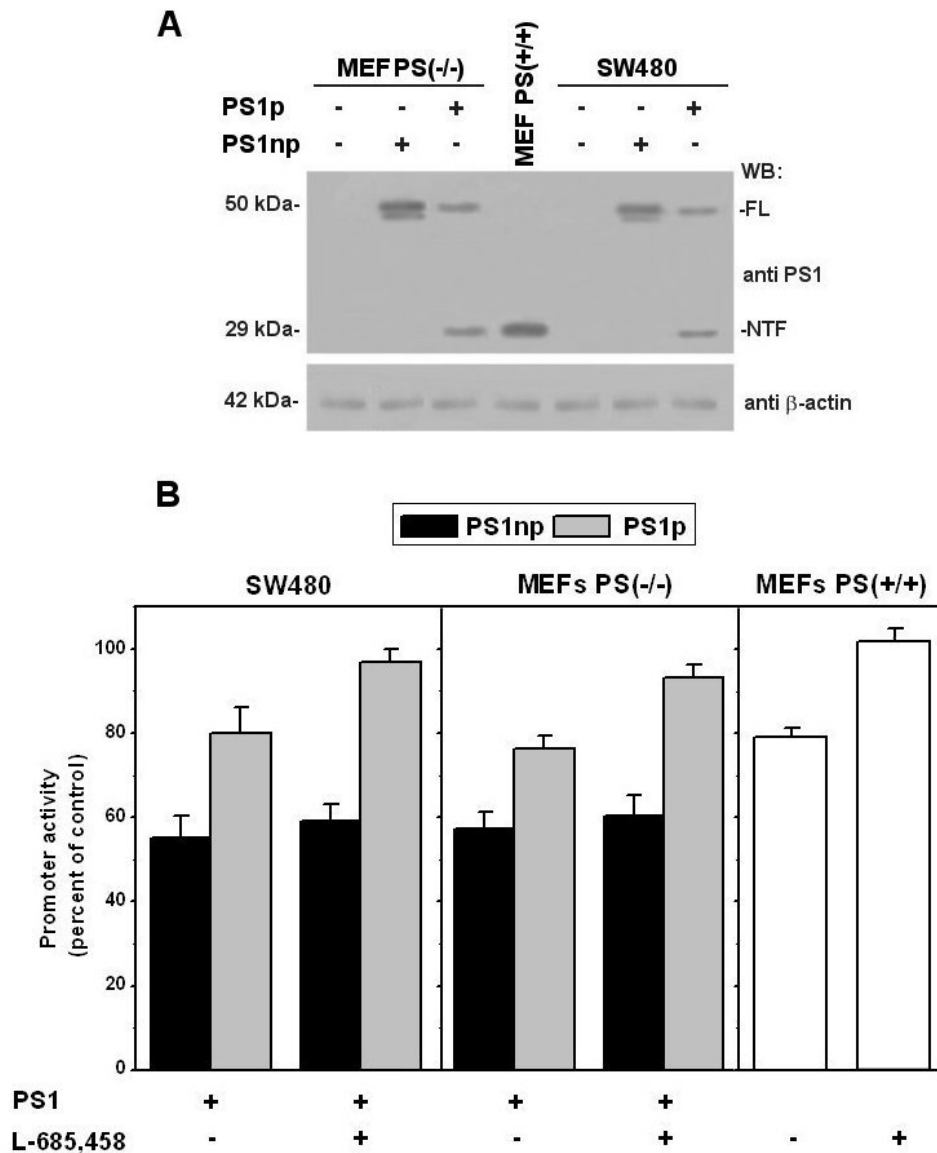


Figura 17. Només la forma processada de la PS1 inhibeix l'activitat transcripcional de Tcf-4- β -catenina per un mecanisme dependent de l'activitat γ -secretasa. (A) Es van transfectar de forma transitòria diferents línies cel·lulars amb 5 μ g de pcDNA3.1-*Myc/His*-PS1 (P1np), pcDNA3.1-PS1 (PS1p) o el vector sol com a control. A les 48h, es van preparar els extractes cel·lulars. 50 μ g d'extractes totals van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents formes de la PS1 van ser detectades amb l'anticòs anti-PS1(1-65). **(B)** Diferents línies cel·lulars es van cotransfectar amb

pcDNA3.1-*myc/His*-PS1 (PS1np), pcDNA3.1-PS1(PS1p) (300ng) o el vector buit com a control, el plàsmid TOP-FLASH (50ng) i el plàsmid pTK-Renilla (20ng). 24h postransfecció, es van tractar les cèl·lules amb L-685,458 (Calbiochem) 5 μ M, durant 24h. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb el vector sol. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. -, absència; +, presència.

Es va observar que l'inhibidor γ -secretasa, només revertia l'efecte inhibidor de l'activitat transcripcional dependent del complex Tcf-4- β -catenina en el cas de la PS1p, mentre que no tenia cap efecte sobre la inhibició induïda per la PS1np (veure la **Figura 17B**).

Aquests resultats, suggerien que la PS1p i la PS1np, inhibien l'activitat transcripcional d'una forma diferent. Mentre que la inhibició causada per la PS1p era dependent de l'activitat γ -secretasa, la inhibició originada per la PS1np era independent d'aquesta activitat.

Per això, en aquest treball és presenten dues parts. Una primera part dedicada als efectes de la forma processada de la PS1 i una segona dedicada a la forma de PS1 que no pot ser processada. A cada part, s'estudia el mecanisme pel qual cada forma de la PS1 reprimeix l'activitat transcripcional de la β -catenina.

**ÀNALISI DE L'EFECTE DE LA PS1p EN
L'ACTIVTAT TRANSCRIPCIONAL DEPENDENT DE
TCF-4- β -CATENINA**

1. LA PS1p MODULA ELS NIVELLS DE LES CADHERINES, I INDIRECTAMENT EL D'ALTRES PROTEÏNES DE LES UNIONS ADHERENTS

Ens vam plantejar com la PS1p, a través de la seva activitat γ -secretasa, podia inhibir l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina. Els substrats de l'activitat γ -secretasa són proteïnes transmembrana de tipus I, a les quals processa en el seu domini transmembrana. Per tant, el processament d'aquestes proteïnes genera uns fragments intracel·lulars, que podrien ser la causa de l'efecte inhibidor de la PS1p. Les cadherines són proteïnes transmembrana de tipus I que interaccionen amb la PS1, per tant, són possibles substrats de l'activitat γ -secretasa. Com a conseqüència de l'acció de la γ -secretasa (que processaria a les cadherines en el domini transmembrana), hi hauria una disminució dels nivells de l'E-cadherina sencera.

Per això, vam voler estudiar els nivells de les cadherines en un sistema que expressés constitutivament la PS1p, utilitzant els fibroblast embrionaris de ratolí que expressaven tant la PS1p com la PS2p (MEF PS(+/+)), i els MEF *knock-out* per les dues presenilines (MEF PS(-/-)). Amb la utilització d'aquest *knock-out*, s'elimina la redundància funcional de les presenilines.

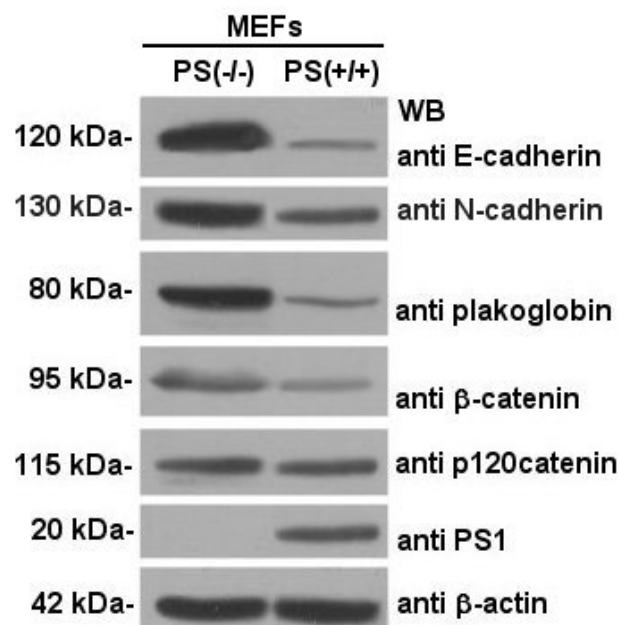


Figura 18. La PS1p regula els nivells de les cadherines. 50 μ g d'extractes totals (veure apartat 3.6 dels Materials i mètodes) van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents proteïnes van ser detectades amb els anticossos específics corresponents.

Com s'observa en la **Figura 18**, la presència de la PS1p disminuïa els nivells de les cadherines, i concretament, disminuïa més dràsticament els d'E-cadherina que els de N-cadherina. Com que les cadherines són les responsables de la correcta formació de les unions adherents, també es va analitzar els nivells d'altres components de les unions. Els nivells de la β -catenina i principalment de la placoglobina, disminuïen en presència de la PS1p. En canvi, no variaven els nivells de la p120-catenina (veure la **Figura 18B**).

Per tant, aquests resultats suggerien que la PS1p regulava els nivells de l'E- i N-cadherina, i també els d'altres components de les unions adherents, com la placoglobina i la β -catenina.

1.1. La disminució dels nivells de l'E-cadherina no és deguda a un efecte transcripcional

Tot i que pensàvem que la disminució dels nivells d'E-cadherina era deguda al processament d'aquesta proteïna per acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1p; no es podia descartar la possibilitat que fos deguda a un efecte de la PS1 a nivell transcripcional. Per això, es van realitzar diferents estudis de nivells de RNA.

Es va extreure el RNA de les MEFs PS(-/-) i de les MEFs PS(+/+), i es va realitzar un assaig de RT-PCR semiquantitativa. Com mostra la **Figura 19A**, no s'observaven diferències quantitatives del mRNA de l'E-cadherina entre les MEFs PS(-/-) i les MEFs PS(+/+). Els nivells del mRNA de l'HPRT van ser utilitzats com a control, per verificar que les possibles diferències existents entre el mRNA de l'E-cadherina, no fossin degudes a un error en la quantitat inicial de RNA.

Per acabar de confirmar que la PS1p, no tenia un efecte a nivell transcripcional, es va realitzar una PCR a temps real (PCR quantitativa). La quantitat de mRNA de l'E-cadherina en les MEFs PS(+/+), era menor que en les MEFs PS(-/-) (veure la **Figura 19B**), però aquesta diferència no es va considerar significativa (és significativa quan la diferència és major del 40%).

Per tant, la disminució dels nivells de l'E-cadherina que s'observava en presència de la PS1p (MEFs PS(+/+)), no era deguda a un efecte a nivell transcripcional.

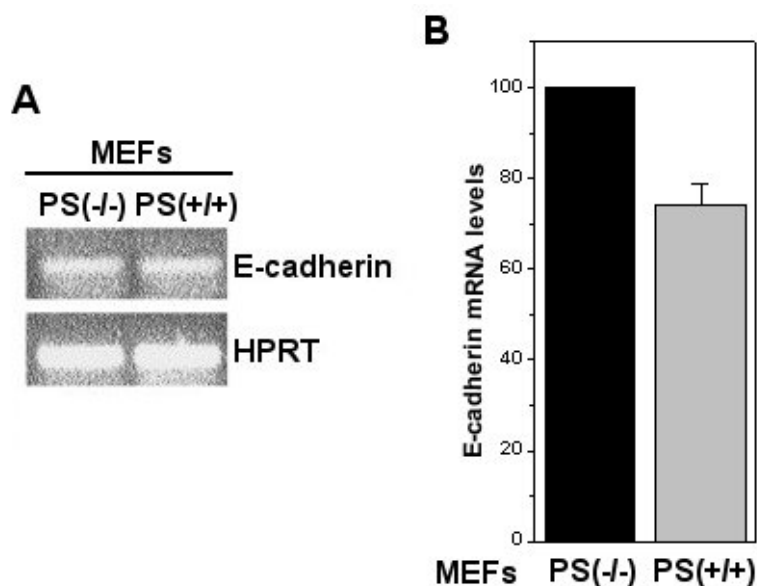


Figura 19. La PS1p no modifica els nivells del mRNA de l'E-cadherina. (A) Gel d'agarosa per resoldre la RT-PCR semiquantitativa del mRNA de l'E-cadherina (35 cicles). (B) PCR a temps real del mRNA de l'E-cadherina (veure l'apartat 1.2.3 dels Materials i mètodes).

1.2. La disminució dels nivells de l'E-cadherina és deguda a l'activitat γ -secretasa

Una vegada descartat que l'efecte de la PS1p no era a nivell transcripcional, es va analitzar si la disminució dels nivells de l'E- i N-cadherina era originada per l'activitat γ -secretasa. L'activitat γ -secretasa processaria les cadherines pel domini transmembrana, hi hauria una disminució de la forma sencera i es generarien uns fragments que correspondrien al domini citosòlic de les cadherines, anomenats CTF2 o cadh/CTF2. S'ha descrit que les cadherines també poden ser processades pel domini extracel·lular per metal·loproteases presents en la matriu extracel·lular. Per acció d'aquestes metal·loproteases es generen uns fragments ancorats a la membrana (cadh/CTF1), els quals també són substrats de l'activitat γ -secretasa [248, 249]. En presència de l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa, la PS1p no podria processar les cadherines i com a conseqüència esperaríem veure un augment en els nivells de l'E- i N-cadherina senceres i una disminució dels fragments citosòlics cadh/CTF2.

Per tal de comprovar-ho, es van tractar les cèl·lules MEFs PS(-/-) i les MEFs PS(+/-) amb o sense l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa, *L-685,458*. Es va observar que en presència de l'inhibidor, les MEFs PS(+/-) recuperaven els nivells de l'E- i N-cadherina sencera i al mateix temps disminuïen els fragments citosòlics de l'E- i N-

cadherina (CTF2) (**Figura 20**, veure els dos panells superiors). També es va constatar un augment dels fragments E-cadh/CTF1 i N-cadh/CTF1 ja que l'activitat γ -secretasa no els podia processar. Per tant, l'activitat γ -secretasa de la PS1 semblava la responsable de la disminució dels nivells de les cadherines, i de la generació del fragment cadh/CTF2. En presència de la PS1p, les cadherines eren processades per l'activitat γ -secretasa, i com a conseqüència es produiria una desestabilització de les unions adherents. La β -catenina i la placoglobina, unides o no al fragment CTF2 generat, quedarien lliures al citosol, fet que podria facilitar la seva degradació via proteosoma. Això podia explicar que en presència de la PS1p, s'observés també una disminució dels nivells de la β -catenina i de la placoglobina (veure la **Figura 18 i 20**).

El tractament de les cèl·lules amb l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa, impedia que la PS1p pogués processar les cadherines, i per tant, les unions adherents s'estabilitzaven. Per això, com a conseqüència d'aquesta estabilització, també augmentaven els nivells de la placoglobina i de la β -catenina (**Figura 20**, panells 3 i 4). Aquestes dades, suggerien que els nivells de les cadherines, i indirectament els de la β -catenina i placoglobina, eren dependents de l'activitat γ -secretasa.

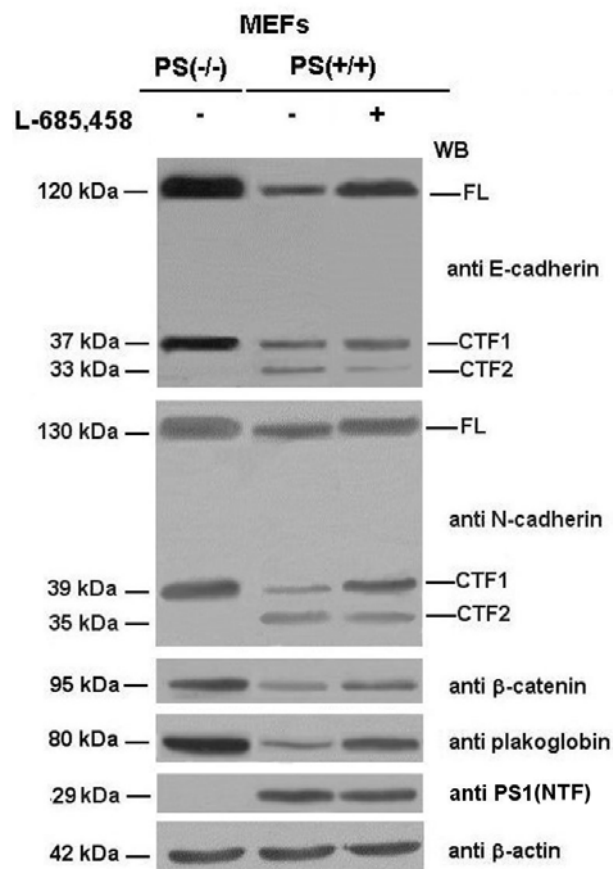


Figura 20. Els nivells de les cadherines estan regulats per l'activitat γ -secretasa de la PS1p. Les cèl·lules MEFs PS(-/-) i MEFs PS(++)) es van tractar amb L-685,458 (5 μ M) durant 24 h. Després es van fer extractes cel·lulars totals i 50 μ g van ser processats per SDS-PAGE i Western blot.

1.3. L'E-cadherina és menys estable en les cèl·lules MEFs PS(+/+) que en les MEFs PS(-/-)

Per estudiar amb més detall la disminució d'E-cadherina originada per la PS1p, es van fer assaigs d'estabilitat. En aquests assaigs s'estudiaven els nivells d'E-cadherina al llarg del temps, tractant o no les cèl·lules amb un inhibidor de la síntesi proteica, la *cicloheximida*. Per tant, en presència de *cicloheximida*, els nivells de la proteïna a estudiar, només depenien de la seva vida mitja (degradació) o possibles processaments.

Es va estudiar els nivells de l'E-cadherina en les cèl·lules MEFs PS(-/-) i MEFs PS(+/+) que expressen constitutivament la PS1p. Cada tipus cel·lular es va exposar a diferents temps de tractament amb cicloheximida. En les cèl·lules que no expressen la PS1p, s'observava un 50% de la disminució d'E-cadherina a les 24 hores de tractament amb cicloheximida (CHX) (**Figura 21A i B**, veure el panell superior esquerre), mentre que en les MEFs PS(+/+) els nivells d'E-cadherina sencera disminuïen a la meitat després de 10 hores de tractament (veure el panell superior dret). Donat que la quantitat inicial d'E-cadherina en les MEFs PS(+/+) és molt menor que la de les MEFs PS(-/-), per poder tenir nivells inicials d'E-cadherina comparables en els dos sistemes cel·lulars, es va posar 6 vegades més quantitat d'extractes de les MEFs PS(+/+) que de les MEFs PS(-/-). Aquests resultats indicaven que en presència de la PS1p hi havia una menor estabilitat de l'E-cadherina, degut al seu processament per acció de l'activitat γ -secretasa.

Pel què fa al fragment citosòlic de l'E-cadherina (CTF2), a mesura que van disminuint els nivells d'E-cadherina sencera pel processament de la γ -secretasa, haurien d'augmentar els nivells del fragment CTF2. Però s'observava una disminució d'aquest fragment similar a l'E-cadherina sencera (**Figura 21A**, veure el panell 2). Segurament, aquesta disminució era deguda a la ràpida degradació, ja que es tracta d'un fragment molt petit.

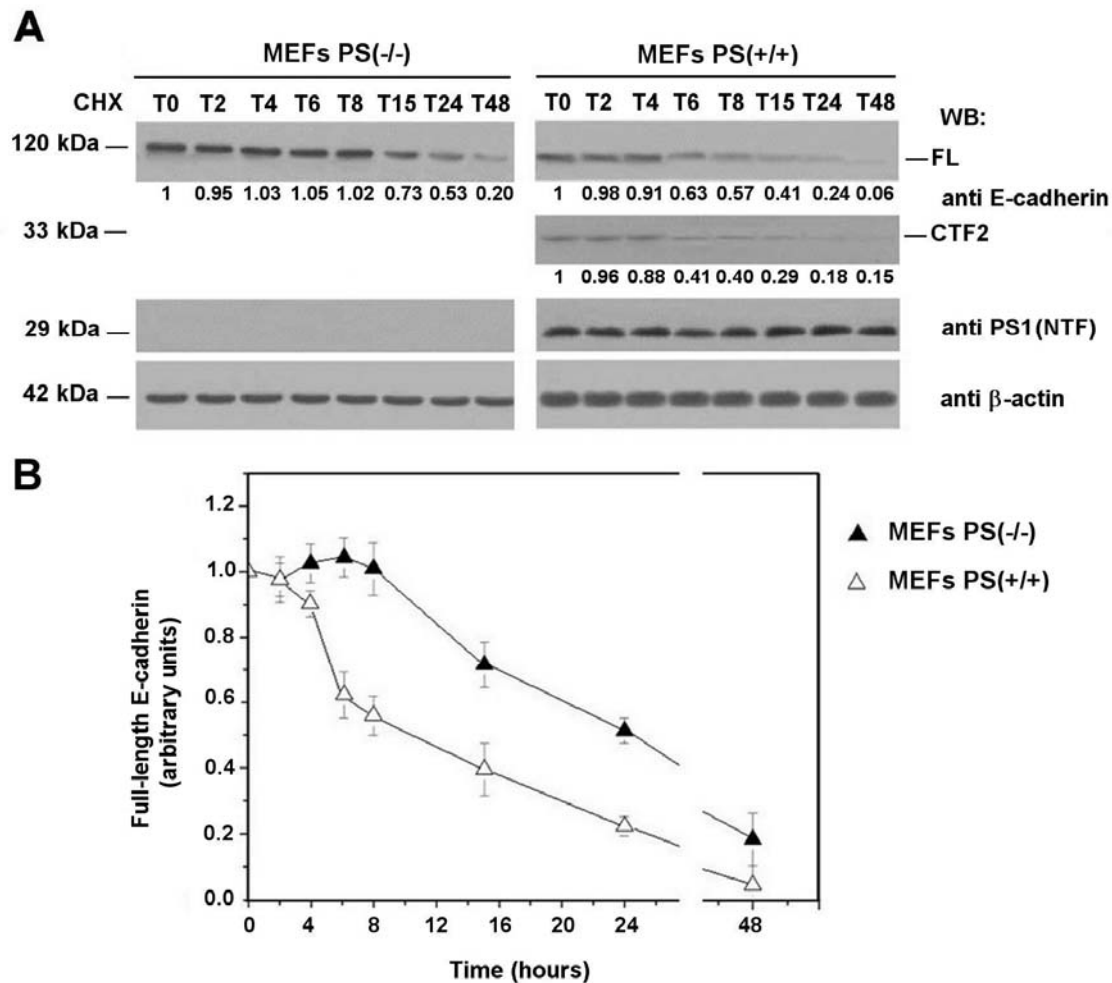


Figura 21. L'estabilitat de l'E-cadherina sencera és menor en les MEFs PS(+/+). (A) Les cèl·lules MEFs PS(-/-) i PS(+/+) es van tractar amb 25 μ g/mL de CHX (Sigma) durant diferents temps. A continuació, es van fer els extractes cel·lulars. 10 i 60 μ g de MEFs PS(-/-) i PS(+/+) respectivament, van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents proteïnes van ser detectades amb els anticossos específics corresponents. Els valors indicats sota cada figura, representen la quantitat de proteïna que s'expressa en cada temps, referida a la quantitat de proteïna observada en el temps inicial. (B) Representació gràfica dels valors relatius obtinguts per l'estabilitat de l'E-cadherina en cada línia cel·lular.

1.4. La PS1p regula l'estabilitat de l'E-cadherina

Es va analitzar a continuació si els dos plàsmids de PS1, el que expressava la PS1 que es processava i la que no es podia processar, tenien un comportament similar en l'estabilitat de l'E-cadherina.

Es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules MEFs PS(-/-) amb uns plàsmids que expressaven l'E-cadherina, la PS1p o la PS1np i es van tractar en presència o no de l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa *L-685,458*. L'expressió de l'E-cadherina exògena es podia seguir per Western blot, ja que està fusionada a CFP (26

kDa) i té un pes molecular més elevat que la proteïna endògena. En presència de la PS1p, hi havia una disminució dels nivells de l'E-cadherina exògena (E-cadherina-CFP; 145 kDa) (**Figura 22**; comparar els carrils 2 i 3, del panell superior esquerre), que es recuperaven quan les cèl·lules estaven exposades a l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa (veure el carril 4). Els mateixos resultats s'havien observat per l'E-cadherina endògena (veure la **Figura 20**).

En canvi, quan les cèl·lules es van cotransfectar amb el plàsmid de la PS1np, els nivells de l'E-cadherina exògena no disminuïen comparats amb la condició control (comparar els carrils 2 i 3, del panell superior dret). L'inhibidor de l'activitat γ -secretasa, tampoc va produir canvis en els nivells de l'E-cadherina exògena (veure el carril 4).

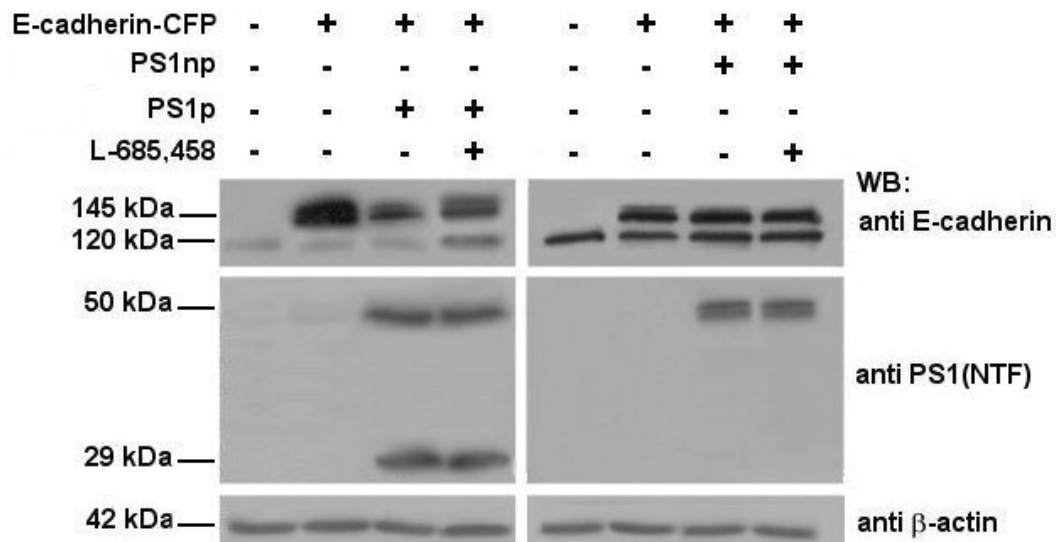


Figura 22. La PS1p és la responsable de la disminució dels nivells d'E-cadherina. Les cèl·lules MEFs PS(-/-) es van cotransfectar amb 2,5 μ g del plàsmid pECFP-N1-E-cadherina, de pcDNA3.1-PS1 (PS1p) o de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np). 24h posttransfecció es van tractar les cèl·lules amb absència o presència de L-685,458 (5 μ M) durant 24h. A continuació es van realitzar extractes cel·lulars totals i 50 μ g van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents proteïnes van ser detectades amb els anticossos específics corresponents. +, presència; -, absència.

Aquests resultats mostraven que la PS1p i la PS1np tenien un comportament diferent en el processament de l'E-cadherina. Mentre que la PS1p disminuïa els nivells de l'E-cadherina, la PS1np no els modificava. Per tant, vam concloure que només la forma processada de la PS1 era la responsable del tall de l'E-cadherina, induint la generació d'un fragment citosòlic (CTF2).

1.5. La PS1p interacciona amb l'E-cadherina *in vitro* i en línies cel·lulars en cultiu

Per tal que la PS1p induís el processament de l'E-cadherina, era necessari que aquestes dues proteïnes formessin part del mateix complex. Es va analitzar la interacció entre la PS1p endògena i l'E-cadherina. Ambdues proteïnes van coimmunoprecipitar en les cèl·lules MEFs PS(+/+), tal com es mostra a la **Figura 23A**. Evidentment, en les MEFs PS(-/-), no es va observar cap complex PS1p-E-cadherina, ja que aquestes cèl·lules no expressaven les presenilines.

La interacció de la PS1p endògena amb el fragment citosòlic de l'E-cadherina (E-cadh/CTF2), també va ser detectada *in vitro* per assaigs de pull-down (**Figura 23B**, veure els carrils 4 i 8 del panell superior). Aquesta interacció també es produïa entre la PS1p exògena (transfectada en les MEFs PS(-/-)) i el fragment citosòlic de l'E-cadherina, l'E-cadh/CTF2 (**Figura 23B**, veure els carrils 3 i 7 del panell superior). En canvi, no es va detectar cap interacció entre la PS1np exògena i l'E-cadh/CTF2 (**Figura 23B**, comparar els carrils 2 i 6).

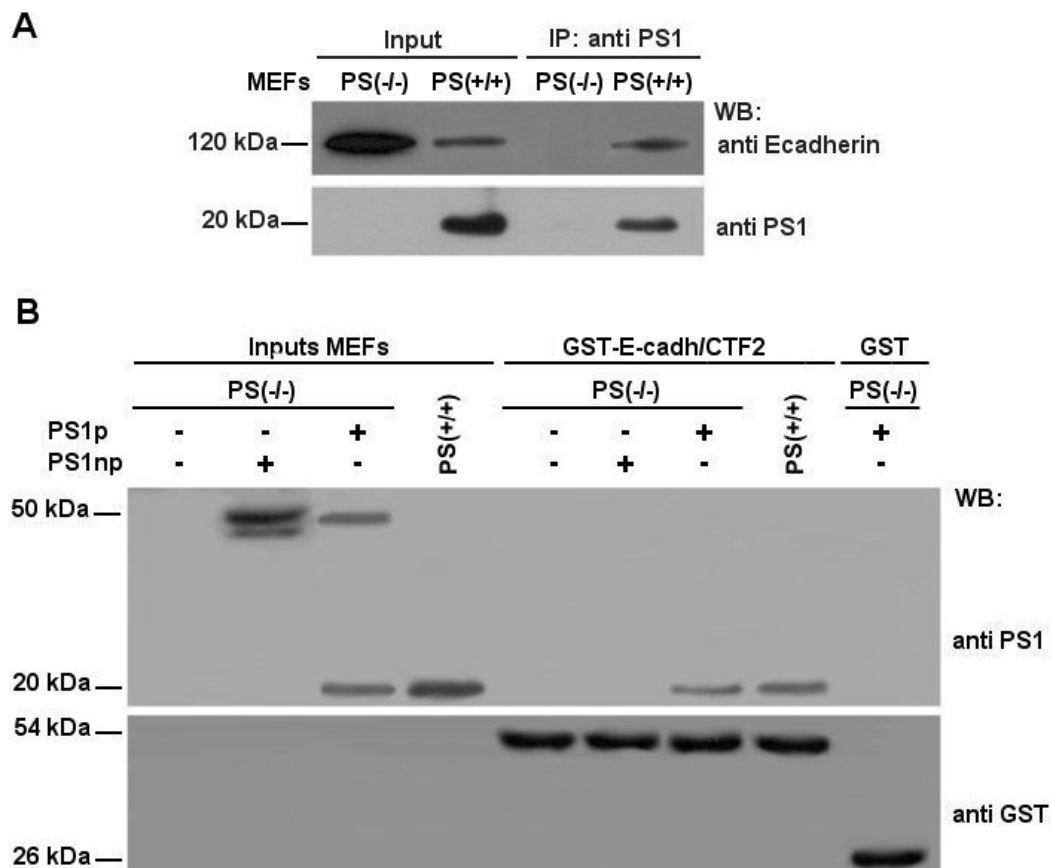


Figura 23. La PS1p interacciona amb l'E-cadherina. (A) 500 µg de cada tipus cel·lular van ser immunoprecipitats amb l'anti-PS1(303-316) (veure apartat 2.3.3 dels Materials i mètodes). Les mostres van ser processades per

SDS-PAGE i Western blot. L'E-cadherina associada a la PS1p es va detectar amb l'anticòs específic anti-E-cadherina. **(B)** Es van transfectar transitòriament cèl·lules MEFs PS(-/-) amb 15 µg de pcDNA3.1-PS1 (PS1p), de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np). 1 mg d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 15 pmols de GST-E-cadh/CTF2 o GST com a control. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de PS1np i PS1p associada a la E-cadh/CTF2, es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(263-407). Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similar de la proteïna recombinant en cada condició. **Input:** 5% de l'extracte cel·lular total. +, presència; -, absència.

Aquests resultats indicaven, que només la PS1p interaccionava amb l'E-cadherina. A més, permetien explicar les dades obtingudes en l'apartat anterior (**Figura 22**), en el sentit que la PS1p és la responsable del processament de l'E-cadherina perquè es capaç d'interaccionar directament amb aquesta última o de formar part del mateix complex. Mentre que, la PS1np no modifica els nivells d'E-cadherina, ja que aquestes dues proteïnes no interaccionen.

1.6. La p120-catenina competeix amb la PS1p i regula l'estabilitat de l'E-cadherina

La p120-catenina és un membre de la família de les proteïnes armadillo, que interacciona amb l'E-cadherina pel mateix domini jxtamembrana per on s'uneix la PS1. Per assaigs de pull-down, es va analitzar si la p120-catenina competia amb la PS1p per unir-se a l'E-cadherina. Com es mostra en la **Figura 24**, el fragment citosòlic de l'E-cadherina (E-cadh/CTF2) que manté el domini jxtamembrana, interaccionava amb la PS1p present en les cèl·lules MEFs PS(+/-) (veure el carril 2 del panell superior). La preincubació del fragment E-cadh/CTF2 amb la p120-catenina, disminuïa la quantitat de PS1p unida al fragment E-cadh/CTF2 (comparar els carrils 2 i 3 del panell superior), indicant que la PS1p i la p120-catenina competien per unir-se al mateix domini de l'E-cadherina.

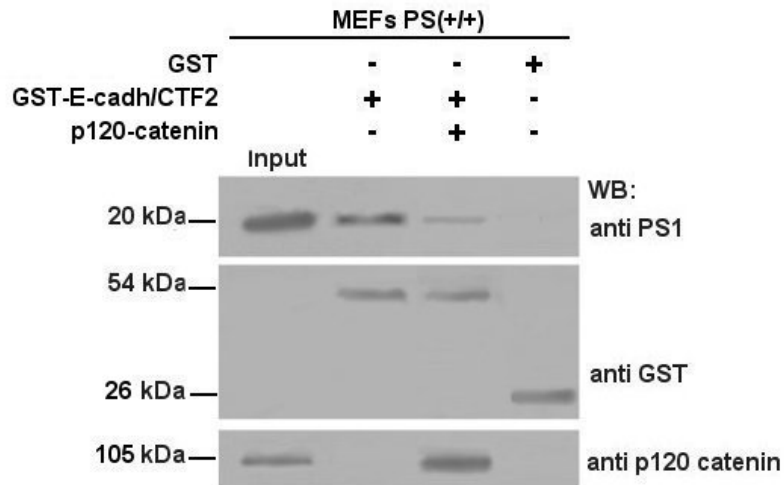


Figura 24. La p120-catenina competeix amb la PS1p per unir-se a l'E-cadherina. 1,3 mg d'extractes cel·lulars MEFs PS(+/+) es van incubar amb 22 pmols d'E-cadh/CTF2, els quals van ser preincubats o no amb 20 pmols de p120-catenina. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de PS1p associada a l'E-cadh/CTF2, es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similars de la proteïna recombinant. Amb l'anti-p120-catenina per comprovar que la p120-catenina estava present en els complexos. **Input:** 5% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència.

A continuació, es va plantejar la possibilitat de que en presència de la p120-catenina, com que hi hauria menys PS1p unida a l'E-cadherina, això comportaria un menor processament de l'E-cadherina, i per tant, no disminuirien els nivells d'E-cadherina. Per tal de comprovar-ho, es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules MEFs PS(-/-) amb un plàsmid que permetia expressar l'E-cadherina fusionada amb CFP (E-cadherina-CFP), i amb els plàsmids que expressaven la PS1p i/o la p120-catenina. En presència de la PS1p disminuïen els nivells de l'E-cadherina exògena (**Figura 25**, comparar els carrils 2 i 3 del panell superior), com ja s'havia observat anteriorment. En canvi, quan les cèl·lules estaven transfectades amb la p120-catenina sola o en presència de la PS1p, no s'observava disminució dels nivells d'E-cadherina (comparar els carrils 2, 4 i 5). A més, es mantenien uns nivells d'E-cadherina més elevats que quan només es transfectava la PS1p (comparar els carrils 3 i 5).

Per tant, la p120-catenina, desplaçava la PS1p de la seva unió a l'E-cadherina, disminuint llavors el processament de l'E-cadherina. Es va concloure, que la p120-catenina estabilitzava l'E-cadherina.

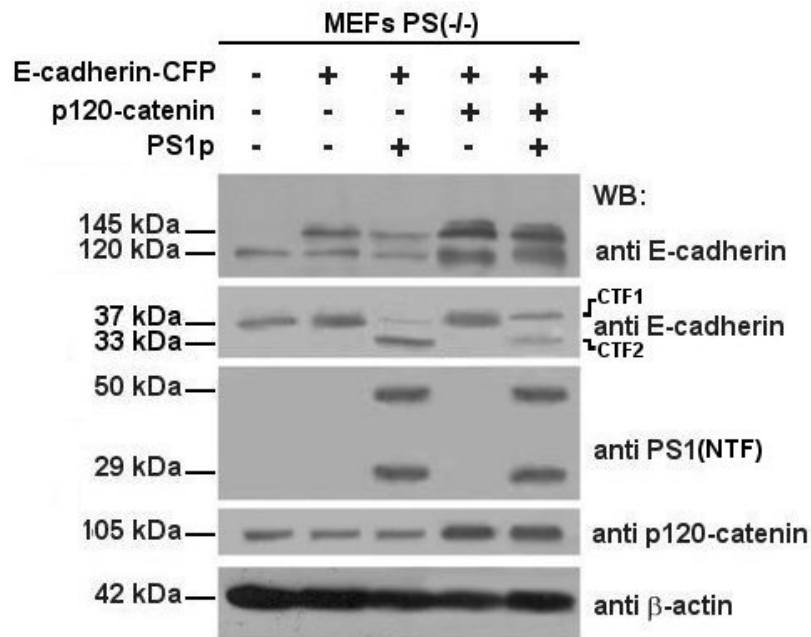


Figura 25. La p120-catenina regula l'estabilitat de l'E-cadherina. Les cèl·lules MEFs PS(-/-) es van cotransfectar amb 2 μ g de pECFPN1-E-cadherina, de pcDNA3.1His-p120-catenina i/o de pcDNA3.1-PS1 (PS1p). 24 h posttransfecció es van fer extractes cel·lulars totals. 50 μ g d'extractes van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Els nivells d'expressió de l'E-cadherina es van detectar amb l'anticòs anti-E-cadherina. L'anti-PS1(1-65) i anti-p120 es van utilitzar per comprovar la transfecció, i l'anti- β -actina per normalitzar les diferents condicions.

2. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1p EN L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEX TCF-4- β -CATENINA, ÉS DEGUT A LA FORMACIÓ DELS FRAGMENTS CADH/CTF2

2.1. Els fragments cadh/CTF2 inhibeixen l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4- β -catenina

Els resultats obtinguts mostraven que la PS1p era la responsable de la pèrdua d'estabilitat de l'E-cadherina. A més, tant l'estabilitat de les cadherines com la formació dels fragments citosòlics (cadh/CTF2) i també l'efecte inhibidor de la PS1p en l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina, eren dependents de l'activitat γ -secretasa.

Per tant, l'estabilitat de les cadherines i la inhibició de l'activitat transcripcional semblaven dependre de la mateixa causa. És a dir, que la disminució dels nivells de les cadherines senceres i el conseqüent augment dels fragments cadh/CTF2 fos la

causa de l'efecte inhibidor de la PS1p en l'activitat transcripcional. A més, els homòlegs dels fragments cadh/CTF2 d'altres proteïnes transmembrana de tipus I, com el fragment de Notch o de l'APP s'havia descrit que tenen capacitat de translocar al nucli, on regulen l'expressió de diferents gens [250, 251]. Això ens va fer pensar que els fragments CTF2 de les cadherines, podien estar regulant la transcripció dependent de Tcf-4- β -catenina.

Es van realitzar diferents assaigs d'activitat transcripcional en les cèl·lules MEFs PS(-/-) cotransfectades amb diferents concentracions dels plàsmids que expressaven els fragments citosòlics de les cadherines (E-cadh/CTF2 i N-cadh/CTF2), i el plàsmid TOP-FLASH, el qual té el promotor TOP sensible a Tcf-4- β -catenina. Es va utilitzar aquesta línia cel·lular perquè en ser *knock-out* per les presenilines, les cèl·lules no generen els fragments citosòlics de les cadherines. Si realment l'efecte inhibidor de la PS1p era degut a la formació d'aquests fragments, esperàvem trobar una disminució de l'activitat transcripcional en aquestes cèl·lules. Efectivament, s'observava una disminució de l'activitat transcripcional Tcf-4- β -catenina en presència, tant del fragment E-cadh/CTF2 com del N-cadh/CTF2 (veure la **Figura 26**). A més, aquesta inhibició era dependent de la concentració dels fragments citosòlics. A major concentració d'aquests fragments, més inhibició de l'activitat transcripcional. Per tant, l'efecte inhibidor de la PS1p semblava dependre de la formació dels fragments E-cadh/CTF2 i N-cadh/CTF2.

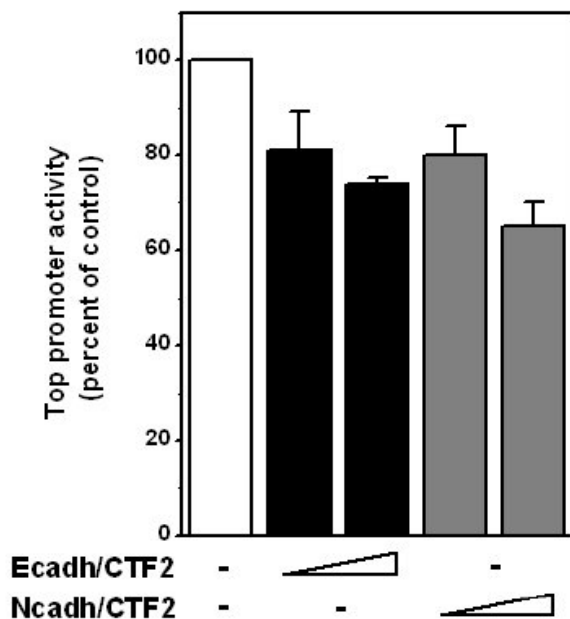


Figura 26. Els fragments cadh/CTF2 inhibeixen l'activitat transcripcional dependent de β -catenina. Cèl·lules MEFs PS(-/-) es van cotransfectar amb pEGFPC1-E-cadh/CTF2 o pcDNA3.1-N-cadh/CTF2 (150-300 ng) o el vector buit com a control, el plàsmid TOP-FLASH (50ng) i el plàsmid pTK-Renilla (20ng). L'activitat luciferasa relativa de cada mostra es va determinar 48 h després de la transfecció. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb el vector buit. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. -, absència.

Per acabar de concloure que la formació del fragment E-cadh/CTF2 era responsable de la inhibició per la PS1p de l'activitat transcripcional de la β -catenina, es va plantejar la següent hipòtesi:

Si la p120-catenina estabilitzava l'E-cadherina, com a conseqüència, no es generaria el fragment E-cadh/CTF2. Per tant, no hi hauria disminució de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina.

Es van fer assaigs d'activitat transcripcional cotransfectant transitòriament les cèl·lules MEFs en presència o no dels plàsmids que expressaven la PS1p i/o la p120-catenina, i amb el plàsmid TOP-FLASH. Es pot observar a la **Figura 27**, que la p120-catenina era capaç de revertir la inhibició de l'activitat transcripcional dependent del complex Tcf-4- β -catenina originada per la PS1p (tant per la PS1p endògena com exògena).

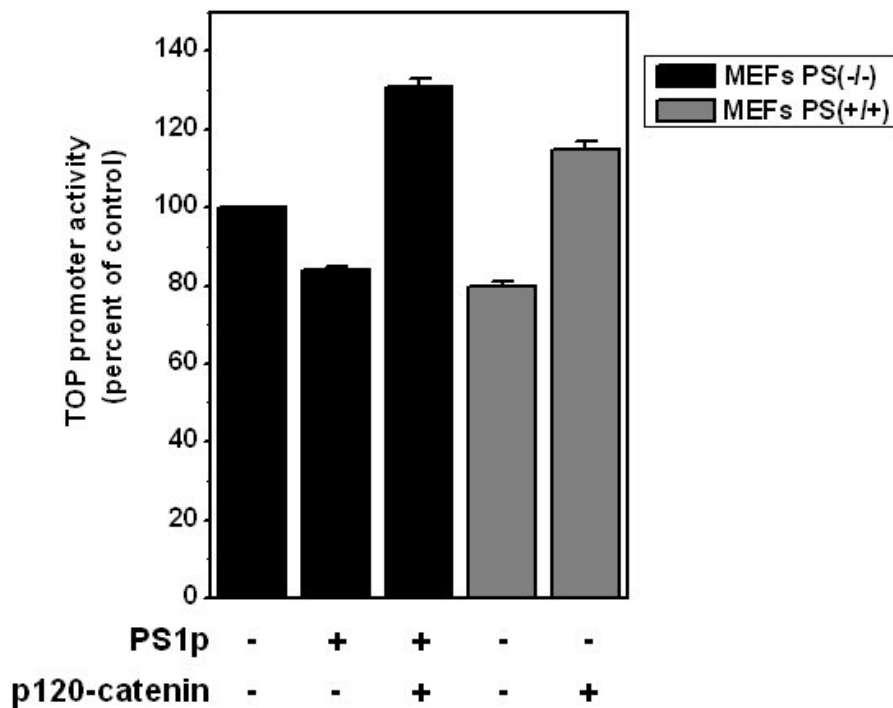


Figura 27. La p120-catenina reverteix la inhibició mediada per la PS1p de l'activitat transcripcional dependent del complex Tcf-4- β -catenina. Cèl·lules MEFs es van cotransfectar amb pcDNA3.1Myc/His-PS1p (150 ng), i/o pcDNA3.1His-p120-catenina (150 ng), el plàsmid TOP-FLASH (50ng) i el plàsmid pTK-Renilla (20ng). Després de 48 h, es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb el vector buit. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. -,absència; +,presència.

2.2. Per què els fragments E-cadh/CTF2 inhibeixen l'activitat transcripcional de Tcf-4- β -catenina?

2.2.1. La β -catenina facilita la localització nuclear del fragment E-cadh/CTF2

Una vegada comprovat, que l'efecte inhibidor de la PS1p era degut a la generació dels fragments citosòlics de les cadherines (cadh/CTF2), es va intentar esbrinar com aquests fragments podien inhibir l'activitat transcripcional depenent de la β -catenina. El fragment citosòlic de l'E-cadherina manté el domini d'interacció a la β -catenina. Es va plantejar la possibilitat que la formació del complex E-cadh/CTF2- β -catenina, segrestés a la β -catenina al citoplasma, impeding la seva translocació al nucli i per tant la seva funció com a coactivador transcripcional.

Per estudiar la localització cel·lular del fragment E-cadh/CTF2, es van realitzar assaigs de fluorescència. Es van transfectar transitòriament les cèl·lules MEFs PS(-/-) amb el plàsmid que expressava el fragment E-cadh/CTF2 fusionat amb GFP, en presència o no del plàsmid de la β -catenina *wild type*. El fragment E-cadh/CTF2 es localitzava al citoplasma (veure la **Figura 28A**). Quan es cotransfectava amb la β -catenina predominava la localització nuclear (**Figura 28B**).

Aquest efecte que s'observava en presència de la β -catenina, va ser comprovat cotransfectant el plàsmid del fragment GFP-E-cadh/CTF2 amb un plàsmid que expressava la β -catenina fusionada amb CFP. La construcció CFP- β -catenina permetia confirmar, si la localització nuclear del fragment E-cadh/CTF2 era facilitada per la β -catenina. Esperàriem veure una localització nuclear de l'E-cadh/CTF2, només en les cèl·lules que expressessin també la CFP- β -catenina. Com mostra la **Figura 28C**, es van observar dues poblacions cel·lulars amb diferent localització del fragment E-cadh/CTF2. Un grup de cèl·lules en les que l'E-cadh/CTF2 tenia una localització citoplasmàtica (fletxa vermella), i un altre grup cel·lular on l'E-cadh/CTF2 tenia una localització nuclear (fletxes blanques). La localització citoplasmàtica de l'E-cadh/CTF2, corresponia a cèl·lules que no havien incorporat la CFP- β -catenina (fletxa vermella de la **Figura 28D**). Mentre que, les cèl·lules amb localització nuclear eren les que s'havien transfectat a la vegada amb la CFP- β -catenina (fletxes blanques). Aquests resultats suggerien, que la β -catenina facilitava la translocació del fragment E-cadh/CTF2 al nucli. Per tant, l'E-cadh/CTF2 no segrestava la β -catenina al citoplasma, sinó que el complex E-cadh/CTF2- β -catenina localitzava al nucli.

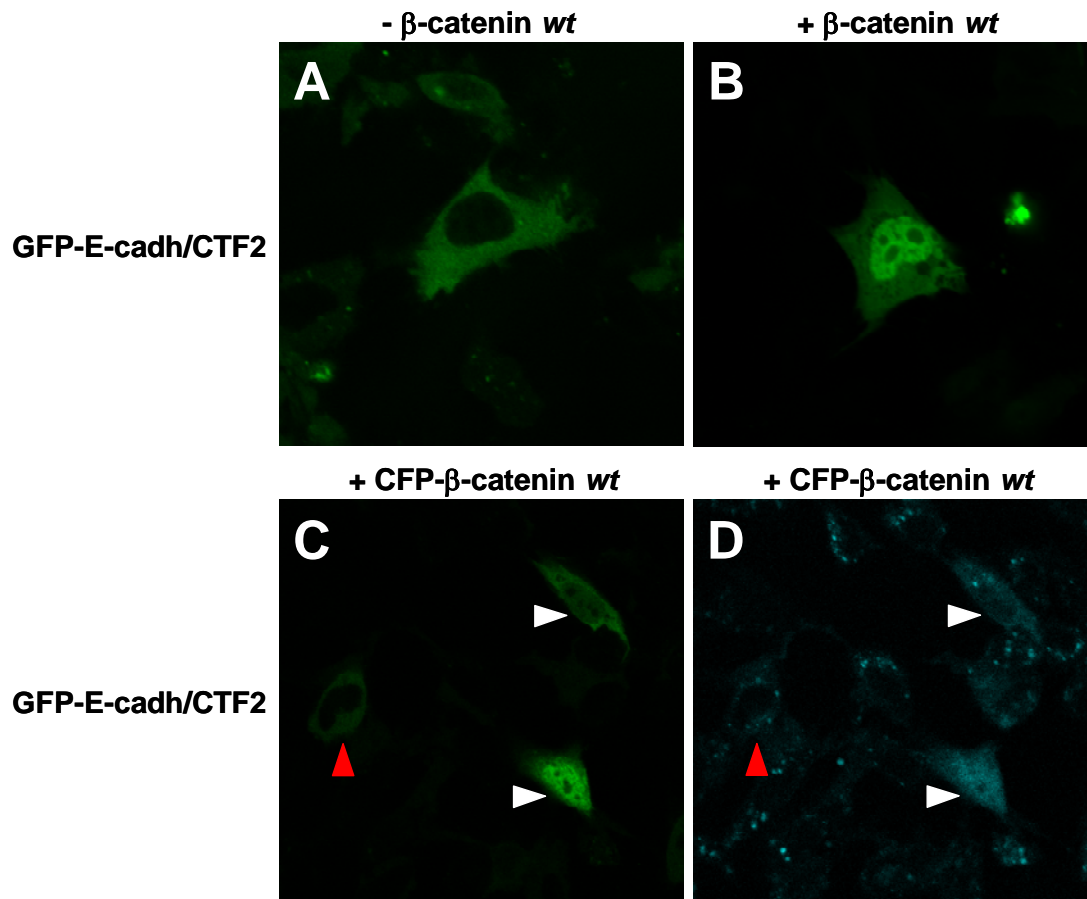


Figura 28. La β -catenina facilita la localització nuclear de l'E-cadh/CTF2. Les cèl·lules MEFs PS(-/-) es van transfectar amb pEGFP-E-cadh/CTF2 (250ng) (A), amb pEGFP-E-cadh/CTF2 (250ng) i pcDNA3.1His- β -catenina *wild type* (wt) (250ng) (B) i amb pEGFP-E-cadh/CTF2 (250ng) i pECFPc1- β -catenina wt (625ng) (C i D). Visualització en verd de la GFP-E-cadh/CTF2 (A, B i C) i en blau de la CFP- β -catenina wt (D).

2.2.2. El fragment E-cadh/CTF2 no impedeix la interacció Tcf-4- β -catenina

Si el complex E-cadh/CTF- β -catenina és localitzava al nucli, vam pensar que podia inhibir l'activitat transcripcional impedit la interacció entre la β -catenina i el Tcf-4. Per això, es va immunoprecipitar la β -catenina tant de les cèl·lules MEF PS(-/-) com de les MEF PS(+/+), i es va analitzar la presència de Tcf-4. No s'observaven diferències d'interacció entre la β -catenina i el Tcf-4 en presència del fragment citosòlic de l'E-cadherina (E-cadh/CTF2) (Figura 29, comparar els carrils 3 i 4, del panell 2), indicant que aquesta tampoc era la causa de l'efecte inhibidor de l'activitat transcripcional de la β -catenina.

L'E-cadherina sencera, el fragment E-cadh/CTF1 i l'E-cadh/CTF2 interaccionaven amb la β -catenina, ja que tots aquests fragments mantienien el domini d'unió a la β -catenina (veure el panell superior).

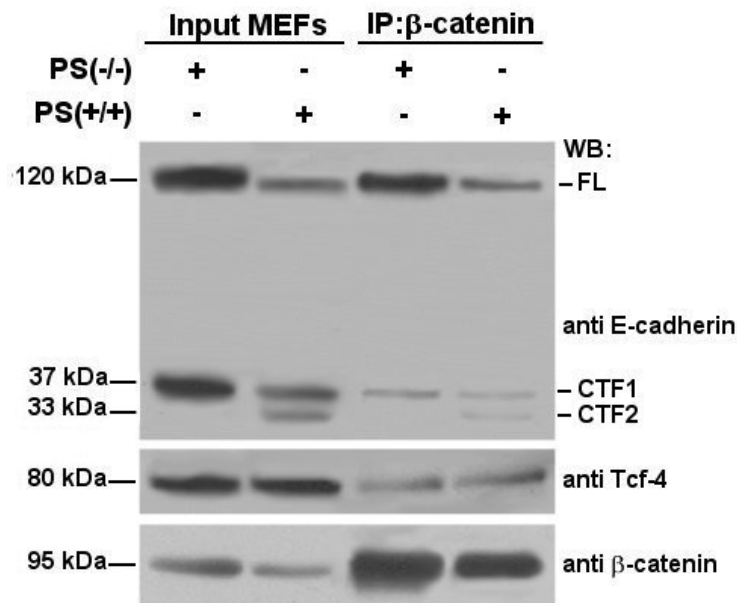


Figura 29. L'E-cadh/CTF2 no impedeix la interacció entre el Tcf-4 i la β-catenina. 800 µg d'extractes cel·lulars totals de les cèl·lules MEFs, es van immunoprecipitar amb l'anti-β-catenina (veure l'apartat 2.3.3 dels Materials i mètodes). Els diferents fragments d'E-cadherina i el Tcf-4 associats es van analitzar per Western blot amb els anticossos específics corresponents. Per verificar que nivells similars de β-catenina s'havien purificat, es va reanalitzar la membrana amb l'anti-β-catenina. **Input:** 7,5% de l'extractes cel·lulars total. -, absència; +, presència.

2.2.3. El fragment E-cadh/CTF2 interacciona amb la CBP

El grup de Marambaud i col·laboradors [252] va demostrar recentment que el fragment N-cadh/CTF2 interaccionava amb el factor transcripcional CBP i promovia la seva degradació via proteosoma, inhibint la transcripció dependent de CRE.

Els dominis citosòlics de la N-cadherina i l'E-cadherina tenen una elevada homologia, per això, ens vam plantejar la possibilitat que el fragment E-cadh/CTF2 també pogués interaccionar amb la CBP. Es van realitzar assaigs de pull-down amb els fragments N- i E-cadh/CTF2 fusionats a GST i extractes cel·lulars de MEFs PS(-/-). Com mostra la **Figura 30**, l'E-cadh/CTF2 també interaccionava amb la CBP (veure el carril 2). Aquestes proteïnes de fusió van ser fosforilades per la serina treonina quinasa CKI, que s'havia descrit que tenia activitat sobre l'E-cadherina. Es va observar que la fosforilació, tant del fragment N-cadh/CTF2 com de l'E-cadh/CTF2, disminuïa la seva afinitat per la CBP (comparar els carrils 2-3 i 4-5), indicant que aquesta interacció estava regulada per fosforilació en residus serina-treonina de les cadherines.

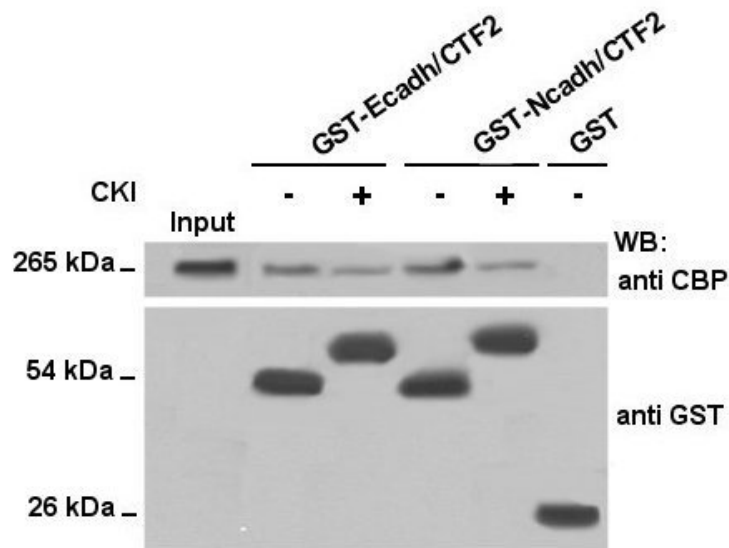


Figura 30. L'E-cadh/CTF2 interacciona amb la CBP. 1.2 mg d'extractes cel·lulars MEFs PS(-/-) es van incubar amb 22 pmols de GST-E-cadh/CTF2, GST-N-cadh/CTF2 o GST com a control, prèviament fosforilats o no amb CKI δ durant 40 minuts a 30°C. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de CBP associada a la N- i E-cadh/CTF2, es va detectar amb l'anticòs específic anti-CBP. Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similar de la proteïna recombinant en cada condició. **Input:** 5% de l'extracte cel·lular total. +, presència; -, absència.

2.2.4. L'E-cadh/CTF2 inhibeix l'activitat transcripcional a través de la CBP

La interacció de la β -catenina amb el Tcf-4 és imprescindible per tal que es reclutin totes les proteïnes necessàries per activar la maquinària transcripcional, entre elles la CBP. La CBP és un coactivador transcripcional que interacciona directament amb la β -catenina. Si el fragment N-cadh/CTF2 interaccionava amb la CBP i promovia la seva degradació, potser l'E-cadh/CTF2, com que també interaccionava amb aquest coactivador transcripcional, també podria facilitar la seva degradació. Llavors, la disminució dels nivells de la CBP, podrien ser responsables de disminuir l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina.

Com que la PS1p genera els fragments citosòlics de les cadherines, es van realitzar assaigs d'activitat transcripcional cotransfectant les cèl·lules MEFs amb els plàsmids que expressaven la CBP, la PS1p i el plàsmid TOP-FLASH (sensible a Tcf-4- β -catenina). Com ja havíem observat, la PS1p disminuïa l'activitat transcripcional, depenent de dosi (**Figura 31**, carrils 2 i 3). En presència de CBP augmentava l'activitat transcripcional tant en les MEFs PS(-/-) com en les PS(+/+) (carrils 4 i 8), mentre que la cotransfecció amb la PS1p disminuïa l'activitat transcripcional (comparar carrils 4, 5 i 6), però menys que amb la PS1p sola. Aquests resultats

suggerien que l'efecte inhibidor de la PS1p era a través de la CBP. Però no podíem descartar si era degut a la generació de l'E-cadh/CTF2 o N-cadh/CTF2, ja que la PS1p genera els dos fragments citosòlics de les cadherines.

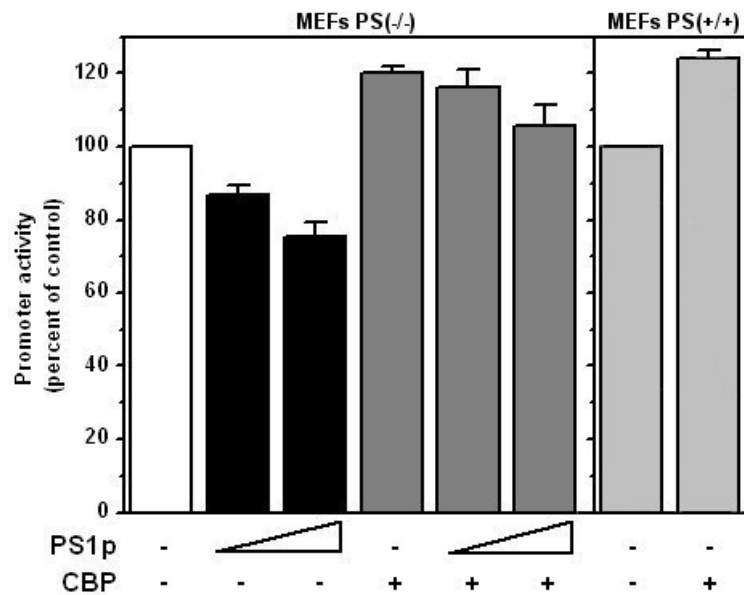


Figura 31. La PS1p inhibeix l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina a través de la CBP. Les cèl·lules MEFs es van cotransfectar amb pcDNA3.1-PS1(PS1p) (125-250ng), pcDNA3.1-CBP (250ng) o el vector buit com a control, el plàsmid TOP-FLASH (50ng) i el plàsmid pTK-Renilla (10ng). 48h posttransfecció, es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb pcDNA3.1 sol. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. -, absència; +, presència.

Per analitzar si l'efecte repressor de la PS1p era degut tant a la generació del fragment E-cadh/CTF2 com a la de N-cadh/CTF2, es van fer diferents assaigs d'activitat transcripcional. Es van cotransfectar les cèl·lules MEFs PS(-/-) amb els plàsmids que expressaven la CBP, els fragments E-cadh/CTF2 o N-cadh/CTF2, i el plàsmid TOP-FLASH. Com mostra la **Figura 32**, els fragments citosòlics de les cadherines inhibien l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina (veure els carrils de l'1 al 4), mentre que la CBP l'augmentava (veure el carril 5). Aquest augment era degut que les cèl·lules MEFs PS(-/-) no generen els fragments E- i N-cadh/CTF2, i per tant la CBP no era degradada. En canvi, l'activitat transcripcional disminuïa lleugerament en presència dels fragments citosòlics de les cadherines (veure els carrils del 5 al 9) ja que no hi havia suficient quantitat d'E-cadh/CTF2 o N-cadh/CTF2 per contrarestar els efectes de la CBP. Aquests resultats suggerien que la repressió produïda pels fragments E- i N-cadh/CTF2, transfectats o generats per acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1p, tenia lloc a través de la CBP, possiblement augmentant la seva degradació.

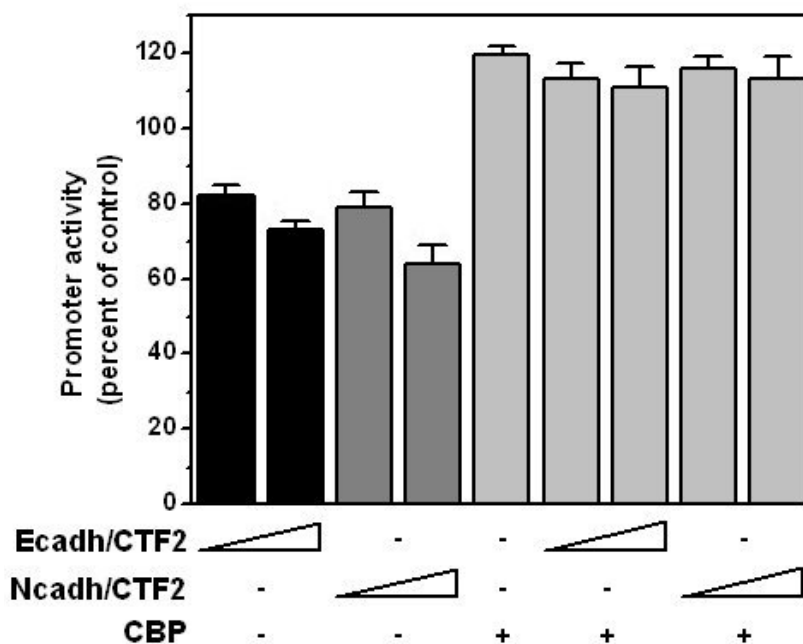


Figura 32. El fragment E-cadh/CTF2 inhibeix l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina a través de la CBP. Cèl·lules MEFs PS(-/-) es van cotransfectar amb pEGFPC1-E-cadh/CTF2 o pcDNA3.1-N-cadh/CTF2 (125-250 ng), pcDNA3.1-CBP (250ng) o el vector buit com a control, el plàsmid TOP-FLASH (50ng) i el plàsmid pTK-Renilla (10ng). L'activitat luciferasa relativa de cada mostra es va determinar 48 h després de la transfecció. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb el vector buit. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. -, absència.

En les cèl·lules MEFs PS(+/-), que expressaven la PS1p i per tant es generaven els fragments E- i N-cadh/CTF2, hi havia una disminució dels nivells de CBP totals (**Figura 33A**, comparar els carrils 1 i 2). Aquests nivells es recuperaven en tractar les cèl·lules amb l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa (comparar els carrils 2 i 3), ja que no hi havia formació dels fragments citosòlics de les cadherines. Per estudiar amb més detall aquesta disminució dels nivells totals de CBP, es van preparar extractes citosòlics i extractes nuclears de les cèl·lules MEFs PS(-/-) i de les PS(+/-) tractades o no amb l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa. En les cèl·lules MEFs PS(+/-), els nivells de CBP estaven clarament disminuïts en la fracció nuclear comparat amb les PS(-/-) (**Figura 33B**, comparar els carrils 4 i 5 del panell superior), i aquests nivells es recuperaven en presència de l'inhibidor γ -secretasa (veure els carrils 5 i 6). Mentre que en la fracció citosòlica els nivells de CBP eren similars (veure els carrils 1, 2 i 3).

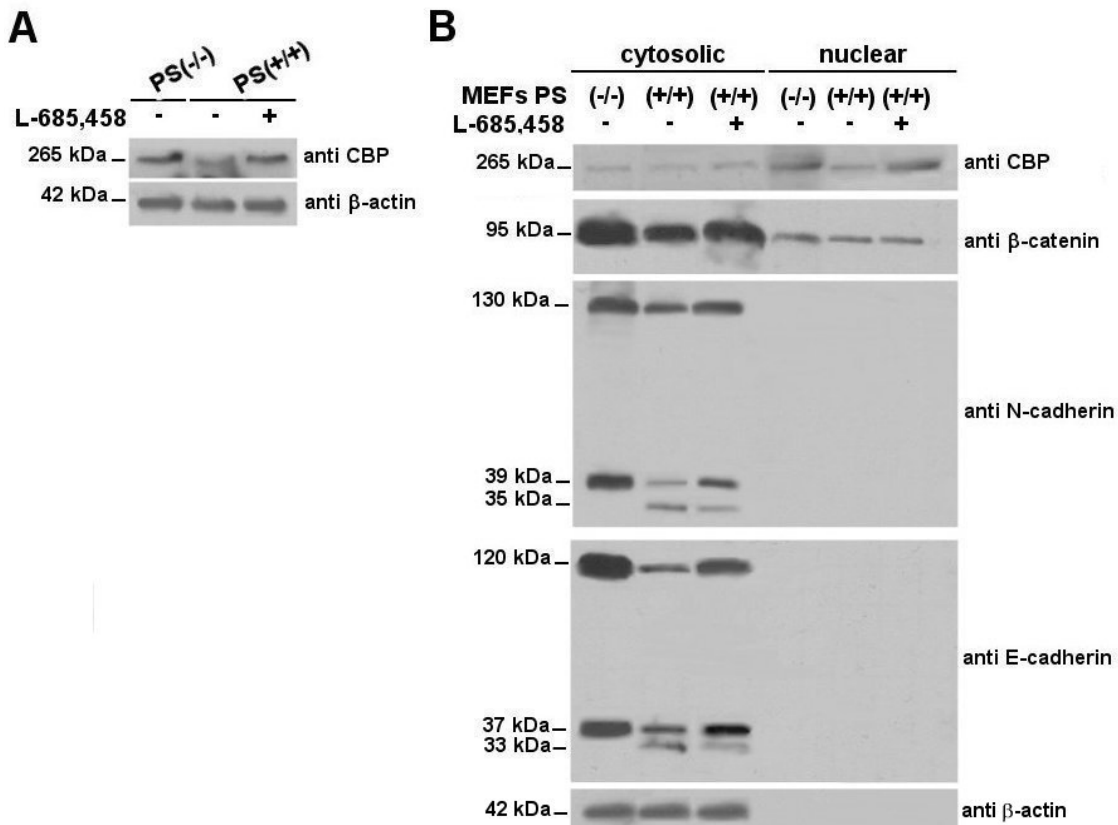


Figura 33. Disminució dels nivells de CBP en presència de la PS1p. (A) 50 μ g d'extractes totals de les cèl·lules MEFs PS(-/-) o PS(+/-) van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents proteïnes van ser detectades amb els anticossos específics corresponents. **(B)** Cèl·lules MEFs van ser fraccionades amb la fracció citosòlica o la fracció nuclear. 55 μ g de cada fracció cel·lular van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents proteïnes van ser detectades amb els anticossos específics corresponents. Les cèl·lules MEFs PS(+/-) es van tractar amb inhibidor L-685,458 (5 μ M) durant 24 h a les condicions que ho indica. -, absència; +, presència.

Ja havíem comentat que els nivells totals de β -catenina eren menors en les cèl·lules MEFs PS(+/-) que en les PS(-/-) (**Figures 18**). Es va observar que aquests nivells totals de β -catenina es recuperaven en tractar les cèl·lules MEFs PS(+/-) amb un inhibidor del proteosoma (**Figura 34**, carrils 3-4 del panell 2). Per tant, aquests resultats suggerien que la disminució dels nivells de β -catenina en presència de la PS1p, era deguda a un augment en la degradació d'aquesta catenina via proteosoma. En la **Figura 33B**, podem observar que aquesta disminució només era de la β -catenina present en la fracció citosòlica (comparar els carrils 1-2 i 4-5 del panell 2), ja que els nivells de la β -catenina nuclear es mantenien iguals. Aquests resultats indicaven que l'efecte inhibitor de la PS1p no era degut a una disminució dels nivells de β -catenina nuclear, sinó que era degut a una disminució dels nivells

nuclears del factor transcripcional CBP. Cal destacar que els fragments E- i N-cadh/CTF1 i CTF2 tenien una localització citosòlica (**Figura 33B**, veure el panell 3 i 4), indicant que l'efecte que produïen sobre la CBP era citosòlic, segurament afavorint una degradació via proteosoma.

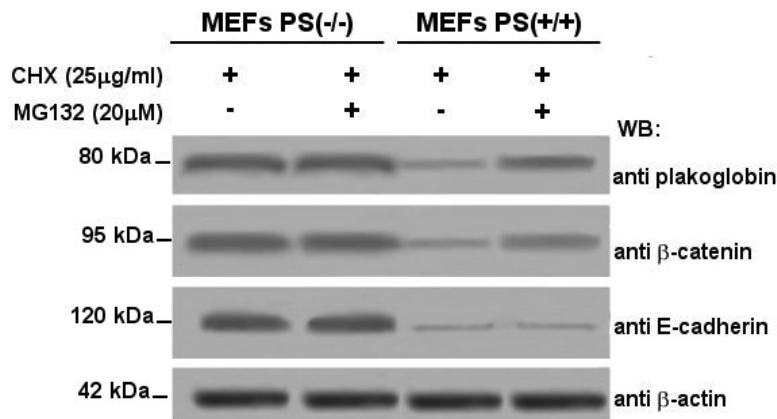


Figura 34. La PS1p facilita la degradació de la β -catenina i de la placoglobina via proteosoma. Les cèl·lules MEFs PS(-/-) i PS(+/-) es van tractar amb un inhibidor de la síntesi proteica, cicloheximida (CHX) i amb un inhibidor del proteosoma, MG132, a les condicions que ho indica. 50 µg d'extractes cel·lulars totals van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents proteïnes van ser detectades amb els anticossos específics corresponents. -, absència; +, presència.

El conjunt de resultats obtinguts en l'estudi de l'efecte inhibidor de la forma processada de la PS1 sobre l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina permetia concloure que: l'efecte inhibidor era degut a la formació dels fragments E-cadh/CTF2 i N-cadh/CTF2 per acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1p. Aquests fragments interaccionaven amb el factor transcripcional CBP afavorint la seva degradació. Com a conseqüència disminuïen els nivells nuclears de CBP i hi hauria una menor activitat transcripcional de Tcf-4- β -catenina.

**ÀNALISI DE L'EFECTE DE LA PS1_{np} SOBRE
L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL
COMPLEX TCF-4- β -CATENINA**

1. LA PS1np INHIBEIX L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEX TCF-4- β -CATENINA

1.1. La PS1np inhibeix l'activitat dels promotors TOP i LEF-1.

Generalment, la PS1 està processada i es forma un fragment amino i un carboxiterminal que es mantenen associats a la membrana [253]. Havíem observat, a l'inici d'aquest treball, que la sobreexpressió d'una forma de PS1 que no pot ser processada (PS1np) en les cèl·lules SW480, inhibia l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina de manera dosi dependent (**Figura 16**) i aquesta inhibició tenia lloc per un mecanisme diferent al de la PS1 que si es pot processar (PS1p) (**Figura 17**). Ja que alguns malalts d'Alzheimer familiar precoç presenten mutacions específiques en la PS1, que impedeixen el seu correcte processament (veure apartat 2.3.2 de la Introducció). Ens vam plantejar estudiar el mecanisme pel qual aquesta forma no processada de la PS1 (PS1np) reprimia l'activitat transcripcional de la β -catenina.

Es va estudiar si aquesta inhibició també s'observava utilitzant un fragment del promotor humà de LEF-1 (-1874/+85), que tenia els elements d'unió a Tcf-4.

La sobreexpressió de la PS1np en cèl·lules SW480 inhibia l'activitat transcripcional dels dos promotors sensibles al complex Tcf-4- β -catenina (**Figura 35**). La inhibició sobre el promotor LEF-1, també era dependent de la concentració de PS1np: així, a major concentració de la PS1np, major inhibició de l'activitat transcripcional induïda pel complex Tcf-4- β -catenina.

Aquesta inhibició per part de la PS1np també es va observar en altres línies cel·lulars epitelials, com són les cèl·lules pancreàtiques MiaPaca i les cèl·lules de colon SW620 (veure la **Figura 35**). Cal destacar, que la línia cel·lular pancreàtica RWP1, presentava una major resistència als efectes de la PS1np (veure la **Figura 35**).

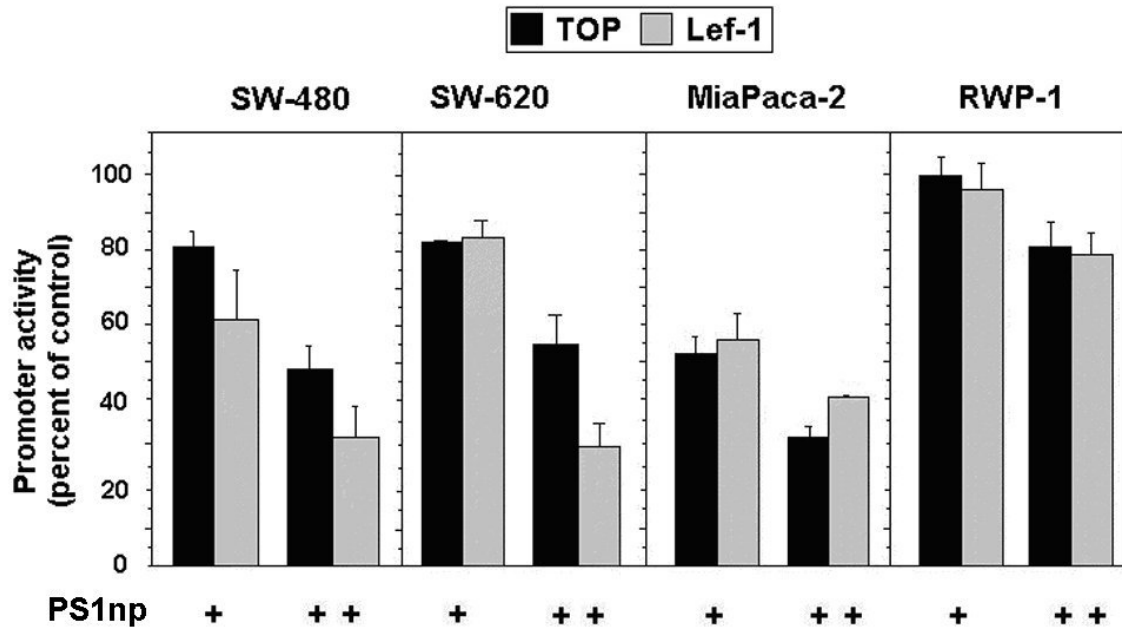


Figura 35. La PS1np inhibeix l'activitat transcripcional dependent de β -catenina. Les cèl·lules SW480 es van cotransfectar amb pcDNA3.1-*Myc/His*-PS1 (+, 150ng; ++, 300ng), el plàsmid TOP-FLASH (50ng) o el LEF-1-pGL3 (50ng) i el plàsmid pTK-*Renilla* (50ng). Després de 48 h, es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra com es descriu en l'apartat 3.7 dels Materials i mètodes. El percentatge d'activitat es va calcular comparant els nivells d'activitat luciferasa i els nivells obtinguts després de la transfecció amb pcDNA3.1-*Myc/His* sol. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents.

1.2. La PS1np disminueix els nivells de la proteïna c-myc

En els últims anys s'han identificat més de 50 gens regulats pel complex Tcf-4- β -catenina, implicats en el desenvolupament embrionari i en processos tumorals.

Si la PS1np inhibeix l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina, també esperariem una disminució en l'expressió dels gens diana de Tcf-4- β -catenina, com per exemple c-myc [185]. Aquest gen és responsable de que les cèl·lules tumorals proliferin més ràpidament i no siguin susceptibles a processos de diferenciació terminal [176, 254].

Es van transfectar les cèl·lules SW480 (línia cel·lular en la que s'observa un clar efecte inhibitor de la PS1 en l'activitat transcripcional) amb el plàsmid que expressava la PS1np i es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna c-myc. Tal com s'esperava i es mostra en la **Figura 36**, es va observar una disminució de l'expressió de la proteïna c-myc en cèl·lules transfectades prèviament amb la PS1np (veure el panell superior).

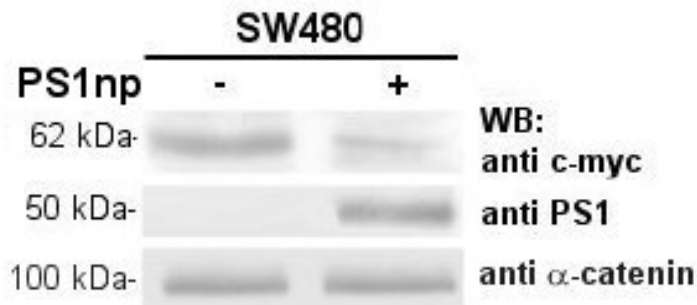


Figura 36. Disminució de l'expressió de la proteïna c-myc en presència de la PS1np. Es van transfectar cèl·lules SW480 amb 5 µg de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) o el vector sol com a control. A les 48 h, es van preparar els extractes cel·lulars. 25 µg d'extracte total van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. La c-myc va ser detectada amb l'anticòs anti-c-myc. La membrana es va estripar i reanalitzar amb l'anti-PS1(303-316) per verificar la transfecció i la presència de la PS1np. -, absència; +, presència.

2. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1np NO ÉS DEGUT A CANVIS EN ELS NIVELLS DE LA β-CATENINA EN CÈL·LULES EPITELIALS

Una vegada comprovat que la PS1np inhibia l'activitat transcripcional del complex Tcf-4-β-catenina en diferents línies cel·lulars epitelials, es va plantejar esbrinar el mecanisme pel qual la PS1np podia estar inhibint.

La capacitat de la β-catenina de migrar al nucli depèn dels nivells d'aquesta proteïna lliures al citosol. El control dels nivells citosòlics de la β-catenina està finament regulat per un complex multiproteic format per l'APC, l'axina, la β-catenina, la CK1α i la GSK3β, entre altres (veure l'apartat 3.2.1 de la introducció). La fosforilació de la serina 45 de la β-catenina per part de la CK1α, provoca que la GSK3β fosforili diferents residus de l'extrem N-terminal de la β-catenina. La fosforilació de la serina 33 facilita la unió de la β-Trcp ubiquitina lligasa i la posterior degradació de la β-catenina via proteosoma [255] (veure la **Figura 9** de la introducció).

S'ha descrit que la PS1 indueix la degradació de la β-catenina a través d'un mecanisme independent de l'estimulació per axina de la fosforilació per GSK3β dels residus Thr 41 i Ser 37 i 33 [211]. Per tant, es va estudiar si la inhibició per la PS1np de l'activitat transcripcional de la β-catenina en les cèl·lules SW480, podia ser deguda a una desestabilització de la β-catenina (augment de la degradació) com a conseqüència de la fosforilació en el seu extrem N-terminal. Es va transfectar

transitòriament cèl·lules SW480 amb els plàsmids que expressaven la PS1np o l'APC i es van tractar amb un inhibidor del proteosoma, *MG132*, en les condicions que ho indica. Aquest inhibidor bloqueja la via de degradació depenent d'ubiquitina-proteosoma, per tant, la β -catenina no és degradada i es pot estudiar el seu estat de fosforilació.

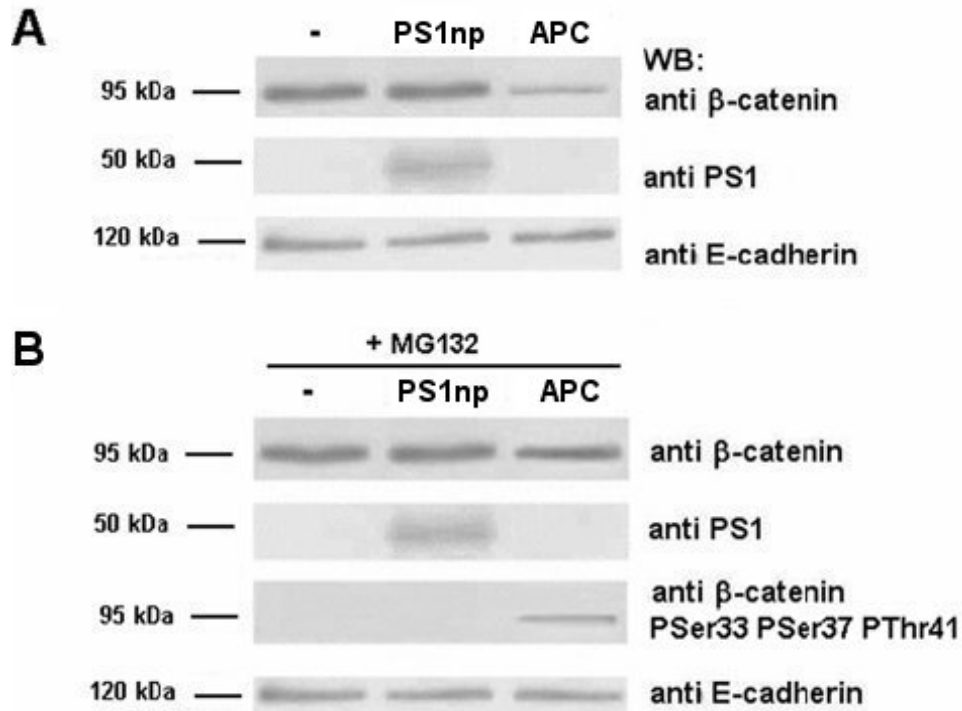


Figura 37. La PS1np no disminueix els nivells endògens de la β -catenina en les cèl·lules SW480. (A) Cèl·lules SW480 es van transfectar amb 5 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np), de pCMV-APC o del vector sol. A les 48 h es van preparar els extractes cel·lulars com es descriu en l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes. 20 μ g d'extractes totals van ser analitzats per SDS-PAGE i Western blot amb els anticossos específics envers la β -catenina, la PS1np i l'E-cadherina com a control. (B) Les cèl·lules es van transfectar igual que en el panell A, però van ser tractades, abans de la preparació dels extractes cel·lulars, durant 6 hores amb l'inhibidor del proteosoma MG132 a una concentració final de 10 μ M. Els extractes van ser analitzats per Western blot envers els mateixos anticossos que en el panell A, més l'anticòs específic pels residus Ser33, Ser37 i Thr41 fosforilats.

Com es mostra en la **Figura 37A** (comparar els carrils 1 i 2 del panell superior), la PS1np no disminuïa els nivells de β -catenina endògena. A més, la fosforilació en els residus Ser-33, Ser-37 i Thr-41 de la β -catenina no augmentava en les cèl·lules transfectades amb la PS1np, tot i en presència de l'inhibidor del proteosoma (**Figura 37B**, carril 1-2, panell 3). En canvi, tal com era d'esperar, l'APC disminuïa els nivells de β -catenina endògena (**Figura 37A**; comparar carrils 1 i 3 del panell superior) i augmentava la fosforilació en els residus situats en l'extrem

aminoterminal de la β -catenina (**Figura 37B**; carril 3 del panell 3). L'APC és utilitzat com a control ja que és un component del complex multiproteic de la via de degradació de la β -catenina dependent d'axina. Per tant, en presència d'APC s'afavoreix la fosforilació de l'extrem aminoterminal i la degradació de la β -catenina.

Aquests resultats permetien concloure que la inhibició per la PS1np de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina, no era deguda a una degradació de la β -catenina, ja que ni augmentava la fosforilació dels residus modificats per la GSK3 β , ni disminuïen els nivells de β -catenina en presència de la PS1np.

També vam estudiar, si la PS1np podia desestabilitzar els nivells exògens de la β -catenina. Es van cotransfectar transitòriament cèl·lules SW480 amb els plàsmids que expressaven la β -catenina, la Rho (com a control de transfecció) i la PS1np o bé l'APC, totes elles en pcDNA3.1/His, excepte l'APC. Es va purificar la β -catenina per níquel-agarosa i es van analitzar els nivells d'aquesta proteïna.

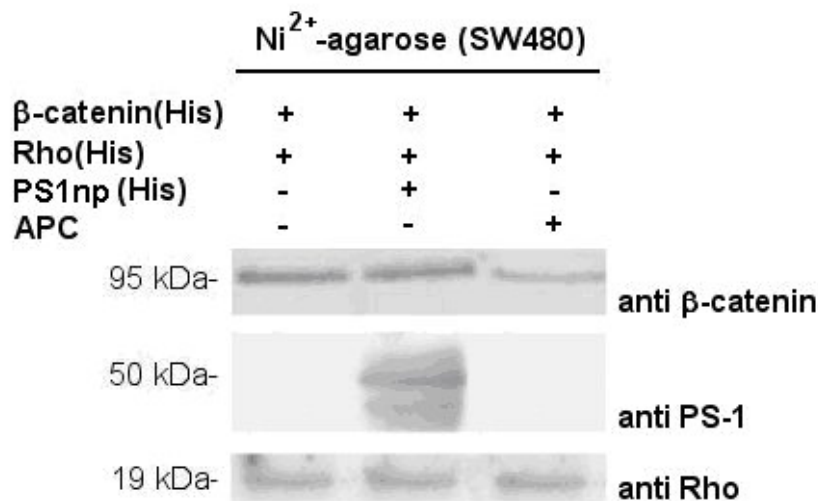


Figura 38. La PS1np no disminueix els nivells exògens de β -catenina. Es van cotransfectar cèl·lules SW480 amb 7 μ g de pcDNA3.1/His- β -catenina, 6 μ g de pcDNA3.1/His-Rho(K27T) i 10 μ g de pcDNA3.1/His-PS1 (PS1np), de pCMV-APC o del vector sol. A les 48 h es van preparar els extractes cel·lulars. 300 μ g d'extractes van ser incubats amb la níquel-agarosa per la purificació dels productes transfectats, els quals s'expressen amb una cua d'histidines. Les mostres van ser processades per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de β -catenina i PS1np ectòpica purificada, va ser detectada amb l'anticòs específic anti- β -catenina i anti-PS1(303-316). La quantitat de Rho purificada i detectada amb l'anti-Rho, era un control per verificar que l'experiment de la níquel agarosa havia funcionat per igual en les diferents condicions. +, presència; -, absència.

Es pot comprovar com la PS1np tampoc afectava els nivells de la β -catenina ectòpica purificada (**Figura 38**, comparar carrils 1 i 2 del panell superior), mentre que l'APC introduïda com a control, si que disminuïa els nivells de β -catenina (comparar

carrils 1 i 3 del panell superior), ja que accelera la seva degradació. La GTPasa Rho també va ser purificada per níquel-agarosa i es va utilitzar com a control de la transfecció per tal d'assegurar que les possibles diferències detectades en els nivells de β -catenina, no fossin degudes a errors en la purificació per la níquel-agarosa.

3. LA PS1np INTERACCIONA AMB LA β -CATENINA I LA PLACOGLOBINA

3.1. Interacció de la PS1np amb la β -catenina i la placoglobina en cèl·lules en cultiu

Es va investigar la possibilitat de que l'efecte inhibidor de la PS1np fos degut a la interacció PS1- β -catenina en els complexos de les unions adherents. Ambdues proteïnes van coimmunoprecipitar, en les cèl·lules epitelials SW480 i també en les cèl·lules RWP1, tal i com es mostra a la **Figura 39A**. També es va detectar que la PS1np podia interaccionar amb la placoglobina (o γ -catenina), un homòleg de β -catenina, en aquestes dues línies cel·lulars (**Figura 39B**).

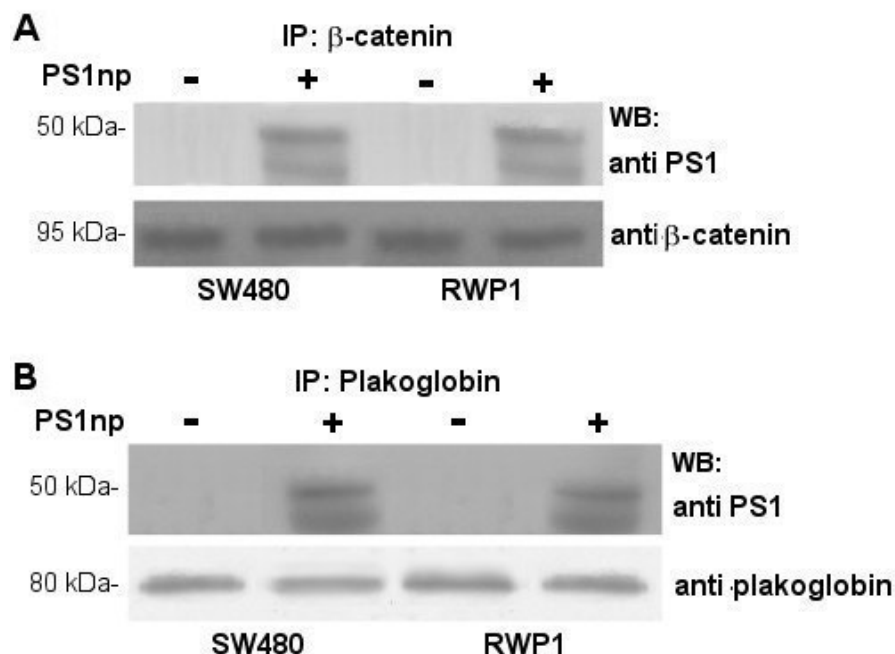


Figura 39. La PS1np s'associa amb la β -catenina i amb la placoglobina en les cèl·lules epitelials. Cèl·lules SW480 i RWP1 van ser transfectades transitòriament amb 15 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) o amb el vector buit com a control. A les 48 h es van preparar els extractes cel·lulars. 300 μ g de cada tipus cel·lular van ser immunoprecipitats amb l'anti- β -

catenina i l'anti-placoglobina. Les mostres van ser processades per SDS-PAGE i Western blot. La PS1np associada a la β -catenina i a la placoglobina es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). +, presència; -, absència.

3.2. Interacció *in vitro* de la PS1np amb la β -catenina i la placoglobina

La placoglobina és una proteïna homòloga a la β -catenina, que pot formar part de les unions adherents substituïnt a la β -catenina, però té un paper específic en els desmosomes.

La β -catenina i la placoglobina estan formades per tres dominis clarament diferenciats. Un domini central anomenat armadillo amb un 83% d'homologia en la seqüència aminoacídica i de caràcter bàsic. I els extrems N- i C-terminal els quals són més diferents ja que només comparteixen un 57% i un 15% d'homologia, respectivament (**Figura 40**) i són de caràcter àcid. La poca similitud que presenten els extrems terminals de la placoglobina i de la β -catenina, i el fet que aquests dominis terminals estan implicats en la regulació de les interaccions d'aquestes proteïnes amb altres factors, podria explicar les diferències funcionals d'ambdues proteïnes [170].

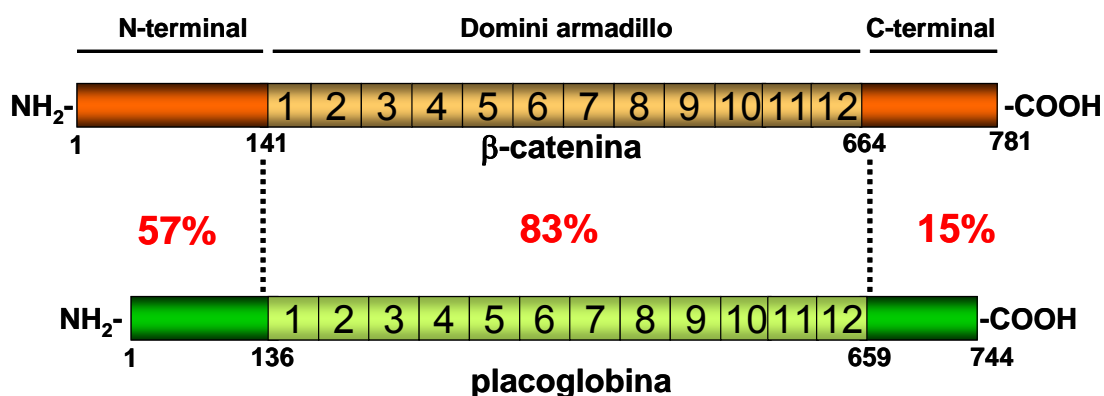


Figura 40. Esquema de la β - i γ -catenina (placoglobina). La seva estructura primària consta d'un extrem aminoterminal, un domini central format per 12 repeticions de 42 aminoàcids anomenat domini armadillo, i un extrem carboxiterminal. Els tant per cents indiquen el grau d'homologia de l'extrem N-terminal, del domini armadillo i de l'extrem C-terminal, respectivament, entre la β -catenina i la placoglobina.

La interacció entre la PS1np i la β -catenina també va ser detectada *in vitro* per assaigs de pull-down. Vam detectar que aquesta forma de la PS1, també era capaç d'unir-se a la placoglobina amb una afinitat similar a la de la β -catenina (veure **Figura 41**, comparar els carrils 2 i 3).

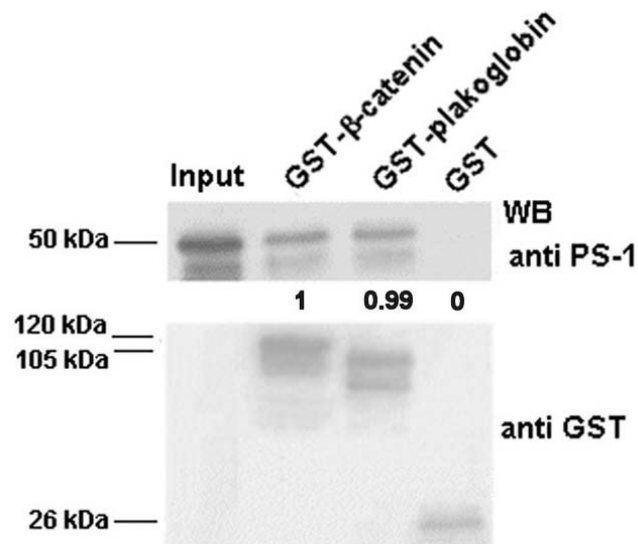


Figura 41. Interacció *in vitro* entre la PS1np- β -catenina i la PS1np-placoglobina. Es van transfectar transitòriament cèl·lules RWP1 amb 15 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1(PS1np). 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 10 pmols de GST- β -catenina, GST-placoglobina o GST. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de PS1np associada a la proteïna recombinant es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similars de les proteïnes recombinants. Els valors indicats a sota cada figura, representen la quantitat relativa de PS1np unida a la proteïna recombinant. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total.

3.3. La PS1np interacciona amb les últimes repeticions armadillo de la β -catenina

Resultats descrits pel nostre grup [168, 169] indiquen que els extrems terminals de la β -catenina interaccionen amb el domini armadillo i aquesta interacció limita la capacitat de factors, com l'E-cadherina i la TBP, d'unir-se a aquest domini armadillo.

Aquestes dades ens van fer plantejar la possibilitat que la interacció entre la β -catenina i la PS1np, també pogués estar regulada pels extrems terminals de la β -catenina. A més, es va determinar el lloc d'unió de la PS1np en la β -catenina.

Es van realitzar assaigs de pull-down de la PS1np amb diferents mutants delecionats de la β -catenina (veure la **Figura 42**), expressats com a proteïnes recombinants fusionades a GST. Es van utilitzar extractes cel·lulars RWP1 transfectats amb la forma no processada de la PS1. Els resultats van mostrar (**Figura 43**, comparar els carrils 2-3) que la PS1np té major afinitat pel domini armadillo central de la β -catenina que per la proteïna sencera. Aquest comportament ja s'havia descrit per altres proteïnes que interaccionen amb la β -catenina a través del domini

armadillo [168, 169], i suggeria que els extrems terminals de la β -catenina competien amb la PS1np per unir-se al domini central de repeticions armadillo de la β -catenina. Per tant, els extrems terminals de la β -catenina dificulten la unió entre la PS1np i la β -catenina.

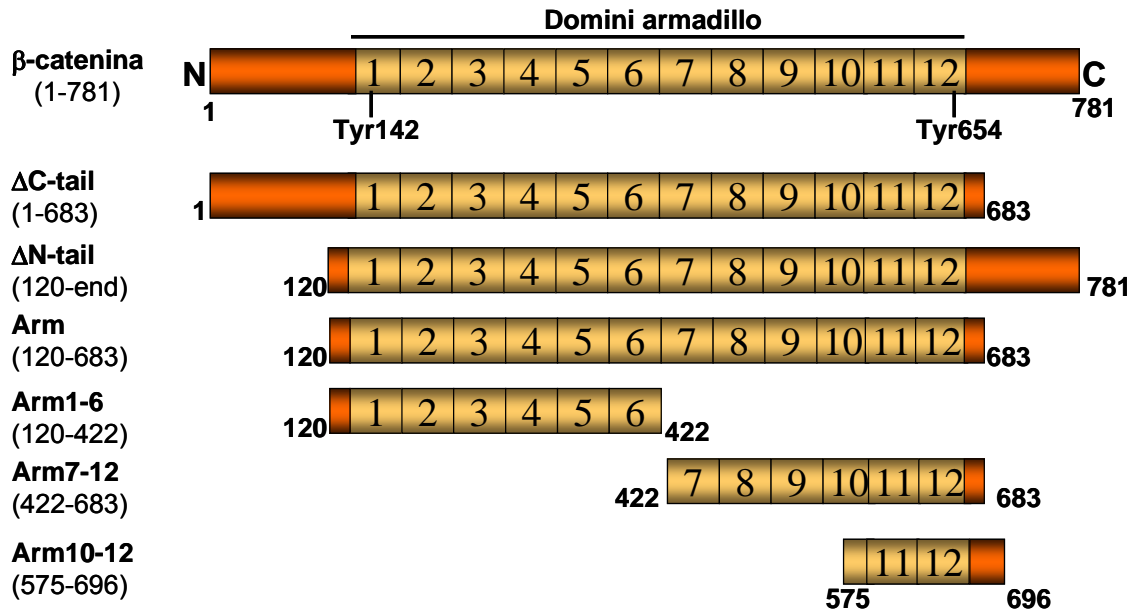


Figura 42. Diagrama de la β -catenina i dels diferents mutants deletionats utilitzats. Els rectangles taronges representen els extrems terminals de la β -catenina. El domini central està format per 12 repeticions armadillo on s'indiquen les tirosines més rellevants. La Tyr142 fosforilada per les quinases Fyn i Fer i la Tyr654 fosforilada pel receptor d'EGF (EGFR), que regulen la unió a l' α -catenina i a l'E-cadherina, respectivament.

Vam observar, que la PS1np s'associava amb un fragment de la β -catenina que contenia les últimes repeticions armadillo (7-12), amb una afinitat similar al domini armadillo sencer (**Figura 43**, comparar carrils 3 i 6). A més, el fragment de la β -catenina que conté les primeres sis repeticions armadillo pràcticament no interaccionava amb la PS1np (comparar els carrils 3 i 5). Per tant, són les últimes repeticions armadillo, entre els aminoàcids 422 i el 683, les responsables de la interacció amb la PS1np.

A la mateixa figura s'observava com la interacció entre la PS1np i la Δ N- β -catenina (construcció que li manca l'extrem N-terminal i sabem que potencia la interacció de l'extrem C-terminal al domini armadillo [169]), és menor que la interacció amb la Δ C- β -catenina (construcció que li falta l'extrem C-terminal) (comparar els carrils 2, 8 i 9). Per tant, aquests resultats indicaven que l'extrem C-terminal de la β -catenina és el que dificultava la unió entre la PS1np i la β -catenina.

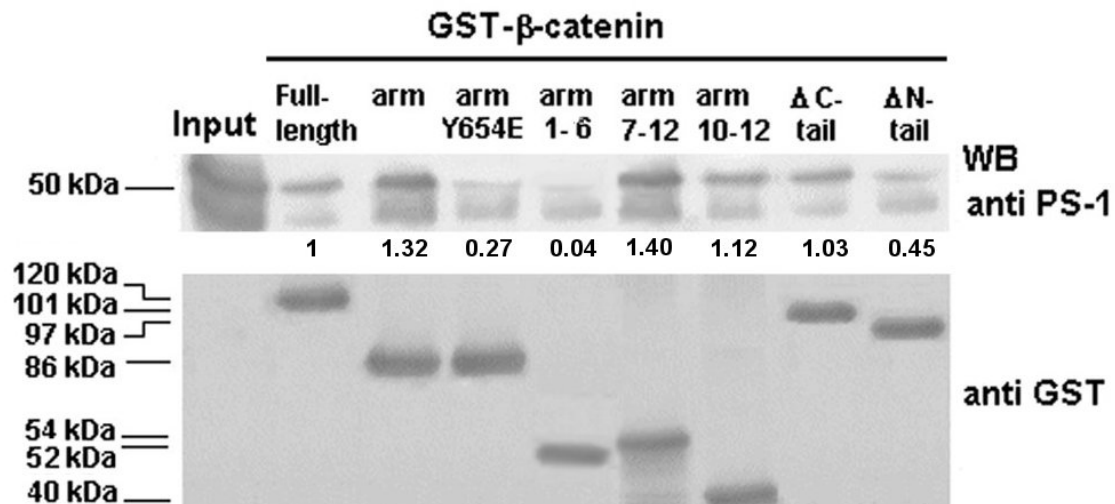


Figura 43. La PS1np interacciona amb les últimes repeticions (7-12) del domini armadillo de la β -catenina. Es van transfectar transitòriament cèl·lules RWP1 amb 15 μ g de pcDN3.1Myc/His-PS1(PS1np). 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 10 pmols de GST- β -catenina o amb els diferents mutants delecionats també expressats amb GST. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de la PS1np associada a la proteïna recombinant es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similars de les proteïnes recombinants. Els valors indicats a sota cada figura, representen la quantitat relativa de PS1np unida a la proteïna recombinant. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total.

3.4. La fosforilació de la Tyr654 de la β -catenina, disminueix l'afinitat de la PS1np per la β -catenina

Estudis anteriors del grup havien demostrat que la fosforilació de diferents residus tirosina de la β -catenina, regulaven la seva interacció amb diferents factors de les unions adherents. Concretament, la fosforilació de la tirosina 654 de la β -catenina, catalitzada en cèl·lules epitelials per tirosina quinases com el receptor EGF (EGFR) o erbB2 i menys eficientment per Src, disminueix la interacció entre la β -catenina i l'E-cadherina [236], donant lloc a una desestabilització i pèrdua de les unions adherents. D'altra banda la fosforilació addicional de la tirosina 142 per les quinases Fer o Fyn, inhibia la interacció entre la β -catenina i l' α -catenina [239], facilitant el pas al nucli de la β -catenina.

Es van utilitzar els mutants puntuals de la Tyr654 i la Tyr142 de la β -catenina a glutàmic, mutants que mimetitzen les formes fosforilades d'aquestes tirosines, per estudiar si la fosforilació d'aquests residus podia regular la interacció entre la PS1np i la β -catenina. Assaigs de pull-down amb les proteïnes recombinants fusionades a

GST (GST- β -catenina *wild type*, GST- β -cateninaY654E i GST- β -cateninaY142E) i extractes cel·lulars RWP1 transfectats transitòriament amb la forma no processada de la PS1, van mostrar que el mutant de la Tyr654 (Y654E) disminuïa la interacció entre la β -catenina i la PS1np (**Figura 44**). Es va observar també, que la interacció entre la PS1np i la construcció de la β -catenina que només té el domini central armadillo amb el residu Tyr654 mutant a glutàmic (Glu), també es veu disminuïda (**Figura 43**, comparar carrils 3 i 4).

En canvi, amb el mutant de la β -catenina Tyr142 a Glu (Y142E) no es va observar cap efecte en la interacció entre aquestes dues proteïnes.



Figura 44. La fosforilació de la tirosina 654 de la β -catenina afecta l'afinitat per la PS1np. Es van transfectar transitòriament cèl·lules RWP1 amb 15 μ g de pcDN3.1Myc/His-PS1 (PS1np). 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 10 pmols de GST- β -catenina (WT), amb els mutants puntuals (Y142E, GST- β -cateninaY142E i Y654E, GST- β -cateninaY654E) o GST com a control. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La PS1np associada a la proteïna recombinant (mutants puntuals) es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). En el panell inferior es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar que els nivells dels diferents mutants puntuals de la β -catenina eren similars. Els valors indicats a sota cada figura, representen la quantitat relativa de PS1np unida a la proteïna recombinant. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total.

3.5. La PS1np interacciona amb la placoglobina d'una manera diferent a com ho fa amb la β -catenina

Després d'haver observat per primera vegada una interacció entre la placoglobina i la PS1np vam voler caracteritzar-la. Malgrat la similitud entre la β -catenina i la placoglobina, ambdues interaccionaven de manera diferent amb la PS1np.

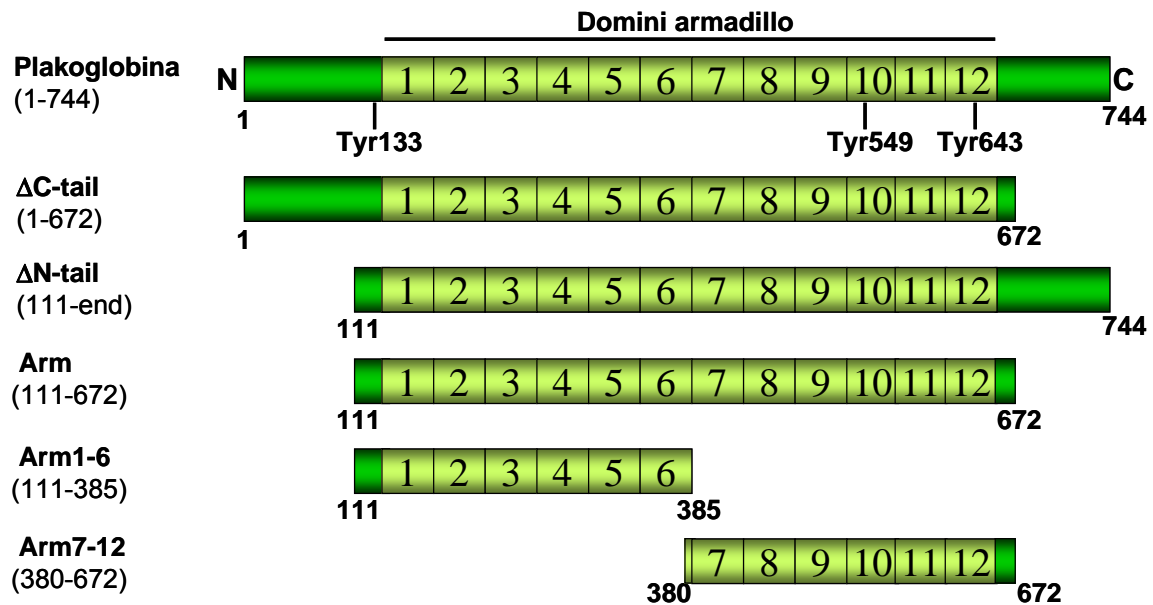


Figura 45. Diagrama de la placoglobina i de les diferents construccions delecionades utilitzades. Els rectangles verd fosc representen els extrems terminals de la placoglobina. El domini armadillo central està format per 12 repeticions armadillo i on s'indiquen les tirosines més importants. La Tyr133 (posició equivalent a la tirosina 142 de la β -catenina) és fosforilada per la quinasa Fyn. La Tyr549 (una fenilalanina en la β -catenina) és fosforilada per les quinases Fer i Fyn. Finalment, la Tyr643 (equivalent a la tirosina 654 de la β -catenina) és fosforilada per la tirosina quinasa Src.

Assaigs de pull-down de PS1np amb diferents mutants delecionats de la placoglobina (veure **Figura 45**), expressats també com a proteïnes recombinants amb GST, van mostrar que a diferència del que passava amb la β -catenina, el domini armadillo de la placoglobina tenia menys afinitat que la placoglobina sencera (**Figura 46**, comparar els carrils 2 i 3 del panell superior); indicant que els extrems amino i carboxiterminals de la placoglobina estaven regulant, de manera positiva, aquesta interacció. Concretament, era l'extrem N-terminal el que participava en l'associació a la PS1np, ja que la interacció entre la construcció que li falta l'extrem aminoterminal (Δ N-tail) i la PS1np, era menor que amb la construcció que li falta l'extrem carboxiterminal (Δ C-tail) (**Figura 46**, comparar els carrils 6 i 7). El domini d'interacció involucrat en la unió a la PS1np es va caracteritzar a les sis primeres repeticions armadillo, ja que la construcció que correspon a les últimes repeticions armadillo (arm7-12) no interaccionava amb la PS1np (comparar els carrils 3, 4 i 5).

Aquests resultats suggerien que la interacció de la PS1np amb la placoglobina tenia lloc més cap a l'extrem aminoterminal del domini armadillo que en el cas de la β -catenina. Aquest és un resultat curiós, ja que ambdues proteïnes tenen el domini armadillo molt similar.

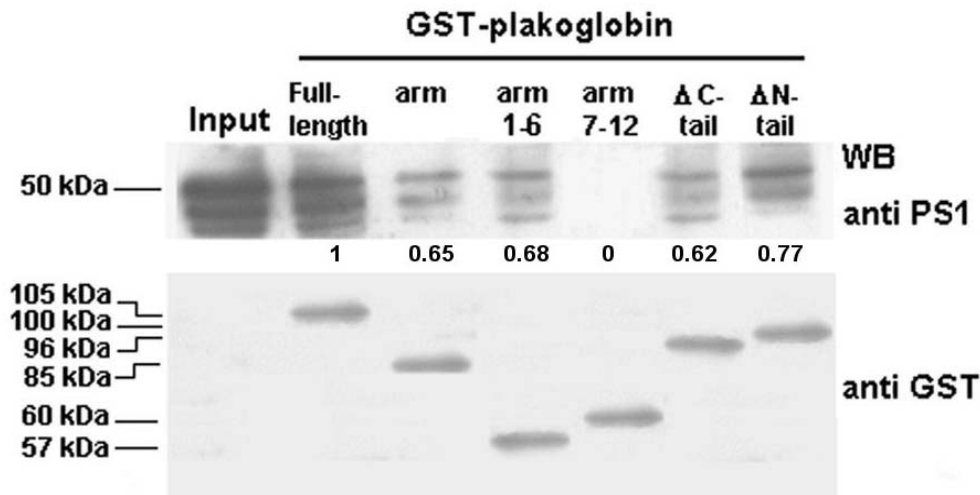


Figura 46. La PS1np interacciona amb les repeticions (1-6) del domini armadillo de la placoglobina. Es van transfectar transitòriament cèl·lules RWP1 amb 15 μ g de pcDN3.1Myc/His-PS1 (PS1np). 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 11 pmols de GST- placoglobina o amb els diferents mutants delecionats també expressats amb GST. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La PS1np associada a la proteïna recombinant es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). En el panell inferior es pot comprovar que els nivells de les proteïnes recombinants eren similars. Els valors indicats a sota cada figura, representen la quantitat relativa de PS1np unida a la proteïna recombinant. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total.

3.6. La fosforilació de la Tyr643 de la placoglobina augmenta l'afinitat per la PS1np

El grup ha descrit que la placoglobina és fosforilada en residus tirosina específics i que en ser modificats, regulen la interacció de la placoglobina amb els altres components de les unions adherents i dels desmosomes [238].

Es van utilitzar els mutants puntuals de la placoglobina que mimetitzen les formes fosforilades de la Tyr133 (posició equivalent a la tirosina 142 de la β -catenina), de la Tyr549 (una fenilalanina en la β -catenina) i de la Tyr643 (equivalent a la tirosina 654 de la β -catenina), per estudiar si la fosforilació en alguna d'aquestes tirosines podia regular la interacció entre la PS1np i la placoglobina. Assaigs de pull-down van mostrar que la interacció entre la PS1np i els mutants puntuals Tyr133 a Glu (Y133E) i el Tyr549 a Glu (Y549E) no es veia afectada (**Figura 47**). En canvi, el mutant Tyr643 a Glu (Y643E) augmentava l'afinitat per la PS1np, al contrari de l'efecte produït per la fosforilació de la tirosina equivalent (Tyr654) en la β -catenina (**Figura 44**). Aquests resultats reforcen la conclusió d'una regulació diferent de la

interacció entre la placoglobina·PS1np i la β -catenina·PS1np, tot i ser dues proteïnes molt similars.

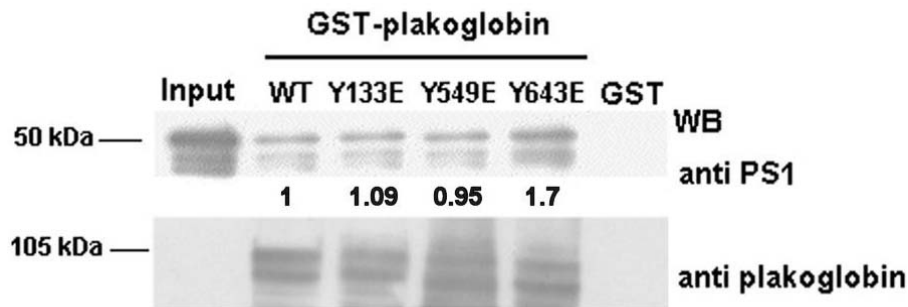


Figura 47. La fosforilació de la tirosina 643 de la placoglobina afecta l'afinitat per la PS1np. Es van transfectar transitòriament cèl·lules RWP1 amb 15 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1(PS1np). 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 11,4 pmols de GST-placoglobina (WT), els mutants puntuals (Y133E, GST-placoglobinaY133E; Y549E, GST-placoglobinaY549E; Y643E, GST-placoglobinaY643E) o GST com a control. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de PS1np associada a la proteïna recombinant (mutants puntuals) es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similar dels diferents mutants puntuals de la placoglobina. Els valors indicats a sota cada figura, representen la quantitat relativa de PS1np unida a la proteïna recombinant. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència.

Dades del grup indicaven que el receptor d'EGF (EGFR) fosforilava l'extrem carboxiterminal de la placoglobina [238], confirmant resultats de Gaudry i col·laboradors, on descriuen que tres residus tirosina del domini carboxiterminal de la placoglobina (Tyr693, 724 i 729) eren fosforilats després de l'estimulació del EGFR [256]. Per estudiar si aquestes fosforilacions podien regular la interacció entre la placoglobina i la PS1np, vam tractar les cèl·lules epitelials IEC-18 (línia cel·lular immortalitzada no tumorigènica) en presència o no, del factor de creixement epidèrmic EGF, el qual estimula el receptor d'EGF. A continuació es va immunoprecipitar la PS1 i com mostra la **Figura 48**, el tractament amb EGF augmentava la interacció entre la placoglobina i la PS1np (comparar els carrils 3 i 4). Aquests resultats suggerien que com a mínim una d'aquestes tres tirosines situades en el domini carboxiterminal de la placoglobina fosforilades pel receptor d'EGF, també estaven regulant d'una manera positiva la interacció entre la placoglobina i la PS1np.

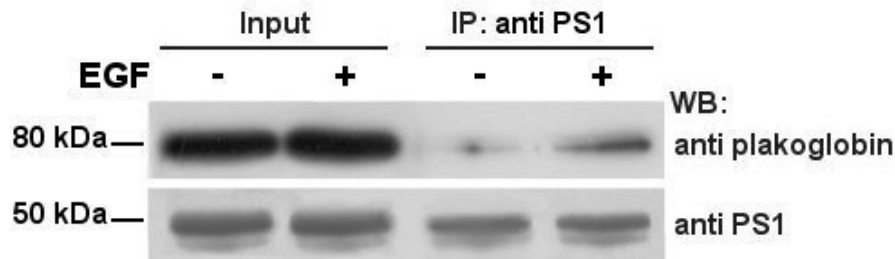


Figura 48. L'estimulació del receptor d'EGF augmenta l'afinitat entre la placoglobina i la PS1np. Cèl·lules IEC-18 es van transfectar amb 15 µg de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np). 40 hores postransfecció, es van tractar les cèl·lules en absència o presència d'EGF (50ng/mL) durant 3 hores. A continuació es van fer extractes cel·lulars totals i 350 µg es van immunoprecipitar amb l'anti-PS1(303-316). Els immunocomplexos van ser analitzats per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de placoglobina unida a la PS1np es va detectar amb l'anti-placoglobina. Per verificar que nivells similars de la PS1np s'havien purificat, es va reanalitzar la membrana amb l'anti-PS1(303-316). **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència.

Resumint, les nostres dades indicaven que la PS1np interaccionava tant amb la β -catenina com amb la placoglobina a través dels seus dominis armadillo. Tot i l'elevada homologia entre aquests dominis, la unió tenia lloc per regions diferents; amb β -catenina era més carboxiterminal per les repeticions armadillo 7-12, mentre que, la placoglobina utilitzava les sis primeres repeticions armadillo. Per tant, l'especificitat de la interacció amb la PS1np ve donada per les diferències existents en els extrems terminals de la β -catenina i de la placoglobina.

Totes dues interaccions, β -catenina·PS1np i placoglobina·PS1np, es regulen per fosforilació en tirosines específiques. Així, mentre que la fosforilació de la Tyr654 de la β -catenina inhibia la interacció amb la PS1np, la fosforilació de la tirosina equivalent en la placoglobina (Tyr643), la facilitava. A més, la fosforilació de tirosines situades en el domini carboxiterminal de la placoglobina també regula positivament la interacció entre aquesta catenina i la PS1np.

4. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1np NO ÉS DEGUT A LA INTERACCIÓ DIRECTA AMB LA β -CATENINA

Després d'haver estudiat com es regulava la interacció entre la β -catenina i la PS1np, vam plantejar-nos la possibilitat de que la interacció directa d'aquestes dues proteïnes a les unions adherents, fos la causant de l'efecte inhibidor de l'activitat

transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina. És a dir, que la interacció de la PS1np i la β -catenina a la membrana plasmàtica, estabilitzès aquesta última a les unions adherents, impeding el seu pas al nucli on desenvoluparia la seva funció com a coactivador transcripcional.

Per comprovar aquesta hipòtesi es van transfectar les cèl·lules epitelials RWP1 amb la β -catenina perquè així, la repressió per la PS1np de l'activitat transcripcional dependent de la β -catenina es trobava incrementada. Això era degut a que aquest tipus cel·lular era el menys sensible a l'efecte inhibidor de la PS1np (veure **Figura 35**). Es va transfectar transitòriament la β -catenina *wild type* i els mutants puntuals de la β -catenina (Tyr142 a Glu, Tyr654 a Glu i el doble mutant Tyr142 i 654 a Glu) insertats en el pcDNA3.1/His, en presència o no del plàsmid que expressava la PS1np. Es va determinar l'activitat del complex Tcf-4- β -catenina utilitzant l'assaig d'activitat transcripcional amb el promotor sintètic TOP sensible a Tcf-4- β -catenina.

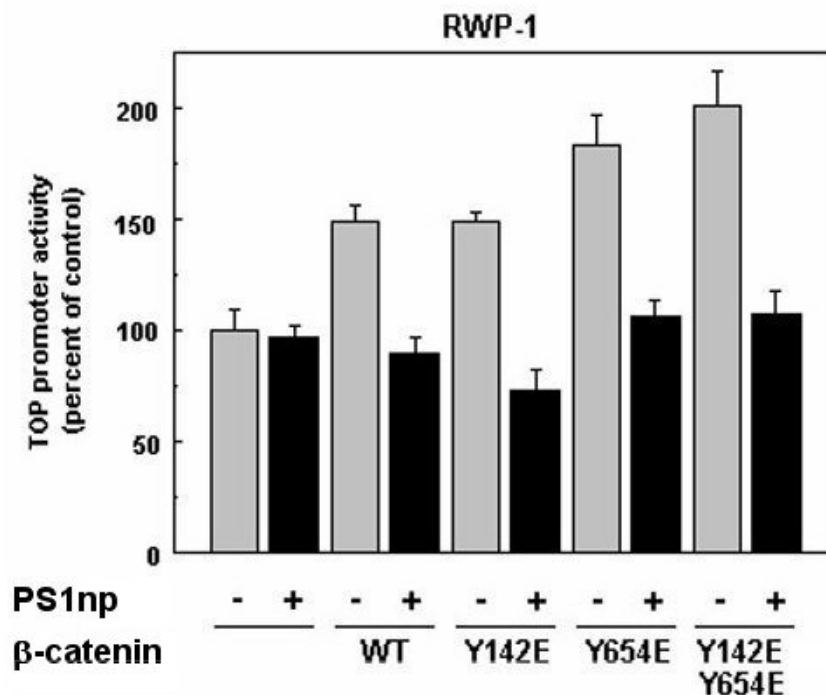


Figura 49. L'efecte inhibidor de la PS1np no és degut a la interacció amb la β -catenina. Cèl·lules RWP1 es van cotransfectar amb la β -catenina *wild type*, i/o diferents mutants puntuals de la β -catenina insertats en pcDNA3.1/His (150 ng), el plàsmid TOP-FLASH (50ng), el plàsmid pTK-Renilla (50ng) en absència o presència de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) (150ng). Després de 48 h, es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb pcDNA3.1/His i pcDNA3.1Myc/His sols. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. WT: His- β -catenina wild-type; Y142E: His- β -cateninaY142E; Y654E: His- β -cateninaY654E; Y142E/Y654E: His- β -cateninaY142E/Y654E. -,absència; +,presència.

Com mostra la **Figura 49**, la β -catenina *wild type* va estimular l'activitat transcripcional 1,5 vegades respecte el control. Això s'explica perquè hi ha més β -catenina lliure i capaç d'anar al nucli. En presència de la PS1np aquesta activitat disminuïa, ja que la PS1np està actuant com a regulador negatiu de l'activitat transcripcional dependent de β -catenina. El mutant puntual Tyr142 a Glu es comportava igual que la β -catenina *wild type*, tant en absència com en presència de la PS1np. Aquests resultats eren esperables, ja que aquest mutant es comportava igual que la β -catenina *wild type*, pel que fa a la interacció amb la PS1np. El mutant puntual Tyr654 a Glu de la β -catenina augmentava l'activitat del promotor TOP aproximadament 1,8 vegades respecte el control. El resultat també era lògic, ja que aquest mutant no interaccionava ni amb l'E-cadherina ni amb la PS1np, i com a conseqüència hi havia una pèrdua de β -catenina a les unions adherents i un augment de la β -catenina citosòlica capaç d'anar al nucli. Però, en presència de PS1np també vam observar una disminució de l'activitat transcripcional. Aquesta inhibició era similar a l'observada amb la β -catenina *wild type*. No esperàvem trobar una disminució de l'activitat transcripcional, ja que aquest mutant (Y654E) interaccionava amb molt poca afinitat amb la PS1np i per tant, la PS1 no hauria d'afectar els nivells de β -catenina nuclear. El doble mutant Tyr142 i 654 a Glu de la β -catenina també augmentava l'activitat del promotor TOP. El resultat era esperable, ja que no interaccionava ni amb l'E-cadherina ni amb l' α -catenina, i com a conseqüència augmentava la β -catenina citosòlica capaç d'anar al nucli. La presència addicional de PS1np també inhibia l'activitat transcripcional.

Vam concloure que l'efecte inhibidor de la PS1np sobre l'activitat transcripcional de la β -catenina, no era degut a la interacció directa de la forma no processada de la PS1 amb la β -catenina en les unions adherents.

5. L'EFECTE INHIBIDOR DE LA PS1np ÉS DEGUT A UNA DISMINUCIÓ DE LA UNIÓ DEL TCF-4 AL DNA

5.1. La PS1np i el Tcf-4 formen part del mateix complex

S'havia descrit per altres membres del grup, que la β -catenina i la placoglobina s'unien al Tcf-4 en dominis diferents [257]. La conseqüència d'aquestes

interaccions tenia efectes oposats: mentre la unió Tcf-4· β -catenina augmentava el reclutament dels cofactors transcripcionals necessaris per l'activació de gens diana, la unió Tcf-4·placoglobina inhibia la unió del Tcf-4 al DNA. Per tant, la placoglobina al nucli reprimia l'expressió dels gens diana activats pel complex Tcf-4· β -catenina.

Donat que la PS1np s'unia tant a la β -catenina com a la placoglobina i que totes dues interaccionaven amb el Tcf-4, vam voler comprovar si la PS1np interferia en la interacció de la β -catenina o la placoglobina amb el Tcf-4; o si al contrari, la PS1np i el Tcf-4 podien formar part del mateix complex.

Com mostra la **Figura 50**, la PS1np i el Tcf-4 coimmunoprecipitaven tant en les cèl·lules RWP1 com en les SW480 (veure carrils 4 i 9 del panell superior). Amb aquests resultats podíem afirmar que aquestes dues proteïnes formaven part del mateix complex. Vam observar que en presència de PS1np augmentava la quantitat de placoglobina present en l'immunocomplex (**Figura 50**, carrils 3-4 i 8-9 panell 3). Aquest augment era major en les cèl·lules SW480 que en les RWP1. La β -catenina també era immunoprecipitada amb el Tcf-4. La PS1np també augmentava la interacció entre el Tcf-4 i la β -catenina (veure carrils 3-4 i 8-9 panell inferior), però menys que el que observàvem per la placoglobina i només en les cèl·lules SW480.

Aquests resultats indicaven que la PS1np facilitava la interacció entre la placoglobina i el Tcf-4 amb més afinitat que entre la β -catenina i el Tcf-4.

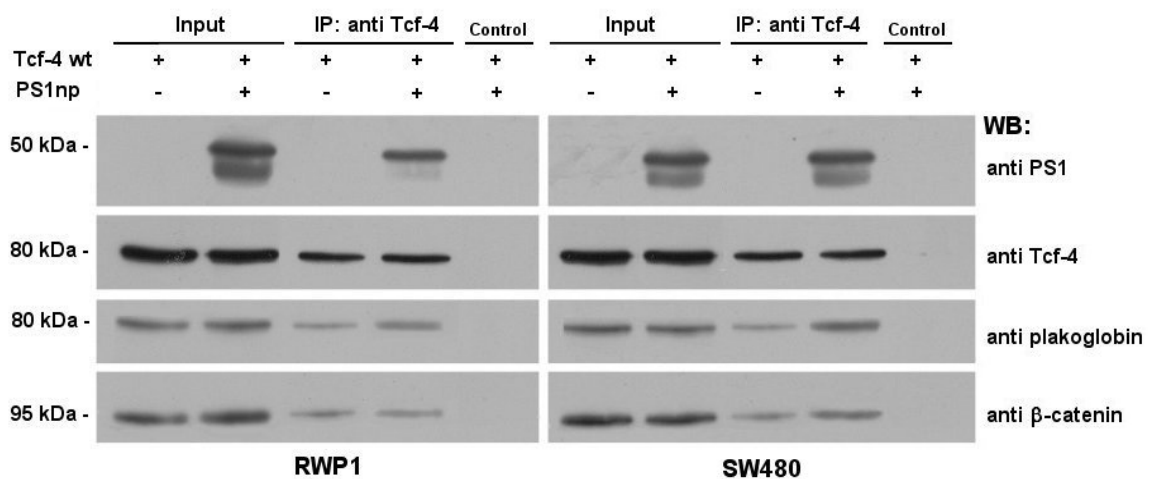


Figura 50. La PS1np i el Tcf-4 formen part del mateix complex i la PS1np facilita la interacció Tcf-4-placoglobina. Es van cotransfectar cèl·lules RWP1 i SW480 amb 7.5 μ g de pcDNA3.1/His-Tcf-4 en presència o no de 8.5 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np). A les 48 h es van preparar els extractes cel·lulars. 500 μ g d'extractes totals es van immunoprecipitar amb l'anticòs anti-Tcf-4. La PS1np, la placoglobina i la β -catenina associades es van analitzar per Western blot amb els anticòsos específics corresponents. Per verificar que nivells similars de Tcf-4 s'havien purificat, es va reanalitzar la membrana amb l'anti-Tcf-4. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència; control: extractes cel·lulars amb proteïna A-agarosa.

5.2. La placoglobina és la mediadora de la unió entre la PS1np i el Tcf-4

Ja que la PS1np augmentava la interacció entre la placoglobina i el Tcf-4, i que junt amb la β -catenina, formaven part del mateix complex, vam voler estudiar amb més detall, com es regulava aquesta interacció.

Es van transfectar transitòriament les cèl·lules RWP1 amb el plàsmid que expressava la PS1np i assaigs de pull-down ens van permetre analitzar la interacció de la PS1np amb diferents fragments del Tcf-4 fusionats amb GST. Com s'observa a la **Figura 51**, la PS1np interaccionava amb el Tcf-4 a través de la mateixa regió (aa 1-53) per on s'uneix la β -catenina. La PS1np també interaccionava amb el fragment que conté el domini d'unió a la placoglobina, Tcf-4 (aa 51-110) (veure carrils 2 i 5 del panell superior). Aquestes dades indicaven que la PS1np s'unia al Tcf-4 a través de la mateixa regió utilitzada per la interacció amb la β -catenina o la placoglobina.

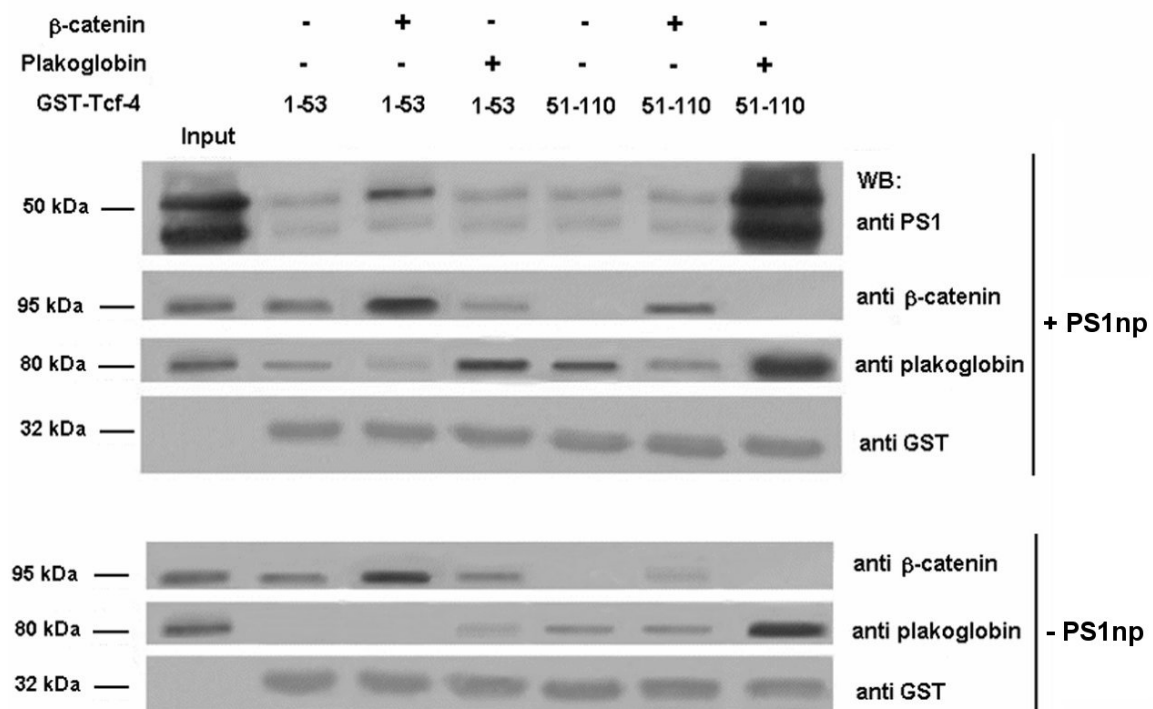


Figura 51. La β -catenina i la placoglobina són mediadores de la unió entre la PS1np i el Tcf-4. Cèl·lules RWP1 van ser transfectades transitòriament amb 15 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1(PS1np). 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 30 pmols de GST-Tcf-4(aa 1-53) o GST-Tcf-4(aa 51-110), els quals van ser preincubats o no amb 60 pmols de β -catenina o placoglobina. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de PS1np associada a la proteïna recombinant es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316). Es va reanalitzar la membrana amb anti- β -catenina i anti-placoglobina per analitzar la quantitat d'ambdues proteïnes presents en els complexos. També amb l'anti-GST per comprovar

nivells similars dels diferents mutants delecionats del Tcf-4. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència.

La preincubació dels fragments GST-Tcf-4 (aa 1-53) i GST-Tcf-4 (aa 51-110) amb β -catenina o placoglobina, respectivament, augmentava la quantitat de PS1np unida al Tcf-4 (**Figura 51**, comparar els carrils 2-3 i 5-7 del panell superior), suggerint que, tant la β -catenina com la placoglobina feien de mediadors de la interacció entre la PS1np i el Tcf-4. De tota manera l'efecte era molt més evident en el cas de la placoglobina (comparar carrils 3 i 7), indicant que la interacció entre la PS1np i el Tcf-4 era mediada principalment per la placoglobina. A més, la placoglobina també interaccionava millor amb el Tcf-4 quan hi havia la PS1np (**Figura 51**, comparar el carril 5 dels panells 3 i 6), reforçant així, la conclusió de l'experiment de la figura anterior (**Figura 50**).

5.3. La PS1np anul·la l'especificitat d'unió de la placoglobina al Tcf-4

Vam continuar estudiant l'efecte de la PS1np en l'associació de la β -catenina i la placoglobina al Tcf-4 *wild type* i a un mutant de Tcf-4 on la serina 60 s'havia substituït per un glutàmic. Aquest mutant puntual mimetitza la fosforilació produïda per la proteïna quinasa CKII. Com a conseqüència d'aquesta fosforilació s'inhibeix la unió entre la placoglobina i el Tcf-4, mentre que no es veu alterada la interacció entre la β -catenina i el Tcf-4 [257].

Es van transfectar transitòriament les cèl·lules SW480 amb el plàsmid que expressava el Tcf-4(aa 1-80) *wild type* o el mutant Tcf-4(aa 1-80)S60E, en presència o no, del plàsmid que expressava la PS1np. Aquest fragment del Tcf-4 conté tant el domini d'unió a la β -catenina (aa 1-51) com el de la placoglobina (aa 51-80). A continuació, es va immunoprecipitar el Tcf-4 i es van analitzar les proteïnes unides a l'immunocomplex. La transfecció de la PS1np augmentava la quantitat de β -catenina unida al Tcf-4 *wild type* (**Figura 52**, comparar els carrils 5-6 del panell 2; i com ja havíem vist en la **Figura 50**) i de manera més modesta al mutant Tcf-4S60E (carrils 7 i 8) (recordar que aquest mutant no regula la interacció entre la β -catenina i el Tcf-4). La PS1np estimulava molt més la unió de la placoglobina al Tcf-4 *wild type* (**Figura 52**, comparar els carrils 5-6 del panell superior), com ja havíem observat anteriorment. Com s'esperava, no es va detectar interacció entre la placoglobina i el

mutant Tcf-4S60E (veure el carril 7), ja que la fosforilació en aquesta posició inhibeix la unió entre la placoglobina i el Tcf-4. El resultat més sorprenent va ser, observar que la PS1np afavoria la interacció entre el mutant Tcf-4S60E i la placoglobina (veure el carril 8), indicant que la PS1np modificava la interacció entre la placoglobina i el Tcf-4 i la feia insensible a la fosforilació en el residu serina 60.

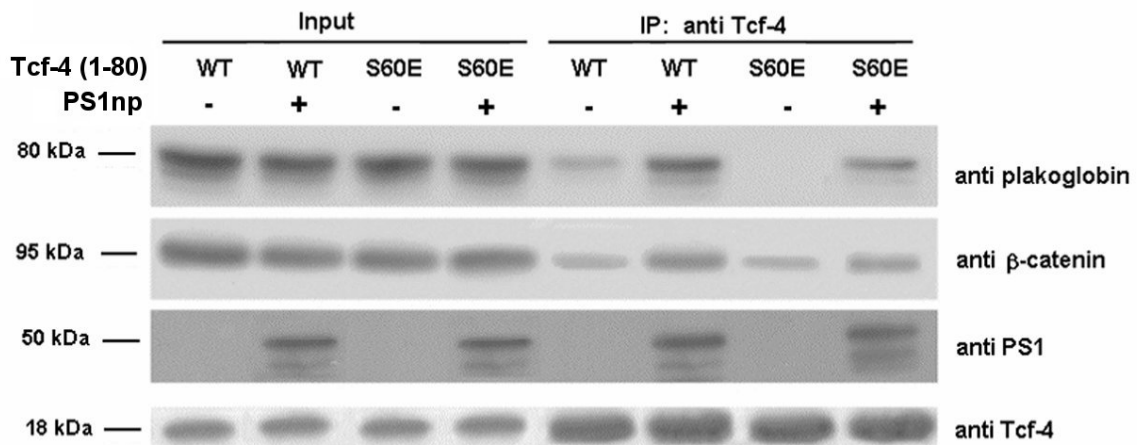


Figura 52. La PS1np anul·la l'especificitat d'unió entre la placoglobina i el Tcf-4. Les cèl·lules SW480 es van cotransfectar amb 7.5 µg del Tcf-4(1-80) wt o el S60E insertats en el pcDNA3.1/His en presència o absència de 8.5 µg de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) o el vector buit. A les 48 hores es van preparar els extractes cel·lulars. 350 µg d'extractes cel·lulars totals van ser immunoprecipitats amb l'anti-Tcf-4. Els immunocomplexos van ser analitzats per Western blot amb els anticossos específics corresponents. Per verificar que nivells similars de Tcf-4 s'havien purificat, es va reanalitzar la membrana amb l'anti-Tcf-4. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència.

Com ja s'ha mencionat, treballs del grup, mostraven que els extrems terminals de la β -catenina i la placoglobina regulaven la interacció de diferents cofactors als dominis armadillo d'ambdues proteïnes [168-170]. Aquests extrems terminals eren els responsables de la diferent especificitat d'unió a Tcf-4: al domini Tcf-4 (aa 1-51) (en el cas de la β -catenina) o al domini Tcf-4 (aa 51-80) (per la placoglobina). Construccions de la β -catenina i placoglobina desprovistes d'aquests extrems terminals perdien completament l'especificitat: el domini armadillo de la placoglobina i de la β -catenina podien interaccionar indistintament amb les dues seqüències d'unió del Tcf-4 (Figura 3 de [170]). Basant-nos en aquest coneixement previ sobre la regulació de la β -catenina i placoglobina pels seus extrems terminals, vam plantejar la possibilitat que la PS1np (interacciona per les 6 primeres repeticions armadillo de la placoglobina) pogués produir un canvi conformacional dels extrems terminals de la placoglobina, deixant el domini armadillo més accessible als seus cofactors. És a dir, postulàvem que en presència de la PS1np com que el domini armadillo de la placoglobina

quedaria més lliure dels extrems terminals, perdria especificitat i podria unir-se tant al seu propi domini d'unió de Tcf-4 (aa 51-80) com també al domini d'unió propi de la β -catenina (Tcf-4 aa 1-51). Aquest fet explicaria perquè en presència de la PS1np, la placoglobina podia interaccionar amb el mutant S60E, ja que s'uniria al Tcf-4 pel domini d'unió propi de la β -catenina, a través dels aminoàcids de l'1-51.

En els assaigs de pull-down de la **Figura 53**, es pot comprovar que el domini armadillo de la placoglobina s'unia al Tcf-4 amb major afinitat que la proteïna sencera (comparar els carrils 3 i 5 del panell superior), suggerint que els extrems terminals estaven interferint en la interacció de la placoglobina al Tcf-4. La PS1np augmentava la quantitat de Tcf-4 unida a la placoglobina (**Figura 53**, comparar els carrils 3 i 4), en canvi, no afectava la interacció de Tcf-4 al domini armadillo de la placoglobina (carrils 5 i 6).

Aquests resultats suggerien que l'efecte de la PS1np consistia en eliminar les restriccions imposades pels extrems terminals de la placoglobina.

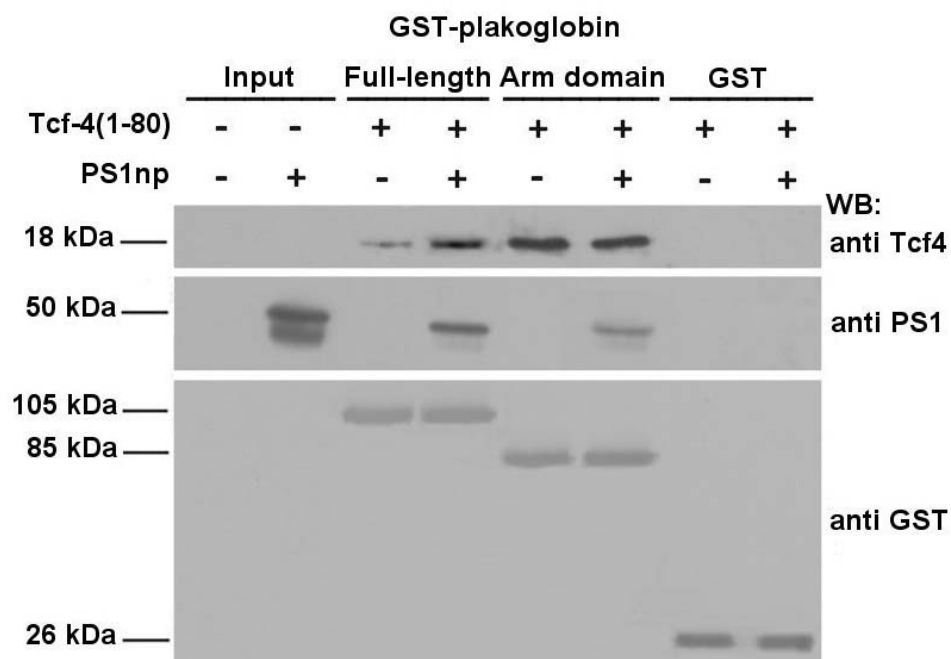


Figura 53. La PS1np elimina les restriccions imposades pels extrems terminals en la interacció placoglobina-Tcf-4. 11 pmols de GST-placoglobina o GST-armadillo de la placoglobina es van preincubar amb 23 pmols de Tcf-4(1-80). A continuació es va realitzar un assaig de pull-down amb 500 μ g d'extractes cel·lulars transfectades transitòriament amb 15 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) o amb el vector buit. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de Tcf-4 associat a la proteïna recombinant es va detectar amb l'anticòs específic anti-Tcf-4. Es va reanalitzar la membrana amb anti-PS1(303-316) com a control de la transfecció i amb anti-GST per comprovar nivells similar de les proteïnes recombinants. **Input:** 5% de l'extracte cel·lular total. -, absència; +, presència.

5.4. La PS1np impedeix la unió del Tcf-4 al DNA

Com s'ha mencionat a l'apartat 5.1, la unió de la placoglobina al Tcf-4 impedia la unió de Tcf-4 al DNA. Vam examinar aleshores si la unió de la PS1np al Tcf-4 també anava acompanyada d'una disminució de la unió del Tcf-4 al DNA.

Es van incubar extractes cel·lulars totals de cèl·lules SW480 (cotransfectades amb Tcf-4, en presència o no de la PS1np), amb un oligonucleòtid que contenia la seqüència d'unió a Tcf-4 del promotor de c-myc, un dels gens diana del complex Tcf-4- β -catenina, i també amb un oligonucleòtid que contenia la seqüència d'unió al Tcf-4 del promotor del plàsmid TOP-FLASH (utilitzat en assaigs d'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina). Aquests oligonucleòtids estaven marcats amb biotina per facilitar la seva purificació per estreptavidina-agarosa.

En absència de la PS1np en els extractes, el Tcf-4 s'unia tant a l'oligonucleòtid que tenia la seqüència del promotor c-myc com al que tenia la seqüència del promotor TOP (**Figura 54**, carrils 3 i 5 del panell superior). En canvi, la PS1np disminuïa la unió de Tcf-4 al DNA (comparar els carrils 3-4 i 5-6). A més, com ja esperàvem, detectàvem β -catenina en els complexos on el Tcf-4 interaccionava amb el DNA, en canvi, no hi havia presència de placoglobina (veure els carrils 3, 4 i 5 dels panells 2 i 3).

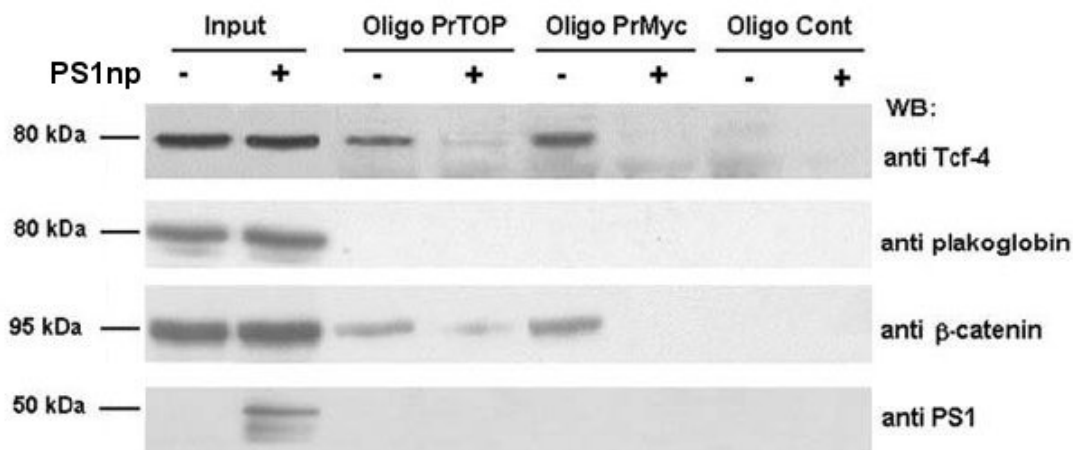


Figura 54. La PS1np inhibeix la unió del Tcf-4 al DNA. Cèl·lules SW480 van ser cotransfectades amb 7 μ g de pcDNA3.1/His-Tcf-4 en presència o no de 9 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np). A les 48 h es van preparar extractes cel·lulars totals. 200 ng de l'oligo biotinilat que contenia la seqüència d'unió al Tcf-4 del promotor de c-myc (ProMyc) o la seqüència sintètica del promotor TOP (ProTOP) es van incubar amb 300 μ g d'extracte cel·lular de les SW480 transfectades. L'oligo biotinilat es va purificar per cromatografia amb estreptavidina-agarosa. El Tcf-4 associat es va analitzar per Western blot amb l'anticòs anti-Tcf-4. La membrana va ser reanalitzada amb els anticossos específics per la β -catenina, la placoglobina i la PS1np. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. Cont: control amb oligo no específic; -, absència; +, presència.

Vam concloure que la PS1np facilitava la interacció entre la placoglobina i el Tcf-4 i com a conseqüència s'inhibia la interacció del Tcf-4 al DNA. Degut a aquesta inhibició, també disminuïa la transcripció dels gens diana del complex Tcf-4· β -catenina.

5.5. La interacció de la PS1np amb la placoglobina estabilitza al Tcf-4 fora del nucli

El mecanisme pel qual la PS1np inhibia la unió del Tcf-4 al DNA podia ser degut a un efecte inhibitor intrínsec de la PS1 o de la placoglobina en el complex que l'exclouria de la seva interacció al DNA o una distribució subcel·lular alterada del Tcf-4.

Per tant, es va analitzar la localització cel·lular del Tcf-4 i de la PS1np per immunofluorescència. Es van cotransfectar les cèl·lules SW480 amb els plàsmids que expressaven el Tcf-4 i la PS1np, en presència o no de la placoglobina. Com mostra la **Figura 55**, la PS1np es localitzava al citosol amb una clara distribució perinuclear i excluída totalment del nucli (panell esquerre inferior). En canvi, el Tcf-4 es detectava en els dos compartiments cel·lulars: citosol i nucli (panell esquerre superior). La localització del Tcf-4 era específica, ja que no es trobava alterada per l'expressió ectòpica de la PS1np, excepte quan es transfectava simultàniament amb la placoglobina. En aquestes cèl·lules, s'observava una disminució del Tcf-4 nuclear (comparar els panells superiors).

Aquests resultats suggerien que la PS1np interaccionava amb el Tcf-4 en un compartiment extranuclear, però només en presència de la placoglobina, i aquesta interacció placoglobina·PS1np retenia el Tcf-4 fora del nucli, impeding així la seva unió als promotors diana.

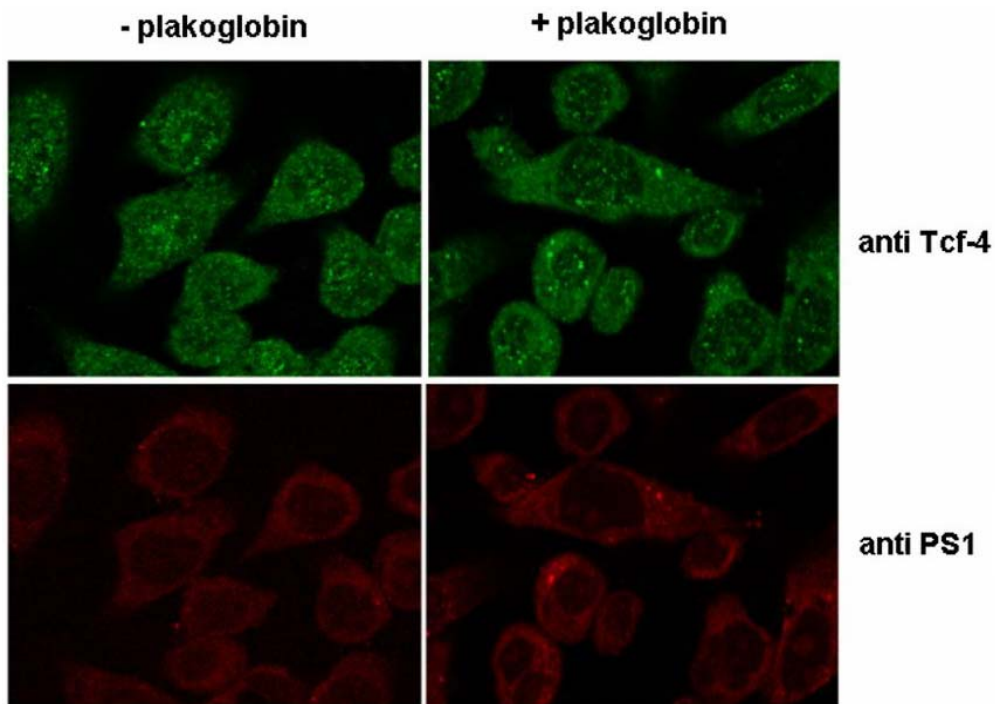


Figura 55. La PS1np estabiliza el Tcf-4 fora del nucli. Cèl·lules SW480 van ser transfectades amb 200 ng de pcDNA3.1/His-Tcf-4, de pcDNA3.1Myc-His-PS1 (PS1np) i amb pcDNA3.1/His-placoglobina quan s'indica. La localització del Tcf-4 va ser detectada amb l'anticòs anti-Tcf-4 clon 6H5-3 de ratolí (secundari conjugat amb fluoresceïna; verd), i de la PS1np amb l'anti-PS1(303-316) de conill (secundari conjugat amb Alexa 488; vermell) Els controls sense l'anticòs primari no van donar senyal. -, absència; +, presència.

5.6. La sobreexpressió de Tcf-4 anul·la l'efecte inhibidor de la PS1np en l'activitat transcripcional dependent de la β -catenina

Els resultats anteriors indicaven que la PS1np, a través de la seva associació amb la placoglobina, impedia que el Tcf-4 s'unís al DNA. Per tant, el factor limitant de l'activitat transcripcional dependent de la β -catenina, en cèl·lules transfectades amb la PS1np, era el Tcf-4.

Aquesta conclusió va ser confirmada duent a terme assaigs d'activitat del promotor TOP en les cèl·lules SW480 cotransfectades amb diferents quantitats dels plàsmids que expressaven la PS1np i el Tcf-4. Com es mostra a la **Figura 56A**, en presència de Tcf-4 exogen, el promotor TOP no estava afectat per l'expressió de la PS1np, ja que hi havia un excés de Tcf-4. En canvi, si que s'observava una inhibició de l'activitat transcripcional per PS1np quan només hi havia Tcf-4 endogen (**Figura 56A**).

A més, la cotransfecció amb la placoglobina permetia que les cèl·lules recuperessin la sensibilitat a l'efecte inhibidor de la PS1np (**Figura 56B**, veure les

tres últimes condicions). La repressió per la PS1np era més accentuada que en les cèl·lules control, segurament degut a l'estimulació de l'activitat TOP que s'observava en expressar placoglobina. En aquest cas, la PS1np podia unir-se a la placoglobina exògena i augmentar l'afinitat pel Tcf-4 fora del nucli, contrarestant així l'excés de Tcf-4 exogen.

El conjunt de resultats obtinguts per la PS1 no processada permeten explicar que el seu efecte inhibidor de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4· β -catenina, es produeix per una disminució de la unió del Tcf-4 al DNA, deguda a un augment de la interacció Tcf-4-placoglobina facilitada per la PS1np, en un compartiment extranuclear; retenint el Tcf-4 fora del nucli.

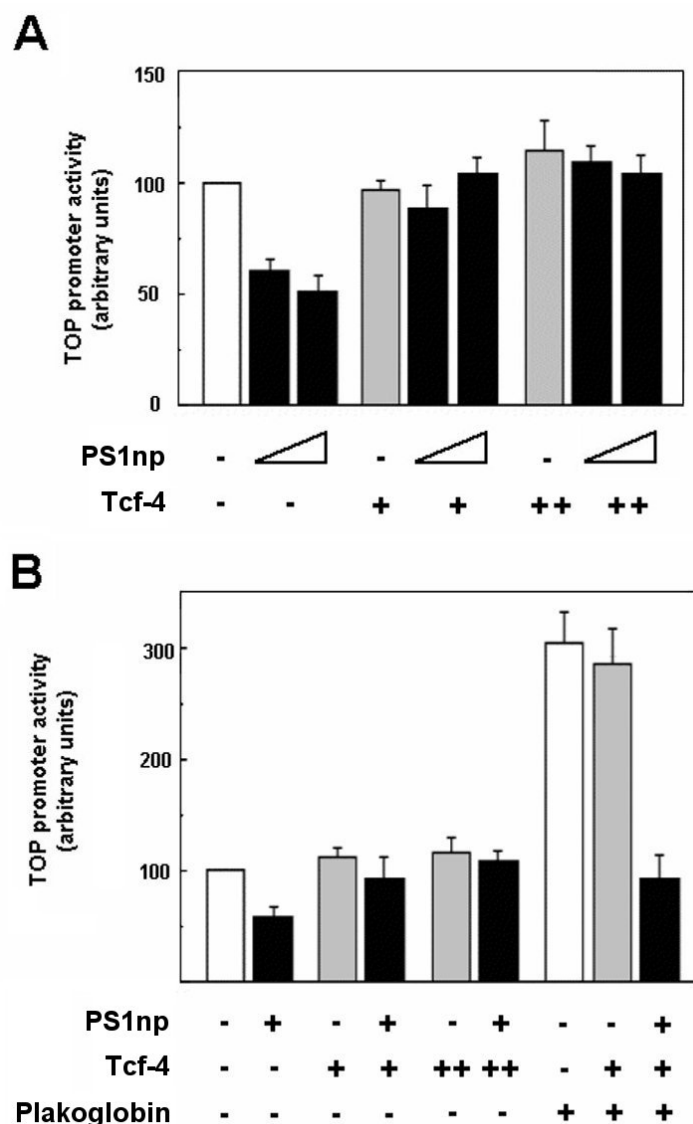


Figura 56. La sobreexpressió de Tcf-4 anul·la l'efecte repressor de la PS1np en l'activitat Tcf-4· β -catenina. (A) Les cèl·lules SW480 es van transfectar amb pcDNA3.1/His-Tcf-4 (+, 150 ng; ++, 300 ng) (columnes grises), amb pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) (150-300 ng) (columnes negres) o amb els vectors buits (columnes blanques) i amb els plàsmids

TOP-FLASH (50ng) i pTK-Renilla (50ng). En el panell **B**, es va transfectar les mateixes quantitats que en A i es va afegir pcDNA3.1/His-placoglobina (+, 150 ng) a les condicions que ho indica. Després de 48 h, es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb els vectors buits. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. -, absència; +, presència.

6. LA PS1np TÉ MÉS AFINITAT PER LA β -CATENINA I PLACOGLOBINA QUE LA PS1p

Per confirmar que aquest mecanisme de repressió en l'activitat transcripcional de Tcf-4- β -catenina només depenia de la PS1 que no era capaç de processar-se correctament, es va analitzar si la PS1 que si era processada podia modificar la interacció entre la placoglobina i el Tcf-4. Es va utilitzar com a font de PS1 processada les cèl·lules MEFs PS(+/-) que expressaven aquesta forma de PS1 de manera endògena. Com mostra la **Figura 57A**, el fragment carboxiterminal de la PS1 (PS1p) (20 kDa) interaccionava amb menys afinitat amb la β -catenina (aproximadament 5 vegades menys, veure la **Figura 57B**) i amb la placoglobina (unes tres vegades menys) que la PS1np (comparar els carrils 2-9 i 3-10). La interacció d'aquest fragment carboxiterminal de la PS1p amb el Tcf-4 era indetectable (**Figura 57A**, carril 4). Resultats similars es van obtenir en barrejar extractes cel·lulars que tenien la forma processada de la PS1 (MEFs PS(+/-)) amb extractes transfectats amb el plàsmid que expressava la PS1np. Tot i que la banda majoritària corresponia al fragment C-terminal de la PS1p, era la banda corresponent a la PS1np (50 kDa) la que tenia més afinitat tant per la GST- β -catenina com per la GST-placoglobina (veure la **Figura 57A**, tres últimes condicions). En aquestes condicions la PS1np s'associava entre 4 i 5 vegades millor que la PS1p, a la β -catenina i a la placoglobina, respectivament.

Aquests resultats suggerien que la interacció amb Tcf-4 estava restringida a la PS1 que no es processava perquè l'afinitat per la placoglobina i la β -catenina era major.

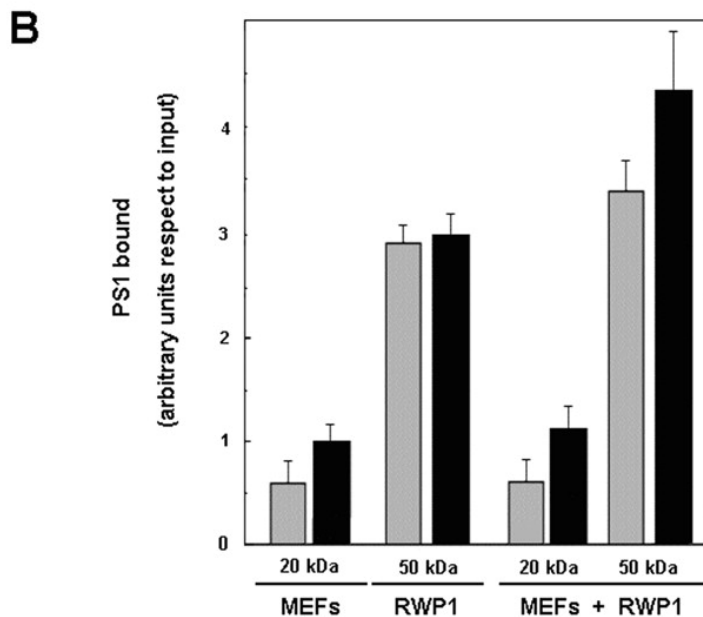
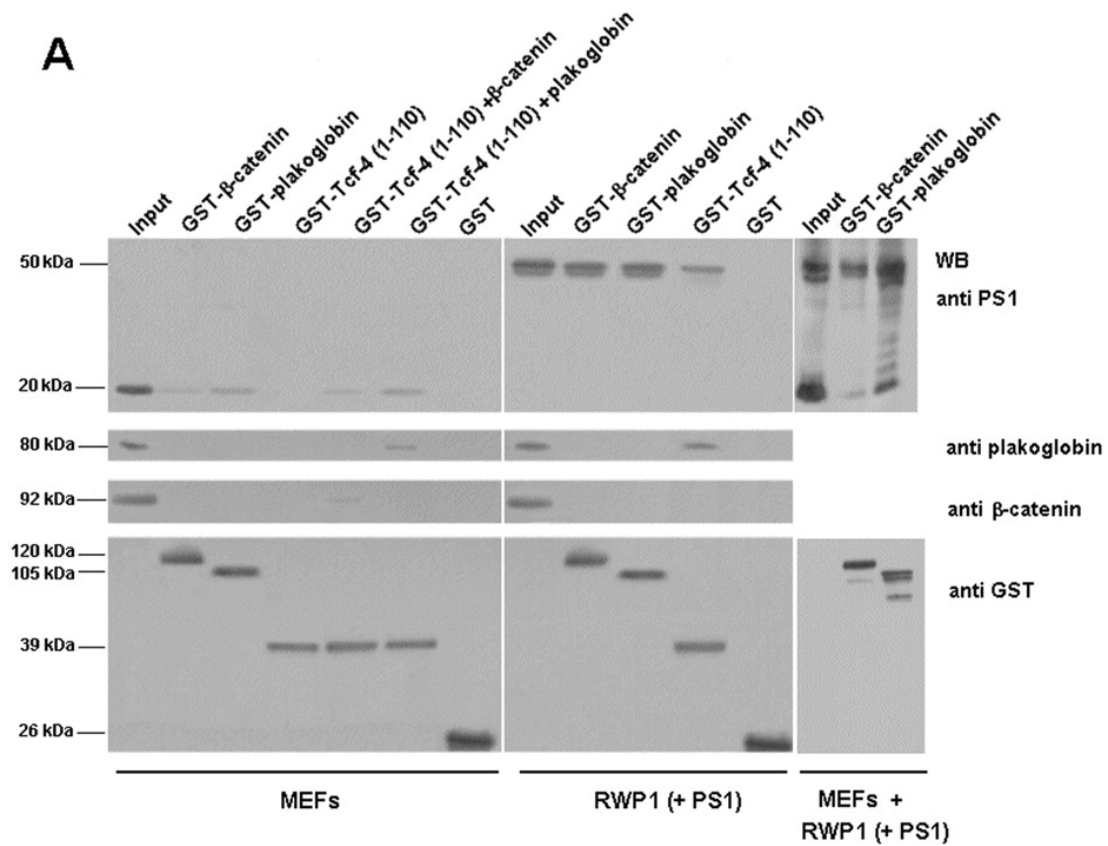


Figura 57. La PS1p té menys afinitat per la placoglobina, la β -catenina i el Tcf-4 que la PS1np. (A) Es van fer assaigs de pull-down incubant 10 pmols de GST, GST- β -catenin, GST-placoglobina o 30 pmols de GST-Tcf-4 (aa 1-110) amb 1,5 mg d'extractes totals de les MEFs PS(+/+), 300 μ g d'extractes RWP1 transfectats amb 15 μ g de pcDNA3.1Myc/His-PS1 (PS1np) o una barreja formada per 200 μ g d'extractes de RWP1-PS1np i 1mg d'extractes de MEFs PS(+/+). Quan s'indica, el Tcf-4 va ser preincubant amb 60 pmols de β -catenina o de placoglobina. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot amb l'anticòs específic anti-PS1(303-316), anti-placoglobina, anti- β -catenina. Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar

nivells similars de la proteïna recombinant. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total de les MEFs, un 3% de RWP1 i un 4% d'extracte barrejat. **(B)** Valors obtinguts de la quantitat de PS1p o PS1np unida a la β -catenina (barres grises) o a la placoglobina (barres negres), respecte els corresponents inputs.

7. MUTANTS DE LA PS1 DE L'ALZHEIMER FAMILIAR PRECOÇ ES COMPORTEN COM LA PS1np

A continuació vam analitzar el comportament de dos mutants de la PS1 presents en alguns malalts d'Alzheimer familiar precoç, pel que fa a l'activitat transcripcional depenent del complex Tcf-4- β -catenina. Els mutants M146L i H163R de la PS1 inhibeixen l'activitat transcripcional d'una manera similar a com ho feia la PS1np (veure la **Figura 58**). És a dir, inhibeixen l'activitat transcripcional en un 45% aproximadament, i a més, era independent de l'activitat γ -secretasa, ja que en presència de l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa no es recuperaven els nivells d'activitat.

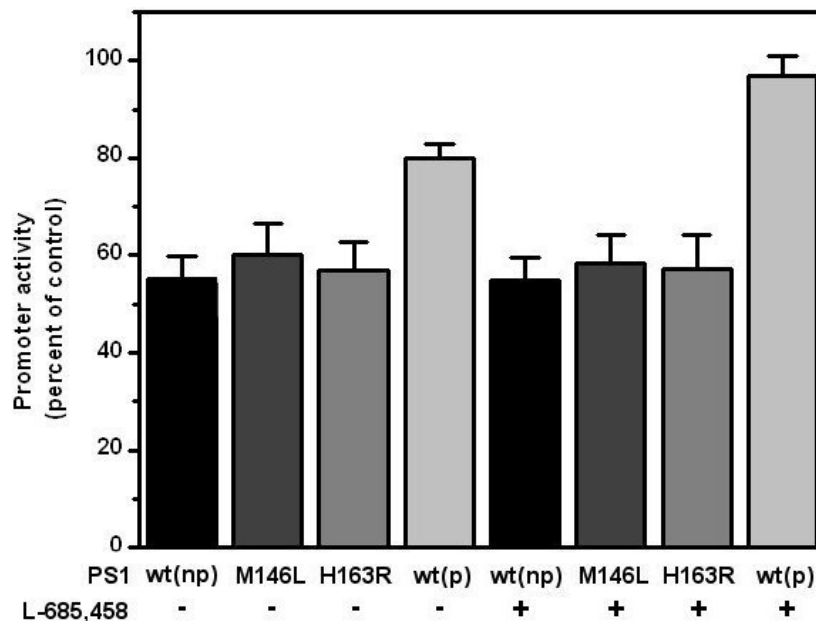


Figura 58. Els mutants M146L i H163R de la PS1 inhibeixen l'activitat transcripcional de β -catenina. Cèl·lules SW480 es van cotransfectar amb pcDNA3.1Myc/His-PS1, pcDNA3.1-PS1M146L, pcDNA3.1-PS1H163R i pcDNA3.1-PS1 (300ng), el plàsmid TOP-FLASH (50ng), el plàsmid pTK-Renilla (50ng). A les 24h, es van tractar amb L-658,458 (Inhibidor γ -secretasa) 5 μ M durant 24h. Es va determinar l'activitat luciferasa relativa de cada mostra. Els nivells d'activitat es van referir als de les cèl·lules transfectades amb el vectors sols. Els segments indiquen la desviació estàndard de quatre transfeccions independents. Wt(np): PS1 *wild type* no processada; M146L: mutant M146L de la PS1; H163R: mutant H163R de la PS1; Wt(p): PS1 *wild type* processada.-,absència; +,presència.

Nosaltres pensàvem que aquestes característiques d'inhibició eren degudes a la forma no processada de la PS1. Per tant, si aquests mutants es comportaven com la forma de PS1 que no es podia processar, esperàvem observar una manca d'endoproteolisi de la PS1 i també del processament de l'E-cadherina. Per això, vam transfectar les cèl·lules epitelials RWP1 amb els plàsmids que expressaven la PS1np, els mutants M146L i H163R i la PS1p. La **Figura 59A** (panell superior) mostra que aquests mutants puntuals de la PS1 no es processaven. A més, aquests mutants tampoc eren capaços de generar el fragment corresponent al domini citosòlic de l'E-cadherina, E-cadh/CTF2 (**Figura 59A**, panell del mig).

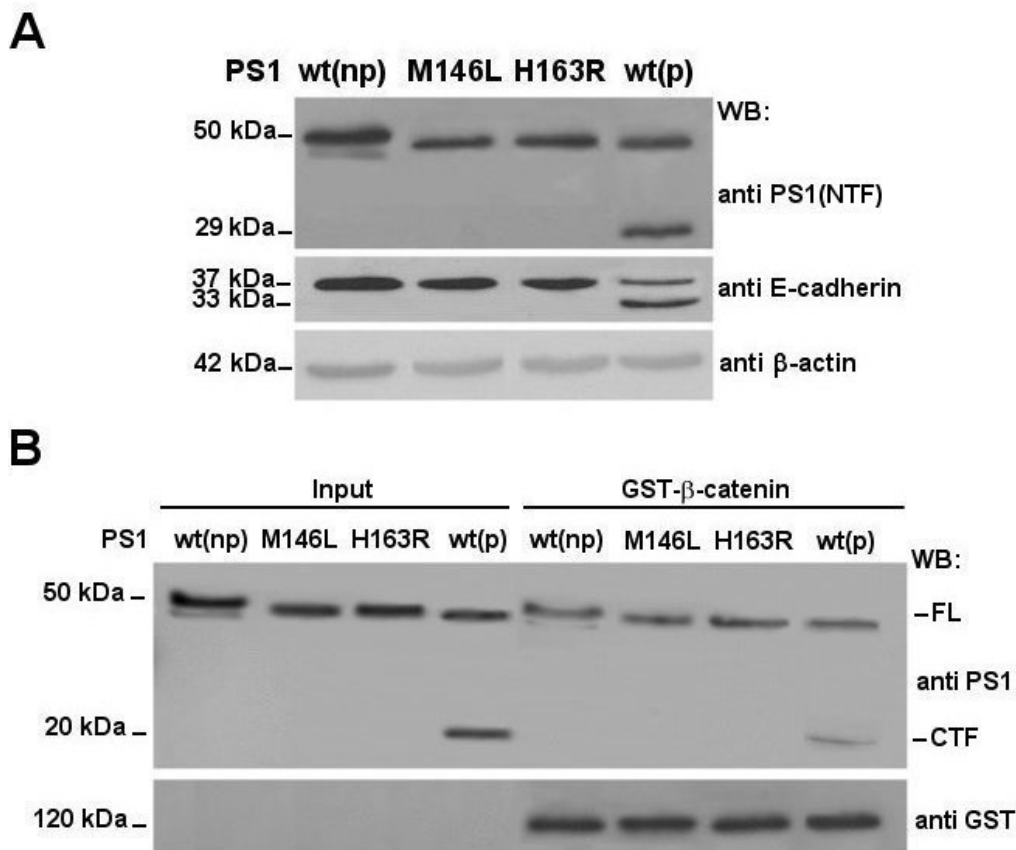


Figura 59. Els mutants M146L i H163R de la PS1 no es processen ni generen l'E-cadh/CTF2. (A) Cèl·lules RWP1 es van transfectar transitòriament amb 5 μ g de pcDNA3.1*Myc/His*-PS1, pcDNA3.1-PS1M146L, pcDNA3.1-PS1H163R i pcDNA3.1-PS1. A les 48h, es van preparar els extractes cel·lulars i 50 μ g d'extracte total van ser processats per SDS-PAGE i Western blot. Les diferents formes de la PS1 van ser detectades amb l'anticòs anti-PS1(1-65). (B) Cèl·lules RWP1 es van transfectar amb 15 μ g dels mateixos plàsmids que en el panell A. 500 μ g d'aquests extractes cel·lulars es van incubar amb 10 pmols de GST- β -catenina. Els complexos formats es van purificar amb glutatió-sepharosa i analitzar per SDS-PAGE i Western blot. La quantitat de PS1np i PS1p associada a la proteïna recombinant es va detectar amb l'anticòs específic anti-PS1(263-407). Es va reanalitzar la membrana amb l'anti-GST per comprovar nivells similars de les proteïnes recombinants. **Input:** 10% de l'extracte cel·lular total. Wt(np): PS1 *wild type* no processada; M146L: mutant M146L de la PS1; H163R: mutant H163R de la PS1; wt(p): PS1 *wild type* processada.

Una altra característica de la forma no processada de la PS1 era que tenia més afinitat per la β -catenina que la PS1 processada. Per tant, vam analitzar la interacció entre la β -catenina i els mutants M146L i H163R de la PS1 amb assaigs de pull-down. Com mostra la **Figura 59B**, la interacció entre la β -catenina i els mutants de la PS1 era del mateix ordre que la PS1np i molt menor que amb la PS1p.

Els resultats obtinguts amb els mutants M146L i H164R de la PS1 presents en malalts d'Alzheimer familiar precoç, permetien reforçar que el mecanisme d'inhibició de l'activitat transcripcional a partir la pèrdua d'interacció entre el Tcf-4 i el DNA, era dependent de la forma no processada de la PS1.

DISCUSSIÓ

La presenilina 1 (PS1) és una holoproteïna que a més d'estar implicada en la generació de la malaltia d'Alzheimer, modula negativament l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina [206-208].

Aquest efecte inhibidor de la PS1 es dona tant per la PS1 que es processa correctament (PS1p) com per la PS1 que no s'endoproteolitza (PS1np), i depèn de la concentració; així una major concentració de PS1 correlaciona amb una major inhibició de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina. Com a conseqüència d'aquesta inhibició hi ha una menor expressió dels gens diana d'aquest complex, gens implicats en proliferació cel·lular (**Figura 36**). La PS1np mostra una major inhibició d'aquesta activitat transcripcional (**Figures 16 i 35**), a més aquest efecte inhibidor és independent de l'activitat γ -secretasa (**Figura 17**) a diferència de la inhibició produïda per la PS1p. Aquestes dades indicaven que les dues formes de la PS1 inhibien de manera diferent l'activitat transcripcional de la β -catenina.

1. EFECTE INHIBIDOR DE LA FORMA PROCESSADA DE LA PS1 SOBRE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE LA β -CATENINA

En presència de la forma processada de la PS1 s'observa una disminució dels nivells de les cadherines (**Figura 18**). Aquesta disminució tant de l'E-cadherina com de la N-cadherina és conseqüència de l'activitat γ -secretasa (**Figura 20**). L'activitat γ -secretasa consisteix en processar proteïnes transmembrana de tipus I, en el domini transmembrana. Aquest tipus de proteïnes es caracteritzen per tenir un domini extracel·lular, un únic domini transmembrana i un domini intracel·lular petit. A l'inici d'aquest treball, només s'havien descrit dos substrats de l'activitat γ -secretasa, el receptor Notch i la proteïna precursora β -amiloide (APP). Aquestes dues proteïnes transmembrana de tipus I, són processades per diferents activitats proteases, una de les quals és l'activitat γ -secretasa generant un fragment intracel·lular corresponent al domini C-terminal (**Figures 6 i 7**).

Les cadherines són proteïnes transmembrana de tipus I, i per tant susceptibles de ser substrats de l'activitat γ -secretasa. Diferents evidències indicaven que podien ser substrats d'aquesta activitat, ja que els nivells de les cadherines es recuperaven en presència d'un inhibidor de l'activitat γ -secretasa, i a més desapareixia el fragment d'aproximadament 35 kDa (**Figura 20**). Nosaltres pensàvem que aquest fragment podia correspondre al fragment originat com a conseqüència de l'activitat γ -secretasa

en el domini transmembrana. Altres grups han descrit recentment que efectivament l'E-cadherina és un substrat de l'activitat γ -secretasa i que es genera un fragment citosòlic corresponent al domini intracel·lular anomenat E-cadh/CTF2 d'aproximadament 35 kDa [245], com nosaltres observàvem. Fa poc temps, també s'ha publicat per altres grups el mateix processament per la N-cadherina [252] (veure la **Figura 60**).

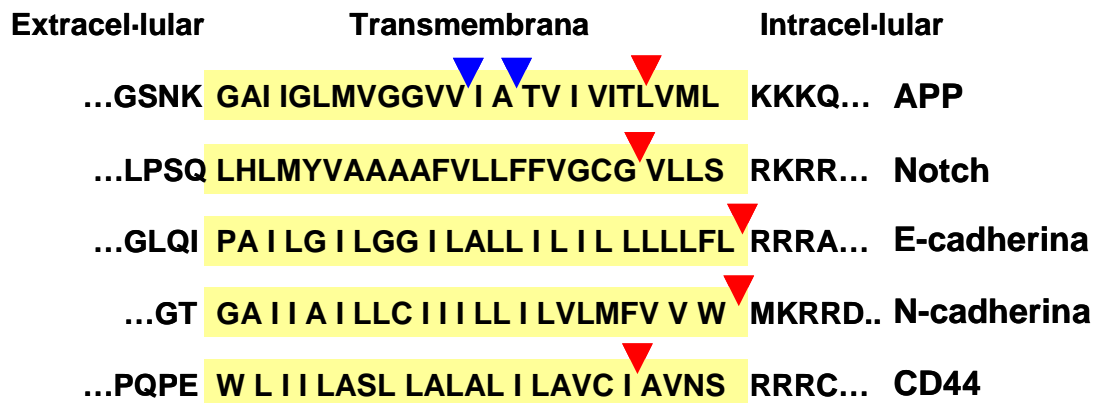


Figura 60. Comparació dels dominis transmembrana i identificació dels llocs de tall de l'activitat γ -secretasa. Els triangles vermells són els llocs de tall de l'activitat γ -secretasa per la formació dels fragments intracel·lulars, i els triangles blaus els llocs de tall per la generació dels pèptids $\alpha\beta$. Adaptat de [117].

Actualment ja s'han descrit més d'una quinzena de proteïnes transmembrana de tipus I, substrats de l'activitat γ -secretasa. A la **Taula 4** és mostren els substrats coneguts fins el moment. Entre ells s'hi troben diferents receptors de membrana com per exemple el receptor tirosina quinasa *ErbB4*, molècules d'adhesió com les cadherines i el *CD44* i també lligands com l'*efrinaB*. Com a conseqüència de l'acció de l'activitat γ -secretasa sobre aquests substrats es genera un fragment que correspon al domini intracel·lular anomenat ICD o CTF2. Aquests fragments estan involucrats en diferents vies de transducció de senyals que regulen l'expressió gènica, la senyalització i el desenvolupament. A la majoria d'ells se'ls hi atribueix una funció a nivell transcripcional. Per exemple, el fragment intracel·lular (SICD) format per acció de la γ -secretasa sobre el substrat sindecan3, regula negativament el coactivador transcripcional CASK [258]. Més endavant també es fa referència a la funció transcripcional dels productes intracel·lulars NICD i AICD dels substrats Notch i APP, respectivament.

Substrat	Productes generats	Referència
Alcadeïna	AlcICD	[259]
APP	Pèptids A β AICD	[53, 260]
CD44	CD44-ICD	[261]
DCC	DCC-ICD	[262]
Delta(1)	CTF2(DICD); DII1 ^{IC}	[263, 264]
E-cadherina	E-cadh/CTF2	[245]
EfrinaB2	EfrinaB2/CTF2	[265]
ErbB4	B4-ICD	[266]
GluR3	GluR3s	[267]
Jagged(2)	CTF2; JICD	[263, 264]
LAR	LICD	[268]
LRP	LRP-ICD	[269]
N-cadherina	N-cadh/CTF2	[252]
Nectina-1a	NE-ICD	[270]
Notch	NICD	[271, 272]
p75NTR	p75-ICD	[273]
Sindecán3	SICD	[258]

Taula 4. Substrats descrits de la γ -secretasa. *APP*, proteïna precursora β -amiloide; *CD44*, molècula d'adhesió que uneix àcid hialurònic; *DCC*, càncer colorectal delecí; *Delta1* i *Jagged* són lligands del receptor Notch; *EfrinaB*, lligand del receptor d'efrines; *ErbB4*, receptor tirosina quinasa; *GluR3*, receptor de glutamat subunitat 3; *LAR*, receptor tirosina fosfatasa LAR; *LRP*, receptor de lipoproteïnes de baixa densitat; *Nectina-1a*, membre de la superfamília de les immunoglobulines; *Notch*, receptor Notch; *p75NTR*, el receptor de neurotrofines p75; *sindecán 3*, proteoglicà. La nomenclatura del fragment intracel·lular generat per acció de l'activitat γ -secretasa és la inicial del substrat seguit de ICD (domini intracel·lular) o CTF2.

Diferents estudis demostren que la PS1 interacciona amb la β -catenina i l'E-cadherina, estabilitzant aquest complex [104, 243]. Per aquests autors, la inhibició de l'activitat transcripcional de la β -catenina podria ser deguda a una estabilització del complex E-cadherina- β -catenina per part de la PS1, que faria que la β -catenina es localitzés preferentment a la membrana plasmàtica. Nosaltres també hem observat que la PS1p interacciona amb l'E-cadherina (**Figura 23**). Però a diferència d'aquests autors, les nostres dades indiquen que la PS1p desestabilitza l'E-cadherina degut al seu processament en el domini transmembrana per acció de l'activitat γ -secretasa (**Figures 20 i 21**). Per tant, en generar-se un fragment citosòlic d'E-cadherina, ja no es podria retenir la β -catenina a la membrana. Els nostres resultats també demostren que aquest tall de l'E-cadherina només el genera la forma processada de la PS1 (**Figura 22**).

En presència de la PS1p, també s'observa una disminució dels nivells de la β -catenina i de la placoglobina (**Figures 18 i 20**). Degut a aquesta disminució de la β -catenina és lògic pensar que hi hauria menys β -catenina nuclear i una disminució en la formació del complex Tcf-4- β -catenina i com a conseqüència una menor activitat transcripcional dependent d'aquest complex. Aquest fet podria explicar l'efecte inhibidor de la PS1p. Hi ha altres grups que donen suport a la hipòtesi que la PS1 facilita la degradació de la β -catenina, fet que comportaria una disminució de l'activitat transcripcional de β -catenina [205, 209, 210]. Experiments de fraccionament cel·lular mostren que la disminució de β -catenina que s'observa en presència de la PS1p, té lloc només en la fracció citosòlica, mentre que la β -catenina nuclear no varia (**Figura 33B**). Per tant, la disminució dels nivells de β -catenina no sembla ser la causa de l'efecte inhibidor de la PS1, almenys en el sistema cel·lular emprat. La disminució de la β -catenina citosòlica s'explicaria com a conseqüència del processament de l'E-cadherina. Degut a aquest processament la β -catenina i també la placoglobina s'alliberarien de les unions adherents i quedarien lliures al citosol, fet que facilitaria la seva degradació via proteosoma. Per això, s'observen nivells més baixos d'aquestes catenines en presència de la PS1p, i que es recuperen en tractar les cèl·lules MEF PS(+/+) amb un inhibidor del proteosoma (**Figura 34**).

Aquestes conclusions estan recolzades per diferents estudis. S'ha descrit que en determinades situacions com per exemple, durant la remodelació dels contactes intercel·lulars, la morfogènesi, la reparació tissular, la migració i la mort cel·lular, es necessari un desensamblatge de les unions mediades per les cadherines [173]. Les principals activitats catalítiques implicades en la degradació de les cadherines en aquestes condicions són les de les metal·loproteases de la matriu extracel·lular i de l'activitat γ -secretasa. Per tant, en condicions de dissociació cel·lular, les cadherines (l'E-cadherina de 120 kDa i la N-cadherina de 135 kDa) són processades en el domini extracel·lular per una metal·loproteasa, l'ADAM10, una desintegrina metal·loproteasa de la família de proteïnes transmembrana dependents de Zinc [248, 249]. Amb l'acció de l'ADAM10 es genera un fragment C-terminal ancorat a la membrana anomenat cadh/CTF1 de 38-40 kDa (veure la **Figura 61**). Aquest fragment manté la interacció amb la PS1, la β -catenina i indirectament amb l' α -catenina. El fragment cadh/CTF1 és processat per l'activitat γ -secretasa de la PS1 generant un fragment corresponent al domini citosòlic de les cadherines, cadh/CTF2 de 33-35 kDa. Aquest fragment és soluble i es dissocia de la PS1 i del citoesquelet d'actina. Per tant, hi ha un augment citosòlic de la β -catenina unida al fragment cadh/CTF2 [245] (revisat a [246]). En els nostres experiments també observem un fragment d'un pes molecular més elevat que

el fragment citosòlic (cadh/CTF2), que correspondria al fragment cadh/CTF1. Els nivells d'aquest fragment també augmenten quan es tracten les cèl·lules amb l'inhibidor de l'activitat γ -secretasa, ja que és substrat d'aquesta activitat (**Figura 20**). Actualment, no se sap si el processament de l'E-cadherina és seqüencial, és a dir, primer actua l'ADAM10, i una vegada format l'E-cadh/CTF1 seria el substrat de la γ -secretasa, o bé si aquesta activitat pot ser independent de l'activitat d'ADAM10 [245, 274]. El processament de la N-cadherina, en canvi és seqüencial. Per tal que la γ -secretasa porti a terme la seva funció, és imprescindible la formació prèvia del fragment N-cadh/CTF1 per acció de l'ADAM10 [274]. Aquest processament seqüencial, també s'observa en el processament d'una altra proteïna transmembrana tipus I, CD44 [275].

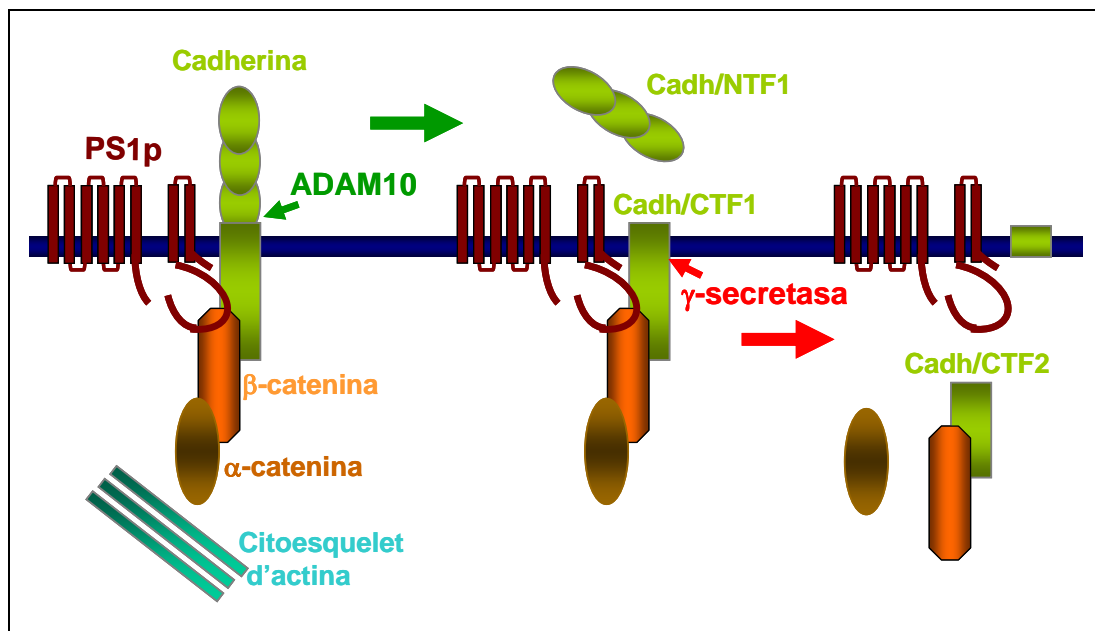


Figura 61. Representació esquemàtica del processament de les cadherines. Les cadherines són processades en el domini extracel·lular per la metal·loproteasa ADAM10, generant un fragment anomenat cadh/CTF1 que es manté ancorat a la membrana i associat a la PS1 i β -catenina. Aquest fragment es substrat de l'activitat γ -secretasa, la qual actua en el domini transmembrana, formant el fragment cadh/CTF2. El fragment cadh/CTF2 es dissocia de la PS1 i del citoesquelet i és alliberat al citosol formant un complex amb la β -catenina.

S'ha descrit que els fragments citosòlics de Notch i de l'APP, el NICD i l'AICD respectivament, formats per acció de l'activitat γ -secretasa, tenen capacitat de migrar el nucli on regulen l'expressió de diferents gens. Per exemple, l'AICD interacciona al nucli amb la p65, una proteïna adaptadora que actua com a cofactor transcripcional, i amb la Tip60 (una proteïna que forma part d'un complex multiproteic amb activitat

histona acetiltransferasa) [250]. Recentment, s'atribueix al fragment E-cadh/CTF2 un paper protector de la producció dels pèptids A β . La presència d'aquest fragment promou la degradació lisosomal/endosomal dels derivats transmembrana de l'APP (el C99 i el C83) [276]. El fragment C99 és substrat de l'activitat γ -secretasa generant els fragments A β i el fragment corresponent al domini intracel·lular d'APP, AICD (veure la **Figura 6**). En presència d'E-cadh/CTF2 disminueixen els nivells del fragment C99 i com a conseqüència també disminueix la producció dels pèptids A β i del fragment AICD. Per tant, l'E-cadh/CTF2 inhibeix la producció dels pèptids β -amiloides i del fragment intracel·lular AICD de l'APP [276]. Aquests resultats podrien indicar una competició entre els diferents substrats de l'activitat γ -secretasa. Per exemple que l'activitat γ -secretasa talli a l'E-cadherina i en canvi no processi a l'APP, això significaria que el complex multiproteic amb activitat γ -secretasa tindria una afinitat diferent per cada un dels seus substrats.

En canvi, no s'ha descrit cap paper a nivell nuclear per l'E-cadh/CTF2. Degut a la similitud amb els fragments NICD i AICD, vam estudiar si els fragments cadh/CTF2 podien ser els responsables de la inhibició de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina. Els nostres resultats indiquen que aquests fragments citosòlics d'E-cadherina inhibeixen l'activitat transcripcional de la β -catenina (**Figura 26**). A més, aquesta inhibició és revertida per la p120-catenina (**Figura 27**). La reversió produïda per la p120-catenina, és lògica ja que aquesta catenina competeix amb la PS1p per unir-se al domini jxtamembrana de l'E-cadherina (**Figura 24**). Per tant, en presència de la p120-catenina, es detecta menys PS1p unida a l'E-cadherina i un menor processament d'aquesta cadherina (**Figura 25**). La disminució en el processament de l'E-cadherina comporta una menor formació del fragment citosòlic E-cadh/CTF2, el qual és el responsable de la inhibició de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina.

Alguns autors han descrit que el fragment cadh/CTF2 interacciona amb la β -catenina en el citosol [245]. Nosaltres pensàvem que aquesta interacció potser podia retenir la β -catenina en aquest compartiment impeding el seu pas al nucli i que pogués actuar com a coactivador transcripcional. No obstant, els nostres resultats d'immunofluorescència mostren que aquest complex E-cadh/CTF2- β -catenina pot localitzar-se al nucli (**Figura 28**) i per tant, el fragment CTF2 no reté la β -catenina al citoplasma.

El nostre grup, havia descrit que la β -catenina interaccionava pel domini armadillo, concretament per les repeticions de la 3 a la 10, amb els 50 primers aminoàcids del Tcf-4. En canvi, l'associació entre l'E-cadherina i la β -catenina té lloc

pràcticament en la totalitat de les dotze repeticions armadillo de la β -catenina. Com que els dominis d'interacció estan solapats, això suggeria que el complex E-cadh/CTF2- β -catenina, que té capacitat de translocar al nucli, podia interferir en l'associació entre la β -catenina i el Tcf-4. El Tcf-4 requereix la unió amb la β -catenina, ja que aquesta última proteïna recluta altres factors transcripcionals essencials per activar la transcripció. A diferència del què pensàvem, el complex E-cadh/CTF2- β -catenina tampoc altera la interacció entre la β -catenina i el Tcf-4 (**Figura 29**). Diferents possibilitats permeten explicar perquè el fragment E-cadh/CTF2 no modifica la interacció entre la β -catenina i el Tcf-4. L'E-cadherina i el Tcf-4, tot i unir-se al domini de repeticions armadillo de la β -catenina, podrien interaccionar per superfícies diferents. Aquest fenomen passa amb altres factors, com per exemple l'E-cadherina i la proteïna d'unió a la caixa TATA, TBP. Aquestes dues proteïnes interaccionen amb la β -catenina per la mateixa zona però a través de superfícies diferents [168]. Això es podria explicar si la β -catenina, el fragment E-cadh/CTF2 i el Tcf-4 és localitzessin en el mateix compartiment cel·lular. Tanmateix, mitjançant assaigs de fluorescència i de fraccionament cel·lular, s'ha observat una localització citosòlica i no nuclear del fragment E-cadh/CTF2. Per tant, queda lluny la possibilitat d'un complex entre les tres proteïnes en condicions fisiològiques. A més, l'afinitat entre la β -catenina i el Tcf-4 és més elevada que entre la β -catenina i el fragment E-cadh/CTF2, per això la β -catenina va al nucli encara que hi hagi CTF2.

La funció de la CBP (coactivador del factor transcripcional CREB) és al nucli, on regula l'expressió de diferents gens que contenen seqüències CRE en el seus promotors, per exemple c-fos. A més, la CBP també és un dels coactivadors que recluta la β -catenina en interaccionar amb el Tcf-4, per tal d'activar la maquinària transcripcional i activar els gens dependents del complex Tcf-4- β -catenina. S'ha descrit recentment per Marambaud i col·laboradors que el fragment N-cadh/CTF2, format per acció de l'activitat γ -secretasa sobre la N-cadherina, interacciona amb la CBP i la reté al citoplasma. La formació del complex N-cadh/CTF2-CBP promou la degradació de la CBP pel sistema d'ubiquitina-proteosoma [252] (revisat en [246]). Per tant, aquests autors detecten una disminució de l'expressió dels gens dependents de CRE i de Tcf-4- β -catenina [252, 277]. Nosaltres hem observat que el fragment E-cadh/CTF2 també té la capacitat d'interaccionar amb la CBP (**Figura 30**). A més, la inhibició de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina per l'E-cadh/CTF2 és revertida per la CBP, d'una manera similar a com passa amb el fragment N-cadh/CTF2 (**Figura 32**). Si la inhibició de l'activitat transcripcional de β -catenina per N-cadh/CTF2 és deguda a un augment de la degradació de la CBP [252], i l'E-cadh/CTF2 es comporta d'una manera

anàloga al fragment citosòlic de la N-cadherina, era possible que l'efecte inhibidor de l'E-cadh/CTF2 també fos degut a un augment de la degradació de la CBP. Tal com indiquen els resultats obtinguts en aquesta tesi (**Figura 33A**), es demostra que en la línia cel·lular utilitzada, la qual expressa constitutivament la PS1 processada, hi ha nivells menor de CBP. Per tant, la generació dels fragments citosòlics de les cadherines per acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1p, comportaria una degradació de la CBP i com a conseqüència una disminució de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina, a més de l'expressió dels gens depenents de CRE.

Resultats de diferents grups reforcen aquesta conclusió. Així, un mutant de la PS1 present en malalts d'Alzheimer familiar precoç, PS1(L286V), augmenta l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina. Aquest mutant no és capaç de processar la N-cadherina i per tant, no es genera el fragment N-cadh/CTF2 responsable de la degradació de la CBP. Per això, en presència de la PS1(L286V) s'observa un augment dels nivells de CBP i com a conseqüència un augment de l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4- β -catenina-CBP [277]. Les nostres dades i també les obtingudes per Marambaud i col·laboradors [252] i Teo i col·laboradors [277], comentades anteriorment, són diferents als resultats descrits per Saura i col·laboradors [63]. Aquests darrers autors observen que els ratolins doble *knock-out* condicionals per les presenilines tenen nivells proteics (totals i nuclears) i nivells de mRNA de la CBP, menors que els ratolins control. Aquest grup demostra que la pèrdua de les presenilines produeix una disminució dels nivells de CBP i per tant, una disminució de l'expressió dels gens depenents de CRE, com el gen c-fos. Aquesta discrepància de resultats és podria explicar de diferents maneres: degut a una diferència de metodologia o sistema experimental ja que aquest grup utilitza teixits cerebrals de ratolins adults, mentre que nosaltres utilitzem un sistema de cultius cel·lulars; considerant que la interacció entre la CBP i el fragment cadh/CTF2 pugui estar regulada per algun altre factor, que fos limitant segons el sistema cel·lular emprat. Els nivells de cadh/CTF2 en altres sistemes no fossin suficients ni capaços de regular la CBP. És a dir, segons els nivells inicials de les cadherines i dels components proteics que formen el complex amb activitat γ -secretasa, hi hauria més o menys formació dels fragments cadh/CTF2 responsables de la degradació de la CBP. També es possible que en determinades condicions la fosforilació de l'E-cadherina per CKI, que hem vist que disminueix l'afinitat per la CBP, es pogués produir; fet que evitaria que la CBP es degradés i per tant, que disminuís l'activitat transcripcional de la β -catenina. A més, la CBP és un factor transcripcional necessari perquè el complex Tcf-4- β -catenina activi la transcripció. Si un dèficit de les presenilines disminueix els nivells de CBP, com

postulen Saura i col·laboradors, no es podrien explicar altres dades que indiquen que la PS1 és un regulador negatiu de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina [206-208].

El conjunt dels resultats obtinguts per la PS1p, ens permet proposar un model d'inhibició de l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4- β -catenina. L'efecte inhibitor de la PS1p no pensem que sigui per una regulació a la baixa dels nivells de β -catenina. Tal com mostra la **Figura 62**, la PS1p interacciona amb l'E-cadherina i la processa generant un fragment citosòlic anomenat E-cadh/CTF2. El fragment CTF2 generat manté el domini d'interacció amb la β -catenina, però no impedeix que la β -catenina transloqui al nucli, ni que interaccioni amb el factor transcripcional Tcf-4. L'efecte inhibitor de l'activitat transcripcional sembla ser degut a la interacció entre l'E-cadh/CTF2 i la CBP en el citosol. La formació d'aquest complex E-cadh/CTF2-CBP afavoriria la degradació de la CBP via proteosoma. En disminuir els nivells del coactivador transcripcional CBP, es produiria una devallada de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina.

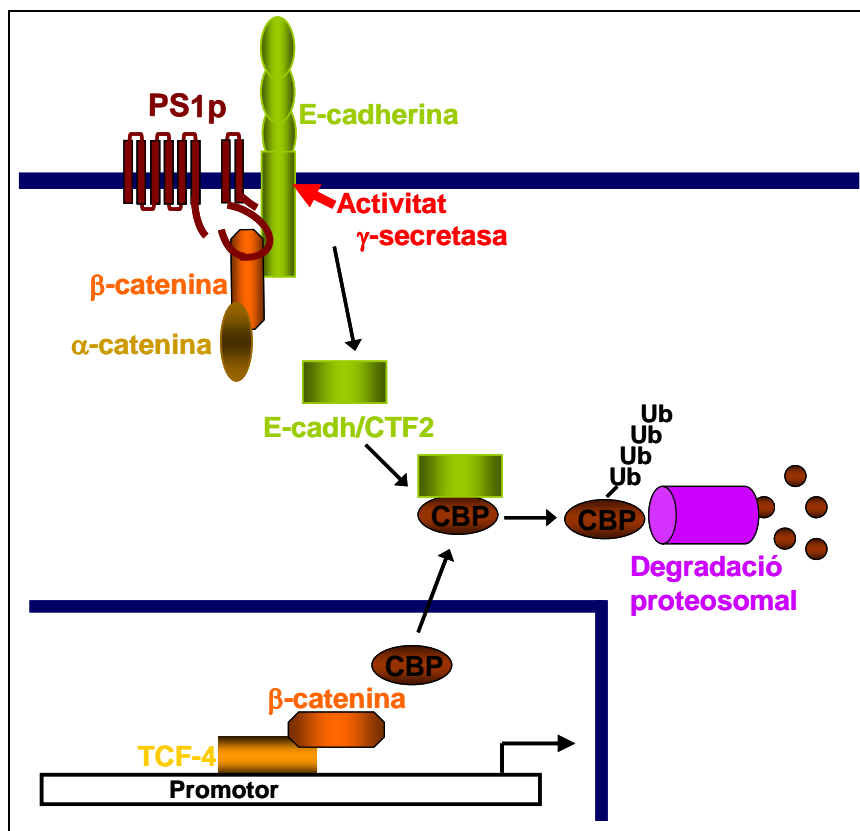


Figura 62. Model proposat de l'efecte inhibitor de la PS1p en l'activitat transcripcional mediada pel complex Tcf-4- β -catenina. Per acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1p es processa l'E-cadherina i es genera el fragment corresponent al domini intracel·lular anomenat E-cadh/CTF2. L'E-cadh/CTF2 interacciona amb el cofactor transcripcional CBP i promou la seva degradació via proteosoma. Degut a la devallada de CBP hi ha una disminució de l'activitat transcripcional de Tcf-4- β -catenina.

2. EFECTE INHIBIDOR DE LA FORMA NO PROCESSADA DE LA PS1 EN L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE LA β -CATENINA

Ja s'ha comentat que l'efecte inhibidor de la PS1 no processada sobre l'activitat transcripcional mediada per Tcf-4- β -catenina és diferent a l'efecte inhibidor de la PS1 processada. Diferents resultats obtinguts ens permeten suggerir un mecanisme de repressió diferent en l'activitat transcripcional segons la forma existent de PS1. (i) L'efecte inhibidor de la PS1 no processada és independent de l'activitat γ -secretasa (**Figura 17**) i (ii) existeix una interacció molt dèbil entre la forma no processada de la PS1 i l'E-cadherina (**Figura 23B**). Com a conseqüència d'aquesta dèbil interacció, la PS1np processa ineficientment a l'E-cadherina (**Figura 22**). Per això, aquesta forma de la PS1 no està implicada en l'estabilitat de l'E-cadherina. El fet que la PS1p interaccioni amb l'E-cadherina i la PS1np no, podria ser degut a un canvi conformacional de la PS1 quan s'endoproteolitza, el qual afavoriria l'associació entre la PS1 i l'E-cadherina.

S'ha descrit que en determinades condicions, la PS1 podria actuar com una proteïna adaptadora, facilitant la fosforilació de la β -catenina per la proteïna quinasa A (PKA) i seguidament per la quinasa glicogen sintasa 3 β (GSK3 β). Aquest mecanisme seqüencial de fosforilació de la β -catenina és independent a la presència de l'axina, proteïna necessària per acoblar la quinasa CKI al complex multiproteic encarregat de fosforilar la β -catenina [211]. La PKA, en el cas de la PS1, i la CKI, per l'axina, són les responsables de la fosforilació inicial de la β -catenina, i així, permetra la següent fosforilació per acció de la GSK3 β , la qual desestabilitza a la proteïna. Nosaltres hem detectat una disminució de l'activitat transcripcional dependent de la β -catenina en cèl·lules epitelials (**Figura 35**), però no és acompanyada d'una disminució dels nivells totals de la β -catenina. En presència de la PS1np, la quantitat de β -catenina en la cèl·lula es manté (**Figura 37 i 38**). Per tant, la PS1np no estaria implicada en la regulació de la degradació de la β -catenina, ja que la cèl·lula tindria la mateixa quantitat de β -catenina amb capacitat de migrar al nucli i actuar com a coactivador transcripcional.

Altres estudis demostren que la PS1 interacciona amb la β -catenina i l'E-cadherina i estabilitza aquest complex [104, 243]. Nosaltres hem observat que la PS1 no processada (PS1np) també interacciona amb la β -catenina. Aquesta interacció es produeix a través del domini central anomenat armadillo, concretament per les últimes 6 repeticions armadillo d'aquest domini (**Figura 43**). La interacció amb el domini

armadillo és major que la interacció amb la proteïna *wild type*, indicant que els extrems amino i carboxiterminals estan dificultant aquesta interacció. Concretament, és l'extrem carboxiterminal el responsable de disminuir la interacció entre la PS1np i la β -catenina, ja que el Δ C- β -catenina (construcció que li falta l'extrem C-terminal) interacciona millor amb la PS1np que la construcció que li manca l'extrem N-terminal (**Figura 43**). El fet que l'extrem carboxiterminal dificulti la interacció entre la PS1np i la β -catenina s'explicaria per la capacitat que té aquest extrem d'interaccionar amb les últimes repeticions del domini central de la pròpia β -catenina [169]. Aquest extrem interacciona per la mateixa zona per on interacciona la PS1np, per tant, dificultaria la interacció de la PS1np amb la β -catenina. A més, la interacció entre la PS1np i la β -catenina és regulada per fosforilació en residus tirosina. La interacció entre ambdues proteïnes és bloquejada quan es substitueix la tirosina 654 (situada en la part final del domini armadillo) per un glutàmic (**Figura 44**), amb la finalitat de mimetitzar la fosforilació produïda en aquest residu pel receptor de EGF. Aquesta pèrdua d'afinitat quan s'incorpora el glutàmic en el residu 654, confirma que la interacció entre la PS1np i la β -catenina té lloc per la part final del domini armadillo i que aquest residu és important per aquesta interacció. Membres del nostre grup també havien observat un fet similar entre la β -catenina i l'E-cadherina. La interacció entre aquestes dues proteïnes té lloc pràcticament per la totalitat de les 12 repeticions armadillo de la catenina, però la fosforilació d'aquest residu regula negativament la interacció entre ambdues proteïnes [236]. Per tant, la tirosina 654 de la β -catenina és important per la regulació de la interacció entre aquesta catenina i altres cofactors, com per exemple, la PS1 i l'E-cadherina.

Els autors anteriors que demostren que la PS1 interacciona amb la β -catenina i l'E-cadherina i estableix aquest complex [104, 243], també afirmen que amb l'estabilització de les unions adherents, s'impedeix que la β -catenina es transloqui al nucli, condició indispensable perquè desenvolupi la seva activitat transcripcional. Els nostres resultats mostren que la PS1np també té la capacitat d'inhibir l'activitat transcripcional del mutant de la β -cateninaY654E tot i que aquest mutant no interacciona ni amb l'E-cadherina ni amb la PS1np (**Figures 44 i 49**). Aquesta dada és contradictòria als autors anteriors, i ens permet reforçar la nostra conclusió que l'efecte inhibitor de la PS1np en l'activitat transcripcional depenent de la β -catenina és independent de la interacció entre la PS1np i la β -catenina.

La discrepància dels nostres resultats dels descrits per altres autors que relacionen a la PS1 en la degradació de la β -catenina, es podria explicar de diferents maneres: que l'activitat de la PKA en les nostres cèl·lules epitelials, sigui baixa i

incapaç de fosforilar el residu serina 45 de la β -catenina, tot i la presència de la PS1np. En les línies cel·lulars utilitzades, el gen de l'APC no és funcional. No s'ha descrit la rellevància de l'APC en la degradació de la β -catenina induïda per la PS1, però, si actua com l'axina, la PS1 només podria degradar a la β -catenina quan formes un complex juntament amb l'APC. És possible que l'efecte de degradació sobre la β -catenina fos dependent del processament de la PS1. És a dir, s'observés una degradació de la β -catenina en presència dels fragments amino i carboxiterminals de la PS1. Es va considerar que aquesta possibilitat era poc probable, ja que la PS1np té una major afinitat per la β -catenina, que la PS1p (comparar els carrils 2 i 9, de la **Figura 57**). Però podia ser certa, tot i la baixa afinitat entre la β -catenina i la PS1p, si aquesta última (la PS1p) fos la responsable de la unió entre la PKA i la β -catenina. I de fet, en les cèl·lules MEFs PS(+/+) que expressen constitutivament la PS1 processada tenen nivells menors de β -catenina reforçant la idea que els nivells de β -catenina només estan regulats per la PS1p (**Figura 18**). Però aquesta disminució de β -catenina correspon a la β -catenina citosòlica, mentre que els nivells de β -catenina nuclear responsables de l'activitat transcripcional, no es modifiquen (**Figura 33**). Aquests resultats indiquen que els nivells de β -catenina tampoc són la causa de l'efecte inhibitor de la PS1p ni de la PS1np en el nostre sistema cel·lular emprat.

Hem descrit que la PS1np també pot interaccionar amb la placoglobina amb una afinitat similar a la de la β -catenina (**Figures 39 i 41**). La placoglobina, també anomenada γ -catenina, és una proteïna molt similar a la β -catenina, especialment en el domini central armadillo per on interacciona la PS1np. Però, tot i tenir un domini armadillo molt similar (un 83% d'homologia), les dues proteïnes no s'associen a la PS1np en residus equivalents. Mentre que la β -catenina s'uneix per les últimes repeticions armadillo, la PS1np interacciona per les sis primeres repeticions de la placoglobina (**Figura 46**). La interacció de la PS1np amb la placoglobina, és major amb la proteïna *wild type* que amb la construcció que només té el domini central armadillo de la placoglobina (**Figura 46**). Aquest resultat indica que en aquest cas els extrems N- i C-terminals afavoreixen la unió entre ambdues proteïnes, al contrari del que passava amb la interacció entre la PS1np i la β -catenina. Aquí es torna a posar de manifest que la unió de la β -catenina o de la placoglobina a un mateix cofactor, és diferent degut als extrems terminals. És a dir, l'especificitat d'unió a la PS1np, igual com passa amb altres factors, vindria donada pels extrems N- i C-terminals de les catenines [170]. Concretament, és l'extrem aminoterminal el que afavoreix la unió entre la PS1np i la placoglobina, ja que la interacció entre el Δ C-placoglobina (construcció que li falta l'extrem C-terminal) és major que la interacció amb el Δ N-

placoglobina (construcció que li manca l'extrem N-terminal). A més, la regulació per fosforilacions en residus tirosina també és diferent. La interacció entre la PS1np i la β -catenina, és disminuïda quan es modifica el residu tirosina 654. En canvi, la fosforilació en el residu equivalent de la placoglobina, la tirosina 643, no redueix sinó que augmenta la interacció entre la PS1np i la placoglobina (**Figura 47**). Per tant, factors de creixement que modulen la fosforilació en aquests residus tirosina de les dues catenines, pot modular la interacció de la PS1np a una o a l'altra catenina. L'adició del factor de creixement epidèrmic en cèl·lules epitelials augmenta la interacció entre la PS1np i la placoglobina (**Figura 48**). Per tant, l'associació entre la PS1np i les catenines potser regulada per senyals extracel·lulars.

La fosforilació del Tcf-4 per la quinasa CKII ha permès al nostre grup identificar dues zones diferents d'interacció de la β -catenina i de la placoglobina al factor de transcripció Tcf-4 [257]. Aquests dos dominis d'unió a les catenines estan localitzats en dues seqüències adjacents: de l'aminoàcid 1-51 del Tcf-4 s'uneix la β -catenina i de l'aminoàcid 51-80 s'uneix la placoglobina. La interacció entre la placoglobina i el Tcf-4 és anul·lada per la fosforilació del residu serina 60 del Tcf-4. La unió d'aquestes dues proteïnes al Tcf-4 no és excloent, és a dir, totes dues es poden unir simultàniament al Tcf-4. La unió de la placoglobina al Tcf-4 inhibeix l'activitat transcripcional depenent de β -catenina bloquejant la unió entre el Tcf-4 i el DNA. Ben-Ze'ev i col·laboradors [278] van suggerir que els extrems N- i C-terminal de la placoglobina estaven implicats en aquesta repressió, ja que els dominis armadillo de la β -catenina i de la placoglobina són molt similars. Resultats més recents publicats pel nostre grup [170], demostren que aquesta diferència d'especificitat d'unió a Tcf-4 ve modulada pels extrems d'ambdues proteïnes.

En aquest treball hem demostrat que en presència de la PS1np, la placoglobina augmenta l'associació amb el Tcf-4 i s'anul·la la pèrdua d'interacció quan el residu serina 60 està fosforilat per la CKII (**Figures 50 i 52**). Aquests resultats suggereixen, que la PS1np modifica les característiques d'unió entre la placoglobina i el Tcf-4. El Tcf-4 interacciona amb el domini armadillo de la placoglobina i de la β -catenina, i aquesta associació està afectada pels extrems terminals d'aquestes catenines. Com es mostra en la **Figura 53**, i també s'ha descrit per altres cofactors que s'uneixen a la placoglobina i a la β -catenina [170, 239], el domini armadillo de les catenines s'uneix millor al Tcf-4 que la proteïna *wild type*. En presència de la PS1np augmenta la interacció entre la placoglobina i el Tcf-4, mentre que no es veu afectada la interacció entre el domini armadillo de la placoglobina i el Tcf-4. Aquests resultats indiquen que l'efecte que produeix la PS1np és anul·lar la inhibició induïda pels extrems terminals.

En el nostre grup s'havia descrit que la unió de diferents factors al domini armadillo de la placoglobina i de la β -catenina és cooperativa. És a dir, la interacció d'un primer factor, per exemple, la unió de la placoglobina a l'E-cadherina, potencia l'associació d'un segon factor, l' α -catenina [238]. Aquest efecte és degut a canvis conformacionals dels extrems terminals de les catenines. En condicions normals, els extrems terminals de les catenines estan interaccionant amb el domini armadillo i entre ells. Però amb la interacció del primer factor es produeix un canvi conformacional d'un dels extrems terminals que provoca un canvi en l'altre extrem, facilitant la interacció del segon factor.

En aquest treball, proposem una acció similar per part de la PS1 no processada (veure la **Figura 63**). La interacció de la PS1np en les primeres repeticions del domini armadillo de la placoglobina, provocaria un canvi de conformació de l'extrem aminoterminal que comportaria a un altre canvi conformacional de l'extrem carboxiterminal d'aquesta catenina. Com a conseqüència el lloc d'unió del Tcf-4 quedaria més accessible. Per tant, la interacció de la PS1np potencia l'associació del Tcf-4 a la mateixa zona de la placoglobina, però probablement a través d'una superfície diferent. A més, amb la interacció de la PS1np a la placoglobina, es perd l'especificitat d'unió d'aquesta última proteïna al Tcf-4. És a dir, el Tcf-4 s'uneix a la placoglobina pel seu domini d'interacció (51-80), però també es pot unir pel domini d'interacció de la β -catenina (1-51) (veure les **Figures 50 i 52**).

Com ja s'ha mencionat, l'associació de la placoglobina al Tcf-4 bloqueja la interacció d'aquesta última proteïna al DNA. Hem observat que el Tcf-4 s'uneix menys al DNA (**Figura 54**), degut molt possiblement a l'augment de la unió Tcf-4·placoglobina, induït per la PS1np. Com a conseqüència d'aquesta major associació Tcf-4·placoglobina, s'inhibeix la unió del Tcf-4 al DNA, produint una disminució de l'activitat transcripcional mediada per Tcf-4· β -catenina. A més, aquesta inhibició de la interacció entre el Tcf-4 i el DNA, és degut que en presència de la PS1np una gran part del Tcf-4 està present en algun compartiment extranuclear (**Figura 55**), per tant, no es localitza al nucli i no pot actuar com a factor transcripcional.

Aquests resultats recolzen els treballs d'altres autors que indiquen que la placoglobina és un repressor de la proliferació en cèl·lules epitelials, i que aquest efecte no és degut a una estimulació a nivell de les unions intercel·lulars [279]. Però també s'han descrit efectes positius de la placoglobina en l'activitat transcripcional dependent de la β -catenina (**Figura 56**). La placoglobina desplaça a la β -catenina de les unions adherents, augmentant els nivells citosòlics de la β -catenina, facilitant el pas al nucli i augmentant l'activitat transcripcional del complex Tcf-4· β -catenina [280]. Per

tant, l'efecte positiu o negatiu de la placoglobina en l'activitat transcripcional mediada per β -catenina, depèn de la interacció amb el Tcf-4, la qual és modificada degut a la presència de la PS1np.

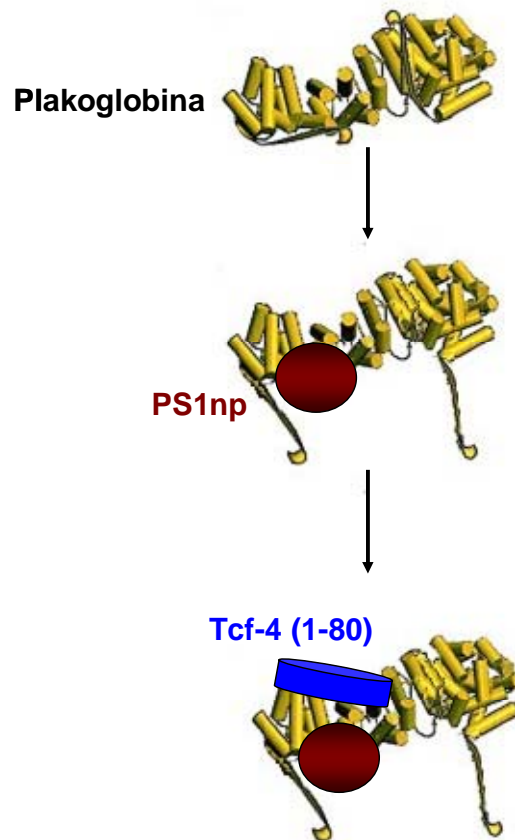


Figura 63. Model proposat d'interacció entre la placoglobina, la PS1np i el Tcf-4. Els extrems terminals de les catenines estan interaccionant amb el domini armadillo i entre ells. Els cilindres grocs corresponen al domini armadillo, i les cintes grogues els extrems N- i C-terminals de la placoglobina. Amb la interacció d'un primer factor, en aquest cas la PS1 no processada (el cercle marró), és produïx un canvi conformatiu de l'extrem aminoterminal de la placoglobina. El canvi conformatiu de l'extrem N-terminal comporta un canvi també conformatiu de l'extrem C-terminal. Com a conseqüència el lloc d'unió del segon cofactor (cilindre blau que correspon al Tcf-4 1-80 aa) queda més accessible.

Els mutants M146L i H163R de la PS1 presents en l'Alzheimer familiar precoç, no s'endoproteolitzen en les cèl·lules epitelials utilitzades (**Figura 59**). Aquests mutants tenen una comportament similar a la PS1np *wild type* tant en l'afinitat amb que interaccionen amb la β -catenina (**Figura 59**), com en l'efecte inhibidor de l'activitat transcripcional del complex Tcf-4- β -catenina ja que també és independent de l'activitat γ -secretasa (**Figura 58**). Aquests resultats recolzen que el mecanisme d'inhibició de l'activitat transcripcional és diferent segons l'estat d'endoproteolisi de la PS1. S'ha establert una controvèrsia sobre la capacitat que tenen aquests mutants

d'endoproteolitzar-se. Diferents autors han observat un dèficit en el processament d'aquests mutants, mentre que d'altres veuen un correcte processament i generació dels fragments N- i C-terminals. Aquesta diferència podria ser deguda a la quantitat dels altres components del complex γ -secretasa (nicastrina, aph i pen-2) presents en cada tipus cel·lular utilitzat. És possible que si hi ha poca quantitat d'aquests components, part de la PS1 que es sobreexpressa no forma part del complex γ -secretasa i no pot ser processada.

Cal recordar, que la majoria dels resultats sobre la inhibició de la PS1np en l'activitat transcripcional depenent del complex Tcf-4- β -catenina, es van dur a terme en cèl·lules epitelials. A més, la interacció entre la PS1 i la placoglobina o la β -catenina depèn de modificacions postranscripcionals (fosforilacions) d'aquestes catenines i del processament de la PS1 (**Figura 57**). Aquests dos paràmetres són molt diferents en cada tipus cel·lular i circumstàncies. Per això, la contribució de la placoglobina en la modulació de la via transcripcional depenent de la β -catenina, pot ser diferent en neurones, en fibroblast o en cèl·lules epitelials.

Els nostres resultats permeten proposar un model per explicar l'efecte inhibitor de la PS1np en l'activitat transcripcional de la β -catenina, i que seria el següent (veure la **Figura 64**):

A part de la localització a la membrana formant part de les unions adherents, la β -catenina també es localitza al citosol i al nucli. Els nivells de β -catenina en el citosol estan regulats per la via de senyalització de Wnt. Quan la via està activada, s'inhibeix la degradació de la β -catenina pel proteosoma, per tant, augmenta la concentració de β -catenina lliure el citosol i la conseqüent translocació al nucli. Una vegada en el nucli, la β -catenina interacciona amb el factor de transcripció Tcf-4 i activa els gens depenents del complex Tcf-4- β -catenina. En presència de la PS1 no processada, aquesta interacciona amb la placoglobina provocant un canvi conformacional dels extrems terminals de la placoglobina. Degut a aquest canvi conformacional augmenta l'afinitat entre la placoglobina i el Tcf-4 en un compartiment extranuclear. Per tant, com a conseqüència de la interacció PS1np-placoglobina-Tcf-4 hi ha una retenció de Tcf-4 al citosol, però no es pot descartar la possibilitat que hi hagués una sortida de Tcf-4 del nucli. En aquestes condicions, degut a la retenció extranuclear del Tcf-4 hi ha una menor formació nuclear del complex Tcf-4- β -catenina i una disminució de l'activitat transcripcional mediada per aquest complex.

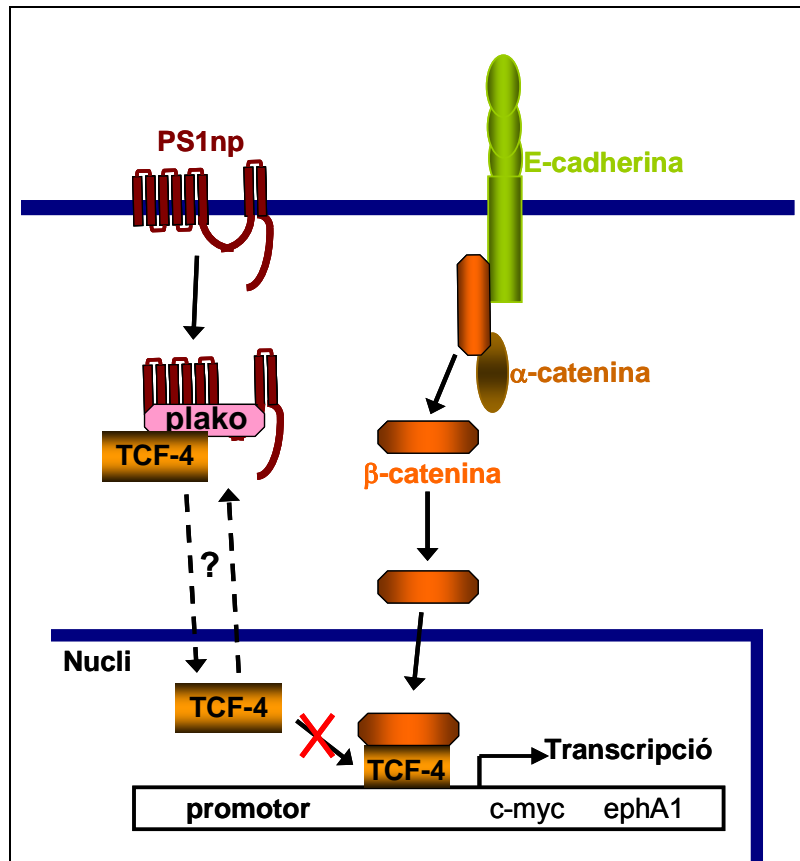


Figura 64. Model proposat de l'efecte inhibitor de la PS1 no processada en l'activitat transcripcional dependent del complex Tcf-4-β-catenina. En condicions normals la β-catenina forma part de les unions adherents. Quan la β-catenina està lliure al citosol pot migrar al nucli on activa els gens dependents dels complex Tcf-4-β-catenina. En presència de la PS1 no processada (PS1np), aquesta interacciona amb la placoglobina i augmenta l'afinitat entre la placoglobina i el factor transcripcional Tcf-4. La localització del complex PS1np-placoglobina-Tcf-4 té lloc en un compartiment extranuclear. Probablement hi ha una retenció del Tcf-4 fora del nucli, però no es pot descartar una possible sortida de Tcf-4 desde el nucli. De totes maneres, amb la localització extranuclear de Tcf-4, hi ha una disminució de l'activitat transcripcional dependent de Tcf-4-β-catenina.

CONCLUSIONS

La **conclusió principal** d'aquesta tesi doctoral és que la PS1 inhibeix l'activitat transcripcional del complex Tcf-4· β -catenina per un mecanisme diferent segons si es troba en forma processada o en forma d'holoproteïna (no processada). A partir d'aquí es deriven altres conclusions més específiques:

- 1) La PS1 processada interacciona amb l'E-cadherina i la desestabilitza. És a dir, l'E-cadherina és processada per l'acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1p en el domini transmembrana. Com a conseqüència es genera un fragment anomenat E-cadh/CTF2, el qual correspon al domini intracel·lular de l'E-cadherina. Per tant, en presència de la PS1p hi ha una disminució dels nivells d'E-cadherina sencera.
- 2) La p120-catenina competeix amb la PS1 processada per unir-se a l'E-cadherina i per tant, regula l'estabilitat d'aquesta cadherina.
- 3) L'efecte inhibidor de la PS1 processada sobre l'activitat transcripcional del complex Tcf-4· β -catenina, és degut als fragments E-cadh/CTF2 i N-cadh/CTF2 generats per acció de l'activitat γ -secretasa de la PS1. Aquests fragments interaccionen amb el coactivador transcripcional CBP i afavoreixen la seva degradació.
- 4) La PS1 no processada no interacciona amb l'E-cadherina. Per aquest motiu, la forma no processada de la PS1 no modifica l'estabilitat d'aquesta cadherina.
- 5) La PS1 no processada interacciona tant amb la β -catenina com amb la placoglobina pels dominis armadillo. Tot i l'elevada homologia entre aquests dominis, la unió té lloc per regions diferents; amb la β -catenina té lloc per les últimes sis repeticions, mentre que la placoglobina utilitza les sis primeres repeticions armadillo. Per tant, l'especificitat de la interacció amb la PS1np ve donada per les diferències existents en els extrems terminals de la β -catenina i de la placoglobina.
- 6) Aquestes dues interaccions, β -catenina·PS1np i placoglobina·PS1np també estan regulades per la fosforilació en tirosines específiques. La fosforilació de la Tyr654 de la β -catenina inhibeix la interacció amb la PS1np, mentre

que, la fosforilació de la tirosina equivalent en la placoglobina (Tyr643) la facilita.

- 7) La placoglobina és la medidora de la interacció entre la PS1 no processada i el Tcf-4.

- 8) La PS1 no processada quan interacciona amb la placoglobina provoca un canvi conformacional dels extrems amino i carboxiterminals d'aquesta catenina. Degut a aquest canvi conformacional augmenta l'afinitat entre la placoglobina i el Tcf-4. Aquesta interacció (PS1np·placoglobina· β -catenina) té lloc en un compartiment extranuclear, retenint el Tcf-4 fora del nucli. Com a conseqüència hi ha una menor formació nuclear del complex Tcf-4· β -catenina i una disminució de l'activitat transcripcional depenent d'aquest complex.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNiques RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ DELS ÀCIDS NUCLEICS

1.1. Tècniques relacionades amb la manipulació del DNA

1.1.1. Preparació de bactèries competents i transformació

La soca utilitzada durant la realització d'aquest treball va ser la DH5 α de *Escherichia coli*. Aquesta soca es caracteritza per ser deficient d'endonucleases (*endA*), fet que augmenta el rendiment de la minipreparació de DNA i també per ser deficient en recombinació (*recA*) i així augmentar l'estabilitat del nostre insert.

➤ Preparació de cèl·lules competents

- Es va créixer una única colònia de *E.coli* DH5 α procedent d'una estria (LB-agar) en 5 mL de LB durant 8 h a 37°C.
- A continuació, es va diluir 1/50 en SOB acabat de preparar i es va créixer a 18°C fins a una OD₆₀₀=0.6.
- Després es va deixar 10 min en gel i seguidament es va centrifugar suaument a 2.500 xg durant 10 min a 4°C.
- Es va decantar el medi i el pellet es va resuspendre amb 80 mL de TB fresc.
- Es va centrifugar novament a 2.500 xg, 10 min a 4°C i es va resuspendre el pellet amb 20 mL de TB fresc.
- Es va afegir DMSO a una concentració final del 7%.
- Després de mantenir-les 10 min en gel es van aliquotar, congelar amb nitrogen líquid i guardar a -80°C.

➤ Transformació

- Es va barrejar 100 μ l de DH5 α competents (acabades de preparar o descongelades lentament a 4°C) amb el DNA.
- Es va incubar la barreja de DNA-cèl·lules durant 30 min en gel.

- Seguidament es va procedir a fer el xoc tèrmic posant la barreja 90 segons a 42°C, seguit de 90 segons a 4°C.
- Després es va afegir 0,9 mL de LB i es va incubar 1 hora a 37°C amb agitació. En aquest pas LB és sense ampil·lina per permetre que els bacteris transformats poguessin desenvolupar la resistència a l'antibiòtic que està codificada en el vector.
- Es va centrifugar a 1500 xg durant 5 min per descartar part del volum del sobrenedant. Uns 100 µL de bacteris es van sembrar en una placa de LB-agar amb ampil·lina i es va incubar durant 16 h a 37°C.

1.1.2. Aïllament del DNA plasmídic

A partir de 5 ml d'un cultiu líquid saturat de bacteris, es pot aïllar el seu DNA plasmídic per ser digerit, subclonat, transformat o transfectat. Es va utilitzar el *kit* comercial de *minipreps* de Promega i es va seguir el seu protocol basat en el mètode de la lisi alcalina.

1.1.3. Anàlisi del DNA en gels d'agarosa

L'anàlisi, la identificació i la separació de fragments de DNA es va realitzar mitjançant electroforesi convencional en gels d'agarosa en condicions no desnaturalitzants. Generalment es va utilitzar una concentració d'agarosa del 0.8-2% depenent de la mida dels fragments de DNA a estudiar. Es va utilitzar TAE 1x com a tampó d'electroforesi i la detecció del DNA es va realitzar mitjançant la tinció amb bromur d'etidi (BrEt) afegint-lo al gel (0.25-0.5 µg/ml). L'estimació de la mida dels fragments de DNA a estudiar es va realitzar a partir una comparació amb el marcador de pes molecular conegut de DNA del fag λ digerit amb Hind III. Per la purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa (veure apartat 1.1.4 dels Material i Mètodes) el gel es va tenyir posteriorment amb una solució de TAE 1x que contenia BrEt (0.5 µg/ml). A continuació el gel es va posar sobre una font de llum UV i l'emissió de llum es va captar amb una càmera fotogràfica o de vídeo.

1.1.4. Construcció de plàsmids

Moltes de les construccions utilitzades en aquest treball es van realitzar mitjançant el subclonatge d'un fragment de DNA en un vector plasmídic.

➤ **Preparació del vector**

Digestió amb enzims de restricció

Es van digerir 2-3 µg de DNA en un volum final de 20-50 µl. La quantitat d'enzim, el tampó a utilitzar, la temperatura i el temps de reacció van ser a cada cas els especificats pel fabricant (New England Biolabs).

Desfosforilació del vector

La desfosforilació es realitza quan es digereix el vector amb un sol enzim de restricció, per evitar que el vector linealitzat es recircularitzi. Es va afegir 0.5 unitats de fosfatasa alcalina d'intestí de vaca (Biolabs, New England) per µg de DNA i es va incubar durant 1 hora a 37°C. Posteriorment es va inactivar la fosfatasa incubant 15 minuts a 70-75 °C. Es va aïllar el DNA de la mescla utilitzant el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham) seguint el protocol del fabricant. El DNA es va resuspendre en TE.

➤ **Preparació de l'insert**

A. Mitjançant enzims de restricció

Digestió amb enzims de restricció

Es van seguir els mateixos passos que per la digestió del vector. Però en aquest cas es van digerir 2-5 µg de DNA en un volum final de 20-50 µl. Els productes de digestió es van resoldre en un gel d'agarosa per ser purificats posteriorment.

Generació d'extrems roms: reomplert amb la polimerasa *Klenow*

El DNA procedent de la digestió (2-5 µg) es va tractar amb 2 unitats de Klenow per µg de DNA i 25 µM de dNTPs a 37°C durant 1 hora en un volum final de 50 µl. Finalment el DNA es va purificar utilitzant el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham).

Purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa

La banda corresponent al fragment d'interès es va retallar del gel d'agarosa i es va aïllar seguint les instruccions del kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham).

B. Mitjançant amplificació per PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es va realitzar generalment en un volum final de 50 μ l. Es va barrejar 10-50 ng de DNA motlle amb tampó de reacció 1x, 1mM MgCl₂, 10 mM de dNTPs (Invitrogen), 0.3 μ M de cada un dels oligonucleòtids (dissenyats perquè hibridin al principi i al final del fragment que volem amplificar), 1-2.5 unitats de la polimerasa *Pfx* (Invitrogen) i aigua autoclavada fins als 50 μ l.

La PCR es va dur a terme en un termociclador (Perklin-Elmer) i les condicions de la reacció van ser:

- 95°C durant 3 minuts.
- Desnaturalització: 95°C durant 15 segons per separar les dues cadenes de DNA.
- Anellament: 38-60°C (segons la temperatura dels oligonucleòtids) durant 30 segons per permetre la unió dels oligonucleòtids (o primers) a la cadena motlle.
- Elongació: 68°C, però en aquest cas el temps depèn de la longitud del fragment a amplificar. La *Pfx* amplifica a una velocitat de 1 Kb/min. Els passos 1, 2 i 3 es van repetir durant 20-25 cicles per obtenir l'amplificació exponencial del DNA diana.
- Cicle d'extensió final a 68°C durant 2 minuts per permetre l'elongació de qualsevol fragment que pugui no estar acabat de sintetitzar.

C. Mitjançant amplificació per RT-PCR

Per la realització d'algunes construccions va ser necessari l'amplificació de fragments de DNA a partir del RNA. Es va utilitzar el "SuperscriptTM one-step RT-PCR System" (Life Technologies) (veure apartat 1.2.1 dels Materials i mètodes).

➤ Lligació

Una vegada purificats el vector i l'insert, ambdós es troben linealitzats i amb els extrems compatibles per ser lligats. Es va barrejar una relació molar vector:insert de 1:3 si els extrems generats pels enzims de restricció eren cohesius. Si els extrems del vector i insert eren roms, es va augmentar la relació molar vector:insert de 1:10. La reacció es va dur a terme en un volum final de 10 μ l, afegint 1 unitat de T4 DNA lligasa (Roche) en un medi que contenia tampó de lligació (amb 1 mM d'ATP). Es va incubar tota la nit a 16°C.

1.1.5. Mutagènesi dirigida

Altres plàsmids utilitzats en aquest treball es van generar per mutagènesi dirigida amb la finalitat de generar mutants puntuals d'un aminoàcid. Es va fer servir el kit comercial *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) seguint les instruccions del protocol del kit. Tots els mutants que es van obtenir amb aquest mètode van ser comprovats per seqüenciació.

En la següent taula (**Taula 5**) es mostren els mutants puntuals que s'han utilitzat per la realització d'aquest treball i també els oligonucleòtids que es van emprar.

Mutació	Oligonucleòtids utilitzats (5'-3')
β -catenina Tyr-142→Glu	TTGATTAAC GAG CAGGATGAC
β -catenina Tyr-654→Glu	GGCGTGGCAAC GAAG CAGCTGCTGCTGTCC
Placoglobina Tyr-133→Glu	CATCTCATCAAC GAAC CAGGACGATGCC
Placoglobina Tyr-549→Glu	GGCACTGCCACCC GAAG CTGCTGCCGTC
Placoglobina Tyr-643→Glu	ACACAGCAGCCC GAAAC GGATGGTGTG
Tcf-4 Ser-60→Glu	TCAAACAGCTCC GAAG ATTCGAGGCGGA

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats per la generació dels mutants puntuals.

Es va hibridar els oligonucleòtids que tenien la mutació desitjada amb el DNA de doble cadena (en forma de supercoil) i desnaturalitzat de les formes *wild type* de β -catenina, placoglobina i Tcf-4 clonades a pGEX. A continuació es va fer una PCR obtenint un nou vector, de doble cadena, que tenia el gen d'interès alterat en les bases adequades. Per eliminar de la barreja el vector parental es va afegir *Dpn I*, enzim de restricció que digereix el DNA metilat i hemimetilat. El nou vector generat *in vitro*, al no presentar cap tipus de metilació, no va ser digerit.

1.1.6. Seqüenciació del DNA

Es va utilitzar el *dRhodamine terminator cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer) i uns oligonucleòtids pròxims a la mutació a analitzar (màxim a 500 bp de distància).

1.2. Tècniques relacionades amb la manipulació del RNA

Per l'obtenció de RNA total purificat es va fer una extracció de RNA utilitzant el *GenElute™ Mammalian Total RNA kit* (Sigma).

1.2.1. RT-PCR

Per la realització d'algunes construccions va ser necessari l'amplificació de fragments de DNA a partir del RNA. Es va utilitzar el "*Superscript™ one-step RT-PCR System*" (Life Technologies). A partir de 0.5 µg de RNA total de cèl·lules NIH-3T3, es va afegir al medi un parell d'oligonucleòtids els quals hibriden al principi i al final del fragment a amplificar, reactiu per RT-PCR el qual conté els dNTPs, aigua autoclavada i tractada amb llum UV (per provocar la dimerització de timidines d'un possible DNA contaminant i evitar que sigui amplificat), la Transcriptasa reversa (RT) i la DNA polimerasa Taq. Les reaccions de la RT-PCR es van realitzar en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) i les condicions van ser les següents:

- Transcripció reversa: 50°C, temperatura a la qual la RT és activa i retrotranscriu el RNA a DNA, durant 30 minuts.
- 94°C durant 3 minuts per provocar la separació de les cadenes de DNA i inactivar la RT.
- 94°C durant 15 segons, també per separar les dues cadenes de DNA.
- Anellament: 52.5°C durant 30 segons per permetre la hibridació entre el DNA i els oligonucleòtids.
- Elongació: 72°C amb un temps variable segons la mida del fragment a amplificar. En aquest cas la polimerasa Taq amplifica el DNA a una velocitat de 1 Kb/min. Els passos 3, 4 i 5 es van repetir durant 40 cicles per aconseguir l'amplificació exponencial del DNA.
- Cicle d'extensió final a 72°C durant 4 minuts.

1.2.2. RT-PCR semiquantitativa

Tots els anàlisis de RT-PCR semiquantitativa es van realitzar a partir de 300 ng de RNA total purificat i utilitzant el kit *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen).

Els parells d'oligonucleòtids (sense/antisense) i els números d'accés al *GenBank™* van ser els següents:

Nom del gen	Oligonucleòtids (sense/antisense)	Núm. d'accés GenBank
hsE-cadherina	5'-TTCCTCCCAATACATCTCCCTCACAGCAG-3' 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAATCAGA-3'	AB025106
HPRT	5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3' 5'-TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT-3'	BC083145

Taula 6. Oligonucleòtids utilitzats per la realització de la RT-PCR semiquantitativa i quantitativa.

1.2.3. RealTime-PCR (quantitativa)

Tots els anàlisis de RT-PCR quantitativa es van realitzar a partir de 300 ng de RNA total purificat i utilitzant el kit *Quantitect[®] SYBR[®] Green RT-PCR* (Quiagen).

La RT-PCR i l'obtenció de les dades es va realitzar amb un ABI PRISM 7900HT. Totes les quantificacions es van normalitzar amb controls interns de HPRT. El valor de quantitat relativa per a cada gen analitzat es va expressar com a $2^{-(Ct-Cc)}$ (Ct i Cc són les mitges de les diferències dels triplicats dels cicles obtinguts després de normalitzar amb HPRT). Els parells d'oligonucleòtids (sense/antisense) utilitzats van ser els mateixos que per la RT-PCR semiquantitativa.

2. TÈCNIQUES RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES

2.1. Extracció o purificació de proteïnes

2.1.1. Expressió i purificació de proteïnes recombinants en *E.coli*

Per l'expressió i purificació de les proteïnes de fusió en *E.coli*, es va utilitzar uns vectors d'expressió anomenats pGEX (Amersham, veure **Figura 65**), els quals permeten generar una fusió aminoterminal de la proteïna d'interès de la proteïna *glutathione-S-transferasa* (GST). A més contenen un promotor induïble per isopropil- β -D-tiogalactòsid (IPTG).

Una vegada generades aquestes construccions es van transformar en cèl·lules competents DH5 α i es va procedir a la preparació del cultiu cel·lular. Un petit volum d'aquest cultiu es va créixer fins a la saturació en LB amb ampicil·lina, després es va

diluir amb 50% en glicerol i es va guardar a -80°C . La purificació es va realitzar mitjançant una cromatografia d'afinitat amb la resina *Glutathione-SepharoseTM4B* (Amersham).

Durant aquest treball es van expressar i purificar diferents proteïnes de fusió a GST. Per totes elles es va seguir bàsicament el mateix protocol variant únicament, en alguns casos, les temperatures i temps d'inducció depenent de la solubilitat i de la tendència a la degradació de les diferents proteïnes de fusió; els volums del cultiu bacterià utilitzat, en funció dels nivells d'expressió i del rendiment de la purificació de cada proteïna i en funció de les quantitats a utilitzar en cada experiment. La unió, els rentats i l'elució de la proteïna de fusió (quan va ser necessari) de la resina es va realitzar seguint un mètode en *batch*.

➤ **Cultiu i preparació de l'extracte cel·lular**

- Una petita alíquota de stock de -80°C es va créixer tota la nit a 37°C amb agitació (220 rpm) en 20 ml de LB-ampicil·lina (125 mg/L).
- A continuació es va diluir 1:10 en LB-ampicil·lina acabada de preparar i es va mantenir en agitació (220 rpm) a 37°C fins arribar a una $\text{OD}_{600}=0.6-0.8$ (aproximadament 1-1.5 hores) indicant que el cultiu estava en la fase de creixement exponencial.
- Es va afegir IPTG (a una concentració final de 0.1 mM) i es van mantenir les condicions de creixement durant 2 hores més.
- Es van centrifugar les cèl·lules (8000 rpm, 4°C , 10 min.)

A. Extracte cel·lular de proteïnes de fusió de fàcil solubilització (β -catenina, p120-catenina i Tcf-4)

- Després de la centrifugació el pellet es va resuspendre en PBS 1x.
- A continuació, es van lisar els bacteris sotmetent la mescla a sonicació durant 15 segons en petites alíquotes.
- Es va afegir Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final de l' 1% per ajudar a solubilitzar les proteïnes de fusió.
- Es va centrifugar (10000 rpm, 4°C , 10 min.) i es va recollir el sobrenedant. El pellet es va descartar perquè conté els fragments de membrana i altres restes cel·lulars.

B. Extracte cel·lular de proteïnes recombinants de difícil solubilització (placoglobina)

- En aquest cas el pellet es va resuspendre amb 10 mL de STE complementat amb liozozim.
- Es va deixar 15 minuts en gel i seguidament es va afegir DTT (ditiotreitòl) a una concentració final de 5mM.
- A continuació es va afegir el Sarcosil a una concentració final del 1%.
- Seguidament, es van lisar els bacteris sotmetent la mescla a sonicació durant 15 segons en petites alíquotes (aproximadament 500 µl).
- Es van ajuntar totes les alíquotes i es va afegir Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final de l' 1% per ajudar a solubilitzar les proteïnes de fusió.
- Es va vortexar durant 1 minut i centrifugar a 11000 rpm, 4°C durant 20 min.
- Es va recuperar el sobrenedant, es va afegir Tritó X-100 (Sigma) a una concentració final del 3% i es va vortexar durant 2 minuts.

➤ Unió de la proteïna de fusió a Glutathione-Sepharosa

- Es va agafar 250 µl (200 µl de resina efectiva) de la barreja de Glutathione-Sepharosa (subministrada per la casa Amersham al 80% en etanol) i es va centrifugar (600 xg, 5 min., T^a ambient) i eliminar el sobrenedant. Aquesta sepharosa té unida glutatió i així permet la unió específica de la GST. D'aquesta manera, en un solt pas de cromatografia, la proteïna de fusió amb GST es retinguda, mentre que la resta de proteïnes són descartades.
- La resina es va centrifugar i rentar amb PBS 1x tres vegades. Finalment es va resuspendre amb 200 µl de PBS 1x.
- A continuació es va afegir a la resina els 10 ml d'extracte bacterià soluble i es va incubar durant 1 hora a T^a ambient en un agitador orbital.
- Es va centrifugar (600 xg, 5 min., T^a ambient) i es va descartar el sobrenedant. La resina, que portava unida la nostra proteïna d'interès, es va rentar 3 vegades amb PBS 1x.

➤ Aïllament de la proteïna**A. Mitjançant l'elució de la proteïna unida a GST**

- Es va incubar la resina amb 10 mM de glutatió reduït (GEB) (Sigma) durant 20 minuts a T^a ambient. En aquest pas es va aconseguir separar la proteïna de fusió unida a GST de la Glutathione-Sepharose (ja que la GST té més

afinitat pel glutatió reduït de la fase mòbil que pel glutatió oxidat immobilitzat en la resina).

- Es va centrifugar (600 xg, 5 min., T^a ambient) i recuperar el sobrenedant.
- La proteïna obtinguda es va diluir al 50% en glicerol, dividir en alíquotes i es va conservar a -20°C.

B. Mitjançant un tall entre la GST i la proteïna recombinant

- La proteïna unida a la resina es va incubar amb tampó de diàlisi i es va afegir 1 unitat de PreScission (PS) per cada 100 µg de proteïna de fusió.
- Es va incubar a 4°C durant 4-16 hores amb agitació.
- Es va centrifugar (600 xg, 5 min., T^a ambient) i el sobrenedant es va guardar a -20°C en 50% de glicerol.

El rendiment de la purificació es va comprovar analitzant en un gel de SDS-PAGE alíquotes de la proteïna purificada i també alíquotes separades durant el procés de purificació de la proteïna (inducció, solubilització). La visualització de la proteïna es va realitzar mitjançant la tinció del gel amb blau de *Coomassie* (20 minuts en solució de tenyir i un parell d'hores amb solució de destenyir, *destainer*). La quantitat de proteïna obtinguda es va estimar comparant la intensitat de les bandes amb quantitats conegudes d'albumina de sèrum boví (BSA), analitzades en paral·lel (en el mateix gel) amb la proteïna.

Aquestes condicions estàndards van ser aplicades amb èxit sobre totes les proteïnes clonades en els vectors pGEX-6P, obtenint en cultius de volums entre 20-200 mL un rendiment de 0.1-2 µg de proteïna/ mL de cultiu.

2.1.2. Obtenció de proteïnes a partir cultius cel·lulars

Les cèl·lules cultivades en el laboratori es van sotmetre a un procés de lisis per l'obtenció de proteïnes cel·lulars utilitzades en experiments posteriors. El mètode utilitzat en la lisis es explica en l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes.

2.2. Tècniques electroforètiques per l'estudi de proteïnes

2.2.1. Electroforesi SDS-PAGE (Mètode de Laemmli)

En aquest treball es va utilitzar els sistemes de Mini-Protean II i Mini-Protean III (Bio-Rad) per l'electroforesi monodimensional en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). Es van utilitzar gels de 1.5 mm de gruixut amb un percentatge d'acrilamida (en el gel separador) entre el 8 i el 16.5 % segons el pes molecular dels fragments proteics a estudiar. En canvi, en el gel concentrador la concentració d'acrilamida era del 4%. En tots els casos es va mantenir una relació acrilamida:bisacrilamida de 37.5:1.

Per la preparació de les mostres se'ls va afegir tampó de càrrega Laemmli 5x (veure l'apartat 4 dels Materials i mètodes) i es van bullir entre 40 segons i 4 minuts.

Els gels es van córrer a voltatge constant durant 1-2 hores i les mostres es van visualitzar mitjançant la tinció *Coomassie* com ja s'ha explicat anteriorment.

El marcador de pes molecular utilitzat va ser el Kaleidoscope (Bio-Rad).

2.2.2. Electrotransferència de proteïnes. Western blot.

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (0.45 µm Protran, Schleicher & Schuell) mitjançant electrotransferència en un sistema humit, utilitzant el sistema Mini Trans-blot (Bio-Rad).

Generalment la transferència es va realitzar en fred i amb agitació a un amperatge constant de 400 mA durant 90 minuts. Una vegada finalitzada la transferència, es va comprovar que les proteïnes havien estat transferides tenyint les membranes amb vermell Ponceau (1-2 minuts) i es van rentar amb H₂O per eliminar l'excés de colorant.

2.2.3. Immunodetecció

La detecció de les proteïnes d'interès es va dur a terme mitjançant la hibridació seqüencial de la membrana amb un anticòs primari específic per la proteïna (veure la **Taula 7**) i posteriorment amb un anticòs secundari conjugat amb HRP (peroxidasa de rave):

- Es va bloquejar la membrana amb 1% de BSA en TBS-T durant 1 hora a T^a ambient amb agitació o durant 16 hores a 4°C.

- A continuació, es va incubar la membrana de nitrocel·lulosa amb la dilució adequada descrita pel fabricant de l'anticòs primari en TBS-T amb 0.1% de BSA durant 1-4 hores a T^a ambient i amb agitació.
- Es va rentar la membrana tres vegades durant 10 minuts amb TBS-T per eliminar l'excés d'anticòs primari.
- Es va incubar amb l'anticòs secundari, anti IgG, diluït en TBS-T amb 0.1% de BSA durant 1-1.5 h a T^a ambient i amb agitació.
- Després es va rentar la membrana tres vegades durant 10 minuts per eliminar l'excés d'anticòs secundari.
- L'anticòs es va detectar mitjançant un sistema quimioluminiscent, utilitzant el kit comercial SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) i pel·lícules fotogràfiques Kodak X-Omat (Sigma), seguint les instruccions del fabricant.

En alguns casos, una vegada revelada, la membrana de nitrocel·lulosa es va estripar submergint-la en *Stripping buffer* durant 30 minuts a 55°C. Posteriorment es va tornar a bloquejar i incubar amb altres anticossos.

Anticòs primari	Organisme	Epítip	Casa comercial
α -catenina, <i>clon 5</i>	ratolí	729-906 (final)	BD Transduction Labs
β -actina, <i>clon AC-15</i>	ratolí (líquid ascític)	N-terminal	Sigma
β -catenina, <i>clon 14</i>	ratolí	571-781(final)	BD Transduction Labs
c-Myc, <i>clon 9E10</i>	ratolí (líquid ascític)	C-terminal	BD Transduction Labs
E-cadherina, <i>clon 36</i>	ratolí	735-883(final)	BD Transduction Labs
Fosfo- β -catenina (Ser33/37/Thr41)	conill	Pser33/Pser37 PThr41	Cell Signaling
γ -catenina (Placoglobina), <i>clon15</i>	ratolí	553-738	BD Transduction Labs
GST, 27-4577	cabra	no caracteritzat	Amersham Pharmacia
N-cadherina, <i>clon 32</i>	ratolí	aa 802-819	BD Biosciences
p120-catenina, <i>clon 98</i>	ratolí	aa 790-911(final)	BD Transduction Labs
Presenilina 1 (Ab-2)	conill	aa 303-316	Calbiochem

Anticòs primari	Organisme	Epítop	Casa comercial
Presenilina 1 (N-terminal)	conill	aa 1-65	Calbiochem
Presenilina 1 (Loop Domain)	conill	aa 263-407	Calbiochem
Rho, clon 55	ratolí	aa 1-155	BD Transduction Labs
Tcf-4, clon 6H5-3	ratolí	aa 31-331	Upstate biotechnology
Tcf-4, clon N-20	cabra	N-terminal	Santa Cruz biotech.
Anticòs secundari	Organisme		Casa comercial
Immunopure Goat Anti-Mouse IgG-HRP	cabra		Pierce
Peroxidasa-conjugated Rabbit Anti-Goat IgGs	conill		Dako
Peroxidasa-conjugated Goat Anti-Rabbit IgGs	cabra		Dako

Taula 7. Llista detallada dels anticossos utilitzats.

2.3. Assaigs d'interacció proteïna-proteïna

En el desenvolupament d'aquest treball es van realitzar diferents assaigs d'interacció entre proteïnes que es poden classificar en tres grups:

Pull-down: incubació d'una proteïna recombinant amb extractes cel·lulars totals.

Assaig de purificació amb níquel-agarosa: expressió d'un gen en cèl·lules i purificació proteica posterior.

Coimmunoprecipitació: purificació selectiva d'una proteïna endògena d'un extracte cel·lular per analitzar la seva associació a diferents proteïnes cel·lulars d'interès.

2.3.1. Assaig de Pull-Down

Aquest tipus d'assaig es una aproximació més fisiològica a l'estudi de les interaccions que una proteïna estableix amb la resta de proteïnes cel·lulars. És a dir, la proteïna recombinant fusionada a un *epítop* (generalment fusionada a GST) s'incuba amb extractes cel·lulars. Els complexos formats es purifiquen per cromatografia d'afinitat i s'analitzen les proteïnes d'interès que hagin copurificat amb la proteïna recombinant. Aquest tipus d'assaigs es van utilitzar per comparar el comportament de proteïnes *wild type*, mutants puntuals i delecionats.

- Es van incubar entre 10-30 picomols de la proteïna d'interès unida a GST o de GST com a control amb 0.5-1.5 mg d'extractes cel·lulars totals (veure apartat 3.6 dels Materials i Mètodes) en un volum final de 200-250 μ l de tampó de binding, durant 40-45 minuts, a T^a ambient i agitació.
- Els complexos formats es van aïllar afegint 20 μ L de Glutathione-Sepharose 4B®, la qual té afinitat per la GST, i es van incubar 25 minuts a 25°C.
- Després es va rentar la reïna dues vegades amb 800 μ L de tampó de binding per eliminar les proteïnes cel·lulars no unides a la proteïna GST. Els complexos units a la reïna es van solubilitzar afegint tampó de càrrega d'electroforesi (5x) i les mostres es van bullir 40 segons.
- Els complexos solubilitzats es van analitzar per electroforesi de poliacrilamida, SDS-PAGE. Posteriorment el gel es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa per ser analitzada per Western blot amb els anticossos monoclonals o policlonals envers la proteïna desitjada en cada assaig.

2.3.2. Assaig de purificació amb níquel-agarosa

Un altre tipus d'experiment desenvolupat consisteix en la transfecció de diferents productes, clonats en el pcDNA3.1/His, en cèl·lules expressant així la proteïna d'interès amb una cua d'histidines. Aprofitant l'afinitat de les histidines per la unió al ió níquel, els complexos formats es van poder purificar cromatogràficament.

- 300-500 μ g d'extractes de la línia cel·lular SW480 es van incubar amb un volum final de 200 μ L de tampó de Lisis (veure apartat 4 dels Materials i mètodes) sense EDTA amb 60 μ L d'una suspensió al 50% (p/v) de níquel-NTA-agarosa® (Qiagen) durant 90 min a 4°C.
- Després es van fer dos rentats de la reïna amb 500 μ L de tampó de Lisi sense EDTA, més un rentat de tampó de Lisis sense EDTA amb un suplement de 30 mM Imidazol i 10-50 mM NaCl, per eliminar les unions inespecífiques a la níquel-agarosa. Les proteïnes unides a la reïna van ser solubilitzades en tampó de càrrega d'electroforesi i sotmeses a SDS-PAGE.

2.3.3. Co-immunoprecipitació

Es van immunoprecipitar les proteïnes endògenes o transfectades transitòriament d'extractes cel·lulars i es va analitzar l'associació a diferents proteïnes cel·lulars d'interès.

- Es va incubar de 300-500 µg d'extracte cel·lular total (preparats com es descriu en l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes) amb 4 µg/mL de l'anticòs corresponent durant 16 hores a 4°C i amb agitació.
- Després es va centrifugar breument a 12000 rpm per eliminar el material insoluble.
- El sobrenedant es va incubar durant 90 minuts a 4°C amb 40 µL (d'una solució al 50% p/v) de proteïna A-agarosa (Sigma).
- El material immunoprecipitat es va rentar dues vegades amb 800 µL de tampó de Lisis.
- Els complexos proteics es van eluir directament amb el tampó de càrrega d'electroforesi i van ser analitzats per Western blot.

2.4. Assaig d'interacció proteïna-DNA

Per dur a terme els assaigs d'interacció entre el Tcf-4 (proteïna) i el DNA es van dissenyar els oligonucleòtids corresponents a la zona del promotor de *c-myc* que té una alta afinitat pel Tcf-4 [185], i els oligonucleòtids corresponents al promotor sintètic TOP, el qual té tres seqüències d'unió de Tcf-4. Aquests oligonucleòtids (sens i antisens) es van sintetitzar marcant l'extrem 5' amb biotina per facilitar la seva purificació.

- Es van incubar 200 ng d'oligonucleòtid marcat amb 300 µg d'extracte total (preparats com es descriu en l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes) de cèl·lules SW480. Les incubacions es van realitzar en un volum final de 200 µL de tampó de *Binding d'extractes* (veure l'apartat 4) durant 45 minuts a 4°C amb agitació.
- Els complexos Tcf-4/DNA es van aïllar incubant 40 µL d'estreptavidina-agarosa (Sigma) durant 45 minuts a 4°C i amb agitació.
- A continuació es va rentar la reïna tres vegades amb 500 µL del tampó de *Binding d'extractes* per eliminar les proteïnes no unides.

- Els complexos proteïna/DNA formats es van eluir afegint tampó de càrrega d'electroforesi. Les mostres es van analitzar per SDS-PAGE i Western blot amb l'anticòs específic envers el Tcf-4.

3. CULTIUS CEL·LULARS

3.1. Línies cel·lulars utilitzades

Línia cel·lular	Origen	Característiques
IEC-18	Epiteli intestinal de rata	Línia immortalitzada, no tumorigènica.
MEF PS1PS2 wt	Embrions de ratolí	Fibroblast primaris embrionaris de ratolí.
MEF PS-/-	Embrions de ratolí	Fibroblast primaris embrionaris de ratolí, <i>knock-out</i> per la presenilina 1 i la presenilina 2.
Miapaca	Carcinoma pancreàtic humà	Presenta contactes cel·lulars poc definits i té una deficient expressió de E-cadherina.
RWP1	Carcinoma pancreàtic humà	Línia epitelial amb unions adherents ben definides.
SW480	Adenocarcinoma primari humà de colon	Presenta contactes cel·lulars poc definits i baixa expressió de E-cadherina. Hi ha poca β -catenina retinguda a la membrana i una alta activitat transcripcional mitjançada pel complex Tcf-4/ β -catenina.
SW620	Adenocarcinoma humà de colon	Línia epitelial amb poca β -catenina retinguda a la membrana i tenen una alta activitat transcripcional mitjançada pel complex Tcf-4/ β -catenina.

Taula 8. Línies cel·lulars utilitzades.

3.2. Condicions dels cultius cel·lulars

Les diferents línies cel·lulars es van mantenir en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Life Technologies, Inc.) amb un suplement del 10% de sèrum de fetus boví (FCS) (Biological Industries). A aquest medi també se li afegix piruvat sòdic, L-glutamina i penicil·lina/estreptavidina (Life Technologies, Inc.). Es van créixer a 37°C amb una atmosfera que conté un 5% de CO₂ i quan les cèl·lules van arribar a la

confluència adient van ser tractades amb Tripsina (Life Technologies, Inc.) i ressemerades.

3.3. Recompte de cèl·lules

Per determinar el nombre de cèl·lules presents en suspensió, es va recórrer a l'ajuda d'un microscopi òptic i una càmera de *Neubauer*, d'un volum conegut. Així, es van poder visualitzar i comptar les cèl·lules presents en un determinat volum de solució. L'adició de *Trypan Blue* (Sigma) a la barreja aplicada a la càmera de *Neubauer*, va permetre controlar la integritat i supervivència cel·lular, descartant sempre els cultius que presentaven tincions positives superiors al 5%.

3.4. Congelació i emmagatzematge

Per conservar les línies cel·lulars per un llarg període de temps, es van resuspendre uns 4-8 milions de cèl·lules en 900 μL de DMEM/10% FCS i es van posar en un criotub, el qual contenia 100 μL de dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma), a 0°C. Suaument es va homogeneïtzar la barreja a temperatura ambient. El criotub es va congelar en etapes successives passant varies hores a -20°C, -40°C, -80°C i finalment es van dipositar en el tanc de nitrogen líquid.

La descongelació de cèl·lules emmagatzemades en el tanc de nitrogen líquid es va dur a terme de forma immediata sotmetent els criotubs a un bany de 37°C fins gairebé la completa descongelació del seu contingut. Ràpidament es va diluir 10-20 vegades en DMEM/10%FCS i es va dur a terme un processament normal.

3.5. Transfeccions transitòries

Totes les transfeccions realitzades van ser de forma transitòria.

Es van solubilitzar, comptar i sembrar $2\text{-}5\cdot 10^4$ cèl·lules/cm² en plaques de diferent mida segons l'experiment. Les cèl·lules es van incubar entre 16-24 h fins aconseguir una confluència del 50-75%.

Seguint les instruccions del fabricant, es van barrejar uns 0,2 μg de DNA/cm² (del plàsmid adient), 2-5 μL de LipofectAMINE™ i Plus™ per μg de DNA en Opti-MEM®

(tots de Life Technologies). La barreja de transfecció es va afegir a les cèl·lules i es van incubar durant 4-5 h.

Una vegada transfectades, les cèl·lules es van reincubar amb DMEM/10% FCS durant unes 24-48 h per permetre l'expressió dels productes d'interès. Després d'aquest temps les cèl·lules van ser lisades per l'obtenció d'extractes cel·lulars o per la realització dels assaigs d'activitat transcripcional.

3.6. Preparació d'extractes cel·lulars

- Les cèl·lules es van rentar en PBS 1x fred per eliminar el medi de cultiu.
- A continuació es va afegir 1 ml de PBS 1x fred sobre la monocapa de cèl·lules i es van aixecar de la placa de forma mecànica amb l'ajuda d'una rasqueta.
- La suspensió de cèl·lules en PBS es va centrifugar (2500g, 5 min., 4°C) i es va eliminar el sobrenedant.
- El pellet de cèl·lules es va resuspendre en tampó de lisis (homogeneïtzant amb una xeringa d'insulina) i es va deixar 15 minuts en gel.
- Es va centrifugar (14000 rpm, 5 min., 4°C) i es va descartar el precipitat cel·lular.
- El sobrenedant es va quantificar amb el kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) basat en el mètode desenvolupat per Bradford (1976), i es va emmagatzemar a –20°C fins a un posterior ús.

3.7. Assaig d'activitat transcripcional

Per analitzar l'activitat transcripcional mitjançada per la β -catenina, diferents línies cel·lulars (30.000-50.000 cèl·lules/pou en una placa de 96 pous) van ser cotransfectades amb els plàsmids TOP-FLASH o LEF-1-pGL3 (50 ng), el pTK-*Renilla luciferase* (50-5 ng) i amb diferents proteïnes d'interès segons cada assaig (màxim 300 ng de DNA).

Els plàsmids TOP-FLASH tenen un promotor sintètic amb tres còpies de la seqüència d'unió del Tcf-4 al DNA, un promotor mínim de Fos, i a continuació (cap el 3') hi ha el gen de la luciferasa de *Firefly*.

Els plàsmids LEF-1-pGL3 tenen el fragment del promotor Lef-1 humà (-1874/+58) insertat en pGL3 [281].

Els plàsmid pTK-*Renilla* tenen el gen de la luciferasa de *Renilla* sota el control d'un promotor constitutivament actiu de la timidina quinasa.

48 h després de la cotransfecció, les cèl·lules es van lisar i es van exposar a diferents substrats, els quals són processats per cada una de les luciferases, seguint les instruccions del fabricant (*Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega).

L'activitat de les luciferases va ser seguida amb el luminòmetre FB-12 (Berthold Detection Systems). L'activitat relativa de la luciferasa de *Firefly* va ser normalitzada respecte a la de la luciferasa de *Renilla* en cada cas per evitar disparitat de resultats degut a la diferent eficiència de la transfecció entre mostres. Cada transfecció es va repetir quatre vegades i es va calcular la mitja i la desviació estàndard.

3.8. Preparació de les cèl·lules per fluorescència o immunofluorescència

Quan volem fer fluorescència o immunofluorescència les cèl·lules no es sembren en plaques sinó que es sembren sobre cubres. El protocol que es va seguir va ser el següent:

➤ **Preparació dels cubres** (aquests passos es van realitzar dins la campana de flux laminar; condicions estèrils).

- Es van agafar els cubres (3-4 cubres per condició de transfecció) i es van posar dins d'una placa de Petri que contenia etanol el 70% durant 5 minuts per tal d'esterilitzar-los.
- Es van rentar els cubres amb PBS 1x estèril dues vegades durant 5 minuts per eliminar les restes d'etanol i es van deixar assecar sobre una gassa estèril.
- Una vegada els cubres van ser secs, es van col·locar en plaques de 24 pous (1 cubre per pou) que contenia DMEM.
- Es van sembrar 50.000 cèl·lules per pou. El dia següent es van transfectar les cèl·lules seguint el protocol de plus-lipofectamina.

➤ **Fixació dels cubres per fluorescència** (no es necessari mantenir condicions estèrils).

24 hores postransfecció es van fixar les cèl·lules als cubres de la següent manera:

- Es van rentar els cubres un parell de vegades amb PBS 1x pH= 7.4 (aquest pH evita que les cèl·lules es desenganxin) durant 5 minuts.
- Una vegada rentats amb PBS es van posar 20 minuts a T^a ambient amb PFA 4% (paraformaldehyd).
- Es van fer un parell de rentats amb PBS 1x pH= 7.4 durant 5 minuts.
- Finalment es van fer dos rentats de 3 minuts amb aigua destil·lada.
- Quan els cubres van estar secs, es va posar una gota de moviol (medi de muntatge) sobre un portaobjectes i es va deixar caure el cubre poc a poc amb la cara que té les cèl·lules tocant el moviol.
- Es va deixar assecar durant 20 minuts i es van observar les mostres al microscopi confocal RM-IRE2 Leica. Les mostres fixades es poden guardar 15 dies a 4°C.

➤ **Fixació i permeabilització dels cubres per immunofluorescència** (no es necessari mantenir condicions estèrils).

48 hores postransfecció (o les hores que siguin més adients segons l'assaig) es van fixar les cèl·lules als cubres.

- Es van rentar els cubres un parell de vegades amb PBS 1x pH= 7.4 (aquest pH evita que les cèl·lules es desenganxin) durant 5 minuts.
- Una vegada rentats amb PBS es van posar 30 minuts a T^a ambient amb PFA 4% (paraformaldehyd).
- Es van fer un parell de rentats amb PBS 1x pH= 7.4 durant 5 minuts.
- A continuació es van permeabilitzar les cèl·lules amb 1% SDS durant 10 minuts molt exactes a T^a ambient.
- Es van rentar quatre vegades amb PBS 1x pH=7.4 durant 5 minuts per eliminar tot el SDS i evitar que interfereixi amb l'anticòs.
- Es van bloquejar els cubres amb PBS 1x, 0.1% saponina i 1% BSA durant una hora a T^a ambient.
- Es van fer les dilucions dels anticossos corresponents en TBS 3% BSA. Pel què fa la presenilina es va fer una dilució 1/25 i pel Tcf-4 una dilució 1/20. Es va preparar 20µl per cada cubre. La immunofluorescència que es presenta en aquest treball els dos anticossos es van poder posar a la vegada perquè tenien diferent anticòs secundari.
- En una placa de Petri gran es va posar parafilm al fons i es van dipositar les gotes de 20µl (tantes com cubres teníem).

- Es van agafar els cubres i es van posar amb la cara que tenien les cèl·lules tocant la gota. Es va deixar tota la nit a 4°C. Els cubres que servien de control del secundari (cubres que no s'incuben amb el primari i així restar el soroll de fons a la mostra) es van deixar tota la nit amb PBS 1x amb el 3% de BSA.
- Es van agafar els cubres mantenint les cèl·lules cap amunt i es van rentar 5 vegades amb PBS 1x durant 5 minuts.
- Es va fer una dilució 1/500 dels anticossos secundaris en PBS 1x. En el nostre cas vam fer servir l'anti-mouse conjugat amb *fluorescein isothiocyanate* (Dako) per detectar el Tcf-4, i l'anti-rabbit conjugat amb Alexa 488 (Molecular Probes) per detectar la PS1np. 20 µl del mix de secundaris es va posar en un parafilm net i es van posar a sobre els cubres i es van deixar una hora a T^a ambient.
- Es van agafar els cubres mantenint les cèl·lules cap amunt i es van rentar 5 vegades amb PBS durant 5 minuts.
- Es va posar una gota del medi de muntatge Fluoromont sobre el portaobjectes i es va deixar caure el cubre poc a poc amb la cara que té les cèl·lules tocant el Fluoromont.
- Es van observar les mostres al microscopi confocal TCS-SP2 Leica.

4. REACTIUS I TAMPONS UTILITZATS

Agarosa

Type I-A; Low EEO (Sigma)

Bromur d'etidi

BrEt 10 mg/ml en H₂O (Sigma)

BSA

Abúmina de serum boví (Sigma)

Cicloheximida

Cycloheximide ready made (Sigma)

Coomassie Blue

- 40 % Metanol (v/v)
- 10 % Àcid acètic (v/v)
- 0.1 % (p/v) Brilliant Blue R (Sigma) en H₂O

Destainer

- 40 % Metanol (v/v)
- 10 % Àcid acètic (v/v) en H₂O

DMSO

- Dimetilsulfòxid (Sigma)

Glutatió reduït (GEB)

- 50 mM Tris pH 8
- 20 mM glutatió reduït

IPTG

- IPTG (β -D-isopropil-tiogalactopiranosit) 100 mM en H₂O (Sigma)

L-685,458

- γ -secretase Inhibitor X (L-685,458) (Calbiochem)

LB (medi de cultiu Luria-Bertani)

- 10 gr/l triptona
- 5 gr/l llevat
- 5 gr NaCl
- Es va ajustar a pH 7 amb NaOH

Marcador de pes molecular de DNA

- 1 Kb *DNA ladder* (Biolabs)

Marcador de pes molecular de proteïnes

- Kaleidoscope (Bio-Rad)

MG132

- MG132 (Sigma)

PBS 10x (Tampó fosfat salí)

1.4 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂PO₄

pH 7.3

Plaques LB-Agar

Agar 1.5 % (w/v)

Ampicil·lina (125 mg/ml)

Pounceau

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

1 % Àcid acètic en H₂O

Sarcosil

Lauroylsarcosine (Sigma)

Dissolt amb tampó STE

SOB

2 % (w/v) triptona

0.5 % (w/v) llevat

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

pH 6.7-7.0

Stripping buffer

2 % (p/v) SDS (dodecilsulfat sòdic)

62.5 mM Tris

100 mM β-mercaptoetanol

pH 6.8

TAE 50x

250 mM Tris pH 8.5
50 mM acetat
100 mM EDTA (etilendiaminotetraacetat de sodi)

Tampó d'electroforesi

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

Tampó d'interacció *in vitro* de proteïnes (*Binding buffer*)

3 mM MgCl₂
50 mM Tris pH 7.8
1 mM EDTA i DTT
150 mM NaCl
0.1 % (p/v) Tritó X-100

Tampó de Binding d'extractes (interacció proteïna-DNA)

20 mM HEPES pH 7.6
150 mM KCl
3 mM MgCl₂
10% glicerol
0.3 mg/mL BSA

Tampó de càrrega d'electroforesi (Lammeli) 5x

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

Tampó de càrrega d'electroforesi de DNA 5x

0.25 % Bromofenol Blue (p/v)
40 % glicerol en H₂O

Tampó de diàlisi

50mM Tris-HCl

120 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

pH 8.3 (tampó de càrrega) o pH 7 (tampó de PreScission)

Tampó de Lisi (extractes cel·lulars)

25 mM Tris HCl pH 7.6

150 mM NaCl

1 mM EDTA (etilendiaminotetraacetat de sodi)

1% Digitonina

1 mM NaF

0.3 μ M Aprotinina

1 μ M Leupeptina

1 μ M Pepstatina

1mM Pefabloc

Tampó de transferència

20 mM Tris pH 8

150 mM glicina

20 % Metanol (v/v)

Tampó STE

10 mM Tris pH 8

150mM NaCl

1mM EDTA

mg/mL lisozim (Sigma)

TB

10 mM Pipes

55 mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

Es va ajustar a pH 6.7 abans de la incorporació del MnCl₂

TBS

25 mM Tris-HCl pH 7.5

136 mM NaCl

4 mM KCl

TBS-T

TBS + 0.1 % (p/v) Tween 20 (Bio-Rad)

TE

10 mM Tris-HCl pH 7.5

1 mM EDTA

5. PLÀSMIDS

En aquest apartat s'indiquen tots els plàsmids que es van utilitzar durant la realització d'aquest treball, i es descriu breument l'estratègia de clonatge d'aquells que es va dur a terme en el nostre laboratori.

5.1. Vectors d'expressió en procarïotes

Com a vehicle d'expressió de les diferents proteïnes recombinants es van utilitzar els vectors pGEX-6P, amb les seves tres pautes de lectura 1, 2 o 3 (Amersham-Pharmacia). Aquest tipus de vector permet expressar qualsevol producte clonat com a proteïna de fusió amb GST (Glutathione-S-transferasa). Les característiques principals d'aquests vectors són:

- Origen propi de replicació.
- Gen per la resistència a ampicil·lina (Amp^r).
- Gen codificant per la GST controlat pel promotor Tac (resultat de la fusió del promotor lac i Trp) que permet una alta expressió de forma induïble químicament amb IPTG.
- Una seqüència amb múltiples llocs de tall per enzims de restricció "polilinker" o MCS, a continuació del gen de la GST per facilitar el clonatge unidireccional del producte d'interès.

- Presència d'una seqüència específica entre la GST i la nostra proteïna, per la proteasa PreScission (PS) (Amersham-Pharmacia) i així poder separar la proteïna de la GST.

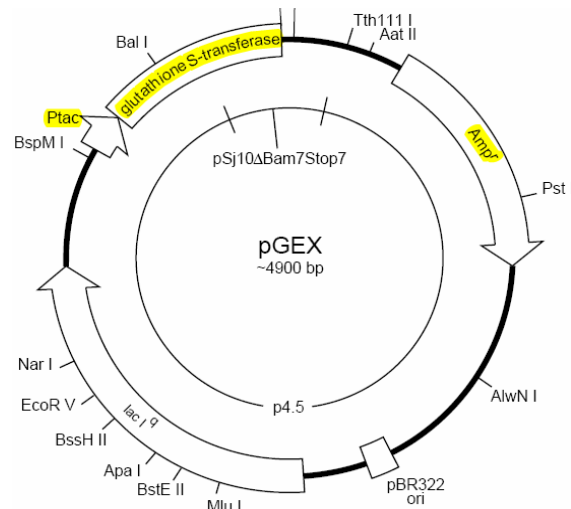


Figura 65. Vector d'expressió procariota.

Nom de la construcció	Origen/ obtenció de l' insert	Insertat en
A. β-catenina (aa 1-781)	cDNA cedit pel Dr. R. Kemler, digerit amb BamHI.	pGEX-6P-3 obert amb BamHI.
B. β-cateninaY142E	Per PCR amb oligonucleòtids que contenen la mutació.	
C. β-cateninaY654E	Per PCR amb oligonucleòtids que contenen la mutació.	
D. ΔN β-catenina (aa 120-781)	Digestió de A amb SacI i NotI, purificació de la banda de ≈660 pb.	pGEX-6P-3 arm (120-683) tallat amb SacI i NotI.
E. ΔC β-catenina (aa 1-683)	Digestió de A amb BamHI i SacI, purificació de la banda de ≈1750 pb.	pGEX-6P-3 arm (120-683) obert amb BamHI i SacI.
F. β-catenina armadillo (aa 120-683)	Per PCR a partir de A . Els primers tenien les dianes BamHI i XhoI. Purificació de la banda de ≈1689 pb.	pGEX-6P-3 obert amb BamHI i XhoI.
G. β-catenina armadillo (aa 120-683)Y654E	Per PCR amb oligonucleòtids que contenen la mutació.	
H. β-catenina 1-6 armadillo (aa 120-422)	Digestió de F amb BamHI i EcoRI, purificació de la banda de ≈ 906 pb.	pGEX-6P1 obert amb BamHI i EcoRI.
I. β-catenina 7-12 armadillo (aa 422-683)	Digestió de F amb EcoRI i EcoRV, purificació de la banda de ≈ 790 pb.	pGEX-6P2 obert amb EcoRI i EcoRV.
J. β-catenina 10-12 armadillo (aa 575-696)	Digestió de pGEX-β-catenina (aa 575-782) amb BglII i NotI. Reomplert amb la polimerasa Klenow i relligar.	

Nom de la construcció	Origen/ obtenció de l' insert	Insertat en
K. Placoglobina (aa 1-744)	pBKS-placoglobina cedit per Dr. A. Ben-Ze'ev. Digestió amb EcoRI i purificació de la banda de ≈ 3200 pb.	pGEX-6P2 obert amb EcoRI i desfosforilat.
L. Placoglobina Y133E	Per PCR amb oligonucleòtids que contenen la mutació.	
M. Placoglobina Y549E	Per PCR amb oligonucleòtids que contenen la mutació.	
N. Placoglobina Y643E	Per PCR amb oligonucleòtids que contenen la mutació.	
Q. ΔN placoglobina (aa 111-744)	Per PCR a partir de cDNA humà. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i XhoI. Es va purificar la banda de ≈ 1900 pb.	pGEX-6P2 obert amb BamHI i XhoI.
P. ΔC placoglobina (aa 1-672)	Per PCR a partir de cDNA humà. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i EcoRV. Es va purificar la banda de ≈ 2200 pb.	pGEX-6P3 obert amb BamHI i SmaI.
Q. Placoglobina armadillo (aa 111-672)	Per PCR a partir de K. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i EcoRV.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI.
R. Placoglobina 1-6 armadillo (aa 111-385)	Per PCR a partir de K. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i EcoRV.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI.
S. Placoglobina 7-12 armadillo (aa 380-672)	Per PCR a partir de K. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i EcoRV.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI.
T. cyto-E-cadherina (aa 732-883) "regió citosòlica"	Per PCR a partir de cDNA murí total. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i EcoRI.	pGEX-6P-3 obert amb BamHI i EcoRI.
U. cyto-N-cadherina (aa 746-906) "regió citosòlica"	Per RT-PCR a partir RNA total de ratolí. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i XhoI. Purificació de la banda de ≈ 500 pb.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i XhoI.
V. Tcf-4 (aa 1-597)	Per RT-PCR a partir RNA humà total. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i EcoRV.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i SmaI.
X. Tcf-4 (aa 1-110)	Per PCR a partir de V. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i XhoI.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i XhoI.
Y. Tcf-4 (aa 1-53)	Per PCR a partir de V. Els <i>primers</i> tenien les dianes BamHI i XhoI.	pGEX-6P-1 obert amb BamHI i XhoI.
Z. Tcf-4 (aa 51-110)	Per PCR a partir de V. Els <i>primers</i> tenien les dianes EcoRI i XhoI.	pGEX-6P-1 obert amb EcoRI i XhoI.
AA. p120-catenina-1 (aa 1-911)	Digestió del pcDNA-p120-catenina (1-911) amb EcoRI i NotI.	pGEX-6P-3 obert amb EcoRI i NotI.

Taula 9. Característiques de les construccions utilitzades.

5.2. Vectors d'expressió en eucariotes

5.2.1. pcDNA 3.1, pcDNA 3.1 His, pcDNA 3.1 Myc-His (Invitrogen)

Els vectors utilitzats per expressar les diferents proteïnes (tan les natives com els mutants puntuals) en eucariotes van ser la família dels pcDNA3.1. Les principals característiques són:

- Alt nivell d'expressió ja que tenen el promotor CMV.
- Permeten generar la proteïna d'interès fusionada amb diferents epítops: una cua d'histidines i l'epítop XpressTM (localitzats en l'extrem N-terminal de la nostra proteïna en el cas del pcDNA3.1/His), o l'epítop *Myc-His* (localitzat en l'extrem C-terminal en el cas del pcDNA3.1/*Myc-His*).
- La cua d'histidines permet una posterior purificació de la proteïna per cromatografia de níquel-agarosa (iò amb afinitat per l'histidina). Els epítops XpressTM i *Myc* són fàcilment detectables mitjançant un anticòs.

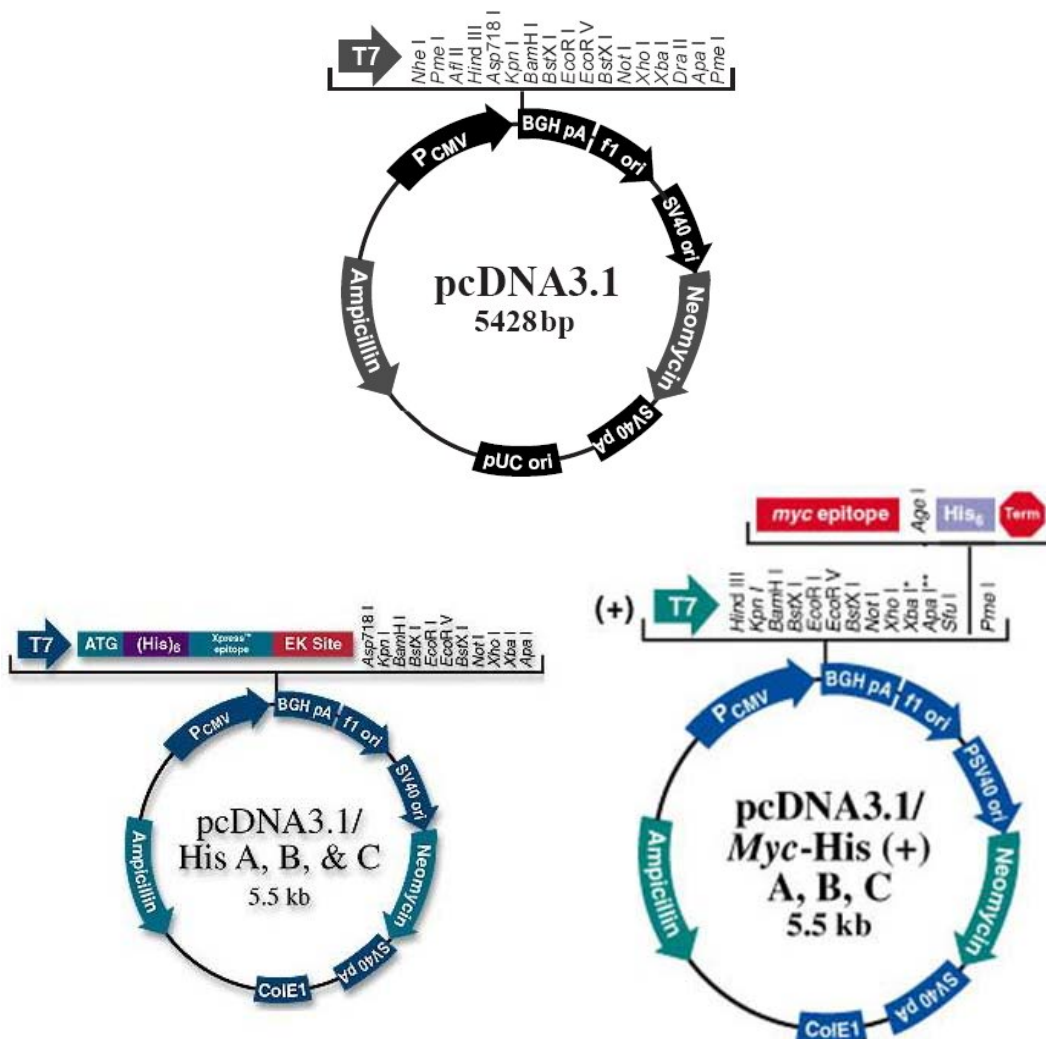


Figura 66. Vectors d'expressió en eucariotes.

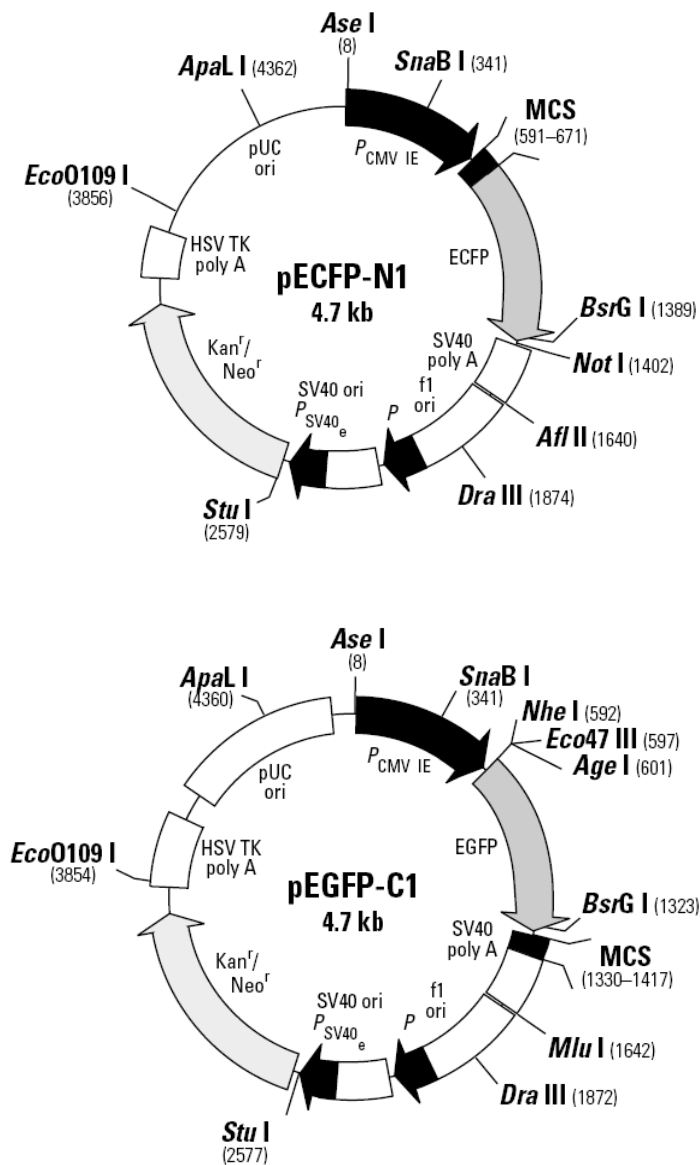
Nom de la construcció	Origen de l'insert	Insertat en
A. β -catenina (aa 1-781)	Digestió de pGEX- β -catenina amb BamHI.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI.
B. β cateninaY142E	Digestió de pGEX- β -cateninaY142E amb BamHI.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI.
C. β cateninaY654E	Digestió de pGEX- β -cateninaY654E amb BamHI.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI.
D. β cateninaY142E, Y654E	Digestió de pGEX- β -cateninaY142E, Y654E amb BamHI.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI.
E. Tcf-4 wt sencer (aa 1-597)	Digestió de pGEX-Tcf-4 amb BamHI i XhoI i es va purificar la banda de \cong 1800 pb.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI i XhoI.
F. Tcf-4 (aa 1-80)	Digestió de E amb BglII i SmaI. Es va purificar la banda de \cong 1100 pb.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BglII i EcoRV.
G. Tcf-4 S60E (aa 1-80)	Digestió de pcDNA3.1/HisC-Tcf-4 S60E amb BglII i SmaI. Es va purificar la banda de \cong 1100 pb.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BglII i EcoRV.
H. Placoglobina (aa 1-744)	Digestió de pGEX-placoglobina amb EcoRI. Purificació de la banda de \cong 3200 pb.	pcDNA3.1/His(A) obert amb EcoRI i desfosforilat.
I. Presenilina-1 His (aa 1-467)	Per RT-PCR a partir RNA total de ratolí. Els primers tenien les dianes BamHI i EcoRV. Purificació de la banda de \cong 1400 pb.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI i EcoRV.
J. Presenilina-1 Myc (aa 1-467)	Digestió de I amb BamHI i EcoRV. Purificació de la banda de \cong 1400 pb.	pcDNA3.1 Myc/aHis (A) amb BamHI i EcoRV.
K. hPS1 wt	Presenilina-1 humana. Cedit pel Dr. C. Saura.	pcDNA3.1 obert amb KpnI i BamHI.
L. cyto-N-cadherina (aa 746-906)	Digestió de pGEX-cyto-N-cadherina amb BamHI i XhoI. Purificació de la banda de \cong 500 pb.	pcDNA3.1 obert amb BamHI i XhoI.
M. p120-catenina-1 (aa 1-911)	CAS-1-pcDNA cedit per Dr. A. Reynolds, digerit amb EcoRI i KpnI. Reomplert amb la polimerasa Klenow.	pcDNA3.1/His obert amb EcoRV
N. RhoA	Digestió de pGEX-RhoA(K27T) amb BamHI i EcoRI. Purificació de la banda de \cong 700 pb.	pcDNA3.1/His(C) obert amb BamHI i EcoRI.

Taula 10. Relació de les construccions en pcDNA3.1.

5.2.2. Vectors pEGFP i pECFP

Aquests vectors permeten obtenir la proteïna d'interès fusionada amb GFP o CFP i així poder visualitzar la seva localització cel·lular mitjançant la utilització d'un microscopi de confocal.

Però també es poden fer servir pel seguiment de la proteïna en un Western blot ja que obtens la proteïna fusionada a un epítot (GFP o CFP).



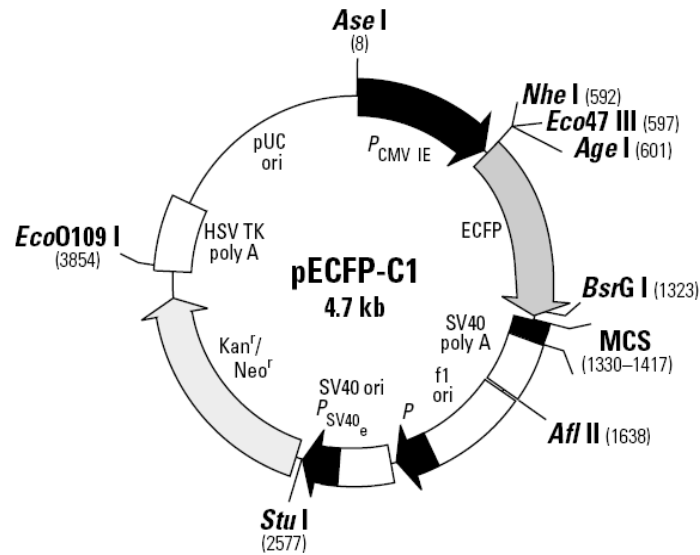


Figura 67. Vectors de fluorescència.

Nom de la construcció	Obtenció de l'insert	Insertat en
1. GFP-cyto-E-cadherina (aa 732-883) "regió citosòlica"	Digestió de pGEX-cyto-E-cadherina amb BamHI i EcoRI. Es va purificar la banda de ≈ 453 pb.	pEGFP-C1 obert amb BglII i EcoRI.
2. E-cadherina-CFP (aa 1-885)	pBATEM2 digerit amb BglII i HindIII.	pECFP-N1 obert amb BglII i HindIII.
3. CFP- β -catenina (aa 1-781)	Digestió de pGEX- β -catenina amb BamHI.	pECFP-C1 obert amb BamHI.

Taula 11. Construccions en GFP i CFP.

5.2.3. Altres

Nom de la construcció	Obtenció
vp16-Tcf-4	Cedit
pCMV-APC	Cedit
TOP-FLASH	Cedit
pTK-Renilla	Cedit
LEF-1-pGL3	Cedit

Taula 12. Construccions varies.

BIBLIOGRAFIA

1. Goedert, M. and Spillantini, M.G. **A century of Alzheimer's disease** (2006) *Science* **314**, 777-81.
2. Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E. and Sczufca, M. **Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study** (2005) *Lancet* **366**, 2112-7.
3. Cummings, J.L. and Cole, G. **Alzheimer disease** (2002) *Jama* **287**, 2335-8.
4. Velez-Pardo, C., Jimenez Del Rio, M. and Lopera, F. **Familial Alzheimer's disease: oxidative stress, beta-amyloid, presenilins, and cell death** (1998) *Gen Pharmacol* **31**, 675-81.
5. Stoothoff, W.H. and Johnson, G.V. **Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences** (2005) *Biochim Biophys Acta* **1739**, 280-97.
6. Mi, K. and Johnson, G.V. **The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease** (2006) *Curr Alzheimer Res* **3**, 449-63.
7. Selkoe, D.J. **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy** (2001) *Physiol Rev* **81**, 741-66.
8. Jarrett, J.T., Berger, E.P. and Lansbury, P.T., Jr. **The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease** (1993) *Biochemistry* **32**, 4693-7.
9. Zagorski, M.G., Yang, J., Shao, H., Ma, K., Zeng, H. and Hong, A. **Methodological and chemical factors affecting amyloid beta peptide amyloidogenicity** (1999) *Methods Enzymol* **309**, 189-204.
10. Tseng, B.P., Esler, W.P., Clish, C.B., Stimson, E.R., Ghilardi, J.R., Vinters, H.V., Mantyh, P.W., Lee, J.P. and Maggio, J.E. **Deposition of monomeric, not oligomeric, A β mediates growth of Alzheimer's disease amyloid plaques in human brain preparations** (1999) *Biochemistry* **38**, 10424-31.
11. Forloni, G., Lucca, E., Angeretti, N., Della Torre, P. and Salmona, M. **Amidation of beta-amyloid peptide strongly reduced the amyloidogenic activity without alteration of the neurotoxicity** (1997) *J Neurochem* **69**, 2048-54.
12. Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J. and Selkoe, D.J. **Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition** (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 552-7.
13. Stine, W.B., Jr., Dahlgren, K.N., Krafft, G.A. and LaDu, M.J. **In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis** (2003) *J Biol Chem* **278**, 11612-22.
14. Cruts, M. and Van Broeckhoven, C. **Presenilin mutations in Alzheimer's disease** (1998) *Hum Mutat* **11**, 183-90.

15. Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M. and Neve, R.L. **Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus** (1987) *Science* **235**, 880-4.
16. Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. and et al. **Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease** (1991) *Nature* **349**, 704-6.
17. Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E. and et al. **Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14** (1992) *Science* **258**, 668-71.
18. St George-Hyslop, P., Haines, J., Rogaev, E., Mortilla, M., Vaula, G., Pericak-Vance, M., Foncin, J.F., Montesi, M., Bruni, A., Sorbi, S. and et al. **Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14** (1992) *Nat Genet* **2**, 330-4.
19. Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. and et al. **Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease** (1995) *Nature* **375**, 754-60.
20. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K. and et al. **Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus** (1995) *Science* **269**, 973-7.
21. Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. and et al. **Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene** (1995) *Nature* **376**, 775-8.
22. Wolfe, M.S. **When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased A β ₄₂/A β ₄₀. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease** (2007) *EMBO Rep* **8**, 136-140.
23. Kowalska, A. **Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer's disease** (2004) *Pol J Pharmacol* **56**, 171-8.
24. Goate, A. **Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease** (2006) *J Alzheimers Dis* **9**, 341-7.
25. Crutch, S.J. and Warrington, E.K. **Partial knowledge of abstract words in patients with cortical degenerative conditions** (2006) *Neuropsychology* **20**, 482-9.
26. Rossor, M.N., Fox, N.C., Beck, J., Campbell, T.C. and Collinge, J. **Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation** (1996) *Lancet* **347**, 1560.

27. Helisalmi, S., Hiltunen, M., Mannermaa, A., Koivisto, A.M., Lehtovirta, M., Alafuzoff, I., Ryyanen, M. and Soininen, H. **Is the presenilin-1 E318G missense mutation a risk factor for Alzheimer's disease?** (2000) *Neurosci Lett* **278**, 65-8.
28. Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C.S., Laws, S.M., Gandy, S.E. and Martins, R.N. **The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?** (2004) *Pharmacol Res* **50**, 397-409.
29. Cruts, M., van Duijn, C.M., Backhovens, H., Van den Broeck, M., Wehnert, A., Serneels, S., Sherrington, R., Hutton, M., Hardy, J., St George-Hyslop, P.H., Hofman, A. and Van Broeckhoven, C. **Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease** (1998) *Hum Mol Genet* **7**, 43-51.
30. Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., Clark, R.F. and et al. **A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene** (1995) *Neuroreport* **7**, 297-301.
31. Tysoe, C., Whittaker, J., Xuereb, J., Cairns, N.J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Wilcock, G. and Rubinsztein, D.C. **A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early-onset Alzheimer disease** (1998) *Am J Hum Genet* **62**, 70-6.
32. Czech, C., Tremp, G. and Pradier, L. **Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms** (2000) *Prog Neurobiol* **60**, 363-84.
33. Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., Campion, D., Chi, H., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Rogaev, E.I., Lin, C., Liang, Y., Ikeda, M., Mar, L., Brice, A., Agid, Y., Percy, M.E., Clerget-Darpoux, F., Piacentini, S., Marcon, G., Nacmias, B., Amaducci, L., Frebourg, T., Lannfelt, L., Rommens, J.M. and St George-Hyslop, P.H. **Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant** (1996) *Hum Mol Genet* **5**, 985-8.
34. Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G. and Murri, L. **Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review** (2003) *Brain Res Bull* **61**, 1-24.
35. Mahley, R.W. and Rall, S.C., Jr. **Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein** (2000) *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**, 507-37.
36. Vance, J.E., Campenot, R.B. and Vance, D.E. **The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration** (2000) *Biochim Biophys Acta* **1486**, 84-96.
37. Blennow, K., de Leon, M.J. and Zetterberg, H. **Alzheimer's disease** (2006) *Lancet* **368**, 387-403.
38. Perez-Tur, J. **[Presenilins in the genesis of Alzheimer s disease]** (2001) *Rev Neurol* **33**, 967-72.

39. Boulianne, G.L., Livne-Bar, I., Humphreys, J.M., Liang, Y., Lin, C., Rogaeve, E. and St George-Hyslop, P. **Cloning and characterization of the Drosophila presenilin homologue** (1997) *Neuroreport* **8**, 1025-9.
40. Tsujimura, A., Yasojima, K. and Hashimoto-Gotoh, T. **Cloning of Xenopus presenilin-alpha and -beta cDNAs and their differential expression in oogenesis and embryogenesis** (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 392-6.
41. Levitan, D. and Greenwald, I. **Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a Caenorhabditis elegans S182 Alzheimer's disease gene** (1995) *Nature* **377**, 351-4.
42. Levitan, D., Doyle, T.G., Brousseau, D., Lee, M.K., Thinakaran, G., Slunt, H.H., Sisodia, S.S. and Greenwald, I. **Assessment of normal and mutant human presenilin function in Caenorhabditis elegans** (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14940-4.
43. Li, X. and Greenwald, I. **HOP-1, a Caenorhabditis elegans presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling** (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12204-9.
44. Brunkan, A.L. and Goate, A.M. **Presenilin function and gamma-secretase activity** (2005) *J Neurochem* **93**, 769-92.
45. Fraser, P.E., Yang, D.S., Yu, G., Levesque, L., Nishimura, M., Arawaka, S., Serpell, L.C., Rogaeve, E. and St George-Hyslop, P. **Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease** (2000) *Biochim Biophys Acta* **1502**, 1-15.
46. Newman, M., Musgrave, F.I. and Lardelli, M. **Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models** (2006) *Biochim Biophys Acta*.
47. Annaert, W.G., Levesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., George-Hyslop, P.S., Cordell, B., Fraser, P. and De Strooper, B. **Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons** (1999) *J Cell Biol* **147**, 277-94.
48. Lah, J.J. and Levey, A.I. **Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments** (2000) *Mol Cell Neurosci* **16**, 111-26.
49. Kim, S.H., Lah, J.J., Thinakaran, G., Levey, A. and Sisodia, S.S. **Subcellular localization of presenilins: association with a unique membrane pool in cultured cells** (2000) *Neurobiol Dis* **7**, 99-117.
50. Nowotny, P., Gorski, S.M., Han, S.W., Philips, K., Ray, W.J., Nowotny, V., Jones, C.J., Clark, R.F., Cagan, R.L. and Goate, A.M. **Posttranslational modification and plasma membrane localization of the Drosophila melanogaster presenilin** (2000) *Mol Cell Neurosci* **15**, 88-98.

51. Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H. and Haass, C. **Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane** (2002) *J Cell Biol* **158**, 551-61.
52. Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J. and Tonegawa, S. **Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice** (1997) *Cell* **89**, 629-39.
53. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. and Van Leuven, F. **Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein** (1998) *Nature* **391**, 387-90.
54. Conlon, R.A., Reaume, A.G. and Rossant, J. **Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites** (1995) *Development* **121**, 1533-45.
55. Davis, J.A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D.L., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S. and Wong, P.C. **An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos** (1998) *Neuron* **20**, 603-9.
56. Qian, S., Jiang, P., Guan, X.M., Singh, G., Trumbauer, M.E., Yu, H., Chen, H.Y., Van de Ploeg, L.H. and Zheng, H. **Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression** (1998) *Neuron* **20**, 611-7.
57. Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B.L., Kimberly, W.T., Seubert, P., Koo, E.H., Shen, J. and Selkoe, D.J. **Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi** (1998) *Biochemistry* **37**, 16465-71.
58. Wiltfang, J., Esselmann, H., Cupers, P., Neumann, M., Kretschmar, H., Beyermann, M., Schleuder, D., Jahn, H., Ruther, E., Kornhuber, J., Annaert, W., De Strooper, B. and Saftig, P. **Elevation of beta-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells** (2001) *J Biol Chem* **276**, 42645-57.
59. Palacino, J.J., Berechid, B.E., Alexander, P., Eckman, C., Younkin, S., Nye, J.S. and Wolozin, B. **Regulation of amyloid precursor protein processing by presenilin 1 (PS1) and PS2 in PS1 knockout cells** (2000) *J Biol Chem* **275**, 215-22.
60. Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L. and De Strooper, B. **Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells** (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 461-2.
61. Yu, H., Saura, C.A., Choi, S.Y., Sun, L.D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M.A., Younkin, S., Kandel, E.R., Kirkwood, A. and Shen, J. **APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice** (2001) *Neuron* **31**, 713-26.

62. Feng, R., Wang, H., Wang, J., Shrom, D., Zeng, X. and Tsien, J.Z. **Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2** (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8162-7.
63. Saura, C.A., Choi, S.Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher, R.J., 3rd, Kandel, E.R., Duff, K., Kirkwood, A. and Shen, J. **Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration** (2004) *Neuron* **42**, 23-36.
64. Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S. and Bernstein, A. **Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects** (1999) *Genes Dev* **13**, 2801-10.
65. Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., Baekelandt, V., Dressel, R., Cupers, P., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Van Leuven, F. and De Strooper, B. **Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency** (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11872-7.
66. Dewji, N.N. and Singer, S.J. **The seven-transmembrane spanning topography of the Alzheimer disease-related presenilin proteins in the plasma membranes of cultured cells** (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14025-30.
67. Dewji, N.N., Valdez, D. and Singer, S.J. **The presenilins turned inside out: implications for their structures and functions** (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1057-62.
68. Kim, J. and Schekman, R. **The ins and outs of presenilin 1 membrane topology** (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 905-6.
69. Laudon, H., Hansson, E.M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G. and Naslund, J. **A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1** (2005) *J Biol Chem* **280**, 35352-60.
70. Henricson, A., Kall, L. and Sonnhammer, E.L. **A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence** (2005) *Febs J* **272**, 2727-33.
71. Oh, Y.S. and Turner, R.J. **Evidence that the COOH terminus of human presenilin 1 is located in extracytoplasmic space** (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C576-81.
72. Li, X. and Greenwald, I. **Membrane topology of the C. elegans SEL-12 presenilin** (1996) *Neuron* **17**, 1015-21.
73. Li, X. and Greenwald, I. **Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for Caenorhabditis elegans and human presenilins** (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7109-14.

74. Doan, A., Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Podlisny, M., Selkoe, D.J., Seeger, M., Gandy, S.E., Price, D.L. and Sisodia, S.S. **Protein topology of presenilin 1** (1996) *Neuron* **17**, 1023-30.
75. Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A.I., Gandy, S.E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L. and Sisodia, S.S. **Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo** (1996) *Neuron* **17**, 181-90.
76. Li, Y.M., Xu, M., Lai, M.T., Huang, Q., Castro, J.L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduveilil, J.G., Register, R.B., Sardana, M.K., Shearman, M.S., Smith, A.L., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A. and Gardell, S.J. **Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1** (2000) *Nature* **405**, 689-94.
77. Thinakaran, G., Harris, C.L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H.H., Price, D.L., Borchelt, D.R. and Sisodia, S.S. **Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors** (1997) *J Biol Chem* **272**, 28415-22.
78. Thinakaran, G. and Parent, A.T. **Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease** (2004) *Pharmacol Res* **50**, 411-8.
79. De Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., George-Hyslop, P.S. and Van Leuven, F. **Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins** (1997) *J Biol Chem* **272**, 3590-8.
80. Saura, C.A., Tomita, T., Davenport, F., Harris, C.L., Iwatsubo, T. and Thinakaran, G. **Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing** (1999) *J Biol Chem* **274**, 13818-23.
81. Podlisny, M.B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E.H., Seubert, P., St George-Hyslop, P., Teplow, D.B. and Selkoe, D.J. **Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue** (1997) *Neurobiol Dis* **3**, 325-37.
82. Ratovitski, T., Slunt, H.H., Thinakaran, G., Price, D.L., Sisodia, S.S. and Borchelt, D.R. **Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin** (1997) *J Biol Chem* **272**, 24536-41.
83. Zhang, J., Kang, D.E., Xia, W., Okochi, M., Mori, H., Selkoe, D.J. and Koo, E.H. **Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells** (1998) *J Biol Chem* **273**, 12436-42.
84. Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T. and Selkoe, D.J. **Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity** (1999) *Nature* **398**, 513-7.

85. Laudon, H., Mathews, P.M., Karlstrom, H., Bergman, A., Farmery, M.R., Nixon, R.A., Winblad, B., Gandy, S.E., Lendahl, U., Lundkvist, J. and Naslund, J. **Co-expressed presenilin 1 NTF and CTF form functional gamma-secretase complexes in cells devoid of full-length protein** (2004) *J Neurochem* **89**, 44-53.
86. Tomita, T., Takikawa, R., Koyama, A., Morohashi, Y., Takasugi, N., Saido, T.C., Maruyama, K. and Iwatsubo, T. **C terminus of presenilin is required for overproduction of amyloidogenic Abeta42 through stabilization and endoproteolysis of presenilin** (1999) *J Neurosci* **19**, 10627-34.
87. Bergman, A., Laudon, H., Winblad, B., Lundkvist, J. and Naslund, J. **The extreme C terminus of presenilin 1 is essential for gamma-secretase complex assembly and activity** (2004) *J Biol Chem* **279**, 45564-72.
88. Loetscher, H., Deuschle, U., Brockhaus, M., Reinhardt, D., Nelboeck, P., Mous, J., Grunberg, J., Haass, C. and Jacobsen, H. **Presenilins are processed by caspase-type proteases** (1997) *J Biol Chem* **272**, 20655-9.
89. Vito, P., Ghayur, T. and D'Adamio, L. **Generation of anti-apoptotic presenilin-2 polypeptides by alternative transcription, proteolysis, and caspase-3 cleavage** (1997) *J Biol Chem* **272**, 28315-20.
90. Fluhrer, R., Friedlein, A., Haass, C. and Walter, J. **Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis** (2004) *J Biol Chem* **279**, 1585-93.
91. Kirschenbaum, F., Hsu, S.C., Cordell, B. and McCarthy, J.V. **Glycogen synthase kinase-3beta regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels** (2001) *J Biol Chem* **276**, 30701-7.
92. Twomey, C. and McCarthy, J.V. **Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3beta substrate** (2006) *FEBS Lett* **580**, 4015-20.
93. Lau, K.F., Howlett, D.R., Kesavapany, S., Standen, C.L., Dingwall, C., McLoughlin, D.M. and Miller, C.C. **Cyclin-dependent kinase-5/p35 phosphorylates Presenilin 1 to regulate carboxy-terminal fragment stability** (2002) *Mol Cell Neurosci* **20**, 13-20.
94. Chen, Q. and Schubert, D. **Presenilin-interacting proteins** (2002) *Expert Rev Mol Med* **2002**, 1-18.
95. Verdile, G., Gandy, S.E. and Martins, R.N. **The Role of Presenilin and its Interacting Proteins in the Biogenesis of Alzheimer's Beta Amyloid** (2006) *Neurochem Res.*
96. Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E.H. and Selkoe, D.J. **Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease** (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8208-13.
97. Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A.D., Lovett, M. and Kosik, K.S. **Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family** (1997) *Neuroreport* **8**, 1489-94.

98. Levesque, G., Yu, G., Nishimura, M., Zhang, D.M., Levesque, L., Yu, H., Xu, D., Liang, Y., Rogaeva, E., Ikeda, M., Duthie, M., Murgolo, N., Wang, L., VanderVere, P., Bayne, M.L., Strader, C.D., Rommens, J.M., Fraser, P.E. and St George-Hyslop, P. **Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and beta-catenin** (1999) *J Neurochem* **72**, 999-1008.
99. Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. and Wolozin, B. **Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau** (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9637-41.
100. Ray, W.J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W., Wu, J.Y., Kopan, R. and Goate, A.M. **Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch** (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3263-8.
101. Gu, Y., Chen, F., Sanjo, N., Kawarai, T., Hasegawa, H., Duthie, M., Li, W., Ruan, X., Luthra, A., Mount, H.T., Tandon, A., Fraser, P.E. and St George-Hyslop, P. **APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes** (2003) *J Biol Chem* **278**, 7374-80.
102. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P. and St George-Hyslop, P. **Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing** (2000) *Nature* **407**, 48-54.
103. Kim, S.H. and Sisodia, S.S. **Evidence that the "NF" motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2** (2005) *J Biol Chem* **280**, 41953-66.
104. Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H.C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G.R., Martinelli, G., Mehta, P., Friedrich, V.L., Jr. and Robakis, N.K. **Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts** (1999) *Mol Cell* **4**, 893-902.
105. Thomas, A.V., Herl, L., Spoelgen, R., Hiltunen, M., Jones, P.B., Tanzi, R.E., Hyman, B.T. and Berezovska, O. **Interaction between presenilin 1 and ubiquilin 1 as detected by fluorescence lifetime imaging microscopy and a high-throughput fluorescent plate reader** (2006) *J Biol Chem* **281**, 26400-7.
106. Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St George-Hyslop, P.H. and Fraser, P.E. **The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin** (1998) *J Biol Chem* **273**, 16470-5.

107. Li, Y.M., Lai, M.T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M.K., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A. and Gardell, S.J. **Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state** (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6138-43.
108. Nyabi, O., Bentahir, M., Horre, K., Herreman, A., Gottardi-Littell, N., Van Broeckhoven, C., Merchiers, P., Spittaels, K., Annaert, W. and De Strooper, B. **Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin** (2003) *J Biol Chem* **278**, 43430-6.
109. Cervantes, S., Saura, C.A., Pomares, E., Gonzalez-Duarte, R. and Marfany, G. **Functional implications of the presenilin dimerization: reconstitution of gamma-secretase activity by assembly of a catalytic site at the dimer interface of two catalytically inactive presenilins** (2004) *J Biol Chem* **279**, 36519-29.
110. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H. and Haass, C. **Reconstitution of gamma-secretase activity** (2003) *Nat Cell Biol* **5**, 486-8.
111. Zhang, L., Lee, J., Song, L., Sun, X., Shen, J., Terracina, G. and Parker, E.M. **Characterization of the reconstituted gamma-secretase complex from Sf9 cells co-expressing presenilin 1, nicastrin [correction of nacastrin], aph-1a, and pen-2** (2005) *Biochemistry* **44**, 4450-7.
112. De Strooper, B. **Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex** (2003) *Neuron* **38**, 9-12.
113. Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H. and De Strooper, B. **Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms** (2006) *J Neurochem* **96**, 732-42.
114. Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G. and Sisodia, S.S. **Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo** (1996) *Neuron* **17**, 1005-13.
115. Xia, W., Zhang, J., Kholodenko, D., Citron, M., Podlisny, M.B., Teplow, D.B., Haass, C., Seubert, P., Koo, E.H. and Selkoe, D.J. **Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins** (1997) *J Biol Chem* **272**, 7977-82.
116. Kimberly, W.T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M.S. and Selkoe, D.J. **The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation** (2000) *J Biol Chem* **275**, 3173-8.
117. Periz, G. and Fortini, M.E. **Functional reconstitution of gamma-secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2** (2004) *J Neurosci Res* **77**, 309-22.

118. Esler, W.P., Kimberly, W.T., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Moore, C.L., Tsai, J.Y., Rahmati, T., Xia, W., Selkoe, D.J. and Wolfe, M.S. **Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1** (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 428-34.
119. Seiffert, D., Bradley, J.D., Rominger, C.M., Rominger, D.H., Yang, F., Meredith, J.E., Jr., Wang, Q., Roach, A.H., Thompson, L.A., Spitz, S.M., Higaki, J.N., Prakash, S.R., Combs, A.P., Copeland, R.A., Arneric, S.P., Hartig, P.R., Robertson, D.W., Cordell, B., Stern, A.M., Olson, R.E. and Zaczek, R. **Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors** (2000) *J Biol Chem* **275**, 34086-91.
120. Liz, M.A. and Sousa, M.M. **Deciphering cryptic proteases** (2005) *Cell Mol Life Sci* **62**, 989-1002.
121. Wolfe, M.S. **The secretases of Alzheimer's disease** (2003) *Curr Top Dev Biol* **54**, 233-61.
122. Tolia, A., Chavez-Gutierrez, L. and De Strooper, B. **Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex** (2006) *J Biol Chem* **281**, 27633-42.
123. De Strooper, B. **Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease** (2007) *EMBO Rep* **8**, 141-6.
124. Xia, W. and Wolfe, M.S. **Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases** (2003) *J Cell Sci* **116**, 2839-44.
125. Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C. and Steiner, H. **Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation** (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8666-71.
126. Tomita, T., Katayama, R., Takikawa, R. and Iwatsubo, T. **Complex N-glycosylated form of nicastrin is stabilized and selectively bound to presenilin fragments** (2002) *FEBS Lett* **520**, 117-21.
127. Yang, D.S., Tandon, A., Chen, F., Yu, G., Yu, H., Arawaka, S., Hasegawa, H., Duthie, M., Schmidt, S.D., Ramabhadran, T.V., Nixon, R.A., Mathews, P.M., Gandy, S.E., Mount, H.T., St George-Hyslop, P. and Fraser, P.E. **Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins** (2002) *J Biol Chem* **277**, 28135-42.
128. Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W. and De Strooper, B. **gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation** (2003) *J Cell Sci* **116**, 1127-36.
129. Shiraishi, H., Marutani, T., Wang, H.Q., Maeda, Y., Kurono, Y., Takashima, A., Araki, W., Nishimura, M., Yanagisawa, K. and Komano, H. **Reconstitution of gamma-secretase by truncated presenilin (PS) fragments revealed that PS C-terminal transmembrane domain is critical for formation of gamma-secretase complex** (2006) *Genes Cells* **11**, 83-93.

130. Zhang, T., Tran, S., Clouser, C. and Pignoni, F. **Nicastrin controls aspects of photoreceptor neuron specification and differentiation in the Drosophila eye** (2005) *Dev Dyn* **234**, 590-601.
131. Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., 3rd, Sudhof, T. and Yu, G. **Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor** (2005) *Cell* **122**, 435-47.
132. Lopez-Schier, H. and St Johnston, D. **Drosophila nicastrin is essential for the intramembranous cleavage of notch** (2002) *Dev Cell* **2**, 79-89.
133. Chung, H.M. and Struhl, G. **Nicastrin is required for Presenilin-mediated transmembrane cleavage in Drosophila** (2001) *Nat Cell Biol* **3**, 1129-32.
134. Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A. and Priess, J.R. **APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos** (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 775-9.
135. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J.S. and Curtis, D. **aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation** (2002) *Dev Cell* **3**, 85-97.
136. Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C. and Steiner, H. **Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants** (2004) *J Biol Chem* **279**, 41340-5.
137. Ma, G., Li, T., Price, D.L. and Wong, P.C. **APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development** (2005) *J Neurosci* **25**, 192-8.
138. LaVoie, M.J., Fraering, P.C., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Kimberly, W.T., Wolfe, M.S. and Selkoe, D.J. **Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin** (2003) *J Biol Chem* **278**, 37213-22.
139. Kim, S.H., Ikeuchi, T., Yu, C. and Sisodia, S.S. **Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates** (2003) *J Biol Chem* **278**, 33992-4002.
140. Bergman, A., Hansson, E.M., Pursglove, S.E., Farmery, M.R., Lannfelt, L., Lendahl, U., Lundkvist, J. and Naslund, J. **Pen-2 is sequestered in the endoplasmic reticulum and subjected to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in the absence of presenilin** (2004) *J Biol Chem* **279**, 16744-53.
141. Luo, W.J., Wang, H., Li, H., Kim, B.S., Shah, S., Lee, H.J., Thinakaran, G., Kim, T.W., Yu, G. and Xu, H. **PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1** (2003) *J Biol Chem* **278**, 7850-4.

142. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. and Iwatsubo, T. **The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex** (2003) *Nature* **422**, 438-41.
143. Morais, V.A., Crystal, A.S., Pijak, D.S., Carlin, D., Costa, J., Lee, V.M. and Doms, R.W. **The transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with APH-1 and the gamma-secretase complex** (2003) *J Biol Chem* **278**, 43284-91.
144. Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C. and Steiner, H. **Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex** (2004) *J Biol Chem* **279**, 23255-61.
145. Muller, U. and Kins, S. **APP on the move** (2002) *Trends Mol Med* **8**, 152-5.
146. Gandy, S. and Petanceska, S. **Regulation of alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism** (2001) *Adv Exp Med Biol* **487**, 85-100.
147. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F. **Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease** (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3922-7.
148. Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K. and Evin, G. **A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing** (2002) *Biochemistry* **41**, 2825-35.
149. Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R. and Ihara, Y. **Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase** (2005) *J Neurosci* **25**, 436-45.
150. Zhao, G., Cui, M.Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L. and Xu, X. **gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain** (2005) *J Biol Chem* **280**, 37689-97.
151. Chiba, S. **Notch signaling in stem cell systems** (2006) *Stem Cells* **24**, 2437-47.
152. Fortini, M.E. **Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling** (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 673-84.
153. Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M.H., Berechid, B.E., Lopez, P.A., Meucci, O., McGlade, J.C., Rakic, P. and D'Adamio, L. **The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling** (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7102-7.

154. Kopan, R. and Goate, A. **Aph-2/Nicastrin: an essential component of gamma-secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization** (2002) *Neuron* **33**, 321-4.
155. Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E. and Polakis, P. **Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines** (1997) *Science* **275**, 1790-2.
156. Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. **Lessons from hereditary colorectal cancer** (1996) *Cell* **87**, 159-70.
157. Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y., Aihara, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T. and Nakamura, Y. **Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3** (1998) *Cancer Res* **58**, 2524-7.
158. Fox, D.T., Homem, C.C., Myster, S.H., Wang, F., Bain, E.E. and Peifer, M. **Rho1 regulates Drosophila adherens junctions independently of p120ctn** (2005) *Development* **132**, 4819-31.
159. Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R. and Hoschuetzky, H. **Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins** (1994) *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**, 3655-63.
160. Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D. and Moon, R.T. **The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3** (1996) *Genes Dev* **10**, 1443-54.
161. Takemaru, K.I. and Moon, R.T. **The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression** (2000) *J Cell Biol* **149**, 249-54.
162. Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T. and Fukamizu, A. **Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300** (2000) *J Biol Chem* **275**, 35170-5.
163. Zorn, A.M., Barish, G.D., Williams, B.O., Lavender, P., Klymkowsky, M.W. and Varmus, H.E. **Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin** (1999) *Mol Cell* **4**, 487-98.
164. Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H. and Cho, K.W. **Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer** (2000) *Nature* **403**, 781-5.
165. Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1** (1996) *Nature* **382**, 638-42.
166. Hsu, S.C., Galceran, J. and Grosschedl, R. **Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin** (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 4807-18.

167. Huber, A.H., Nelson, W.J. and Weis, W.I. **Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin** (1997) *Cell* **90**, 871-82.
168. Piedra, J., Martinez, D., Castano, J., Miravet, S., Dunach, M. and de Herreros, A.G. **Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation** (2001) *J Biol Chem* **276**, 20436-43.
169. Castano, J., Raurell, I., Piedra, J.A., Miravet, S., Dunach, M. and Garcia de Herreros, A. **Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin** (2002) *J Biol Chem* **277**, 31541-50.
170. Solanas, G., Miravet, S., Casagolda, D., Castano, J., Raurell, I., Corrienero, A., de Herreros, A.G. and Dunach, M. **beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity** (2004) *J Biol Chem* **279**, 49849-56.
171. Anastasiadis, P.Z. and Reynolds, A.B. **The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer** (2000) *J Cell Sci* **113 (Pt 8)**, 1319-34.
172. Polakis, P. **Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect** (2002) *Curr Biol* **12**, R499-R501.
173. Nelson, W.J. and Nusse, R. **Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways** (2004) *Science* **303**, 1483-7.
174. Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H. **Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer** (2003) *Biochim Biophys Acta* **1653**, 1-24.
175. Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D. and Moon, R.T. **Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways** (1999) *Oncogene* **18**, 7860-72.
176. van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. and Clevers, H. **The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells** (2002) *Cell* **111**, 241-50.
177. Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X. **Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism** (2002) *Cell* **108**, 837-47.
178. Caricasole, A., Bakker, A., Copani, A., Nicoletti, F., Gaviraghi, G. and Terstappen, G.C. **Two sides of the same coin: Wnt signaling in neurodegeneration and neuro-oncology** (2005) *Biosci Rep* **25**, 309-27.
179. Zhou, B.P. and Hung, M.C. **Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis** (2005) *Cell Cycle* **4**, 772-6.
180. Matsuzawa, S.I. and Reed, J.C. **Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses** (2001) *Mol Cell* **7**, 915-26.

181. Liu, J., Stevens, J., Rote, C.A., Yost, H.J., Hu, Y., Neufeld, K.L., White, R.L. and Matsunami, N. **Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein** (2001) *Mol Cell* **7**, 927-36.
182. Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. **Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions** (2004) *Genes Dev* **18**, 2225-30.
183. Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. and Clevers, H. **XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos** (1996) *Cell* **86**, 391-9.
184. Bienz, M. and Clevers, H. **Linking colorectal cancer to Wnt signaling** (2000) *Cell* **103**, 311-20.
185. He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway** (1998) *Science* **281**, 1509-12.
186. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. **The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway** (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5522-7.
187. Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T. and Clevers, H. **Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1** (1999) *Science* **285**, 1923-6.
188. He, T.C., Chan, T.A., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. **PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs** (1999) *Cell* **99**, 335-45.
189. Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J. and Hanski, C. **Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas** (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1603-8.
190. Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P. and Matrisian, L.M. **The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors** (1999) *Oncogene* **18**, 2883-91.
191. Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N. and Costantini, F. **Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway** (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 1172-83.
192. Conacci-Sorrell, M.E., Ben-Yedidia, T., Shtutman, M., Feinstein, E., Einat, P. and Ben-Ze'ev, A. **Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis** (2002) *Genes Dev* **16**, 2058-72.

193. Kolligs, F.T., Nieman, M.T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I.M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K.R. and Fearon, E.R. **ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation** (2002) *Cancer Cell* **1**, 145-55.
194. Koh, T.J. **Extragastric effects of gastrin gene knock-out mice** (2002) *Pharmacol Toxicol* **91**, 368-74.
195. Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H. and Pals, S.T. **Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway** (1999) *Am J Pathol* **154**, 515-23.
196. Batlle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., van den Born, M.M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T. and Clevers, H. **Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB** (2002) *Cell* **111**, 251-63.
197. Kim, J.S., Crooks, H., Dracheva, T., Nishanian, T.G., Singh, B., Jen, J. and Waldman, T. **Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells** (2002) *Cancer Res* **62**, 2744-8.
198. Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y. and Furukawa, Y. **Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers** (2001) *Oncol Res* **12**, 469-76.
199. Zhang, X., Gaspard, J.P. and Chung, D.C. **Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia** (2001) *Cancer Res* **61**, 6050-4.
200. Parr, B.A. and McMahon, A.P. **Wnt genes and vertebrate development** (1994) *Curr Opin Genet Dev* **4**, 523-8.
201. Moon, R.T., Brown, J.D. and Torres, M. **WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development** (1997) *Trends Genet* **13**, 157-62.
202. Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C. **Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction** (2005) *Nature* **438**, 867-72.
203. Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J. and He, X. **A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation** (2005) *Nature* **438**, 873-7.
204. Anderton, B.H., Dayanandan, R., Killick, R. and Lovestone, S. **Does dysregulation of the Notch and wntless/Wnt pathways underlie the pathogenesis of Alzheimer's disease?** (2000) *Mol Med Today* **6**, 54-9.
205. Murayama, M., Tanaka, S., Palacino, J., Murayama, O., Honda, T., Sun, X., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Wolozin, B. and Takashima, A. **Direct association of presenilin-1 with beta-catenin** (1998) *FEBS Lett* **433**, 73-7.

206. Noll, E., Medina, M., Hartley, D., Zhou, J., Perrimon, N. and Kosik, K.S. **Presenilin affects arm/beta-catenin localization and function in Drosophila** (2000) *Dev Biol* **227**, 450-64.
207. Soriano, S., Kang, D.E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H. and Koo, E.H. **Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing** (2001) *J Cell Biol* **152**, 785-94.
208. Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A.M., Wang, X.J., Koo, E.H., Wu, X. and Zheng, H. **Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis** (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10863-8.
209. Kang, D.E., Soriano, S., Frosch, M.P., Collins, T., Naruse, S., Sisodia, S.S., Leibowitz, G., Levine, F. and Koo, E.H. **Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of beta-catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the beta-catenin-signaling pathway** (1999) *J Neurosci* **19**, 4229-37.
210. Killick, R., Pollard, C.C., Asuni, A.A., Mudher, A.K., Richardson, J.C., Rupniak, H.T., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., Brion, J.P., Levey, A.I., Levy, O.A., Vestling, M., Cowburn, R., Lovestone, S. and Anderton, B.H. **Presenilin 1 independently regulates beta-catenin stability and transcriptional activity** (2001) *J Biol Chem* **276**, 48554-61.
211. Kang, D.E., Soriano, S., Xia, X., Eberhart, C.G., De Strooper, B., Zheng, H. and Koo, E.H. **Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis** (2002) *Cell* **110**, 751-62.
212. Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V.M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X. and Yankner, B.A. **Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis** (1998) *Nature* **395**, 698-702.
213. Nishimura, M., Yu, G. and St George-Hyslop, P.H. **Biology of presenilins as causative molecules for Alzheimer disease** (1999) *Clin Genet* **55**, 219-25.
214. Palacino, J.J., Murphy, M.P., Murayama, O., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Takashima, A., Golde, T.E. and Wolozin, B. **Presenilin 1 regulates beta-catenin-mediated transcription in a glycogen synthase kinase-3-independent fashion** (2001) *J Biol Chem* **276**, 38563-9.
215. Kowalczyk, A.P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E.A., Kopp, D.S., Borgwardt, J.E., Corcoran, C.M., Settler, A. and Green, K.J. **The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease** (1999) *J Biol Chem* **274**, 18145-8.
216. Adams, C.L., Nelson, W.J. and Smith, S.J. **Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion** (1996) *J Cell Biol* **135**, 1899-911.

217. Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J. and Ben-Ze'ev, A. **The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer** (2002) *J Clin Invest* **109**, 987-91.
218. Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. and Hendrickson, W.A. **Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins** (1995) *Nature* **374**, 327-37.
219. Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O. and Takeichi, M. **Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis** (2002) *Neuron* **35**, 77-89.
220. Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., Matsuyoshi, N., Takeichi, M. and et al. **Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes** (1995) *J Cell Biol* **128**, 949-57.
221. Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K. and Reynolds, A.B. **Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion** (2000) *J Cell Biol* **148**, 189-202.
222. Ireton, R.C., Davis, M.A., van Hengel, J., Mariner, D.J., Barnes, K., Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Matrisian, L., Bundy, L.M., Sealy, L., Gilbert, B., van Roy, F. and Reynolds, A.B. **A novel role for p120 catenin in E-cadherin function** (2002) *J Cell Biol* **159**, 465-76.
223. Davis, M.A., Ireton, R.C. and Reynolds, A.B. **A core function for p120-catenin in cadherin turnover** (2003) *J Cell Biol* **163**, 525-34.
224. Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I. and Nelson, W.J. **Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex** (2005) *Cell* **123**, 889-901.
225. Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J. and Weis, W.I. **Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly** (2005) *Cell* **123**, 903-15.
226. Gates, J. and Peifer, M. **Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions** (2005) *Cell* **123**, 769-72.
227. Birchmeier, W. and Behrens, J. **Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness** (1994) *Biochim Biophys Acta* **1198**, 11-26.
228. Papadavid, E. and Katsambas, A. **The interactions and role of epithelial cadherin and catenins in tumorigenicity** (2001) *Int J Dermatol* **40**, 254-7.
229. Thiery, J.P. **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression** (2002) *Nat Rev Cancer* **2**, 442-54.
230. Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A. **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells** (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 84-9.

231. Lickert, H., Bauer, A., Kemler, R. and Stappert, J. **Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion** (2000) *J Biol Chem* **275**, 5090-5.
232. Catimel, B., Rothacker, J., Catimel, J., Faux, M., Ross, J., Connolly, L., Clippingdale, A., Burgess, A.W. and Nice, E. **Biosensor-based micro-affinity purification for the proteomic analysis of protein complexes** (2005) *J Proteome Res* **4**, 1646-56.
233. Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M.M. and Birchmeier, W. **Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene** (1993) *J Cell Biol* **120**, 757-66.
234. Shibata, T., Ochiai, A., Kanai, Y., Akimoto, S., Gotoh, M., Yasui, N., Machinami, R. and Hirohashi, S. **Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells** (1996) *Oncogene* **13**, 883-9.
235. Hazan, R.B. and Norton, L. **The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton** (1998) *J Biol Chem* **273**, 9078-84.
236. Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. **Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation** (1999) *J Biol Chem* **274**, 36734-40.
237. Bonvini, P., An, W.G., Rosolen, A., Nguyen, P., Trepel, J., Garcia de Herreros, A., Dunach, M. and Neckers, L.M. **Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription** (2001) *Cancer Res* **61**, 1671-7.
238. Miravet, S., Piedra, J., Castano, J., Raurell, I., Franci, C., Dunach, M. and Garcia de Herreros, A. **Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription** (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 7391-402.
239. Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H.G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. **p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction** (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 2287-97.
240. Brady-Kalnay, S.M., Rimm, D.L. and Tonks, N.K. **Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo** (1995) *J Cell Biol* **130**, 977-86.
241. Muller, T., Choidas, A., Reichmann, E. and Ullrich, A. **Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration** (1999) *J Biol Chem* **274**, 10173-83.

242. Stahl, B., Diehlmann, A. and Sudhof, T.C. **Direct interaction of Alzheimer's disease-related presenilin 1 with armadillo protein p0071** (1999) *J Biol Chem* **274**, 9141-8.
243. Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich, V.L., Jr. and Robakis, N.K. **Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex** (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2381-6.
244. Serban, G., Kouchi, Z., Baki, L., Georgakopoulos, A., Litterst, C.M., Shioi, J. and Robakis, N.K. **Cadherins mediate both the association between PS1 and beta-catenin and the effects of PS1 on beta-catenin stability** (2005) *J Biol Chem* **280**, 36007-12.
245. Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarnier, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. and Robakis, N.K. **A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions** (2002) *Embo J* **21**, 1948-56.
246. Marambaud, P. and Robakis, N.K. **Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation** (2005) *Genes Brain Behav* **4**, 134-46.
247. Doerfler, P., Shearman, M.S. and Perlmutter, R.M. **Presenilin-dependent gamma-secretase activity modulates thymocyte development** (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9312-7.
248. Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P. **ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation** (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9182-7.
249. Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P. **ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling** (2005) *Embo J* **24**, 742-52.
250. Hass, M.R. and Yankner, B.A. **A {gamma}-secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein** (2005) *J Biol Chem* **280**, 36895-904.
251. Katoh, M. and Katoh, M. **WNT antagonist, DKK2, is a Notch signaling target in intestinal stem cells: augmentation of a negative regulation system for canonical WNT signaling pathway by the Notch-DKK2 signaling loop in primates** (2007) *Int J Mol Med* **19**, 197-201.
252. Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R. and Robakis, N.K. **A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations** (2003) *Cell* **114**, 635-45.
253. Marjaux, E., Hartmann, D. and De Strooper, B. **Presenilins in memory, Alzheimer's disease, and therapy** (2004) *Neuron* **42**, 189-92.

254. Tetsu, O. and McCormick, F. **Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells** (1999) *Nature* **398**, 422-6.
255. Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M. and Bejsovec, A. **Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wntless signalling activity** (1998) *Nature* **395**, 604-8.
256. Gaudry, C.A., Palka, H.L., Dusek, R.L., Huen, A.C., Khandekar, M.J., Hudson, L.G. and Green, K.J. **Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation** (2001) *J Biol Chem* **276**, 24871-80.
257. Miravet, S., Piedra, J., Miro, F., Itarte, E., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. **The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin** (2002) *J Biol Chem* **277**, 1884-91.
258. Schulz, J.G., Annaert, W., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., De Strooper, B. and David, G. **Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling** (2003) *J Biol Chem* **278**, 48651-7.
259. Araki, Y., Miyagi, N., Kato, N., Yoshida, T., Wada, S., Nishimura, M., Komano, H., Yamamoto, T., De Strooper, B., Yamamoto, K. and Suzuki, T. **Coordinated metabolism of Alcadein and amyloid beta-protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation** (2004) *J Biol Chem* **279**, 24343-54.
260. Ikeuchi, T. and Sisodia, S.S. **Cell-free generation of the notch1 intracellular domain (NICD) and APP-CTfgamma: evidence for distinct intramembraneous "gamma-secretase" activities** (2002) *Neuromolecular Med* **1**, 43-54.
261. Murakami, D., Okamoto, I., Nagano, O., Kawano, Y., Tomita, T., Iwatsubo, T., De Strooper, B., Yumoto, E. and Saya, H. **Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembraneous cleavage of CD44** (2003) *Oncogene* **22**, 1511-6.
262. Taniguchi, Y., Kim, S.H. and Sisodia, S.S. **Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC)** (2003) *J Biol Chem* **278**, 30425-8.
263. Ikeuchi, T. and Sisodia, S.S. **The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage** (2003) *J Biol Chem* **278**, 7751-4.
264. LaVoie, M.J. and Selkoe, D.J. **The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments** (2003) *J Biol Chem* **278**, 34427-37.
265. Georgakopoulos, A., Litterst, C., Ghersi, E., Baki, L., Xu, C., Serban, G. and Robakis, N.K. **Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling** (2006) *Embo J* **25**, 1242-52.

266. Lee, H.J., Jung, K.M., Huang, Y.Z., Bennett, L.B., Lee, J.S., Mei, L. and Kim, T.W. **Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4** (2002) *J Biol Chem* **277**, 6318-23.
267. ARAMeyer, E.L., Strutz, N., Gahring, L.C. and Rogers, S.W. **Glutamate receptor subunit 3 is modified by site-specific limited proteolysis including cleavage by gamma-secretase** (2003) *J Biol Chem* **278**, 23786-96.
268. Haapasalo, A., Kim, D.Y., Carey, B.W., Turunen, M.K., Pettingell, W.H. and Kovacs, D.M. **Presenilin/{gamma}-Secretase-mediated Cleavage Regulates Association of Leukocyte-Common Antigen-related (LAR) Receptor Tyrosine Phosphatase with beta-Catenin** (2007) *J Biol Chem* **282**, 9063-72.
269. May, P., Reddy, Y.K. and Herz, J. **Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain** (2002) *J Biol Chem* **277**, 18736-43.
270. Kim, D.Y., Ingano, L.A. and Kovacs, D.M. **Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage** (2002) *J Biol Chem* **277**, 49976-81.
271. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A. and Kopan, R. **A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain** (1999) *Nature* **398**, 518-22.
272. Saxena, M.T., Schroeter, E.H., Mumm, J.S. and Kopan, R. **Murine notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis** (2001) *J Biol Chem* **276**, 40268-73.
273. Jung, K.M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P.K., Kim, D.S., Ryu, S.H., Chao, M.V. and Kim, T.W. **Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor** (2003) *J Biol Chem* **278**, 42161-9.
274. Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A. and Shimohama, S. **Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1** (2006) *Neurosci Lett* **402**, 278-83.
275. Nagano, O. and Saya, H. **Mechanism and biological significance of CD44 cleavage** (2004) *Cancer Sci* **95**, 930-5.
276. Agiostratidou, G., Muros, R.M., Shioi, J., Marambaud, P. and Robakis, N.K. **The cytoplasmic sequence of E-cadherin promotes non-amyloidogenic degradation of A beta precursors** (2006) *J Neurochem* **96**, 1182-8.
277. Teo, J.L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C. and Kahn, M. **Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation** (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12171-6.

-
278. Ben-Ze'ev, A. and Geiger, B. **Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer** (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**, 629-39.
279. Yin, T., Getsios, S., Caldelari, R., Kowalczyk, A.P., Muller, E.J., Jones, J.C. and Green, K.J. **Plakoglobin suppresses keratinocyte motility through both cell-cell adhesion-dependent and -independent mechanisms** (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5420-5.
280. Teuliere, J., Faraldo, M.M., Shtutman, M., Birchmeier, W., Huelsken, J., Thiery, J.P. and Glukhova, M.A. **beta-catenin-dependent and -independent effects of DeltaN-plakoglobin on epidermal growth and differentiation** (2004) *Mol Cell Biol* **24**, 8649-61.
281. Dominguez, D., Montserrat-Sentis, B., Virgos-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Franci, C. and Garcia de Herreros, A. **Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor** (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 5078-89.

Llista de publicacions derivades d'aquesta tesi:

Raurell, I., J. Castaño, C. Francí, AG. de Herreros, and M. Duñach. Presenilin-1 interacts with plakoglobin and enhances placoglobina Tcf-4 association: implications for the regulation of β -catenin/Tcf-4-dependent transcription. (2005) J Biol Chem. **281**, 1401-11.

Raurell, I., Casagolda, D., De Strooper, B., Garcia de Herreros, A., Duñach, M. γ -secretase-dependent and independent effects of presenilin-1 on β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity. Manuscrit en preparació.

Llista de publicacions en les que s'ha contribuït durant la realització d'aquesta tesi:

Castaño, J., Raurell, I., J.A. Piedra, S. Miravet, M. Dunach, and A. Garcia de Herreros. β -catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to β -catenin. (2002) J Biol Chem. **277**, 31541-50.

Miravet, S., J. Piedra, J. Castaño, Raurell, I., C. Francí, M. Duñach, and A. Garcia de Herreros. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates β -catenin-mediated transcription. (2003) Mol Cell Biol. **23**, 7391-402.

Solanas, G., S. Miravet, D. Casagolda, J. Castaño, Raurell, I., A. Corriero, A.G. de Herreros, and M. Duñach. β -Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. (2004) J Biol Chem. **279**, 49849-56.

Castaño, J., Solanas, G., Casagolda, D., Raurell, I., Villagrasa, P., Bustelo X., Garcia de Herreros, A. and Duñach, M. Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. (2007) Mol Cell Biol. **27**, 1745-57.

AGRAÏMENTS

Un dilluns de fa molt temps, concretament el 5 de novembre del 2001, vaig entrar per primera vegada a la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i tota decidia vaig anar a la Unitat de Biofísica. Per mi era un dia molt important, començava la tesi doctoral!! Quins nervis!!

Des d'aquell dia fins al dia d'avui, han passat un munt de coses. Però finalment he complert el meu objectiu: acabar la tesi!. Per poder dir aquestes paraules tinc d'agrair a la meva directora de tesi, la Dra. Mireia Duñach, per oferir-me l'oportunitat de realitzar la tesi, de formar-me com a investigadora i entrar a formar part del grup dels "cateninos". Quan em vaig incorporar, el grup estava format pel Jose i la Susana (els fundadors del mític grup), el Dani (el tècnic) i en Julio.

Julio, què dir-te... Has viscut la meva tesi com si fos la teva, m'has escoltat, aconsellat, ajudat (personalment i científicament) i ni mil pàgines serien suficients per agrair-te tot el què has fet i estàs fent per mi. Però tinc la sort que podré agrair-t'ho cada dia de la meva vida (o això espero).

Més tard es va afegir al grup l'Àlex (el tècnic més enfeinat del món), la Guio (l'animadora del grup! sense les cantades i les historietes del metro-bus no serà el mateix), el David (els últims temps l'única imatge masculina del grup! Quina paciència que tens amb totes nosaltres; i nosaltres amb tu, ji ji), la Patri (MI NIÑA!!! Trobaré a faltar els teus consells, les converses professionals i sentimentals,...i sobretot les teves abraçades), la Neus (la supertècnica! Gràcies per compartir amb tots nosaltres la teva fantàstica rialla i ser com ets) i finalment la Montse (la postdoc! Gràcies per fer els cafès més dolços). Tots junts hem passat moments molt divertits que sempre recordaré i d'altres de més crítics que els intentaré esborrar (són moltes hores juntets). Moltes gràcies per ajudar-me!!!!

Agrair a tota la gent de la Unitat de biofísica (becaris de tots els temps, secre, Elodia, informàtics i els grans jefes) per ajudar-me en els moments que ho he necessitat. Donar les gràcies a el Víctor (per preocupar-se sempre per mi i per tothom) i a l'Irene (moltes vegades recordo les grans confidències a la campana? Encara que els teus projectes futurs estan lluny de les terres catalanes, recorda que sempre pots comptar en mi).

Agrair molt especialment al Dr. Antonio Garcia de Herreros pels seus consells, idees i acollir-me durant petites estades en el seu grup. També donar les gràcies a tota

la gent de l'IMIM que en algun moment al llarg d'aquests anys m'ha ajudat molt amablement.

No puc oblidar-me de donar les gràcies als meus pares per animar-me a iniciar aquesta tesi i està sempre el meu costat. I com no, agrair a la resta de la meva família (també a la família política) per preocupar-se sempre pels meus progressos científics i el meu estat anímic.

Ha arribat el moment d'agrair a les amigues i amics la paciència que han tingut amb mi. Moltes gràcies Laura, Raquel, Armand, Eva, Calabuig, Mireies, les meves nenes waterpolistes i els "bellotins" per escoltar-me quan ho necessitava. Agrair especialment a l'Albins, per formar part de la meva vida desde fa tants anys (érem unes *renacuajes*, especialment jo) i perquè sense les xerrades i caminades aquàtiques, la recta final d'aquesta tesi hagués estat molt més dura.

Gràcies a tothom per aportar un gra de sorra a la meva vida!!!!!!!!!!

Ah!!! Finalment dedicar unes paraules a la presenilina 1. Han estat 5 anys, 5 mesos i 15 dies d'intensa relació. Juntes hem passat bons moments, ens hem divertit, hem rigut,...però també hem tingut èpoques molt difícils, suposo com tota relació, fins el punt d'odiar-nos. Però finalment fruit de la nostra relació ha nascut aquesta petita gran memòria. Presenilina 1, ha estat un honor poder treballar amb tu.

Calldetenes, divendres 20 d'abril de 2007

Imma Raurell Saborit