

Identificació de gens associats a la transició epiteli-mesènquima induïda pels factors de transcripció E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK. Mecanisme de l'activació transcripcional de MMP-9 i Id-1 induïda per E47 i *Snail*.

Tesi doctoral
Mireia Jordà Ramos
Barcelona, 2005

Identificació de gens associats a la transició epiteli-mesènquima induïda pels factors de transcripció E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK. Mecanisme de l'activació transcripcional de MMP-9 i Id-1 induïda per E47 i *Snail*.

Memòria presentada per
Mireia Jordà Ramos
per optar al grau de Doctor
per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Tesi realitzada sota la direcció de la **Dra. Àngels Fabra Fres** al Departament d'Oncologia Molecular de l'Institut de Recerca Oncològica (IRO), i adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Tutor: Enrique Querol Murillo

Barcelona, 2005

Í NDEX

ABREVIATURES	1
INTRODUCCIÓ	5
1. LA PROGRESSIÓ TUMORAL EN ELS CARCINOMES	7
2. LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA: UN PROCÉS COMÚ ALS CARCINOMES I AL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI.....	9
2.1. Plasticitat epitelial. Dispersió cel·lular (<i>scattering</i>) versus TEM.....	10
2.2. Pèrdua de l'expressió i/o funció de la cadherina E en les transicions epitelio-mesènquima	10
2.3. Mecanismes responsables de la pèrdua d'expressió i/o funció de la cadherina E: repressors transcripcionals	12
2.3.1. <i>SNAIL</i> : característiques i funció.....	14
2.3.2. E12 i E47: característiques i funció.....	18
2.4. Inducció de la transició epitelio-mesènquima (TEM)	22
2.4.1. Convergència dels diferents inductors/efectors de la TEM en la pèrdua de la funció de la cadherina E i/o en la inducció dels seus repressors transcripcionals ...	22
3. CORRELACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE <i>SNAIL</i> I E47 AMB LA PROGRESSIÓ TUMORAL	28
4. GENS EFECTORS DELS CANVIS FENOTÍPICS MEDIATS PER <i>SNAIL</i> I E47 I/O LA PÈRDUA DE LA FUNCIO DE LA CADHERINA E	29
5. LA FAMÍLIA DE LES METAL·LOPROTEASES (MMPS): MMP-9.....	31
5.1. Característiques.....	31
5.2. Funcions	35
5.3. MMP-9.....	38
5.3.1. Paper de MMP-9 en la progressió tumoral.....	39
5.3.2. Regulació de l'expressió de MMP-9	40
6. ID-1.....	46
6.1. Característiques i funció.....	46
6.2. Implicació d'Id-1 en la progressió tumoral.....	48
6.3. Regulació de l'expressió d'Id-1	50
HIPÒTESI I OBJECTIUS	53
MATERIAL I MÈTODES	59
1. PLÀSMIDS EMPRATS I OBTENCIÓ	61
2. CULTIUS CEL·LULARS	66
2.1. Línies cel·lulars.....	66
2.2. Medis de cultiu i tècniques de cultius cel·lulars.....	67
2.3. Tractaments.....	68
2.4. Transfeccions transients	69
3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ A NIVELL DE RNA	70

3.1. Obtenció de RNA.....	70
3.2. <i>RNA arbitrarily primed</i> - PCR (RAP-PCR)	70
3.3. <i>Northern Blot</i>	78
3.4. Transcripció reversa - reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	78
3.5. Anàlisi per microarrays	79
4. MESURA DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL.....	81
4.1. Mesura de l'activitat luciferasa i renilla	81
4.2. Mesura de l'activitat β -galactosidasa	81
5. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ PROTEÏNA-DNA DE LES REGIONS PROMOTORES	81
5.1. Extracció de proteïnes nuclears.....	81
5.2. Assaig de retard en gel.....	82
6. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ A NIVELL PROTEIC.....	85
6.1. Obtenció d'extractes proteics totals.....	85
6.2. Obtenció de medis condicionats	85
6.3. Extracció de proteïnes associades a membrana.....	86
6.4. Anàlisi de l'activitat gelatinolítica	86
6.5. <i>Western Blot</i>	86
6.6. Immunofluorescència	87
6.7. Anticossos.....	88
RESULTATS.....	89
1. CARACTERITZACIÓ DEL PERFIL D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA (TEM) INDUÏDA PELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ E47 I <i>SNAIL</i> EN CÈL·LULES EPITELIALS	91
1.1. Estudi de l'expressió diferencial de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant RAP-PCR.....	91
1.1.1. Consideracions tècniques de la RAP-PCR	92
1.1.2. Anàlisi de l'expressió diferencial de gens mitjançant RAP-PCR.....	94
1.1.3. Validació dels resultats per <i>Northern Blot</i>	99
1.1.4. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats.....	101
1.2. Estudi de l'expressió diferencial de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant <i>microarrays</i> de cDNA.....	102
1.2.1. Validació dels resultats per Northern Blot o RT-PCR semiquantitativa.....	104
1.2.2. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats.....	105
2. MECANISME DE REGULACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE MMP-9 INDUÏDA PER E47 I <i>SNAIL</i> EN LES CÈL·LULES MDCK	110
2.1. Inducció de MMP-9 per E47 i <i>Snail</i> en les cèl·lules epitelials MDCK	110
2.2. Activació del promotor de MMP-9 per E47 i <i>Snail</i> en les cèl·lules MDCK.....	114

2.3. Mapatge del(s) element(s) del promotor de MMP-9 responedor(s) a E47 i <i>Snail</i> .	117
2.3.1. La caixa E no és essencial per la inducció de MMP-9 mediada per E47 i <i>Snail</i>	117
2.3.2. NFκB regula l'activació transcripcional de MMP-9 induïda per E47 i <i>Snail</i> ..	119
2.3.3. Ets-1 i Sp1 s'uneixen al promotor de MMP-9 activant-lo en resposta a E47 i <i>Snail</i>	121
2.4. Fosforilació de Sp1 endogen	129
2.5. La via Erk/MAPK regula la inducció de MMP-9 mediada per E47 i <i>Snail</i>	130
2.6. La via PI3K/Akt regula l'expressió de MMP-9 induïda per <i>Snail</i> en col·laboració amb la via Erk/MAPK	136
2.7. H-Ras coopera sinèrgicament amb <i>Snail</i> en l'activació de MMP-9	137
3. MECANISME DE REGULACIÓ DE L'ACTIVACIÓ D'ID-1 INDUÏDA PER E47 I SNAIL ..	140
3.1. Inducció d'Id-1 per E47 i <i>Snail</i> en les cèl·lules epitelials MDCK	140
3.2. Estimulació de l'activitat del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail	142
3.3. L'activació del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail implica la unió de factors de transcripció a les caixes E i GC distals	144
3.4. Implicació de la via Erk/MAPK en la inducció d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail	155
3.5. H-Ras activa la transcripció d'Id-1	159
DISCUSSIÓ	161
1. Perfil d'expressió gènica de la TEM induïda per E47 o <i>Snail</i> en les cèl·lules epitelials MDCK	164
2. Gens associats a la TEM induïda per E47 o <i>Snail</i> en les cèl·lules epitelials MDCK	170
3. Paper d'E47 i <i>Snail</i> en la progressió tumoral	179
4. Mecanisme d'activació de l'expressió de MMP-9 induïda per E47 i <i>Snail</i>	181
5. Mecanisme d'activació de l'expressió d'Id-1 induïda per E47 i <i>Snail</i>	189
6. Mecanismes comuns de la regulació transcripcional dels gens coexpressats durant la TEM induïda per E47 o <i>Snail</i> .	194
CONCLUSIONS	197
BIBLIOGRAFIA	203
ANNEXES	233

ABREVIATURES

AD	domini d'activació transcripcional	MAP1B	proteïna associada a microtúbuls 1B
AJs	unions adherents	MAPK	proteïna quinasa activada per mitògens
APC	<i>Adenomatous Poliposis Coli</i>	MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
aRNA	RNA amplificat	MEC	matriu extracel·lular
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	MKK	MAPK quinasa
BMK1	<i>Big MAP Kinase 1</i>	MKKK	MAPK quinasa quinasa
BMP	proteïna morfogenètica de l'ós	MMP	metal·loproteasa
Cdc25B	proteïna de divisió del cicle cel·lular 25B	mRNA	RNA missatger
Cdk	quinasa depenent de ciclina	MT-MMP	MMP transmembranal
cDNA	DNA complementari	MZF	<i>myeloid zinc finger protein</i>
CtBP	<i>Carboxi-terminal Binding Protein</i>	NFκB	factor nuclear kappa B
DMEM	<i>Dubelcos Eagle Modified Medium</i>	PAI-1	inhibidor de l'activador del plasminogen 1
DMSO	dimetil sulfòxid	PAS	Per-ARNT-Sim
DNA	àcid desoxiribonucleic	pb	parell de bases
dNTP	trifosfodesoxiribonucleòtids	PCR	reacció en cadena de la polimerasa
D.O.	densitat òptica	PI 3K	fosfatidilinositol-3-quinasa
DTT	ditiotreitòl	PKB	proteïna quinasa B
EGF	factor de creixement epidèrmic	PKC	proteïna quinasa C
EMSA	assaig de retard en gel	pRB	proteïna del retinoblastoma
Erk	quinasa regulada per senyals extracel·lulars	RAP-PCR	<i>RNA arbitrarily primed – PCR</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>	RCE	element control del retinoblastoma
FGF	factor de creixement fibroblàstic	RNA	àcid ribonucleic
FI	filaments intermedis	rRNA	RNA ribosòmic
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa	RT	transcripció reversa
Gfi	factor d'independència del creixement	SDS-PAGE	electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS
GPI	glicosilfosfatidilinositol	Smad	proteïna similar a mad
GSK-3β	glicogen sintasa quinasa 3β	SNAG	domini comú a <i>Snail</i> i <i>Gfi-1</i>
HAT	acetiltransferasa d'histones	SPARC	<i>Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine</i>
HDAC	deacetilasa d'histones	T/T°	temperatura
HGF/SF	factor de creixement d'hepatòcits/ factor de dispersió	Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
H-Ras	Harvey-Ras	TCF	factor de cèl·lules T
Id	inhibidor de la diferenciació o inhibidor de la unió al DNA	TCR	receptor de cèl·lules T
IgG	immunoglobulina G	TEM	transició epiteli-mesènquima
IL	interleuquina	TFPI-2	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor-2</i>
ILK	quinasa associada a integrines	TGF	factor de creixement transformant
IκB	inhibidor κB	TIMP	inhibidor de metal·loproteases específic de teixit
IκK	quinasa IκB	TNF	factor de necrosi tumoral
IPTG	isopropiltio-β-D-galactòsid	TPA	tetradecenoil-forbol-13-acetat
JAM1	<i>junction adhesion molecule 1</i>	uPA	activador uroquinasa del plasminogen
JUNK	quinasa c-Jun aminoterminal	u	unitat enzimàtica
kDa	kilodalton	Wnt	<i>Wingless type</i>
LEF	factor potenciador de leucòcits		
LZ	<i>leucine zipper</i>		

INTRODUCCIÓ

Durant el desenvolupament d'aquesta memòria s'analitzarà l'expressió diferencial de gens en la transició epitelial-mesènquima (TEM) mediada per *Snail* i E47 que tenen un paper rellevant en els processos d'invasió, i en concret en la invasió tumoral. En aquest sentit, aprofundirem en els mecanismes responsables de la sobreexpressió de MMP-9 i d'Id-1, ambdós involucrats en la progressió tumoral dels carcinomes.

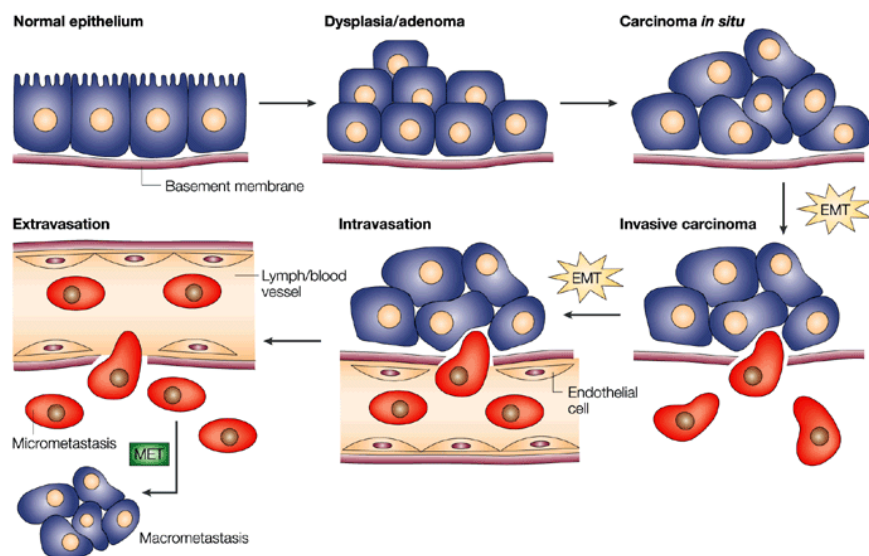
1. LA PROGRESSIÓ TUMORAL EN ELS CARCINOMES

El fenotip cel·lular és el resultat d'un equilibri dinàmic entre una maquinària de transcripció i traducció i l'entorn, que controla la proliferació i diferenciació cel·lular pròpies de l'òrgan i/o teixit. En les cèl·lules tumorals, com a conseqüència de l'acumulació de múltiples i successives alteracions genètiques, aquest equilibri s'altera comportant una pèrdua de l'homeostasi així com de les funcions cel·lulars i fisiològiques que els correspondrien. La majoria de tumors sòlids progressen cap a un fenotip maligne, és a dir, metastàtic. Al llarg d'aquesta progressió es genera en el tumor primari un conjunt heterogeni de poblacions cel·lulars com a conseqüència, almenys en part, de la inestabilitat genòmica. Algunes d'aquestes cèl·lules (una de cada 10^{11}) seran capaces de colonitzar un òrgan o teixit diferent d'on s'ha desenvolupat el tumor primari i formar metàstasis (Fidler, 1990). S'anomena progressió tumoral el conjunt d'etapes que tenen lloc des que es forma el tumor primari fins que les cèl·lules causen una lesió metastàtica en teixits o òrgans diferents (Hanahan and Weinberg, 2000). Aquest és el cas dels carcinomes, d'origen epitelial, que constitueixen el tipus de tumor més freqüent ja que més del 90% de tumors són carcinomes (Christofori and Semb, 1999). En els carcinomes, la pèrdua de l'organització epitelial no únicament té efectes sobre les cèl·lules del tumor sinó també sobre l'estroma que l'envolta i el sosté. Aquestes influències d'un compartiment sobre l'altre i viceversa, és a dir, entre estroma i tumor, són importants per la progressió tumoral (Byers et al., 1994).

A la figura I.1 es mostra un model hipotètic i simplificat de les etapes de progressió tumoral i formació de metàstasis espontànies des del tumor primari. En aquest model les etapes es presenten de forma esquemàtica i esglaonada, per entendre que cadascuna implica una sèrie de canvis diferents en l'expressió gènica de manera que confereixen a la cèl·lula unes funcions concretes. Breument, les etapes són:

- Creixement de les cèl·lules fins formar el tumor primari.
- Alliberació de les cèl·lules del tumor primari i invasió de l'estroma tissular que el rodeja. Això implica la interacció amb la matriu extracel·lular (MEC) i amb altres cèl·lules com fibroblasts, cèl·lules endotelials, etc.
- Disseminació local i ruptura de la membrana basal.

- Penetració en els vasos sanguinis o limfàtics (intravasació) permetent el seu transport passiu fins a òrgans distants. Les cèl·lules tumorals han de sobreviure a les defenses del sistema immunològic de l'hoste així com a les turbulències de la circulació.
- Detenció en algun punt concret de la xarxa vascular i sortida des del vas fins el parènquima cel·lular (extravasació).
- Inducció de l'angiogènesi: generació de nous vasos sanguinis que assegurin l'aport de nutrients a les cèl·lules tumorals.
- Proliferació i creixement del nou tumor (tumor secundari o metàstasi).



Thiery, 2002

Figura 1.1. Progressió d'un carcinoma. L'epiteli normal envoltat per la membrana basal pot proliferar localment i donar lloc a un adenoma. L'acumulació d'alteracions genètiques i epigenètiques pot conduir a un carcinoma *in situ*, encara rodejat per la membrana basal. Algunes d'aquestes cèl·lules poden envair localment provocant la ruptura de la membrana basal. D'aquesta manera, poden arribar a intravasarse als canals sanguinis o limfàtics, permetent el seu transport passiu a òrgans distants. En llocs secundaris, algunes cèl·lules tumorals poden extravasarse i romandre solitàries (micrometàstasi) o formar un nou tumor (macrometàstasi).

2. LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA: UN PROCÉS COMÚ ALS CARCINOMES I AL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

Un aspecte crucial per l'adquisició de capacitats invasives és la transició de la cèl·lula amb característiques epitelials cap a unes característiques més similars a una cèl·lula mesenquimal, havent perdut la cohesió amb les cèl·lules que l'envolten i l'ancoratge a la MEC, i en definitiva esdevenir una cèl·lula migratòria.

Els canvis fenotípics que experimenten les cèl·lules tumorals en el procés d'invasió a les darreres etapes de la progressió dels tumors tenen un gran paral·lelisme amb els del desenvolupament embrionari, i en aquest sentit podrien ser governats per mecanismes comuns. En ambdues situacions, algunes subpoblacions de cèl·lules epitelials perden els seus sistemes d'adhesió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-MEC i abandonen el seu entorn per anar a altres regions on finalment formaran metàstasis (progressió tumoral) o es diferenciaran en tipus cel·lulars (desenvolupament embrionari). Aquesta conversió fenotípica es coneix com a **transició epiteli-mesenquima** (TEM) (Boyer et al., 2000; Hay, 1995; Thiery, 2002).

Durant aquest procés les cèl·lules epitelials, a més a més de perdre les unions cel·lulars (principalment les unions adherents i desmosomals mediatees per cadherines i les unions oclusives o *tight junctions*), també experimenten una reorganització del citoesquelet i perden la seva polaritat àpico-basal, de manera que canvien a un fenotip més allargat, fibroblastoid i migratori, expressen marcadors mesenquimals i adopten els mecanismes necessaris per envair la MEC (figura I.2) (Boyer et al., 2000; Thiery, 2002).

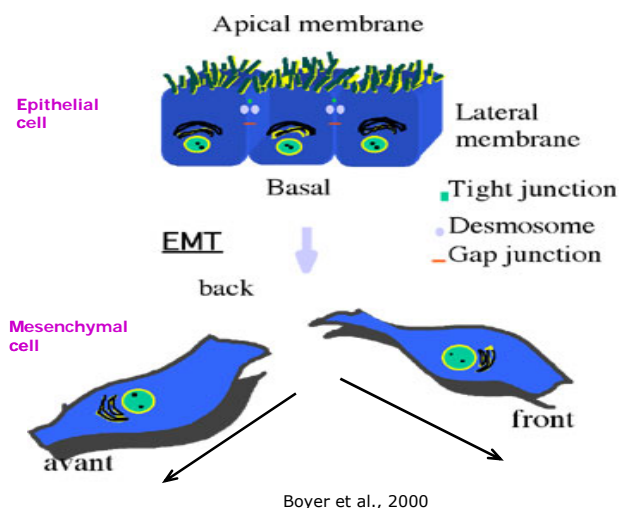


Figura I.2. La transició epiteli-mesenquima (TEM) induïx grans canvis en la morfologia i l'adhesió cel·lulars. Les cèl·lules epitelials perden el seu fenotip i n'adopten un de més fibroblastoid i migratori, similar al mesenquimal. Té lloc la pèrdua de les unions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-MEC així com de la polaritat àpico-basal. A més a més, es reorganitza el citoesquelet i expressen marcadors mesenquimals.

Així doncs, les TEMs no només tenen lloc en processos fisiològics com la gastrulació o la formació de la cresta neural (Hay, 1995), sinó també en processos patològics com la progressió tumoral (Birchmeier et al., 1993), participant en el

programa de desdiferenciació que condueix els carcinomes malignes a envair localment i a distància (Boyer et al., 2000; Petersen, 2003; Thiery, 2002).

2.1. Plasticitat epitelial. Dispersió cel·lular (*scattering*) versus TEM

Molts processos fisiològics i patològics exigeixen que la cèl·lula epitelial perdi el seu fenotip polaritzat transitòriament o establement, per això es parla de la plasticitat de la cèl·lula epitelial. La modulació d'aquesta plasticitat cel·lular ha estat estudiada molt extensament en diverses línies cel·lulars epitelials les quals han perdut algun dels seus trets característics en diferent grau donant lloc a diferents fenotips. En diversos estudis el terme TEM ha estat emprat per descriure un rang molt ampli de fenotips epitelials, la qual cosa ha creat sovint confusió en el camp (Janda et al., 2002a). Per això, és important diferenciar principalment entre dos fenotips: dispersió cel·lular o *scattering* i TEM. Tots dos de forma similar porten a la pèrdua de la polaritat epitelial, a una morfologia fibroblastoide i a un increment de la motilitat, però poden diferenciar-se per l'anàlisi de gens marcadors i estudis de reversibilitat. En aquest sentit, l'*scattering* s'indueix *in vitro* a les 48 hores o menys d'exposició als senyals inductors i reverteix quan aquests es retiren; en canvi, la TEM només és completa al cap de 4-6 dies i persisteix després de treure els inductors. Per altra banda, la TEM comporta l'expressió *de novo* de marcadors mesenquimals mentre que l'*scattering* no. De fet, estudis de comparació de la TEM i l'*scattering* han mostrat que els perfils d'expressió són diferents, la qual cosa estableix que són processos separats i molecularment diferents (Grunert et al., 2003; Janda et al., 2002a; Jechlinger et al., 2003).

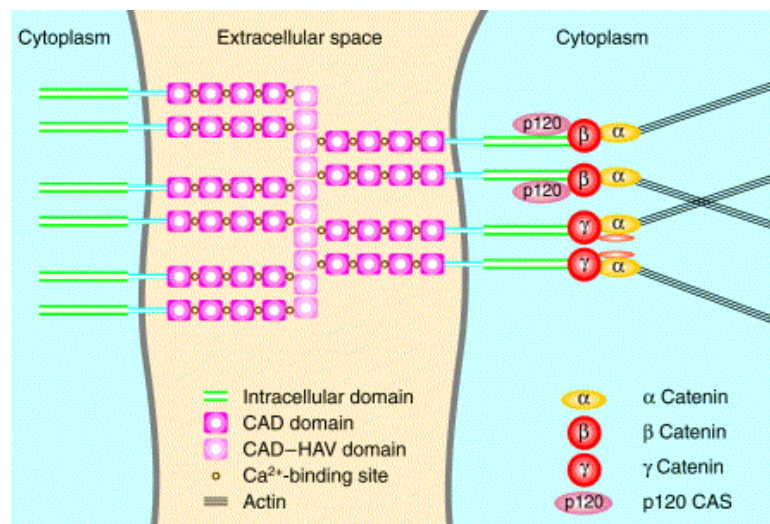
2.2. Pèrdua de l'expressió i/o funció de la cadherina E en les transicions epiteli-mesènquima

Les cèl·lules epitelials estan íntimament lligades entre sí mitjançant una sèrie d'especialitzacions de membrana anomenades *unions intercel·lulars* (unions oclusives, unions adherents i desmosomes), que un cop organitzades formen el *complex d'unió* que envolta cadascuna de les cèl·lules epitelials del teixit.

Les cadherines constitueixen una superfamília de proteïnes transmembranals, dependents de calci (Ca^{2+}) per la seva acció (Kemler et al., 1989; Ozawa et al., 1990; Ringwald et al., 1987), que medien les interaccions homotípiques entre cèl·lules adjacents (Takeichi, 1993). Però a més a més de participar merament en fenòmens d'adhesió, les cadherines semblen formar part de fenòmens molt més complexos com el

desenvolupament de la polaritat cel·lular, la formació de teixits embrionaris o el control de la homeostasi tissular (Takeichi, 1988; Takeichi, 1995).

La cadherina E és la cadherina clàssica que es troba en les unions adherents de les cèl·lules dels teixits epitelials. Estableix les unions cèl·lula-cèl·lula mitjançant la interacció entre les regions extracel·lulars de les cadherines E de cèl·lules veïnes, alhora que connecta indirectament amb els microfilaments d'actina del citoesquelet. Per fer-ho, s'associa amb els membres d'una família de proteïnes citoplasmàtiques anomenades col·lectivament catenines, atès que la seva estructura i funcions són molt conservades tant en organismes vertebrats com en invertebrats (Nagafuchi and Takeichi, 1989). Inicialment, es van descriure tres catenines diferents: les catenines α , β i γ (altrament anomenada plakoglobina), que difereixen entre elles per la localització i pel grau d'associació amb la cadherina E. Així, la catenina β interacciona amb la cadherina E de les unions adherents, mentre que la catenina γ , tot i que també ho pot fer, es troba preferentment en els complexos que formen els desmosomes (Kemler, 1993; Takeichi, 1995; Tepass et al., 2000). Tanmateix, les dues proteïnes serveixen de nexa entre la cadherina E i la catenina α , que és la responsable de la interacció amb el citoesquelet d'actina en les unions adherents (Knudsen et al., 1995; Rimm et al., 1995). Existeixen altres catenines que interaccionen directament amb el domini proximal de membrana de la cadherina E, tot i que no es coneix molt bé el seu paper, com diverses isoformes de p120 (Reynolds et al., 1994) (figura I.3).



Christofori & Semb, 1999

Figura I.3. Estructura de les unions adherents. Els homodímers de cadherina E expressats en les membranes plasmàtiques de cèl·lules adjacents interaccionen mitjançant el domini extracel·lular. El complex d'adhesió intracel·lular, compost per les catenines α , β , γ (plakoglobina) i p120, uneixen la cadherina E amb el citoesquelet d'actina.

D'aquesta manera, les cèl·lules epitelials que expressen cadherina E i la resta de components funcionals asseguren l'ancoratge al citoesquelet la qual cosa és bàsica per

al manteniment de l'estabilitat de les unions intercel·lulars i l'homeostasi del teixit. Contràriament, la pèrdua de l'expressió o de la funció de la cadherina E pot abocar a la pèrdua de l'arquitectura i funcions epitelials. Aquesta pèrdua de la funcionalitat de la cadherina E es dona concomitantment en l'adquisició de capacitats invasives (Berx et al., 1998; Perl et al., 1998; Thiery, 2002) i és característica/responsable de les TEMs durant determinades etapes del desenvolupament embrionari i de la progressió dels tumors.

En aquest sentit, la pèrdua de la cadherina E durant el desenvolupament ha estat observada en la formació de l'endoderm parietal en ratolins coincidint amb la TEM (Damjanov et al., 1986; Veltmaat et al., 2000) i en la gastrulació en *Drosophila* (Tepass et al., 1996), en pollastre (Edelman et al., 1983) i en ratolí (Burdsal et al., 1993). A més a més, s'ha demostrat que *in vitro* hi ha una correlació directa entre la pèrdua de cadherina E i la pèrdua del fenotip epitelial (Behrens et al., 1989; Birchmeier et al., 1993; Christofori and Semb, 1999; Perl et al., 1998). Paral·lelament, s'ha comprovat en cultius *in vitro* de cèl·lules epitelials que l'addició d'anticossos anti-cadherina E pot trencar les unions intercel·lulars i induir un fenotip mesenquimal (Imhof et al., 1983). L'adquisició del fenotip mesenquimal també ha estat associada amb un comportament invasiu de les cèl·lules en gels de col·lagen tridimensionals i en explants de cor (Chen and Obrink, 1991; Peinado et al., 2004a). Per altra banda, l'expressió i funcionalitat de la cadherina E es manté en la majoria de tumors diferenciats, incloent carcinoma de pell, cap i coll, mama, pulmó, fetge, colon i pròstata, mentre que als carcinomes més agressius es detecta la seva pèrdua d'expressió, de manera que l'expressió de cadherina E i el grau de malignitat es correlacionen inversament (Birchmeier et al., 1993; Christofori and Semb, 1999).

2.3. Mecanismes responsables de la pèrdua d'expressió i/o funció de la cadherina E: repressors transcripcionals

La regulació del gen de la cadherina E és complexa, atesos per una banda els canvis d'expressió que requereixen les cèl·lules epitelials (per exemple, en els processos de TEM) i per altra banda l'alt grau de similitud amb d'altres cadherines (Faraldo and Cano, 1993). Aquests fets indiquen que l'expressió de la cadherina E ha d'estar governada molt finament.

Els canvis a nivell genètic, que impliquen mutacions somàtiques i pèrdua d'heterozigositat del locus de cadherina E portant a l'absència de la proteïna o a una proteïna no funcional, són poc freqüents; s'han descrit en alguns tipus de tumors, com carcinomes lobul·lars de mama (Berx et al., 1995) i carcinomes gàstrics difosos (Becker et al., 1994; Guilford et al., 1998). La majoria de carcinomes que no presenten

expressió de cadherina E tenen el *locus* gènic intacte. Això va fer pensar que els canvis epigenètics i transcripcionals podrien estar jugant un paper molt important en la regulació de l'expressió de la cadherina E.

De fet, la hipermetil·lació d'illes CpG en la regió promotora del gen de cadherina E s'ha associat a la pèrdua de la seva expressió en diferents carcinomes humans (Graff et al., 1995; Hennig et al., 1995; Yoshiura et al., 1995). En els darrers anys també s'ha posat de manifest la participació d'altres mecanismes de control de l'expressió de la cadherina E, com són processos d'acetilació/deacetilació d'histones que podrien col·laborar en els processos de metil·lació (Koizume et al., 2002; Richards and Elgin, 2002).

Però en la majoria de casos la repressió de la cadherina E és mediada per repressió transcripcional principalment. Inicialment la regulació de la transcripció de la cadherina E es va estudiar en ratolí i després es va comprovar en humans (Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996). Aquests estudis han demostrat que la regió promotora compresa entre -178 i +92 pb respecte l'inici de transcripció conté els elements indispensables per dirigir, almenys en part, la transcripció del gen de cadherina E en cèl·lules epitelials i alhora el silenciament en cèl·lules no epitelials i invasives (Behrens et al., 1991; Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996). Aquesta regió és rica en GC (posicions -25/-58) i conté una caixa CCAAT (posició -65). Si bé aquests elements no semblen tenir una activitat específica de teixit per sí sols en alguns contextos, sí podrien col·laborar en el manteniment de l'activitat basal ja que la seva mutació resulta en la pèrdua de l'activitat transcripcional (Behrens et al., 1991; Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996). Per altra banda, aquesta regió promotora conté un element palindròmic anomenat E-pal compost per dues caixes E consecutives (CANNTG), capaç d'unir diversos repressors, comunament expressats en cèl·lules invasives, i en conseqüència abrogar la transcripció del gen (Behrens et al., 1991; Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996). Darrerament s'han caracteritzat diversos factors de transcripció que compleixen aquesta funció: les proteïnes de dits de zinc *Snail* (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000) i *Slug* (Bolos et al., 2003; Hajra and Fearon, 2002), els factors de dobles dits de zinc δ EF1/ZEB-1 i SIP-1/ZEB-2 (Comijn et al., 2001; Grootclaes and Frisch, 2000) i els factors de transcripció *basic helix-loop-helix* (bHLH) E12/E47 (Perez-Moreno et al., 2001) i *Twist* (Yang et al., 2004). El paper específic de cada factor o la seva cooperació potencial en contextos cel·lulars específics encara no es coneix plenament, tot i que s'hipotetitza que la repressió inicial de la cadherina E seria duta a terme per un repressor amb alta afinitat d'unió a les caixes E del promotor, com *Snail*, mentre que el manteniment d'aquesta repressió podria ser mediada per altres repressors amb menor afinitat d'unió a les caixes E, com E47 o *Slug*.

Els mediadors de la senyalització de Wnt, tals com la catenina β i LEF-1, també abroguen l'expressió de la cadherina E en queratinòcits de pell (Jamora et al., 2003) i en cèl·lules epitelials durant la morfogènesi del fol·licle pilós (Jamora et al., 2005). En aquest cas, LEF-1 s'uneix a un motiu LEF/TCF localitzat *upstream* de l'element E-pal del promotor (Huber et al., 1996).

A més a més de tots aquests elements reguladors de la seqüència promotora del gen de cadherina E, cal destacar l'existència d'elements potenciadors de l'activitat transcripcional (*enhancers*) localitzats a l'intró 1 (posició -6/+16) (Behrens et al., 1991) i a l'intró 2, que en gran manera poden contribuir a l'expressió de la cadherina E determinant l'especificitat tissular o bé estar involucrats en la pèrdua d'expressió associada als tumors epitelials (Stemmler et al., 2005).

2.3.1. *SNAIL*: característiques i funció

Snail es va caracteritzar com un factor de transcripció de tipus dits de zinc capaç d'interaccionar amb el DNA i actuar de regulador negatiu de l'expressió de gens implicats en el desenvolupament embrionari temprà (Boulay et al., 1987; Kasai et al., 1992). Pertany a la superfamília Snail, de la qual el primer membre que es va descriure fou *snail* de *Drosophila melanogaster* (Grau et al., 1984; Nusslein-Volhard., 1984), que és essencial per la formació del mesoderm (Boulay et al., 1987). Al llarg dels anys s'han anat identificant nombrosos membres d'aquesta superfamília tant en vertebrats com en invertebrats, que s'engloben en dues famílies en base a l'homologia de la seqüència dels dits de zinc i la presència de diversos motius consens: les famílies Snail i Scratch. Els membres de la família Scratch estan més estretament relacionats des del punt de vista filogenètic, a diferència de les proteïnes de la família Snail que formen un grup més heterogeni. De fet, en vertebrats la família Snail es divideix en dues subfamílies: la Snail i la Slug (Locascio et al., 2002).

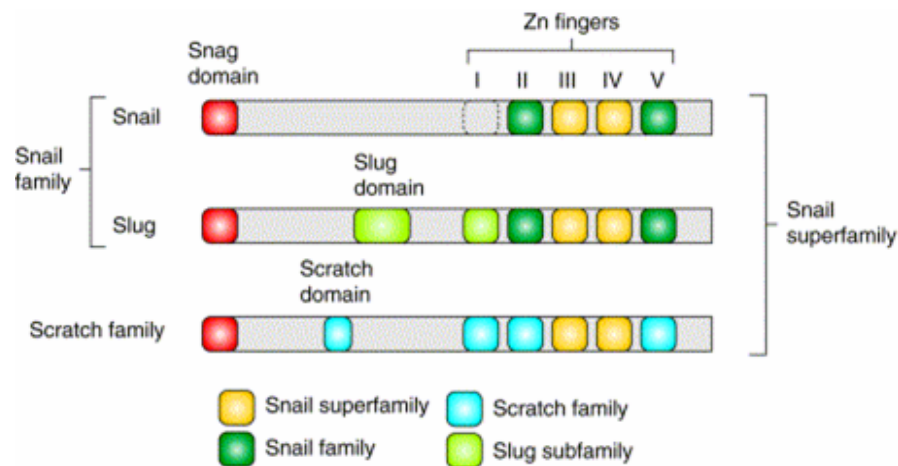
També s'ha trobat un gen murí inusual, el gen *Smuc*, que per homologia de dominis es considera de la família Snail, però molt separat de la resta de membres; de fet no es coneix cap ortòleg en altres espècies (Kataoka et al., 2000). A més a més, s'ha descrit l'existència d'un retrogen humà actiu de *Snail* anomenat *Snail-like* (Paznekas et al., 1999), el qual codifica per una proteïna similar a *Snail* (Locascio et al., 2002). La seva funció biològica, però, es desconeix.

Els factors de transcripció de la superfamília Snail mantenen tots una organització estructural similar. La regió carboxiterminal és altament conservada i conté de quatre a sis dominis dits de zinc, mentre que la regió aminoterminal és molt més

divergent. Els dits de zinc són del tipus C_2H_2 , en què les dues cisteïnes i histidines coordinen l'ió de zinc, i són els responsables de la unió al DNA.

Cal senyalar la conservació de la funció repressora de les proteïnes *Snail* en l'evolució (Hemavathy et al., 2000; Nieto, 2002). Monòmers de la proteïna *Snail* interaccionen amb la seqüència consens de DNA formada per un nucli de 6 bases, CA(G/C)(G/C)TG, anomenat "caixa E" present en les regions promotores de diversos gens, entre ells la cadherina E (Mauhin et al., 1993). En vertebrats, l'activitat repressora de les proteïnes *Snail* no només depèn dels dits de zinc sinó també del domini SNAG (*Snail/Gfi*) situat a la regió aminoterminal (Nakayama et al., 1998). Inicialment aquest domini es va caracteritzar en el protooncogen *Gfi* i s'ha anat trobant en diverses proteïnes amb dits de zinc de vertebrats (Grimes et al., 1996). Contràriament, algunes proteïnes *Snail*, com *snail* de *Drosophila*, no tenen el domini SNAG, però en canvi tenen un motiu específic d'unió al corepressor *Carboxi-terminal Binding Protein* (CtBP) que faria aquestes funcions (Nibu et al., 1998). En alguns membres de la superfamília *Snail* de vertebrats també hi ha una seqüència consens parcial d'unió a CtBP.

En la figura I.4 es mostra una classificació de la superfamília *Snail* així com l'estructura, de forma esquemàtica, dels dominis dels seus membres.



Manzanares et al., 2001

Figura I.4. Classificació i estructura esquemàtica dels dominis dels membres de la superfamília de *Snail* en vertebrats. Els dits de zinc centrals III i IV (groc) presenten una seqüència consens per tots els membres de la superfamília *Snail*, mentre que els dits de zinc II i V (verd fosc i blau) permeten la distinció entre la família *Snail* i *Scratch*. Pel que fa al dit de zinc I (verd clar), no està present en la subfamília *Snail*, i sembla no tenir cap rellevància funcional en els membres que el contenen. En la regió aminoterminal, rica en aminoàcids bàsics, existeixen unes seqüències consens característiques de la subfamília *Slug* (domini *Slug* -verd clar-), així com altres característiques de la família *Scratch* (domini *Scratch* -blau-), tot i que encara no es coneix la funcionalitat d'aquests dominis. En la part més aminoterminal i comú a tots els membres de la superfamília *Snail* en vertebrats es troba el domini SNAG (vermell) que té activitat repressora.

Recentment, s'ha descrit que *Snail*, a més a més d'unir-se directament a les caixes E del promotor de la *cadherina E*, també recluta enzims remodeladors de la

cromatina i de les histones, tals com acetiltransferases d'histones (HATs) o deacetilases d'histones (HDACs), per exercir la seva funció repressora. Concretament, a través del domini aminoterminal SNAG, *Snail* recluta les deacetilases d'histones HDAC1/2 de classe I i el corepressor Sin3A, tant *in vitro* com *in vivo*, (Peinado et al., 2004b).

Tot i que sempre s'havia parlat de *Snail* com a repressor transcripcional, darrerament s'han anat trobant diversos gens activats per *Snail*, o si més no per la sobreexpressió de *Snail* en cèl·lules epitelials (Cano et al., 2000; del Barrio and Nieto, 2002; Miyoshi et al., 2004). Aquestes dades han obert un nou camp per estudiar la capacitat de *Snail* com a activador transcripcional. De fet, ja s'havia proposat que podia funcionar com a activador ja que en transfectar transientment les cèl·lules Schneider SL2 de *Drosophila* amb un vector d'expressió de *Snail* i un plàsmid reporter que contenia la seqüència consens d'unió al DNA per *Snail* resultava en un increment de l'activitat transcripcional (Mauhin et al., 1993).

Els factors de transcripció de la família Snail són molt importants en molts processos que es donen durant el desenvolupament embrionari, tant en vertebrats com en invertebrats, incloent la diferenciació del mesoderm, la formació de la cresta neural, l'asimetria esquerra-dreta, el desenvolupament neuronal, l'apoptosi, la divisió cel·lular i l'endorreduplicació (Nieto, 2002). A més a més, estan implicats en la tumorigènesi. De fet, controlen un fenomen més general, la TEM (Thiery, 2002).

La primera indicació que les proteïnes Snail estan implicades en la TEM prové d'un estudi en embrions temprans de pollastre on es demostra que oligonucleòtids antisentit de *Slug* inhibeixen la formació de la cresta neural i la delaminació del mesoderm (Nieto et al., 1994). Sorprenentment, els estudis sobre *Slug* de ratolí en el desenvolupament embrionari van mostrar la seva expressió en mesoderm i regions migratòries, però no estrictament associada als processos de TEMs (Jiang et al., 1998; Sefton et al., 1998). En canvi, els embrions de ratolí homocigòtics nuls per *Snail* són letals i presenten defectes en les TEMs que han de produir-se en la gastrulació (Carver et al., 2001) i que recorden els defectes que presenten els embrions mutants de *Snail* en *Drosophila* (Oda et al., 1998). És a dir, *Snail* millor que *Slug* seria el gen implicat en les TEMs en el ratolí (Sefton et al., 1998). Això és confirmat pel fet que l'expressió de *Snail* de ratolí és capaç d'induir una TEM completa en línies cel·lulars epitelials (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). L'anàlisi comparatiu dels estudis de *Snail* i *Slug* en embrions de pollastre i ratolí ha determinat que existeix un patró d'expressió invers en alguns llocs, notablement en la cresta neural i el mesoderm, durant el desenvolupament temprà. Altres llocs d'expressió per cada gen estan conservats per les dues espècies (Sefton et al., 1998).

2.3.1.1. Regulació de *Snail*

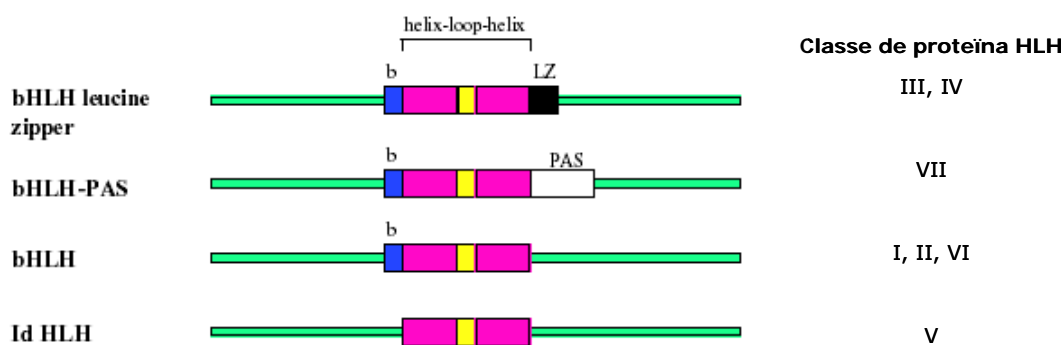
L'expressió de *Snail* pot ser activada per molts inductors del procés de TEM, com el factor de creixement transformant β (TGF- β), l'oncogen H-Ras o la quinasa associada a integrines (ILK) (Barbera et al., 2004; Peinado et al., 2003). S'ha descrit que en el promotor humà la regió mínima compresa entre -78 i +59 pb, que no té caixa TATA però sí un lloc consens per Sp1, és suficient per mantenir l'especificitat mesenquimal, i aquesta activitat mínima és dependent de la via de senyalització Ekr/MAPK. NF κ B/p65 també estimula la transcripció de *Snail* a través de la regió -194/-78 (Barbera et al., 2004). Pel que fa al promotor murí, s'ha descrit que la regió proximal -100 pb, que conté un lloc AP-1, mediarà els efectes de H-Ras els quals són dependents de les vies Erk/MAPK i PI3K, mentre que els elements responedors a TGF- β estarien situats a la regió -900/-675 que conté llocs consens per factors com AP-4 i MZF-1 (Peinado et al., 2003).

Per altra banda, els senyals dependents d'estrògens es troben implicats en la regulació de l'expressió de *Snail* ja que indueixen la seva repressió transcripcional mitjançant el reclutament de MTA3 (gen 3 associat a metàstasi), una subunitat deacetilasa d'histones del complexe Mi-2/NuRD, al promotor de *Snail*. L'absència del receptor d'estrògens i/o el seu funcionament anòmal permetrien una expressió aberrant de *Snail* amb la consegüent pèrdua de cadherina E i altres gens diana com ocorre en molts carcinomes de mama (Fujita et al., 2003).

Un dels mecanismes posttraduccional que recentment s'ha implicat en la regulació de *Snail* és la importació o exportació nuclear i la degradació per la via ubiquitina/proteosoma (Dominguez et al., 2003; Zhou et al., 2004). *Snail* és una molècula molt làbil amb una vida mitja d'aproximadament 25 minuts. S'ha demostrat que la glicogen sintetasa quinasa 3 β (GSK-3 β) s'uneix a *Snail* i el fosforila en dos motius consens per regular dualment la funció de la proteïna. La fosforilació en el primer lloc regula la seva degradació per la via ubiquitina/proteosoma mediada per Trcp- β , mentre que la fosforilació del segon lloc controla la localització subcel·lular induint el seu export nuclear. A més a més, s'ha demostrat que la GSK-3 β és regulada per algunes de les vies de senyalització que controlen l'expressió de *Snail* tals com les de PI3K/Akt i Erk/MAPK. Es podria proposar que aquestes vies de senyalització inhibirien GSK-3 β la qual cosa resultaria en l'estabilització de *Snail* i la seva localització nuclear que permetrien la inducció de la TEM. Donat que GSK-3 β també regula β -catenina, es podria especular que la inhibició de GSK-3 β per aquestes vies estabilitzaria *Snail* i β -catenina, que induirien la migració cel·lular, la proliferació i l'oncogènesi de forma coordinada (Zhou et al., 2004).

2.3.2. E12 i E47: característiques i funció

E12 i E47 són proteïnes codificades pel gen E2A, generades per *splicing* alternatiu, i pertanyen a la família de factors de transcripció *helix-loop-helix* (HLH), els components de la qual són clau durant molts processos del desenvolupament, tant en vertebrats com en invertebrats (Aronheim et al., 1993a; Massari and Murre, 2000). S'han identificat més de 240 membres en organismes que van des de llevats fins a mamífers (Atchley and Fitch, 1997). El motiu HLH és un domini altament conservat que comprèn dues hèlixs α amfipàtiques separades per un bucle. Aquest domini media l'homodimerització o heterodimerització (Murre et al., 1994), que és essencial per la unió d'aquests factors al DNA i per l'activitat transcripcional (Goldfarb et al., 1998; Shirakata et al., 1993; Voronova and Baltimore, 1990). Adicionalment, algunes proteïnes HLH contenen un motiu de dimerització *leucine zipper* (LZ) caracteritzat per tenir repeticions de set leucines que es troba immediatament adjacent al costat carboxiterminal del domini HLH (Henthorn et al., 1991). Altres proteïnes HLH tenen un domini PAS (Per-ARNT-Sim) immediatament després del domini HLH caracteritzat per un plegament α/β (Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 2004). Gairebé totes les proteïnes HLH tenen una regió bàsica, immediatament adjacent al costat aminoterminal del domini HLH, que media la unió al DNA; per això es parla de la subfamília bHLH (*basic helix-loop-helix*). De fet, aquesta regió bàsica és crítica per l'especificitat d'unió al DNA i l'activitat transcripcional (Davis et al., 1990) (figura I.5).



Norton, 2000

Figura I.5. Estructura esquemàtica de diverses famílies de proteïnes HLH. Es mostren el domini HLH de dimerització, el domini bàsic d'unió al DNA i els dominis *leucine zipper* (LZ) i PAS.

S'ha demostrat que perquè un dímer bHLH s'uneixi al DNA li calen dues regions bàsiques, és a dir, la regió bàsica de cada monòmer; per això es diu que les proteïnes bHLH actuen com a dímers obligats, de manera que cada monòmer bHLH interacciona amb la meitat de la caixa E (Lu and Sloan, 2002).

La majoria de dímers bHLH s'uneixen a les anomenades caixes E que contenen la seqüència consens CANNTG, originalment identificada en els *enhancers* intrònics de les immunoglobulines κ i μ (Ephrussi et al., 1985; Voronova and Baltimore, 1990). Algunes proteïnes HLH també poden unir-se a la seqüència de DNA relacionada amb la caixa E anomenada caixa N, CACNAG (Klamt et al., 1989; Tietze et al., 1992).

La família HLH s'agrupa en set classes (I-VII) segons la distribució tissular, les capacitats de dimerització i les especificitats d'unió al DNA (taula I.1) (Massari and Murre, 2000). Més recentment, s'ha descrit una altra classificació de les proteïnes HLH basada en la seqüència d'aminoàcids. Així s'ha creat un arbre filogenètic que classifica els membres de la família en quatre grans grups (A-D) que comprenen més de 24 subfamílies (Atchley and Fitch, 1997). Donat que el nombre de proteïnes HLH segueix creixent, aquesta classificació "natural" suposaria una categorització més acurada.

Les proteïnes HLH s'han implicat en el desenvolupament hemapoietic, miogènic, pancreàtic, cardíac i neurogènic (taula I.1).

Taula I.1. Classificació dels reguladors transcripcionals HLH.

Classe	Membres	Funció	Característiques	Referències
Classe I (proteïnes E)	E12, E47, HEB, E2-2 o 1TF-2, Daugtherless	Miogènesi, limfopoiesi, determinació de sexe, limfomogènesi, etc.	Ubics, poden formar homodímers i heterodímers	(Desiderio, 1995; Farah et al., 2000; Park, 1999)
Classe II	MyoD, Miogenina NeuroD/BETA2 dHAND, eHAND Mash Twist Mist SCL/Tal1	Miogènesi Diferenciació neurogènica, desenvolupament pancreàtic Morfogènesi cardíaca Regulador positiu de la neurogènesi Inhibidor de la diferenciació miogènica i neurogènica Exocitosi de secrecions seroses Hemapoiesi	Específics de teixit, només poden formar heterodímers, preferentment amb proteïnes E, els heterodímers poden unir-se a caixes E canòniques i no canòniques	(Kageyama et al., 1997; Naya et al., 1997; Olson, 1990) (Srivastava, 1999) (Kageyama et al., 1995) (Spicer et al., 1996) (Lemerclier et al., 1998; Shivdasani et al., 1995)
Classe III	Myc TFE SREBP	Proliferació cel·lular, apoptosi, oncogènesi, diferenciació, etc. <i>Enhancer</i> de la transcripció de la cadena pesada d'Igs Síntesi d'esterols, determinació d'adipòcits	Presència de domini LZ adjacent al domini HLH	(Vastrik et al., 1994) (Javaux et al., 1991) (Brown and Goldstein, 1997)
Classe IV	Mad, Max, Mxi	Regulació de la proliferació cel·lular	Dimerització amb la proteïna Myc o entre elles	(Hurlin et al., 1994)
Classe V	Id	Inhibició de la unió a DNA, inhibició de la diferenciació, etc.	Ubics, no tenen domini bàsic d'unió al DNA, actuen de reguladors negatius de les proteïnes de classe I	(Benezra et al., 1990b; Norton, 2000)
Classe VI	HES, HESR1	Proliferació cel·lular, via de senyalització de Notch	Presència de prolines en la regió bàsica	(Henderson et al., 2001; Muller et al., 2002)
Classe VII	AHR, ARNT, Sim HIF	Respostes biològiques als hidrocarburs aromàtics plans Regulador de l'homeostasi d'O ₂	Presència d'un domini bHLH-PAS	(Hankinson, 1995; Qin et al., 2001) (Semenza, 2002)

E12 i E47 concretament són factors bHLH de classe I generats per *splicing* diferencial d'un dels dos exons que codifiquen el domini HLH. El domini HLH d'aquestes dues proteïnes difereix en un 20% de la seqüència aminopeptídica (Aronheim et al., 1993a).

Les proteïnes E2A, com tots els factors HLH de classe I, a més a més del domini de dimerització HLH i del domini bàsic d'unió al DNA, tenen dos dominis separats altament conservats en l'extrem aminoterminal, anomenats AD1 i AD2, els quals s'ha demostrat que activen la transcripció (figura I.6). El domini AD1 funciona eficientment en una gran varietat de línies cel·lulars de mamífers, mentre que el domini AD2, també anomenat domini *loop-helix*, funciona preferentment en les línies cel·lulars pancreàtiques beta (Aronheim et al., 1993b). A més a més, les proteïnes E tenen un domini autoregulator anomenat Rep que és un potent inhibidor dels dominis d'activació AD1 i AD2, sense afectar la unió al DNA (Markus et al., 2002).

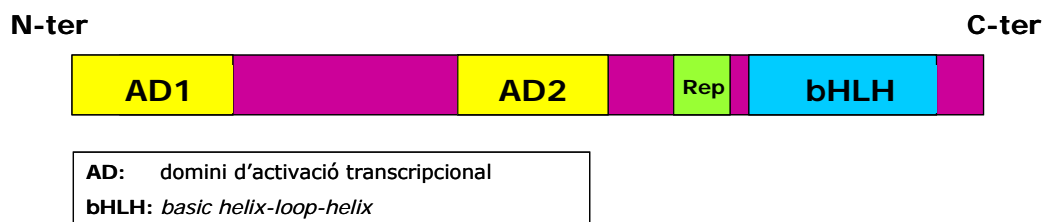


Figura I.6. Estructura esquemàtica dels dominis dels productes del gen E2A (E47 i E12). Les proteïnes E12 i E47 tenen dos dominis d'activació transcripcional (AD1 i AD2) a l'extrem aminoterminal, un domini autoregulator (Rep) que inhibeix els dominis AD1 i AD2, un domini bàsic d'unió al DNA i un domini de dimerització *helix-loop-helix* a l'extrem carboxiterminal.

Els productes del gen E2A juguen un paper central en la regulació de gens específics de teixit, principalment de cèl·lules B (Kee and Murre, 1998; Schlissel et al., 1991) i múscul esquelètic (Bain et al., 1994).

Les proteïnes E2A són ubiqües però els nivells d'expressió varien segons el llinatge cel·lular, la qual cosa fa que existeixin diferents estratègies per generar els característics complexes bHLH. En cèl·lules pancreàtiques β i musculars es formen heterodímers entre proteïnes bHLH específiques de teixit com IESF1 i MyoD i proteïnes E2A (presentes en baixa concentració en cèl·lules no limfoides). En canvi, en cèl·lules B limfoides, l'acumulació de concentracions elevades de proteïnes E2A permet la formació d'homodímers (Aronheim et al., 1993a).

El paper de les proteïnes E2A en activar gens específics de cèl·lules B demostra que poden funcionar com a activadors transcripcionals. A més a més dels dominis d'activació transcripcional AD, poden reclutar enzims modificadors de la cromatina. Està descrit que poden interaccionar amb coactivadors transcripcionals HATs com p300 i CBP (Ogryzko et al., 1996) o el complexe SAGA que també té activitat HAT (Massari et al., 1999).

Per altra banda, les proteïnes E2A també reprimeixen la transcripció de molts gens mitjançant la unió directa a les caixes E del promotor. De fet, i com s'argumenta al llarg de la memòria, E47 és un repressor de l'expressió de la cadherina E, i en aquest sentit sobretot juga un paper important en la TEM durant el desenvolupament

embrionari i la progressió tumoral (Perez-Moreno et al., 2001). Estudis d'hibridació *in situ* en embrions mostren l'absència de les proteïnes E2A en l'epiteli embrionari, mentre que l'expressió és elevada en el mesoderm d'embrions temprans (Perez-Moreno et al., 2001). La implicació d'E47 en les TEMs i la repressió de cadherina E és confirmada pel fet que l'expressió ectòpica d'E47 murí en la línia cel·lular epitelial MDCK indueix una TEM dramàtica (Perez-Moreno et al., 2001).

2.3.2.1. Regulació d'E47

Com ja s'ha dit, E47 i E12 són productes d'*splicing* alternatiu del gen E2A. Hi ha molt poc treball fet sobre la regulació transcripcional d'aquest gen. Sembla ser que aquesta és específica per a cada tipus cel·lular, i en aquest sentit s'ha descrit que en limfòcits l'activitat del promotor és regulada per elements repressors (situats a la regió -831/-358 pb) i elements activadors (situats a la regió -357/-263 pb), tot i que no s'han identificat els factors de transcripció que s'hi uniren. En canvi, en fibroblasts les regions que contenen elements repressors no semblen jugar-hi un paper decisiu en el control de la transcripció (Hata and Mizuguchi, 2004).

Atès que les proteïnes E2A s'expressen constitutivament en la majoria de teixits, la seva regulació a nivell posttraduccional juga un paper molt important. La principal modificació és la fosforilació. S'ha descrit que la fosforilació d'E47 immediatament abans de la regió bàsica inhibeix la seva unió al DNA (Johnson et al., 1996; Sloan et al., 1996). Contràriament, durant la diferenciació muscular E47 fosforilat en la serina 140 per la quinasa p38 indueix l'heterodimerització amb el factor bHLH de tipus II MyoD i l'activació de gens específics de múscul (Lluis et al., 2005).

Per altra banda, existeixen reguladors negatius endògens, la família Id de factors HLH, que segresten les proteïnes E, entre elles E47, formant dímers incapaços d'unir-se al DNA perquè només tenen una regió bàsica (Benezra et al., 1990b). Sembla ser molt important el balanç E47/Id per l'activitat d'E47 (Norton, 2000).

El receptor transmembranal Notch també reprimeix l'activitat d'E47, però ho fa independentment dels dominis bHLH i ADs, per la qual cosa es postula l'existència de dominis reguladors addicionals o cofactors (Ordentlich et al., 1998).

Un altre mecanisme important de regulació és la degradació de les proteïnes E2A per la via ubiquitina/proteosoma. Consistent amb aquest mecanisme, aquestes proteïnes són molt inestables, amb una vida mitja de 55 minuts (Kho et al., 1997).

2.4. Inducció de la transició epiteli-mesènquima (TEM)

Tot i que en alguns treballs s'ha descrit que molts factors de creixement per sí sols indueixen un procés de TEM, en realitat el que indueixen és *scattering* (Janda et al., 2002a). El fenotip d'*scattering* va ser observat per primera vegada en les cèl·lules epitelials de ronyó MDCK per efecte del factor de creixement d'hepatòcits/factor de dispersió (HGF/SF) (Stoker and Perryman, 1985). L'*scattering* també és induït pel factor de creixement epidèrmic (EGF) i per membres de les famílies del factor de creixement fibroblàstic (FGF) i del factor de creixement transformant β (TGF- β), la qual cosa s'ha observat en diferents línies cel·lulars com les cèl·lules epitelials de bufeta NBT-II (Boyer et al., 1992; Edme et al., 2002), les cèl·lules epitelials de ronyó MDCK (Potempa and Ridley, 1998) o les cèl·lules epitelials de mama NMuMG (Bakin et al., 2000; Miettinen et al., 1994) i EpH4 (Janda et al., 2002a).

En canvi, la inducció d'un procés de TEM complet requereix la combinació de diverses senyals. A continuació ens centrarem en els mecanismes d'inducció del procés de TEM, tot i que algunes molècules i vies de senyalització implicades també són requerides en l'*scattering* o altres fenotips que pugui adoptar la cèl·lula epitelial.

2.4.1. Convergència dels diferents inductors/efectors de la TEM en la pèrdua de la funció de la cadherina E i/o en la inducció dels seus repressors transcripcionals

La inducció de TEM requereix la combinació de diversos senyals, típicament la cooperació de TGF- β i altres factors de creixement o els seus transductors *downstream* (Janda et al., 2002a).

Els factors TGF- β constitueixen una extensa família de citocines amb diverses funcions biològiques i contraoposades, importants tant en el desenvolupament embrionari com en el manteniment de l'homeostasi dels teixits (Reiss, 1997). De fet, TGF- β té activitat antiproliferativa a les cèl·lules epitelials, però contràriament pot estimular o inhibir la proliferació de les cèl·lules mesenquimals i els fibroblastes (Derynck and Zhang, 2003; Massague and Chen, 2000). Per altra banda, TGF- β juga un paper força complex en la tumorigènesi on actua com a molècula proinvasiva i autocrina (Akhurst and Derynck, 2001) i/o contràriament com a supressor de tumors (Bottinger and Kopp, 1998; Tang et al., 1998). Els mecanismes responsables de les respostes transcripcionals als tractaments amb TGF- β no són del tot coneguts, malgrat els importants avanços dels darrers anys en la identificació dels components de les vies de senyalització per TGF- β . De fet, aquesta molècula transdueix senyals a través de

receptors específics de membrana de tipus I i II ($T\beta R$ -I i II), i d'aquesta manera s'activa la via de senyalització intracel·lar mediada per Smads, molècules encarregades de transmetre aquests senyals específics cap el nucli. Així, Smad2 i Smad3 són fosforilats directament pel receptor $T\beta R$ -II actiu la qual cosa comporta l'heterodimerització amb Smad4 i la translocació al nucli, on mediaran la transcripció de gens diana de TGF- β (Massague and Chen, 2000; ten Dijke et al., 2000). Tanmateix, la majoria de carcinomes es caracteritzen per la presència de mutacions en els receptors de TGF- β , en Smad2 i en Smad4 (Derynck and Zhang, 2003), la qual cosa comporta la pèrdua de les funcions normals de TGF- β de manera que es promou la progressió tumoral. En aquest context, TGF- β ha estat associat a processos de TEM en models de carcinogènesi de pell i de mama (Cui et al., 1996; Oft et al., 1996).

A diferència de TGF- β , altres factors de creixement medien la seva senyalització mitjançant receptors que tenen un domini intracel·lular amb activitat quinasa que quan s'activa recluta diversos factors, incloent proteïnes amb dominis SH2. Generalment, els dominis SH2 interaccionen amb les anomenades proteïnes petites amb activitat GTPasa, tals com Ras, Rho i Rac (Gimond et al., 1999; Potempa and Ridley, 1998) o amb altres quinases, incloent la família de tirosina quinases Src amb membres com Fyn i Yes (Owens et al., 2000).

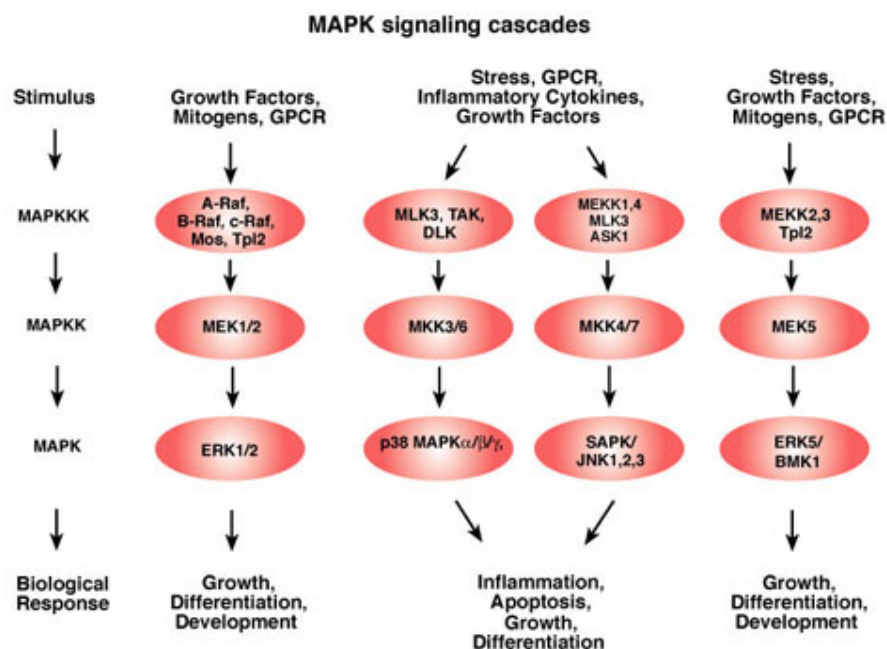
La cooperació de TGF- β amb altres factors de creixement o els seus transductors *downstream* en la inducció de TEM permet superar els efectes antiproliferatius i proapoptòtics de la senyalització per TGF- β dependent de Smads, perquè TGF- β pugui influenciar en la plasticitat epitelial i en la migració/invasió (Derynck et al., 2001; ten Dijke et al., 2000). Aquesta cooperació es podria subdividir en quatre mecanismes d'acció:

- a) activació de diferents factors de transcripció que formen complexes amb Smads i actuen sinèrgicament o oposadament sobre els mateixos gens dianes, com gens de molècules del cycle cel·lular (ciclins D) o d'adhesió (cadherina E).
- b) activació de la transcripció d'inhibidors de la senyalització per Smad.
- c) inducció de la síntesi autocrina de TGF- β (Oft et al., 1996) i altres factors de creixement com el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) (Jechlinger et al., 2003).
- d) TGF- β activa vies de senyalització independents de Smad que interaccionen amb vies activades per altres factors de creixement (Petritsch et al., 2000).

Aquesta cooperació ocorre en la majoria sinó en totes les situacions normals i patològiques que impliquen TEM *in vivo*. És el cas de la formació del mesoderm en la que estan implicats membres de la família TGF- β i FGFs. En aquest procés s'ha demostrat que la senyalització de FGF indueix l'expressió de *Snail* (Ciruna and Rossant, 2001).

La cooperació més rellevant en la inducció de TEM i sobre la que es coneix millor el mecanisme és TGF- β i l'oncogen H-Ras. Les proteïnes de la família Ras regulen la proliferació i la diferenciació cel·lulars, causen transformació oncogènica i són mutades/amplificades en molts càncers humans. En la TEM induïda per TGF- β i l'oncogen H-Ras, aquest insensibilitzaria la cèl·lula a l'aturada del cycle cel·lular i a l'apoptosi induïdes per TGF- β (Filmus et al., 1992; Oft et al., 1996). Per altra banda, Ras actua mitjançant nombrosos efectors, tals com la quinasa Raf-1 que activa la via Erk/MAPK (Marais et al., 1995) i la PI3K que activa Akt (Kodaki et al., 1994).

Les quinases Erk formen part de la família de proteïnes quinases activades per mitògens (MAPKs), la qual es pot englobar en tres subfamílies activades diferentment per diversos estímuls: les quinases regulades per senyals extracel·lulars (Erks), les quinases c-Jun aminoterminal/proteïnes quinases activades per l'estrès (JNK/SAPKs) i les p38/HOG (Hazzalin and Mahadevan, 2002; Johnson and Lapadat, 2002). Darrerament s'ha descrit una nova Erk, l'Erk5/BMK1 (*Big MAP Kinase 1*), que presenta algunes diferències estructurals respecte les Erks conegudes fins aleshores (Lee et al., 1995; Zhou et al., 1995). Les MAPKs formen part d'un sistema de tres quinases activades seqüencialment per fosforilació en treonines i tirosines, de manera que una MAPK quinasa quinasa (MKKK) fosforila una MAPK quinasa (MKK) que fosforila una MAPK (figura I.7). Un cop fosforilada aquesta darrera, es transloca al nucli on fosforila



Cell signalling

Figura I.7. Cascades d'activació/fosforilació de les MAPKs. Diferents estímuls, com són la unió de factors de creixement o citocines als seus receptors cel·lulars, inicien l'activació de les vies MAPKs que es dona per fosforilació seqüencial de manera que una MAPKKK fosforila una MAPKK i aquesta fosforila una MAPK, la qual es transloca al nucli on fosforila factors de transcripció, afectant la seva capacitat activadora o repressora, que regulen l'expressió de gens associats a diverses funcions cel·lulars.

factors de transcripció afavorint o impedit la seva unió a les regions promotores de gens que regulen principalment la proliferació i la diferenciació cel·lular (Hazzalin and Mahadevan, 2002; Johnson and Lapadat, 2002).

Per altra banda, l'activació de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) resulta en la producció de PI(3,4,5)₃P₃ i PI(3,4)P₂ en la part interna de la membrana plasmàtica que interaccionen amb la proteïna quinasa B (PKB)/Akt. Aquesta s'activa per fosforilació i mitjançant l'estimulació o inhibició de diversos gens dianes implicats en supervivència, creixement i proliferació cel·lular (Cantley, 2002).

Així, H-Ras contribuiria en la TEM activant aquestes vies de senyalització (Bakin et al., 2000; Chen et al., 2000; Potempa and Ridley, 1998). Recentment s'ha demostrat que la hiperactivació de la via Raf/MAPK és necessària en la inducció de TEM per TGF-β i H-Ras *in vitro*, així com per la formació de tumors i metàstasis *in vivo*. En canvi, l'activació de la via PI3K/Akt *in vitro* protegeix la cèl·lula de l'apoptosi induïda per TGF-β i causa *scattering* però no TEM i *in vivo* és suficient per la tumorigènesi però no per la metàstasi (Janda et al., 2002b). De fet, molts estudis demostren que l'activació sostinguda de la via Erk/MAPK resulta en la desestabilització de l'arquitectura epitelial i induïx TEM. Quan s'expressa ectòpicament una forma constitutivament activa de MEK1 en les cèl·lules epitelials MDCK es produeix un canvi fenotípic molt pronunciat amb l'adquisició d'una morfologia fibroblastoide i l'expressió de marcadors mesenquimals (Montesano et al., 1999; Schramek et al., 1997b).

Diversos treballs recents s'han centrat en l'estudi de la regulació del factor de transcripció *Snail* per TGF-β. La cooperació de TGF-β1 i l'oncogen H-Ras induïx l'expressió de *Snail*, ja que l'activació del promotor murí mediada per TGF-β1 en les cèl·lules epitelials MDCK és bloquejada per un dominant negatiu de H-Ras. L'activació del promotor de *Snail* per TGF-β1 és dependent de MEK1/2 però aparentment independent de Smad4, i la inducció del promotor mediada per H-Ras, en presència o no de TGF-β1, depèn de les vies Erk/MAPK i PI3K (Peinado et al., 2003). Per altra banda, s'ha descrit que TGF-β2 i Smad2 induïxen transientment *Snail* durant la morfogènesi del fol·licle pilós (Jamora et al., 2003).

A part de les vies Erk/MAPK i PI3K, altres vies de senyalització intervenen en la inducció de TEM en cooperació amb TGF-β, com la via Wnt. Les proteïnes Wnt, una família de molècules extracel·lulars molt diferent a les descrites fins aquest punt, també intervé en la inducció de la TEM. Els membres d'aquesta família s'uneixen a diferents receptors *Frizzled* i activen vies de transducció de senyals que controlen l'expressió gènica, l'adhesió cel·lular i la polaritat cel·lular (Moon et al., 2002). La via canònica de Wnt activa la funció de la catenina β. En absència de senyals Wnt, la catenina β lliure és fosforilada per la quinasa glicogen sintasa 3β (GSK-3β) en el complex *adenomatous polyposis coli* (APC)/GSK-3β i és degradada per la via ubiquitina/proteosoma. Quan la

via de senyalització Wnt és activada, GSK-3 β és inactivada per fosforilació per *Dishevelled*, de manera que no fosforila la catenina β fent que aquesta s'acumuli al citoplasma i es transloqui cap al nucli, on s'uneix al factor de cèl·lules T/ factor potenciador de leucòcits 1 (TCF/LEF-1) i indueix l'expressió de gens diana, alguns d'ells relacionats amb desenvolupament i càncer (Christofori and Semb, 1999; Gumbiner, 1995). Tenint en compte que durant la TEM té lloc la pèrdua de la cadherina E i per tant un conseqüent augment de catenina β lliure, la via de Wnt juga un paper molt important. En algunes cèl·lules epitelials normals o transformades i en algunes cèl·lules de càncer colorectal, la TEM es correlaciona amb la presència de catenina β en el nucli. Estudis genètics en *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans* així com ratolins *knockouts* per gens de membres de la família Wnt han demostrat la implicació d'aquestes molècules en processos tan diversos com la segmentació o la gastrulació i en càncer (Polakis, 2000; Schubert et al., 2002). Tanmateix, la sobreproducció de catenina β no condueix a una TEM (Kim et al., 2000).

També s'ha descrit que la inducció de TEM mediada per TGF- β en els queratinòcits HaCaT activa la quinasa associada a integrines (ILK) (Lee et al., 2004b). ILK és una proteïna serina/treonina quinasa intercel·lular que interacciona amb els dominis citoplasmàtics de les integrines β i nombroses proteïnes associades al citoesquelet. Estudis recents han demostrat que l'expressió d'ILK també és induïda en cèl·lules epitelials tubulars renals durant la TEM mediada per TGF β -1 (Li et al., 2003). Per altra banda, la sobreexpressió d'ILK en cèl·lules epitelials murines de mama inhibeix la diferenciació i causa la pèrdua de molècules d'adhesió com la cadherina E així com l'adquisició de capacitats migratòria i invasiva, induint una TEM (Somasiri et al., 2001). Aquesta disminució de cadherina E s'ha demostrat que és degut a un augment dels nivells de *Snail* i la translocació de β -catenina al nucli (Tan et al., 2001).

La majoria de vies de senyalització finalitzen en el nucli on actuen regulant l'activitat transcripcional de gens específics. Entre ells, alguns factors de transcripció poden considerar-se com a gens *master*, capaços de controlar el procés de TEM. Aquest paper es pot atribuir als activadors transcripcionals Fos i Jun (membres de la família AP-1). En aquest sentit, les cèl·lules epitelials perden el seu fenotip epitelial quan s'activen les proteïnes de fusió induïbles cFos-receptor d'estrogen (cFos-ER) o cJun-ER (Fialka et al., 1996; Reichmann et al., 1992).

Els membres de la família Ets-1 també són candidats a tenir un paper important en la inducció de TEMs. L'expressió d'aquests factors de transcripció s'ha observat en situacions de processos invasius en embrions i en tumors humans. S'ha demostrat que l'expressió d'Ets-1 és transièntment induïda en cèl·lules epitelials durant l'organogènesi temprana en el pollastre (Fafeur et al., 1997). En aquest sentit, el factor de creixement

HGF/SF estimula l'expressió d'Ets-1 en les cèl·lules epitelials MDCK mitjançant la via Ras-Erk/MAPK (Paumelle et al., 2002), promovent la dissociació cel·lular i la motilitat.

NFκB inicialment va ésser descobert com un activador de funcions inflamatòries i immunes, però recentment ha estat implicat en processos de TEM i tumorigènesi (Orlowski and Baldwin, 2002). NFκB pot, en part, induir TEM en cèl·lules epitelials de mama transformades per Ras en absència de TGF-β, suggerint que la senyalització per NFκB podria mediar aspectes importants de la senyalització de TGF-β per induir la TEM en cooperació amb Ras (Huber et al., 2004) A més a més, NFκB sembla ésser necessari per al manteniment del fenotip mesenquimal en cèl·lules que ha sofert una TEM, ja que la inhibició de NFκB reverteix cap al fenotip epitelial (Huber et al., 2004).

Atès que tots els inductors de TEM convergeixen en la pèrdua de l'expressió/funció de la cadherina E, els repressors transcripcionals de la cadherina E juguen un paper principal en la TEM. L'expressió estable d'aquests factors de transcripció en cèl·lules epitelials provoca una conversió fenotípica dramàtica acompanyada de la pèrdua de marcadors epitelials (cadherina E, plakoglobina, etc.) i l'expressió de marcadors mesenquimals (vimentina, fibronectina, etc.), així com l'adquisició de propietats migratòries i invasives. Concretament aquests factors de transcripció són els factors de dits de zinc *Snail* (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000) i *Slug* (Bolos et al., 2003), el factor de dobles dits de zinc SIP-1 (ZEB-2) (Comijn et al., 2001) i els factors bHLH E47 (Perez-Moreno et al., 2001) i *Twist* (Yang et al., 2004).

A la figura I.8 es mostra un esquema dels diferents efectors de la TEM.

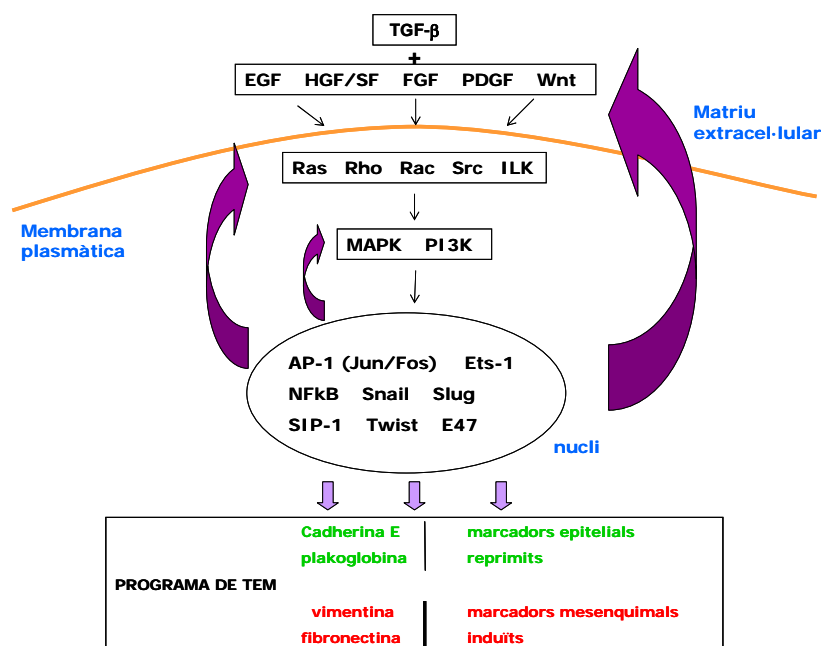


Figura I.8. Inductors i mediadors de la TEM. La sobreexpressió de reguladors *master* com AP-1, Ets-1, NFκB, *Snail*, *Slug*, SIP-1, *Twist* o E47, condueix a canvis dramàtics en el perfil d'expressió gènica i en el comportament cel·lular.

3. CORRELACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE *SNAIL* I E47 AMB LA PROGRESSIÓ TUMORAL

La idea que l'expressió aberrant dels gens de la família *Snail* podria està implicada en progressió tumoral va ser proposada fa uns anys i ha estat refrendada recentment (Nieto, 2002). En aquest sentit, s'ha trobat una correlació inversa en l'expressió de *Snail* i cadherina E en línies tumorals murines i humanes derivades de pell, colon, mama, mucosa oral, hepatocarcinoma i melanoma (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Poser et al., 2001; Yokoyama et al., 2001). L'expressió de *Snail* en aquestes línies també està relacionada amb un augment de la motilitat i la invasivitat *in vitro*. Per altra banda, *Snail* és activat *in vivo* en el front invasiu de tumors escamosos de pell de ratolí (Cano et al., 2000) i també és present en humans en càncer gàstric (Rosivatz et al., 2002), en carcinomes hepatocel·lulars (Cano et al., 2000; Sugimachi et al., 2003) i en carcinomes de mama en què la seva expressió es correlaciona inversament amb el grau de diferenciació dels tumors i és associat amb metàstasis als nòduls limfàtics (Blanco et al., 2002; Cheng et al., 2001). En aquest sentit i refrendant les troballes de la presència de *Snail* en tumors invasius, l'expressió ectòpica de *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK els confereix capacitats tumorigèniques, migratòries i invasives (Cano et al., 2000).

Pel que fa a la implicació del factor de transcripció E47 en la progressió tumoral, és evident que hi participa però depenent del context cel·lular se li ha associat un paper com a supressor o com a promotor de la progressió. Per una banda, la generació de ratolins nuls pel gen E2A ha revelat la seva implicació en limfopoesi ja que la diferenciació de les cèl·lules B en aquests ratolins està completament bloquejada en estadis molt temprans (Bain et al., 1994) provocant defectes severos en la maduració de les cèl·lules T (Bain et al., 1997). A més a més, gairebé tots els ratolins deficientes pel gen E2A desenvolupen limfomes tímics, la qual cosa suggereix que els productes generats per *splicing* alternatiu d'aquest gen exerceixen un paper important en els processos de diferenciació i similar als efectes de les proteïnes supressores de tumors (Bain et al., 1997).

Contràriament, i en un context cel·lular molt diferent, s'ha trobat una correlació inversa entre l'expressió de les proteïnes E2A i de la cadherina E en línies cel·lulars de carcinoma (Perez-Moreno et al., 2001). A més a més, l'expressió exògena i estable d'E47 a les cèl·lules MDCK condueix a una TEM amb l'adquisició de propietats migratòries/invasives i tumorigèniques (Perez-Moreno et al., 2001), suggerint la seva implicació en la progressió tumoral.

4. GENS EFECTORS DELS CANVIS FENOTÍPICS MEDIATS PER *SNAIL* I *E47* I/O LA PÈRDUA DE LA FUNCIÓ DE LA CADHERINA E

Les cèl·lules epitelials que pateixen les TEMs, ja sigui durant el desenvolupament o en la progressió tumoral, tenen en comú la pèrdua del seu fenotip per adoptar un fenotip mesenquimal caracteritzat, entre altres coses, per la capacitat de migrar i envair nous terrenys (Thiery, 2002). Per això, han de penetrar la membrana basal i entrar a l'estroma intersticial. Però per altra banda, han de tenir assegurades altres funcions com la supervivència cel·lular en entorns no propicis (com poden ser els nous teixits que envaeixen) i el control de la proliferació. Això suggereix que les cèl·lules candidates a l'adopció del nou fenotip mediat per l'expressió de *Snail* i/o *E47* hauran de modificar l'expressió de determinats gens que els permetin assolir aquestes fites. Aquests gens són considerats "efectors" dels canvis que es succeiran a la cèl·lula que expressa *Snail* i/o *E47* i que ha perdut la funcionalitat/expressió de la cadherina E. Entorn aquests gens sorgeixen algunes qüestions:

- De quins gens es tracta i quins són els rellevants?
- Com són regulats aquests gens?

Cal suposar que aquests gens són els mateixos i característics de les cèl·lules mesenquimals i en conseqüència els canvis en l'expressió gènica haurien de reflectir **pèrdues** en l'expressió dels gens associats al fenotip epitelial i contràriament **guanys** en l'expressió dels gens associats al fenotip mesenquimal, i en particular relacionats amb la invasió cel·lular.

En aquest sentit, es coneixen alguns gens relacionats amb la invasió que són reprimits directament per la unió de *Snail* a les caixes E dels seus promotors: la mucina epitelial Muc-1 (Guaita et al., 2002); les claudines i les ocludines, que són proteïnes d'adhesió cel·lular i formen part de les unions oclusives (Ikenouchi et al., 2003); i la ciclina D2 (Vega et al., 2004). A part d'aquests gens, no s'ha descrit cap altra diana directa encara. En canvi, mitjançant anàlisis genètics i experiments de sobreexpressió, s'han trobat molts candidats per una regulació directa o indirecta. Els transfectants de *Snail* deixen d'expressar altres marcadors epitelials com la desmoplaquina (Cano et al., 2000) i la citoqueratina 18 (Guaita et al., 2002).

L'expressió ectòpica de *Snail* en cèl·lules epitelials també porta a l'activació de gens, ja sigui directament o indirectament (no es coneixen els mecanismes), alguns dels quals són: marcadors mesenquimals com la vimentina i la fibronectina (Cano et al., 2000); la GTPasa RhoB (del Barrio and Nieto, 2002); algunes metal·loproteases, com MMP-1, MMP-2, MMP-7 i MT-MMP-1 (Miyoshi et al., 2004; Yokoyama et al., 2003); o els

factors de transcripció LEF-1 i ZEB-1 (Guaita et al., 2002). Tots aquests canvis no poden ser subsidiaris a la pèrdua de la cadherina E, ja que la transfecció d'aquesta proteïna no és suficient per induir una reversió completa a una morfologia epitelial, és a dir, una transició mesènquima-epiteli (TME) (Navarro et al., 1993).

Alguns d'aquests gens també podrien ser regulats directament o indirectament per E47, tot i que encara no hi ha gaires treballs fets en aquest sentit. La sobreexpressió d'aquest factor en cèl·lules epitelials també va associada a la repressió de marcadors epitelials com plakoglobina i a l'activació de marcadors mesenquimals com vimentina i fibronectina (Perez-Moreno et al., 2001).

A més a més dels gens relacionats amb la migració i la invasió cel·lular, també serien susceptibles de canvis d'expressió gens implicats en la supervivència i la proliferació cel·lular per tal d'afavorir i consolidar la TEM. En aquest sentit, moltes línies de treball evidencien un paper dels membres de la superfamília Snail en la regulació de la mort cel·lular o supervivència. En línies cel·lulars epitelials transfectades amb *Snail* i en embrions de ratolí i pollastre s'ha vist que l'expressió dels gens Snail confereix resistència a la mort cel·lular induïda per estrès o per senyals proapoptòtics a través de l'activació de les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt (Vega et al., 2004). Durant la gastrulació de *Drosophila*, els canvis morfològics van acompanyats de la inhibició de la mitosi, la qual cosa relaciona la morfogènesi amb la divisió cel·lular i depèn de la funció de *Snail* (Grosshans and Wieschaus, 2000). Això està d'acord amb la baixa proliferació de les cèl·lules que expressen *Snail* (ja sigui en cultiu o en embrions). S'ha demostrat que *Snail* desafavoreix la transició de G1 temprana a G1 tardana mantenint nivells baixos de ciclina D2 i pot bloquejar la transició G1/S incrementant els nivells de p21/Cip1. És a dir, *Snail* afavoreix els canvis morfològics front a la proliferació en cèl·lules que esdevenen migratòries (Vega et al., 2004).

Les proteïnes E2A també contribueixen a la regulació del cicle cel·lular, tot i que el seu paper és controvertit i depèn del tipus cel·lular. Mentre que l'expressió ectòpica del gen E2A en fibroblasts bloqueja la fase G1 (Peverali et al., 1994), en cèl·lules B promou la proliferació cel·lular i està associat a un increment dels nivells de diverses ciclines, incloses les ciclines D2 i D3 (Zhao et al., 2001).

En aquest treball s'analitzarà la regulació de l'expressió dels gens de la metal·loproteasa MMP-9 i del factor HLH Id-1, per la qual cosa ens centrarem en la descripció de diferents aspectes d'aquestes molècules.

5. LA FAMÍLIA DE LES METAL·LOPROTEASES (MMPs): MMP-9

Els organismes multicel·lulars estan constituïts per una sèrie de teixits separats per la matriu extracel·lular (MEC), que constitueixen la membrana basal i l'estroma intersticial. La MEC és molt important per crear l'entorn cel·lular adequat durant el desenvolupament i la morfogènesi. Dóna suport en l'adhesió cel·lular i transmet senyals a través de receptors d'adhesió cel·lular. Consisteix en una xarxa densa de col·làgens, laminines, glicoproteïnes i proteoglicans, juntament amb altres components minoritaris com tenascina i fibronectina (Egeblad and Werb, 2002).

Durant les TEMs que es donen en el desenvolupament i la progressió tumoral, les cèl·lules epitelials perden el seu fenotip per adoptar un fenotip mesenquimal caracteritzat, entre altres coses, per la capacitat de migrar i envair nous terrenys (Thiery, 2002). Les cèl·lules invasives penetren la membrana basal i entren a l'estroma intersticial. Nombrosos estudis han demostrat que perquè una cèl·lula sigui capaç d'envair hi ha d'haver una cooperació espacial i temporal molt estreta entre molècules d'adhesió cel·lular, elements del citoesquelet, proteases de degradació de la MEC i molècules reguladores. S'han identificat diferents classes de proteases que poden degradar la MEC, incloent les serina-, cisteïna-, treonina-, aspàrtic- i metal·lo-proteases (Hanahan and Weinberg, 2000; Stetler-Stevenson and Yu, 2001). La família de les metal·loproteases (MMPs), també anomenades matrixines, tenen el principal paper en el procés d'invasió. Aquestes proteases estan estrictament regulades i juguen un paper crucial en molts processos fisiològics com l'embriogènesi i el remodelatge normal de teixits, però el seu descontrol pot portar a patologies com l'artritis, la fibrosi o el càncer (Egeblad and Werb, 2002; Visse and Nagase, 2003; Vu and Werb, 2000).

5.1. Característiques

El primer membre de la família de les metal·loproteases (MMPs) fou descrit per Gross i Lapiere com una col·lagenasa implicada en la dissolució de la cua del capgròs (Gross and Lapiere, 1962). Actualment es coneixen més de 20 metal·loproteases humanes i les homòlogues d'altres espècies. Històricament, les MMPs es dividien en col·lagenases, gelatinases, estromelisines i matrilisines en base a l'especificitat del component de la MEC que degraden. Però donat que la llista de substrats va creixent,

s'ha adaptat un sistema de numeració seqüencial per les MMPs, que ara s'agrupen segons la seva estructura (Egeblad and Werb, 2002; Wagenaar-Miller et al., 2004) (taula I.2).

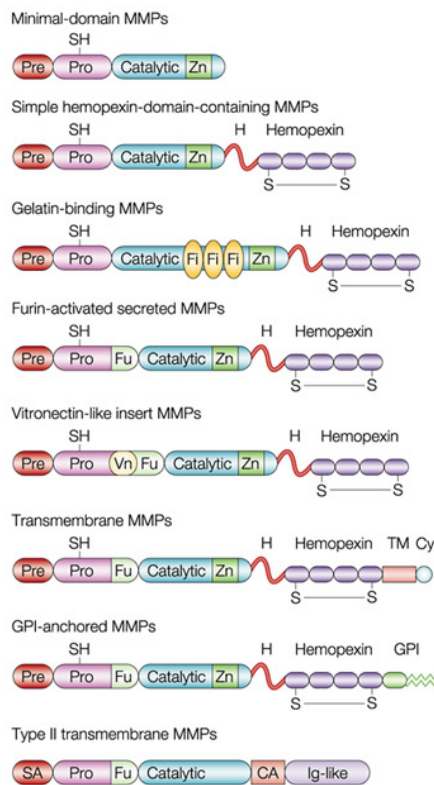
Taula I.2. Classificació de les metal·loproteases de matriu.

Nom	Característiques estructurals	Altres noms
MMP-1	Domini hemopexina simple	Col·lagenasa-1, col·lagenasa intersticial, col·lagenasa de fibroblasts, col·lagenasa de teixit
MMP-2	Domini d'unió a gelatina	Gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, col·lagenasa de tipus II de 72 kDa, gelatinasa de neutròfils
MMP-3	Domini hemopexina simple	Estromelisina-1, transina-1, proteoglicanasa, proteïna activadora de procol·lagenases
MMP-7	Domini mínims	Matrilisina, matrinsa, PUMP1, metal·loproteasa petita uterina
MMP-8	Domini hemopexina simple	Col·lagenasa-2, col·lagenasa de neutròfils, col·lagenasa PMN, col·lagenasa de granulòcits
MMP-9	Domini d'unió a gelatina	Gelatinasa b, gelatinasa de 92 kDa, col·lagenasa de tipus IV de 92 kDa
MMP-10	Domini hemopexina simple	Estromelisina-2, transina-2
MMP-11	Activada per furina i secretada	Estromelisina-3
MMP-12	Domini hemopexina simple	Metal·loelastasa, elastasa de macròfags, metal·loelastasa de macròfags
MMP-13	Domini hemopexina simple	Col·lagenasa-3
MMP-14	Domini de transmembrana	MT1-MMP, MT-MMP-1
MMP-15	Domini de transmembrana a	MT2-MMP, MT-MMP-2
MMP-16	Domini de transmembrana	MT3-MMP, MT-MMP-3
MMP-17	Domini d'unió a GPI	MT4-MMP, MT-MMP4
MMP-18	Domini hemopexina simple	Col·lagenasa-4 (de <i>Xenopus</i> , sense homòleg humà)
MMP-19	Domini hemopexina simple	RASI-1, MMP-18
MMP-20	Domini hemopexina simple	Enamelisina
MMP-21	Insert similar a la vitronectina	Homòleg de XMMP de <i>xenopus</i>
MMP-22	Domini hemopexina simple	CMMP (de pollastre, sense homòleg humà)
MMP-23	Domini de transmembrana de tipus II	CA-MMP, femalisina, MIFR, MMP-21/MMP-22
MMP-24	Domini de transmembrana	MT5-MMP, MT-MMP5
MMP-25	Domini d'unió a GPI	MT6-MMP, MT-MMP6, leucolisina
MMP-26	Domini mínims	Endometasa, matrilisina-2
MMP-27	Domini hemopexina simple	
MMP-28	Activada per furina i secretada	Epilisina
Sense designació	Domini hemopexina simple	Mcol-A (ratolí)
Sense designació	Domini hemopexina simple	Mcol-B (ratolí)
Sense designació	Domini d'unió a gelatina	Gelatinasa de 75 kDa (pollastre)

GPI, glicosilfosfatidilinositol; MMP, metal·loproteasa de matriu; MT-MMP, MMP de membrana; PMN, neutròfil polimorfonuclear; PUMP, metal·loproteasa putativa.

Les MMPs són endopeptidases depenents de zinc que, conjuntament, poden degradar la majoria, sinó tots, dels components de la MEC (Stetler-Stevenson and Yu, 2001; Visse and Nagase, 2003). Es tracta d'una família de proteases que es sintetitzen com a proenzims (zimògens) secretats o transmembranals que són processats a la forma activa per l'alliberació del propèptid aminoterminal. Tots els membres de la família estan compostats almenys d'un predomini aminoterminal, un prodomini i un domini catalític. El predomini sol ser molt ric en aminoàcids hidrofòbics i dirigeix els

enzims al reticle endoplasmàtic per fer possible la seva secreció. El prodomini conté la seqüència altament conservada PRCGVPD que inclou la cisteïna que interacciona amb l'àtom de zinc del centre catalític, mantenint l'enzim en estat inactiu (zimogen). L'activació de la MMP es dona quan s'allibera aquest domini propeptídic. Al domini catalític hi ha el motiu HEXGHXXGXXH que uneix l'àtom de zinc que és necessari per l'activitat enzimàtica. A més a més d'aquests dominis mínims, existeixen dominis addicionals diversament combinats que són importants per l'especificitat de substrat, per l'activació intracel·lular i per la localització enzimàtica (figura I.11) (Stamenkovic, 2000; Wagenaar-Miller et al., 2004).



Egeblad & Werb, 2002

Figura I.11. Estructura esquemàtica dels dominis de les MMPs. Les MMPs es poden dividir en 8 grups estructurals, cinc dels quals són secretats i tres dels quals estan associats a membrana (MT-MMPs). *MMPs secretades*: els dominis mínims són una seqüència senyal que dirigeix cap al reticle endoplasmàtic (Pre), un propèptid (Pro) amb un grup tiol (SH) que interacciona amb el zinc per mantenir la MMP inactiva i un domini catalític que conté un lloc d'unió a zinc (Zn). A més a més, algunes MMPs contenen un domini similar a l'hemopexina que connecta amb el domini catalític mitjançant una "xarnera" (H) i que media la interacció amb altres molècules (inhibidors o substrats). Les gelatinases contenen inserts que s'assemblen a les repeticions que uneixen col·lagen II de la fibronectina (FI). Les MMPs activades per furina tenen un motiu de reconeixement per les proteïnases intracel·lulars semblants a la furina (Fu). Aquest motiu també es troba a les MMPs amb un insert semblant a la vitronectina (Vn) i a les MT-MMPs. *MT-MMPs*: inclouen MMPs que tenen un domini carboxiterminal, un domini transmembrana (TM) i un domini citoplasmàtic (Cy) molt curt, o un domini d'ancoratge glicosilfosfatidilinositol (GPI), o una senyal aminoterminal d'ancoratge (SA), una sèrie de cisteïnes (CA) i dominis similars a les immunoglobulines (Ig).

L'activitat de les MMPs pot ser regulada a diversos nivells per garantir un estricte control: transcripció, activació proteolítica del proenzim i inhibició de l'enzim actiu.

TRANSCRIPCIÓ

Existeixen múltiples factors tals com citocines, factors de creixement, oncogens o canvis en les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-MEC, que poden regular positivament o negativament l'expressió de les MMPs a nivell transcripcional. Les regions promotores de les MMPs contenen un element AP-1 proximal, aproximadament a 70 pb anteriors a l'inici de transcripció, implicat en l'activitat basal i induïda (Fini et al., 1994). També contenen un lloc PEA3 que uneix elements de la família Ets i coopera

amb el lloc AP-1 en l'activació de MMP-1, -3 i -9 (Gum et al., 1996; Vu and Werb, 2000; Westermarck et al., 1997). A més a més, els promotors de les MMPs tenen molts altres elements reguladors *cis* específics de cadascuna, com per exemple un lloc NFκB crucial per l'activació de MMP-9 (Sato and Seiki, 1993).

ACTIVACIÓ PROTEOLÍTICA DEL PROENZIM

Les MMPs són sintetitzades com a precursors inactius (zimògens) i el prodomini de l'enzim ha de ser eliminat per generar una proteïna enzimàticament activa. Les MMPs poden ser activades per proteïnases o per agents químics *in vitro*, tals com agents modificants de grups tiol, glutatió oxidat, SDS, agents caotròpics i oxígens reactius. La majoria d'aquests agents desestabilitzen la interacció de l'àtom de zinc del centre catalític amb la cisteïna del prodomini (Visse and Nagase, 2003). Estudis recents han demostrat que l'òxid de nitrogen (NO) també activa proMMP-9 durant la isquèmia cerebral, la qual cosa és una demostració d'activació química d'una proMMP *in vivo* (Gu et al., 2002).

Es coneixen moltes proteases capaces d'activar proteolíticament les MMPs. L'activació per la plasmina és una via molt important *in vivo*. La plasmina és generada a partir del plasminogen per l'activador tissular del plasminogen (tPA) i per l'activador uroquinasa del plasminogen (uPA). Els dos són proteïnes associades a membrana de manera que l'activació de les proMMPs és localitzada i com a resultat modificaran la MEC pericel·lular. S'ha descrit que la plasmina pot activar proMMP-1, -3, -7, -9, -10 i -13 (Lijnen, 2001).

In vitro les MMPs activades poden participar en el processament d'altres MMPs, i en alguns casos autoactivar-se. En aquest sentit, MMP-1 pot activar proMMP-2, i proMMP-13 pot ser activada per MT1-MMP, MMP-3, -10 i -12, i pot activar proMMP-2 i -9 (Stamenkovic, 2000). El mecanisme d'activació proteolítica més ben estudiat és l'activació de proMMP-2 (gelatinasa B) per MT1-MMP. Aquest model prediu la formació d'un complex ternari a la superfície cel·lular compostat per MT1-MMP, proMMP-2 i l'inhibidor de teixit de MMP-2 (TIMP-2). TIMP-2, que està unit a MT1-MMP fa de receptor de MMP-2, i l'eliminació proteolítica del prodomini de MMP-2 és duta a terme per una molècula MT1-MMP lliure de TIMP-2 (Stanton et al., 1998; Zucker et al., 1998).

La majoria de proMMPs són secretades i activades extracel·lularment, però algunes són activades intracel·lularment. ProMMP-11 (estromelisina 3) és activada intracel·lularment per la furina, ja que conté una seqüència de reconeixement per furina a l'extrem carboxiterminal del propèptid (Pei and Weiss, 1995). Altres MMPs, incloent les MT-MMPs, MMP-23 i -28 també tenen motius bàsics similars en el propèptid (Visse and Nagase, 2003).

INHIBICIÓ DE L'ENZIM ACTIU

Un cop activades, les MMPs poden ser inhibides *in vivo* per inhibidors endògens. Els més ben estudiats són els inhibidors de metal·loproteases específics de teixit (TIMPs). Es coneixen 4 TIMPs en vertebrats (TIMP-1, -2, -3 i -4), i són proteïnes de 21-29 kDa que bloquegen específicament i reversiblement l'activitat de les MMPs unint-se al centre catalític en una relació estequiomètrica 1:1. Tenen diferents afinitats i especificitats. Els TIMPs són produïts per una gran varietat de cèl·lules, incloent queratinòcits, fibroblasts, osteoblasts i cèl·lules endotelials (Gomez et al., 1997). També existeixen inhibidors de MMPs que contenen subdominis d'estructura similar als TIMPs.

Existeixen altres inhibidors com una proteïna molt abundant en plasma, la α 2-macroglobulina, que en unir-se a les MMPs fa que siguin endocitades irreversiblement (Barrett, 1981), o la serina proteasa TFPI-2 (*tissue factor pathway inhibitor-2*) (Herman et al., 2001). Es coneix un únic inhibidor associat a membrana: RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein*) que reprimeix els nivells de MMP-9 i activa MMP-2 (Oh et al., 2001).

5.2. Funcions

Estudis *in vitro* i *in vivo* demostren que les MMPs estan implicades en processos cel·lulars com la migració, la proliferació, la supervivència i la morfogènesi, els quals són essencials per al desenvolupament i la progressió tumoral (Vu and Werb, 2000).

LES MMPs EN LA MIGRACIÓ CEL·LULAR I MORFOGÈNESI

És evident que la MEC presenta una barrera per la migració cel·lular i el fet que les MMPs degradin els seus components fa que siguin clau en la motilitat de les cèl·lules. Utilitzant assajos *in vitro* de migració cel·lular a través de la MEC s'han implicat les MMPs en la migració d'una gran varietat de tipus cel·lulars, com l'epitelial, el mesenquimal i el neuronal (Vu and Werb, 2000). En cultiu, la migració dels queratinòcits sobre col·lagen I requereix la proteòlisi específica d'aquesta molècula mediada per col·lagenases. Per altra banda, inhibidors de MMPs impedeixen aquesta migració i, a més a més, els queratinòcits que no expressen la col·lagenasa-1 no migren sobre aquest substrat (Pilcher et al., 1997).

Les MMPs intervenen en la reparació de ferides. Els queratinòcits del front de la ferida han de migrar i reepiteliaritzar la superfície de la ferida. Alguns estudis de queratinòcits en cultiu mostren que és necessari la intervenció de la MMP-1 perquè migren. A més a més, en ratolins tractats amb inhibidors de MMPs es retarda la reparació de ferides (Lund et al., 1999).

Una acció particular de les MMPs en la morfogènesi és la seva habilitat per afectar l'organització cel·lular. Quan es cultiven adipòcits sobre membranes basals, migren i s'organitzen en grans estructures multicel·lulars. Aquestes cèl·lules secreten MMP-2, i la inhibició de la seva activitat resulta en la inhibició de la migració cel·lular i de l'organització en estructures tridimensionals (Brown et al., 1997). També intervenen en la morfogènesi tubular. Per exemple, la formació d'estructures tubulars per cèl·lules epitelials i endotelials és depenent de MMPs (Fisher et al., 1994; Schnaper et al., 1993).

LES MMPs COM ACTIVADORES DE CITOCINES I FACTORS DE CREIXEMENT

Les MMPs poden regular la bioaccessibilitat de moltes molècules alliberant-les de proteïnes a les que estan unides o de reserves de la MEC, o poden modular l'activitat de molècules activant-les o inactivant-les proteolíticament. Per exemple, MMP-2, -3 i -7 poden tallar la decorina alliberant el TGF- β unit a ella (Imai et al., 1997). El precursor de la interleuquina-1 β (IL-1 β) pot activar-se pel processament mediat per MMP-2, -3 i -9 (Schonbeck et al., 1998). Les MMPs també poden tallar molècules de superfície cel·lular. És el cas de com MMP-2 i -9 que tallen la galectina-3 modificant els dominis de reconeixement de carbohidrats, la qual cosa altera la capacitat d'aquesta molècula de transduir senyals (Ochieng et al., 1994).

LES MMPs EN LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR I L'APOPTOSI

Les interaccions entre els components de la MEC i molècules de la superfície cel·lular regulen el comportament cel·lular. En un entorn canviant, l'habilitat de les cèl·lules per proliferar, sobreviure o diferenciar-se canvia també. Per tant, les MMPs poden alterar el comportament cel·lular a través de la seva acció sobre la MEC. Estudis del paper de les MMPs sobre el comportament cel·lular en cultiu demostren que aquestes proteases intervenen en proliferació, supervivència i apoptosi.

La inhibició de MMP-2 per inhibidors químics o amb anticossos redueix la resposta mitogènica de cèl·lules musculars al factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) (Uzui et al., 2000). Les MMPs també poden regular els senyals de proliferació a través de les integrines indirectament pel seu efecte sobre la MEC (Agrez and Bates, 1994).

MMP-3 indueix apoptosi quan es sobreexpressa en cèl·lules epitelials de mama, probablement degradant la laminina (Alexander et al., 1996). Contràriament, MMP-7 inhibeix l'apoptosi a través del processament del precursor del factor de creixement epidèrmic que uneix heparina (proHB-EFG) generant HB-EFG madur que promou la supervivència cel·lular (Yu et al., 2002).

LES MMPs EN L'ANGIOGÈNESI

L'angiogènesi és molt important, entre altres coses, per al creixement del tumor. Inhibidors endògens i sintètics de les MMPs redueixen l'angiogènesi tumoral (Martin et al., 1999; Oh et al., 2001). Les MMPs també generen fragments que són inhibidors de l'angiogènesi, com per exemple el processament del plasminogen per MMP-2, -3, -7, -9 i -12 que dona lloc a l'angiotastina (Cornelius et al., 1998).

LES MMPs EN LA INVASIÓ I METÀSTASI

El desenvolupament i la progressió tumoral impliquen una sèrie d'obstacles biològics que la cèl·lula ha de superar, ja que ha de migrar del seu lloc d'origen a una regió diferent on diferenciar-se o formar metàstasis, la qual cosa duu a terme mitjançant el procés de TEM. Atès que la MEC és la primera barrera física, s'ha estudiat el possible paper de les MMPs en aquest procés.

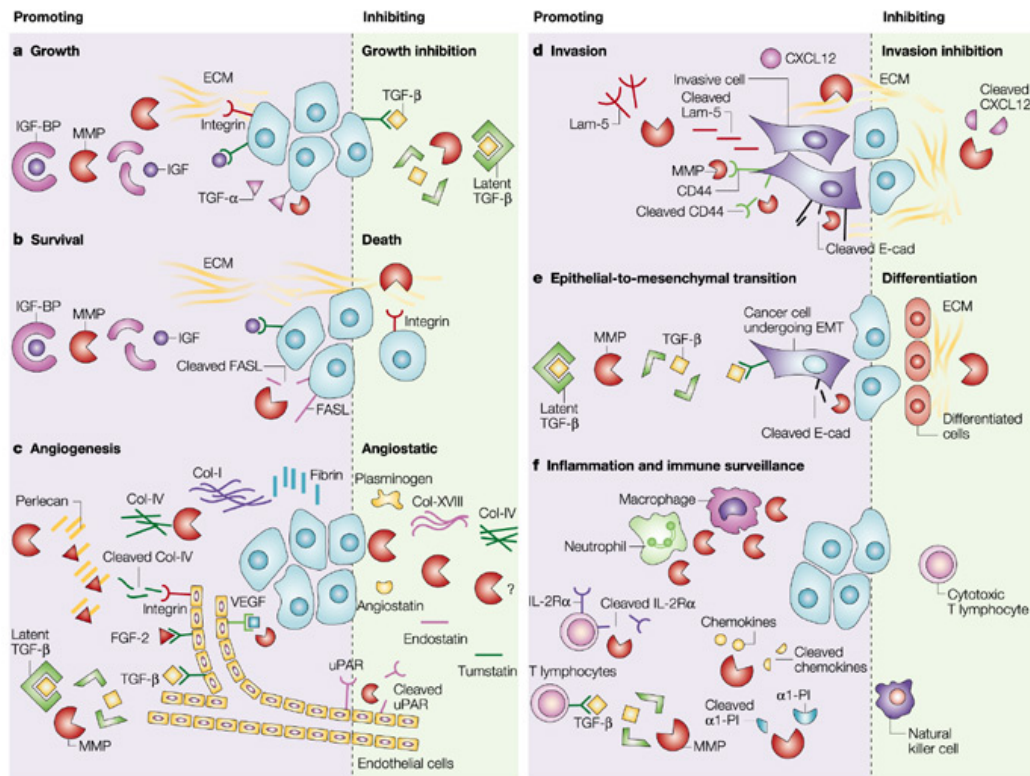
Les primeres indicacions de la importància de les MMPs en la biologia tumoral vénen d'un estudi de l'any 1979 sobre una MMP secretada per una línia cel·lular de melanoma capaç de degradar la membrana basal (Liotta et al., 1979). Això va ser seguit per nombrosos treballs que mostren la correlació directa entre la capacitat invasiva i metastàtica i l'expressió de MMPs. S'han fet assajos d'invasió *in vitro* i s'ha vist que la sobreexpressió de MMP-2, -3, -13 i -14 promou la invasió de línies cel·lulars a través de col·lagen I, d'explants de nervi òptic o de matrigel (Ala-Aho et al., 2002; Belien et al., 1999; Lochter et al., 1997), mentre que la sobreexpressió de TIMPs la inhibeix (Ahonen et al., 1998). En assajos de metàstasis experimentals, el nombre de colònies formades en els pulmons és reduït quan s'inhibeix MMP-9 en un model murí de sarcoma (Hua and Muschel, 1996), i també és reduït en ratolins nuls per MMP-2 i MMP-9 comparat amb els ratolins salvatges (Itoh et al., 1999; Itoh et al., 1998).

En el procés d'invasió, les MMPs no només degraden components de la MEC sinó que també tenen com a substrat molècules d'adhesió cel·lular. CD44 és el principal receptor de l'àcid hialurònic i és tallat per MMP-14, de manera que el domini extracel·lular és alliberat. Quan el lloc de tall de CD44 és mutat, s'inhibeix la migració (Kajita et al., 2001). MMP-3 i MMP-7 tallen la cadherina E de manera que el fragment que s'allibera promou la invasió tumoral *in vitro* (Noe et al., 2001). Durant la invasió, és important la localització de les MMPs en les protusions de superfície especialitzades com els *invadopodia*, la qual cosa s'ha demostrat que passa amb MMP-2, -9 i -14 (Egeblad and Werb, 2002).

Les MMPs participen en els darrers estadis del procés metastàtic, quan les cèl·lules tumorals entren al torrent circulatori, és a dir, en la intravasació, com és el cas de MMP-9 i -14 (Kim et al., 1998). En canvi, les MMPs no són importants en la extravasació (Koop et al., 1994).

Les MMPs també estan implicades en els mecanismes d'evasió del sistema immunològic per part de les cèl·lules tumorals; per exemple, quan activen TGF- β que és un important inhibidor de la resposta dels limfòcits T contra els tumors (Gorelik and Flavell, 2001).

En la figura I.12 es mostra un esquema de les funcions de les MMPs en la progressió tumoral.



Egeblad & Werb, 2002

Figura I.12. Funcions de les MMPs en la progressió tumoral. Les metal·loproteases de matriu (MMPs) tenen funcions promotores i inhibidores del càncer, i algunes vies amb efectes oposats en la progressió tumoral són iniciades per la proteòlisi d'un mateix substrat.

Així doncs, l'expressió i l'activitat de les MMPs està incrementada en la majoria de càncers humans i sovint es correlaciona amb un avançat estadi del tumor, invasió i metàstasi. La majoria d'estudis mostren una associació negativa entre les MMPs i el pronòstic (Egeblad and Werb, 2002; Stamenkovic, 2000; Stetler-Stevenson and Yu, 2001; Wagenaar-Miller et al., 2004).

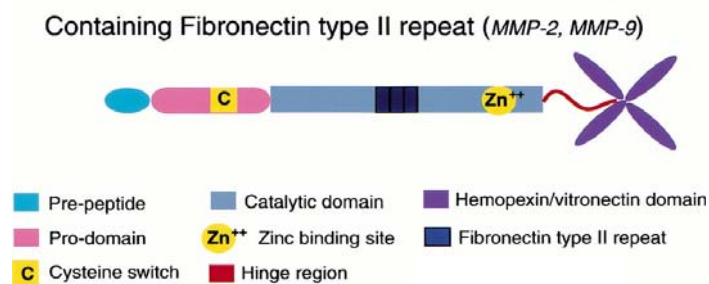
5.3. MMP-9

La MMP-9, també anomenada gelatinasa B o col·lagenasa de tipus IV de 92 kDa, juga un paper molt important en migració i invasió cel·lular, tant en processos fisiològics com patològics, facilitant la destrucció de la membrana basal que separa el

compartiment epitelial de l'estromal (Freije et al., 2003; Fridman et al., 2003; Himelstein et al., 1994).

Juntament amb la MMP-2 formen el grup de les gelatinases ja que són capaces de degradar gelatina (col·làgens desnaturalitzats) i diferents col·làgens nadius; MMP-9 concretament és capaç de digerir col·làgens de tipus I, IV, V i X, a més de laminina i TGF- β latent (Stamenkovic, 2000).

Com la majoria de les MMPs, la MMP-9 és secretada com a proenzim (Wilhelm et al., 1989) i posteriorment activada per múltiples enzims, incloent la catepsina G, la tripsina, la MMP-3 (Okada et al., 1992) i la MMP-2 (Fridman et al., 1995), que alliberen un fragment de 73 aminoàcids de l'extrem aminoterminal de la proteasa. L'enzim actiu presenta cinc dominis: el predomini aminoterminal i el domini catalític, que comparteixen tots els membres de la família de MMPs, un domini semblant a la fibronectina que uneix col·lagen, un domini carboxiterminal semblant a l'hempexina, i un domini únic de 54 aminoàcids ric en prolines homòleg a la cadena $\alpha 2$ del col·lagen V (figura I.13).



Vu & Werb, 2000

Figura I.13. Estructura de la metal·loproteasa 9 (MMP-9). El proenzim MMP-9 conté un predomini aminoterminal (blau clar) i un prodomini (rosa) que conté una cisteïna (C groga) que interacciona amb l'àtom de Zn (Zn^{2+} groc) del domini catalític (blau); aquests dominis són comuns a totes les MMPs. A més a més, presenta un domini semblant a la fibronectina (blau fosc) i un domini semblant a l'hempexina (lila) que interacciona amb el domini catalític mitjançant una "xarnera" (vermell).

5.3.1. Paper de MMP-9 en la progressió tumoral

L'elevada expressió de MMP-9 està associada a un elevat potencial metastàtic en molts tipus de càncer incloent càncer de mama, càncer de pròstata, glioblastoma i melanoma (Hujanen et al., 1994; Jones et al., 1999; Rao et al., 1993; Sehgal et al., 1996). Per exemple, MMP-9 és detectat en el 68% de carcinomes primaris de mama, tant en el compartiment estromal com en cèl·lules adjacents a les cèl·lules tumorals (Jones et al., 1999). En models de tumor de mama de rata el nivell elevat de MMP-9 en sèrum es correlaciona amb metastasis espontànies (Nakajima et al., 1993). L'activitat de MMP-9 és dramàticament més alta en glioblastomes comparat amb els menys

malignes o amb extractes de teixit cerebral normal (Rao et al., 1993). La inhibició de l'expressió i/o l'activitat de MMP-9 en estudis en animals resulta en la reducció de la invasió i metàstasis (Garbisa et al., 1997; Lozonschi et al., 1999).

5.3.2. Regulació de l'expressió de MMP-9

Malgrat la semblança d'estructura i substrat entre MMP-2 i MMP-9, la seva expressió en l'espai i el temps varia molt *in vivo*, la qual cosa indica que tenen funcions diferents. Això és també emfatitzat pels diferents patrons d'expressió de cada enzim. MMP-2 s'expressa en cèl·lules estromals semblants a fibroblasts durant el desenvolupament, mentre que la seva expressió és pràcticament insignificant en l'estroma dels adults (Reponen et al., 1992). En canvi, MMP-9 s'expressa en osteoclasts durant la formació dels ossos en el desenvolupament (Reponen et al., 1994) o en queratinòcits en la reparació de ferides de pell (Salo et al., 1994). En tumors invasius, MMP-2 sovint és expressada per cèl·lules estromals adjacents al tumor però no per cèl·lules tumorals (Salo et al., 1994), mentre que MMP-9 normalment és expressada per cèl·lules tumorals (Egeblad and Werb, 2002).

El gen de MMP-9 humà va ser descrit per primer cop l'any 1991 i mapejat al cromosoma 20 (Huhtala et al., 1991), mentre que el gen murí va ser mapejat en una regió singènica del cromosoma 2 (Masure et al., 1993). Són altament conservats de manera que mantenen la mateixa estructura exó/intró amb només diferències en la llargada dels introns. El gen de MMP-9 té 7.7 kb, conté 13 exons i codifica per un mRNA de 2.5 kb en el cas humà (Huhtala et al., 1991), mentre que en ratolí codifica per dos mRNA, un de 2.5 kb i un de 3.2 kb, que serien productes de diferents senyals de poliadenilació (Masure et al., 1993). El gen de MMP-9 també ha estat clonat i seqüenciat en moltes altres espècies en les que també està altament conservat: conill (Fini et al., 1994), rata (Eberhardt et al., 2000) i gos (Yokota et al., 2001).

La caracterització del promotor de MMP-9 murí per Masure et al. determina que l'inici de transcripció es situa a 25pb anteriors a l'inici de transcripció, mentre que segons Munaut et al. hi ha dos inicis de transcripció, un a -19 i l'altre a -20 (Masure et al., 1993; Munaut et al., 1999). La regió promotora murina, canina i humana presenten una elevada identitat, de manera que es troben els mateixos elements reguladors en posicions gairebé iguals amb alguna excepció, la qual cosa suggereix que la seva regulació transcripcional és similar (figura I.14). De fet, la comparació de les seqüències promotores de diferents espècies mostra la derivació des d'una regió promotora ancestral comuna que ha sofert mutacions donant lloc a l'especificitat d'espècie (Campbell et al., 2001).

Figura 1.14. Alineament de la seqüència del promotor de MMP-9 de diferents espècies: de gos (referència del GenBank AF280420) amb les de conill (referència del GenBank L36050), humà (referència del GenBank M68343), de ratolí (referència del GenBank X72794) i de rata (referència del GenBank AF148065). La posició -1 es va considerar just *upstream* de l'inici de transcripció (ATG) del promotor de gos indicat amb una fletxa. Les regions equivalents en les diferents espècies estan subratllades i inclou: la caixa TATA i dominis NFκB, AP-1, Sp1/caixa GC, PEA3, SRY, Lyf-1, GATA-1 i GATA-2.

L'anàlisi de la seqüència promotora murina ha revelat diferents elements reguladors implicats en la resposta transcripcional basal i induïda de MMP-9. Té un motiu semblant a la caixa TATA o TATA-*like* (TTAAA; posició -23/-19). Cal destacar dos llocs AP-1 (TGAGTCA; posicions -82/-76 i -480/-474) que són reconeguts per membres de les famílies Fos i Jun. El lloc AP-1 situat a -82/-76, altament conservat en totes les espècies, s'ha demostrat que és necessari per l'activitat promotora basal i induïda en cèl·lules tumorals humanes ja que mutacions d'aquest lloc suprimeixen l'activitat (Sato and Seiki, 1993). També hi ha un lloc semblant a AP-1 (TGATTCA; posició -50/-44), que no ha es troba al promotor humà (Munaut et al., 1999).

A més a més de llocs AP-1, hi ha una seqüència consens per AP-2 (CCCCAGGC; posició -598/-591), que no està tan conservada. Mentre que AP-1 és un factor de transcripció ubic, l'expressió de AP-2 és restringida, de manera que seria un bon candidat per contribuir a l'activitat promotora específica de tipus cel·lular. S'ha descrit que AP-2 estimula el promotor de MMP-9 de conill en cèl·lules de còrnia (Fini et al., 1994).

Un altre element molt important és el motiu *kB* (GGAATCCCC; posició -536/-527), que és també altament conservat i actua sinèrgicament amb altres elements reguladors del promotor per participar en l'expressió de MMP-9 (Sato and Seiki, 1993), en particular amb el lloc AP-1 proximal (Gum et al., 1997; Yokoo and Kitamura, 1996). Per altra banda, el lloc *kB* és indispensable per la repressió transcripcional de MMP-9 induïda per TGF-β en monòcits/macròfags (Ogawa et al., 2004).

A més a més, el promotor de MMP-9 murí presenta tres caixes GC (posicions -56/-51, -459/-454 i -603/-598), mentre que l'humà només en té una i el caní quatre. Aquestes regions riques en GC poden ser reconegudes per Sp1 i Sp3. La caixa GC més distal és la més conservada i participa en l'activació del promotor sinèrgicament amb altres elements (Sato and Seiki, 1993). La més proximal també es troba en el promotor de les diferents espècies, excepte en l'humà que conté una caixa GT. El motiu GGGGTGGGG és homòleg a l'anomenat element control del retinoblastoma (RCE), i s'ha demostrat que Sp1 també pot unir-s'hi i estimular la transcripció de promotors que el contenen (Kim et al., 1992). La caixa GT del promotor humà de MMP-9 és essencial en la seva inducció per *v-src* (Sato et al., 1993).

Un altre lloc important és el motiu PEA3 (AGGAAGC; posició -487/-481), que uneix membres de la família Ets; se sap que funciona sinèrgicament amb el lloc AP-1

proximal en el promotor de les col·lagenases (Gum et al., 1996; Gutman and Wasyluk, 1990).

Finalment, així com en l'homòleg humà, la regió promotora murina també presenta un segment microsatèl·lit de residus C i A alternants a la posició -136/-85; en canvi, en el promotor caní i de conill no apareix. La importància d'aquest motiu encara està per determinar ja que existeixen estudis controversos; mentre uns demostren el seu requeriment per l'expressió de MMP-9 (Shimajiri et al., 1999), altres no li atribueixen cap funció (Sato et al., 1993).

Tots aquests motius es troben en el promotor situats entre -1 i -600 pb respecte l'inici de transcripció aproximadament, que és la regió més conservada i la responsable de l'expressió basal i induïda, però, en canvi no semblen estar implicats en l'especificitat de teixit. Existeix un treball que demostra *in vivo* que els elements responsables de l'expressió de MMP-9 en osteoclasts i queratinòcits que migren es troben en la regió entre -2722 i -7745 pb respecte l'inici de transcripció (Munaut et al., 1999).

Totes aquestes seqüències d'unió a factors de transcripció medien la transcripció basal i els efectes d'una sèrie d'agents extracel·lulars que poden regular l'expressió de MMP-9 positivament o negativament, tals com factors de creixement, citocines, ésters de forbol i endotoxines bacterianes. Està descrit que els factors de creixement EGF i amfirregulina estimulen la producció de MMP-9 en la línia cel·lular humana de càncer de mama SKBr3 (Kondapaka et al., 1997), així com també ho fa l'herregulina- β 1 (Yao et al., 2001). EGF i HFG/SF també han estat implicats en l'estimulació de l'expressió de MMP-9 durant la migració de queratinòcits (McCawley et al., 1999). TGF- β activa MMP-9 en cèl·lules de càncer de pròstata i de mama (Samuel et al., 1992; Sehgal and Thompson, 1999; Welch et al., 1990) i en queratinòcits (Caulin et al., 1995). Pel que fa a les citocines inflamatòries, la interleuquina-1 (IL-1) estimula la producció de MMP-9 en condrocits articulars (Lefebvre et al., 1991) i en cèl·lules mesangials (Yokoo and Kitamura, 1996). El factor de necrosi tumoral α (TNF- α) va ser identificat com a inductor de MMP-9 en línies cel·lulars d'osteosarcoma i de fibrosarcoma (Okada et al., 1990; Sato and Seiki, 1993). Els ésters de forbol també estimulen la producció de MMPs mimetitzant l'acció dels factors de creixement i les citocines; per exemple el 12-O-tetradecenoil-forbol-13-acetat (TPA) estimula MMP-9 en la línia HT1080 de fibrosarcoma (Sato and Seiki, 1993). Finalment, algunes endotoxines bacterianes indueixen la producció de MMP-9, com és el cas del liposacàrid (LPS) en macròfags i neutròfils (Jin et al., 1999; Xie et al., 1994).

L'expressió de MMP-9 també està regulada a través dels contactes cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-MEC. Durant la diferenciació de macròfags l'adhesió cel·lular mediada per fibronectina és requerida per la inducció de MMP-9 (Xie et al., 1998). Estudis previs

del nostre laboratori han demostrat que existeix una correlació inversa entre els nivells de cadherina E i de MMP-9 en queratinòcits transformats murins (Llorens et al., 1998). S'ha descrit que la senyalització mediada per cadherina E a través de PI3K podria regular el comportament invasiu de les cèl·lules i la secreció de proteïnases com MMP-9 i uPA (Munshi et al., 2002).

Per altra banda, en cèl·lules humanes de glioma s'ha demostrat que la polimerització de l'actina transdueix senyals que modulen l'expressió de MMP-9 (Chintala et al., 1998).

A més a més, l'expressió de Ras i Src oncogènics indueix l'expressió de MMP-9. L'oncogen Ras és un potent estímul de MMP-9 en cèl·lules embrionàries de rata (Bernhard et al., 1990). Utilitzant tècniques de transfecció de H-Ras activat o oligonucleòtids antisentit s'ha demostrat que l'oncogen Ras és necessari per la inducció de MMP-9 en línies cel·lulars de càncer d'ovari humà (Gum et al., 1996; Shibata et al., 1998). Pel que fa a l'oncogen Src, s'ha descrit que indueix la síntesi de MMP-9 en la línia de fibrosarcoma HT1080 i en fibroblasts NIH-3T3 (Sato et al., 1993).

Tots aquests factors indueixen respostes cel·lulars que activen múltiples vies de senyalització, tals com les MAPKs. S'ha demostrat que l'activació prolongada però no transient de la via Erk/MAPK és responsable de l'estimulació de l'expressió de MMP-9 en queratinòcits (McCawley et al., 1999; Zeigler et al., 1999). Les Erks també indueixen MMP-9 en cèl·lules de glioma (Lakka et al., 2000; Lakka et al., 2002) o en cèl·lules de melanoma (Govindarajan et al., 2003). Per altra banda, s'ha descrit que en cèl·lules humanes de glioblastoma i de càncer escamós oral les vies JNK i Erk cooperen en la inducció de MMP-9 (Gum et al., 1997; Lakka et al., 2000). Les p38/HOG també poden regular l'expressió de MMP-9. La inhibició de la quinasa p38 suprimeix la inducció de la gelatinasa per PMA en cèl·lules de carcinoma escamós de la cavitat oral (Simon et al., 1998), així com per herregulina- β 1 en cèl·lules de càncer de mama (Yao et al., 2001). Finalment, s'ha descrit que la sobreexpressió de la quinasa BMK/MEK5 en càncer de pròstata està associada a la capacitat invasiva i metastàtica i a l'expressió de MMP-9 (Mehta et al., 2003). És a dir, les diferents vies MAPK poden induir l'expressió de MMP-9, depenent de l'estímul que arriba a la cèl·lula i del tipus cel·lular.

S'han descrit altres vies de senyalització responsables de la inducció de MMP-9, com la PI3K, la qual està implicada, per exemple, en l'associació de proMMP-9 a la membrana induïda per EGF en cèl·lules de càncer d'ovari (Ellerbroek et al., 2001).

Atès que el PMA és un conegut inductor de PKC i indueix MMP-9 en cèl·lules tumorals, s'ha suggerit el possible paper de PKC en l'activació de la gelatinasa (Huhtala et al., 1991).

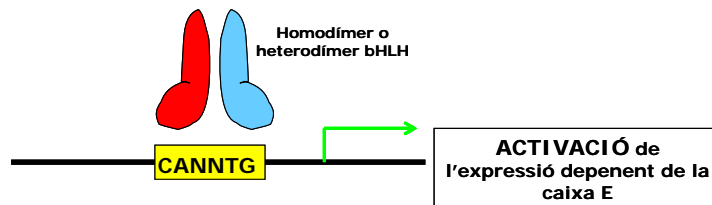
Sovint hi ha implicades en l'activació de MMP-9 múltiples vies de senyalització que actuen sinèrgicament, com en algunes línies cel·lulars humanes de càncer de mama on cooperen les vies de p38, Erk i PKC (Yao et al., 2001).

6. ID-1

6.1. Característiques i funció

Id-1 forma part de la família de proteïnes Id, que són factors HLH de classe V caracteritzats per no tenir domini bàsic d'unió al DNA i que, com tots els membres de la família, funcionen com a dímers. Els heterodímers que formen, principalment amb factors bHLH de classe I i de classe II, no tenen la capacitat d'unir-se al DNA i per tant actuen com a reguladors negatius naturals (figura I.9). Per aquest motiu aquestes proteïnes es van anomenar Id (Inhibidors de la Unió al DNA). A més a més, el nom Id també reflecteix el seu potencial com a inhibidors de la diferenciació (Benezra et al., 1990b). S'han identificat gens que codifiquen per proteïnes Id en diverses espècies des de *Drosophila* fins humans, però no en *S. cerevisiae* ni en *C. elegans*, la qual cosa fa pensar que és una funció evolutivament més tardana (Ruvkun and Hobert, 1998).

(A) Absència de proteïna Id



(B) Presència de proteïna Id

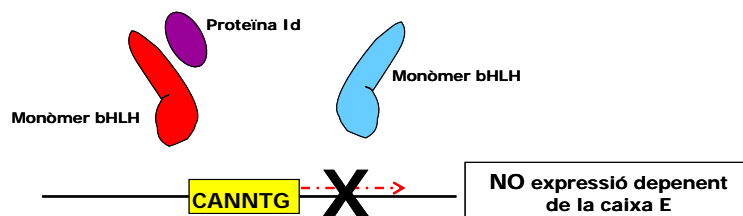


Figura I.9. Les proteïnes Id com a dominants negatius dels factors de transcripció bHLH. Els factors bHLH regulen l'expressió gènica unint-se directament a les caixes E (CANNTG) dels promotors en forma de dímers, però quan interaccionen amb les proteïnes HLH Id, que no tenen el domini bàsic d'unió al DNA, es formen dímers no funcionals.

La primera proteïna Id es va identificar el 1990, i fins ara s'han trobat quatre proteïnes Id (Id1-4) en mamífers (Benezra et al., 1990b; Christy et al., 1991; Riechmann et al., 1994; Sun et al., 1991), codificades per gens individuals situats, almenys en humans, en cromosomes diferents (Norton et al., 1998). A més a més, tots els membres tenen almenys dues formes per *splicing* alternatiu, però la rellevància biològica encara no es coneix. Aquestes proteïnes comparteixen el domini HLH altament conservat i tenen tamanyos similars, entre 13 i 20 kDa, però presenten moltes

diferències en la resta de seqüència. Malgrat que tots els membres de la família Id s'expressen en la majoria d'òrgans i teixits, mostren distints patrons d'expressió estrictament regulats en el temps i l'espai. Mentre que la distribució d'Id-1, -2 i -3 es solapa, Id-4 mostra un únic patró durant l'embriogènesi (Evans and O'Brien, 1993; Riechmann and Sablitzky, 1995).

A més a més d'interaccionar amb factors bHLH de classe I i II, les proteïnes Id també interaccionen amb proteïnes no bHLH, com proteïnes del retinoblastoma (pRB, p107 i p130) (Iavarone et al., 1994; Lasorella et al., 1996), factors de transcripció Pax (*Paired homeobox*) (Sharrocks & Norton, observacions no publicades), la proteïna 1 murina associada a Id-1 (M1DA1) (Shoji et al., 1995) i proteïnes amb dominis Ets (Yates et al., 1999).

Les proteïnes Id són essencials per al desenvolupament. Les primeres evidències que impliquen aquestes proteïnes com a reguladors negatius de la diferenciació vénen d'estudis en els llinatges miogènics i hemapoietics. Es va trobar que la sobreexpressió d'Id-1 en mioblasts portava a la inhibició de la diferenciació muscular a través de la interacció amb proteïnes E prevenint així la transcripció de determinats gens musculars (Benezra et al., 1990a). A causa de la redundància funcional dels quatre membres de la família en mamífers i els seus patrons d'expressió solapats, només els encreuaments entre ratolins nuls per diferents gens Id són letals; per exemple les combinacions entre *knockouts* d'Id1 i Id3 no són viables (Lyden et al., 1999). Així doncs, la inactivació d'un sol gen Id no sembla ser suficient per causar un defecte en el desenvolupament temprà, tal com demostren els ratolins nuls per cada un dels gens Id.

Tot i que les proteïnes Id tradicionalment s'han considerat reguladors negatius de la diferenciació cel·lular, en els darrers anys s'ha vist que també estan implicades en la proliferació cel·lular i en la supervivència cel·lular (Ling et al., 2004; Norton, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003). Les cèl·lules quiescents expressen nivells baixos o nuls dels gens Id mentre que les cèl·lules en proliferació expressen nivells alts. Les proteïnes Id actuen en diferents estadis del cicle cel·lular modulant la transcripció de diversos gens diana coneguts, en alguns casos per interacció directa amb proteïnes no bHLH. (Norton, 2000). Concretament s'han descrit dues vies que associen les proteïnes Id amb el cicle cel·lular:

- La interacció directa d'Id-2 i Id-4 amb proteïnes del retinoblastoma (pRB i les relacionades p107 i p130) (Iavarone et al., 1994; Lasorella et al., 1996).
- La inhibició de l'expressió del gen que codifica p21^{Cip1/Waf1} regulat per les proteïnes E2A. Això s'ha descrit per Id-1, però probablement també ho utilitzen altres membres (Prabhu et al., 1997).

Cal destacar que Id-2, -3 i -4, però no Id-1, són fosforilats per la quinasa 2 dependent de ciclina (CDK2) en la fase G1 tardana, la qual cosa altera l'especificitat de dimerització i és un mecanisme de control temporal de les proteïnes Id (Deed et al., 1997).

Estudis recents suggereixen que les proteïnes Id, especialment Id-1, estan implicades en la regulació de la senescència cel·lular i la immortalització (Alani et al., 1999; Nickoloff et al., 2000). La cotransfecció d'Id-1 amb el factor antiapoptòtic Bcl-2 porta a la immortalització de fibroblasts primaris murins (Norton and Atherton, 1998). Aquests resultats indiquen que Id-1 podria jugar un paper essencial en prolongar la supervivència de cèl·lules normals; tanmateix, el fet que Id-1 per sí sol no sigui capaç d'immortalitzar cèl·lules normals indica que calen factors addicionals per superar la senescència replicativa (Ling et al., 2004).

6.2. Implicació d'Id-1 en la progressió tumoral

El fet que les proteïnes Id regulin positivament la proliferació i la supervivència de cèl·lules normals, especialment després del seu efecte inhibitori sobre les vies dels supressors de tumors p53 i Rb, ha focalitzat el seu estudi en l'associació amb la tumorigènesi (Lasorella et al., 2001; Norton, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003).

En els darrers anys s'ha trobat que les proteïnes Id estan sobreexpressades en molts tumors humans, majoritàriament d'origen epitelial (Hasskarl and Munger, 2002; Lasorella et al., 2001; Ling et al., 2004). La sobreexpressió de proteïnes Id sol estar correlacionada amb un grau histològic pobre o moderat (poc diferenciat) i amb un mal pronòstic (Schindl et al., 2001; Schoppmann et al., 2003).

Generalment el membre de la família Id que es troba sobreexpressat en la majoria de tumors humans és Id-1. Així com la funció d'Id-1 en el desenvolupament és redundant amb la d'altres membres de la família i per tant no és essencial, el seu paper en promoure la supervivència cel·lular i la transformació maligne sol ser únic. S'ha descrit que l'expressió dirigida d'Id-1 en l'epiteli de l'intestí prim de ratolins adults resulta en el desenvolupament d'adenomes (Wice and Gordon, 1998).

Atès que nivells alts d'Id-1 es correlacionen amb estadis avançats del càncer (Lin et al., 2000; Ouyang et al., 2002) i que s'ha implicat en proliferació, angiogènesi, invasió i supervivència cel·lular, com es descriu a continuació, s'ha suggerit que podria jugar un paper important en la progressió tumoral.

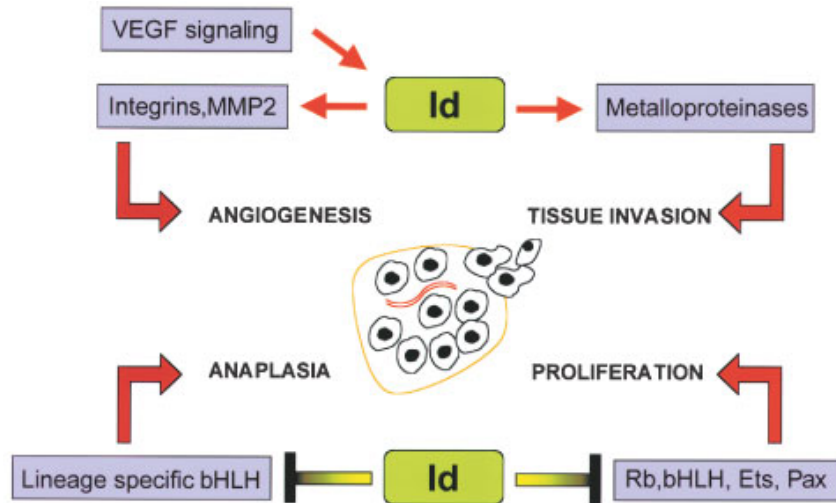
Els primers estudis de l'expressió forçada d'Id-1 en línies cel·lulars de fibroblasts immortalitzades mostraven que causava la disrupció de l'organització del citoesquelet i la pèrdua d'adhesió (Deed et al., 1993). La primera evidència de la

implicació d'Id-1 en invasió cel·lular es va trobar en cèl·lules murines epitelials de mama immortalitzades, les SCp2, en les que l'expressió ectòpica d'Id-1 incrementa la seva capacitat d'envair la membrana basal gràcies a la secreció d'una gelatinasa de 120 kDa (Desprez et al., 1998). En aquest sentit, s'ha observat que l'expressió d'Id-1 és més elevada en línies cel·lulars de càncer de mama més agressives (en termes d'estadi de diferenciació i capacitat d'invasió), com les MDA-MB-231 i MDA-MB-435, que en les línies menys agressives MCF7 i T47D. A més a més, l'expressió ectòpica d'Id-1 en les cèl·lules T47D augmenta el creixement cel·lular i la capacitat d'invasió i redueix la dependència d'hormones (Lin et al., 2000). Recentment, utilitzant tecnologia antisentit, la inhibició de l'expressió d'Id-1 és capaç de reduir les metàstasis a pulmó de cèl·lules de càncer de mama de procedència humana (MDA-MB-231) xenotrasplantades a ratolins immunocompetents (Balb/c *nude mice*) (Fong et al., 2003), la qual cosa indicaria que la inhibició d'Id-1 podria ser una bona estratègia terapèutica en les metàstasis de càncer de mama.

Id-1 també s'ha implicat en apoptosi o contràriament en afavorir la supervivència cel·lular, segons el tipus cel·lular i el context. Per una banda, en alguns estudis amb cèl·lules normals, principalment d'origen no epitelial, s'ha descrit que Id-1 indueix apoptosi (Kim et al., 1999; Tanaka et al., 1998b), mentre que en cèl·lules epitelials, normals o tumorals, Id-1 seria antiapoptòtic. Per exemple, en cèl·lules de càncer de pròstata, Id-1 protegeix de l'apoptosi en part a través de l'activació de la via de NFκB, que participa en la regulació de gens amb funcions antiapoptòtiques, com Bcl-xl (Ling et al., 2003).

Id-1 i Id-3 també estarien implicats en angiogènesi, en base al fet que els dobles *knockouts* no són viables a causa d'una vascularització aberrant. A més a més, els tumors capaços de créixer o metastitzar en ratolins nuls per un d'aquests gens presenten defectes en vascularització i una necrosi elevada (Lyden et al., 1999). Segons un estudi, Id-1 és un potent repressor transcripcional de la trombospondina que és un inhibidor de l'angiogènesi (Fernandez-Garcia et al., 2005; Volpert et al., 2002).

A la figura I.10. es mostra un esquema de les funcions de les proteïnes Id en la progressió tumoral.



Lasorella et al., 2001

Figura 1.10. La senyalització per Id controla múltiples etapes del càncer. Les proteïnes Id inactiven factors bHLH i inhibeixen la diferenciació. També alteren les vies antiproliferatives i promouen la proliferació. Actuant com a mediadors de la senyalització per VEGF, les proteïnes Id permeten la mobilització de precursors angiogènics i el reclutament de veïns endotelials. Les proteïnes Id també estimulen la producció de metalloproteïnases per facilitar la invasió.

6.3. Regulació de l'expressió d'Id-1

Com molts altres reguladors del cicle cel·lular, els gens Id són gens immediats temprans, responedors a mitògens i altament expressats en tractaments amb sèrum. S'ha descrit en fibroblasts i cèl·lules musculars que la resposta d'Id-1 al sèrum és controlada en part per un complex multiproteic que conté Egr-1, un gen de resposta temprana (Tournay and Benezra, 1996).

És interessant el fet que els promotors dels gens Id contenen diverses caixes E, la qual cosa fa que puguin ser potencialment regulats pels mateixos factors bHLH, en un possible mecanisme de *feedback*. Recentment, s'ha publicat que Id-1 és un gen diana del factor bHLH/LZ c-myc en les cèl·lules humanes de càncer de mama MCF-7 i T47D (Swarbrick et al., 2005).

Altres estudis de la regulació transcripcional d'Id-1 en cèl·lules tumorals de mama han identificat una petita regió de 31 pb a l'extrem 3' del seu promotor responsable de la seva repressió en cèl·lules poc agressives. Aquest element conté un lloc consens d'unió al factor de transcripció NF1, el qual recluta els repressors transcripcionals HDAC-1 i pRb. Per contra, les cèl·lules altament agressives no expressen NF1 i per tant són incapaces de reclutar repressors a aquesta regió del promotor (Singh et al., 2002).

Un altre mecanisme de regulació de l'expressió del gen Id-1 en cèl·lules tumorals de mama està relacionat amb els factors BMP, i per tant amb la superfamília TGF- β . Id-1 sembla ser un gen dependent de BMP-2, el qual indueix la seva expressió

probablement a través de la unió de Smad 1/4 a diferents motius SBE (elements d'unió a Smad) situats a aproximadament 1 kb abans de l'inici de transcripció (Katagiri et al., 1994; Ogata et al., 1993). Per altra banda, s'ha descrit que TGF- β reprimeix Id-1 en cèl·lules epitelials, la qual cosa requereix la síntesi del factor de transcripció ATF3 que s'associa a Smad 3/4 formant un complex que s'uneix a la mateixa regió que els efectors de BMP-2 (Kang et al., 2003).

En canvi, es coneix molt poc sobre les vies de senyalització que associen l'expressió d'Id amb senyals extracel·lulars. S'ha descrit en alguns sistemes cel·lulars que la via Erk/MAPK està implicada en la regulació de l'expressió d'Id-1 i Id-3 està a (Bain et al., 2001; Ling et al., 2002).

L'estat de fosforilació de les proteïnes Id pot regular el grau d'especificitat d'interacció amb les proteïnes E2A (Deed et al., 1994). Com ja s'ha comentat, Id-2, -3 i -4 poden ser substrats de les quinases dependents de ciclina, com CDK2, però a més a més tenen llocs putatius de fosforilació per moltes altres quinases. Id-1 i -2 poden ser fosforilats *in vitro* per la proteïna quinasa dependent de cAMP i Id-1, -2 i -3 poden ser fosforilats per la proteïna quinasa C (PKC), però la fosforilació mediada per aquestes dues quinases no afecta la capacitat de dimeritzar amb E47 (Nagata et al., 1995).

Per últim, els nivells intracel·lulars de les proteïnes Id són regulats per la via de degradació ubiquitina/proteosoma (Bounpheng et al., 1999), tenint una vida mitja curta, de 20 a 60 minuts, que pot allargar-se gràcies a l'heterodimerització amb proteïnes bHLH ja que d'aquesta manera són menys susceptibles a ser degradades (Bounpheng et al., 1999; Deed et al., 1996). Per altra banda, també són regulades per la localització subcel·lular. A diferència dels factors bHLH, les proteïnes Id no tenen senyals de localització nuclear. En el citoplasma, els factors bHLH poden heterodimeritzar amb elles i actuar com a xaperones nuclears (Deed et al., 1996).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La pèrdua de les funcions de la cadherina E és un event essencial perquè es doni el procés de *transició epitel·li-mesènquima* (TEM) durant el qual les cèl·lules epitelials perden el seu fenotip per adoptar-ne un de similar al de les cèl·lules mesenquimals (Boyer et al., 2000; Hay, 1995; Thiery, 2002). Aquest és un fet comú que té lloc durant el desenvolupament embrionari (Hay, 1995) o bé en processos patològics com la progressió tumoral en molts carcinomes (Birchmeier et al., 1993) que implica l'adquisició d'un fenotip invasiu i metastàtic.

Aquesta conversió fenotípica té lloc gràcies a canvis d'expressió gènica que comporten la pèrdua de marcadors epitelials com la cadherina E i la plakoglobina i el guany de marcadors mesenquimals com la vimentina i la fibronectina (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Es creu que la pèrdua de les funcions de la cadherina E actua com a iniciadora o bé com a detonant dels canvis successius que tindran lloc els quals afectaran a molts altres gens i funcions cel·lulars pròpies del nou fenotip mesenquimal (Behrens et al., 1989; Birchmeier et al., 1993; Imhof et al., 1983; Perl et al., 1998).

Atès que els factors de transcripció E47 (de la família *basic helix-loop-helix*, bHLH) i *Snail* (factor amb dits de zinc) són, entre d'altres, uns eficients repressors transcripcionals directes de la cadherina E capaços de desencadenar una TEM completa (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001), es suggereix que ambdós factors de manera directa (per exemple augmentant o disminuint l'activitat transcripcional) o indirecta (com a conseqüència de la pèrdua de les funcions de la cadherina E) siguin els responsables dels canvis d'expressió gènica. A favor d'aquesta hipòtesi s'ha descrit la regulació transcripcional de gens com el de la mucina 1 (Guaita et al., 2002), la ciclina D2 (Vega et al., 2004), etc., regulats per *Snail*, i per altra banda la suporten diversos estudis de perfils d'expressió durant les TEMs (Kierner et al., 2001) (Jechlinger et al., 2003; Zavadil et al., 2001) indicant la correlació directa o inversa entre l'expressió de *Snail* o E47 amb d'altres gens.

Dit això i atesa la magnitud del canvi que suposa l'adquisició d'un fenotip tant diferent, moltes altres alteracions en l'expressió de gens concrets són esperables. Quins són aquests gens i quina és la seva contribució al canvi fenotípic així com quin és el mecanisme que provoca els canvis en llur expressió són, entre d'altres, qüestions encara no resoltes ara per ara.

En aquest sentit les cèl·lules MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) que *in vitro* mantenen les característiques epitelials (adhesions intercel·lulars, polaritat àpico-basal, etc.) són un sistema adequat per l'estudi de les TEMs, atès que els canvis fenotípics provocats per l'expressió ectòpica dels factors E47 o *Snail* indueixen un fenotip invasor i

migratori (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001) que podria permetre la identificació dels gens involucrats en aquest procés.

Per altra banda, la metal·loproteasa MMP-9 (Himmelstein et al., 1994; Stamenkovic, 2000) i el factor de transcripció HLH Id-1 (Benezra et al., 1990b) són candidats a formar part d'aquest grup de gens que canvien la seva expressió durant les TEMs. Així i en el cas de MMP-9 ho suggereixen troballes prèvies del nostre laboratori (Llorens et al., 1998) i estudis publicats que indiquen la correlació entre l'expressió de MMPs i *Snail* (Miyoshi et al., 2004; Yokoyama et al., 2003). Pel que fa a Id-1, atès que és un inhibidor de la unió de factors bHLH com E47 a les regions promotores de gens com la cadherina E, i també se li atribueix un paper proangiogènic (Lyden et al., 1999; Volpert et al., 2002), antiapoptòtic (Ling et al., 2003) i proinvasiu (Desprez et al., 1998), podria ser un gen implicat en les TEMs. A més a més, s'ha trobat sobreexpressat en molts carcinomes (Lin et al., 2000; Ouyang et al., 2002).

En base a això, ens plantegem la següent **hipòtesi**:

La TEM mediada pels factors de transcripció E47 i Snail a les cèl·lules epitelials MDCK implica canvis en l'expressió de gens associats al fenotip invasiu i migratori. La metal·loproteasa MMP-9 i el factor de transcripció HLH Id-1 són, entre d'altres, gens diana d'E47 i Snail en les TEMs, contribuint al fenotip invasiu i migratori.

L'expressió aberrant d'aquests gens és conseqüència de l'activació transcripcional per interacció directa d'aquests factors de transcripció amb les regions promotores i/o de l'activació transcripcional mediada per vies de senyalització específicament activades en la TEM.

La comprovació d'aquestes hipòtesis es fonamentarà en els **objectius** següents:

En el model epitelial de TEM que inclou les cèl·lules MDCK (*Madin Darvy Canine Kidney*), que mantenen *in vitro* les característiques pròpies de les cèl·lules epitelials, i les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail obtingudes després d'expressar ectòpicament els factors de transcripció E47 i *Snail* murins, respectivament:

1. Analitzar els perfils d'expressió gènica en la transició epiteli-mesènquima induïda pels factors de transcripció E47 o *Snail* mitjançant les tècniques de RAP-PCR i *microarrays* de cDNA. Identificar gens relacionats amb la invasió/migració.
2. Comprovar i estudiar els mecanismes d'expressió diferencial del gens MMP-9 i Id-1 en la transició epiteli-mesènquima induïda pels factors de transcripció E47 o *Snail*.
 - 2.1 Anàlisi de l'expressió a nivell de proteïna i de mRNA de MMP-9 i Id-1.
 - 2.2 Anàlisi de l'activitat transcripcional dels gens de MMP-9 i Id-1. Identificació i funcionalitat dels elements reguladors presents a les regions promotores, i en especial les caixes E. Contribució de les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt.
 - 2.3 Anàlisi de la implicació de l'oncogen Ras en l'activació de la transcripció de MMP-9 i Id-1.

MATERIAL I MÈTODES

1. PLÀSMIDS EMPRATS I OBTENCIÓ

La descripció dels plàsmids emprats en aquest treball es resumeix en la taules M.1 i M.2, on també s'indica la seva utilització en diferents sistemes experimentals així com les dianes de clonatge.

Vectors d'expressió

Taula M.1. Descripció dels plàsmids d'expressió utilitzats en aquest treball.

<i>Plàsmids</i>	<i>Ús</i>	<i>Origen</i>	<i>Vector de clonatge</i>	<i>Obtenció</i>	<i>Dianes de clonatge¹</i>
pcDNA3-E47 pcDNA3-Snail	Vectors d'expressió en cèl·lules eucariotes	Cedit per la Dra. A. Cano	pcDNA3 pcDNA3		EcoRI/XhoI XhoI/NotI
pRC-Sp1		Cedit pel Dr. R. Tjian	pRC		BglII/SmaI
pCELF-RasV12 pCELF-RasN17 pMycCMV-Erk2-MEK1		Cedit pel Dr. P. Crespo	pCELF pCELF pMycCMV		KpnI/Hind III
pcDNA3-MEK1-DN pGEMT-Ets1		Cedit per la Dra. A. Aranda	pcDNA3 pGEMT		NotI
pCMVTAG-Sp1wt pCMVTAG -Sp1T435A pCMVTAG -Sp1T739A pCMVTAG -Sp1DM		Cedit pel Dr. G. Pages	pCMVTAG pCMVTAG pCMVTAG pCMVTAG		NotI/EcoRI NotI/EcoRI NotI/EcoRI NotI/EcoRI
pSuperior-siSnail	Vectors d'expressió siRNA en cèl·lules eucariotes	Cedit per la Dra. A. Cano	pSuperior-Puro (Oligoengine)	Es va dissenyar un oligonucleòtid-19mer siRNA complementari a la regió aminoterminal del mRNA del primer dit de zinc de <i>Snail</i> murí (posició des de 573 fins 591 en el cDNA murí, referència del GenBank NM011247) i es va clonar en el vector pSuperior-Puro.	

¹ Els enzims de restricció han estat subministrats per Biolabs i Roche.

Vectors reporters per l'anàlisi de l'activitat promotora

Els vectors reporters (o construccions promotores) generats en aquest treball corresponen als emprats en l'anàlisi de l'activitat transcripcional del gen murí MMP-9 i del gen humà Id-1, i contenen la seqüència promotora de cadascun així com mutants de deleció o mutants puntuals (taula M.2).

Taula M.2. Descripció dels vectors reporters per l'anàlisi de l'activitat promotora.

Plàsmids	Origen	Vector de clonatge	Obtenció	Dianes de clonatge ¹	Oligonucleòtids ²
<u>Promotor MMP-9 murí</u> pMMP9-1170luc pMMP9-808luc pMMP9-588luc pMMP9-389luc pMMP9-117luc pMMP9-97luc pMMP9-75luc	Generats al laboratori	pGL2-basic pGL2-basic pGL2-basic pGL2-basic pGL2-basic pGL2-basic pGL2-basic	Promotor amplificat per PCR amb oligonucleòtids específics, clonat en el vector pCR2.1 del kit <i>TA cloning Vector Kit</i> (Invitrogen) i subclonat en el vector pGL2-baisc (Promega) en les dianes indicades. Les construccions de deleció es van obtenir de la mateixa manera a partir de la construcció llarga.	KpnI/XhoI KpnI/XhoI KpnI/XhoI KpnI/XhoI HindIII/XhoI HindIII/XhoI KpnI/XhoI	pMMP9-1170 5'/pMMP9+142 3' pMMP9-808 5'/pMMP9+142 3' pMMP9-588 5'/pMMP9+142 3' pMMP9-389 5'/pMMP9+142 3' pMMP9-117 5'/pMMP9+142 3' pMMP9-97 5'/pMMP9+142 3' pMMP9-75 5'/pMMP9+142 3'
pMMP9-97 ^{m89/87} luc (mutant) pMMP9-97 ^{m85/82} luc (mutant)		pGL2-basic pGL2-basic	Les formes mutades de la construcció pMMP9-97luc es van obtenir per PCR amb oligonucleòtids específics a partir de la construcció salvatge introduint mutacions puntuals en les posicions indicades ³ .	KpnI/XhoI KpnI/XhoI	pMMP9-mut89/87 5' /pMMP9-mut89/87 3' pMMP9-mut85/82 5' /pMMP9-mut85/82 3'
<u>Promotor d'Id-1 humà</u> proId-1370luc proId-1046luc	Cedit pel Dr. F.Ventura	pGL2-basic pGL2-basic		SacI/XhoI SacI/XhoI	
proId-1179luc	Generat al laboratori	pGL2-basic	Construcció de deleció obtinguda a partir de la construcció proId-1370luc de la mateixa manera que els mutants de deleció del promotor de MMP-9.	KpnI/XhoI	proId-1179 5'/proId+86 3'
proId-1370 EboxM-luc (mutant) proId-1779 Sp1M.luc (mutant)		pGL2-basic pGL2-basic	Les formes mutades de les construccions proId-1370 i proId-1179 van ser obtingudes de la mateixa manera que els mutants del promotor de MMP-9 ³ .	SacI/XhoI KpnI/XhoI	proId-EboxM 5'/proId-EboxM 3' proId-Sp1M 5'/proId-Sp1M 3'
<u>Mesura de l'eficàcia de transfecció</u> pRenillaLuciferasa-TK	Promega	pRL-TK			
pAc5.1/V5-His/lacZ	Cedit pel Dr. M. Fernández	pAc5.1/V5-His		KpnI/NotI	

¹ Els enzims de restricció han estat subministrats per Biolabs i Roche.

² La seqüència dels oligonucleòtids utilitzats per amplificar els diferents fragments del promotor es mostra a les taules M.3, M.4, M.5 i M.6.

³ En l'apartat "mutagènesi dirigida" s'explica més detalladament l'obtenció de les formes mutades

La seqüència promotora del gen murí MMP-9 (referència del GenBank AF403768) es va obtenir mitjançant PCR amb encebadors específics (taula M.3) a partir del DNA genòmic de la línia cel·lular de carcinoma escamós de pell Haca4 (Llorens et al., 1998) i comprèn la regió que va des de -1170 pb fins a +142 pb respecte al lloc d'inici de transcripció. Es va fer servir de motlle per generar els mutants de deleció.

El vector que conté la seqüència promotora del gen Id-1 (referència del GenBank US7645) va ser cedit pel Dr. F. Ventura (Facultat de Medicina, UB, Campus de Bellvitge, Barcelona, Espanya) i comprèn la regió que va des de -1370 pb fins a +86 pb respecte al lloc d'inici de transcripció (Lopez-Rovira et al., 2002). Es va fer servir de motlle per generar els mutants de deleció.

Mutants de deleció

Els mutants de deleció van ser obtinguts per PCR emprant els encebadors específics de les taules M3 i M4.

Taula M.3. Encebadors emprats pel clonatge dels diferents mutants de deleció del promotor de MMP-9 murí.

<i>Nom</i>	<i>Seqüència</i>	<i>Tamany producte PCR (pb)</i>
pMMP9-1170 5'	5' TGG GAG AAC ACC CAG CTC TCT C 3'	1312
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTG TCC G 3'	
pMMP9-808 5'	5' GGA GCT AGG GGT TTG CCC 3'	950
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTGTCC G 3'	
pMMP9-588 5'	5' GGA GCT AGG GGT TTG CCC 3'	730
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTG TCC G 3'	
pMMP9-389 5'	5' GGT CTC GGG CCT CAG GTC TC 3'	531
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTG TCC G 3'	
pMMP9-117 5'	5' ACA CAC ACG CTG AGT CAG GCA TA 3'	259
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTG TCC G 3'	
pMMP9-97 5'	5' TAA GCC TGG AGG GGA GGG GCG G 3'	239
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTG TCC G 3'	
pMMP9-75 5'	5' GGT CAC TGA TTC CGT TTT A 3'	217
pMMP9+142 3'	5' CTC TGC CAG CTG GTG TCC G 3'	

Taula M.4. Encebadors emprats pel clonatge del mutant de deleció del promotor d'Id-1.

<i>Nom</i>	<i>Seqüència</i>	<i>Tamany producte PCR (pb)</i>
proId-1179 5'	5' AGC GGT GAA GAA ACC CCA AG 3'	1265
proId+86 3'	5' ACT GGC TGA ACA GAA TGG G 3'	

Mutagènesi dirigida

Els mutants puntuals es van fer mitjançant mutagènesi dirigida, tècnica que permet introduir mutacions puntuals exactament en els nucleòtids d'interès. Es basa en una PCR utilitzant una Taq polimerasa d'alta fidelitat i capaç d'amplificar fragments de DNA de molta llargada. Per això, es va preparar la següent reacció de mescla:

Components	Concentració final
Tampó 10X ¹	1X
dNTPs	2,5 mM
MgCl ₂	0,45 mM
Encebador F	2,5 ng/μL
Encebador R	2,5 ng/μL
Pfu Turbo- DNA polimerasa	0,05 U/μL
DNA motlle	0,2 ng/μL
H ₂ O	

¹ Tampó subministrat juntament amb la Taq Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU): Tris-HCl 200 mM (pH 8,8), MgSO₄ 20 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Tritó X-100 1%, BSA 1 mg/mL

Les condicions de la PCR van ser les següents:

95°C	5 min	
95°C	30 s	
50°C	1 min	18 cicles
68°C	12 min	
68°C	12 min	

El producte de PCR és tractat amb l'enzim de restricció DpnI (Roche, Mannheim, Alemanya) a 37°C durant 2 hores. DpnI reconeix la diana 5' Gm⁶ATC 3' i és específic per DNA metilat i semimetilat, de manera que es va emprar per digerir el DNA parental motlle i seleccionar el DNA sintetitzat que conté la mutació.

Els encebadors utilitzats per obtenir les seqüències promotores mutades es mostren a les taules M.5 i M.6.

M.5. Encebadors per als mutants puntuals del promotor de MMP-9 murí.

Nom	Seqüència
pMMP9-mut89/87 5'	5' TAA GCC TGA AtG GGA GGG GCG G 3'
pMMP9-mut89/87 3'	5' CCG CCC CTC CCa TtC AGG CTT A 3'
pMMP9-mut85/82 5'	5' TAA GCC TGG AGG tGA tGG GCG G 3'
pMMP9-mut85/82 3'	5' CCG CCC aTC aCC TCC AGG CTT A 3'

M.6. Encebadors per als mutants puntuals del promotor d'Id-1 humà.

<i>Nom</i>	<i>Seqüència</i>
proId-EboxM 5'	5' GAG ACT CGt tGG TGT GGG GCG G 3'
proId-EboxM 3'	5' CCG CCC CAC ACC aaC GAG TCT C 3'
proId-Sp1M 5'	5' CTC GCA GGT GTG GtG Ctt GGA GGT AAG GTG 3'
proId-Sp1M 3'	5' CAC CTT ACC TCC aaG CaC CAC ACC TGC CAG 3'

Vectors d'expressió bacterians per proteïnes de fusió

Els vectors d'expressió bacterians pGEX4T1 i pGEX4T1-E47 per l'obtenció de proteïnes de fusió van ser cedits per la Dra. A. Cano.

Expressió i purificació de proteïnes de fusió

La inducció i purificació de les proteïnes GST (glutatió S-Transferasa) i GST-E47 es van dur a terme seguint els protocols convencionals. Breument, el plàsmid pGEX4T1-E47 i el control pGEX4T1 (de la proteïna GST) van ser expressats en *Escherichia coli* induïts amb IPTG (isopropiltio-β-D-galactòsid) generant-se les corresponents proteïnes de fusió. Després de la llisi dels bacteris per sonicació, les proteïnes de fusió es van purificar per cromatografia d'afinitat amb columnes de glutatió sefarosa comercials (*Glutathion-Sepharosa 4B*, Amersham Biosciences, Upsala, Suècia) i es van guardar al·liquotades a -80°C.

Transformació bacteriana

Un cop obtinguts els diferents plàsmids, es van transformar segons el protocol convencional descrit a *Basic methods in molecular biology* (Davis et al., 1986).

Aïllament del DNA dels plàsmids i comprovació

El DNA plasmídic a petita escala (*miniprep*) es va purificar mitjançant el kit *GFX Micro Plasmid Prep kit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Regne Unit).

Per obtenir major quantitat de DNA plasmídic per utilitzar en l'anàlisi de l'activitat promotora, es va realitzar una purificació a gran escala (*maxiprep*) amb el kit *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanya).

Seqüenciació

Totes les construccions van ser seqüenciades per comprovar que eren correctes. Així, es va utilitzar el *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en un seqüenciador automàtic. Atès que totes les seqüències promotores es van clonar en el vector pGL2-basic, per la seqüenciació es van fer servir dos oligonucleòtids continguts en el vector molt propers a l'ínter: una de les dues cadenes de DNA va ser seqüenciada amb l'oligonucleòtid GL1 5' ATC AAT GTA TCT TAT GGT ACT GTA ACT GAG CTA ACA TAA 3' i l'altra cadena amb l'oligonucleòtid GL2 5' CAG TTA CAG TAC CAT AAG ATA CA 3'.

2. CULTIUS CEL·LULARS

2.1. Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball van ser les següents:

-La línia cel·lular epitelial MDCK-II (*Madin Darvy Canine Kidney*), derivada d'epiteli simple de ronyó de gos.

-Clons resultants de la transfecció estable dels vectors pcDNA3 buit (sense insert), pcDNA3-E47 i pcDNA3-Snail a les cèl·lules MDCK-II; en qualsevol dels casos es van obtenir més de cinc clons entre els quals es va seleccionar un d'acord amb els nivells d'expressió del cDNA exogen:

- MDCK-CMV clon B1 resultant de la transfecció de les cèl·lules MDCK amb el vector buit (sense insert) pcDNA3 i aïllat per selecció en presència de G418 en el medi de cultiu (Cano et al., 2000).
- MDCK-E47 clon B1 derivat de la transfecció de les cèl·lules MDCK amb el vector pcDNA3-E47 i aïllat per selecció en presència de G418 en el medi de cultiu. L'origen i caracterització d'aquestes cèl·lules ha estat prèviament descrit (Perez-Moreno et al., 2001).
- MDCK-Snail clon B1 derivat de la transfecció de les cèl·lules MDCK amb el vector pcDNA3-Snail i aïllat per selecció en presència de G418 en el medi de cultiu. L'origen i caracterització d'aquestes cèl·lules ha estat prèviament descrit (Cano et al., 2000).

- Clons resultants de la transfecció estable del vector pSuperior-siSnail (vector que conté un oligonucleòtid-19mer siRNA complementari al mRNA de *Snail* murí) a les cèl·lules MDCK-Snail (C1, C3 i C4) aïllats per selecció en presència de puromicina en el medi de cultiu.

Aquestes línies cel·lulars van obtenir-se al laboratori de la Dra A. Cano (Instituto de Investigaciones de Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, Espanya) i cedides al nostre laboratori per desenvolupar els objectius proposats en aquest treball.

-La línia Schneider L2 (SL2), d'origen embrionari de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972). Aquesta línia va ser cedida pel Dr M. Fernández (Instituto de Investigaciones de Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, Espanya).

2.2. Medis de cultiu i tècniques de cultius cel·lulars

Les cèl·lules MDCK-II i els clons derivats es van créixer en medi DMEM:Ham's F-12 (1:1) suplementat amb piruvat sòdic 100mM, L-glutamina 200mM i un 10% (v/v) de sèrum boví fetal inactivat (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU). Les cèl·lules transfectades establement amb els vectors d'expressió pcDNA3, pcDNA3-E47 i pcDNA3-Snail es van créixer en presència de l'antibiòtic de selecció genètica (500 µg/mL) (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU) mentre que les cèl·lules transfectades establement amb el vector d'expressió pSuperior-siSnail es van cultivar en presència de puromicina (1 µg/mL). Les cèl·lules es van créixer adherides a la superfície interna de flascons o plaques de plàstic que es van incubar en una estufa de cultius a 37°C sota una atmosfera saturada d'humitat i enriquida amb un 5% de CO₂ i un 95% d'aire. Els subcultius es van fer en la fase exponencial del cultiu (dos cops per setmana) mitjançant tripsinització (amb una solució de tripsina-EDTA 1X: 0,05% tripsina, 0,2 g/L EDTA, GIBCO, Grand Island, NY, EEUU) de les monocapes, prèviament rentades amb PBS1X. L'activitat de la tripsina es bloquejava amb el mateix volum de medi amb sèrum, les suspensions cel·lulars es centrifugaven i s'obtenia un *pellet* cel·lular que s'emprava per extreure RNA o proteïnes, per congelar o per resuspendre de nou en medi amb sèrum i inocular en diferents flascons o plaques a raó de 2x10⁴ cèl·lules/cm² de la superfície del plàstic.

En tots els casos els experiments es van fer en absència d'antibiòtics en el medi de cultiu. Totes les línies van ésser testades per la presència de micoplasma (*kit PCR Venor GeM*, Minerva Biolabs, Berlin, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant i van ésser trobades lliures.

Les cèl·lules SL2 es van créixer en medi *Shields and Sang M3 Insect Medium* (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal inactivat (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU) i els antibiòtics penicil·lina (10000 unitats /mL) i

estreptomicina (10000 µg/mL) (GIBCO, Grand Island, NY, EEUU). Les cèl·lules es van créixer en suspensió en flascons de plàstic que es van incubar a 25°C (Schneider, 1972). Els subcultius es van fer centrifugant les cèl·lules dels flascons per obtenir un *pellet* cel·lular que es rentava amb PBS1X i s'utilitzava per congelar o es tornava a resusprendre en medi amb sèrum i es repartia en diferents flascons.

Per criopreservar els estocs de les diferents cèl·lules, es preparaven les suspensions cel·lulars de cultius exponencials a raó de 2×10^6 cèl·lules/ml de medi de congelació i es dispensaven en vials criogènics (Nunc., Dinamarca), els quals es congelaven baixant gradualment la temperatura en un contenidor especial, *NALGENE Cryo 1°C Freezing Container*, que es mantenia 4 h a -80°C. Després, els vials es transferien a contenidors de nitrogen líquid (-196°C) pel seu emmagatzemament. El medi de congelació consistia en el medi de cultiu propi de la línia cel·lular suplementat amb un 20% v/v de sèrum i dimetil sulfòxid (DMSO) fins un 10% v/v com a crioprotector ja que el procés de congelació danya les cèl·lules principalment a causa de la formació de cristalls intracel·lulars i de la pressió osmòtica. La descongelació dels vials es va fer sempre de manera ràpida en un bany maria a 37°C i en agitació, procedint a bescanviar el medi de congelació per medi de cultiu mitjançant dilució (1:10), centrifugació i posada en marxa del cultiu en les condicions esmentades prèviament.

2.3. Tractaments

Quan s'indica, les cèl·lules es van tractar en medi sense sèrum durant 5 hores amb els següents inhibidors sintètics:

- PD98059 (50 µM): inhibidor de les quinases quinasa MEK1/2 (Calbiochem, Darmstadt, Alemanya)
- U0126 (10 µM): inhibidor de les quinases quinasa MEK1/2 (Calbiochem, Darmstadt, Alemanya)
- Wortmannina (40 nM): inhibidor de la quinasa PI3K (Sigma, St. Louis, MO, EEUU)
- SB203580 (10 µM): inhibidor de la quinasa p38 (Calbiochem, Darmstadt, Alemanya)
- JNKinhi (II) (100 nM): inhibidor de la quinasa JNK (Calbiochem, Darmstadt, Alemanya)

2.4. Transfeccions transients

Les transfeccions de les cèl·lules MDCK-II i dels clons derivats es van dur a terme amb *Lipofectamine Plus Reagent* (Promega Inc., Madison, WI, EEUU) seguint les instruccions del fabricant. Es van sembrar 2×10^5 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous, i al dia següent es va transfectar 1 μg de les construccions dels promotors indicades i 100 ng del vector pRL-TK (Promega Inc., Madison, WI, EEUU) com a control de l'eficiència de la transfecció. Els assajos de cotransfecció es van realitzar en presència de les quantitats indicades dels vectors d'expressió senyalats. La quantitat de DNA es va mantenir constant afegint la quantitat de vector buit corresponent apropiada. Quan s'indica, les cèl·lules van ser tractades amb l'inhibidor especificat a la concentració i durant el temps senyalats. Les cèl·lules es van transfectar en medi sense sèrum durant 5 hores i després es va fer un canvi amb medi contenint un 10% de sèrum o sense sèrum, segons s'indica. Passades 24h les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS 1X i es van recollir. Es van resuspendre en 80 μL de tampó de llisi passiu 1X (Promega Inc., Madison, WI, EEUU) i es van fer tres cicles de congelació/descongelació per llisar. El sobrenedant es va recuperar i es va llegir l'activitat luciferasa i renilla com s'indica a l'apartat 4.1.

Les transfeccions de les cèl·lules SL2 es van dur a terme pel mètode de precipitació amb fosfat de calci seguint el protocol convencional (Sambrook et al., 1989). Es van sembrar 5×10^5 cèl·lules/pou en plaques de 12 pous i al dia següent es va transfectar 2 μg de les construccions dels promotors indicats i 200 ng del vector pPac que codificava pel gen LacZ sota el control del promotor de l'actina de *Drosophila* com a control de l'eficiència de la transfecció. A més a més, es va cotransfectar 2 μg dels vectors d'expressió indicats. La quantitat de DNA es va mantenir constant afegint la quantitat de vector buit corresponent apropiada. Passades 24 hores es van rentar les cèl·lules dues vegades amb medi sense sèrum i es van deixar creixent en medi amb sèrum durant 72 hores, després de les quals es van recollir i es van resuspendre en 40 μL de Tris-HCl 0,25M (pH 7,8). El sobrenedant es va recuperar i es va llegir l'activitat luciferasa i β -galactosidasa com s'indica a l'apartat 4.2.

3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ A NIVELL DE RNA

3.1. Obtenció de RNA

L'extracció de RNA total es va realitzar a partir de cèl·lules creixent en cultius exponencials i es va dur a terme amb el kit *RNeasy Mini kit* (Qiagen Sciences, Maryland, EEUU) segons les instruccions del fabricant. Per determinar la concentració de RNA en solució es van emprar tècniques espectrofotomètriques i es van fer mesures a 260 nm i a 280 nm (1 D.O₂₆₀ correspon aproximadament a una concentració de 40 µg/mL de RNA). Per comprovar l'estat dels RNAs després de cada extracció es van resoldre 250 ng en gels d'agarosa al 1% en TBE (Tris-borat 90mM, EDTA 2mM, pH 8,3) que es van tenyir amb bromur d'etidi per la seva visualització.

3.2. RNA arbitrarily primed - PCR (RAP-PCR)

La tècnica de *RNA arbitrarily primed - PCR (RAP-PCR)* (Welsh et al., 1992) s'utilitza per estudis d'expressió diferencial de gens. Es basa en generar per PCR patrons arbitraris però reproduïbles de bandes de cDNA (*fingerprints*) amb la fi d'identificar aquelles que són diferents entre distintes poblacions de RNA, per exemple entre cèl·lules transfectades establement i la seva línia parental o entre el teixit normal i tumoral d'un mateix individu. És important que les diferents mostres a comparar tinguin un mateix *background* genètic, ja que quan s'utilitzen tipus cel·lulars d'homogeneïtat genòmica desconeguda les comparacions de l'expressió gènica poden resultar enganyoses.

El primer pas és sempre la transcripció reversa del RNA de la mostra. Es pot utilitzar com encebador un oligo(dT), amb la particularitat que en l'extrem 3' de l'encebador hi ha una o dues bases que no són timines i que actuen com a "ganxo" (p.ex. 5'-(dT)₁₀CA-3'). D'aquesta manera l'encebador s'uneix a les cues de poli(A) dels mRNAs just a l'inici de les mateixes, o sigui, en el seu extrem 5' (si no, els fragments que s'amplificarien a continuació podrien correspondre gairebé exclusivament a les cues de poli(A) i no a la resta del missatger). També es pot utilitzar en el pas de la transcripció reversa un encebador de seqüència arbitrària que s'uneix a aquells llocs dins dels RNAs amb els que millor s'aparella. D'aquesta manera només es selecciona una subpoblació dels RNAs de la mostra que ve donada per l'encebador.

A continuació, un o dos encebadors de seqüència arbitrària (que pot ser el mateix o un diferent al de la RT) serveix com encebador per la síntesi de la segona

cadena per acció d'una DNA polimerasa termoestable. Si les condicions són poc estrictes (la qual cosa s'aconsegueix per exemple amb una baixa temperatura d'anellament o amb una elevada concentració de Mg^{2+}), la síntesi de la segona cadena s'inicia a partir de diferents punts dins dels cDNAs que són els que, en aquestes condicions, millor s'uneixen a l'encebador, és a dir, els que s'uneixen a l'encebador menys inespecíficament. Posteriorment, tots aquells fragments de cDNA flanquejats per un o els dos encebadors es poden amplificar per PCR de manera específica (amb condicions molt estrictes) en presència d'un nucleòtid radioactiu (en el nostre cas $[\alpha^{33}P]dATP$) que permet la seva detecció (figura M.1).

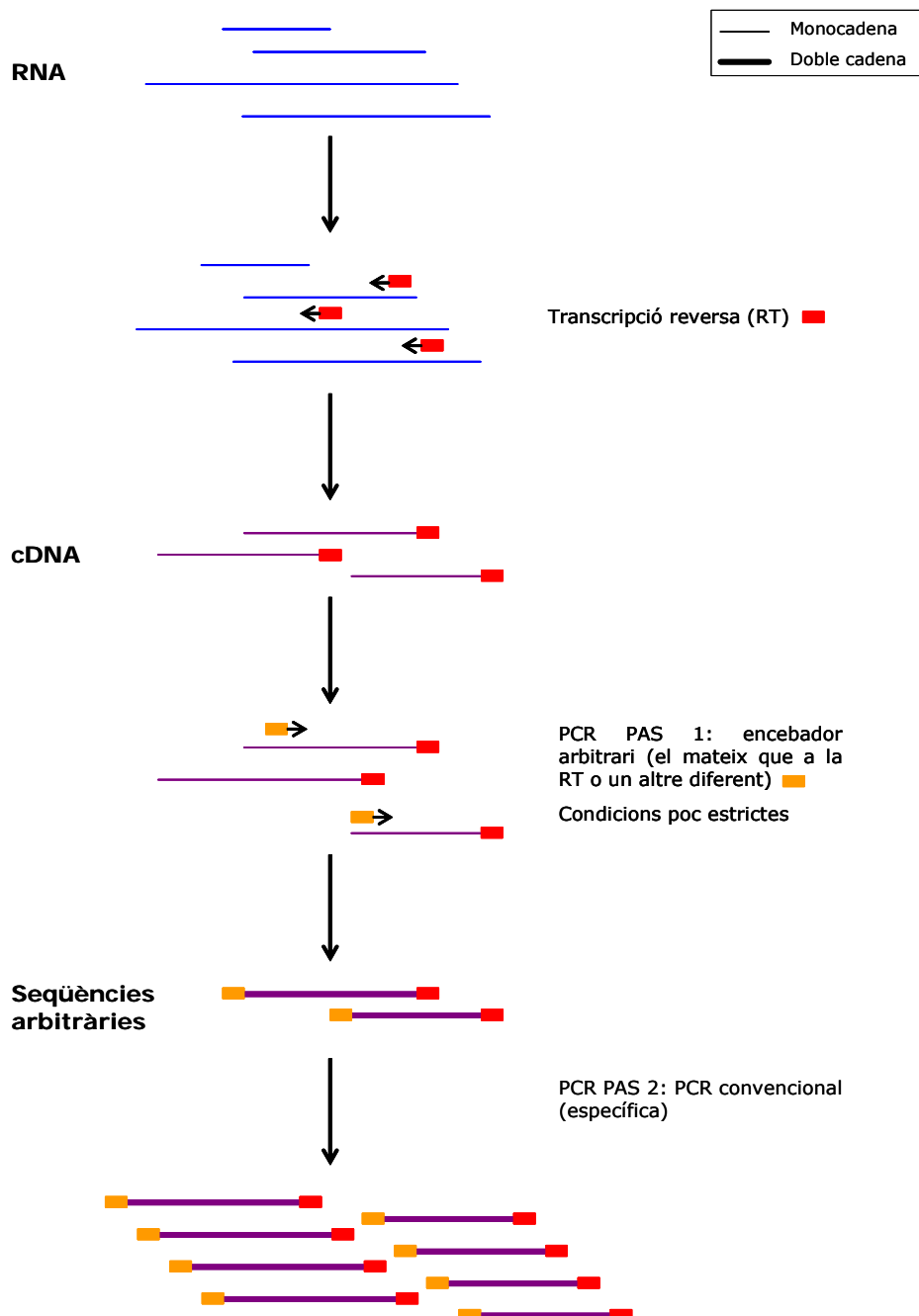


Figura M.1. Esquema de la tècnica RAP-PCR.

La resolució dels productes resultants per electroforesi en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida genera un patró de bandes o *fingerprint* que, en determinades condicions de reacció, és reproduïble i característic de cada mostra (Liang and Pardee, 1992). Tot i que les intensitats de les distintes bandes dins d'un mateix *fingerprint* varien independentment les unes de les altres, entre patrons diferents la intensitat d'una mateixa banda és proporcional a la concentració inicial de la seqüència a partir de la qual s'amplifica (Welsh et al., 1992). Les bandes d'interès poden després retallar-se directament dels gels, eluir-se i clonar-se per identificar-les i per confirmar els resultats per tècniques alternatives com *Northern blot* o RT-PCR quantitativa (figura M.2).

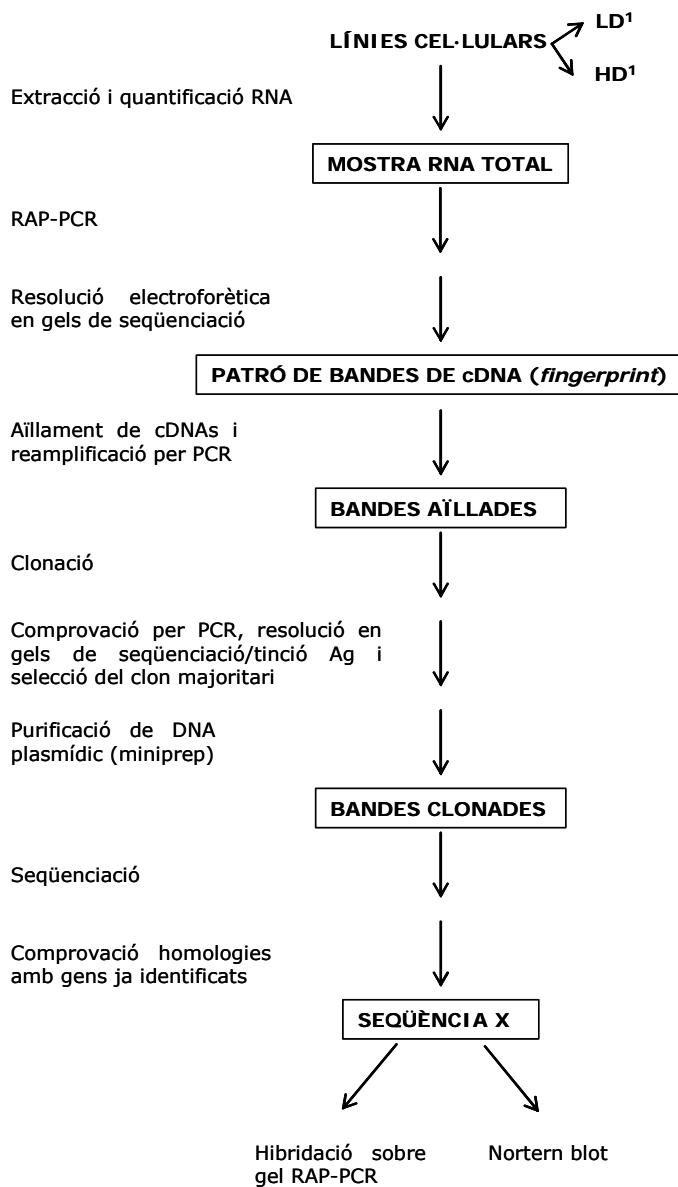


Figura M.2. Estratègia utilitzada en l'anàlisi de l'expressió diferencial de gens trobats mitjançant RAP-PCR. ¹ Les cèl·lules es van recollir en condicions de baixa confluència cel·lular (LD) i alta confluència cel·lular (HD).

Transcripció reversa (RT) dels RNAs

Els diferents RNAs a estudiar es van retrotranscriure a cDNA. La mescla de reacció (20 µL) que es va utilitzar per la transcripció reversa va ser la següent:

Components	Concentració final
RNA total	5 ng/µL
Encebador	0,5 µM
Tampó 5X ¹	1X
DTT ²	10 mM
dNTPs	0,5 mM
Inhibidor de RNAses ³	6,25-31 mU/µL
M-ML V RT ⁴	10 U/µL

¹ Tampó subministrat juntament amb la RT (GIBCO, Eggenstein, Alemanya): Tris-HCl 250mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM

² Per dificultar la formació d'estructures secundàries del RNA

³ Per evitar la degradació del RNA atesa la seva labilitat

⁴ Transcriptasa reversa del virus murí de la leucèmia de Moloney (GIBCO, Eggenstein, Alemanya)

Els RNAs es van escalfar a 65°C durant 5 minuts per eliminar les estructures secundàries i es van afegir a la mescla de reacció que es va incubar a 37°C durant una hora i posteriorment es va escalfar a 95°C durant 5 minuts per inactivar els enzims.

A més a més de les mostres corresponents als RNAs de les diferents línies cel·lulars, en la RT també es van incloure els controls pertinents per controlar els problemes de contaminació: H₂O de la RT i una mostra sense transcriptasa reversa per detectar les possibles contaminacions de DNA.

A la taula M.7 s'indiquen els encebadors que es van utilitzar per fer les RTs.

Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilitzant com a mostra el producte de la transcripció reversa, es va fer una PCR per delimitar els fragments de cDNA i amplificar-los fins fer-los detectables. Per això, es van utilitzar un o dos encebadors arbitraris, un dels quals podia ser el mateix encebador de la RT i opcionalment un altre qualsevol. Per facilitar la detecció es va afegir un trifosfodesoxirribonucleòtid marcat radioactivament, concretament amb [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP, a més dels no marcats.

La mescla de reacció (25 µL/mostra) que es va emprar va ser la següent:

Components	Concentració final
Tampó 10X ¹	1X
dNTPs	0,5 mM
[$\alpha^{33}\text{P}$]dATP ²	0,16 nCi
Encebador 1	1 μM
(Encebador 2) ³	1 μM
Taq polimerasa ⁴	0,06 U/ μL
cDNA (producte RT)	2,5 μL
H ₂ O	

¹ Tampó subministrat juntament amb la Taq (Roche, Mannheim, Alemanya): Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM.

² 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (Amersham Biosciences, Regne Unit)

³ Opcional

⁴ Roche, Mannheim, Alemanya

A la taula M.7 s'indiquen els encebadors que es van utilitzar per fer les RTs i les PCRs:

Taula M.7. Encebadors utilitzats en la RAP-PCR.

RT	PCR
Oligo(dT): 5' TTT TTT TTT TTT TTT NI 3'	Des 3307 5' CTG TTC CAT CGC ACC CCT 3' Des 2934 5' TGT GGG AAT GGC GTT GAA 3' PLC511 5' TCC GAA TGA GTG GGC AGA GG 3' D12577 a : 5' GAA GGG CAA CAA CAA CAG TGA A 3' i D12577 b : 5' CTT TTT TTT CTC CCC CAC TC 3'
TP53-CA1: 5' AGG ATA CTA TTC AGC CCG AGG TG 3'	TP53-CA1
pU6: 5' GCT TCT GAC TTA TTC TTG CTC TGA 3'	pU6
H12/B: 5' CGC CAG GCT CAC CTC TAT A 3'	H12/B
VEGF R: 5' TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA 3'	VEGF R i VEGF F: TCC AGG AGT ACC CTG ATG AC 3' VEGF R2: 5' CCT CGG CTT GTC ACA TCT GCA 3' VEGF R3: 5' CCG CCT CGG CTT GTC ACA TCT 3'
10DN: 5' ATG GCG GGA GGT AGATG AC 3'	10DN i/o 1UR: 5' AGA CTG CCT TCC GGG TCA CT 3'
ML 1- 8up: 5' GTT TCA GTC TCA GCC ATG AG 3'	ML 1- 8up
ML 1- 8B: 5' GTT TCA GTC TCA GCC ATG 3'	ML 1- 8B
ML 1- 11up: 5' GCC ACC ACA TAC ACC ATA TG 3'	ML 1- 11up
ML: 5' GCC ACC ACA TAC ACC TAT G 3'	ML
D4S912GT: 5' TCT AGT TAA TTC TCC GTT TCA T3 '	D4S912GT

A més a més de les mostres procedents de la RT, en la PCR també es va incloure un control amb H₂O per detectar problemes de contaminació.

Tot seguit es mostren els dos programes de cicles als que es sotmetien les mostres al termociclador; la temperatura d'anellament (T) depenia de l'encebador utilitzat:

95°C	1 min	
94°C	45 seg	40 cicles
T	45 seg	
72°C	45 seg	
72°C	5 min	

Encebadors: PLC511, Des 3307, Des 2934, D12577a i D12577b, TP53-CA.1,
VEGF R, VEGF F, VEGF R2 i VEGF R3: **T 50 °C**
10DN, 1UR: **T 55°C**

95°C	1 min	
94°C	1 min	5 cicles
T ₁	45 seg	
72°C	1 min 15 seg	
94°C	1 min	35 cicles
T ₂	45 seg	
72°C	1 min 15 seg	
72°C	5 min	

Encebadors: ML 1- 8up, ML 1- 8B, ML 1- 11up, ML: **T₁ 37°C, T₂ 55°C**
pU6: **T₁ 40°C, T₂ 60°C**
D4S912GT: **T₁ 50°C, T₂ 60°C**
H12/B: **T₁ 55°C, T₂ 60°C**

Electroforesi dels productes amplificats i obtenció dels *fingerprints*

Els productes de la RAP-PCR desnaturalitzats durant 3 minuts a 95°C es van resoldre electroforèticament en gels desnaturalitzants de seqüenciació (acrilamida 6%/urea 8M) en el tampó TBE. En finalitzar l'electroforesi els gels es van enganxar a una fulla de paper Whatman 3MM, es van assecar al buit a 80°C i es van exposar a pel·lícules radiogràfiques per detectar el senyal. El resultat és la imatge d'un gel d'electroforesi (amb, almenys, tants carrils com poblacions cel·lulars a comparar) en el que es poden observar diferents bandes de cDNA anònimes, obtingudes a partir de RNA, que mostren un mateix patró excepte algunes bandes que presenten diferències d'intensitat entre cada població. És el que es coneix com a *fingerprints*.

Aïllament dels cDNAs separats per electroforesi

Totes les bandes que apareixien als *fingerprints* que presentaven diferències d'intensitat entre les distintes línies cel·lulars (i probablement representaven cDNAs diferencialment expressats) es van retallar dels gels. Per això, es van superposar les pel·lícules revelades als gels secs corresponents per transil·luminació i es van identificar les bandes d'interès al gel. Es van retallar amb un bisturí, es van posar en tubs de microcentrífuga amb 20 µL d'aigua i es van eluir durant 20 minuts a 65°C. Els gels es van tornar a exposar a pel·lícules radiogràfiques per comprovar que s'havien retallat les bandes correctament.

Reamplificació dels cDNAs

Per obtenir major quantitat de material per poder clonar, es va realitzar una PCR amb el(s) mateix(os) encebador(s) utilitzats en el pas de la PCR de la RAP-PCR, tot i que només en 25 cicles i a la temperatura T_2 .

Clonació dels fragments de cDNA reamplificats

Per facilitar la seqüenciació, les bandes de cDNA retallades i reamplificades es van clonar en el vector pCR2.1 del kit *TA cloning Vector Kit* (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, EEUU). Això va implicar un pas de lligació cDNA-vector (seguint les instruccions del fabricant) i un pas de transformació (veure apartat 1). Per assegurar que tots els plàsmids procedents de la transformació contenien l'insert d'interès, en cada cas es van seleccionar 10 clons diferents i es van comprovar per PCR utilitzant les mateixes condicions de la reamplificació. Els productes de PCR desnaturalitzats durant 3 minuts a 95°C es van resoldre electroforèticament en gels de seqüenciació juntament amb el producte de la reamplificació original corresponent. La seva detecció dels cDNAs es va fer per tinció amb plata seguint el protocol de Schlegel (Schlegel et al., 1996). Si el producte de PCR era del mateix tamany que la banda que s'havia retallat del gel, el clon es considerava bo. Es van seleccionar tres clons de cada banda.

Atès que l'electroforesi de la RAP-PCR fa una separació dels cDNAs en funció del seu tamany, és possible que quan es retalla una banda s'estigui seleccionant més d'un cDNA (de fet, tots els que tinguin el mateix tamany). Quan després es clona el suposat producte únic en un plàsmid i s'obté una sèrie de colònies que han incorporat insert, en realitat es té una representació de tots els inserts possibles. Per això, els productes de PCR de les diferents colònies es van resoldre electroforèticament en gels de seqüenciació, ja que d'aquesta manera és possible separar cDNAs amb diferències de

tamanys molt petites. En el cas d'obtenir més d'un insert diferent a partir d'una mateixa transformació es seleccionaven tres colònies del majoritari (és a dir, del que contenien més colònies) o dels majoritaris.

Dels clons seleccionats de cada banda es va purificar el DNA plasmídic mitjançant el kit *GFX Micro Plasmid Prep kit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Regne Unit).

Seqüenciació dels cDNAs

Utilitzant com a mostra els plàsmids amb l'insert, es van seqüenciar seguint els procediments descrits en l'apartat 1.

Identificació dels cDNAs

Les seqüències obtingudes es van introduir en una base de dades (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) per comprovar la seva identitat.

Obtenció de sondes i marcatge

Es va seleccionar el producte de reamplificació d'un dels clons correctes de cada banda de la RAP-PCR d'interès, es va purificar amb el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Regne Unit) seguint les instruccions del fabricant i es va marcar radioactivament amb [α P³²]dCTP (4×10^8 c.p.m. μ g⁻¹). El marcatge es va fer mitjançant el kit *Ready-to-go DNA Labelling Beads (-dCTP)* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU), que es basa en l'ús d'oligonucleòtids aleatoris (*random priming*) que s'uneixen al DNA en llocs aleatoris i serveixen d'encebadors per la síntesi de DNA catalitzada per una DNA polimerasa. Les sondes marcades es van purificar amb el kit *ProbeQuant G-50 MicroColumns Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU) seguint les instruccions del fabricant.

Transferència i hibridació de gels de RAP-PCR

Per la transferència de gels de RAP-PCR a membranes de niló es va seguir el protocol descrit per Welsh (Welsh et al., 1995) basat en la capil·laritat utilitzant com a tampó: NaCl 3M, Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4).

La hibridació de les membranes amb les sondes marcades es va fer seguint els procediments convencionals (Davis et al., 1986).

3.3. Northern Blot

L'anàlisi per *Northern Blot* (Alwine et al., 1977) es va fer seguint el protocol convencional. Breument, 10 µg de RNA es van desnaturalitzar a 65°C durant 10 minuts, es van separar electroforèticament en gels d'agarosa al 1,1% desnaturalitzants amb un 6% de formaldehid i es van transferir a membranes de niló (Hybond-XL, Amersham, Little Chalfont, Regne Unit). Les membranes es van hibridar amb la sonda apropiada marcada radioactivament amb αP^{32} (veure apartat 3.2) i es van exposar a pel·lícules radiogràfiques per detectar el senyal. Després de deshibridar-les, les mateixes membranes es van rehibridar amb una sonda murina de gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) i els senyals obtinguts es van utilitzar per normalitzar l'expressió de les mostres. La quantificació densitomètrica de les bandes es va dur a terme amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix.

3.4. Transcripció reversa - reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La transcripció reversa (RT) es va dur a terme com s'indica en l'apartat 3.2, però partint de 2 µg de RNA total, en el cas de MMP-9, i 500 ng, en la resta, i utilitzant com encebadors *random hexamers* (Roche, Mannheim, Alemanya). En el pas de la PCR es van emprar els encebadors que es mostren en la taula M.8. El programa de cicles al que es van sotmetre les mostres al termociclador va ser el següent, variant la temperatura d'anellament (T) segons els encebadors utilitzats:

	95°C	1 min	
	94°C	45 seg	30 cicles
T ¹	72°C	45 seg	
	72°C	45 seg	
		5 min	

¹ La temperatura d'anellament s'indica a la taula M.8.

Taula M.8. Encebadors per l'anàlisi de l'expressió gènica per RT-PCR.

Nom	Seqüència	Tamany producte PCR (pb)	T (°C)
TIMP-1 gos 5'	5' TCA ACC AGA CCG ACT TAA ACC G 3'	500	55
TIMP-1 gos 3'	5' GAG TAG GAT TTA GGC CAT CCG G 3'		
MMP-3 gos 5'	5' GAA GGA ACA GTG GTC CTG TCG TT 3'	570	57
MMP-3 gos 3'	5' AGA CTG GGT ACA TCA GAG CGC TAG 3'		
MMP-9 gos 5'	5' GCT GGA CAA AAC CAC CCT GGA GGC CAT 3'	364	67
MMP9 gos 3'	5' GTC GTC GAA GTG GGC GTC TCC CTG AAT 3'		
Snail murí 5'	5' CCC AAG CCC AGC CGA TGA G 3'	200	65
Snail murí 3'	5' CTT GGC CAC GGA GAG CCC 3'		
GAPDH gos 5'	5' TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC 3'	900	60
GAPDH gos 3'	5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'		
Cadh-E gos 5'	5' GGA ATC CTT GGA GGG ATC CTC 3'	560	60
Cadh-E gos 3'	5' GTC GTC CTC GCC ACC GCC GTA CAT 3'		
Id-1 humà 5'	5' GGA CGA GCA GCA GGT AAA CGT 3'	178	65
Id-1 humà 3'	5' TTC CAA CTT CGG ATT CCG AGT 3'		
Ciclofilina gos 5'	5' CGT GCT CTG AGT ACT GGA GAG AAG GGA 3'	325	55
Ciclofilina gos 3'	5' CCA CTC AGT CTT GGC GGT GCA GAT GAA 3'		

3.5. Anàlisi per microarrays

Els anàlisis d'expressió gènica mitjançant *microarrays* es van dur a terme al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid en col·laboració amb el Dr. J. Palacios (CNIO, Madrid) i la Dra. A. Cano (CSIC-UAM, Madrid). Concretament es va utilitzar l'Oncochip que inclou aproximadament 6.000 cDNAs humans entre gens i ESTs implicats en funcions tan diverses com apoptosi, cicle cel·lular, angiogènesi, reparació de DNA, diferenciació, factors de creixement, entre altres. A més a més, inclou controls negatius (gens expressats en *Arabidopsis Thaliana* i *Dictyostelium discoideum*), controls per determinar l'abundància relativa de teixit epitelial, limfoide i estromal en les mostres tumorals (Ross and Perou, 2001) i gens específics de teixit. Cada anàlisi es va realitzar per duplicat. La metodologia seguida va ser la següent:

Amplificació lineal del RNA

Es va partir de RNA total (veure apartat 3.1). La síntesi de la primera cadena es va realitzar utilitzant el protocol descrit per GIBCO, BRL, *SuperScript II reverse-transcription*, incloent en la reacció un oligonucleòtid contenint poli-T i promotor T7.

L'amplificació es va dur a terme mitjançant transcripció *in vitro* utilitzant la polimerasa T7 (*Megascript kit*, AMBION).

Marcatge fluorescent del RNA amplificat (aRNA)

En la reacció de retrotranscripció es van afegir els nucleòtids marcats amb Cy5 (*cyanine*)-dUTP (verd) o Cy3-dTUP (vermell). Per cada reacció es van utilitzar 3 µg d'aRNA.

Hibridació

Es va realitzar amb les sondes marcades amb els dos fluorocroms a 42°C en absència de formamida durant 15 hores i després es va procedir als rentats amb concentracions decreixents de SSC (2X, 1X, 0,5X).

Quantificació

Es va realitzar utilitzant un escàner confocal amb làser (ScanArray 5000, GSI Lumonics) capaç de discernir entre les sondes marcades amb Cy3 i Cy5, i produir imatges digitalitzades en format TIFF (*tag image file format*) independents per cadascun. Les dades de fluorescència es van emmagatzemar com imatges de 16 Bits. Es van calcular els nivells d'expressió relativa de cada gen per identificar l'expressió gènica diferencial (*ratios d'expressió*) entre les línies MDCK-CMV control i MDCK-E47 o MDCK-CMV control i MDCK-Snail. Es va detectar i corregir el soroll de fons i es van normalitzar les dades utilitzant controls positius (*housekeeping genes*) i negatius (gens d'un altre organisme o RNAs sintètics).

El processament de les dades específiques per cada *microarray* es va realitzar utilitzant el programa d'anàlisi QuantArray (GSI Lumonics) o Gene Pix 4.0 (Axon). Als *ratios* de fluorescència obtinguts se'ls van aplicar algorismes matemàtics no supervisats i d'agrupació, principalment *clustering* jeràrquic com SOTA (*self organising hierarchical neural network*), així com mètodes supervisats basats en la generació de xarxes neuronals (POMELO).

4. MESURA DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL

4.1. Mesura de l'activitat luciferasa i renilla

L'activitat de la luciferasa i de la renilla luciferasa es va mesurar en els llisats (veure apartat 2.4) de les cèl·lules MDCK-II i dels clons transfectats amb les construccions promotores descrites en l'apartat 1. Breument, l'activitat es va mesurar amb el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay kit* (Promega Inc., Madison, WI, EEUU) seguint les instruccions del fabricant i es va llegir amb un luminòmetre Junior (EG&G Berthold).

4.2. Mesura de l'activitat β -galactosidasa

L'activitat β -galactosidasa es va mesurar en els llisats (veure apartat 2.4) de les cèl·lules SL2 transfectades amb les construccions promotores descrites en l'apartat 1. Per mesurar l'activitat, es van incubar en una placa de 96 pous 10 μ L/pou de mostra amb la següent mescla de reacció fins que apareixia color groc:

Components	Concentració final
Mg ²⁺ 100X ¹	1X
ONPG	880 ng/ μ L
Sodi fosfat (pH 7,5)	0,1 M

¹ MgCl₂ 0,1M, β -mercaptoetanol

La reacció es va aturar amb Na₂CO₃ 1M i les mostres es van llegir en un lector d'ELISA a 420 nm.

5. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ PROTEÏNA-DNA DE LES REGIONS PROMOTORES

5.1. Extracció de proteïnes nuclears

L'obtenció dels extractes proteics nuclears es va fer a partir de cèl·lules en cultiu creixent exponencialment seguint el protocol descrit per Schaffner basat en una llisi hipotònica seguida per una extracció dels nuclis per altes concentracions de sals (Schreiber et al., 1989). La concentració dels extractes nuclears es va mesurar pel mètode BCA (àcid bicinconínic) utilitzant el kit *BCA Protein Assay Reagent* (PIERCE, Rockford, IL, EEUU) seguint les instruccions del fabricant.

5.2. Assaig de retard en gel

L'assaig de retard en gel o EMSA: *Electrophoretic Mobility Shift Assay* permet l'estudi de les unions proteïna-DNA *in vitro*. Aquesta tècnica consisteix en una sèrie de passos que es descriuen a continuació:

Anellament dels oligonucleòtids

Es van dissenyar oligonucleòtids de diferents regions dels promotors de MMP-9 i Id-1 que contenen les seqüències de reconeixement que es volien estudiar. Perquè es doni la unió proteïna-DNA cal que el DNA sigui de doble cadena, per la qual cosa es va fer un pas previ d'anellament del parell d'oligonucleòtids monocadena complementaris. A les taules M.9, M.10 i M.11 es mostren els oligonucleòtids que es van utilitzar al llarg d'aquesta tesi per realitzar els assajos d'EMSA.

Taula M.9. Encebadors per l'assaig de retard en gel per l'estudi del promotor murí de MMP-9.

<i>Nom</i>	<i>Seqüència</i>
pMMP-9/Ebox wt 5'	5' TGC TCC CAC ATG TGT GTG TGT C 3'
pMMP-9/Ebox wt 3'	5' GAC ACA CAC ACA TGT GGG AGC A 3'
pMMP-9/Ebox mut 5'	5' TGC TCC tAc ATt TGT GTG TGT C 3'
pMMP-9/Ebox mut 3'	5' GAC ACA CAC AaA TGT aGG AGC A 3'
pMMP9/NFκB wt 5'	5' TGC CCC ATG GAA TTC CCC AA 3'
pMMP-9/NFκB wt 3'	5' TTG GGG AAT TCC ATG GGG CA 3'
pMMP-9/NFκB mut 5'	5' TGC CCC ATG GAA cTC aCC AA 3'
pMMP-9/NFκB mut 3'	5' TTG GtG AgT TCC ATG GGG CA 3'
pMMP-9/ A wt 5'	5' TAA GCC TGG AGG GGA GGG GCG G 3'
pMMP-9/ A wt 3'	5' CCG CCC CTC CCC TCC AGG CTT A 3'
pMMP-9/ A m ^{89/87} 5'	5' TAA GCC TGa AtG GGA GGG GCG G 3'
pMMP-9/ A m ^{89/87} 3'	5' CCG CCC CTC CCa TtC AGG CTT A 3'
pMMP-9/ A m ^{85/82} 5'	5' TAA GCC TGG AGG tGA gGG GCG G 3'
pMMP-9/ A m ^{85/82} 3'	5' CCG CCC aTC aCC TCC AGG CTT A 3'
pMMP-9/ B wt 5'	5' GGA GGG GCG GGG TCA CTG AT 3'
pMMP-9/ B wt 3'	5' ATC AGT GAC CCC GCC CCT CC 3'
pMMP-9/ B mut 5'	5' GGA GGt gCG aGG TCA CTG AT 3'
pMMP-9/ B mut 3'	5' ATC AGT GAC CtC Gta CCT CC 3'
pMMP-9/ C wt 5'	5' TAA GCC TGG AGG 3'
pMMP-9/ C wt 3'	5' CCT CCA GGC TTA 3'

Taula M.10. Encebadors per l'assaig de retard en gel per l'estudi del promotor humà d'Id-1.

<i>Nom</i>	<i>Seqüència</i>
prold/Ebox C wt 5'	5' CTG CAG GTG ACG GGC TGG 3'
prold/Ebox C wt 3'	5' CCA GCC CGT CAC CTG CAG 3'
prold/Ebox C mut 5'	5' CTt GcG GTG ACG GGA TGG 3'
prold/Ebox C mut 3'	5' CCA GCC CGT CAC CgC aAG 3'
prold/Ebox D wt 5'	5' CTG TAT CTC GCA GCT GCC 3'
prold/Ebox D wt 3'	5' GGC AGC TGC GAG ATA CAG 3'
prold/Ebox D mut 5'	5' CTG TAT CTC atg GCT GCC 3'
prold/Ebox D mut 3'	5' GGC AGC cat GAG ATA CAG 3'
prold/Ebox A wt 5'	5' AAT TCA CTC AGC TGC AGA GCT G 3'
prold/Ebox A wt 3'	5' CAG CTC TGC AGC TGA GTG AAT T 3'
prold/Ebox A mut 5'	5' AAT TCA CTt tGC TGC AGA GCT G 3'
prold/Ebox A mut 3'	5' CAG CTC TGC AGC aaA GTG AAT T 3'
prold/B-1 wt 5'	5' GAG ACT CGC AGG TGT GGG GCG G 3'
prold/B-1 wt 3'	5' CCG CCC CAC ACC TGC GAG TCT C 3'
prold/B-1 Ebox M 5'	5' GAG ACT CGT TGG TGT GGG GCG G 3'
prold/B-1 Ebox M 3'	5' CCG CCC CAC ACC AAC GAG TCT C 3'
prold/B-1 Sp1 M 5'	5' GAG ACT CGC AGG TGT GGt Gct t 3'
prold/B-1 Sp1 M 3'	5' aaG CaC CAC ACC TGC GAG TCT C 3'
prold/B-2 wt 5'	5' GAC TCG CAG GTG TGG G 3'
prold/B-2 wt 3'	5' CCC ACA CCT GCG AGT C 3'
prold/B-3 wt 5'	5' TGT GGG GCG GGG AGG TAA GG 3'
prold/B-3 wt 3'	5' CCT TAC CTC CCC GCC CCA CA 3'

Taula M.11. Encebadors de seqüències consens d'unió a determinats factors de transcripció per l'assaig de retard en gel.

<i>Nom</i>	<i>Seqüència</i>
Sp1 consens 5'	5' ATT CGA TCG GGG CGG GGC AGC 3'
Sp1 consens 3'	5' GCT GCC CCG CCC CGA TCG AAT 3'
Epal cadhE 5'	5' GGC TGC CAC CTG CAG GTG CGT CCC 3'
Epal cadhE 3'	5' GGG ACG CAC CTG CAG GTG GCA GCC 3'

Per l'anellament dels oligonucleòtids es va preparar la següent reacció de mescla (10 µL):

Components	Concentració final
Oligonucleòtid en sentit	50 ng/µL
Oligonucleòtid en antisentit	50 ng/µL
Tampó M 10X (Boehringer Mannheim)	1X
H ₂ O	

La mescla de reacció es va sotmetre a les següents condicions en un termociclador:

95°C	5 min
37°C	30 min
20°C	≥ 2 hores

Marcatge dels oligonucleòtids de doble cadena

Els oligonucleòtids de doble cadena que es van fer servir com a sonda en l'assaig d'EMSA es van marcar radioactivament amb $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{dCTP}^3$ mitjançant la T4 polinucleòtid quinasa (T4PNK) que catalitza la transferència del grup fosfat en la posició γ de l'ATP a l'extrem 5' d'un polinucleòtid. Per això es va preparar la següent mescla de reacció (15 μL):

Components	Concentració final
Oligonucleòtid anellat	6,7 ng/ μL
Tampó 10X ¹	1X
T4PNK ²	1,5 u/ μL
$[\gamma\text{-P}^{32}]\text{dCTP}^3$	1,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$
H ₂ O	

¹ Tampó subministrat juntament amb la T4PNK: Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, EDTA 0,1 mM, ATP 0,1 μM , glicerol 50% (v/v)

² Promega, Madison, WI, EEUU

³ 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (Amersham Biosciences, Regne Unit)

La mescla es va incubar 45 min a 37°C. La reacció es va aturar amb TE 1X (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1mM) i es va purificar amb les columnes de sefacril *MicroSpin S-200 HR Columns* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU) seguint les instruccions del fabricant.

Preparació de la mostra i electroforesi

Pels assajos d'EMSA es van utilitzar 10 μg d'extracte proteic nuclear o 200 ng de proteïna recombinant GST, segons s'indica. El tampó de reacció utilitzat va ser el següent: Hepes 10 mM pH 7,9, KCl 50 mM, glicerol 5%, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,5 mM, ZnSO₄ 0,2 mM, ZnCl₂ 20 μM , DTT 0,5 μM , i com a competidor inespecífic es va emprar poly(dI-dC) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU). Les proteïnes i el tampó es van incubar 10 min a temperatura ambient. Quan es senyala es van afegir els competidors (oligonucleòtids de doble cadena no marcats radioactivament) indicats i es van incubar durant 10 min més a temperatura ambient. Per als assajos de superretard (o *supershifts*) es va afegir l'anticòs indicat (a la taula M.12 es mostra la concentració

de treball de cada anticòs) o les mateixes quantitats de les corresponents IgGs com a control negatiu i es va incubar durant 30 min més a temperatura ambient. Finalment es va afegir la sonda i es va incubar durant 20 minuts addicionals a temperatura ambient.

Després de totes les incubacions, les mostres es van resoldre per electroforesi en gels d'acrilamida al 6% no desnaturalitzants en TBE 0,5X. Aquests gels es van assecar mitjançant l'aplicació simultània de buit i calor i es van exposar a pel·lícules radiogràfiques per detectar els senyals.

6. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ A NIVELL PROTEIC

6.1. Obtenció d'extractes proteics totals

L'extracció de proteïnes totals es va fer a partir de cèl·lules en cultiu creixent exponencialment. Es van rentar dues vegades en PBS1X i es van resuspendre en el tampó de llisi: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), EGTA 1 μ M, NaF 50 mM, NaCl 100 μ M, MgCl₂ 5 mM, NP-40 0,5%, inhibidors de fosfatases: Na₃VO₄ 50 μ M, benzimidina 5 mM i p-nitrofenil fosfat, i la barreja d'inhibidors de proteases *Complete Mini*, que inclou inhibidors de serina i cisteïna proteases i de metal·loproteases (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya). Es van incubar durant 20 minuts a 4°C i es van centrifugar al màxim per recuperar el sobrenedant. La concentració proteica es va determinar pel mètode Bradford (Bradford, 1976).

6.2. Obtenció de medis condicionats

Per l'obtenció del medi condicionat de les línies cel·lulars MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail, les cèl·lules es van créixer en plaques P100 fins un 50% de confluència, es van rentar amb PBS i es van deixar en medi sense sèrum durant 6 hores, després de les quals es va fer un canvi i es van tornar a deixar en medi sense sèrum. Passades 24 hores es va recollir el medi i es va centrifugar per clarificar de restes cel·lulars. La concentració proteica dels medis condicionats es va determinar pel mètode Bradford (Bradford, 1976). En cas que fos necessari, es concentrava per centrifugació amb concentradors Centricon-30 (Amicon Inc., Beverly, MA, EEUU) abans de ser utilitzat per l'assaig de zimografia.

6.3. Extracció de proteïnes associades a membrana

Les fraccions de proteïnes associades a membrana es van preparar a partir de cultius cel·lulars creixent exponencialment. Per la llisi, les cèl·lules es van incubar durant 30 minuts a 4°C en 200 µL de tampó de llisi (2,5% de Tritó X-114 en TBS (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM) i es van centrifugar per eliminar el material insoluble/Tritó X-114. Els homogenats es van sotmetre a separació de fases per incubació a 37°C durant 5 minuts i centrifugació a 3.000g, de manera que la fase hidrofòbica contenia les proteïnes de membrana. La concentració proteica es va determinar per mètode BCA (àcid bicinonínic) utilitzant el kit *BCA Protein Assay Reagent* (PIERCE, Rockford, IL, EEUU) seguint les instruccions del fabricant.

6.4. Anàlisi de l'activitat gelatinolítica

L'anàlisi d'activitat proteolítica es va dur a terme mitjançant assajos de zimografia (Llorens et al., 1998), els quals permeten estudiar la capacitat de degradació, per part d'un enzim, d'un determinat substrat, en el nostre cas la gelatina (col·lagen desnaturalitzat). Per dur a terme els assajos de zimografia es van analitzar les proteïnes procedents de medis condicionats o de la fracció de proteïnes associades a membrana.

Breument, 12 µg de proteïna procedent dels medis condicionats o 50 µg de proteïna de la fracció associada a membrana es van separar electroforèticament en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) contenint un 0,1% de gelatina. Després de l'electroforesi, els gels es van rentar amb Tritó X-100 2,5% dues vegades durant 45 minuts a temperatura ambient per eliminar restes de SDS i es van incubar amb un tampó que contenia NaCl 0,15M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,05% durant 48 hores a 37°C. Finalment els gels es van tenyir amb el colorant *Coomassie blue* i l'activitat proteinasa es va visualitzar per àrees clares sense tenyir degut a la degradació de la gelatina. La massa molecular de l'espècie activa corresponent es va calcular per extrapolació de la posició (Rf) envers la de proteïnes control de coneguda massa molecular.

6.5. Western Blot

L'anàlisi per *Western Blot* (Towbin et al., 1979) es va realitzar seguint el protocol convencional. Breument, es van separar electroforèticament 100 µg d'extracte proteic

total o 30 µg d'extracte proteic nuclear en gels SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) i es van transferir a membranes de PDVF (Immuno-P, Millipore, Massachusetts, EEUU). Després de la incubació amb l'anticòs primari, els anticossos units van ser detectats utilitzant anticossos secundaris conjugats a peroxidasa i rebel·lant per quimioluminescència mitjançant el kit *Supersignal West Pico* (PIERCE, Rockford, IL, EEUU). Les membranes es van exposar a pel·lícules radiogràfiques per detectar els senyals. Després de deshibridar-les, les mateixes membranes es van rehibridar amb un anticòs específic per tubulina α com a control de càrrega. L'origen i les dilucions de treball de cada anticòs utilitzat s'indica a les taules M.12 i M.13.

6.6. Immunofluorescència

Les cèl·lules es van créixer a confluència en plaques de 6 pous sobre portaobjectes de 12 mm de diàmetre i van ser fixades amb paraformaldehid al 3%. Després del bloqueig amb sèrum de cabra al 5% i albúmina bovina al 3% en TBS durant 1 hora a temperatura ambient, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs primari durant 1 hora a temperatura ambient. Es van rentar i es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat a fluoresceïna (FITC) corresponent. La longitud d'excitació de FITC és 495nm i la d'emissió 513 nm. La visualització dels nuclis es va fer mitjançant tinció amb DAPI (Sigma Chemical Co.). Els controls negatius es van realitzar seguint el mateix procediment però en absència de l'anticòs primari. Les preparacions es van muntar en Mowiol i es van visualitzar utilitzant un microscopi Zeiss Axiophot equipat amb epifluorescència. L'origen i la dilució de treball dels anticossos utilitzats es mostra a les taules M.12 i M.13.

6.7. Anticossos

Els diferents anticossos primaris i secundaris utilitzats s'indiquen en les taules M.12 i M.13:

Taula M.12. Anticossos primaris utilitzats.

<i>Anticossos primaris</i>	<i>Espècie</i>	<i>Mono-clonal</i>	<i>Poli-clonal</i>	<i>WB</i>	<i>IF</i>	<i>EMSA</i>	<i>Procedència</i>
Anti-MMP9	conill		X		1:500		Chemicon International Inc
Anti-Sp1	ratolí	X		1:250			BD Pharmingen Technical
Anti-Phospho-Erk1/2	conill		X	1:1000			Cell Signalling Technology
Anti-Erk1/2 total	conill		X	1:1000			Cell Signalling Technology
Anti-Phospho Akt	conill		X	1:1000			New England Biolabs
Anti-tubulina α	ratolí	X		1:5000			Sigma-ALDRICH
Anti-Id1	conill		X	1:200			Sta. Cruz
Anti-p65	conill		X			800 ng	Sta. Cruz
Anti-Sp1	conill		X			4 μ g	Sta. Cruz
Anti-Ets1	conill		X			4 μ g	Sta. Cruz
Anti-E47	conill		X			4 μ g	Sta. Cruz
Anti-Snail D885	conill		x			4 μ g	Cedit per la Dra. A. Cano

WB: *Western blot*, IF: immunofluorescència, EMSA: assaig de retard en gel

Taula M.13. Anticossos secundaris utilitzats.

<i>Anticossos secundaris</i>	<i>Espècie</i>	<i>WB</i>	<i>IF</i>	<i>Procedència</i>
Anti-conill-HRP	mico	1:1000		Amersham
Anti-ratolí-HRP	ovella	1:1000		Amersham
Anti-conill-FITC	cabra		1:100	Jackson

WB: *Western blot*, IF: immunofluorescència

Aquests anticossos es van emprar en les tècniques indicades i en les condicions senyalades en la taula.

RESULTATS

1. CARACTERITZACIÓ DEL PERFIL D'EXPRESSIONI GÈNICA EN LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA (TEM) INDUÏDA PELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ E47 I *SNAIL* EN CÈL·LULES EPITELIALS

S'ha descrit que la sobreexpressió del factor de transcripció bHLH E47 i del factor de dits de zinc *Snail* en la línia cel·lular epitelial prototípica *Madyn Darvy Canine Kidney* (MDCK), derivada d'un epiteli de ronyó de gos, indueix canvis fenotípics dramàtics coneguts comunament com a transició epiteli-mesènquima (TEM). L'expressió d'aquests factors de transcripció provoca el trencament dels contactes intercel·lulars, la dissociació cel·lular i un increment en la motilitat cel·lular, a més a més de l'adquisició de propietats invasives i tumorigèniques (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Les característiques fenotípiques dels transfectants MDCK-E47 (línia parental transfectada amb el cDNA d'E47 murí) i MDCK-Snail (línia parental transfectada amb el cDNA de *Snail* murí) revelen diferències importants en el comportament d'aquestes cèl·lules. En aquest sentit, la línia MDCK-Snail té major capacitat d'invasió en cultius tridimensionals de col·lagen crescuts *in vitro* i *in vivo* a temps curts, mentre que a temps llargs les cèl·lules MDCK-E47 adquireixen major capacitat invasiva (Peinado et al., 2004a). Per altra banda, els tumors induïts per MDCK-E47 mostren un major grau de proliferació que els induïts per MDCK-Snail (Perez-Moreno et al., 2001). Aquestes observacions suggereixen que malgrat que els dos factors de transcripció són capaços d'induir una TEM completa i un fenotip invasiu i tumorigènic, podrien operar en distints aspectes del procés.

Per investigar amb més profunditat l'acció diferencial i/o similar d'E47 i *Snail* sobre l'expressió de gens diana, es van analitzar independentment els patrons d'expressió gènica de les línies cel·lulars MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte la línia cel·lular control MDCK-CMV (línia parental transfectada amb el vector buit en el que estan clonats E47 i *Snail*). Aquest anàlisi es va fer mitjançant dues tècniques: la tècnica *RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction* (RAP-PCR) (Welsh et al., 1992) i la tècnica de *microarrays* de cDNA (Schena et al., 1995).

1.1. Estudi de l'expressió diferencial de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant RAP-PCR

La *RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction* (RAP-PCR) (Welsh et al., 1992) és una tècnica d'anàlisi de l'expressió diferencial de gens basada en l'amplificació de seqüències anònimes i arbitràries mitjançant PCR a partir de RNA prèviament traduït a cDNA. Breument, el conjunt de productes amplificats per a cada mostra obtingut

emprant un encebador escollit arbitràriament pot ser separat per electroforesi -en condicions desnaturalitzants- donant lloc al que s'anomena *fingerprint*. Els *fingerprints* tenen un patró de bandes característic per a cada encebador, que ha de ser reproduïble d'un experiment a l'altre en les mateixes condicions, i a més a més és desitjable que es generin un mínim de 20 bandes. La comparació dels *fingerprints* obtinguts en paral·lel de dues o més mostres permet la detecció de cDNAs que presenten diferències en intensitat o en presència/absència, la qual cosa suggereix diferències en l'expressió de gens concrets. La identificació dels gens als quals pertanyen els productes amplificats es fa mitjançant el clonatge de les bandes d'interès, la seqüenciació de les mateixes i la comparació de la seqüència amb les contingudes en bases de dades com el GenBank.

Un dels avantatges d'aquesta tècnica per el nostre propòsit concret és que permet comparar més de dues mostres alhora, de fet tantes com carrils tingui el gel d'electroforesi. A més a més, la quantitat de RNA de partida és molt baixa (tot i que treballant amb línies cel·lulars, obtenir una quantitat de mostra suficient no és gaire problemàtic). Malgrat que el conjunt del treball és elaboriós i s'han de fer molts experiments amb diferents encebadors per obtenir un nombre considerable de gens diferencialment expressats, l'ús de la RAP-PCR és justificat atès l'origen de les cèl·lules canines i la manca de disponibilitat de *microarrays* de cDNA en aquesta espècie en l'inici d'aquesta tesi.

1.1.1. Consideracions tècniques de la RAP-PCR

En la primera etapa de transcripció inversa (RT) s'utilitza un encebador oligo(dT) o un encebador arbitrari i en la segona etapa de PCR s'utilitza un encebador arbitrari (el mateix o un altre). No tots els encebadors són capaços de generar patrons arbitraris i reproduïbles de bandes. Els encebadors que es van utilitzar per dur a terme aquest treball ja s'havien provat al laboratori per fer RAP-PCR amb altres mostres i per tant ja sabíem que eren bons candidats per generar uns *fingerprints* informatius. De totes formes, es van fer algunes proves per valorar l'ús acurat amb les nostres mostres i trobar els límits i les condicions més ajustades de treball. Les proves es van dur a terme amb l'encebador TP53-CA.1 (5' AGG ATA CTA TTC AGC CCG AGG TG 3') i van ser les següents:

A. Determinació de la influència de la concentració de RNA a la RT

Calia determinar el rang de concentracions de RNA dins del qual el patró de bandes no variava substancialment, ni el nombre de bandes ni la intensitat d'unes respecte les altres, ja que del contrari les comparacions entre mostres diverses no serien acurades. Per això, es van utilitzar en una mateixa RT diferents quantitats de

RNA, des de 25ng fins 100 ng per reacció, i es va provar amb dues mostres: MDCK-Snail LD i MDCK-Snail HD. Com s'observa a la figura R.1 (carrils 1 de la mateixa línia cel·lular, carrils 2 de la mateixa línia cel·lular i carrils 3 de la mateixa línia cel·lular), amb les tres concentracions de RNA utilitzades es van obtenir *fingerprints* totalment reproduïbles. Es va escollir treballar amb 50 ng de RNA de partida en la reacció de RT, ja que és una concentració intermitja la qual es va comprovar que no afectava significativament els patrons de bandes.

B. Determinació de la influència de la concentració de cDNA en la PCR

La influència de la concentració de cDNA en la PCR es va determinar realitzant una PCR amb diferents quantitats (1,25 - 2,5 i 5 μ L) d'un mateix producte de RT. A més a més, per assegurar-nos que els resultats no depenien de la concentració de RNA a la RT, es va partir de tres concentracions de RNA diferents (25, 50 i 100 ng per reacció). Es van fer servir dues mostres (MDCK-Snail LD i MDCK-Snail HD). Els resultats de la figura R.1 mostren que per cada concentració de RNA el patró de bandes era idèntic independentment de la quantitat de cDNA emprat per la PCR. S'observa que utilitzant 5 μ L del producte de la RT en la PCR el *background* disminuïa però s'obtenien les mateixes bandes, de manera que suposava gastar molta mostra per un resultat no més informatiu. Per això, es va decidir treballar amb 2,5 μ L del producte de RT per la PCR ja que és un volum fàcilment pipetejable i, en cas necessari, permetia realitzar diverses PCRs a partir d'una mateixa extracció de RNA i d'una mateixa RT.

MDCK-Snail LD			MDCK-Snail HD		
25	50	100	25	50	100
1	2	3	1	2	3

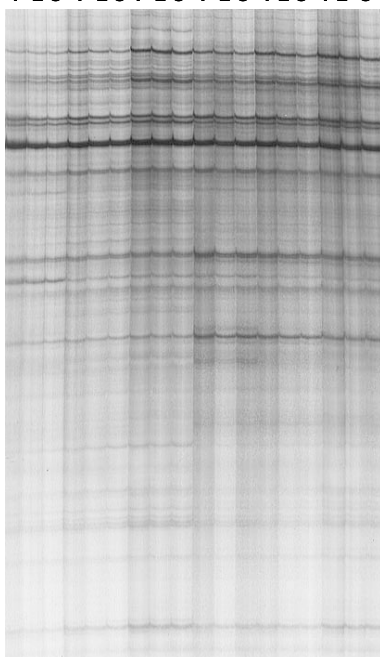


Figura R.1. Influència de la concentració de RNA i cDNA en els *fingerprints*. Diferents quantitats de RNA total (25, 50 i 100 ng) de les cèl·lules MDCK-Snail cultivades a baixa densitat cel·lular (LD) i a alta densitat cel·lular (HD) es van retrotranscriure a cDNA emprant l'encebador arbitrari TP53-CA1 (5' AGG ATA CTA TTC AGC CCG AGG TG 3'). Diferents quantitats del producte de la RT (carril 1: 1,25; carril 2: 2,5 i carril 3: 5 μ L) es van amplificar per PCR emprant el mateix encebador.

C. Valoració de la reproduïbilitat

La reproduïbilitat dels resultats es va valorar mitjançant l'anàlisi de tres rèpliques d'una mateixa mostra de RNA (es va provar amb dues mostres: MDCK-CMV LD i MDCK-CMV HD). En la figura R.2 s'observa que les tres rèpliques de cada mostra donen el mateix *fingerprint* i amb la mateixa intensitat.

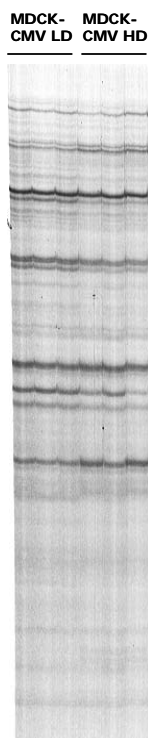


Figura R.2. Reproduïbilitat intrassaig de la tècnica de RAP-PCR. Es van realitzar experiments de RAP-PCR amb l'encebador TP53-CA.1 (5' AGG ATA CTA TTC AGC CCG AGG TG 3') a partir de 3 rèpliques d'una mateixa mostra de RNA total, concretament a partir de 50 ng de RNA de les cèl·lules indicades. En la PCR es van emprar 2,5 µL del producte de PCR.

Per tant, es tracta d'una tècnica reproduïble, però tot i així, en cada RAP-PCR es van incloure mostres de RNA procedents de dues extraccions independents per assegurar la reproduïbilitat dels resultats. A més a més, es van realitzar per cada encebador dos experiments independents de RT i PCR. Es va treballar amb 50ng de RNA total per fer la RT i amb 2,5 µL de producte de RT per fer la PCR.

1.1.2. Anàlisi de l'expressió diferencial de gens mitjançant RAP-PCR

Per dur a terme l'estudi de l'expressió diferencial de gens en les línies MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant la tècnica de la RAP-PCR es va partir de RNA total obtingut de dues extraccions independents. A més a més, atès que s'ha descrit que l'expressió d'alguns gens depèn de la densitat cel·lular en cultiu (Akao et al., 2003; Pocsik et al., 1994), l'extracció dels RNAs es va fer a partir de cèl·lules recollides en condicions de baixa confluència (LD) i d'alta confluència (HD).

Es van utilitzar 18 encebadors (veure apartat 3.2 de materials i mètodes) i es van obtenir diversos patrons de bandes o *fingerprints* com els de la figura R.3. Cada encebador va generar un repertori de bandes o *fingerprints* molt similars entre les diferents línies cel·lulars, suggerint que comparteixen un mateix *background* genètic (com era d'esperar ja que són transfectants d'una mateixa línia cel·lular parental). S'hi detectaven, però, algunes bandes que presentaven diferent intensitat (marcades en la figura amb una fletxa), que probablement corresponen a gens diferencialment expressats. En conjunt els 18 encebadors van generar un total de 35 bandes amb diferències d'intensitat en les línies MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte la línia control MDCK-CMV.

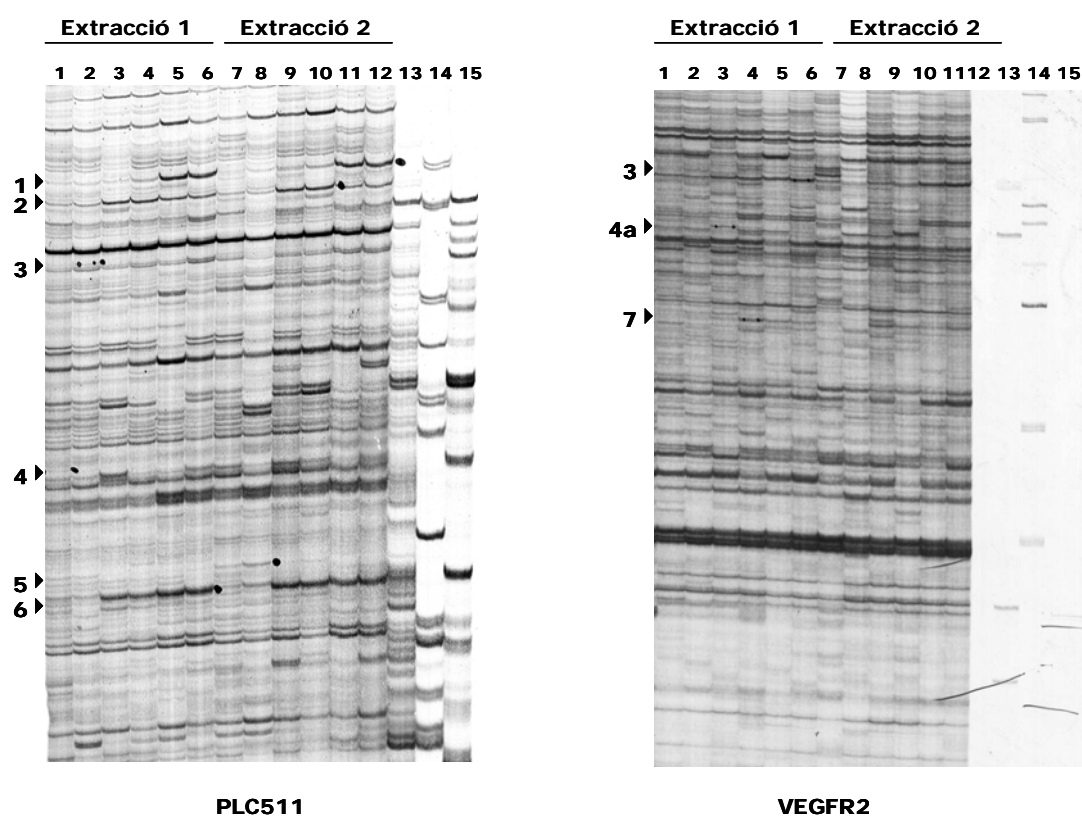


Figura R.3. Exemples de *fingerprints* obtinguts per RAP-PCR emprant els encebadors PLC511 (5' TCC GAA TGA GTG GGC AGA GG 3') o VEGFR2 (5' CCT CGG CTT GTC ACA TCT GCA 3'), respectivament. Les bandes amb diferències d'intensitat, probablement corresponents a gens diferencialment expressats, s'indiquen amb una fletxa. Es van utilitzar dues extraccions independents de RNA total. Carrils 1 i 7: MDCK-CMV LD; 2 i 8: MDCK-CMV HD; 3 i 9: MDCK-E47 LD; 4 i 10: MDCK-E47 HD; 5 i 11: MDCK-Snail LD; 6 i 12: MDCK-Snail HD; 13: control sense transcriptasa inversa; 14: control de l'H₂O de la RT; 15: control de l'H₂O de la PCR.

S'ha descrit que els factors de transcripció E47 i *Snail* poden actuar com a activadors transcripcionals (del Barrio and Nieto, 2002; Kee and Murre, 1998; Miyoshi et al., 2004; Schlissel et al., 1991; Zhao et al., 2001) o com a repressors transcripcionals (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001; Vega

et al., 2004), la qual cosa està d'acord amb els nostres resultats ja que s'han trobat gens amb l'expressió disminuïda i gens amb l'expressió augmentada (taula R.1). Analitzant les bandes que presentaven diferències d'intensitat (corresponents probablement a gens diferencialment expressats) a les cèl·lules MDCK-E47 respecte les cèl·lules MDCK-CMV s'observa que la proporció d'augmentos i disminucions (que equivaldria a guanys i pèrdues d'expressió) és similar, amb una lleugera tendència cap als guanys (taula R.1). Pel que fa a les bandes amb diferències d'intensitat a les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV la proporció d'augmentos i disminucions és igual.

	Intensitat disminuïda	Intensitat augmentada	Nº total de gens
MDCK-E47 vs MDCK-CMV	12 (46%)	14 (54%)	26 (100%)
MDCK-Snail vs MDCK-CMV	15 (50%)	15 (50%)	30 (100%)

Taula R.1. Anàlisi de les bandes amb diferència d'intensitat trobades mitjançant RAP-PCR en les cèl·lules MDCK-E47 o MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV segons presenten un augment o una disminució.

Si s'analitzen les bandes amb diferència d'intensitat de les tres línies cel·lulars per obtenir informació sobre aspectes comuns de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail així com patrons específics i diferencials de cadascuna, s'observa que més de la meitat de les bandes amb diferència d'intensitat, concretament un 65%, apareixien tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail diferents respecte les cèl·lules control (taula R.2). A més a més, i com era d'esperar, E47 i *Snail* afectaven de la mateixa manera aquests putatius gens diana comuns, ja sigui activant-los o reprimint-los (de forma directa o indirecta). Això suggereix que la inducció de la TEM mediada per aquests factors de transcripció comparteix vies comunes de regulació.

Per altra banda, els resultats també mostren que hi ha una sèrie de bandes que només presentaven diferències d'intensitat en les cèl·lules MDCK-E47 o en les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV, i que probablement corresponen a gens regulats únicament per E47 o per *Snail*; aquest fet explicaria les característiques diferencials dels dos fenotips. Concretament, el 12% de bandes només presentava diferències d'intensitat en les cèl·lules MDCK-E47 respecte les cèl·lules MDCK-CMV, i totes elles estaven augmentades. En canvi, el 24% de bandes presentava diferències d'intensitat en les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV, de les que un 9% estaven disminuïdes i un 15% estaven augmentades (taula R.2).

	Intensitat disminuïda	Intensitat augmentada	Nº total de bandes
MDCK-E47 i MDCK-Snail vs MDCK-CMV	12 (35%)	10 (29%)	22 (65%)
MDCK-E47 vs MDCK-CMV	0 (0%)	4 (12%)	4 (12%)
MDCK-Snail vs MDCK-CMV	3 (9%)	5 (15%)	8 (24%)
Nº total de gens	15 (44%)	19 (56%)	34 (100%)

Taula R.2. Moltes de les bandes que presenten diferències d'intensitat són comunes a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, mentre que algunes bandes només són diferents entre les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-CMV o entre les cèl·lules MDCK-Snail i MDCK-CMV. Anàlisi de les bandes amb diferències d'intensitat, corresponents probablement a gens diferencialment expressats, segons si hi ha un augment o una disminució en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail o en una sola d'aquestes línies cel·lulars respecte les cèl·lules MDCK-CMV. Com que dos dels cDNAs trobats corresponien a diferents regions d'un mateix gen, per fer els càlculs es van considerar 34 bandes.

Les bandes dels *fingerprints* obtinguts que presentaven diferències d'intensitat es van retallar del gel d'acrilamida (veure apartat 3.2 de materials i mètodes) i es van clonar per poder seqüenciar-les i identificar mitjançant la comparació amb seqüències ja descrites. De les 35 bandes retallades:

- 3 no es van poder clonar per dificultats tècniques insuperables
- 8 no presentaven homologia amb cap dels gens referenciats en les bases de dades del GenBank fins la data
- 24 presentaven homologia amb gens coneguts (2 corresponien a diferents regions d'un mateix gen)

L'any 2004 es va seqüenciar completament el genoma de gos, la qual cosa ha permès la predicció de molts gens mitjançant mètodes computacionals, concretament amb el programa GNOMON (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/gnomon.html>). Alguns gens, però, ja estaven seqüenciats i publicats en treballs anteriors. Tot i això, 7 dels cDNAs que es van trobar diferencialment expressats no donaven homologia amb cap gen inclòs a les bases de dades del GenBank, ja sigui de gos o d'una altra espècie. Probablement es tracta de gens encara no identificats o de regions poc conservades i que per tant no tenen homologia amb altres espècies. De moment, la única informació sobre la identitat d'aquests cDNAs és el cromosoma on es troben en l'espècie canina.

Per a la següent part de l'anàlisi dels resultats ens vam centrar en els 24 gens identificats. En la taula R.3 hi ha una relació de tots ells classificats segons si estaven sobreexpressats o infraexpressats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV.

Taula R.3. Resum dels gens trobats diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV mitjançant RAP-PCR.

Gen	Nom de la banda	Referència del GenBank		
		Humà	Murí	Caní **
<u>E47/Snail</u>				
Expressió disminuïda				
Regió MHC class II	PLC511 3			AJ630365
<i>Junctional adhesion molecule 1</i> (JAM-1)	PLC511 5	XM041917	MMU89915	XM536132
Queratina 7	TP53CA.1 3/5*	NM005556	AF509888	XM534795
Desmocolina 2 (DSC2)	VEGF R+F 14	NM024422	X73885	CFAJ02299
Pleckstrina 2 (PLECK2)	ML18-B 12	BC00856	NM013738	XM537486
<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i> (TFPI-2)	ML18-B 15	AY691946	NM009364	XM532462
Smad 4	ML 3	NM005359	NM011200	-
Proteïna tirosina fosfatasa IV A, member 1 (PTP4A1)	H12/B 7	NM003463	-	-
dJ347H13.4	H12/B 10	CR456458	-	XM538350
Expressió augmentada				
Proteïna morfogenètica de l'ós 1 (BMP-1)	PLC511 2	NM006129	BC063079	-
Proteïna KIAA1917	PLC511 6	AB067504	-	XM540446
Proteïna associada a microtúbuls 1B (MAP1B)	D12S77a+b 10	NM032010	BC037105	-
<i>Vacuolar protein sorting 13A isoform A</i> (VPS13A o CHAC)	VEGFR2 3	NM033305	NM173028	XM533522
Homòleg de Rad21	D4S912GT 1	NM0062565	NM009009	-
<u>E47</u>				
Expressió augmentada				
<i>Six transmembrane epithelial antigen of prostate</i> (STEAP)	pU6 3	BC066301	NM027399	-
Aldolasa	ML 5	XM372682	BC066149	XM548671
Proteoglicà condroití sulfat 2 (versicà)	VEGFR2 4a	NM004385	D16263	XM546039
<u>Snail</u>				
Expressió disminuïda				
Proteïna de divisió del cicle cel·lular 25B (cdc25B)	ML18-B 4	BC009953	NM02317	-
Caveolina 2 (CAV2)	ML 6	NM001233	NM016900	NM0101997
<i>Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13</i> (NUDT3)	H12/B 6	NM015901	BC0409948	XM536385
Expressió augmentada				
<i>Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein 78kDa) binding protein 1</i> (HSPA5BP1)	PLC511 1	NM178031	NM133804	-
AHNAK	ML18-B 10	NM001620	NM009643	XM540909
Gens dels RNAs ribosòmics 18S, 5.8S i 28S	ML18-B 19		J00623	-

* Es van trobar dues bandes corresponents a diferents regions del mateix gen.

** Els números d'accés de color verd indiquen que són gens de gos predits computacionalment amb el programa GNOMON (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/gnomon.html>).

Pel que fa a la influència de la densitat cel·lular sobre l'expressió gènica, en el cas dels gens diferencialment expressats que es van identificar no es van trobar diferències en funció del grau de confluència del cultiu.

1.1.3. Validació dels resultats per *Northern Blot*

La tècnica de la RAP-PCR, com totes les tècniques d'anàlisi d'expressió diferencial, pot donar falsos positius inherents a la manipulació de les mostres. Així, i atesa la naturalesa exponencial de la PCR, lleugeres variacions en les condicions d'assaig poden alterar considerablement la relació entre els productes i generar resultats artefactuals. Per tot això, cal validar els resultats amb tècniques complementàries com el *Northern blot* o la RT-PCR semiquantitativa o quantitativa.

Per confirmar els nostres resultats obtinguts per RAP-PCR es van escollir els gens que ens interessaven més per la seva relació amb el procés de TEM, concretament els associats a invasió/migració. Les bandes corresponents a aquests gens es van marcar radioactivament i es van utilitzar com a sonda en dues hibridacions diferents. En la primera, realitzada per assegurar que les bandes aïllades i clonades eren realment les que s'havien seleccionat del gel d'acrilamida, cada sonda es va hibridar amb una membrana transferida a partir d'un tros del gel de la RAP-PCR que contenia, entre altres, la banda d'interès. Per altra banda, la sonda es va hibridar amb una membrana de *Northern blot*. És a dir, el RNA total de cada línia cel·lular es va separar electroforèticament en un gel d'agarosa desnaturalitzant i es va transferir a una membrana que es va hibridar amb la sonda apropiada.

En la figura R.4 es mostren els resultats de les hibridacions entre dues membranes transferides a partir dels gels de RAP-PCR i dues de les sondes que es van utilitzar, la banda PLC511 5 (JAM1) i ML18B 12 (Pleckstrin 2). Com es pot observar, cada sonda hibridava sobre la seqüència corresponent a la banda esperada en el gel de la RAP-PCR, la qual cosa indicava que les bandes clonades corresponien a les retallades. Les hibridacions amb la resta de sondes van donar els mateixos resultats, és a dir, s'havia clonat el que realment interessava.

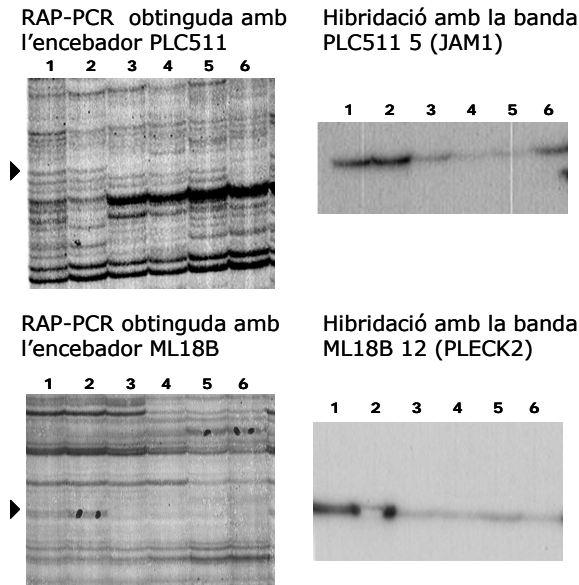


Figura R.4. Comprovació de l'aïllament i clonatge de la banda seleccionada. Els cDNAs diferencialment expressats (indicats amb fletxes) es van marcar radioactivament i es van utilitzar com a sonda per hibridar membranes (dreta) transferides d'un tros del gel d'acrilamida (esquerra) de la RAP-PCR que contenia el producte amplificat d'interès.

A més a més, els *Northern blots* hibridats amb les sondes escollides van confirmar les diferències detectades per RAP-PCR, excepte en el cas de TFPI-2 que mitjançant aquesta tècnica es detectava menor expressió a les cèl·lules MDCK-Snail que a les cèl·lules MDCK-CMV però no a les cèl·lules MDCK-E47, en les que segons les RAP-PCRs la banda corresponent a TFPI-2 tenia menor intensitat que a les cèl·lules MDCK-CMV (figura R.5).

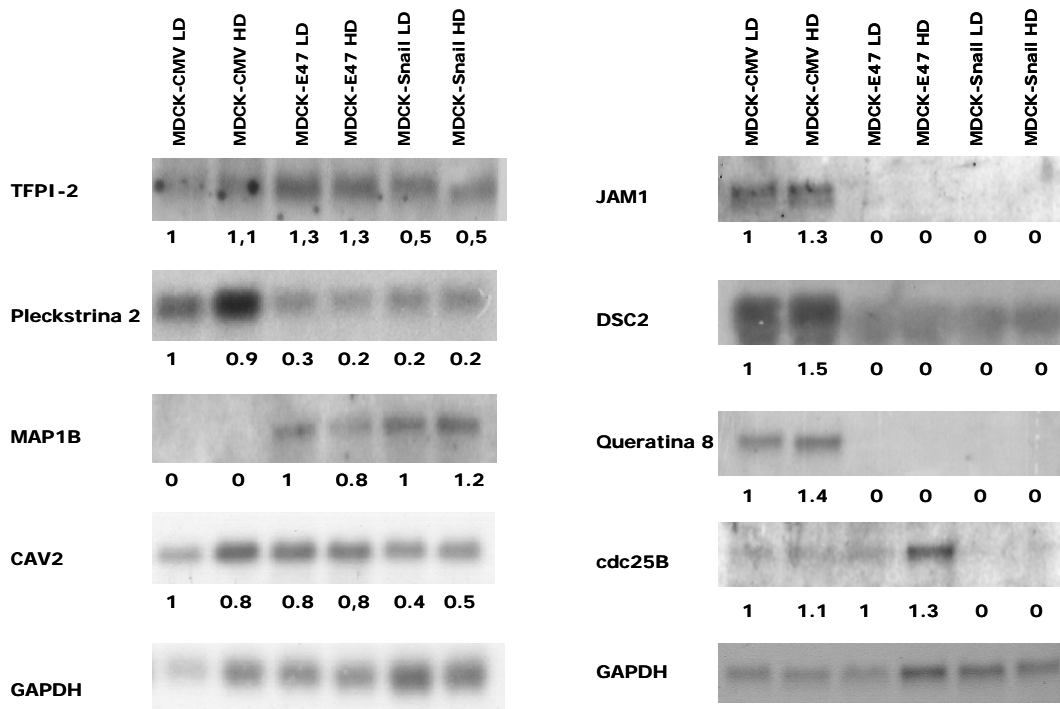


Figura R.5. Validació dels resultats de la RAP-PCR mitjançant *Northern blot*. Es va obtenir RNA total de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail cultivades en condicions de baixa densitat cel·lular (LD) o alta densitat cel·lular (HD) i es van separar 10 µg per electroforesi en gels desnaturalitzants al 1,1% d'agarosa que es van transferir a membranes. Les membranes es van hibridar amb els cDNAs trobats diferencialment expressats, amplificats per PCR i marcats radioactivament. Com a control de càrrega les membranes es van hibridar amb una sonda del gen GAPDH.

1.1.4. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats

Atès el canvi fenotípic dràstic que pateixen les cèl·lules epitelials en adquirir un fenotip mesenquimal (Boyer et al., 2000; Hay, 1995; Thiery, 2002), és d'esperar que hi estiguin implicades nombroses molècules amb funcions molt variades. Això queda reflectit en els nostres resultats ja que els gens que es van trobar diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV poden classificar-se en diferents categories funcionals (taula R.4).

Taula R.4. Classificació funcional dels gens trobats diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV mitjançant RAP-PCR.

Funció	E47/Snail		E47		Snail	
	Expressió augmentada	Expressió disminuïda	Expressió augmentada	Expressió disminuïda	Expressió augmentada	Expressió disminuïda
Adhesió cel·lular		JAM1 DSC2				
Matriu extracel·lular (MEC)			versicà			
Proteases de MEC	BMP-1	TFPI-2				
Proteïnes de citoesquelet	MAP1B	Queratina 7 PLECK2				CAV2
Cicle cel·lular						Cdc25B
Apoptosi					HSPASBP1	
Factors de transcripció		Smad 4				
Quinases/ Fosfatases		PTP4A1				
Metabolisme i transportadors			Aldolasa STEAP			NUDT3
Funcions bàsiques					rRNAs 18S, 5.8s i 28S	
Sistema immune		MHC class II				
Miscel·lani	CHAC Homòleg de Rad 21 KIAA1917	dJ437H13.4			AHNAK	

Com pot observar-se a la taula R.4, un 40% dels gens identificats estan directament relacionats amb el procés d'invasió/migració associat a la TEM, en base a la bibliografia. La majoria d'aquests gens estan diferencialment expressats tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail respecte les cèl·lules control suggerint-los comuns al procés de TEM induït per ambdós factors de transcripció. Dins aquest grup de

gens s'inclouen les pèrdues de gens que codifiquen per proteïnes d'adhesió cel·lular o proteïnes de citoesquelet pròpies de cèl·lules epitelials, i contràriament l'augment de gens que codifiquen per proteases de MEC o proteïnes associades al citoesquelet característiques d'un fenotip mesenquimal, entre altres.

Per altra banda, entre els gens expressats diferencialment només a la línia MDCK-E47 o a la MDCK-Snail respecte les cèl·lules control destaca un grup relacionat amb metabolisme així com algun gen associat a cicle cel·lular o a apoptosi, la qual cosa dóna suport al paper diferencial d'E47 i *Snail* en el control de canvis d'expressió gènica específics.

1.2. Estudi de l'expressió diferencial de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant *microarrays* de cDNA

Una tècnica alternativa d'estudi de l'expressió gènica és mitjançant *microarrays* de cDNA (Schena et al., 1995), que permet determinar l'expressió de mils de gens coneguts simultàniament (Schena et al., 1996). Després de finalitzar els anàlisis per RAP-PCR, atesa la major disponibilitat i varietat de xips per *microarrays* de cDNA, es va dur a terme l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant aquesta tècnica en col·laboració amb el Dr. Palacios del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid) i la Dra. A. Cano de l'Instituto de Investigaciones de Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM (IIB, Madrid), emprant l'Oncochip. Breument, es van hibridar alhora dues mostres de RNA (corresponents a les cèl·lules MDCK-E47 versus MDCK-CMV o MDCK-Snail versus MDCK-CMV) marcades amb dos fluorocroms diferents (Cy5 -verd- i Cy3 -vermell-) sobre una plataforma o xip que contenia aproximadament 6.000 cDNAs, incloent gens i ESTs humans implicats en diverses funcions com apoptosi, cicle cel·lular, angiogènesi, reparació de DNA, diferenciació, factors de creixement, entre altres. D'aquesta manera, en el cas de gens que no presenten diferències d'expressió s'obté un senyal groc i en el cas que presenten diferències d'expressió s'obté un senyal verd o vermell, segons si l'expressió està augmentada o disminuïda respecte la mostra control. Cal incloure els controls necessaris per eliminar el soroll de fons i normalitzar els senyals; per això aquest xip contenia gens d'altres organismes o RNAs sintètics (controls negatius) i gens considerats *housekeeping* (controls positius).

L'elecció d'un xip de cDNAs humans es deu a que, per una banda, en aquells moments no hi havia xips de cDNAs de gos, i per altra banda, existeix una elevada homologia (>90%) del genoma de gos amb l'humà, particularment en la regió codificant i en les seqüències reguladores (Kirkness et al., 2003).

El RNA que es va utilitzar per fer l'estudi per *microarrays* de cDNA és el mateix que el de les RAP-PCRs, però atès que la confluència cel·lular no influeix en l'expressió de la majoria dels gens trobats per RAP-PCR diferencialment expressats i que mitjançant *microarrays* només es poden comparar dues mostres en cada hibridació, es va treballar amb una sola densitat cel·lular, la baixa o LD.

L'anàlisi de l'expressió gènica diferencial mitjançant *microarrays* de cDNA va permetre detectar un total de 57 gens diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les control MDCK-CMV. Mitjançant aquesta tècnica també es van trobar gens amb l'expressió reduïda i gens amb l'expressió augmentada. L'anàlisi dels resultats obtinguts en les cèl·lules MDCK-E47 respecte les cèl·lules MDCK-CMV indica que un 35% dels gens trobats diferencialment expressats estava infraexpressat mentre que un 65% estava sobreexpressat (taula R.5). Pel que fa a les cèl·lules MDCK-Snail té lloc el contrari, és a dir, un 63% dels gens trobats diferencialment expressats presentaven l'expressió disminuïda respecte les cèl·lules MDCK-CMV mentre que un 37% la presentaven augmentada.

	Expressió disminuïda	Expressió augmentada	Nº total de gens
E47	12 (35%)	23 (65%)	34 (100%)
Snail	26 (63%)	15 (37%)	41 (100%)

Taula R.5. Anàlisi mitjançant *microarrays* de cDNA dels gens diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 o MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV segons presenten un augment o una disminució.

D'acord amb els resultats de les RAP-PCRs, mitjançant *microarrays* de cDNA es van detectar gens comuns diferencialment expressats i de la mateixa manera tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail respecte les cèl·lules control, concretament un 33% (taula R.6), la qual cosa dona suport a la hipòtesi que els dos factors de transcripció indueixen la TEM mitjançant vies de regulació comunes. Per altra banda, també es van trobar gens només diferencialment expressats a les cèl·lules MDCK-E47 (27%) o a les MDCK-Snail (40%), que estarien implicats en el comportament diferencial d'aquestes línies cel·lulars. Els gens regulats únicament per E47 presentaven l'expressió augmentada respecte les cèl·lules MDCK-CMV, mentre que d'entre els regulats per *Snail* un 28% la presentaven disminuïda i un 12% la presentaven augmentada.

	Expressió disminuïda	Expressió augmentada	Nº total de gens
E47 / Snail	11 (19%)	8 (14%)	19 (33%)
E47	1 (2%)	14 (25%)	15 (27%)
Snail	16 (28%)	7 (12%)	23 (40%)
Nº total de gens	28 (49%)	29 (50%)	57 (100%)

Taula R.6. Molts dels gens trobats mitjançant la tècnica de *microarrays* de cDNA estan diferencialment expressats tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV, mentre que altres només estan diferencialment expressats en una de les dues línies cel·lulars. El total de gens trobats va ser de 57.

1.2.1. Validació dels resultats per Northern Blot o RT-PCR semiquantitativa

Els resultats que s'obtenen per *microarrays* de cDNA també s'han de validar per tècniques alternatives. Un dels gens que es va detectar amb aquesta tècnica com a infraexpressat tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV va ser la cadherina E. Aquest és un bon control de validació de la tècnica ja que està descrit que efectivament les cèl·lules MDCK deixen d'expressar cadherina E quan es transfecta establement E47 o *Snail* (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). De totes formes, es va comprovar amb alguns dels gens que més ens interessaven per la seva funció i relació amb la TEM si les diferències detectades eren reals. La validació dels resultats es va fer mitjançant RT-PCR semiquantitativa o per *Northern blot*.

Les RT-PCRs es van dur a terme emprant encebadors específics dels gens TIMP-1 (inhibidor de teixit de metal·loproteases 1) i MMP-3 (metal·loproteasa 3) de gos (referència del GenBank AF077817 i AY183143, respectivament). Com a control de càrrega es van utilitzar encebadors específics per la ciclofilina (referència del GenBank XM532704).

Per fer el *Northern blot* es van separar electroforèticament 10 µg de RNA de cada línia cel·lular en gels desnaturalitzants d'agarosa i es van transferir a una membrana que es va hibridar amb el *full-length* del gen SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*) murí (referència del GenBank NM009242). Com a control de càrrega la mateixa membrana es va rehibridar amb el *full-length* del gen murí GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, referència del GenBank NM001001303).

Com s'observa a la figura R.6, efectivament les diferències detectades per *microarrays* de cDNA dels gens que es van comprovar són reals.

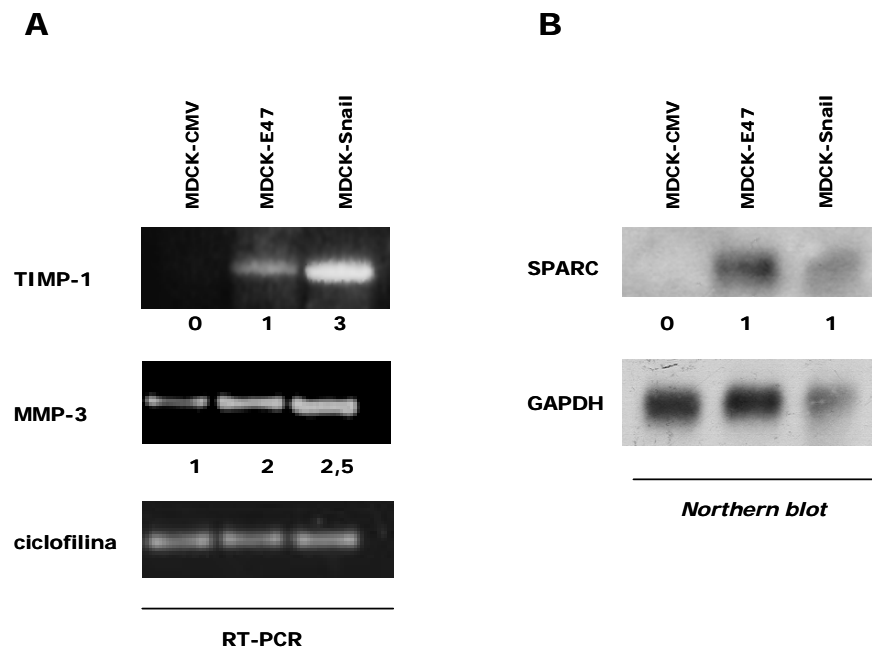


Figura R.6. Validació dels resultats dels *microarrays* de cDNA. (A) Anàlisi de l'expressió de TIMP-1 i MMP-3 mitjançant RT-PCR semiquantitativa a partir de 0,5 µg de RNA total. Com a control de càrrega es va amplificar un fragment de la ciclofilina (225 pb). (B) Anàlisi de l'expressió de SPARC mitjançant *Northern blot*. Es van separar 10 µg de RNA total per electroforesi en gels desnaturalitzants al 1,1% d'agarosa que es van transferir a membranes. Les membranes es van hibridar amb el *full-length* de SPARC murí. Com a control de càrrega les membranes es van hibridar amb una sonda del gen GAPDH. Els números de la part inferior de cada gel indiquen l'increment d'expressió respecte les cèl·lules MDCK-CMV.

1.2.2. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats

Així com es va trobar en l'estudi mitjançant RAP-PCR, l'anàlisi detallat dels gens detectats per *microarrays* de cDNA en relació a la seva funció va permetre observar que pertanyen a diferents categories funcionals. Dins dels gens diferencialment expressats es van trobar gens relacionats amb adhesió cel·lular, MEC, regulació transcripcional, cicle cel·lular, senyalització o metabolisme, entre d'altres (taula R.7).

Com s'observa a la taula R.7, aproximadament un 30 % dels gens diferencialment expressats estaven associats directament amb la TEM, concretament amb el procés d'invasió/migració: gens implicats en adhesió cel·lular, matriu extracel·lular i citoesquelet. La majoria d'aquests gens estaven regulats per E47 i per *Snail* de la mateixa manera, és a dir, presentaven l'expressió augmentada o disminuïda tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV.

Taula R.7. Classificació funcional dels gens trobats diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant *microarrays* de cDNA.

Gen	E47		Snail		Funció	Gen (nom complet)
	Cy3	Cy5	Cy3	Cy5		
APG-1	0.948		1.628	1.416	Funció cel·lular bàsica	heat shock protein (hsp110 family)
PLSCR1	-1.921	-1.283	-1.671	-1.377	Funció cel·lular bàsica	phospholipid scramblase 1
RPL44	0.189	-0.39	2.86	2.046	Funció cel·lular bàsica	ribosomal protein L44
CDH1	-4.448	-4.097	-4.451	-3.442	Adhesió cel·lular	E-cadherin
CTNND1	-0.311	-0.108	1.416	1.844	Adhesió cel·lular	catenin delta 1
DSP	-0.561	-0.699	-2.826	-1.938	Adhesió cel·lular	desmoplakin
ITGA6	0.622	0.277	-1.536	-1.636	Adhesió cel·lular	integrin, alpha 6
ITGA7	1.628	2.002	0.271	0.377	Adhesió cel·lular	integrin, alpha 7
ITGB1	0.891	0.785	1.587	1.414	Adhesió cel·lular	integrin beta 1
TNFAIP6	-2.826	-2.531	-2.458	-1.837	Adhesió cel·lular	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
CCND1	0.895	0.896	-1.565	-1.599	Cicle cel·lular	cyclin D1
GAS1	2.724	3.527	0.253	0.586	Cicle cel·lular	growth arrest-specific 1
HDGF	0.586	0.692	-1.726	-1.493	Creixement cel·lular	hepatoma-derived growth factor
SPRY2	1.371	1.871	0.652	0.697	Creixement cel·lular	sprouty (Drosophila) homolog 2
CALD1	2.427	2.722	2.75	1.811	Senyalització	caldesmon 1
EPS8	1.059	1.063	-1.563	-1.845	Senyalització	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8
GNG11	1.726	1.96	0.679	0.703	Senyalització	guanine nucleotide binding protein 11
IL1RN	-2.088	-2.831	-2.592	-2.458	Senyalització	interleukin 1 receptor antagonist
RGS2	-3.857	-4.059	-3.336	-3.626	Senyalització	regulator of G-protein signalling 2, 24kD
LUM	0.388	-0.403	1.835	1.303	Matriu extracel·lular	Lumican
COL1A2	2.267	2.918	1.968	1.78	Matriu extracel·lular	collagen, type I, alpha 2
COL3A1	-0.892	0.232	4.376	3.862	Matriu extracel·lular	collagen, type III, alpha 1
NID2	-2.019	-1.903	-1.416	-1.495	Matriu extracel·lular	nidogen 2
SERPINH2	1.645	1.094	1.529	1.3	Matriu extracel·lular	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 2

SPARC	5.245	4.761	5.324	5.149	Matriu extracel·lular	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin, SPARC)
SPP1	-2.68	-2.565	-3.366	-1.955	Matriu extracel·lular	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)
SERPINE1	1.309	1.641	2.861	3.447	Matriu extracel·lular	plasminogen activator inhibitor type 1
PPP1CB	-0.394	-0.124	-1.495	-1.842	Quinases/fosfatases	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
PTPN3	-0,41	-0.452	-1.806	-1.657	Quinases/fosfatases	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
PTPNS1	2.585	2.53	0.094	0.021	Quinases/fosfatases	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1
ANXA3	-1.201	-1.732	-0.502	-0.49	Metabolisme i transportadors	annexin A3
ANXA5	1.602	1.329	1.65	1.31	Metabolisme i transportadors	annexin A5
CYP1B1	1.661	1.672	0.418	0.247	Metabolisme i transportadors	cytochrome P450, subfamily I, polypeptide 1
CYP51	0.361	-0.586	-1.286	-1.826	Metabolisme i transportadors	cytochrome P450, 51 (lanosterol 14-alpha-demethylase)
RANBP7	-0.544	-0.314	-1.746	-1.751	Metabolisme i transportadors	RAN binding protein 7
SLC2A3	-0.409	-0.05	-1.905	-1.625	Metabolisme i transportadors	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
MMP3	1.467	1.63	0.424	0.518	Metal·loproteases	matrix metalloproteinase 3
TIMP1	2.543	2.562	1.509	1.268	Metal·loproteases	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TIMP3	-0.827	-1.029	-2.197	-2.168	Metal·loproteases	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
MT1L	2.309	2.151	1.158	0.364	Miscel·lani	metallothionein 1L
CDYL	-0.086	0.851	-1.671	-1.847	Miscel·lani	chromodomain protein, Y chromosome-like
FLJ21032	2.459	2.857	1.519	2.707	Miscel·lani	hypothetical protein FLJ21032
HSPC195	2.066	2.273	0.748	0.141	Miscel·lani	hypothetical protein
ITM2B	1.949	2.381	0.757	0.878	Miscel·lani	integral membrane protein 2B
KIAA0438	-0.582	-0.311	-1.943	-1.613	Miscel·lani	KIAA0438 gene product
MDS003		-1.139	-1.434	-1.51	Miscel·lani	x 003 protein
PLSCR1	-1.921	-1.283	-1.671	-1.377	Miscel·lani	PRO1073 protein
PRO1073	1.909	2.134	0.628	0.455	Miscel·lani	hypothetical protein PRO1489
TFF1	-2.427	-2.737	-2.699	-2.766	Miscel·lani	trefoil factor 1 (breast cancer)
TMEFF1	2.039	1.699	1.134	0.694	Miscel·lani	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1
SFRS7	-0.203	-0.165	-1.747	-1.736	Miscel·lani	splicing factor, arginine/serine-rich 7 (35kD)
KRT19	-1.816	-2.816	-2.45	-3.095	Proteïnes estructurals	keratin 19

MITF	-1.541	-2.013	-2.359	-2.158	Factor de transcripció	microphthalmia-associated transcription factor
SMARCE1	-0.192	-0.099	-1.887	-1.707	Factor de transcripció	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily
TWIST	1.583	1.778	0.259	0.27	Factor de transcripció	Twist homoleg
KRML	2.96	3.747	0.02	0.322	Supressor de tumors	Kreisler (mouse) maf-related leucine zipper homolog

Paral·lelament a l'anàlisi mitjançant RAP-PCR i *microarrays* de cDNA dels perfils d'expressió gènica de les TEMs induïdes per E47 i *Snail* a les cèl·lules MDCK, es va estudiar el possible paper de la metal·loproteasa MMP-9 i del factor de transcripció HLH Id-1 en aquesta conversió fenotípica, ja que es van considerar bons candidats atès dades d'estudis previs.

Per una banda, treballs anteriors realitzats al nostre laboratori van trobar una correlació inversa de l'expressió de MMP-9 i cadherina E en les cèl·lules murines de carcinoma de pell escamós HaCa4 altament metastàtiques. A més a més, es va demostrar que els contactes cel·lulars mediat per la cadherina E exercien un efecte supressor sobre l'expressió de MMP-9 (Llorens et al., 1998). En relació al nostre treball, les cèl·lules HaCa4 expressen el factor de transcripció *Snail* (Cano et al., 2000). En base a aquestes dades, i malgrat que MMP-9 no s'ha detectat com a gen diferencialment expressat ni per RAP-PCR ni per *microarrays*, simultàniament es va estudiar la seva expressió en el nostre model de TEM. Inicialment es va mirar per zimografia i es va trobar que efectivament l'activitat gelatinolítica de MMP-9 era major a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que a les cèl·lules MDCK-CMV. En l'apartat 2 de resultats es mostren els resultats de l'estudi de la regulació de la seva expressió.

Per altra banda, un gen interessant i que tampoc s'ha trobat diferencialment expressat ni per RAP-PCR ni per *microarrays* de cDNA és el gen d'Id-1, que codifica per una proteïna HLH inhibidora dels factors bHLH de classe I i II (Benezra et al., 1990b). Atesa la seva implicació en la regulació d'E47 i que s'ha trobat sobreexpressat en molts carcinomes (Lin et al., 2000; Ouyang et al., 2002), es va voler analitzar la seva expressió en el nostre model de TEM simultàniament a l'estudi de l'expressió diferencial. Efectivament, es va detectar augmentat en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV. En l'apartat 3 de resultats es mostra l'anàlisi de la regulació de la seva expressió.

2. MECANISME DE REGULACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE MMP-9 INDUÏDA PER E47 I *SNAIL* EN LES CÈL·LULES MDCK

2.1. Inducció de MMP-9 per E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK

L'expressió estable d'E47 i *Snail* en la línia cel·lular epitelial MDCK indueix una transició epiteli-mesènquima (TEM) (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001) caracteritzada per la pèrdua de cadherina E que comporta la ruptura de les unions intercel·lulars, la dissociació cel·lular i un augment en la motilitat cel·lular, fets comuns als observats en els fronts invasius dels tumors i que s'associen a l'expressió de MMP-9 per part de les cèl·lules tumorals (Kupferman et al., 2000). Aquestes observacions van suggerir la possible inducció de MMP-9 en el model de TEM utilitzat en el laboratori.

En primer lloc, es va analitzar l'activitat gelatinolítica de MMP-9 en aquestes cèl·lules mitjançant zimografia. Breument, aquesta tècnica permet visualitzar la degradació d'un substrat, en aquest cas gelatina, per part de les proteïnes separades electroforèticament en gels SDS-PAGE que contenen aquest substrat. L'activitat i posició on hi ha degradació és visualitzada per absència de substrat després de tenyir el gel amb el colorant *Coumassie blue*. Així mateix, es pot calcular la massa molecular de l'espècie activa corresponent per extrapolació de la posició (Rf) envers la de proteïnes control de coneguda massa molecular. D'aquesta manera, es va detectar una espècie activa a 110KDa present en els medis condicionats de les tres línies cel·lulars però amb major abundància en el de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (figura R.7A), la qual cosa suggeria un augment de la producció i secreció d'aquest enzim, que per la seva massa molecular fou inicialment considerat MMP-9. Cal destacar que l'activitat gelatinolítica de MMP-9 era molt més elevada en les cèl·lules MDCK-E47 (4 vegades més que el control, carril 2) que en les MDCK-Snail (2,2 vegades, carril 3). Atès que la gelatinasa B es pot trobar associada a les membranes cel·lulars (Fridman et al., 2003; Mira et al., 2004), es va analitzar l'activitat gelatinolítica en la fracció de proteïnes associades a la membrana cel·lular. Així, també es va detectar activitat de MMP-9 associada a membrana en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (carrils 5 i 6, respectivament) mentre que no se'n va trobar a les cèl·lules control (carril 4). Contràriament, la gelatinasa MMP-2, molt estretament relacionada amb MMP-9, pràcticament no tenia activitat i sense diferències entre les tres línies cel·lulars (dades no mostrades).

Per tal de comprovar si veritablement es tractava de MMP-9 i confirmar l'augment de l'expressió de la proteïna en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV així com determinar la seva localització subcel·lular, es va

realitzar una immunocitologia de fluorescència emprant un anticòs específic contra MMP-9. Així, es va poder detectar la gelatinasa B a la superfície cel·lular de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, aparentment concentrada en les extensions de membrana, mentre que pràcticament no se'n detectava a les cèl·lules MDCK-CMV (figura R.7B).

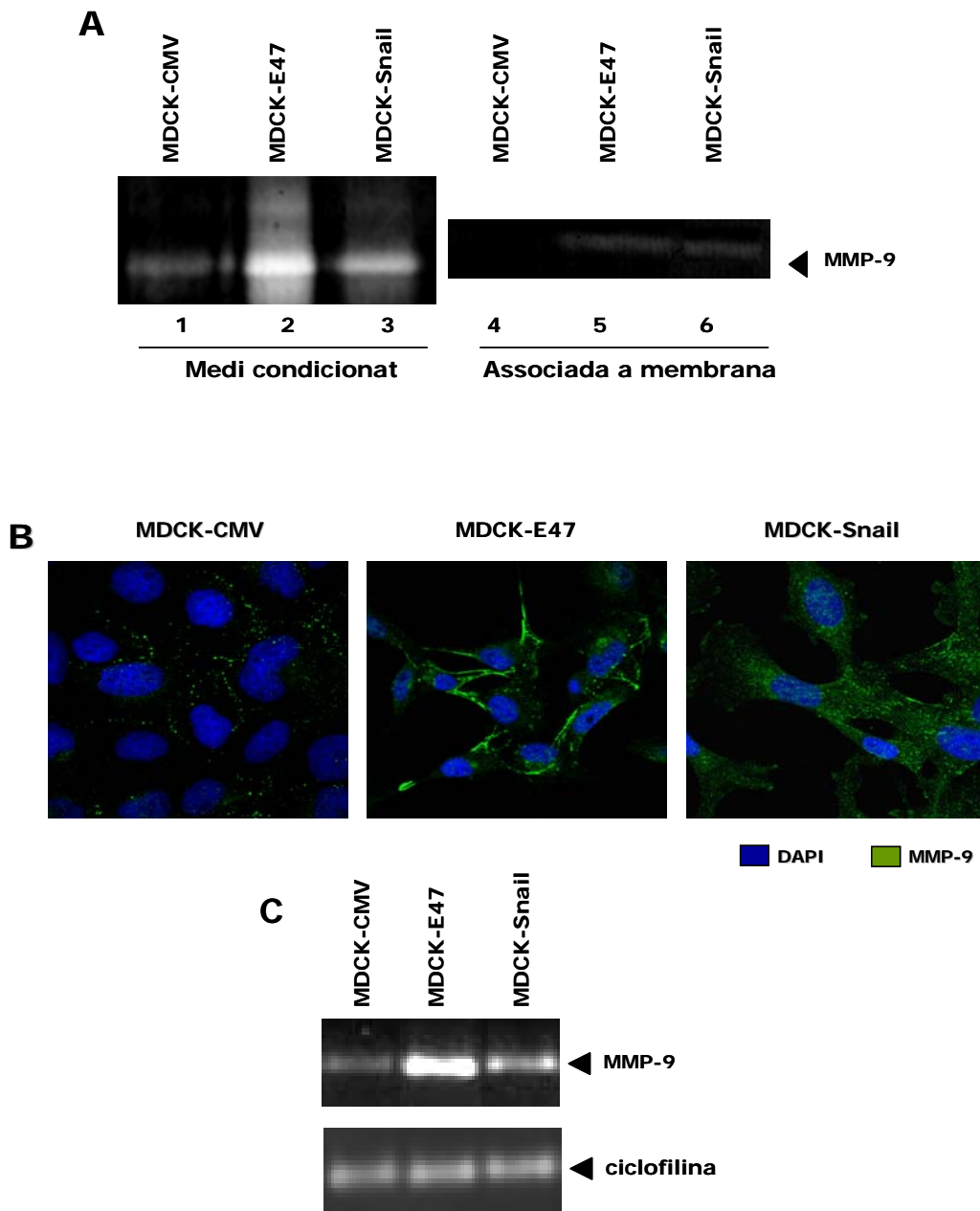


Figura R.7. L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK indueix la secreció de MMP-9 així com la seva expressió a nivell de proteïna i de mRNA. (A) Anàlisi de l'activitat gelatinolítica de MMP-9 en el medi condicionat i en la fracció de proteïnes associades a membrana en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant zimografia emprant gels SDS-PAGE que contenen gelatina. (B) Detecció de MMP-9 per immunofluorescència en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail. (C) Anàlisi dels nivells de mRNA de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant RT-PCR semiquantitativa. Els nivells de mRNA de ciclofilina es mostren com a control de càrrega.

Per comprovar si l'augment d'activitat i d'expressió de MMP-9 en les cèl·lules que expressaven ectòpicament E47 i *Snail* era degut a una activació a nivell transcripcional o a altres mecanismes de regulació com l'activació proteolítica del zimogen o la inhibició de l'enzim actiu (Egeblad and Werb, 2002; Stamenkovic, 2000), es va fer un anàlisi de l'expressió del mRNA de MMP-9 mitjançant RT-PCR semiquantitativa. El RNA total de les cèl·lules es va retrotranscriure a cDNA i es va amplificar una regió del gen caní de MMP-9 mitjançant PCR amb uns encebadors específics. La presència i quantitat del producte de PCR corresponent fou estimada en un gel d'agarosa mitjançant la tinció amb bromur d'etidi. El tamany del producte (365 pb) i el patró de fragments generat per digestió diagnòstica amb enzims de restricció fou el predit segons la referència del GenBank (AF169244). D'aquesta manera es va detectar una banda molt més intensa en les cèl·lules que expressaven E47 o *Snail* exogen que en les cèl·lules control (figura R.7C). També es va amplificar un fragment del gen caní de la ciclofilina (225 pb) com a control intern. Els nivells de mRNA, així com l'activitat gelatinolítica, també són més elevats en les cèl·lules MDCK-E47 (6,1 vegades) que en les cèl·lules MDCK-Snail (3,2 vegades) respecte les cèl·lules control.

Per mostrar una associació directa entre l'expressió de *Snail* i la inducció de MMP-9 es va emprar la tècnica del RNA d'interferència (Brummelkamp et al., 2002). Es va dissenyar un oligonucleòtid 19-mer siRNA a partir de la seqüència de la regió aminoterminal del primer dit de zinc de *Snail* murí (posició 573-591 del cDNA murí, referència del GenBank NM011247), que potencialment s'encarregaria d'abrogar l'expressió d'aquest factor de transcripció. És important destacar que aquesta seqüència és conservada entre el mRNA de *Snail* murí i humà (posició 580-598 del cDNA humà, referència del GenBank NM005985), però no és present en el mRNA de *Slug* de cap espècie (Manzanares et al., 2001). L'oligonucleòtid *Snail*-siRNA-19nt va ser clonat en el vector pSuperior-Puro que porta el gen de resistència a puomicina i es va transfectar establenent a les cèl·lules MDCK-Snail. Després de la transfecció, les cèl·lules van ser seleccionades amb l'antibiòtic puomicina (1 µg/mL). L'eficiència del silenciament de *Snail* es va comprovar per RT-PCR semiquantitativa emprant uns encebadors específics per *Snail* murí que amplificaven un producte de PCR de 200 pb. Com s'observa a la figura R.8-panell superior, els nivells de mRNA de *Snail* dels tres clons interferents de *Snail* analitzats eren nuls o molt baixos (menys del 10% respecte les cèl·lules MDCK-Snail control). També es va estudiar l'efecte del silenciament de *Snail* sobre l'expressió de la cadherina E mitjançant RT-PCR semiquantitativa amb uns encebadors específics per al gen de la cadherina E de gos que amplificaven un producte de PCR de 560 pb. El tamany del producte i el patró de fragments generat per digestió diagnòstica amb enzims de restricció fou el predit segons la referència del GenBank XM536807. Com s'observa a la figura R.8-segona panell, mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i tinció

amb bromur d'etidi, es va detectar una banda corresponent a cadherina E en els tres clons interferents de *Snail* d'intensitat similar a l'observada en les cèl·lules MDCK-CMV, mentre que en les cèl·lules MDCK-Snail no es va detectar cap banda. Aquests resultats indicaven l'eficiència dels interferents de *Snail*, atesa la restauració de l'expressió de cadherina E en absència del seu repressor transcripcional.

Un cop comprovada l'eficiència dels clons interferents de *Snail*, es va voler estudiar l'efecte del silenciament de *Snail* sobre l'expressió de MMP-9, la qual cosa es va fer també mitjançant RT-PCR semiquantitativa amb uns encebadors específics per una regió del gen de MMP-9 caní. En la figura R.8-tercer panell, s'observa que els nivells del producte de PCR corresponent a la gelatinasa B (365 pb, tamany predit segons la referència del GenBank AB006421) obtingut en els interferents de *Snail* són molt baixos (menys del 10% respecte el seu control MDCK-Snail) i similars als obtinguts en les cèl·lules MDCK-CMV. També es va amplificar un fragment del gen caní de GAPDH (900 pb, tamany predit segons la referència del GenBank NM001003142) com a control intern (figura R.8-quart panell).

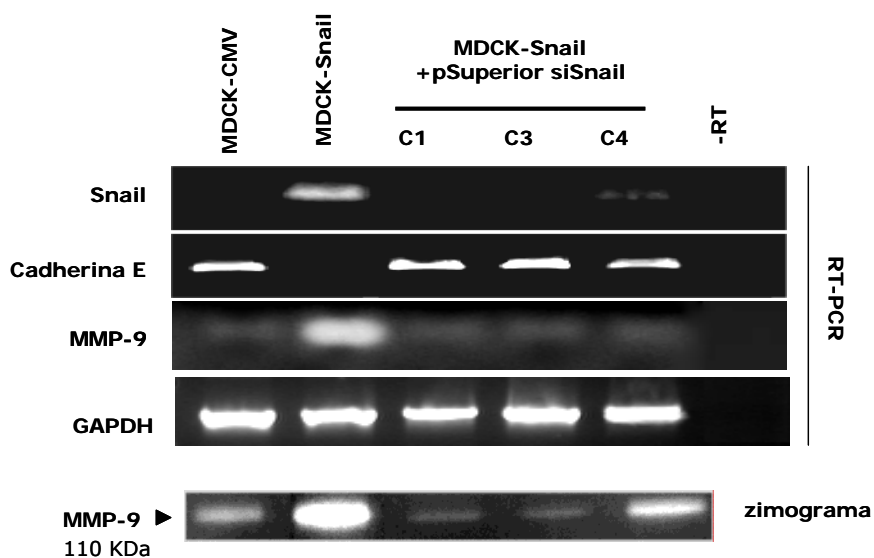


Figura R.8. El silenciament de *Snail* induïx la reexpressió de la cadherina E i la repressió de MMP-9. Mitjançant RT-PCR semiquantitativa es van analitzar els nivells de mRNA de *Snail*, cadherina E i MMP-9 en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-Snail i tres clons independents estables (C1, C3 i C4) obtinguts després de la transfecció de siSnail a les cèl·lules MDCK-Snail (els tres panells superiors). Els nivells de mRNA de GAPDH es mostren com a control de càrrega (quart panell). L'efecte del silenciament de *Snail* en la secreció de MMP-9 es va analitzar mitjançant zimografia emprant gels SDS-PAGE que contenen gelatina (panell inferior).

Així mateix, mitjançant novament zimografia, es va detectar una reducció important de l'activitat de MMP-9 secretada al medi extracel·lular després de la interferència de *Snail* en relació amb la secretada per les cèl·lules MDCK-Snail, emprades en els experiments d'interferència com a controls (figura R.8-panell inferior).

Aquests resultats suggereixen la implicació de *Snail* en la inducció de l'expressió de MMP-9.

Pel que fa a E47, no es van obtenir interferents efectius que silenciessin el gen exogen a les cèl·lules MDCK.

En conjunt, aquests resultats demostren un increment de l'activitat i l'expressió de MMP-9 en les cèl·lules epitelials MDCK quan són transfectades establement amb els factors de transcripció E47 o *Snail*. A més a més, aquesta activació es suggereix majoritàriament a nivell transcripcional.

2.2. Activació del promotor de MMP-9 per E47 i *Snail* en les cèl·lules MDCK

L'increment dels nivells de mRNA de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail en relació als detectats en les cèl·lules control suggereix que aquests factors regulen positivament la transcripció d'aquest gen. Per determinar l'efecte de l'expressió d'E47 i *Snail* sobre la possible activació del promotor de MMP-9, es va construir un promotor heteròleg emprant les seqüències promotores del gen murí de MMP-9 dirigint l'expressió del gen reporter de la luciferasa, l'expressió del qual pot ser mesurada. Per això, es va clonar un fragment de 1,17 Kb del promotor murí al vector pGL2-basic immediatament *upstream* del gen de la luciferasa (construcció I). L'anàlisi computacional d'aquesta regió promotora amb els programes TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) i Patch (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>) va detectar diferents elements reguladors putatius, alguns dels quals estan indicats a la figura R.9A: dues caixes E que es solapen (posició -644/-637 pb respecte l'inici de transcripció), quatre llocs Sp1 (-627/-619, -484/-479, -89/-80 i -82/-77), un motiu NFκB (-561/-552), tres llocs AP-1 (-505/-499, -107/-101 i -69/-61) i una caixa TATA (-44/-40), la majoria d'ells conservats en diferents espècies (Campbell et al., 2001) i descrits com a elements implicats en la regulació transcripcional de MMP-9 en altres sistemes cel·lulars i en resposta a diferents estímuls (Farina et al., 1999; Gum et al., 1997; Sato and Seiki, 1993).

Un cop comprovada per seqüenciació la construcció I del promotor de MMP-9, es va transfectar transientment a les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail i es va mesurar l'activitat relativa de la luciferasa. Com s'observa en la figura R.9B l'activitat promotora és major en les cèl·lules MDCK-E47 (12 vegades) i MDCK-Snail (9 vegades) que en les cèl·lules control MDCK-CMV.

Per analitzar més detalladament la regulació transcripcional de MMP-9 en aquestes cèl·lules, es van generar una sèrie de mutants de deleció d'aquesta regió promotora en funció dels diferents llocs reguladors. A la figura R.9A hi ha un esquema

de totes elles. Així com es va fer amb el promotor llarg, aquests mutants de deleció es van clonar en el vector pGL2-basic dirigint l'expressió del gen reporter de la luciferasa, es van comprovar per seqüenciació i es van transfectar transientment a les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail.

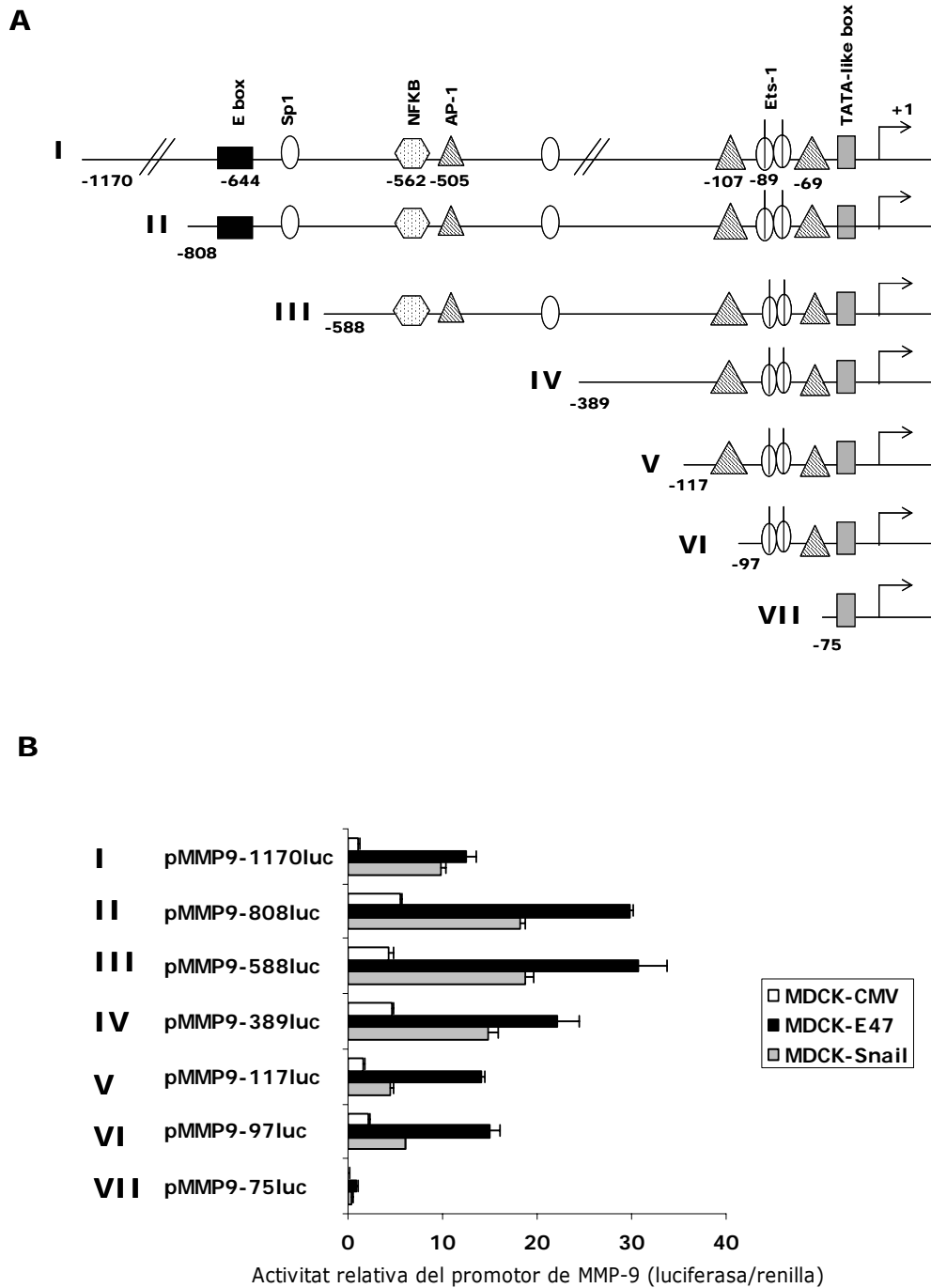


Figura R.9. L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK incrementa l'activitat del promotor de MMP-9. (A) Representació esquemàtica del promotor de MMP-9 murí (construcció I) així com de les diferents construccions de deleció (construccions II-VII) indicant la posició d'elements reguladors putatius. (B) Anàlisi de l'activitat del promotor de MMP-9 murí i de les diferents construccions de deleció en les cèl·lules MDCK-CMV (barres blanques), MDCK-E47 (barres negres) i MDCK-Snail (barres grises) 24 h després de ser transfectades amb 1 µg de cada construcció i 100 ng del vector pRL-TK. L'activitat luciferasa/renilla és relativa a l'obtinguda amb el vector control pGL2-basic i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

Com s'observa a la figura R.9B, les construccions II (-808) i III (-588) presentaven la màxima activitat en totes les línies cel·lulars, la qual cosa suggeria la possible presència d'elements reguladors negatius en la regió entre -1170 i -808 pb (figura R.9B). Concretament, aquestes construccions s'activaven 6 i 4 vegades més en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, respectivament, comparat amb les cèl·lules MDCK-CMV.

Particularment, s'estava interessat en les dues caixes E situades a la posició -644/-637 pb ja que són les seqüències putatives de reconeixement per les proteïnes E47 i *Snail*, tot i que no tenen el consens característic de les caixes E (CA(G/C)(G/C)TG). Per això, en un principi es va pensar que l'activació del promotor de MMP-9 induïda per E47 i *Snail* podria estar regulada directament per la unió d'aquests factors de transcripció a aquest element. Però com s'observa a la figura R.9B, quan es van delectar les caixes E (construcció III) l'activitat es mantenia igual que en la construcció II, suggerint la no implicació d'aquest element en la regulació transcripcional de MMP-9.

En canvi, en delectar el lloc putatiu d'unió a NF κ B (construcció IV), entre d'altres, s'observava una reducció de l'activitat luciferasa en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, la qual cosa feia pensar que els elements d'aquesta regió podrien tenir un paper important en l'activació del promotor de MMP-9 per E47 i *Snail*. Tot i això, s'observaven elevats valors d'activitat luciferasa en les construccions més petites IV (-389), V (-117) i VI (-97), que a més a més mantien la capacitat d'activar-se per E47 i *Snail* i contràriament no tenien elements d'unió a E47 o *Snail*. Cal destacar el fet que no hi ha diferències d'activitat entre les construccions V i VI, i que la construcció VI, que conté la regió proximal a l'inici de transcripció on principalment s'identifica una caixa GC (-89 pb), mantenia aproximadament el 50% de l'activitat respecte la construcció III i era 7 i 3 vegades més activa en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, respectivament, que en les cèl·lules control MDCK-CMV. En canvi, la construcció VII (-75), que només conté un putatiu lloc AP-1 (-69 pb) i la caixa TATA-like (-44 pb) no tenia activitat en cap de les línies cel·lulars. És a dir, que la regió situada entre -97 i -75 pb respecte l'inici de transcripció contindria elements suficients per mantenir l'activitat basal del promotor de MMP-9 a les cèl·lules MDCK-CMV i per respondre a la inducció per E47 i *Snail*.

Per comprovar les repercussions del silenciament de *Snail* sobre l'activitat transcripcional del promotor de MMP-9 es va transfectar la construcció I en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-Snail i als clons interferents de *Snail* (C1, C2 i C3). La mesura de l'activitat luciferasa d'aquesta construcció indicava una dràstica reducció (10 vegades aproximadament) en les cèl·lules que tenien *Snail* silenciats comparat amb les cèl·lules que expressaven ectòpicament *Snail* (figura R.10). De fet, l'activitat promotora mesurada als interferents de *Snail* era similar a la de les cèl·lules control MDCK-CMV.

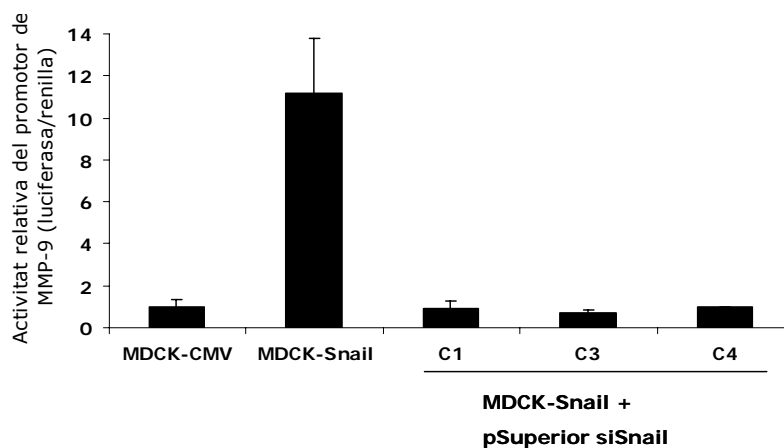


Figura R.10. La inducció de l'activitat del promotor de MMP-9 mediada per *Snail* és abrogada pel silenciament de *Snail*. Anàlisi de l'activitat del promotor de MMP-9 murí (construcció pMMP9-1170luc) en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-Snail i tres clons independents estables (C1, C3 i C4) obtinguts després de la transfecció de siSnail a les cèl·lules MDCK-Snail. L'activitat luciferasa/renilla es va mesurar 24 h després de la transfecció de 1 µg de la construcció promotora i 100 ng del vector pRL-TK, i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

En conjunt, els resultats mostren una activació del promotor de MMP-9 en les cèl·lules MDCK quan expressen E47 o *Snail*. A més a més, la deleció de diferents elements reguladors transcripcionals provoca una reducció de l'activitat promotora la qual cosa indica que l'activació, així com l'activitat basal, estan controlades per la combinació de diferents elements reguladors *cis* del promotor, com ja s'havia reportat en altres tipus cel·lulars (Gum et al., 1997; Gutman and Wasyluk, 1990; Sato and Seiki, 1993).

2.3. Mapatge del(s) element(s) del promotor de MMP-9 responedor(s) a E47 i *Snail*.

2.3.1. La caixa E no és essencial per la inducció de MMP-9 mediada per E47 i *Snail*

Paral·lelament a les transfeccions, es va fer un assaig d'EMSA per analitzar la regió del promotor de MMP-9 que contenia les dues caixes E solapades situades a -644/-637 pb respecte l'inici de transcripció. Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb un oligonucleòtid de doble cadena marcat radioactivament que contenia aquestes caixes E i es van separar electroforèticament en un gel d'acrilamida no desnaturalitzant. Com s'observa a la figura R.11, es va formar un complex proteïna-DNA molt intens a les cèl·lules MDCK-E47 (carril 7) i no tant a les MDCK-Snail (carril 11) o a les cèl·lules MDCK-CMV (carril 3). En canvi, la mutació de les caixes E no va permetre la unió al DNA en cap línia

cel·lular (carrils 5, 9 i 13). A més a més, el complexe semblava ser específic ja que la competició amb un excés d'oligonucleòtid salvatge no marcat radioactivament abrogava la seva formació (carrils 4, 8 i 12) mentre que un excés d'oligonucleòtid mutat no marcat radioactivament no afectava la unió proteïna-DNA (carrils 6, 10 i 14).

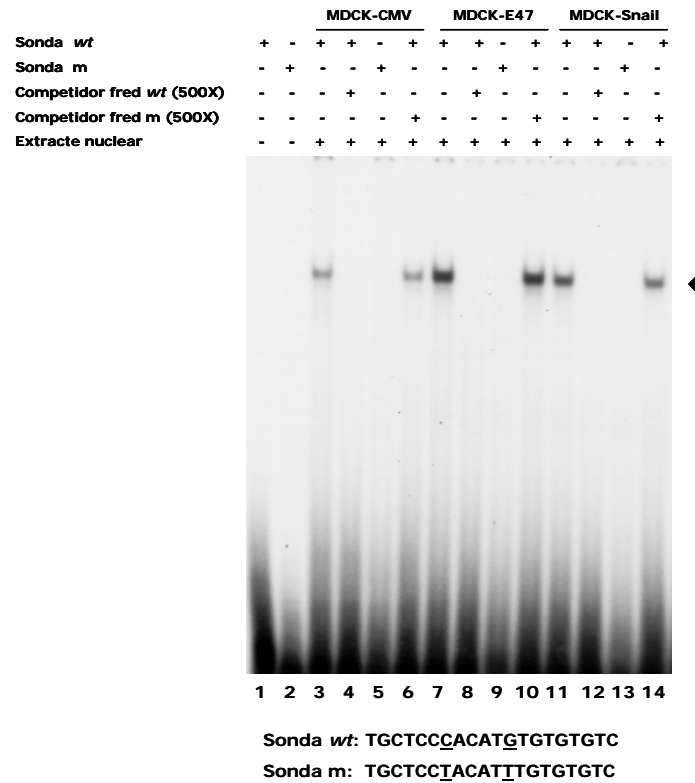


Figura R.11. Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail contenen proteïnes que s'uneixen a les caixes E situades a -644/-637 pb de l'inici de transcripció. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament que contenia les caixes E (*wt*) o mutades (*m*), segons s'indica, i es van resoldre electroforèticament. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior de l'EMSA, subratllant les mutacions. El complexe proteïna-DNA que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

Per determinar la composició proteica del complexe es van incloure en l'assaig d'EMSA anticossos específics contra E47 i contra *Snail*, així com IgGs com a control d'inespecificitat. Els resultats es mostren a la figura R.12, i s'observa que el complexe no és reconegut ni per anti-E47 (carril 2) ni per anti-Snail (carrils 7 i 10).

Tenint en compte els resultats de les transfeccions transients i la mesura de l'activitat luciferasa que indicaven que la deleció d'aquestes caixes E pràcticament no afectava l'activitat transcripcional de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, i que els anticossos específics per E47 i per *Snail* no reconeixen les proteïnes que s'uneixen a aquesta regió promotora, tot indica que E47 i *Snail* no activen la transcripció de MMP-9 per unió directa a les caixes E.

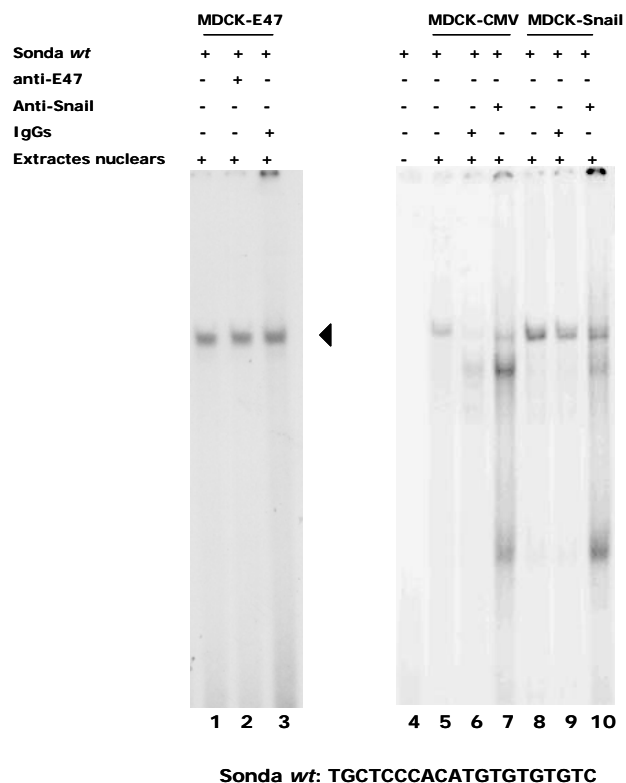


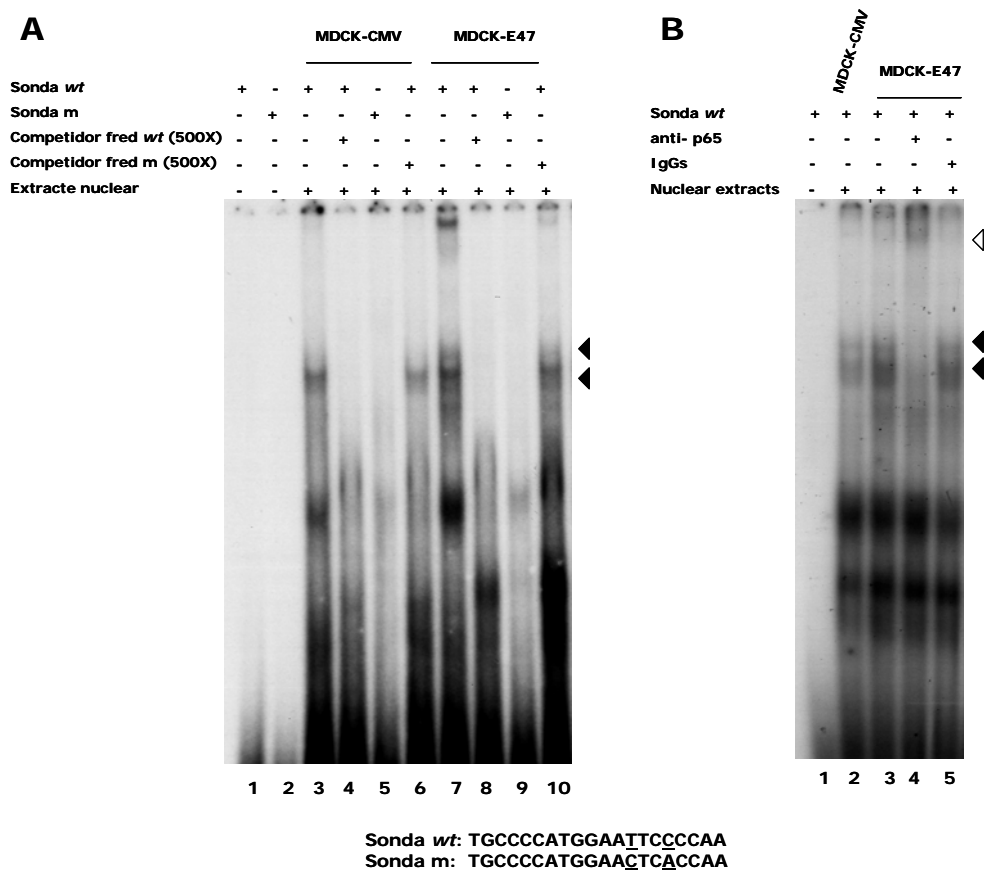
Figura R.12. E47 i *Snail* no s'uneixen a les caixes E situades a -644/-637 pb de l'inici de transcripció. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 (esquerra), MDCK-CMV i MDCK-Snail (dreta) es van incubar amb la sonda de doble cadena marcada radioactivament que conté les dues úniques caixes E solapades del promotor de MMP-9. A més a més, es van incubar amb un anticòs específic contra E47 (4 µg) o contra *Snail* (4 µg), i amb IgGs inespecífiques (4 µg). La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior. El complex proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

En la resta del promotor no s'identifiquen més caixes E, la qual cosa suggereix que l'activació de l'expressió de MMP-9 induïda per E47 o *Snail* és indirecta, i per això, es va decidir analitzar altres elements que poguessin mediar aquesta activació.

2.3.2. NFκB regula l'activació transcripcional de MMP-9 induïda per E47 i *Snail*

S'ha descrit que NFκB regula l'expressió de MMP-9 en diferents sistemes (Farina et al., 1999; Kondraganti et al., 2000; Ricca et al., 2000). Atès que la deleció de l'element que reconeix aquest factor en el promotor de MMP-9 (GGAATTCCCC; posició -561/-552 pb) disminueix significativament l'activitat relativa promotora (figura R.9B), es va analitzar la potencial implicació de NFκB en l'activació transcripcional de MMP-9. Amb aquest propòsit es van realitzar assajos d'EMSA amb els extractes nuclears de les tres línies cel·lulars i una sonda marcada radioactivament que contenia la seqüència d'unió a NFκB (indicada a la figura R.13). Efectivament, com s'observa a les R.13 A i C, es van formar dos complexos proteïna-DNA més intensos en les línies MDCK-E47 (figura R.13A, carril 7) i MDCK-Snail (figura R.13C, carril 7) que en les cèl·lules control MDCK-CMV (figura R.13A, carril 3; figura R.13C, carril 2). A més a més, aquests complexos eren específics ja que competien amb un excés del mateix oligonucleòtid no marcat (figura R.13A, carrils 4 i 8; figura R.13C, carrils 3 i 8) però no amb un excés de l'oligonucleòtid mutat no marcat (figura R.13A, carrils 6 i 10; figura R.13C, carrils 4 i 9).

Atès que NFκB s'uneix al DNA com a homodímer o heterodímer, que pot estar format per cinc possibles subunitats en ratolí i humà: RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 i p52 (Huber et al., 2004), es va voler determinar la composició proteica dels complexos que s'uneixen al promotor de MMP-9. Per això, en l'assaig d'EMSA es va incloure un anticòs específic contra p65, el qual, com es mostra a les figura R.13 B i C, reaccionava amb els dos complexos proteïna-DNA i induïa la formació d'un complex que migrava menys atès l'increment de massa molecular per a la unió de l'anticòs (figura R.13B, carril 4; figura R.13C, carrils 6 i 11). Com a control negatiu, en els assajos de superretard es van incloure IgGs les quals, com era d'esperar, no reconeixien les proteïnes dels complexos (figura R.13B, carril 5; figura R.13A, carrils 5 i 10). Per tant, queda confirmada la presència de p65 en els complexos units al lloc de reconeixement NFκB del promotor de MMP-9.



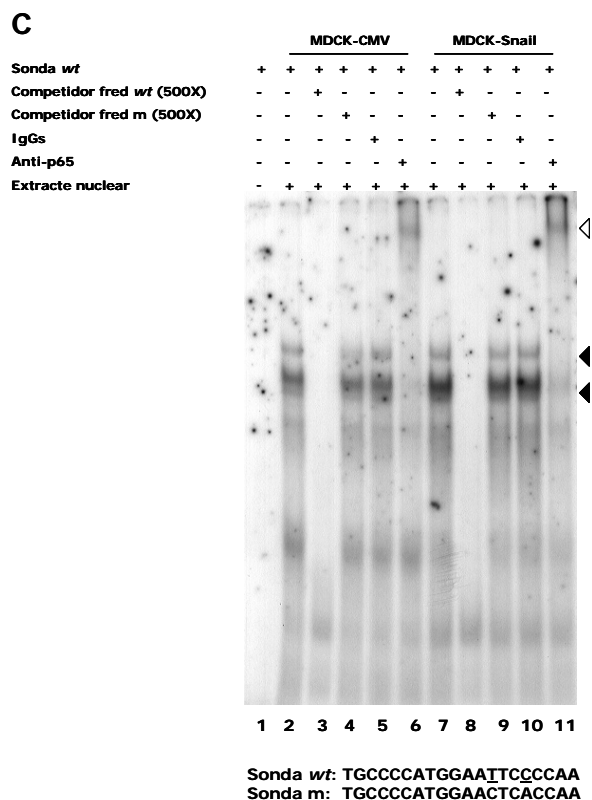


Figura R.13. NFκB, compost almenys per p65, s'uneix al motiu NFκB del promotor de MMP-9 amb major grau en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que en les cèl·lules MDCK-CMV. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 (A,B) i MDCK-Snail (C) es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament que conté el motiu NFκB salvatge (*wt*) o mutat (*m*), segons s'indica, i es van resoldre electroforèticament. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament (A,C). Els superretards es van dur a terme incubant els extractes amb un anticòs anti-p65 (800 ng) o amb IgGs inespecífiques (800 ng) (B,C). La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior dels EMSAs, subratllant les mutacions. Els complexes proteïna-DNA que es van formar es senyalen amb una fletxa negra i els complexes de superretard amb una fletxa blanca.

Així doncs, el lloc NFκB del promotor de MMP-9 està implicat en l'activació induïda per E47 i *Snail* expressats ectòpicament en les cèl·lules epitelials MDCK, ja que hi ha major unió de NFκB en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que en les cèl·lules control MDCK-CMV. A més a més, almenys p65 forma part d'aquests complexos proteïna-DNA.

2.3.3. Ets-1 i Sp1 s'uneixen al promotor de MMP-9 activant-lo en resposta a E47 i *Snail*

Les caixes GA i GC proximals del promotor de MMP-9 medien l'activació transcripcional induïda per E47 i Snail

Els resultats anteriors obtinguts a partir de la mesura indirecta de l'activitat del promotor de MMP-9 mitjançant assajos de cotransfecció en les cellules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mostren que la regió de -97 a -75 pb conté els elements necessaris i suficients per mantenir elevats nivells de l'activitat del promotor de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. L'anàlisi computacional d'aquesta regió promotora amb els programes TFSearch i Patch va detectar un segment ric en GA i GC amb un lloc d'unió a Sp1 d'alta afinitat (HA) en la posició -82 (GGGGCGG) i dos llocs de

baixa afinitat (LA) en les posicions -90 (GAGG) i -89 (GGGGAGGG). Per altra banda, també es van detectar dos llocs contigus putatius d'unió a Ets-1 en les mateixes posicions (GGAGG) que solapen amb les regions Sp1-LA. Per analitzar la funció dels diferents motius en aquesta regió es van generar mutacions puntuals dirigides afectant la seqüència consens dels llocs d'unió d'Ets-1 i de Sp1 en la construcció VI (figura R.14A) i es van transfectar a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. La mutació del primer lloc Ets-1/Sp1-LA (GGAGGGGAGGGG es muta a GAAIGGGAGGGG; construcció VI^{m89/87}) no disminuïa l'activitat promotora respecte la construcció salvatge (construcció VI) (figura R.14B) ni en les cèl·lules MDCK-E47 ni en les MDCK-Snail, la qual cosa indica que aquests elements no estan implicats en la resposta del promotor de MMP-9 als factors de transcripció E47 i *Snail*; fins i tot, la mutació incrementava l'activitat transcripcional, fet que es podria explicar per la possible creació de nous llocs d'unió a altres factors de transcripció diferents o la major accessibilitat dels factors de transcripció responsables de l'activació. En canvi, la introducció de mutacions en les posicions -85 i -82 (GGAGGGGAGGGG es muta a GGAGGIGATGGG; construcció VI^{m85/82}), que suprimeix completament el segon lloc Ets-1/Sp1-LA i parcialment el lloc Sp1-HA, abrogava l'activitat del gen reporter de la luciferasa respecte la construcció salvatge tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail (figura R.14B). Això suggereix que aquests elements són crucials per sostenir la resposta del promotor de MMP-9 a E47 i *Snail*.

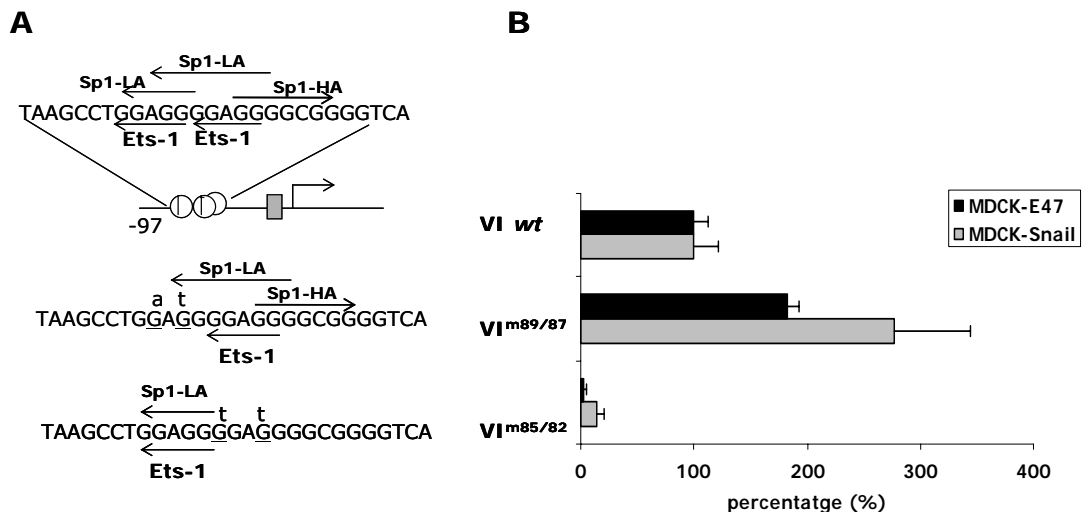


Figura R.14. La mutació dels llocs Ets-1 i Sp1 de la regió proximal del promotor de MMP-9 abroga l'activació indirecta mediada per E47 i *Snail*. (A) Representació esquemàtica de la regió proximal del promotor de MMP-9 murí que comença en la posició -97 pb (construcció VI) respecte l'inici de transcripció, indicant els elements reguladors potencials Ets-1, Sp1-LA, Sp1-HA i la caixa TATA-like (rectangle gris). (B) Anàlisi de l'activitat promotora de la construcció VI wt i de les versions mutades (VI^{m89/87} i VI^{m85/82}) en les cèl·lules MDCK-E47 (barres negres) i MDCK-Snail (barres grises) 24 h després de ser transfectades amb 1 µg de cada construcció i 100 ng del vector pRL-TK. L'activitat relativa representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

A les cèl·lules control MDCK-CMV, en les que l'activitat transcripcional de la construcció VI és molt baixa, les mutacions provoquen un efecte similar, la qual cosa voldria dir que aquests elements també són necessaris per mantenir l'activitat basal. És a dir, aquest resultat indica que la regió proximal rica en caixes GA i GC media la resposta del promotor de MMP-9 a E47 i a *Snail* i alhora està implicada en l'activitat basal de les cèl·lules control.

Ets-1 i Sp1 són activadors del promotor de MMP-9

Atès que els resultats anteriors indiquen que els llocs d'unió d'Ets-1 i Sp1 són responsables de l'activació del promotor de MMP-9 induïda per E47 i *Snail*, es va voler comprovar l'efecte d'aquests factors de transcripció sobre el promotor de la gelatinasa. Per això es va cotransfectar la construcció VI amb quantitats creixents dels vectors d'expressió que contenen el *full-length* d'Ets-1 o de Sp1 i es va mesurar l'activitat luciferasa. Com s'observa a les figures R.15 A i B, tant Ets-1 com Sp1 induïen l'activitat del promotor de MMP-9 d'una forma dependent de dosi. A més a més, els resultats indiquen que Sp1 té major capacitat activadora que Ets-1, ja que quan es van cotransfectar 750 ng del vector d'expressió es va obtenir un increment de l'activitat promotora de 3 vegades per Sp1 i 2 vegades per Ets-1. Cal, però, tenir en compte que no es pot descartar una diferència en l'eficiència d'expressió dels vectors d'Ets-1 i Sp1.

S'ha descrit la cooperació entre els factors de transcripció Ets i Sp1 en l'activació d'alguns promotors, tals com el de la tenascina-C, una glicoproteïna de matriu extracel·lular (Jinnin et al., 2004). Per comprovar si Ets-1 i Sp1 col·laboren en la regulació del promotor de MMP-9, es va cotransfectar transientment la construcció VI amb els dos vectors d'expressió d'Ets-1 i Sp1 junts. Efectivament, quan es coexpressaven alhora, l'activitat promotora incrementava aproximadament 7,5 vegades respecte l'estat basal mentre que quan es transfectaven per separat l'increment era entre 2 i 3 vegades, confirmant-se així la seva acció sinèrgica (figura 15C).

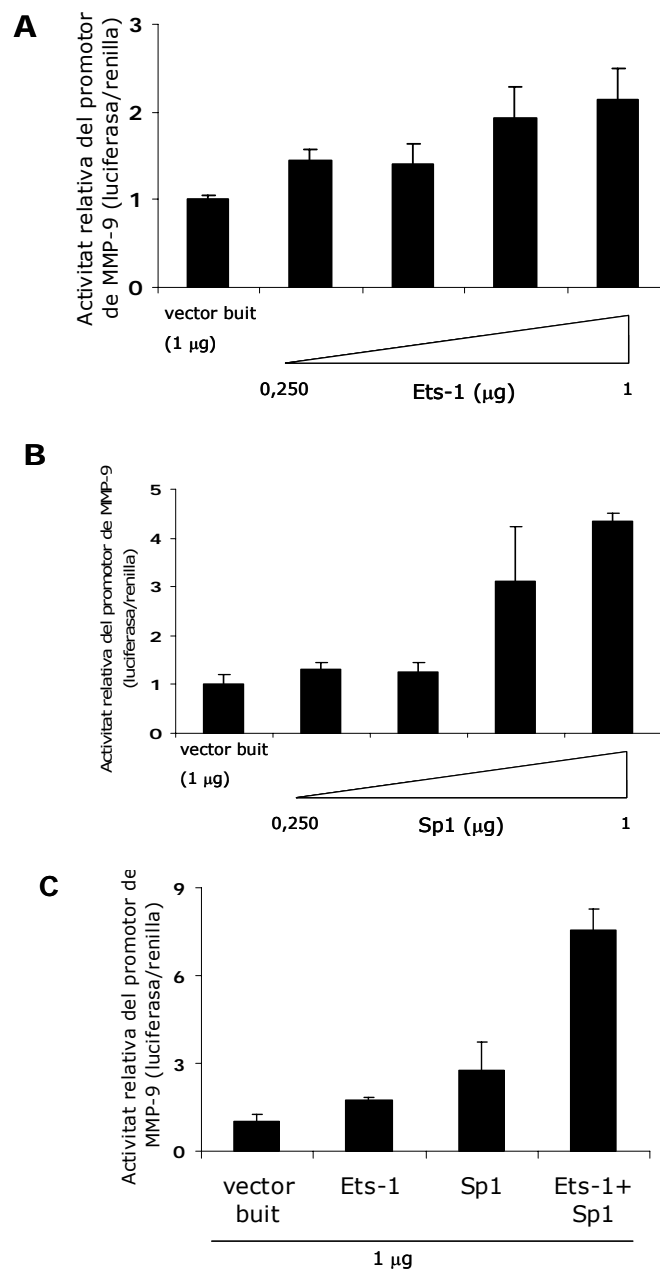


Figura R.15. Ets-1 i Sp1 activen la transcripció de MMP-9 de forma dependent de dosi en les cèl·lules MDCK i poden actuar sinèrgicament. Les cèl·lules MDCK es van transfectar amb 1 µg de la construcció VI, 100 ng del vector pRL-TK i les quantitats indicades del vector d'expressió d'Ets-1 (A), Sp1 (B) o Ets-1 i Sp1 alhora (C). La càrrega de DNA es va compensar amb les quantitats corresponents del vector d'expressió buit. L'activitat luciferasa/renilla es va mesurar 24 h després de la transfecció i representa la mitja (\pm S.D.) de tres experiments independents.

Aquests resultats demostren que Ets-1 i Sp1 col·laboren en l'activació transcripcional del promotor de MMP-9 a través de la regió proximal.

Ets-1 i Sp1 formen un complex que s'uneix a la regió proximal del promotor de MMP-9

A continuació es va estudiar si Ets-1 i Sp1 eren capaços d'unir-se a les caixes GA i GC de la regió proximal del promotor de MMP-9. Per això, es van fer assajos d'EMSA

amb oligonucleòtids de doble cadena marcats radioactivament que contenien els llocs Ets-1, Sp1-LA i Sp1-HA; concretament es van utilitzar 3 oligonucleòtids diferents, que es van anomenar A, B i C, i que cobreixen la regió del promotor de MMP-9 que va des de -97 fins a -66 pb respecte l'inici de transcripció (figura R.16).

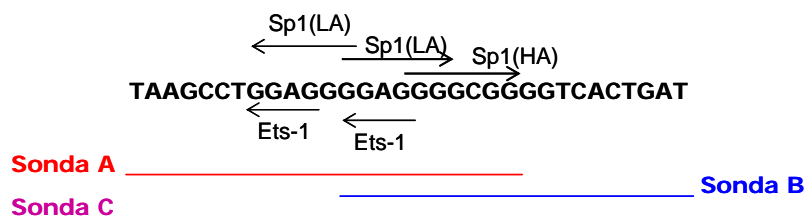


Figura R.16. Sondes emprades en els assajos d'EMSA per l'estudi de la regió proximal del promotor de MMP-9. Representació esquemàtica de la regió proximal del promotor de MMP-9 murí compresa entre -97 i -66 pb respecte l'inici de transcripció, indicant els elements reguladors potencials Ets-1, Sp1-LA i Sp1-HA. La sonda A (vermella) conté dos llocs Ets-1, dos llocs Sp1-LA i un lloc Sp1-HA. La sonda B (blava) conté el segon lloc Ets-1, el segon lloc Sp1-LA i el lloc Sp1-HA. La sonda C conté el primer lloc Ets-1 i el primer lloc Sp1-LA.

Com es mostra en la figura R.17, la incubació de la sonda A, que conté els dos llocs Ets-1/Sp1-LA i el lloc Sp1-HA, amb els extractes nuclears de MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail donava lloc a la formació de diversos complexos proteïna-DNA. Un d'ells, el senyalat amb una fletxa, només apareixia en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (figura R.17A, carril 5; figura R.17B, carril 8, respectivament) i pràcticament no es detectava en els extractes de les cèl·lules MDCK-CMV (figura R.17A, carril 1; figura R.17B, carril 4). A més a més, aquest complex era específic ja que la competició amb un excés del mateix oligonucleòtid no marcat radioactivament l'anul·lava, mentre que la resta de complexos no quedaven afectats, suggerint la seva naturalesa inespecífica (figura R.17A, carril 6; figura R.17B, carril 9).

Per altra banda, es van utilitzar diferents formes mutades de la sonda A per comprovar la funcionalitat dels elements Ets-1 i Sp1. Per analitzar la capacitat d'unió del primer lloc Ets-1/Sp1-LA es van introduir a la sonda A les mutacions -89/-87 (són les mateixes que es van introduir a la construcció VI del promotor de MMP-9 -construcció VI^{m89/87}- utilitzada en els assajos de transfecció, figura R.14B). Aquestes mutacions no impedièen la formació del complex proteïna-DNA en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (figura R.17A, carril 7; figura R.17B, carril 10). D'acord amb els resultats de la transfecció (figura R.14) segons els quals aquesta mutació incrementava l'activitat del promotor, en l'assaig d'EMSA també s'observava una major unió del(s) factor(s) de transcripció a aquesta regió promotora, descartant-se la possibilitat que la mutació creés un nou lloc d'unió ja que no es forma cap complex *de novo*. En les cèl·lules control MDCK-CMV, l'oligonucleòtid mutat també afavoreix la unió al DNA, però en

aquest cas es formaven dos complexos febles (figura R.17A, carril 3; figura R.17B, carril 6).

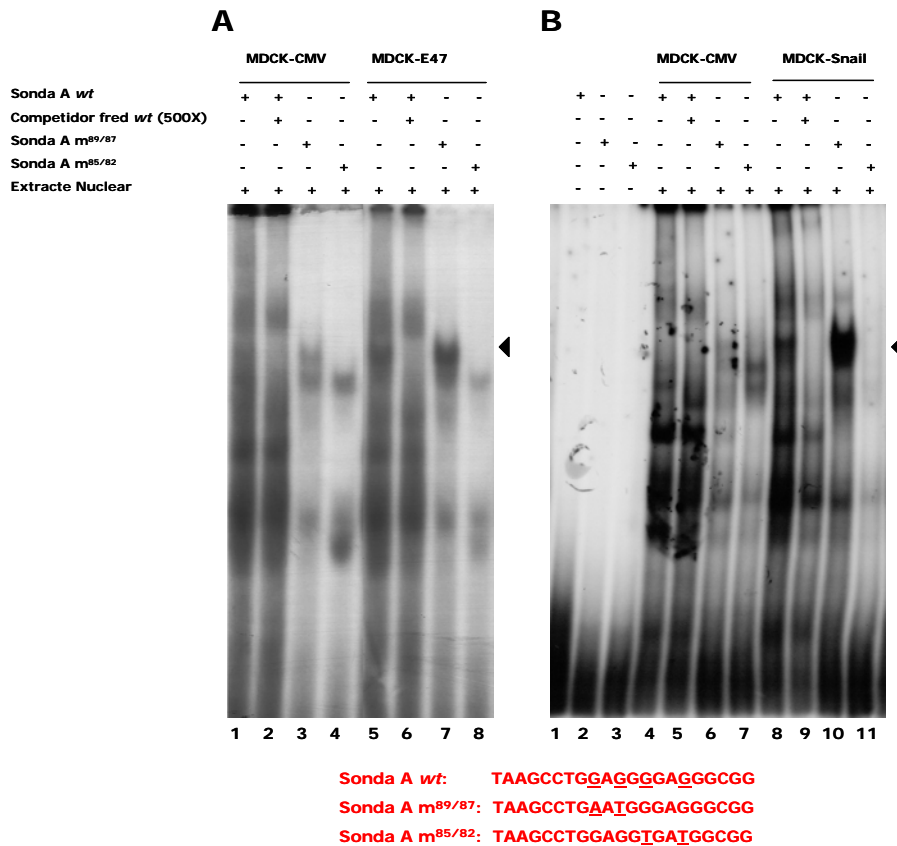


Figura R.17. El segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i el lloc Sp1-HA proximals del promotor de MMP-9 recluten un complexe proteïna-DNA específic en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no en les cèl·lules MDCK-CMV. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb la sonda A de doble cadena marcada radioactivament que conté els motius Ets-1, Sp1-LA i Sp1-HA proximals *wt*, o amb la sonda A que té mutats el primer lloc Ets-1 i Sp1-LA (A m^{89/87}) o el segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i en el lloc Sp1-HA (A m^{85/82}), segons s'indica; i es van resoldre electroforèticament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior, subratllant les mutacions. El complexe proteïna-DNA específic i diferencial que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

Per estudiar la funcionalitat del segon lloc Ets-1/Sp1-LA i del lloc Sp1-HA, es van introduir en la sonda A les mutacions -85/-82 (les mateixes que conté la construcció VI^{m85/82}), i que com s'observa en la figura R.17 abrogaven completament el complexe específic d'interès (figura R.17A, carril 8, figura R.17B, carril 11), la qual cosa està d'acord amb els resultats obtinguts en la transfecció (figura R.14). És a dir, els resultats de l'EMSA amb la sonda A *wt* i mutada donen suport a la hipòtesi que el segon lloc Ets-1/Sp1-LA i el lloc Sp1-HA són elements responedors indirectament a E47 i a *Snail*.

Per analitzar més detingudament aquestes seqüències de reconeixement i confirmar que efectivament totes tres estan implicades en l'activació de MMP-9, es va dissenyar una segona sonda (sonda B) que solapa amb la sonda A ja que conté el segon lloc Ets-1/Sp1-LA i el lloc Sp1-HA (figura R.16). A diferència de la sonda A que té el lloc

Sp1-HA en un extrem, la qual cosa podria afectar la unió de les proteïnes a aquest motiu, la sonda B el té totalment centrat. Els resultats de l'EMSA amb aquesta sonda es mostren a la figura R.18A. S'observa que a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail es formava un complexe similar al que s'obtenia amb la sonda A (figura R.18A, carrils 7 i 11, respectivament), mentre que no es formava quan s'introduïa una mutació que afectava el lloc Sp1-HA (figura R.18A, carrils 9 i 13). En canvi, a les cèl·lules control pràcticament no es detectava el complexe (carril 3). A més a més, aquest complexe era específic ja que desapareixia quan es competia amb un excés de sonda *wt* no marcada radioactivament (figura R.18A, carrils 8 i 12) però no amb un excés de sonda mutada no marcada (figura R.18A, carrils 10 i 14). Per tant, el lloc Sp1-HA és funcional.

Per acabar de confirmar que la sonda A i B donaven el mateix complexe, es van competir entre elles i efectivament un excés de sonda B no marcada radioactivament feia desaparèixer el complexe que es formava amb la sonda A (figura R.18B).

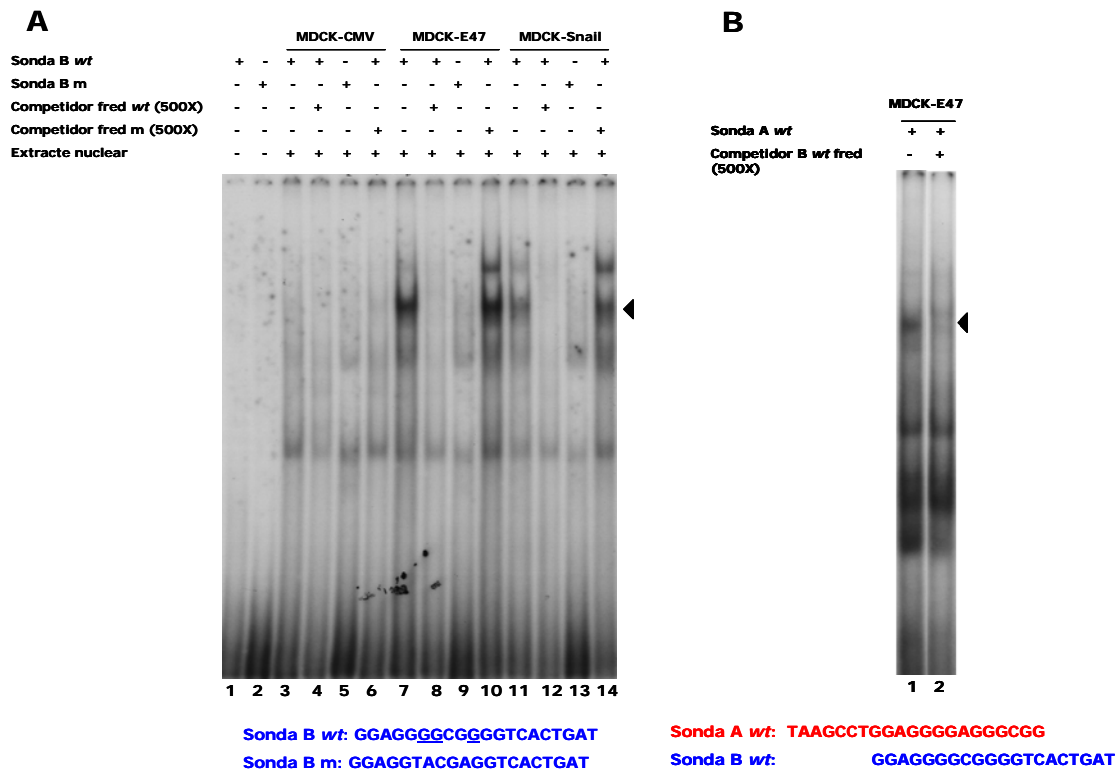


Figura R.18. El segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i el lloc Sp1-HA proximals del promotor de MMP-9 recluten un complexe proteïna-DNA específic en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no en les cèl·lules MDCK-CMV. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament i es van resoldre electroforèticament. (A) Es va emprar la sonda B (color blau) que conté el segon motiu Ets-1 i Sp1-LA i el motiu Sp1-HA salvatges (B *wt*) o mutada en el lloc Sp1-HA (B m), segons s'indica. (B) La sonda B *wt* es va competir amb la sonda A (color vermell) marcada radioactivament que conté els dos motius Ets-1 i Sp1-LA i el motiu Sp1-HA. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior, subratllant les mutacions. El complexe proteïna-DNA específic i diferencial que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

Finalment, per confirmar que el primer lloc Ets-1/Sp1-LA no està implicat en la inducció de MMP-9 per E47 i *Snail* es va fer un assaig d'EMSA amb una tercera sonda (sonda C) que només conté aquests motius. Com s'observa a la figura R.19, no s'unia cap proteïna a aquesta regió promotora.

Per caracteritzar la composició proteica del complex proteïna-DNA que es forma en el segon lloc Ets-1/Sp1-LA i al lloc Sp1-HA es van dur a terme assajos d'EMSA amb la sonda A incloent anticossos específics contra Ets-1 i Sp1. Efectivament, els dos anticossos van reaccionar amb el complex i van abrogar la unió proteïna-DNA (figura R.20A, carrils 4 i 5 en les cèl·lules MDCK-E47, i figura R.20 B, carrils 4 i 5 en les cèl·lules MDCK-Snail), la qual cosa indicaria que és un multiplexe format almenys per Ets-1 i Sp1. De fet, una exposició molt llarga permet veure el superretard de Sp1 (augment del tamany molecular del complex degut a la unió de l'anticòs). Com a control negatiu de l'assaig de superretard es van incloure IgGs que efectivament no reconeixien el complex (figura R.20A, carril 6; figura R.20B, carril 6).



Sonda C wt: TAAGCCTGGAGG

Figura R.19. Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail no s'uneixen al primer lloc Ets-1 i Sp1-LA de la regió proximal del promotor de MMP-9. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament que conté el primer lloc Ets-1 i Sp1-LA (sonda C) i es van resoldre electroforèticament. La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior

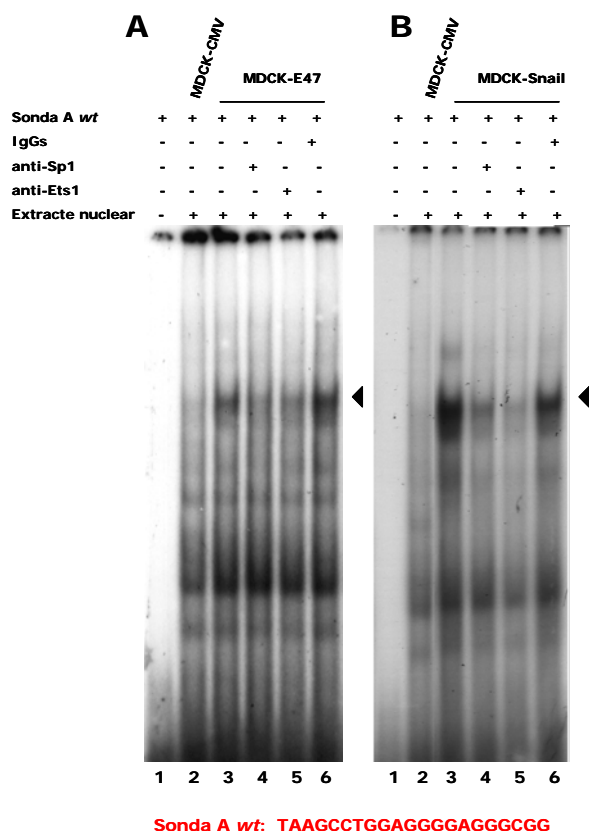


Figura R.20. Ets-1 i Sp1 s'uneixen al segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i al lloc Sp1-HA formant un complexe multiproteic. 10 μ g d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 (A) i MDCK-Snail (B) es van incubar amb la sonda A de doble cadena marcada radioactivament que conté els dos motius Ets-1 i Sp1-LA i el motiu Sp1-HA. A més a més, es van incubar amb un anticòs específic contra Ets-1 (4 μ g) o contra Sp1 (4 μ g), i amb IgGs inespecífiques (4 μ g), i es van córrer electroforèticament. La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior. El complexe proteïna-DNA específic i diferencial que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

Per tant, aquests resultats demostren que el segon lloc Ets-1/Sp1-LA i el lloc Sp1-HA intervien en l'activació del promotor de MMP-9 induïda per E47 i *Snail* reclutant un multicomplexe format almenys per Ets-1 i Sp1.

2.4. Fosforilació de Sp1 endogen

Els resultats obtinguts mitjançant transfeccions transients i assajos d'EMSA indiquen que E47 i *Snail* activen l'expressió de MMP-9 en part afavorint la unió de Sp1 a les caixes GA i GC de la regió proximal del promotor. Aquesta major unió pot ser deguda a diferències en els nivells de Sp1 entre les tres línies cel·lulars o a l'activació de Sp1 mediada per modificacions bioquímiques posttraduccional, tals com la fosforilació.

Per això es va analitzar l'expressió de Sp1 mitjançant *Western blot*. Breument, es van separar electroforèticament els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana que es va hibridar amb un anticòs específic contra Sp1 el qual reconeix la forma no fosforilada (95kDa) i la forma fosforilada (105kDa) de la proteïna. Efectivament, es van detectar dues bandes corresponents a aquestes masses moleculars. La banda superior, és a dir, la forma fosforilada de Sp1 (P-Sp1), pràcticament no es detectava en les

cèl·lules MDCK-CMV mentre que era molt intensa en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (figura R.21). A més a més, també s'observa que no només hi havia diferències en l'estat de fosforilació del factor de transcripció sinó també en els nivells de Sp1 no fosforilat, de manera que les cèl·lules control en tenien menys. Com a control de càrrega es va rehibridar la membrana amb un anticòs específic contra tubulina α .

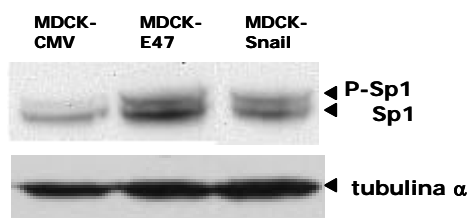


Figura R.21. Les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail expressen més nivells de proteïna Sp1, tant fosforilada com no fosforilada, que les cèl·lules MDCK-CMV. L'anàlisi de l'expressió de proteïna de Sp1 es va dur a terme mitjançant *Western Blot*. 30 μ g d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van resoldre electroforèticament en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PDVF que es va hibridar amb un anticòs específic contra Sp1, el qual reconeix la forma no fosforilada (95 kDa) i la forma fosforilada (105 kDa). Com a control de càrrega es va rehibridar la mateixa membrana amb un anticòs específic contra tubulina α .

Aquests resultats indiquen que E47 i *Snail* estimulen l'expressió de Sp1 i la seva fosforilació, la qual cosa explicaria la major unió de Sp1 al promotor de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les control MDCK-CMV.

2.5. La via Erk/MAPK regula la inducció de MMP-9 mediada per E47 i *Snail*

Activació de la via Erk/MAPK en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV

Tots els resultats obtinguts indiquen que E47 i *Snail* estimulen l'expressió de MMP-9 a nivell transcripcional però de forma indirecta, és a dir, no s'uneixen al promotor de la gelatinasa sinó que afavoreixen la unió d'altres factors de transcripció. Això suggereix que l'expressió estable d'E47 i *Snail* podria induir senyals que afectessin la unió o l'activació de factors de transcripció com Sp1. Tenint en compte que l'expressió de MMP-9 pot ser induïda per la cascada Raf-Erk/MAPK (Lakka et al., 2000; McCawley et al., 1999; Zeigler et al., 1999), es va investigar la possibilitat que aquesta via regulés l'expressió de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. Primer de tot, es va analitzar l'estat d'activació de la via Erk/MAPK. Per això, les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor sintètic PD98059, que bloqueja la via Erk/MAPK ja que inhibeix selectivament l'activitat de les quinases quinasa MEK1/2, i es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules tractades i no tractades per analitzar mitjançant *Western blot*. Concretament, es va examinar l'estat de fosforilació de les quinases Erk, les quals són efectors de les quinases quinasa MEK1/2, utilitzant un anticòs específic que reconeix la

forma fosforilada d'Erk1 i Erk2 (P-Erk1 i P-Erk2) i un anticòs que reconeix Erk1 i Erk2 totals. Com s'observa a la figura R.22-panell superior, es van detectar dues bandes de 44 i 42 kDa corresponents a Erk1 i Erk2 fosforilades, respectivament, molt més intenses a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que a les cèl·lules MDCK-CMV, especialment la banda de P-Erk1. A més a més, es va comprovar que l'inhibidor PD98059 bloquejava aquesta fosforilació a la concentració i temps emprats. En canvi, es van trobar els mateixos nivells d'expressió d'Erk1 i Erk2 totals en les tres línies cel·lulars (figura R.22-segona panell), la qual cosa indica que efectivament les diferències dels nivells de P-Erks entre les tres línies cel·lulars no es deu a un increment en la síntesi de les quinases Erk sinó a una major fosforilació i per tant a una major activació de la via Erk/MAPK. Posteriorment, la membrana es va rehibridar amb un anticòs específic contra tubulina α com a control de càrrega (figura R.22-panell inferior).

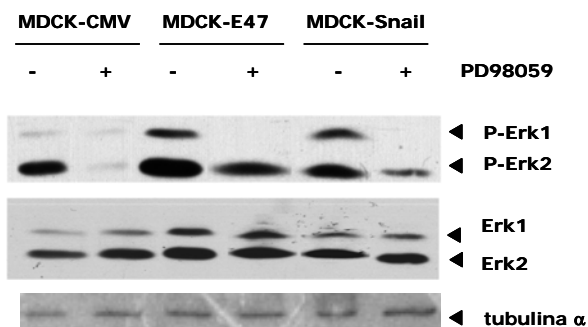


Figura R.22. Activació de la via Erk/MAPK en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV. Les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van cultivar en medi sense sèrum en presència o absència de l'inhibidor sintètic de les quinases MEK1/2 PD98059 (50 μ M) durant 5h. 100 μ g d'extractes proteics totals es van resoldre electroforèticament en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PDVF que es va hibridar amb diferents anticossos després del corresponent procés de deshibridació. Concretament es va hibridar amb un anticòs que reconeix les quinases Erk 1 (44 kDa) i Erk 2 (42 kDa) fosforilades (P-Erk), un anticòs que reconeix les formes fosforilades i no fosforilades de les mateixes quinases Erk i un anticòs específic contra tubulina α com a control de càrrega.

Així doncs, aquests resultats mostren que els factors de transcripció E47 i *Snail* activen la via Erk/MAPK en les cèl·lules epitelials MDCK.

La via Erk/MAPK està implicada en l'activació transcripcional de MMP-9

Per estudiar l'efecte de la via Erk/MAPK sobre l'activació transcripcional de MMP-9 es va cotransfectar la construcció VI del promotor i un dominant negatiu de la quinasa MEK1 (MEK-DN) a les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail i es va mesurar l'activitat relativa de la luciferasa. Com s'observa a la figura R.23, l'activitat promotora disminueix fins un 30% a les cèl·lules MDCK-E47 i fins un 50% a les MDCK-Snail

(assolint uns nivells d'activitat similars als de les cèl·lules MDCK-CMV) la qual cosa indica que la via Erk/MAPK regula l'activació de MMP-9 induïda per E47 i *Snail*. A les cèl·lules control MDCK-CMV també hi ha reducció de l'activitat per efecte de MEK-DN, suggerint la implicació de la via Erk/MAPK en l'activació basal de MMP-9.

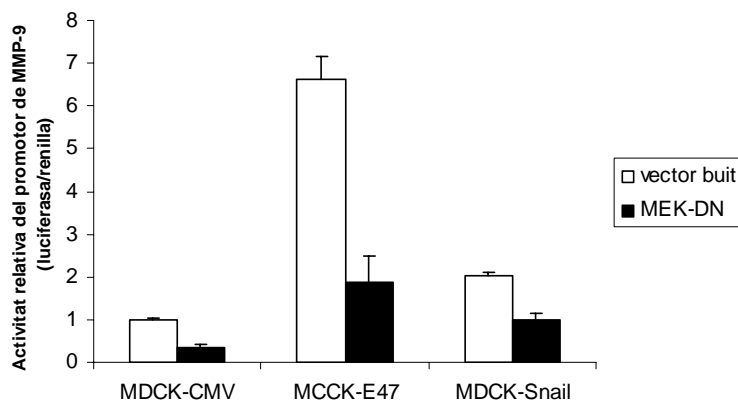


Figura R.23. L'activació del promotor de MMP-9 mediada indirectament pels factors E47 i *Snail* depèn en part de la via Erk/MAPK. Les cèl·lules MDCK es van transfectar amb 1 µg de la construcció VI, 100 ng del vector pRL-TK i 1 µg del vector d'expressió pcDNA3 (barres blanques) o pcDNA3-MEK1-DN (barres negres). L'activitat luciferasa/renilla es va mesurar 24 h després de la transfecció i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

Per tant, els resultats indiquen que l'activació del promotor de MMP-9 per E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK és en part mediada per la via Erk/MAPK.

La via Erk/MAPK i Sp1 col·laboren en l'activació del promotor de MMP-9

Per una banda, es va trobar que E47 i *Snail* incrementaven l'activació de MMP-9 en les cèl·lules epitelials MDCK i aquest efecte era dependent, en part, del reclutament de Sp1 a la regió proximal del promotor. A més a més, E47 i *Snail* estimulaven la síntesi i la fosforilació de Sp1. Per altra banda, es va veure que l'activació de la via Erk/MAPK era major en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que en les cèl·lules control i regulava la transcripció de MMP-9. Per això, es va voler estudiar la possible relació entre la via Erk/MAPK i Sp1 en l'activació transcripcional de MMP-9 induïda per E47 i *Snail*.

Amb aquest propòsit, es va analitzar l'activitat del promotor de MMP-9 en les cèl·lules Schneider (SL2) de *Drosophila melanogaster*, les quals són deficientes en Sp1; d'aquesta manera s'evitava qualsevol interferència amb la proteïna Sp1 endògena de les cèl·lules MDCK i s'assegurava que tota l'activitat promotora era atribuïda a les construccions transfectades. Es van cotransfectar les construccions III o VI del promotor de MMP-9 amb els vectors d'expressió de Sp1 salvatge o mutat i una forma constitutivament activa d'Erk2 (la proteïna de fusió MEK1-Erk2) a les cèl·lules SL2. Com

s'observa a la figura R.24A, l'expressió de Sp1 salvatge (Sp1 *wt*) pràcticament no incrementava l'activitat de la construcció III del promotor de MMP-9 (1,7 vegades). En canvi, quan es va cotransfectar juntament amb Erk2 activat, l'activitat del promotor de MMP-9 s'estimulava 7 vegades aproximadament. També es van cotransfectar diversos mutants de Sp1, concretament Sp1 amb la treonina 453 mutada (Sp1T453A), Sp1 amb la treonina 739 mutada (Sp1T739A) o Sp1 amb les dues treonines mutades alhora (Sp1 DM), ja que segons el treball de Pagès i col·laboradors són dos llocs de fosforilació de Sp1 per quinases Erk (Milanini-Mongiati et al., 2002). Com s'observa a la figura R.24A, aquests mutants per sí sols pràcticament no activaven el promotor de MMP-9, però en presència de la forma activa d'Erk2 mantenien la mateixa eficiència o millor que Sp1 *wt* en promoure l'activació transcripcional del promotor de MMP-9. És a dir, la fosforilació de Sp1 per les quinases Erk és necessària per l'estimulació del promotor de MMP-9 però no es dóna a les treonines 453 i 739, o si es dóna, no afecta l'activitat transcripcional de MMP-9. Això suggereix l'existència al llarg de la proteïna Sp1 d'altres llocs susceptibles de ser fosforilats per les quinases Erk.

Per altra banda, també es va cotransfectar la construcció III amb la forma salvatge de Sp1 i amb *Snail*. Com s'observa a la figura R.24B, quan es va transfectar Sp1 o *Snail* sols pràcticament no s'estimulava el promotor de MMP-9 mentre que si es coexpressaven Sp1 i *Snail* hi havia un increment d'aproximadament 20±10 vegades respecte el control (vector buit). Això confirma que *Snail* activa Sp1 i aquest activa el promotor de MMP-9.

Per comprovar que la regió proximal és la que respon a Sp1 fosforilat per la via Erk/MAPK, es va cotransfectar la construcció VI amb el vector d'expressió de Sp1 salvatge o de Sp1 amb les dues treonines mutades i de *Snail* (figura R.24C). Efectivament, l'expressió únicament de Sp1 no incrementava l'activitat luciferasa (1,7 vegades, com ocorria amb la construcció III), mentre que en presència de *Snail* s'estimulava aproximadament 6 vegades, i aquesta estimulació era reduïda un 30% per efecte d'un dominant negatiu de la quinasa quinasa MEK1 (MEK-DN). Els resultats també suggereixen que les mutacions de les treonines 453 i 739 de Sp1 (Sp1 DM) no afecten la capacitat d'activació transcripcional d'aquesta proteïna sobre del promotor de MMP-9.

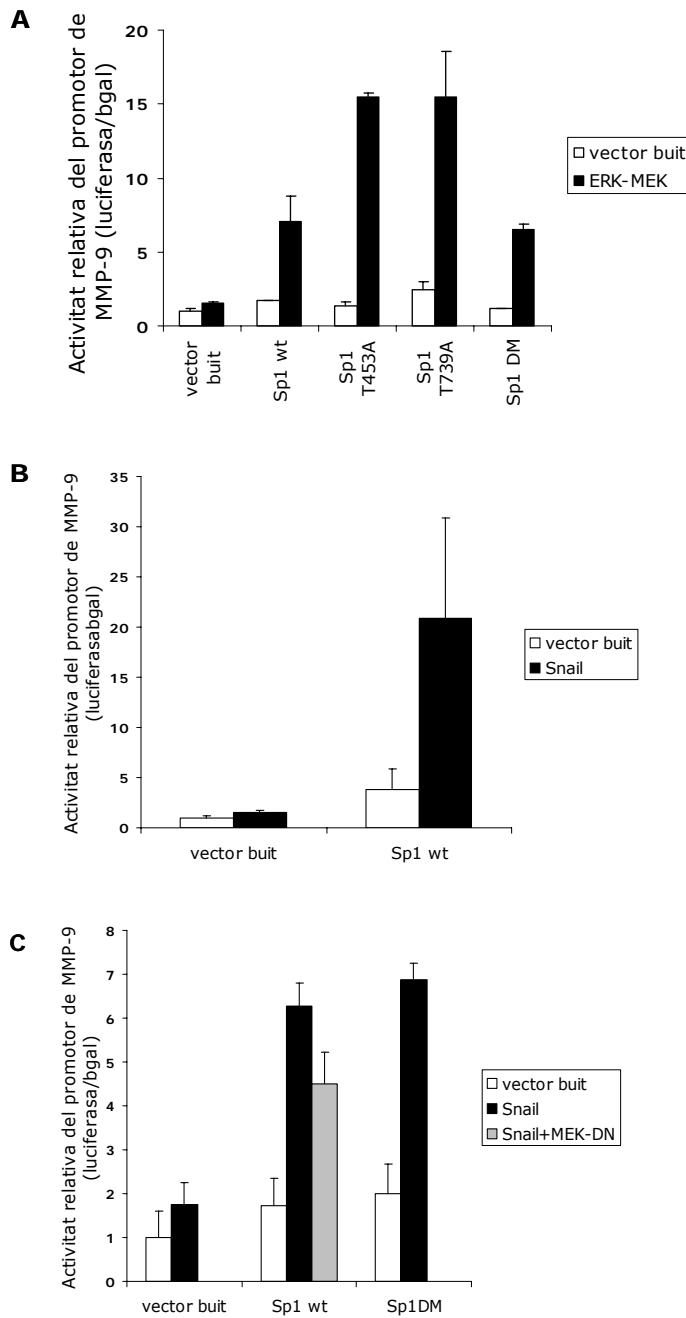


Figura R.24. La via Erk/MAPK activa Sp1, probablement per fosforilació, activant el promotor de MMP-9. Les cèl·lules Schneider (SL2) de *Drosophila melanogaster*, les quals són deficientes en Sp1, es van transfectar amb 2 µg de la construcció III (A i B) o de la construcció VI (C) i 200 ng del vector pPac que codifica pel gen LacZ sota el control del promotor de l'actina de *Drosophila*. Quan s'indica, es van cotransfectar 2 µg dels vectors d'expressió de Sp1 wt, de Sp1 mutat a la treonina 453 (Sp1T453A), de Sp1 mutat a la treonina 735 (Sp1T735A), de Sp1 mutat a les dues treonines alhora (Sp1DM), d'una forma constitutivament activa d'Erk2 (ERK-MEK) o de *Snail*. La càrrega de DNA es va compensar amb les quantitats corresponents del vector d'expressió buit. L'activitat luciferasa/β-galactosidasa es va mesurar 96 h després de la transfecció i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

En conclusió, l'activació del promotor de MMP9 per *Snail* és mediada, almenys en part, per Sp1 activat per la via Erk/MAPK. Aquesta activació és probablement per fosforilació d'altres residus però no de les treonines 453 i 739.

La via Erk/MAPK afavoreix la unió a les caixes GA i GC de la regió proximal del promotor de MMP-9

Per demostrar que l'activació de Sp1 per la via Erk/MAPK és responsable de la unió de la proteïna Sp1 a la regió proximal del promotor de MMP-9 es va fer un assaig

d'EMSA amb la sonda B que conté el segon lloc Ets-1/Sp1-LA i el lloc Sp1-HA marcada radioactivament i amb extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-Snail transfectades transientment amb un dominant negatiu de MEK1 (MEK-DN). Com s'observa a la figura R.25A, l'expressió ectòpica de MEK-DN en les cèl·lules MDCK-Snail provoca una reducció en la formació del complex proteïna-DNA, suggerint la participació de la via Erk/MAPK. Per comprovar que el dominant negatiu de MEK1/2 és funcional i bloqueja la via Erk/MAPK, es va fer un *Western blot* amb un anticòs específic que reconeix la forma fosforilada de les quinases Erk, i després amb un anticòs que reconeix Erk total. Tal com s'indica a la figura R.25B, el dominant negatiu de la quinasa MEK1 redueix la intensitat de la banda corresponent a la forma fosforilada però no la d'Erk total.

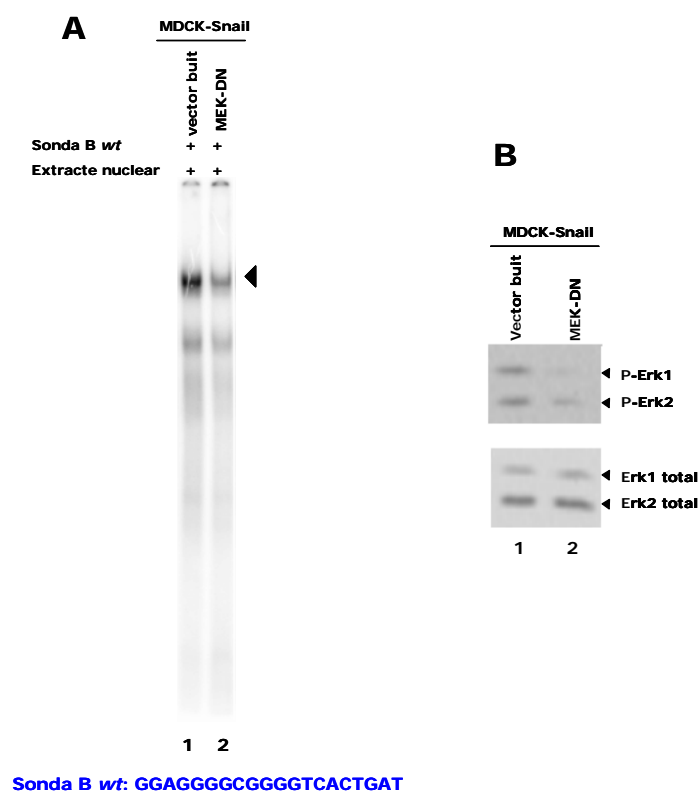


Figura R.25. La via Erk/MAPK influeix almenys en la unió de Sp1 a la regió proximal del promotor de MMP-9. (A) 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-Snail transfectades transientment amb el vector d'expressió pcDNA3 o pcDNA3-MEK1-DN, segons s'indica, es van incubar amb la sonda B de doble cadena marcada radioactivament que conté el segon motiu Ets-1 i Sp1-LA i el motiu Sp1-HA, i es van resoldre electroforèticament. La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior. El complex proteïna-DNA específic i diferencial que es va formar es senyala amb una fletxa negra. (B) 30 µg d'extractes nuclears es van resoldre electroforèticament en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PDVF que es va hibridar amb diferents anticossos després del corresponent procés de deshibridació. Concretament es van hibridar amb un anticòs que reconeix les quinases Erk 1 (44 kDa) i Erk 2 (42 kDa) fosforilades (P-Erk) i amb un anticòs que reconeix les formes

Es conclou que la fosforilació d'almenys Sp1 per la via Erk/MAPK afavoreix la seva unió a la regió proximal rica en caixes GA i GC del promotor de MMP-9 activant la seva transcripció.

2.6. La via PI3K/Akt regula l'expressió de MMP-9 induïda per *Snail* en col·laboració amb la via Erk/MAPK

Activació de la via PI3K/Akt en les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV

Està descrit que la via PI3K/Akt regula l'expressió de MMP-9 en alguns sistemes cel·lulars (Ellerbroek et al., 2001), i per això es va estudiar si ocorria el mateix en les cèl·lules MDCK-CMV i MDCK-Snail. Primer de tot es van tractar les cèl·lules amb un inhibidor sintètic que bloqueja específicament aquesta via, la wortmannina, ja que inhibeix la quinasa PI3K, i es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules tractades i no tractades per analitzar mitjançant *Western blot*. Concretament, es va examinar l'estat de fosforilació de la quinasa Akt utilitzant un anticòs específic que reconeix la forma fosforilada. Com s'observa a la figura R.26, es va detectar una banda corresponent a Akt fosforilat molt més intensa en les cèl·lules MDCK-Snail que en les cèl·lules MDCK-CMV, indicant que l'estat d'activació de la via PI3K/Akt és major en les cèl·lules transfectades establement amb *Snail*. A més a més, es va comprovar que l'inhibidor wortmannina bloquejava aquesta fosforilació a la concentració i temps emprats. Posteriorment, la membrana es va rehibridar amb un anticòs específic contra tubulina α com a control de càrrega.

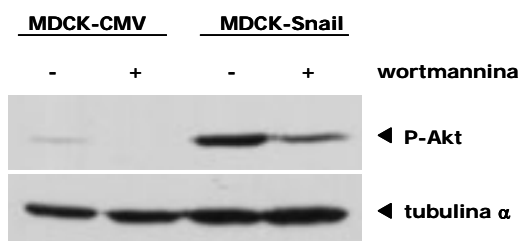


Figura R.26. Activació de la via PI3K/Akt en les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV. Les cèl·lules MDCK-CMV i MDCK-Snail es van cultivar en medi sense sèrum en presència o absència de l'inhibidor sintètic de la quinasa PI3K wortmannina (40 nM) durant 5h. 100 μ g d'extractes proteics totals es van resoldre electroforèticament en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PDVF que es va hibridar amb un anticòs que reconeix la quinasa Akt fosforilada (P-Akt) i amb un anticòs específic contra tubulina α com a control de càrrega.

Aquest resultat mostra que l'expressió estable de *Snail* indueix l'activació de la via PI3K/Akt.

La via PI3K/Akt està implicada en l'activació transcripcional de MMP-9

Per estudiar l'efecte de la via PI3K/Akt sobre l'activació transcripcional de MMP-9 a les cèl·lules MDCK, aquestes es van cotransfectar amb la construcció IV del promotor i el vector d'expressió de *Snail* o el vector buit, i es van tractar amb l'inhibidor wortmannina. La mesura de l'activitat transcripcional va demostrar que

després del tractament hi havia una reducció de l'activitat d'un 20% aproximadament en les cèl·lules transfectades amb *Snail* (figura R.27).

A més a més, les cèl·lules també es van tractar amb l'inhibidor sintètic de la via Erk/MAPK, U0126, sol o juntament amb la wortmannina, i es va mesurar l'activitat promotora. Com s'observa a la figura R.27, l'inhibidor U0126 va provocar una reducció de l'activitat d'un 20%, i actuava sinèrgicament amb la wortmannina causant una reducció d'un 50%. Aquesta reducció de l'activitat no es va donar, però, en les cèl·lules control MDCK.

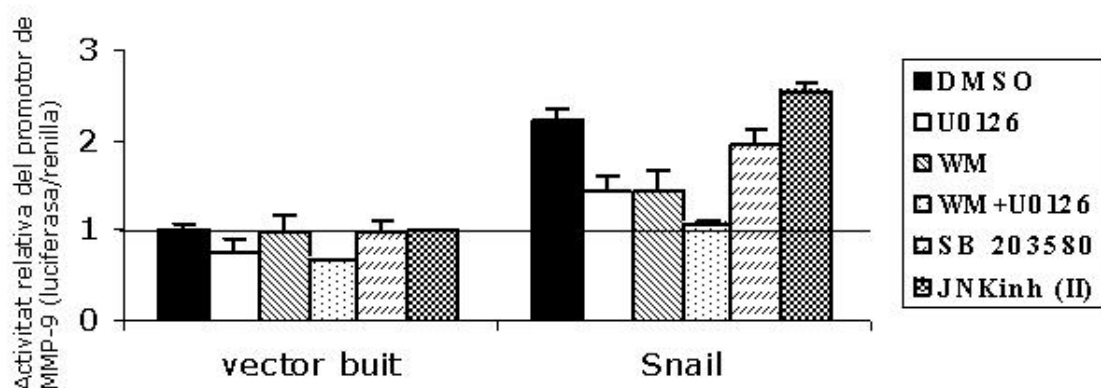


Figura R.27. L'activació del promotor de MMP-9 induïda per *Snail* depèn en part de les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt. Les cèl·lules MDCK es van cotransfectar amb 1 µg de la construcció IV (pMMP9-389luc), 100 ng del vector pRL-TK i 1 µg del vector d'expressió de *Snail* o del vector buit pcDNA3, segons s'indica, i es va mesurar l'activitat luciferasa/renilla 24 h després. 5 hores abans de recollir-les, les cèl·lules es van tractar en medi sense sèrum amb l'inhibidor de MEK1/2 U0126 (10 µM), l'inhibidor de PI3K wortmannina (WM, 40 nM), els dos inhibidors junts, l'inhibidor de p38/MAPK SB203580 (10 µM) o l'inhibidor de JNK/MAPK JNKinh II (100 nM). L'activitat luciferasa/renilla és relativa a l'obtinguda en les cèl·lules MDCK transfectades amb el vector buit i sense tractar, i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

Per analitzar la participació d'altres vies de senyalització en la regulació de MMP-9 com la via de p38/MAPK i de JNK/MAPK també es van tractar les cèl·lules amb inhibidors específics d'aquestes vies, concretament amb SB203580 o JNKinh II, respectivament. Com s'observa a la figura R.27, no va afectar l'activitat del promotor de MMP-9.

És a dir, en l'activació transcripcional de MMP-9 intervenen les vies de senyalització Erk/MAPK, que afecta almenys la fosforilació de Sp1, i PI3K/Akt.

2.7. H-Ras coopera sinèrgicament amb *Snail* en l'activació de MMP-9

Nombrosos treballs han mostrat el requeriment de la senyalització *downstream* de Ras en el procés de TEM en diferents sistemes cel·lulars epitelials (Gotzmann et al., 2002; Oft et al., 1996). Per altra banda, està descrit que l'oncogen H-Ras és un potent inductor de la transcripció i la secreció de MMP-9 (Bernhard et al., 1990; Gum et al.,

1996), i a més a més regula l'activació transcripcional de *Snail* en alguns sistemes epitelials, entre ells les cèl·lules MDCK. D'aquí la importància d'estudiar la contribució potencial de Ras, ja sigui per ell mateix o en cooperació amb *Snail*, en la regulació del promotor de MMP-9 en el nostre sistema cel·lular. Per això, es va cotransfectar transientment una forma constitutivament activa de Ras (RasV12) i un dominant negatiu (RasN17) en les cèl·lules control MDCK-CMV juntament amb la construcció IV en presència o absència de *Snail*. Com s'observa a la figura R.28A, mentre que l'expressió només de H-Ras activat o de *Snail* estimulava modestament l'activitat de la construcció IV (un increment de 3,5 i 2 vegades, respectivament), quan es transfectaven junts hi havia un efecte sinèrgic molt dràstic, produint un increment de 20 vegades. A més a més, un dominant negatiu de Ras provocava una reducció del 60% en l'activació del promotor de MMP-9 mediada per *Snail*. Per altra banda, les cèl·lules cotransfectades amb RasV12, sol o juntament amb *Snail*, es van tractar amb l'inhibidor de la via Erk/MAPK U0126 provocant una reducció d'un 35% aproximadament de l'activitat promotora (figura R.28A).

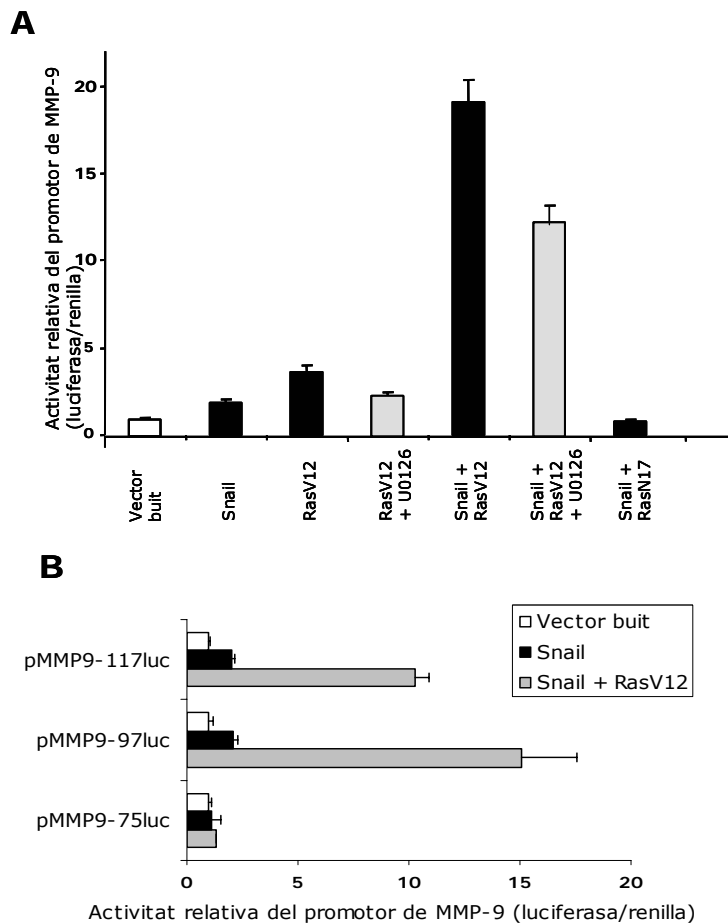


Figura R.28. H-Ras activa la transcripció de MMP-9 i pot actuar sinèrgicament amb *Snail*. Les cèl·lules MDCK es van transfectar amb 1 µg de la construcció IV (A) o de les construccions V, VI i VII (B), 100 ng del vector pRL-TK i quan s'indica 1 µg dels vectors d'expressió de *Snail*, RasVal12 (forma constitutivament activa de H-Ras) o RasN17 (dominant negatiu de H-Ras). La càrrega de DNA es va compensar amb les quantitats corresponents del vector d'expressió buit. (A) Quan es senyala, les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor sintètic de les quinases MEK1/2 U0126 (10 µM) en medi sense sèrum 5 hores abans de recollir les cèl·lules (barres grises). L'activitat luciferasa/renilla es va mesurar 24 h després de la transfecció i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

En conjunt aquests resultats suggereixen que H-Ras activat estimula el promotor de MMP-9 en les cèl·lules epitelials MDCK i que pot actuar sinèrgicament amb *Snail* en aquesta inducció, la qual es dóna, almenys en part, per la via Erk/MAPk. Per altra banda, els resultats indiquen que Ras és necessari en l'activació del promotor de MMP-9 mediada per *Snail*.

A més a més, es va analitzar la resposta de les construccions més petites del promotor de MMP-9 a l'acció sinèrgica de *Snail* i H-Ras activat. Com s'observa a la figura R.28B, l'expressió transient de *Snail* incrementava dues vegades l'activitat de les construccions V i VI, i quan es cotransfectava amb H-RasV12 es donava un augment de 10-15 vegades aproximadament. En canvi, la construcció VII, que en estat basal no tenia activitat i no s'estimulava per *Snail*, tampoc responia a H-RasV12. És a dir, els elements responedors a l'acció sinèrgica de *Snail* i H-Ras es troben en la regió localitzada entre -97 i -75 pb respecte l'inici de transcripció.

D'acord amb els resultats anteriors, la inducció de l'activitat de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-Snail per H-Ras activat es va confirmar mitjançant l'anàlisi zimogràfic (figura R.29).

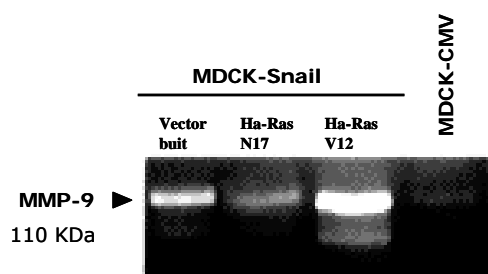


Figura R.29. H-Ras indueix la secreció de MMP-9. Anàlisi de la secreció i activitat gelatinolítica de MMP-9 mitjançant zimografia en les cèl·lules MDCK-Snail després de ser transfectades transientment amb els vectors d'expressió RasVal12 (forma constitutivament activa de H-Ras) o RasN17 (dominant negatiu de H-Ras) i en les cèl·lules MDCK-CMV.

En conjunt, els resultats indiquen que H-Ras activa el promotor de MMP-9 i pot actuar sinèrgicament amb *Snail*. A més a més, és necessari en l'activació induïda per *Snail*.

3. MECANISME DE REGULACIÓ DE L'ACTIVACIÓ D'ID-1 INDUÏDA PER E47 I SNAiL

3.1. Inducció d'Id-1 per E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK

El canvis fenotípics induïts per la transfecció estable dels factors de transcripció E47 o *Snail* en la línia cel·lular epitelial prototípica MDCK –pèrdua dels contactes intercel·lulars i adquisició de propietats migratòries i invasives- (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001) són similars als descrits prèviament en cèl·lules que expressen Id-1 (Desprez et al., 1995; Fong et al., 2003; Lin et al., 1999). A més, molts estudis suggereixen que l'expressió de *Snail* i Id-1 podrien estar relacionades ja que tots dos estan implicats en processos invasius similars i s'han trobat sobreexpressats en moltes línies tumorals agressives (Cano et al., 2000; Desprez et al., 1998; Lin et al., 2000). Per altra banda, la relació entre Id-1 i E47, tots dos membres de la família de factors de transcripció *helix-loop-helix*, sembla ser crítica per entendre els mecanismes pels que E47 indueix un fenotip invasiu. Per això, es va estudiar l'expressió d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail. Primer es van analitzar els nivells de mRNA d'Id-1 mitjançant RT-PCR semiquantitativa utilitzant un parell d'encebadors complementaris a una regió del gen d'Id-1 humà molt conservada en d'altres espècies, atès que el gen d'Id-1 de gos no està identificat ni publicat fins la data. Concretament els encebadors corresponien a les posicions +171 i +349 pb respecte el lloc d'inici de transcripció, de manera que el producte amplificat en condicions poc estrictes era de 178 pb. Després de comprovar per seqüenciació la identitat d'aquest fragment, es van analitzar els nivells d'expressió de les tres línies cel·lulars cultivades *in vitro*. La figura R.30A mostra la presència d'aquest producte tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail, i amb nivells lleugerament superiors a les primeres. Contràriament, després de normalitzar en tots els casos respecte l'expressió de la ciclofilina, els nivells d'Id-1 eren pràcticament indetectables a les cèl·lules MDCK-CMV. També es va estudiar l'expressió d'Id-1 per *Northern blot*, per comprovar els resultats obtinguts per RT-PCR. Breument, el RNA total de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es va separar electroforèticament en un gel d'agarosa desnaturalitzant i es va transferir a una membrana que es va hibridar amb una sonda marcada radioactivament corresponent a un fragment de 178 pb del cDNA d'Id-1 caní (concretament es va utilitzar el mateix producte amplificat per RT-PCR). Com s'observa a la figura R.30B, es va detectar una banda d'aproximadament 900 pb corresponent al mRNA d'Id-1 a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no a les cèl·lules control MDCK-CMV.

En segon terme, es va estudiar l'expressió d'Id-1 a nivell de proteïna mitjançant *Western blot* amb un anticòs específic que reconeix Id-1 però no altres membres de la família. Com es mostra a la figura R.30C, es van detectar dues bandes a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no a les MDCK-CMV. Atès que totes les proteïnes Id tenen almenys dos transcrits generats per *splicing* alternatiu (Norton et al., 1998), aquestes dues bandes podrien correspondre a les dues formes d'Id-1 originades per aquest procés. Una altra possibilitat seria que es tractés d'una forma fosforilada i una no fosforilada ja que s'ha descrit la fosforilació d'aquesta proteïna per diferents quinases (Deed et al., 1994). Atès que estudis previs han demostrat que el sèrum pot influenciar l'expressió d'Id-1 en moltes línies cel·lulars de procedència tumoral però poc agressives (Lin et al., 2000; Ling et al., 2002; Sumida et al., 2004), es va estudiar l'efecte del sèrum en el nostre sistema cel·lular. Tal com es pot observar a la figura R.30C, ni en absència ni en presència de sèrum es detectava la proteïna Id-1 en les cèl·lules control, mentre que era evident en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail en les que la quantitat tampoc estava influenciada per la presència del sèrum en el medi de cultiu.

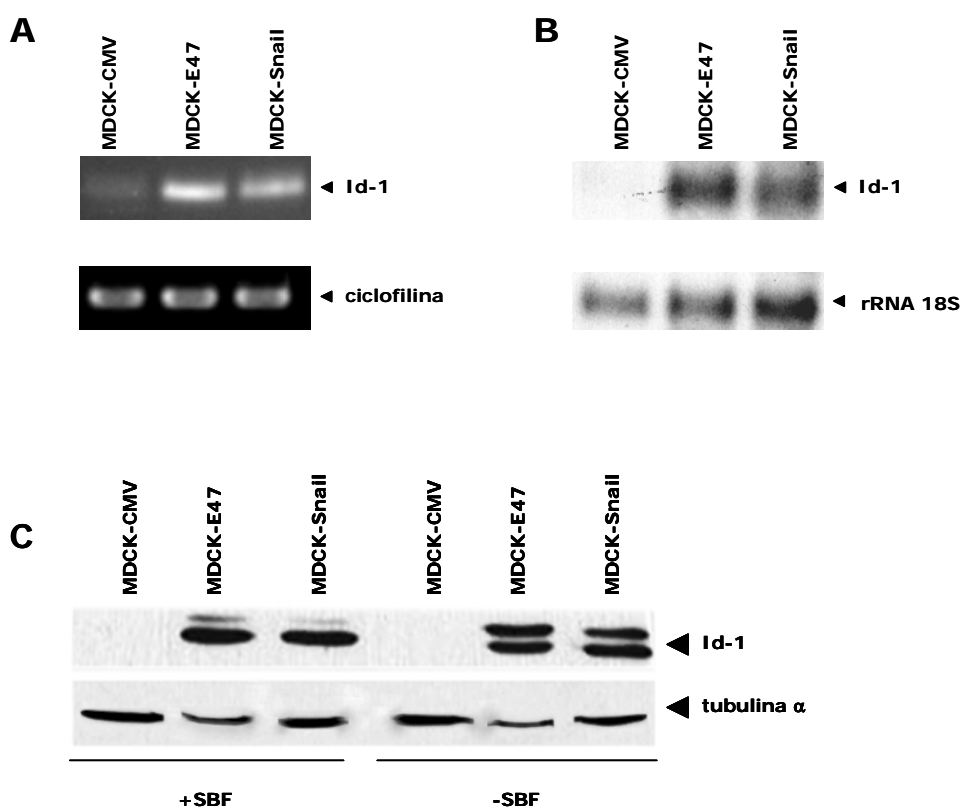


Figura R.30. L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK indueix l'expressió d'Id-1 a nivell de mRNA i de proteïna. Anàlisi dels nivells de mRNA d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant RT-PCR semiquantitativa (A) o mitjançant *Northern blot* (B). Els nivells de mRNA de ciclofilina i de rRNA 18S es mostren com a control de càrrega. (C) Anàlisi dels nivells de proteïna d'Id-1 mitjançant *Western blot*. Les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van cultivar en presència o absència de sèrum, segons s'indica. 100 µg d'extractes proteics totals es van resoldre electroforèticament en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PDVF que es va hibridar amb un anticòs específic contra Id-1 i amb un anticòs específic contra tubulina α com a control de càrrega.

En conjunt, els resultats indiquen que en les cèl·lules epitelials MDCK que han sofert una TEM com a conseqüència de l'expressió estable dels factors de transcripció E47 i *Snail* s'indueix l'expressió d'Id-1 a nivell proteic i de mRNA, la qual cosa suggereix una activació transcripcional. A més a més, aquesta inducció és independent de la presència de sèrum en el medi de cultiu.

3.2. Estimulació de l'activitat del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail

Per determinar si l'augment dels nivells de mRNA d'Id-1 era degut a l'activació de la transcripció, es va analitzar la regió promotora d'Id-1 emprant la seqüència humana atès el grau de conservació d'aquest gen en la filogènia. Per això, es va utilitzar la regió compresa entre les posicions -1370 i +86 pb respecte l'inici de transcripció clonada en el vector pGL2-basic, concretament fusionada *upstream* del gen reporter de la luciferasa per dirigir la seva expressió (Lopez-Rovira et al., 2002). Es va transfectar a les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail i es va mesurar l'activitat transcripcional d'aquesta seqüència promotora (construcció proId-1370). Es va trobar que en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail s'incrementava 13 i 5 vegades, respectivament, comparat amb l'activitat en les cèl·lules control (figura R.31).

Un anàlisi *in silico* d'aquesta regió promotora revelava la presència de caixes E (CANNTG), que són les seqüències de reconeixement per E47 i *Snail*, en les posicions -1256, -1125, -1038 i -880 pb anteriors a l'inici de transcripció, que es van anomenar caixes A, B, C i D, respectivament. Per explorar si aquests elements estaven implicats en la regulació de l'activitat del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail es van generar una sèrie de mutants de deleció de la construcció proId-1370 (figura R.31). L'anàlisi de l'activitat luciferasa d'aquestes construccions mostrava que la deleció de la caixa A i les seqüències incloses fins la posició -1179 pb respecte l'inici de transcripció (construcció proId-1179) causava una reducció d'un 30-40% de l'activitat del promotor respecte la construcció proId-1370 tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail. A més a més, aquest mutant de deleció tenia una activitat promotora major en aquestes dues línies cel·lulars que en les cèl·lules MDCK-CMV, és a dir, encara contenia elements responedors a E47 i a *Snail*. La deleció de les caixes A i B i les seqüències incloses fins la posició -1046 pb respecte l'inici de transcripció (construcció proId-1046) resultava en una pèrdua dramàtica de l'activitat en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (aproximadament un 80-90% respecte el promotor sencer) (figura R.31), de manera que es reduïa fins a uns nivells similars a l'activitat en les cèl·lules control.

Per tant, era probable que alguns elements del promotor d'Id-1 situats entre -1370 i -1046 pb respecte l'inici de transcripció tinguessin un efecte activador tant a les cèl·lules MDCK-E47 com MDCK-Snail.

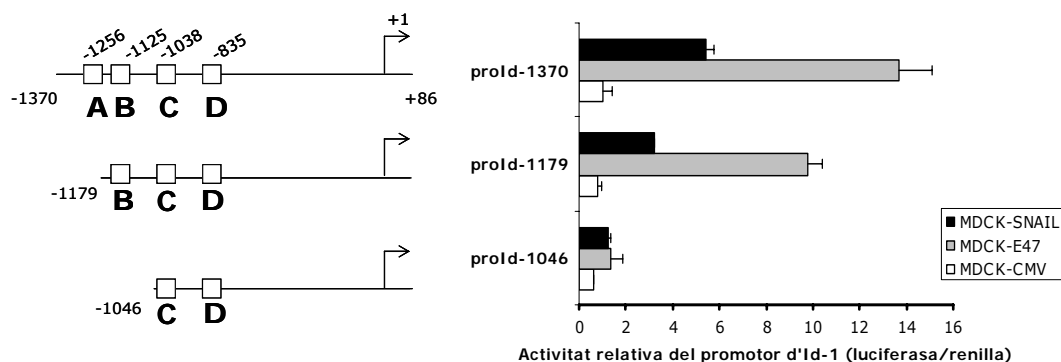


Figura R.31. L'expressió ectòpica d'E47 i Snail en les cèl·lules epitelials MDCK incrementa l'activitat del promotor d'Id-1. (Esquerra) Representació esquemàtica del promotor d'Id-1 humà (construcció proId-1370luc) així com de les diferents construccions de deleció, indicant la posició de les quatre caixes E (quadre blanc) que conté anomenades A, B, C i D. (Dreta) Anàlisi de l'activitat del promotor d'Id-1 i de les diferents construccions de deleció en les cèl·lules MDCK-CMV (barres blanques), MDCK-E47 (barres grises) i MDCK-Snail (barres negres) 24 h després de ser transfectades amb 1 µg de cada construcció i 100 ng del vector pRL-TK. L'activitat luciferasa/renilla representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

Per confirmar la implicació de la caixa E anomenada "B" en l'activació del promotor d'Id-1 mediada per E47 i Snail es va generar un mutant puntual d'aquest motiu (construcció proId-1370EboxM). Atès que l'anàlisi *in silico* d'aquesta regió revelava la presència d'una caixa GC adjacent a la caixa E, també es va mutar aquest element (construcció proId-1179 Sp1M). Es van transfectar aquestes construccions a les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail i es va mesurar l'activitat transcripcional. Com s'observa a la figura R.32, la mutació de la caixa E anomenada "B" reduïa l'activitat promotora un 90% respecte la construcció salvatge corresponent, confirmant el paper crucial d'aquesta caixa E en l'activació del promotor d'Id-1 observada en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (figura R.31). En canvi, la mutació de la caixa GC afectava molt lleugerament l'activitat promotora (s'observava una reducció del 10-15 % respecte la construcció salvatge corresponent), la qual cosa suggeria que aquest lloc per sí sol no era responsable de l'activació del promotor d'Id-1.

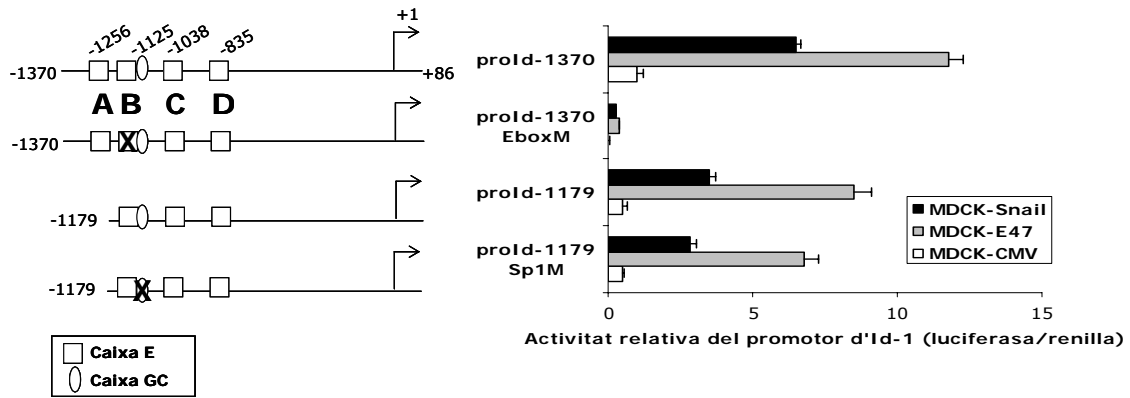


Figura R.32. La mutació de la caixa E situada a -1125 pb de l'inici de transfecció abroga l'activitat del promotor d'Id-1. (Esquerra) Representació esquemàtica del promotor d'Id-1 humà (construccions proId-1370 i proId-1179) senyalant amb una X les mutacions puntuals a la caixa E situada a -1125 pb i al lloc Sp1 adjacent. (Dreta) Anàlisi de l'activitat promotora de les diferents construccions salvatges i mutades en les cèl·lules MDCK-CMV (barres blanques), MDCK-E47 (barres grises) i MDCK-Snail (barres negres) 24 h després de ser transfectades amb 1 µg de cada construcció i 100 ng del vector pRL-TK. L'activitat luciferasa/renilla representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

Els resultats indiquen que la regió del promotor d'Id-1 compresa entre -1179 i -1046 pb respecte l'inici de transcripció conté els elements reguladors suficients capaços d'establir les diferències entre les cèl·lules control i les que han sofert la TEM mediada per l'expressió estable dels factors de transcripció E47 i *Snail*. De fet, la caixa E situada a -1125 pb de l'inici de transcripció hi juga un paper crucial.

3.3. L'activació del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail implica la unió de factors de transcripció a les caixes E i GC distals

Per determinar si l'activació del promotor d'Id-1 es correlacionava amb un increment de la unió proteïna-DNA a les caixes E (anomenades A, B, C i D) es van realitzar assajos d'EMSA utilitzant extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail i oligonucleòtids de doble cadena marcats radioactivament que contenen aquestes seqüències de reconeixement. Segons els anàlisis d'activitat del promotor d'Id-1, la construcció proId-1046 que contenia les caixes E anomenades "C" i "D" tenia una activitat transcripcional molt baixa i molt similar en les tres línies cel·lulars, la qual cosa indicava la poca contribució d'aquests elements a la inducció d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. D'acord amb aquests resultats, els assajos d'EMSA amb oligonucleòtids que contenen les caixes E anomenades "C" o "D" confirmaven que no es formava cap complex proteïna-DNA específic i diferencial a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules control (figures R.33A i B).

A

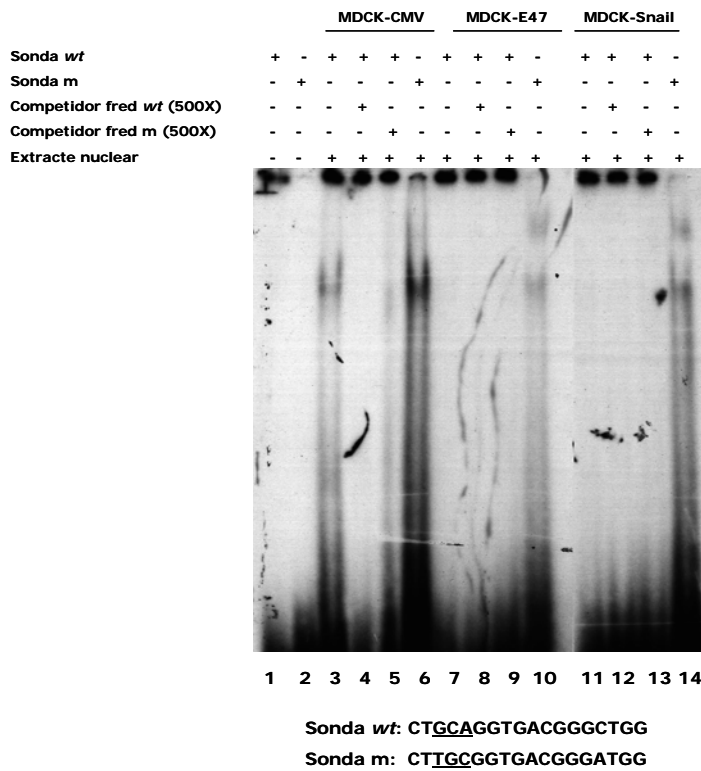
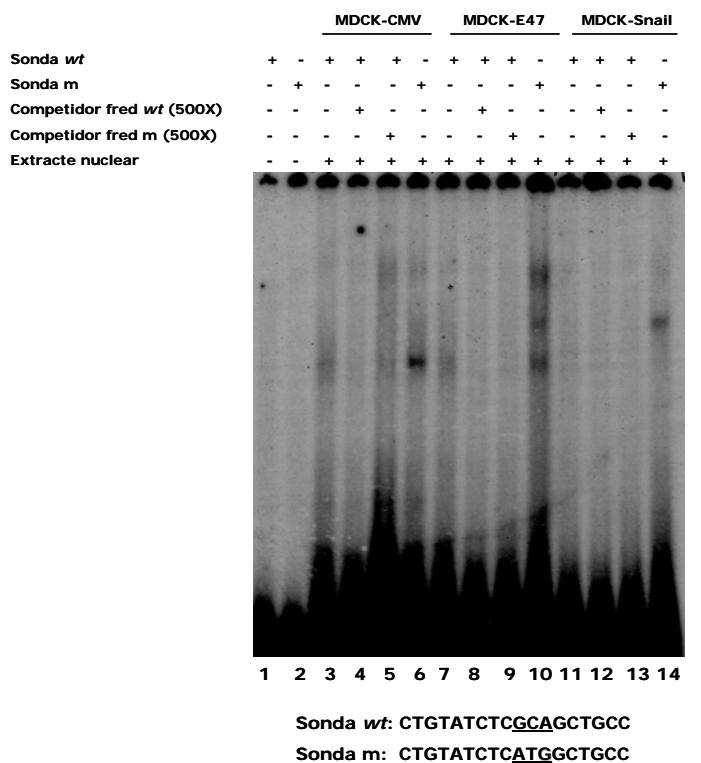


Figura R.33. Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail no contenen proteïnes que s'uneixin específicament a les caixes E situades a -1038 i -880 pb de l'inici de transcripció del promotor d'*Id-1*. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament que conté la caixa E situada a -1038 pb o "C" (figura A) o la caixa E situada a -880 pb o "D" (figura B) i es van resoldre electroforèticament. Es va emprar una sonda salvatge (*wt*) o mutada en la caixa E (*m*), segons s'indica. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior dels EMSAs, subratllant les mutacions.

B



En canvi, quan en l'assaig d'EMSA s'utilitzava la sonda corresponent a la seqüència de la caixa E anomenada en aquest treball "A" es detectava un complex *de novo* a les cèl·lules MDCK-E47 i molt lleument a les cèl·lules MDCK-Snail (que s'indica

amb una fletxa en la figura R.34 als carrils 7 i 11, respectivament) però no a les cèl·lules MDCK-CMV (carril 3). L'especificitat d'aquest complexe es va demostrar per competició amb un excés d'oligonucleòtid salvatge no marcat radioactivament que abolia la seva formació (carrils 8 i 12). Contràriament, el complexe no era abrogat quan la mateixa sonda marcada radioactivament estava en competició amb un excés d'oligonucleòtid mutat no marcat radioactivament (carrils 10 i 14). A més a més, la mutació de la caixa E impedia la formació d'aquest complexe (carrils 9 i 13). Els complexos de major mobilitat electroforètica probablement eren inespecífics perquè també es formaven emprant l'oligonucleòtid mutat com a sonda radioactiva. Això suggereix que la caixa E anomenada "A" contribuiria, almenys en part, en l'activació del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail prèviament atribuïda a la regió promotora compresa entre els nucleòtids en posició -1370/-1179 pb respecte l'inici de transcripció.

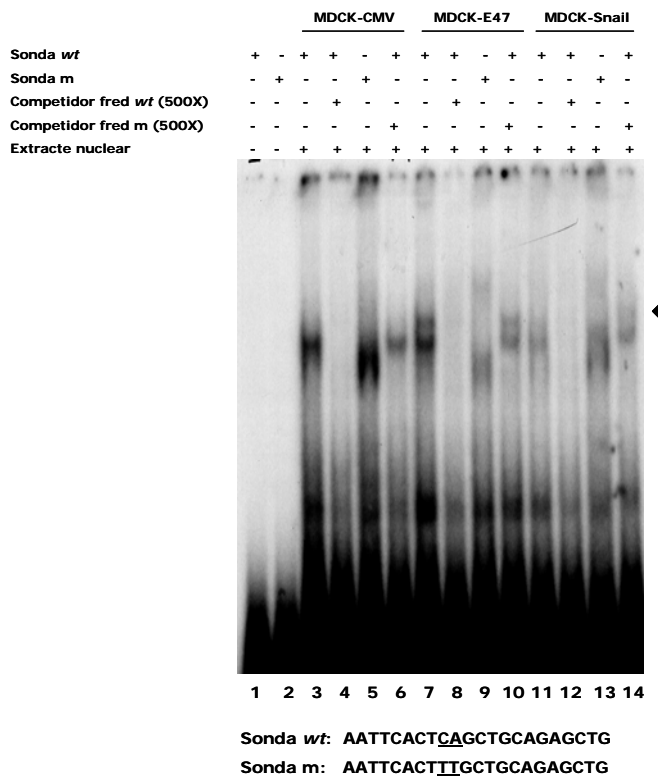


Figura R.34. La caixa E anomenada "A" forma un complexe proteïna-DNA diferencial a les cèl·lules MDCK-E47 i menys abundant a les MDCK-Snail però no a les cèl·lules MDCK-CMV. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament que conté la caixa E situada a -1256 pb de l'inici de transcripció i es van resoldre electroforèticament. Es va emprar una sonda salvatge (*wt*) o mutada en la caixa E (*m*), segons s'indica. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior de l'EMSA, subratllant les mutacions. El complexe proteïna-DNA específic i diferencial que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

Atès que els resultats previs de l'anàlisi de l'activitat del promotor d'Id-1 indicaven que les seqüències compreses entre -1179 i -1046 pb respecte l'inici de transcripció contenien els elements reguladors suficients per respondre a l'activació transcripcional induïda per E47 i per *Snail*, l'estudi de la caixa E anomenada "B" situada en aquesta regió era d'especial interès. A més a més, aquesta caixa E està situada molt a prop d'una caixa GC (GGGGCGGGG), que és la seqüència de reconeixement consens de la proteïna Sp1. Per explorar la unió de factors de transcripció a aquests elements es va dissenyar la sonda B-1 que conté la caixa E i la caixa GC, així com la mateixa sonda mutada en cadascun d'aquests llocs independentment (sondes B-1 EboxM i B-1 Sp1M). Els resultats de l'assaig d'EMSA utilitzant aquestes sondes marcades radioactivament es mostren a la figura R.35. Com s'observa, la sonda B-1 forma diversos complexos proteïna-DNA de manera que el de menys mobilitat electroforètica (anomenat "a") només apareix en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (carrils 4 i 7, respectivament), però no en les cèl·lules MDCK-CMV (carril 1). Els complexos de major mobilitat, senyalats amb una clau a la figura R.35, no es van considerar d'interès atès que es formaven en les tres línies cel·lulars independentment de l'expressió estable d'E47 i *Snail*. La mutació de la caixa E en aquest oligonucleòtid específic emprat com a sonda va resultar en l'abrogació completa del complex "a", tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail (carrils 5 i 8, respectivament), suggerint que aquest motiu –la caixa E– estava implicat en la formació d'aquest complex. Aquests resultats estarien d'acord amb la transfecció de la figura R.32, segons la qual aquesta caixa E és essencial per l'activitat promotora d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. Per altra banda, emprant la sonda que conté la mutació que elimina la caixa GC però manté intacta la caixa E, disminuïa lleugerament la intensitat de la banda corresponent al complex "a" (carrils 6 i 9). Aquest fet suggereix que en aquestes condicions diferents proteïnes podrien estar implicades en la formació del complex "a": les que s'uneixen al motiu de la caixa E i també els membres de la família Sp, atesa la proximitat de la caixa GC, tot i que per sí sola la caixa GC no és important per l'activitat promotora (transfecció de la figura R.32). La resta de complexos generats *de novo* amb aquesta sonda (B-1 Sp1M) i que no es formaven amb la sonda salvatge (indicats en la figura R.35 amb una fletxa) suggeria que possiblement la mutació havia creat nous llocs de reconeixement per altres factors de transcripció, que no eren objecte del present estudi.

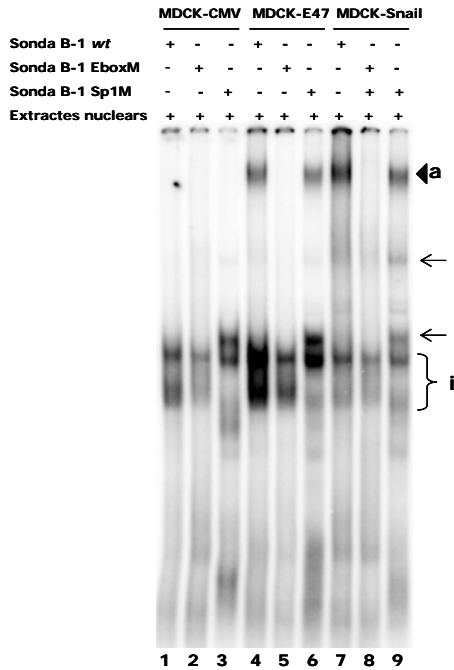


Figura R.35. La regió que conté la caixa E anomenada "B" adjacent a una caixa GC forma un complexe proteïna-DNA específic i diferencial a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no a les cèl·lules MDCK-CMV. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament i es van resoldre electroforèticament. Es van emprar tres sondes: la sonda B-1 wt que conté la caixa E situada a -1125 pb de l'inici de transcripció i una caixa GC, la sonda B-1 Ebox M que té la caixa E mutada i la sonda B-1 Sp1M que té la caixa GC mutada. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior de l'EMSA, subratllant les mutacions. El complexe proteïna-DNA específic i diferencial que es va formar es senyala amb una fletxa negra i s'anomena "a". La resta de complexos formats es van considerar inespecífics (i).

Sonda B-1 wt: GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG
 Sonda B-1 Ebox M: GAGACTCGTIGGTGTGGGGCGG
 Sonda B-1 Sp1M: GAGACTCGCAGGTGTGGIGCI

Per analitzar més detalladament la implicació de la caixa E i les seqüències adjacents en la formació de complexos proteïna-DNA en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail enfront les cèl·lules MDCK-CMV control, es van dissenyar nous oligonucleòtids anomenats B-2 i B-3 que contenien o bé la caixa E o bé la caixa GC, respectivament, tal com s'indica a la figura R.36.

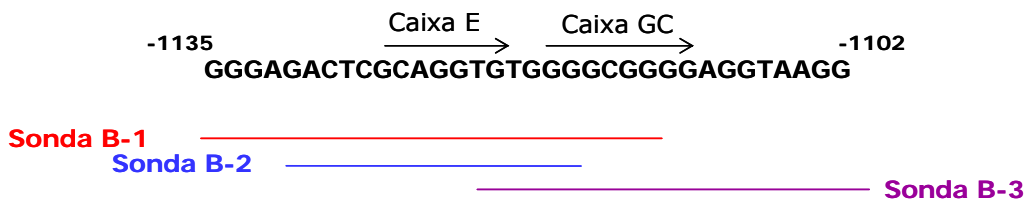


Figura R.36. Sondes emprades en els assajos d'EMSA per l'estudi de la regió del promotor d'Id-1 humà compresa entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció. Representació esquemàtica d'aquesta regió del promotor d'Id-1, indicant els elements reguladors potencials caixa E i caixa GC. La sonda B-1 (vermella) conté la caixa E i la caixa GC. La sonda B-2 (blava) conté la caixa E. La sonda B-3 conté la caixa GC.

Es van incubar aquestes tres sondes marcades radioactivament amb els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail i es va dur a terme un nou assaig d'EMSA. La sonda B-2, que conté la caixa E, formava amb els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail un complexe de major mobilitat electroforètica (complex "a'", figura R.37, carrils 10 i 14, respectivament) que el complex "a" que es formava amb la sonda llarga B-1 (figura R.37, carrils 9 i 13). Aquests resultats tornen a suggerir la implicació de diferents factors de transcripció

en el complexe "a", de manera que la deleció de la caixa GC (sonda B-2) exclouria la unió d'algun(s) factor(s), per la qual cosa disminuiria la massa molecular del complexe "a". Per altra banda, la incubació de la sonda B-3, que conté seqüències riques en GC, amb els extractes nuclears de les mateixes cèl·lules formava un complexe (anomenat "b") de mobilitat electroforètica major que la del complexe "a" en les tres línies cel·lulars però molt menys intens en les cèl·lules MDCK-CMV (carrils 3, 11 i 16). A més a més, el complexe "b" tenia mobilitat similar que un dels que es formava amb una sonda consens per Sp1 (ATTCGATCGGGGCGGGGAGC; carrils 4, 12 i 15), suggerint que hi estaria implicat el factor de transcripció Sp1. Malgrat que la mutació d'aquesta caixa GC no semblava afectar gaire per si sola l'activitat del promotor d'Id-1 segons la transfecció de la figura R.32, els anàlisis d'EMSA suggereixen que aquest potencial lloc d'unió per Sp1 podria participar en l'activació d'Id-1 formant un complexe multiproteic amb el(s) factor(s) de transcripció que s'uneix(en) a la caixa E (donant lloc al complexe "a").

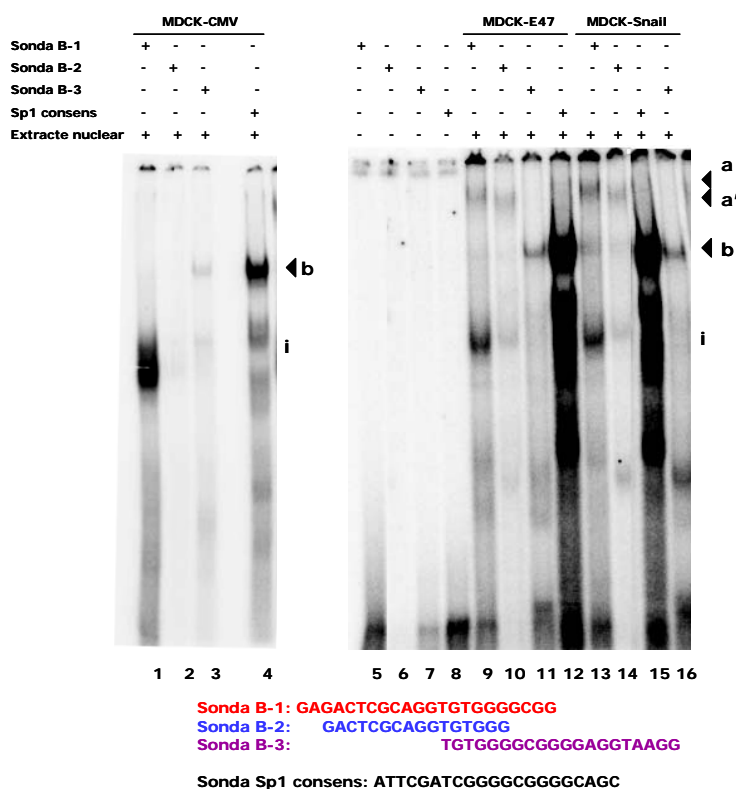


Figura R.37. La regió del promotor d'Id-1 compresa entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció forma diversos complexos proteïna-DNA específics i diferencials a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no a les cèl·lules MDCK-CMV. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb una sonda de doble cadena marcada radioactivament i es van resoldre electroforèticament. Es van emprar quatre sondes: la sonda B-1, la sonda B-2, la sonda B-3 i una sonda consens per Sp1. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior dels EMSAs. Els complexos proteïna-DNA específics i diferencials que es va formar es senyalen amb una fletxa negra. La resta de complexos es consideren inespecífics (i).

A més a més, es van dur a terme assajos de competició entre les tres sondes. Com s'observa a la figura R.38, el complexe proteïna-DNA "a" que es forma amb la sonda B-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail era eficientment competit amb un excés de l'oligonucleòtid B-2, que conté la caixa E, no marcat radioactivament (carrils 2

i 5), mentre que la competició amb l'oligonucleòtid B-3, que inclou els llocs Sp1 intactes, només disminueix parcialment la intensitat del complex "a" (carrils 3 i 6).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que la caixa E anomenada "B" de la regió promotora del gen Id-1 situada en la posició -1125 pb respecte el lloc d'inici de transcripció és crítica per la formació del complex "a", malgrat que l'element Sp1 sembla també contribuir-hi significativament.

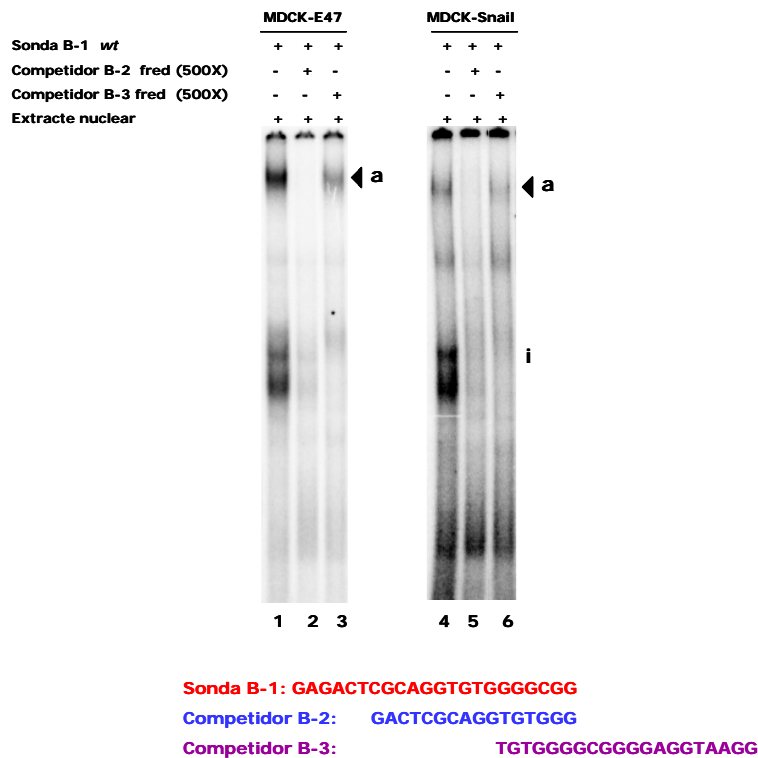


Figura R.38. La caixa E situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció i la caixa GC adjacent participen en la formació d'un multicomplexe. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb la sonda B-1 de doble cadena marcada radioactivament i es van resoldre electroforèticament. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior dels EMSAs. El complex proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra. La resta de complexos es consideren inespecífics (i).

Per analitzar si la proteïna E47 podria unir-se directament a la caixa E "B", es van fer assajos d'EMSA amb la proteïna de fusió GST-E47 i l'oligonucleòtid B-1 marcat radioactivament. Com s'observa a la figura R.39, la proteïna de fusió s'unia a aquesta seqüència del promotor d'Id-1 (carril 5) mentre que no ho feia la proteïna GST (carril 4). La integritat funcional de la proteïna recombinant GST-E47 es va demostrar pel complex format quan s'incubava amb la sonda que conté l'element E-pal del promotor de la cadherina E (carril 1), el qual ja està descrit que uneix E47 (Bolos et al., 2003). Els complexos que es van formar entre la proteïna de fusió i les dues sondes tenien la mateixa mobilitat. És a dir, el factor de transcripció E47 és capaç d'unir-se a la caixa E anomenada "B" del promotor d'Id-1.

No es van poder fer els mateixos assajos amb la proteïna GST-Snail perquè no es disposava d'ella.

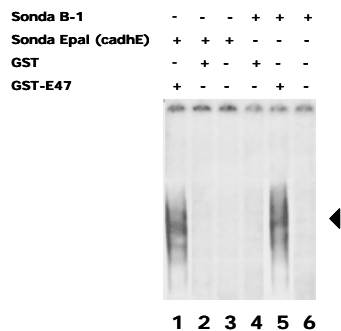


Figura R.39. La proteïna GST-E47 és capaç d'unir-se a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb de l'inici de transcripció. 200 ng de la proteïna GST o de la proteïna recombinant GST-E47 es van incubar amb la sonda B-1 o amb una sonda que conté l'element Epal del promotor de la cadherina E murina marcades radioactivament i es van resoldre electroforèticament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior de l'EMSA. Els complexos proteïna-DNA que es van formar es senyalen amb una fletxa negra.

Sonda B-1: GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG

Sonda Epal: GGGACGCACCTGCAGGTGGCAGCC

Per analitzar la composició proteica dels complexos proteïna-DNA que es formaven en aquesta regió del promotor d'Id-1 i confirmar la presència dels factors de transcripció E47, *Snail* i Sp1, es van incloure en els assajos d'EMSA anticossos policlonals contra aquestes proteïnes, fent servir IgGs com a control d'inespecificitat.

Com s'observa en la figura R.40, la incubació de l'anticòs anti-E47 amb la sonda B-2, que només conté la caixa E, i els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 provocava una disminució de la intensitat del complex "a'" (carril 4) mentre que la presència de les IgGs no específiques no tenia cap efecte (carril 3). A més a més, es formava un altre complex "c" de major mobilitat electroforètica que també era abrogat per la incubació amb l'anticòs anti-E47. Aquests resultats tornen a confirmar que E47 s'uneix a la caixa E d'aquesta regió del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47.

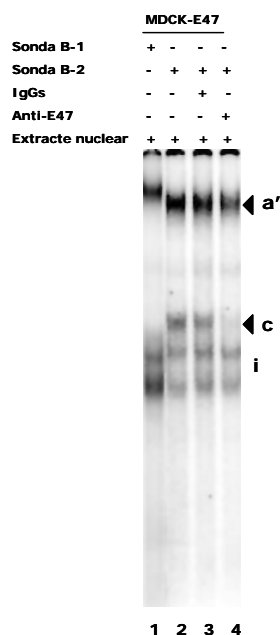


Figura R.40. El factor de transcripció E47 de les cèl·lules MDCK-E47 s'uneix a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 es van incubar amb les sondes B-1 i B-2 de doble cadena marcades radioactivament i amb un anticòs específic contra E47 (4 µg), o amb IgGs (4 µg) inespecífiques. Després de la incubació, la mescla es va resoldre electroforèticament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior de l'EMSA. El complex proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra. La resta de complexos es consideren inespecífics (i).

Sonda B-1: GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG

Sonda B-2: GACTCGCAGGTGTGGG

Paral·lelament, es van dur a terme assajos de superretard amb la sonda B-1 i l'anticòs específic contra la proteïna E47, per acabar de confirmar que el complex "a" de tan baixa mobilitat electroforètica és compost per aquest factor. Com s'observa a la figura R.41, la formació del complex "a" en les cèl·lules MDCK-E47 amb la sonda B1 (carril 1) era disminuïda per l'anticòs anti-E47 (carril 3) mentre que no ocorria amb les IgGs inespecífiques (carril 2). És a dir, la proteïna E47 forma part del complex "a" generat amb els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 i la regió promotora d'Id-1 indicada.

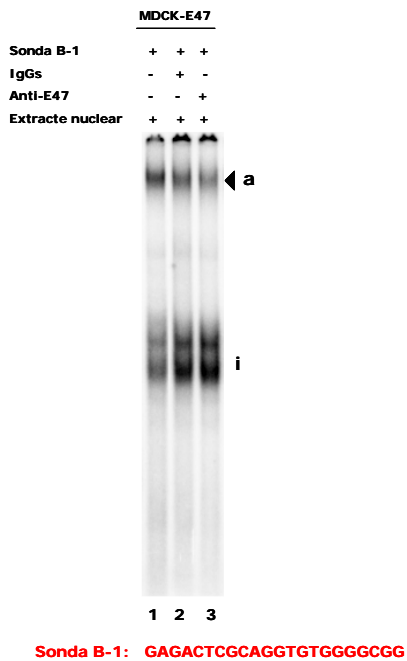


Figura R.41. El factor de transcripció E47 de les cèl·lules MDCK-E47 s'uneix a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 es van incubar amb la sonda B-1 de doble cadena marcada radioactivament i amb un anticòs específic contra E47 (4 µg), o amb IgGs (4 µg) inespecífiques. Després de la incubació, la mescla es va resoldre electroforèticament. La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior de l'EMSA. El complex proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra. La resta de complexos es consideren inespecífics (i).

Per altra banda, es van provar diversos anticossos específics contra *Snail*, comercials i obtinguts per altres laboratoris, però no van donar resultats resolutius.

Per demostrar la participació, directa o indirecta, de *Snail* en la formació d'aquest complex "a", es van incubar els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-Snail i MDCK-Snail siSnail C3 (és a dir, les cèl·lules MDCK-Snail amb *Snail* silenciada per RNA d'interferència) amb la sonda B-1 i es va fer un assaig d'EMSA (figura R.42). Els resultats mostren que el silenciament de *Snail* en les cèl·lules MDCK-Snail impedia la formació del complex "a", situació similar a la de les cèl·lules epitelials MDCK-CMV. Per tant, *Snail* és responsable directament o indirectament de la formació d'aquest complex proteïna-DNA.

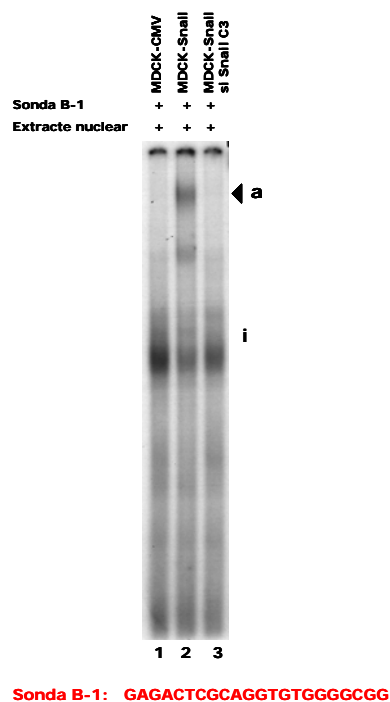


Figura R.42. El silenciament de *Snail* en les cèl·lules MDCK-Snail impedeix la formació del complexe proteïna-DNA a la caixa E situada a -1125 pb de l'inici de transcripció. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-Snail i MDCK-Snail siSnail C3 es van incubar amb la sonda B-1 de doble cadena marcada radioactivament i es van separar electroforèticament. La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior de l'EMSA. El complexe proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

Per determinar la unió de la proteïna Sp1 en la caixa GC situada a -1118 pb de l'inici de transcripció es va emprar la sonda B-3 que conté aquest motiu però no la caixa E. Com es mostra a la figura R.43, l'anticòs contra la proteïna Sp1 feia disminuir la intensitat del complexe "b" que es formava tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les cèl·lules MDCK-Snail (carrils 3 i 7, respectivament). La presència d'aquest anticòs fins i tot afavoria la formació d'un complexe de menor mobilitat electroforètica o superretard atès l'augment de la massa molecular per la unió de l'anticòs (senyalat amb una fletxa blanca) a les cèl·lules que expressen establement E47. Aquests resultats suggereixen que la unió de Sp1 a aquesta caixa GC podria contribuir també en l'activació del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. Per acabar de confirmar que aquest complexe estava format per Sp1, es va competir amb un excés d'oligonucleòtid consens per Sp1 no marcat radioactivament, el qual efectivament anul·lava completament la formació del complexe (carrils 4 i 8).

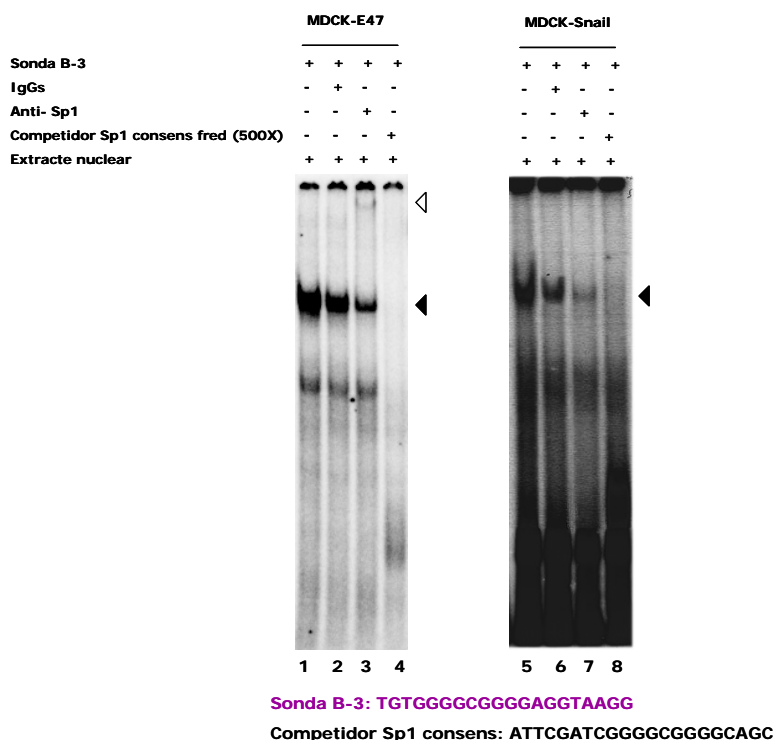
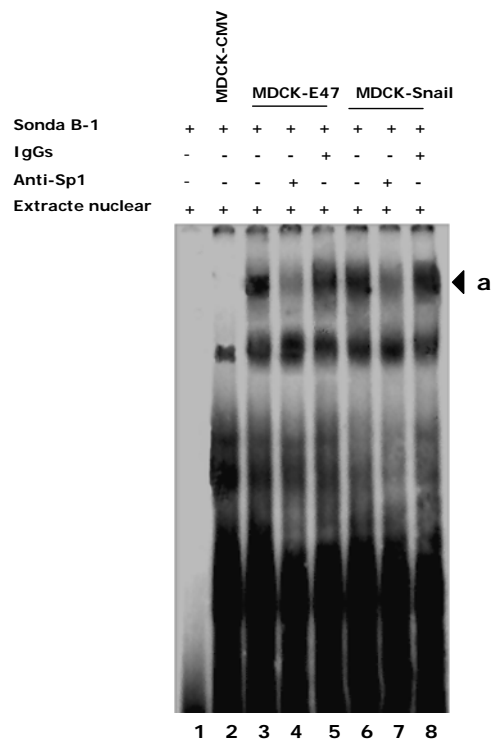


Figura R.43. El factor de transcripció Sp1 s'uneix a la caixa GC del promotor d'Id-1 situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb la sonda B-3 de doble cadena marcada radioactivament i amb un anticòs específic contra Sp1 (4 µg) o amb IgGs (4 µg) inespecífiques. Les competicions es van dur a terme amb un excés molar de 500 vegades de l'oligonucleòtid indicat no marcat radioactivament. Després de la incubació, la mescla es va resoldre electroforèticament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior dels EMSAs. El complex proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra. La banda de superretard s'indica amb una fletxa blanca.

Finalment, per confirmar la participació de la proteïna Sp1 en el complex "a" es va fer un assaig d'EMSA emprant la sonda B-1 i en presència d'un anticòs específic anti-Sp1. Com s'observa en la figura R.44, tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail l'anticòs contra Sp1 interferia en la formació del complex "a" ja que feia disminuir la intensitat de la banda mentre que la IgG inespecífica no l'alterava (carrils 4 i 7, respectivament).

En resum, els resultats indiquen que en l'activació del promotor d'Id-1 estan implicats diferents elements *cis*: per una banda, la caixa E situada a -1256 pb de l'inici de transcripció (caixa "A") que uneix factor(s) de transcripció només present(s) als extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail; per altra banda, i especialment rellevant, la caixa E situada a -1125 pb (caixa "B") que uneix almenys la proteïna E47 en les cèl·lules MDCK-E47 i probablement la proteïna *Snail* en les cèl·lules MDCK-Snail, tot i que de moment aquest darrer no s'ha pogut comprovar directament per manca de bons anticossos. A més a més, s'ha demostrat que també la caixa GC adjacent a aquesta caixa E participa unint Sp1. De fet, tot indica que els factors reclutats per la caixa E formen un complex multiproteic almenys amb Sp1.



Sonda B-1: GAGACTCGCAGGTGTGGGCGG

Figura R.44. El factor de transcripció Sp1 s'uneix a la caixa GC del promotor d'Id-1 situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail formant un multicomplexe. 10 µg d'extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van incubar amb la sonda B-1 de doble cadena marcada radioactivament i amb un anticòs específic contra Sp1 (4 µg) o amb IgGs (4 µg) inespecífiques. Després de la incubació, la mescla es va resoldre electroforèticament. La seqüència de l'oligonucleòtid emprat es mostra a la part inferior de l'EMSA. El complex proteïna-DNA específic que es va formar es senyala amb una fletxa negra.

3.4. Implicació de la via Erk/MAPK en la inducció d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail

La via Erk-MAPK incrementa els nivells de proteïna d'Id-1

Les proteïnes Id van ser inicialment identificades com a reguladors de la diferenciació cel·lular, però s'ha anat veient que també tenen un paper important en la proliferació, la progressió del cicle cel·lular, la senescència, la migració i l'angiogènesi (Benezra et al., 2001; Zebedee and Hara, 2001). Això indica que la seva funció pot ser regulada per múltiples vies moleculars. S'ha descrit que l'activació de la via Raf-Erk/MAPK és essencial per la inducció independent de sèrum d'Id-1 en cèl·lules de càncer de pròstata (Ling et al., 2002).

Atès que les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail tenen la via de senyalització Erk/MAPK molt activada, com ja s'ha demostrat (veure apartat de resultats 2.5), es va analitzar si en aquestes línies cel·lulars la inhibició d'aquesta via de senyalització afectava la producció de la proteïna Id-1. Per assolir aquest objectiu, les cèl·lules en cultiu es van tractar amb l'inhibidor sintètic de les quinases MEK1/2 (PD98059), es van obtenir extractes proteics totals i es van separar electroforèticament en un gel SDS-

PAGE que es va transferir a una membrana. Emprant un anticòs específic contra la proteïna Id-1 es va detectar una reducció dels nivells de proteïna tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail en presència de l'inhibidor PD98059 comparat amb les cèl·lules no tractades (figura R.45). Com a control de càrrega proteica la membrana es va rehibridar amb un anticòs específic contra la tubulina α , l'expressió de la qual no era afectada pel tractament amb l'inhibidor.

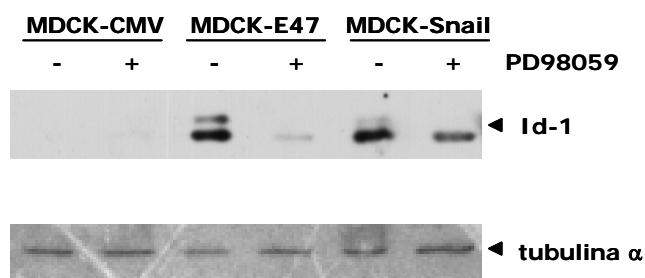


Figura R.45. La via Erk/MAPK regula l'expressió de la proteïna Id-1 en es cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. Les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail prèviament privades de sèrum es van cultivar en medi sense sèrum en presència o absència de l'inhibidor químic de les quinases MEK1/2 PD98059 (50 μ M) durant 5h. 100 μ g d'extractes proteics totals es van resoldre electroforèticament en un gel SDS-PAGE i es van transferir a una membrana de PDVF que es va hibridar amb un anticòs específic contra Id-1 i amb un anticòs específic contra tubulina α com a control de càrrega.

La via Erk/MAPK regula la transcripció d'Id-1

Per comprovar si l'acció de la via Erk/MAPK és a nivell transcripcional, es van tractar les cèl·lules amb l'inhibidor PD98059 i es va mesurar l'activitat del promotor d'Id-1. Com s'observa en la figura R.46, l'activitat de la construcció proId-1370 era reduïda aproximadament un 60% tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail en presència de l'inhibidor, mentre que no era afectada en les cèl·lules MDCK-CMV. És a dir, la via Erk/MAPK participa en l'activació transcripcional d'Id-1.

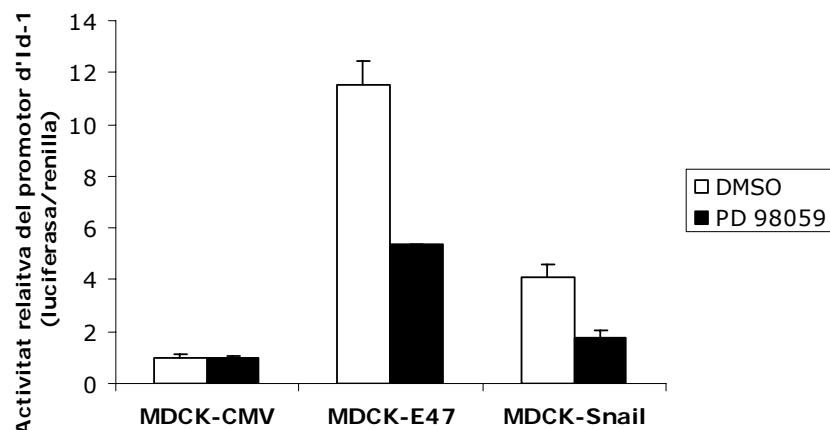


Figura R.46. L'activació del promotor d'Id-1 mediada pels factors E47 i Snail depèn en part de la via Erk/MAPK. Les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van transfectar amb 1 µg de la construcció proId-1170luc i 100 ng del vector pRL-TK i es va mesurar l'activitat luciferasa/renilla 24 h després. Les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor sintètic de les quinases MEK1/2 PD98059 (50 µM) en medi sense sèrum (barres negres) 5 hores abans de recollir-les. L'activitat luciferasa/renilla és relativa a l'obtinguda amb el vector control pGL2-basíic i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

La via Erk/MAPK afavoreix la unió de factors de transcripció a la regió del promotor d'Id-1 compresa entre -1135 i -1102 pb anteriors a l'inici de transcripció

Per explorar si la via Erk/MAPK afavoria la unió proteïna-DNA al promotor d'Id-1, probablement per la fosforilació d'alguns factors de transcripció, es va fer un assaig d'EMSA amb la sonda B-1 marcada radioactivament i extractes nuclears de les cèl·lules tractades prèviament amb l'inhibidor sintètic específic de les quinases MEK 1/2, el PD98059. Com s'observa a la figura R.47A, l'inhibidor PD98059 reduïa la intensitat de la banda corresponent al complex "a" que es formava amb aquesta sonda en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (carrils 4-5 i 6-7, respectivament).

Alguns estudis demostren que la fosforilació de Sp1 per la via Erk/MAPK afavoreix la seva unió al DNA (Milanini-Mongiat et al., 2002), per tant és probable que la disminució del multicomplexe "a" per acció de l'inhibidor PD98059 sigui deguda almenys en part perquè la seva presència impedeix la fosforilació de Sp1. Per això es va dur a terme un assaig d'EMSA amb la sonda B-3, que només conté la caixa GC, marcada radioactivament i extractes nuclears de les cèl·lules tractades prèviament amb l'inhibidor PD98059. Com s'observa a les figures R.47B, l'inhibidor PD98059 reduïa la intensitat de la banda corresponent al complex "b" que es formava amb la sonda B-3 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail (carrils 3-4 i 7-8, respectivament). Pel que fa a les cèl·lules MDCK-CMV, aquest inhibidor no tenia pràcticament cap efecte sobre el complex "b" (carrils 1-2 i 5-6).

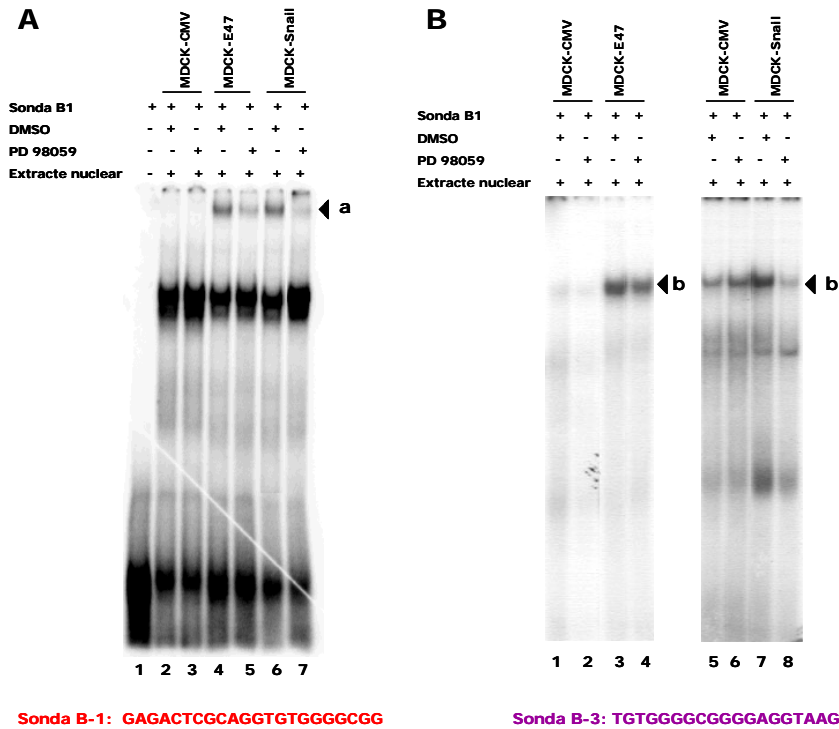


Figura R.47. La via Erk/MAPK afavoreix la unió de factors de transcripció a la regió del promotor d'Id-1 situada entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció. Les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail es van cultivar en medi sense sèrum en presència o absència de l'inhibidor sintètic de les quinases MEK1/2 PD98059 (50 µM) durant 5h. 10 µg d'extractes nuclears es van incubar amb les sondes B-1 (A) o B-3 (B) marcades radioactivament i es van resoldre electroforèticament. La seqüència dels oligonucleòtids emprats es mostra a la part inferior. Els complexos proteïna-DNA específics i diferencials que es van formar es senyalen amb una fletxa negra.

És a dir, la via Erk/MAPK afavoreix la unió de factors de transcripció a la regió del promotor d'Id-1 compresa entre -1135 i -1102 pb, almenys en el cas de Sp1.

La fosforilació de Sp1 per la via Erk/MAPK està implicada en l'activació transcripcional d'Id-1

Per altra banda, es va examinar el paper funcional de la fosforilació de Sp1 per la via Erk/MAPK en l'activació del promotor d'Id-1. Per aquest fi, es van utilitzar les cèl·lules SL2 de *Drosophila* (Schneider, 1972) que no tenen Sp1 endogen i es va analitzar l'activitat de la construcció proId-1370. En aquest sistema, l'expressió exògena de Sp1 estimulava l'activitat transcripcional d'aquesta construcció aproximadament 6,5 vegades respecte l'activitat de les cèl·lules amb el vector buit (sense insert). A més a més, si es cotransfectava juntament amb el cDNA que codifica per una forma constitutivament activa d'Erk2, l'activitat del promotor Id-1 s'incrementava fins a 10 vegades (figura R.48) respecte la de la cotransfecció amb el vector buit. En conjunt, aquests resultats indiquen que l'activació de Sp1 per la via Erk/MAPK estimula el promotor d'Id-1. Per tant, aquest mecanisme podria contribuir presumptament a

l'activació d'Id-1 en altres contextos cel·lulars com les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail en les que la via Erk/MAPK està activada.

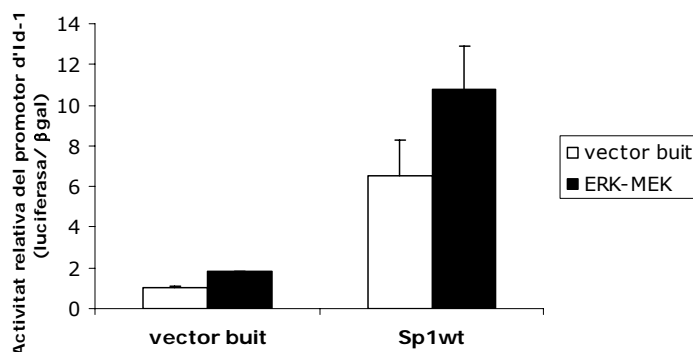


Figura R.48. La via Erk/MAPK activa Sp1, probablement per fosforilació, activant el promotor d'Id-1. Les cèl·lules Schneider (SL2) de *Drosophila melanogaster*, les quals són deficientes en Sp1, es van transfectar amb 2 µg de la construcció proId-1370luc i 200 ng del vector pPac que codifica pel gen LacZ sota el control del promotor de l'actina de *Drosophila*. Quan s'indica es van cotransfectar 2 µg dels vectors d'expressió de Sp1 *wt* i d'una forma constitutivament activa d'Erk (ERK-MEK). La càrrega de DNA es va compensar amb les quantitats corresponents del vector d'expressió buit. L'activitat luciferasa/β-galactosidasa es va mesurar 96 h després de la transfecció i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

3.5. H-Ras activa la transcripció d'Id-1

H-Ras és un efector *upstream* de la via Erk/MAPK per això es va analitzar si podria influenciar la transcripció d'Id-1. Les cèl·lules control MDCK-CMV es van cotransfectar transientment amb un vector d'expressió que codificava per H-Ras constitutivament activat (RasV12) en presència o absència del dominant negatiu de MEK1 (MEK-DN). Es va observar que efectivament l'expressió de RasV12 induïa l'activitat del promotor d'Id-1 aproximadament 6 vegades respecte els controls transfectats amb el vector buit i aquesta estimulació era abrogada per MEK-DN (figura R.49).

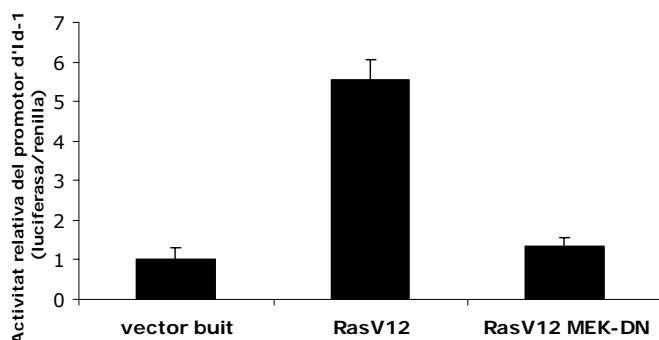


Figura R.49. H-Ras activa la transcripció d'Id-1 via Erk/MAPK. Les cèl·lules MDCK es van transfectar amb 1 µg de la construcció proId-1370, 100 ng del vector pRL-TK i quan s'indica 1 µg dels vectors d'expressió de RasVal12 (forma constitutivament activa de H-Ras) o MEK-DN (dominant negatiu de MEK1). La càrrega de DNA es va compensar amb les quantitats corresponents del vector d'expressió buit. L'activitat luciferasa/renilla es va mesurar 24 h després de la transfecció i representa la mitja (±S.D.) de tres experiments independents.

Aquests resultats indiquen que el promotor d'Id-1 és activat per H-Ras via Erk/MAPK.

DISCUSSIÓ

La transició epiteli-mesènquima (TEM) (Boyer et al., 2000; Hay, 1995; Thiery, 2002) és un procés pel qual les cèl·lules epitelials perden el seu fenotip i n'adopten un de fibroblastoid. Té lloc la ruptura dels contactes cel·lulars, la reorganització del citoesquelet i la pèrdua de la polaritat àpico-basal, fets que afavoreixen la dissociació cel·lular i la motilitat, pròpies de les cèl·lules mesenquimals. A més a més, les cèl·lules que experimenten un procés de TEM deixen d'expressar marcadors epitelials, expressen *de novo* marcadors mesenquimals i adopten els mecanismes necessaris per envair la matriu extracel·lular (MEC) (Boyer et al., 2000; Thiery, 2002). Aquesta conversió és un mecanisme molt important en processos que es donen durant el desenvolupament dels organismes multicel·lulars, tals com la formació del mesoderm i de la cresta neural (Hay, 1995).

El procés de TEM que es dona durant el desenvolupament té un gran paral·lelisme amb algunes etapes de la progressió tumoral. La transformació que implica un creixement descontrolat però manté la diferenciació resulta en tumors benignes o poc invasius. Les característiques específiques de les cèl·lules epitelials, com per exemple l'expressió i funció de la cadherina E, tenen un efecte contrari a la progressió i en aquest sentit se les considera com a supressores de tumors i/o metàstasis (Birchmeier et al., 1993; Christofori and Semb, 1999). Per tant, la progressió tumoral cap a un fenotip maligne requereix la pèrdua del fenotip epitelial i l'adquisició d'un de més fibroblastoid i mesenquimal, és a dir, requereix un procés de TEM (Birchmeier et al., 1996; Boyer et al., 2000; Petersen, 2003; Thiery, 2002). La principal causa de mort dels malalts de càncer és la metàstasi, ja que si bé el tumor primari pot ésser eradicat per cirurgia, quimioteràpia o radioteràpia, les cèl·lules metastàtiques amb freqüència resisteixen els tractaments quimioterapèutics o radioterapèutics, i a més a més poden originar nous focus tumorals fins i tot anys després de l'exèresi quirúrgica. Tenint en compte que més del 90% de tumors humans són carcinomes, és a dir, d'origen epitelial, l'estudi de la TEM pot aportar noves dades per entendre els mecanismes que regulen el procés metastàtic, la qual cosa és molt important per dissenyar noves estratègies terapèutiques per combatre la malaltia o bé afinar en el pronòstic evolutiu d'aquests malalts.

S'ha descrit que el factor de transcripció bHLH E47 i el factor de dits de zinc *Snail* són repressors directes de la cadherina E (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). A més a més, els dos factors són capaços d'induir un procés de TEM complet quan s'expressen en cèl·lules epitelials prototípiques, tals com les cèl·lules MDCK, conferint una alta capacitat migratòria i invasiva en sistemes de cultiu *in vitro* (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001) i en assajos de trasplantament *in vivo* (Peinado et al., 2004a). Per altra banda, existeix una correlació positiva entre l'expressió d'aquests factors de transcripció i les propietats invasives i metastàtiques de

diferents línies cel·lulars de carcinoma i tumors (Blanco et al., 2002; Cano et al., 2000; Cheng et al., 2001; Perez-Moreno et al., 2001; Poser et al., 2001; Sugimachi et al., 2003). Tanmateix no es coneix el mecanisme pel qual E47 i *Snail* indueixen el procés de TEM. És evident que diversos productes de gens implicats en el fenotip epitelial han d'alterar la seva localització intracel·lular, funció i expressió. Moltes d'aquestes alteracions poden ser explicades com events subsidiaris a la repressió de la cadherina E. De fet, algunes línies de treball han evidenciat que la pèrdua de la cadherina E resulta en la pèrdua de la polaritat àpico-basal (Rodríguez-Boulán and Nelson, 1989; Takeichi, 1991). Per contra, estudis previs en queratinòcits han mostrat que el bloqueig de l'expressió de cadherina E per tècniques de cDNA antisentit, malgrat promoure propietats invasives i metastàtiques, no és suficient per induir una TEM completa (Llorens et al., 1998). En aquest sentit, l'expressió exògena de cadherina E no és suficient per revertir el fenotip fibroblastoide de cèl·lules de carcinoma, tals com CarB que expressen *Snail*, cap a un fenotip epitelial (Navarro et al., 1993). Per tant, tot i que les unions intercel·lulars semblen ser dianes primeres en la TEM, altres events cel·lulars, independents de la dissociació cel·lular, contribuirien a la iniciació i completació del procés. Per això, un dels objectius d'aquesta treball ha estat identificar quins són aquests gens per entendre millor el mecanisme molecular que controla les TEMs.

L'estudi dels canvis d'expressió gènica que tenen lloc durant el procés de TEM requereix l'ús d'un model apropiat ben caracteritzat. El nostre model consisteix en la línia cel·lular epitelial prototípica de gos MDCK, que manté *in vitro* les característiques pròpies de les cèl·lules epitelials (estructures d'adhesió, polaritat àpico-basal, etc.), i les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail obtingudes després d'expressar ectòpicament els gens dels factors de transcripció E47 i *Snail* murins, respectivament, a les cèl·lules epitelials MDCK. Aquestes dues línies cel·lulars ja es van caracteritzar en treballs anteriors (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001) i presenten una morfologia totalment fibroblastoide alhora que expressen marcadors mesenquimals, és a dir, que han sofert una TEM.

1. Perfil d'expressió gènica de la TEM induïda per E47 o *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK

La cerca de gens associats al procés de TEM està essent un objectiu molt perseguit en els darrers anys tant en el camp d'investigació sobre desenvolupament com sobre càncer. Per trobar gens candidats s'han utilitzat diferents tècniques, entre les que cal destacar la *PCR-representational difference analysis* (RDA) (Hubank and Schatz, 1994) i els *microarrays* de cDNA (Schena et al., 1995).

A l'inici d'aquest treball ens vam plantejar estudiar les alteracions d'expressió gènica que es produeixen durant el procés de TEM en el nostre sistema cel·lular mitjançant la tècnica *RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction* (RAP-PCR) (Welsh et al., 1992), atès l'origen de les cèl·lules canines i la manca de disponibilitat de *microarrays* de cDNA en aquesta espècie.

La RAP-PCR es basa en una RT-PCR que utilitza encebadors arbitraris. L'antecedent immediat d'aquesta tècnica va ésser l'anomenada AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*) (Welsh and McClelland, 1990), en la que el material de partida era DNA genòmic i per tant permetia la detecció de pèrdues o guanys en el número de còpies d'una seqüència. El resultat és la imatge d'un gel d'electroforesi (amb, almenys, tants carrils com poblacions cel·lulars a comparar) en el que es poden observar diferents bandes de cDNA anònimes, obtingudes a partir de RNA, que mostren un mateix patró per excepte algunes bandes que presenten diferències d'intensitat entre cada població. És el que es coneix com a *fingerprint*.

Cada banda correspon a un cDNA que prové d'un RNA i s'assumeix una relació directa entre la intensitat de la banda i la quantitat del RNA corresponent en la mostra inicial. També pot deduir-se que quant més similars són els patrons de bandes més similars són les poblacions cel·lulars, tot i que cal tenir present que només és un mostreig del RNA existent en aquestes poblacions. Atès que el nostre model de TEM consisteix en la línia epitelial MDCK i dos clons resultants de la transfecció estable d'E47 o *Snail*, era d'esperar que els *fingerprints* obtinguts presentessin l'elevada similitud que s'ha detectat.

La simplicitat i alta sensibilitat de la RAP-PCR així com les baixes quantitats de RNA requerides i la possibilitat d'analitzar seriadament un gran nombre de mostres fan d'ella una tècnica molt útil per buscar gens diferencialment expressats entre distintes poblacions cel·lulars (Dalal et al., 1994; Li et al., 2002; Welsh et al., 1995). Un altre dels avantatges de la RAP-PCR és que els RNAs poc abundants són més fàcilment detectables que mitjançant altres tècniques com la RDA.

Per realitzar l'estudi, es va partir de RNA total, tot i que el RNA ribosòmic (rRNA) representa més del 90% del total de RNA i per tant existeix una elevada probabilitat de l'aparició de bandes de cDNA procedents de rRNA. Existeixen treballs (tesi doctoral de S. Tórtola, 1998) que demostren que no hi ha diferències substancials entre l'ús de RNA total o de RNA missatger (mRNA), la qual cosa s'explicaria pel fet que en la purificació del mRNA mai s'elimina completament la presència de rRNA. Per tant, per estalviar un pas d'extracció bastant elaboriós, es va decidir partir de RNA total.

Per donar per vàlids els resultats obtinguts mitjançant aquestes tècniques és molt important assegurar la reproduïbilitat dels *fingerprints*. Per això, es van realitzar dues extraccions independents de RNA de cada línia cel·lular, i les RAP-PCRs es van fer

un parell de vegades amb cada encebador. Només es van tenir en compte aquells *fingerprints* que es van repetir en aquestes condicions.

Atès que en les extraccions de RNA és comú la contaminació per DNA, un altre requisit indispensable a l'hora d'avaluar els resultats és la comprovació que les bandes no procedeixen de DNA, per la qual cosa en la RT es va incloure una mostra que contenia tots els components de la mescla de reacció excepte la transcriptasa reversa. D'aquesta manera, si en la PCR s'amplificava algun producte, només podria provenir de DNA contaminant ja que el RNA no s'havia retrotranscrit. Per seleccionar les bandes d'interès sempre es van evitar les que tenien el mateix tamany que les que s'obtenien en la mostra sense transcriptasa reversa.

Per altra banda, els resultats demostren que ni la concentració de RNA en la RT ni la concentració de cDNA en la PCR afecten els *fingerprints* en un marge de concentracions de 2,5-10 ng/ μ L de RNA i 0,05-2 ng/ μ L de cDNA.

En la literatura s'han descrit gens l'expressió dels quals està influenciada per la densitat cel·lular en cultiu (Akao et al., 2003; Pocsik et al., 1994), i per això a l'hora de recollir les cèl·lules per extreure el RNA es va fer en dues condicions: a baixa confluència (LD) i a alta confluència (HD). Els resultats indiquen, però, que concretament l'expressió dels gens que nosaltres vam trobar diferencialment expressats no depèn de la confluència cel·lular.

Així doncs, la RAP-PCR és una tècnica precisa, sensible i reproduïble en un ampli espectre de circumstàncies. El nombre total de bandes detectades amb una intensitat o presència diferent entre les tres línies cel·lulars del nostre model de TEM mitjançant RAP-PCR utilitzant els encebadors indicats va ser 35. Atès les característiques de les línies cel·lulars, aquests resultats suggereixen que els gens corresponents a aquests cDNAs podrien estar implicats en la TEM induïda per E47 i *Snail* en cèl·lules epitelials.

Una altra tècnica d'estudi de l'expressió gènica són els *microarrays* de cDNA (Schena et al., 1995), que permet determinar l'expressió de mils de gens coneguts simultàniament (Schena et al., 1996). Com ja s'ha comentat, quan es va iniciar aquesta tesi, es va descartar l'estudi de l'expressió gènica mitjançant *microarrays* per manca de xips de cDNA en l'espècie canina, que és l'origen del nostre model de TEM. Tanmateix, els resultats de l'anàlisi per RAP-PCR van mostrar que existia una elevada homologia entre el genoma caní i humà, ja que a l'hora d'identificar les bandes de les RAP-PCRs que presentaven diferències d'intensitat mitjançant la comparació de les seves seqüències amb les de les bases de dades del GenBank tenien una elevada homologia amb les seqüències humanes. Per altra banda, el treball de Kirkness (Kirkness et al., 2003) demostra que existeix una elevada homologia (>90%) del genoma de gos amb l'humà, particularment en la regió codificant i en les seqüències reguladores. Per això es

va decidir ampliar l'estudi d'expressió diferencial per *microarrays* amb un xip de cDNAs humans, la qual cosa es va fer en col·laboració amb el laboratori del Dr. José Palacios del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid) i la Dra. A. Cano de l'Institut de Investigaciones de Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM (IIB, Madrid). Es va emprar l'Oncochip, que contenia aproximadament 6.000 cDNAs, incloent gens i ESTs humans implicats en diverses funcions. D'aquesta manera es van trobar 57 gens diferencialment expressats.

Tant la tècnica de la RAP-PCR com de *microarrays* de cDNA poden donar resultats artefactuals per la qual cosa s'han de validar amb tècniques alternatives, com el *Northern blot* o la RT-PCR semiquantitativa. Els gens que més ens interessaven per la seva funció i relació amb la TEM van ser comprovats i es van confirmar les diferències d'expressió detectades de tots ells excepte la infraexpressió de TFPI-2 a les cèl·lules MDCK-E47 respecte les cèl·lules MDCK-CMV. Això suggereix que les condicions de treball de les dues tècniques són molt acurades i precises.

Analitzant els gens diferencialment expressats a les cèl·lules MDCK-E47 respecte les MDCK-CMV s'observa que hi ha més guanys d'expressió que pèrdues. En canvi, analitzant els gens diferencialment expressats a les cèl·lules MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV, segons les RAP-PCRs la proporció de guanys i pèrdues d'expressió és idèntica mentre que segons els *microarrays* de cDNA es donen més pèrdues que guanys. Atès que el nombre de gens trobats diferencialment expressats mitjançant *microarrays* és major que el trobat per RAP-PCR, és més probable que els percentatges calculats a partir dels resultats obtinguts per aquesta tècnica s'acostin més a la realitat.

Si es comparen els gens diferencialment expressats a les tres línies cel·lulars per tal de trobar gens comuns i gens específics de les TEMs induïdes per E47 o *Snail*, s'observa que segons els resultats de les RAP-PCRs, el 65% dels gens trobats presenten l'expressió diferencial tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV; en canvi segons els *microarrays*, els gens regulats de forma similar per E47 i *Snail* són un 33% (figura D.1). Per altra banda, els que s'expressen diferencialment només a les cèl·lules MDCK-E47 respecte les cèl·lules MDCK-CMV representen un 12% dels gens trobats per RAP-PCR i un 27% dels gens trobats per *microarrays*. De la mateixa manera, els gens que s'expressen diferencialment només a les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV representen un 24% dels gens trobats per RAP-PCR i un 40% dels gens trobats per *microarrays* (figura D.1). De nou tornen a trobar-se diferències segons la tècnica emprada, però el que és evident és que les TEMs induïdes per E47 o *Snail* a les cèl·lules MDCK comparteixen mecanismes

d'acció i regulació comuns, i, per altra banda, que la transfecció estable de *Snail* a les cèl·lules MDCK provoca molts més canvis d'expressió que la transfecció estable d'E47.

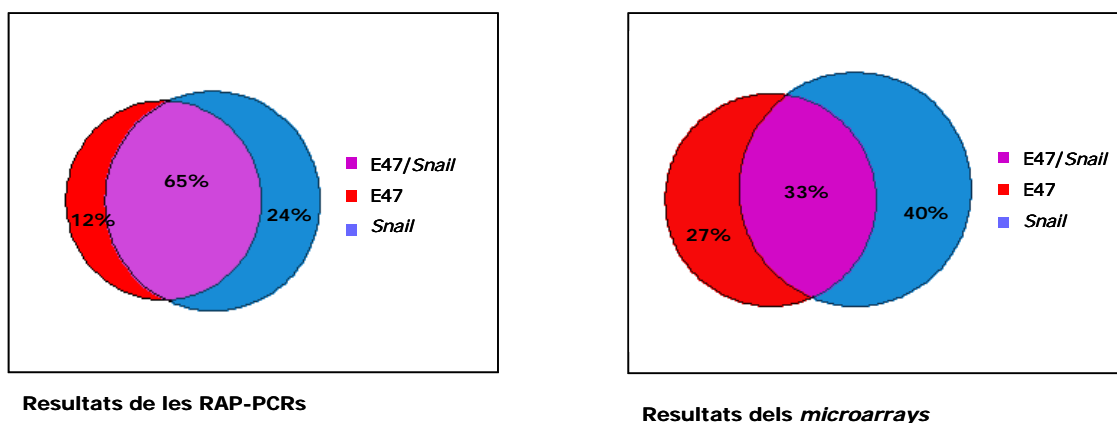


Figura D.1. Comparació dels resultats obtinguts per RAP-PCR i per *microarrays* de cDNA sobre l'expressió diferencial durant la TEM induïda per E47 i *Snail*. Diagrames de les bandes amb diferències d'intensitat trobades per RAP-PCR (esquerra) o dels gens diferencialment expressats trobats per *microarrays* (dreta) en el nostre model de TEM segons si estan regulats tant per E47 com per *Snail*, o només per un dels factors de transcripció.

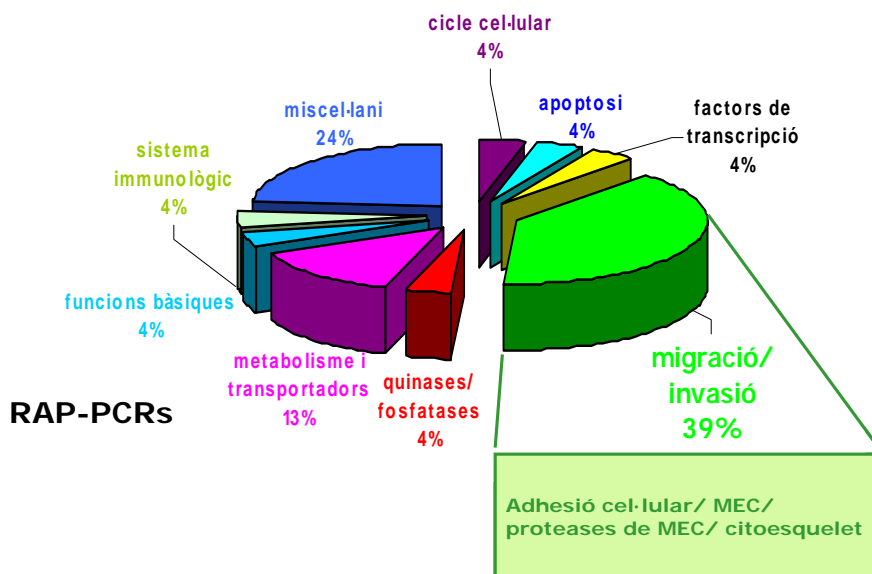
Un anàlisi més detallat dels resultats mostra que dels gens diferencialment expressats comuns a les cèl·lules MDCK-E47 i a les MDCK-Snail respecte les cèl·lules control aproximadament la meitat estan sobreexpressats i la meitat infraexpressats, amb una lleugera tendència cap a pèrdues d'expressió. Pel que fa als gens diferencialment expressats a les cèl·lules MDCK-E47 respecte les cèl·lules control gairebé el 100% estan sobreexpressats, la qual cosa estaria d'acord amb el paper d'E47 com a activador transcripcional de molts gens, per exemple dels específics de les cèl·lules B (Henthorn et al., 1991; Massari and Murre, 2000), malgrat que també s'han descrit casos en què actua com a repressor transcripcional, com és el cas de la cadherina E (Perez-Moreno et al., 2001). Respecte als gens diferencialment expressats a les cèl·lules MDCK-Snail en comparació a les cèl·lules MDCK-CMV, tornem a trobar divergències entre els resultats mitjançant RAP-PCR i *microarrays*. Segons els resultats de les RAP-PCRs *Snail* està associat a més guanys d'expressió que a pèrdues durant la TEM, mentre que els resultats dels xips indiquen el contrari. Atès el paper repressor que sempre s'ha atribuït a *Snail* i que el nombre de gens trobats per *microarrays* és major que el trobat per RAP-PCR, sembla més probable que en la inducció de TEM *Snail* s'associï més a pèrdues d'expressió que a guanys. No cal oblidar que molts dels canvis d'expressió dels gens trobats no es deuen a la unió directa d'E47 i *Snail* als seus promotors sinó que són conseqüència indirecta de la seva expressió constitutiva. Per tant, amb aquestes dades és difícil concloure que aquests factors actuen principalment com a repressors o com a activadors; per això preferim parlar d'associació a pèrdues o

guanys d'expressió. Caldria estudiar el mecanisme de regulació de cadascun dels gens trobats diferencialment expressats.

Les diferències que es troben en els resultats obtinguts per RAP-PCR o per *microarrays* de cDNA es deu a la diferent robustesa de les dues tècniques. No cal oblidar que els gens diferencialment expressats detectats per RAP-PCR es troben de forma totalment aleatòria. En canvi, els gens diferencialment expressats trobats per *microarrays* formen part del repertori de cDNAs inclosos en els xips, de manera que la cerca és més dirigida.

Així bé, en conjunt els resultats suggereixen que l'expressió estable d'E47 i *Snail* en les cèl·lules MDCK, tot i que en ambdós casos indueix un procés de TEM amb fenotips similars, està associada a la posada en marxa de programes genètics redundants i específics, donant suport a un paper diferencial per ambdós factors de transcripció en la TEM, ja sigui durant el desenvolupament o durant la progressió tumoral. De fet, les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail presenten diferències importants en el seu comportament, concretament en la capacitat invasiva, migratòria i proliferativa (Peinado et al., 2004a; Perez-Moreno et al., 2001).

Si es comparen els gens diferencialment expressats que es van trobar mitjançant RAP-PCR i *microarrays* s'observa que codifiquen per molècules amb funcions molt variades, com adhesió cel·lular, citoesquelet, MEC, apoptosi, metabolisme, cicle cel·lular, entre d'altres. De fet, aquests resultats no són sorprenents en el context en què treballem ja que durant el procés de TEM té lloc un canvi fenotípic molt dràstic de manera que les cèl·lules epitelials esdevenen mesenquimals i es dona una conversió que afecta a tots els nivells cel·lulars. Com s'observa a la figura D.2, els percentatges dels gens trobats segons la seva funció és molt similar en les RAP-PCRs i en els *microarrays*.



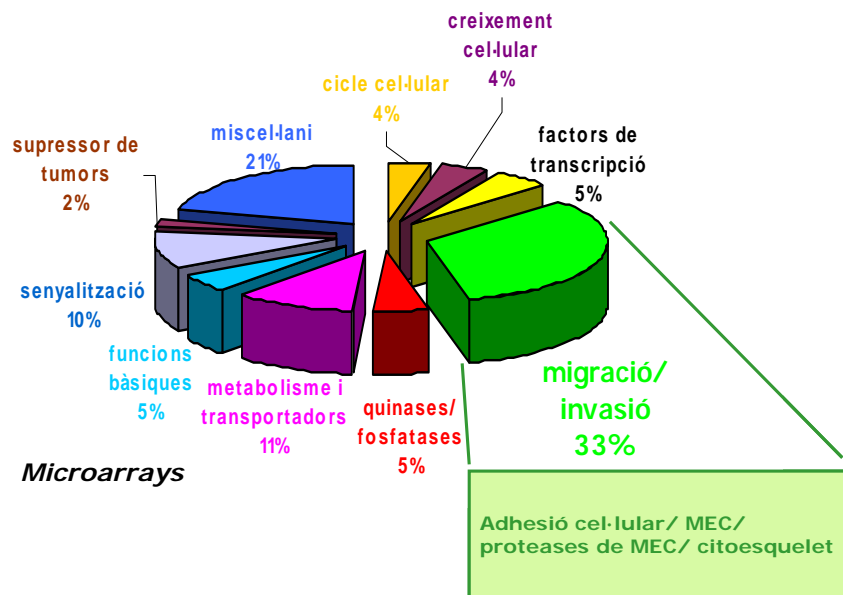


Figura D.2. Classificació segons les funcions dels gens trobats diferencialment expressats en la TEM induïda per E47 i *Snail* en les cèl·lules MDCK, mitjançant RAP-PCRs (dalt) o *microarrays* (baix).

El fet que cap dels gens trobats mitjançant les dues tècniques coincideixin es pot explicar per diverses raons. Per una banda, no cal oblidar que el *fingerprint* obtingut per RAP-PCR amb cada encebador és un mostreig de la població total de RNA de cada línia cel·lular, i per altra banda, cal tenir en compte que els cDNAs de l'Oncochip no representen tots els gens del genoma humà. De fet, la majoria dels gens que es van trobar per RAP-PCR no estan inclosos en el xip. A més a més, tot i que l'homologia entre el genoma de gos i humà és molt elevada, si els cDNAs humans del xip corresponen a regions poc conservades no hibridaran amb el genoma caní. És a dir, la RAP-PCR i els *microarrays* no s'han de considerar dues tècniques alternatives per confirmar uns mateixos resultats, sinó com a dues tècniques complementàries que es van emprar per tenir un repertori més ampli de gens implicats en les TEMs induïdes per E47 i *Snail*.

2. Gens associats a la TEM induïda per E47 o *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK

En conjunt, els resultats generats de l'anàlisi de l'expressió diferencial mitjançant la RAP-PCR i els *microarrays* i els obtinguts al llarg de la tesi van permetre identificar un programa de gens altament coordinat i vies de senyalització implicats en el procés de TEM induït per E47 i *Snail*, una manifestació de la plasticitat de la cèl·lula epitelial.

Gens associats a invasió

Nosaltres ens hem interessat especialment en els canvis d'expressió detectats en gens associats a invasió, és a dir, gens que codifiquen per proteïnes d'adhesió cèl·lula-cèl·lula i d'adhesió cèl·lula-MEC, per proteïnes de citoesquelet, per proteïnes de MEC i per proteïnes que participen en la degradació dels components de la MEC (proteases). Aquestes proteïnes directament podrien contribuir a l'adopció d'un fenotip migratori i invasiu, necessari perquè es donin les TEMs i la progressió tumoral. Això explica que en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail la seva expressió estigui alterada respecte la de les cèl·lules epitelials MDCK. Aquests gens representen un 33-39% dels gens diferencialment expressats trobats tant per RAP-PCR com per *microarrays* de cDNA. A més a més, la majoria d'ells estan diferencialment expressats tant a les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail respecte les cèl·lules control, la qual cosa indica que són gens implicats en les TEMs induïdes per ambdós factors de transcripció. Aquests resultats suggereixen que E47 i *Snail* modifiquen l'expressió de gens comuns associats a migració/invasió.

A continuació, es discuteix i es raona cadascun dels canvis en l'expressió de gens d'aquesta categoria funcional i com aquests canvis poden contribuir al fenotip migratori i invasiu de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail.

En primer lloc ens referirem a la desestabilització de l'arquitectura dels epitelis, mantinguda per nombroses estructures d'adhesió cèl·lula-cèl·lula que durant el procés de TEM es perden, com són les unions adherents (AJs) i els desmosomes.

El primer dels fets a senyalar és la pèrdua de l'expressió de la **cadherina E**, la molècula d'adhesió que participa en l'establiment de les AJs. En aquest sentit, la troballa és confirmativa del que calia detectar, atès que, com ja s'ha dit, els factors de transcripció E47 i *Snail* en són repressors directes (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). En el present estudi, però, no tenim prou eines per atribuir-li la responsabilitat de tots els canvis fenotípics associats al procés de TEM, però en tot cas podem afirmar que molts d'ells són conseqüència de la pèrdua de les funcions que aquesta molècula proporciona a la cèl·lula epitelial, en termes d'estabilitat i manteniment de l'arquitectura tissular entre d'altres. Per altra banda, la pèrdua de l'expressió de la cadherina E està molt ben documentada en els processos de TEM (Thiery, 2002) i en la majoria dels carcinomes invasius (Birchmeier et al., 1993; Christofori and Semb, 1999; Takeichi, 1993).

A més a més de la pèrdua de l'expressió i funcions de la cadherina E, la pèrdua de l'organització epitelial de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail pot trobar-se afavorida per l'expressió reduïda d'altres molècules d'adhesió intercel·lular característiques dels epitelis, com és el cas de la **desmocolina 2**. La desmocolina 2 és

un membre de la superfamília de les cadherines localitzada als desmosomes (Greenwood et al., 1997). Així com la cadherina E, la desmocolina 2 també desenvolupa una funció antiinvasiva, de manera que la sobreexpressió d'aquesta molècula suprimeix la capacitat invasiva en cèl·lules de carcinoma escamós (De Bruin et al., 1999).

Un altre gen relacionat amb l'adhesió intercel·lular que es troba infraexpressat en les cèl·lules MDCK-Snail és el gen de la **desmoplaquina** (DP), que codifica per dos productes d'*splicing* alternatiu: DPI i DPII (Virata et al., 1992). Les desmoplaquines són cadherines desmosomals necessàries per mantenir les adhesions cèl·lula-cèl·lula i l'arquitectura del citoesquelet (Vasioukhin et al., 2001).

També es va trobar infraexpressat en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV el gen de **JAM1** (*junction adhesion molecule 1*). JAM1 forma part de les unions oclusives o *tight junctions*, les quals són estructures d'adhesió importants en la determinació àpico-basal pròpia de les cèl·lules epitelials (Liu et al., 2000). També està descrit que altres components de les unions oclusives, concretament les ocludines i les claudines, són reprimits directament per la unió de *Snail* a diferents caixes E del promotor (Ikenouchi et al., 2003).

Aquests resultats indiquen que en la inducció del procés de TEM E47 i *Snail*, directament o indirectament, reprimeixen l'expressió de diferents grups d'importants molècules d'adhesió intercel·lular característiques del fenotip epitelial.

Altres gens que hem trobat diferencialment expressats a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV són aquells que medien l'adhesió de les cèl·lules als diferents components de la MEC. Això no és sorprenent atès que durant la TEM les cèl·lules es dissocien les unes de les altres però també perden el seu ancoratge sobre la MEC per facilitar la migració. En aquest sentit i donant suport a la resta de troballes que fan referència a l'adopció d'un fenotip mesenquimal, les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail modifiquen l'expressió d'integrines, una família extensa de proteïnes transmembrana compostes per dues subunitats, una α (α 1-18) i una β (β 1-8) que poden associar-se en nombroses combinacions diferents i defineixen l'especificitat per l'adhesió cel·lular a les proteïnes de la MEC incloent la fibronectina, la vitronectina o els col·làgens (Hynes, 2002). De fet, les integrines sovint estan desregulades en neoplàsies (Parise et al., 2000). En l'anàlisi mitjançant *microarrays* de cDNA es va trobar que les cèl·lules MDCK-E47 tenen augmentada respecte les cèl·lules MDCK-CMV l'expressió de la **integrina α_7** . Concretament, $\alpha_7\beta_1$ és un dels principals receptors de la laminina-1 en cèl·lules musculars (Collo et al., 1993; Ziober et al., 1993), tot i que també s'expressa en cèl·lules de melanoma (Kramer et al., 1989) o de glioblastoma (Echtermeyer et al., 1996). S'ha descrit que aquesta integrina regula la migració cel·lular (Echtermeyer et al., 1996; Mielenz et al., 2001; Yao et al., 1996). Per altra banda, les cèl·lules MDCK-Snail expressen elevats nivells de la **integrina β_1** , que sol trobar-se sobreexpressada en

carcinomes invasius (Berry et al., 2003; Brockbank et al., 2005). Aquest és el cas de $\alpha_5\beta_1$, el receptor de la fibronectina, l'expressió del qual augmenta en la progressió de carcinomes escamosos, alhora que les cèl·lules adopten un fenotip mesenquimal (Gomez and Cano, 1995). En canvi, les cèl·lules MDCK-Snail tenen reduïda l'expressió de la **integrina** α_6 , la qual cosa està d'acord amb el fet que $\alpha_6\beta_4$ és una integrina característica de les cèl·lules epitelials (Tamura et al., 1990). Aquestes diferències entre les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail en quant a l'expressió d'integrines podrien explicar en part les diferències en el seu comportament migratori i invasiu.

Un aspecte important de la contribució de les integrines al fenotip invasiu i migratori esdevé del fet que les integrines participen activament en la senyalització cap el nucli (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Atès que els seus dominis citoplasmàtics no tenen activitat enzimàtica, transdueixen els senyals associant-se a proteïnes adaptadores que les connecten al citoesquelet (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996), a quinases citoplasmàtiques tals com FAK (Chen et al., 1995) o membres de la família Src (Wary et al., 1996), o a receptors de factors de creixement tals com PDGF (Schneller et al., 1997) o VEGF (Soldi et al., 1999). D'aquesta manera es poden activar diverses vies de senyalització com la via Erk/MAPK, JNK/MAPK o PI3K (Chen et al., 1996; Miyamoto et al., 1995), que acaben regulant la morfologia cel·lular, el cicle cel·lular o la supervivència cel·lular (Giancotti and Ruoslahti, 1999).

Pel que fa a senyalització en relació a les integrines, volem destacar una troballa important: les cèl·lules MDCK-Snail presenten l'expressió de la **caveolina-2** reduïda respecte les cèl·lules MDCK-CMV. De fet es coneix poc sobre el paper d'aquesta proteïna, però atès la seva homologia amb la caveolina-1 podrien desenvolupar funcions similars relacionades amb el fet que algunes integrines s'associen a proteïnes situades en les invaginacions de membrana anomenades caveoles. Aquestes són un tipus de microdominis lipídics de membrana o *lipid rafts* (on s'hi localitzen Rho i Rac precisament (Michaely et al., 1999)) rics en colesterol, esfingolípids i a més a més unes proteïnes anomenades caveolines o flotilines (Brown and London, 1998; Galbiati et al., 2001). Les caveoles estan implicades en el tràfic de vesícules, endocitosi, transport de lípids i sobretot en senyalització intracel·lular (Anderson, 1998). En conseqüència, els canvis en l'expressió de les caveolines podria tenir implicacions en la senyalització intracel·lular. En el cas de les integrines, s'ha descrit una regulació positiva de senyals per caveolina-1, incloent l'activació de la via Ras/Erk (Wary et al., 1998; Wei et al., 1999). Contràriament, altres autors com Lisanti i Anderson han descrit que la caveolina-1 inhibeix les senyals mediades per Ras i en aquest sentit han suposat que actua com a supressor de tumors (Furuchi and Anderson, 1998; Galbiati et al., 1998). La reducció en l'expressió de la caveolina-2 que hem detectat a les cèl·lules MDCK-Snail va en la direcció del que han descrit alguns autors indicant que l'expressió de caveolina està reduïda en tumors invasius (Koleske et

al., 1995), i, contràriament, que la sobreexpressió de caveolina redueix els nivells d'Erk activats i la proliferació cel·lular (Engelman et al., 1997; Lee et al., 1998).

L'associació i dissociació de les unions cel·lulars durant la TEM, a més a més, van acompanyades d'una dramàtica reorganització del citoesquelet que promou canvis en la morfologia i la motilitat cel·lulars. Algunes estructures d'actina, com la xarxa subcortical de les cèl·lules epitelials, es dissocien. Al mateix temps, altres estructures d'actina, associades a extensions del citoplasma, com els filopodis i els lamelipodis, i a la inducció de la motilitat es formen en un procés dinàmic (Jamora and Fuchs, 2002). En aquest sentit, es va trobar diferencialment expressada **pleckstrin 2** (*platelet and leukocyte C kinase substrate protein 2*), que és una proteïna de membrana que intervé en la reorganització de l'actina (Hu et al., 1999). Concretament, està infraexpressada en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV.

Però no només hi ha una remodelació del citoesquelet d'actina sinó també dels microtúbuls i dels filaments intermedis (FI). Els microtúbuls no semblen participar directament en l'adhesió intercel·lular però sí són necessaris per mantenir les AJs (Ojakian et al., 1997). El mecanisme de connexió entre els microtúbuls i les AJs no es coneix però probablement sigui a través de catenina β i APC (*adenomatous polyposis coli*) (Munemitsu et al., 1994). **MAP1B** (*microtubule-associated protein 1B*), una proteïna associada als microtúbuls, va ésser trobada sobreexpressada en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV, la qual cosa estaria d'acord amb el seu paper promigratori. De fet, és important en la morfogènesi neuronal de manera que els ratolins nuls pel gen de MAP1B presenten anomalies en l'arquitectura cerebral i un retard en la migració (Teng et al., 2001).

Els FI, formats per queratines, participen directament en la resistència mecànica de les estructures epitelials a través dels desmosomes (Jamora and Fuchs, 2002). Les queratines són altament regulades durant la TEM. Només les cèl·lules epitelials expressen queratines, les quals es classifiquen en dos grups: tipus I o àcides i tipus II o bàsiques. Almenys un membre de cada classe és essencial per la formació dels FI (Eichner et al., 1986; Hatzfeld and Franke, 1985). Les cèl·lules de l'epiteli simple expressen normalment la K8 de tipus II i la K18 de tipus I, però en alguns casos, a més a més, expressen la K7 de tipus II i la K19 de tipus I. D'acord amb això, en el nostre anàlisi d'expressió diferencial es va trobar que les **queratines 7 i 19** estan infraexpressades en les cèl·lules mesenquimals MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les epitelials MDCK-CMV.

Per últim, ens referirem als canvis en l'expressió de gens que codifiquen pels diferents components de la MEC. Les cèl·lules epitelials en condicions fisiològiques estan immerses en la MEC, formada per col·làgens, laminines, glicoproteïnes i proteoglicans, juntament amb altres components minoritaris com tenascina i fibronectina (Egeblad and

Werb, 2002), la majoria dels quals són sintetitzats i dipositats per les mateixes cèl·lules. En aquest sentit, és lògic suposar que en situacions patològiques la composició de la MEC estigui alterada i en conseqüència afecti les funcions de control de la proliferació i diferenciació cel·lular que exerceix en situació normal. S'ha descrit una elevada producció de col·làgens, proteoglicans i fibronectina durant la progressió tumoral (Ban et al., 2002; Brenner et al., 2000). En aquest sentit, segons els resultats dels *microarrays*, les cèl·lules mesenquimals MDCK-E47 i MDCK-Snail expressen alts nivells de **col·lagen I $\alpha 2$** . A més a més, les cèl·lules MDCK-Snail tenen augmentada l'expressió del **col·lagen III $\alpha 1$** i les cèl·lules MDCK-E47 sobreexpressen **versicà**, un proteoglicà condroitin sulfat que regula el fenotip cel·lular (Kinsella et al., 2004). La sobreexpressió de versicà en la MEC juga un paper important en l'adhesió, la migració i la progressió tumoral afavorint-los (Wight, 2002). De fet, és produït per moltes cèl·lules tumorals (Touab et al., 2002; Zheng et al., 2004).

També s'han trobat sobreexpressats gens que codifiquen per molècules que modifiquen la MEC per proteòlisi dels seus components, com **BMP-1** (*bone morphogenetic protein 1*), que és una metal·loproteasa que intervé en la formació de la MEC tallant els propèptids COOH dels procol·làgens I, II i III (Kessler et al., 1996). També està implicada en la diferenciació cel·lular i en el desenvolupament mitjançant l'activació de factors de creixement latents de la superfamília TGF- β (Sarras, 1996).

Un altre dels gens trobats diferencialment expressat en la TEM induïda per E47 i *Snail* és SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*), la regulació i funcions del qual són objecte d'estudi en el nostre laboratori (E.Valero, tesi doctoral en preparació). SPARC, també conegut com a osteonectina i BM-90 (Lane and Sage, 1994; Sage, 1997; Yan and Sage, 1999), és una proteïna matricel·lular que pot facilitar l'adopció de canvis morfològics i fenotips migratoris a les cèl·lules epitelials. Això és degut a la seva funció antiadhesiva, ja que abroga les adhesions focals i s'uneix a proteïnes estructurals com col·làgens i vitronectina (Brekken and Sage, 2000; Brekken and Sage, 2001), modificant les interaccions de les cèl·lules amb la MEC. A més a més, SPARC pot modular l'eficàcia de factors de creixement (tals com PDGF o VEGF) o afectar l'expressió/activació de MMPs (com MMP-2) (Brekken and Sage, 2001; Shankavaram et al., 1997). Tot això dóna suport a la idea que SPARC regula les interaccions cel·lulars amb la MEC durant el desenvolupament i en la progressió tumoral (Bradshaw and Sage, 2001). De fet, SPARC sovint s'ha associat a tumors metastàtics (Brekken and Sage, 2000) i s'ha proposat com un marcador diagnòstic de meningiomes invasius (Rempel et al., 1999) i pronòstic en melanomes (Ledda et al., 1996).

D'altra banda, volem senyalar que les troballes en l'expressió diferencial de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail envers el control MDCK-CMV pel que fa a proteases de la MEC i inhibidors d'aquestes, reflexen l'adopció d'un fenotip invasiu. Les cèl·lules que

inicien un procés d'invasió sintetitzen proteases que degraden els components de la MEC. Per tant, és evident que la cèl·lula que ha sofert una TEM expressarà molècules de degradació de la MEC i deixarà d'expressar els seus inhibidors. Això és el que s'ha trobat en el nostre anàlisi d'expressió diferencial. Les cèl·lules mesenquimals MDCK-E47 i MDCK-Snail expressen les metal·loproteases **MMP-9** i **MMP-3**. De fet, nombrosos estudis han demostrat l'activació de metal·loproteases de matriu (MMPs) durant el desenvolupament (Vu and Werb, 2000) i la progressió tumoral (Kim et al., 1998; Noe et al., 2001). Per altra banda, les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail expressen nivells més baixos respecte les cèl·lules control de l'inhibidor de metal·loproteases **TIMP-3**. TIMP-3 forma part de la família de TIMPs que poden bloquejar l'activitat de les MMPs i per tant són importants inhibidors de la progressió tumoral (Gomez et al., 1997). A més a més, les cèl·lules MDCK-Snail també presenten infraexpressat inhibidor **TFPI-2** (*tissue factor pathway inhibitor-2*). TFPI-2 és una glicoproteïna associada a la MEC que inhibeix serina proteases; la seva expressió és molt baixa o nul·la durant la progressió tumoral de gliomes humans i juga un paper important reduint el comportament invasiu de melanomes amelanòtics humans (Konduri et al., 2000). Tanmateix, els inhibidors de proteases **TIMP-1** i **PAI-1** (*plasminogen activator inhibitor type 1*) s'han trobat sobreexpressats en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, però de fet hi ha molts treballs que evidencien el paper controvertit d'alguns inhibidors de proteases (Jiang et al., 2002). De fet, la sobreexpressió de TIMPs ha estat demostrada en diferents tumors. Concretament l'expressió elevada de TIMP-1 s'ha associat a mal pronòstic en càncer colorrectal (Zeng et al., 1995), de mama (Yoshiji et al., 1996) o gàstric (Joo et al., 2000), entre d'altres. Hi ha dos possibles escenaris per entendre aquesta paradoxa. Per una banda, l'elevada expressió de TIMPs podria ser una resposta de l'hoste a l'elevada expressió de MMPs (Jiang et al., 2002). Alternativament, l'elevada expressió de TIMPs en càncer podria afavorir les funcions reguladores del creixement i de l'apoptosi independents de les MMPs atès el paper antiapoptòtic d'algunes TIMPs com TIMP-1 (Guedez et al., 1998; Li et al., 1999). PAI-1 és un membre de la família d'inhibidors dels activadors del plasminogen i es troba en el plasma (Sherman et al., 1992). El sistema plasminogen-plasmina juga un paper important en la progressió tumoral, concretament en l'angiogènesi i la migració. Malgrat que les cèl·lules endotelials necessiten l'activador de plasminogen de tipus uroquinasa (uPA) i plasmina per degradar la MEC i migrar, la proteòlisi de la plasmina ha de ser controlada per inhibidors fisiològics com PAI-1 (Pepper, 2001). Sorprenentment, PAI-1 és un marcador de mal pronòstic en molts tipus de càncer (Rakic et al., 2003). Això podria explicar-se com una resposta a una elevada activitat proteolítica. Alternativament, podria ser degut al paper directe de PAI-1 en la migració i invasió mitjançant la unió a la vitronectina (Zhou et al.,

2003). De fet, l'expressió de PAI-1 ha estat associada a TEM i a invasió (Akiyoshi et al., 2001; Santibanez et al., 1999).

Gens implicats en la proliferació cel·lular

Durant la TEM també queda afectat el cicle cel·lular, de manera que moltes cèl·lules afavoreixen els canvis morfològics enfront al creixement. Això és precisament el que s'ha descrit que ocorre en les cèl·lules MDCK-Snail, les quals reprimeixen la ciclina D2 unint-se a les caixes E del seu promotor (Vega et al., 2004) atenuant així la proliferació. En aquest sentit, nosaltres hem trobat que aquestes cèl·lules també tenen reduïda l'expressió de la **ciclina D1**, també descrit per Vega i col·laboradors (Vega et al., 2004), i de la fosfatasa **Cdc25 B**, la qual s'activa durant la fase S i juga un paper important en l'activació de la quinasa mitòtica Cdk1/ciclina B en el citoplasma (Nilsson and Hoffmann, 2000).

Vies de senyalització i factors de transcripció

Els canvis d'expressió gènica que tenen lloc durant la TEM van acompanyats de l'activació i la repressió de vies de senyalització i de factors de transcripció. E47 i *Snail* indueixen una TEM completa i regulen l'expressió de múltiples gens directament en alguns casos, com la cadherina E, i indirectament en altres casos mitjançant l'activació de vies de senyalització subsidiàries sovint a la repressió de la cadherina E que en últim terme activen altres factors de transcripció. De fet, en el procés de TEM s'han descrit implicades les vies de les MAPKs (Janda et al., 2002b; Montesano et al., 1999; Schramek et al., 1997b), PI3K/Akt (Janda et al., 2002b) i Wnt (Polakis, 2000). I aquesta és la direcció en que precisament van les nostres troballes, ja que la via Erk/MAPk està molt activada en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules control i a més a més intervé en l'activació transcripcional de MMP-9 i d'Id-1. Adicionalment, en les cèl·lules MDCK-Snail la via PI3K també està molt activada i intervé en la regulació de MMP-9. Aquests punts, però, seran discutits més extensament en apartats posteriors.

En el procés de TEM s'han implicat molts factors de transcripció a part d'E47 i *Snail* com són Ets-1 (Fafeur et al., 1997; Paumelle et al., 2002), AP-1 (Fialka et al., 1996; Reichmann et al., 1992), NFκB (Huber et al., 2004; Orłowski and Baldwin, 2002), SIP-1 (Comijn et al., 2001), Slug (Bolos et al., 2003) o Twist (Yang et al., 2004). En l'anàlisi per *microarrays* s'ha trobat augmentada l'expressió d'un factor de transcripció homòleg al factor bHLH **Twist** en les cèl·lules MDCK-E47 respecte les MDCK-CMV, el qual podria ser un *partner* potencial d'E47. E47 és un factor bHLH que obligatòriament

ha de dimeritzar amb altres factors bHLH per unir-se al DNA i regular l'expressió gènica. Només a les cèl·lules B hi ha constància que E47 s'uneix a les regions promotores de gens diana formant homodímers (Aronheim et al., 1993a), tot i que no pot descartar-se que també ho faci en el nostre sistema cel·lular. De fet, els nostres assajos d'EMSA amb la proteïna recombinant d'E47 indiquen que aquest factor és capaç d'interaccionar amb les caixes E del promotor d'Id-1 humà i de cadherina E murina com a homodímer. Normalment, però, heterodimeritza amb factors bHLH de classe II específics de teixit, com podria ser Twist (Wolf et al., 1991).

Un altre factor de transcripció que es va trobar induït en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail és el factor HLH **Id-1**, que és un inhibidor dels factors bHLH, principalment de les proteïnes E, i s'ha detectat sobreexpressat en molts carcinomes (Lin et al., 2000; Ouyang et al., 2002; Wice and Gordon, 1998). De fet, després discutim en profunditat els mecanismes responsables d'aquest canvi d'expressió.

Aquests resultats estan d'acord amb els estudis del perfil d'expressió gènica associats al procés de TEM/invasió que altres laboratoris han realitzat recentment (Jechlinger et al., 2003; Kiemer et al., 2001; Zavadil et al., 2001), on els gens diferencialment expressats varien segons el model de cèl·lules epitelials emprat o bé segons l'inductor de les TEM i l'estratègia utilitzada en la cerca de gens. De fet, en alguns d'aquests estudis, com el de Zavadil (Zavadil et al., 2001), les cèl·lules no pateixen una TEM sinó *scattering*, per la qual cosa no és sorprenent el fet que pràcticament no coincideixin els gens diferencialment expressats en el nostre model de TEM amb els seus. Només un gen, la fibronectina, que presenta un augment d'expressió en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001), va ser trobat fortament sobreexpressat després de tractar les cèl·lules HaCaT amb TGF- β durant 4 hores (Zavadil et al., 2001). En canvi, l'estudi de Jechlinger (Jechlinger et al., 2003) dels perfils d'expressió gènica abans i després de la TEM en les cèl·lules epitelials de mama Eph4 transfectades amb H-Ras i tractades amb TGF- β presenta més coincidències amb el nostre treball. En aquest sentit, els seus resultats indiquen guanys en l'expressió de gens que codifiquen per molècules d'adhesió, de MEC i de citoesquelet pròpies del fenotip mesenquimal (tals com vimentina, col·lagen III α_1 , SPARC, etc.), alhora que senyala pèrdues en l'expressió de gens que codifiquen per molècules d'adhesió i de citoesquelet característics de cèl·lules epitelials (tals com cadherina E, plakoglobina, ocludina, queratina 14, etc.). Pel que fa a l'activitat proteolítica, les troballes en les cèl·lules que han assolit la TEM són guanys en l'expressió de metal·loproteases (MMP-13, MMP-12, MMP-2, etc.) acompanyats de pèrdues en l'expressió d'inhibidors de proteases (Maspin, TIMP-3, etc.) els quals són

compatibles amb la capacitat de degradar els components de la MEC i facilitar la migració i invasió.

Així bé, molts dels gens comuns als programes genètics iniciats per E47 i *Snail* també s'han trobat diferencialment expressats en altres models de TEM (Guaita et al., 2002; Jechlinger et al., 2003; Zavadil et al., 2001). Atès que almenys *Snail* també s'ha trobat sobreexpressat en alguns d'aquests models, podria ser el responsable de molts dels canvis d'expressió que es donen, i per tant es podria considerar un gen *master* de la TEM.

3. Paper d'E47 i *Snail* en la progressió tumoral

En els darrers anys ha sorgit la idea que E47 i *Snail* juguen un paper important en la progressió tumoral. De fet existeixen molts treballs sobre *Snail* i no tants sobre E47 que demostren una correlació inversa en l'expressió d'aquests factors de transcripció i la cadherina E en línies de carcinoma murines i humanes (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001; Poser et al., 2001; Yokoyama et al., 2001). En aquest sentit, l'estudi de l'expressió diferencial de les TEMs induïdes per E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK que s'ha dut a terme al llarg d'aquest treball mostra que una gran part dels gens afectats estan implicats en l'augment del potencial tumorigènic i metastàtic. Altres estudis també donen suport a aquesta idea ja que mostren que *Snail* és un activador transcripcional de MMPs en tumors humans (Miyoshi et al., 2004; Yokoyama et al., 2003).

Les diferències o complementarietats d'ambdós factors de transcripció en l'adquisició del fenotip invasiu en els tumors són per ara fruit de l'especulació només basat en les observacions de l'expressió conjunta o excloent durant les TEMs en el procés embrionari. En aquest cas, a *Snail* se li atribueix un efecte iniciador de les TEM (atès que s'expressa intensament als llocs on s'inicia la TEM en l'embrió (Cano et al., 2000)), mentre que l'expressió del gen E2A, que codifica per E47 i E12, podria tenir un efecte consolidador (atès que s'expressa més tardanament en les TEMs de l'embrió (Perez-Moreno et al., 2001)). És temptador especular que un escenari similar podria operar durant el procés d'invasió tumoral en el que els dos factors de transcripció actuarien de forma coordinada i seqüencial (Perez-Moreno et al., 2001). De fet, l'anàlisi dels tumors derivats de les cèl·lules MDCK-*Snail* suggereix una possible inducció d'E47 mediada directament o indirectament per *Snail*, ja que existeix una correlació entre les zones de major expressió de *Snail* amb les zones que expressen E47 (Peinado et al., 2004a). En aquest sentit, l'estat inicial de la invasió probablement requereix una repressió de la cadherina E ràpida i efectiva que podria ser duta a terme per repressors

transcripcionals amb gran afinitat per les caixes E del seu promotor com *Snail*, i mantinguda per repressors transcripcionals menys afins com E47 (Bolos et al., 2003).

Adicionalment i donant suport al mecanisme d'acció de *Snail* i d'E47 coordinat i seqüencial, la capacitat invasiva a temps curts en cultius tridimensionals de col·lagen crescuts *in vitro* i *in vivo* és major en les cèl·lules MDCK-Snail que en les MDCK-E47. En canvi, a temps llargs de cultiu, les cèl·lules MDCK-E47 presenten un major potencial invasiu que el de les cèl·lules MDCK-Snail, donant així suport al paper d'E47 en el manteniment del fenotip desdiferenciat i migratori (Peinado et al., 2004a). A més a més, totes dues línies cel·lulars són capaces d'induir la formació de nous vasos, tal com s'observa en els trasplants *in vivo*, i principalment als de les cèl·lules MDCK-E47 (Peinado et al., 2004a).

En aquest sentit, els nostres resultats de l'anàlisi d'expressió diferencial de les TEMs induïdes per E47 o *Snail* indiquen que els gens l'expressió dels quals és regulada per E47 i no per *Snail* estan pràcticament tots sobreexpressats respecte les cèl·lules control, mentre que els que només estan regulats per *Snail* majoritàriament estan infraexpressats respecte el control. És a dir, E47 afavoreix els guanys d'expressió mentre que *Snail* afavoreix les pèrdues. Això dóna suport al paper iniciador de *Snail* en la TEM ja que probablement primer cal que la cèl·lula epitelial perdi les propietats epitelials, i alhora suggereix que E47 tindria un paper consolidador en la TEM provocant el guany de marcadors mesenquimals (i mantenint la pèrdua de marcadors epitelials, que estarien dins les dianes comunes amb *Snail*).

No cal oblidar altres factors de transcripció que també reprimeixen l'expressió de la cadherina E com el factor de dits de zinc *Slug* (Bolos et al., 2003; Hajra and Fearon, 2002), els factors de dobles dits de zinc δ EF1/ZEB-1 i SIP-1/ZEB-2 (Comijn et al., 2001; Grootclaes and Frisch, 2000) i el factor de transcripció *basic helix-loop-helix Twist* (Comijn et al., 2001). És plausible que cadascun d'aquests repressors estiguin actuant preferentment en un tipus específic de carcinoma. Així, s'ha descrit l'expressió diferencial de *Snail*, SIP-1 i Twist en diferents tipus de carcinomes gàstrics (Rosivatz et al., 2002). Per altra banda, actualment també està sorgint la idea que aquests diferents factors de transcripció podrien estar produint una repressió additiva o col·laborativa sobre el promotor de la cadherina E i altres en determinats contextos. Aquest model es basa en que algunes línies tumorals negatives per la cadherina E estan expressant més d'un repressor (Cano et al., 2000; Guaita et al., 2002; Hajra and Fearon, 2002; Perez-Moreno et al., 2001). Algunes evidències experimentals donen suport a aquesta hipòtesi mostrant que en determinats contextos *Snail* i SIP-1 poden col·laborar en la repressió del promotor de la cadherina E humana (Comijn et al., 2001). També s'ha vist una acció col·laborativa entre *Snail* i SIP-1 en la repressió del promotor de la mucina 1 (Guaita et al., 2002).

Queda, doncs, per aclarir el mecanisme específic de col·laboració entre els diferents repressors de la cadherina i alhora inductors de TEM en la progressió tumoral, la qual cosa pot ser molt important alhora de dissenyar estratègies terapèutiques contra el càncer.

4. Mecanisme d'activació de l'expressió de MMP-9 induïda per E47 i *Snail*

Un event crucial que té lloc durant la TEM, tant en l'embriogènesi com en situacions patològiques com la progressió tumoral, és l'adquisició per part de les cèl·lules epitelials que han sofert una TEM de la capacitat d'envair i migrar a través de les membranes basals. Aquest fet pressuposa l'adquisició de l'expressió *de novo* de molècules, majoritàriament metal·loproteases, que degraden els components de la MEC per facilitar la migració cel·lular. Troballes prèvies del nostre grup i d'altres relacionen la pèrdua de les característiques epitelials i en concret de la cadherina E amb l'expressió de MMPs i en particular de MMP-9 en els carcinomes (Llorens et al., 1998; Nawrocki-Raby et al., 2003). Per altra banda i en suport d'aquest fet, l'expressió augmentada de MMP-9 ha estat àmpliament documentada en diversos tipus de tumors com carcinomes de mama, de pròstata, bufeta, etc., i també melanoma, glioblastoma, etc., (Hujanen et al., 1994; Jones et al., 1999; Rao et al., 1993), fet que correlaciona l'expressió d'aquesta proteïnasa amb el potencial metastàtic (Sehgal et al., 1996). Fins a la data, però, no es coneix quin és el mecanisme molecular implicat en els guanys de MMP-9 a conseqüència de la pèrdua de la cadherina E.

En aquest treball s'ha demostrat que l'expressió estable d'E47 o *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK indueix un procés de TEM completa acompanyada d'un increment en l'activitat gelatinolítica de MMP-9 així com dels nivells de proteïna i mRNA. Aquests resultats concorden amb les troballes recents d'altres autors que, com nosaltres, descriuen l'augment de l'expressió d'altres metal·loproteases com a conseqüència de l'expressió de *Snail*, suggerint la idoneïtat d'una o altra metal·loproteasa segons el context cel·lular. De fet, s'ha descrit recentment que *Snail* indueix MMP-1, MMP-2, MMP-7 i MT1-MMP en línies hepatocel·lulars (Miyoshi et al., 2004) i MMP-2 en línies de carcinoma escamós (Yokoyama et al., 2003) que, com en el nostre cas, facilitarien la invasió de les cèl·lules tumorals a través de les membranes basals. Aquests estudis, però, no aprofundeixen en el mecanisme responsable d'inducció de l'expressió de les esmentades metal·loproteases.

Els nostres resultats d'augment dels nivells de mRNA de MMP-9 suggereixen que l'increment de l'expressió és conseqüència de l'activació transcripcional del gen MMP-9.

Comparant les seqüències de la regió promotora de MMP-9 de diferents espècies s'observa que la majoria d'elements d'unió a factors de transcripció, tals com AP-1, Sp1,

NFκB, Ets-1 o una possible caixa E, estan presents en totes elles i a més localitzats en posicions gairebé iguals respecte el lloc d'inici de transcripció, tot i alguna excepció, la qual cosa suggereix que la regulació transcripcional d'aquest gen és similar a les diferents espècies (Campbell et al., 2001). Per tant, el mecanisme de regulació de MMP-9 per E47 i *Snail* descrit en aquest treball es podria extrapolar a d'altres espècies com per exemple a cèl·lules humanes, justificant l'ús del promotor murí en el present estudi.

Per entendre el mecanisme d'inducció transcripcional de MMP-9 per E47 i *Snail*, es van fer anàlisis de l'activitat promotora de la regió de 1170 pb corresponents al promotor murí de MMP-9 (Masure et al., 1993; Munaut et al., 1999), dirigint l'expressió del gen luciferasa. L'augment de l'expressió de la luciferasa a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV indica que efectivament aquesta regió conté els elements que regulen l'expressió basal i la inducció transcripcional de MMP-9 mediada per E47 o de *Snail*. A més a més, com ocorre amb els nivells d'expressió de MMP-9, l'activitat promotora és major en les cèl·lules MDCK-E47 que en les cèl·lules MDCK-Snail. Aquesta diferència quantitativa es manté en les diferents construccions que es van analitzar, però sorprenentment l'activitat promotora entre ambdues línies cel·lulars és qualitativament bastant similar. Aquest fet fa suposar que ambdues comparteixen elements reguladors comuns.

Amb l'interès d'esbrinar quins són aquests elements, es va anar analitzant la participació de cadascun en les construccions generades alhora que es comparava l'activitat promotora en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte la de les cèl·lules control. El primer que es s'ha trobat és que la deleció de la seqüència compresa entre -1170 i -808 pb respecte l'inici de transcripció comporta un augment de l'activitat promotora en les tres línies cel·lulars, la qual cosa suggereix la presència d'elements repressors, però en aquest treball ens vam interessar particularment en els motius reguladors responsables de l'activació diferencial a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les control.

Atès que el promotor de MMP-9 té una possible caixa E (de fet són dues caixes E solapades, situades a -644 pb respecte l'inici de transcripció en el promotor murí), tot i que no és exactament la seqüència consens d'unió del factor *Snail*, en un principi es va pensar que l'activació transcripcional podria ser mediada per interacció directa d'E47 i *Snail* a aquest motiu. Malgrat els esforços i empeny en demostrar la participació d'aquest element, els nostres resultats indiquen el contrari, és a dir, que no hi ha unió directa. De fet, l'anàlisi de l'activitat promotora ha mostrat que la deleció de la caixa E no afecta en les dues línies MDCK-E47 i MDCK-Snail. Tanmateix, mitjançant assajos d'EMSA s'ha observat la formació d'un complex proteïna-DNA en aquesta regió promotora a les tres línies cel·lulars, però de diferent intensitat: més intens a les cèl·lules MDCK-E47 que a les MDCK-Snail i més feble a les cèl·lules MDCK-CMV. S'ha

demonstrat que aquest complex no és format ni per E47 ni per *Snail*, i per tant l'activació transcripcional de MMP-9 induïda per E47 i per *Snail* no es deu a la unió directa d'aquests factors de transcripció a la caixa E. La identitat proteica del complex proteïna-DNA detectat per EMSA no es coneix, però atès que la seva presència no sembla tenir conseqüències directes sobre l'activitat del promotor es va decidir estudiar altres motius reguladors.

Els resultats obtinguts al llarg d'aquest treball indiquen que l'activitat basal i l'activació del promotor de MMP-9 a les cèl·lules MDCK-E47 o a les MDCK-Snail és mediada per la cooperació de diferents elements reguladors, concretament NF κ B, Ets-1 i Sp1. En el cas de NF κ B les diferències entre les tres línies són a nivell d'intensitat dels complexos proteïna-DNA, i en el cas d'Ets-1 i Sp1 són d'absència de complexos en la línia cel·lular control, suggerint un augment en la quantitat dels esmentats factors de transcripció o bé una major afinitat per les corresponents seqüències en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que en les cèl·lules MDCK-CMV.

Concretament, és important la seqüència consens de NF κ B localitzada a -561 pb del lloc d'inici de transcripció. La implicació de NF κ B no és sorprenent atès que en alguns sistemes cel·lulars NF κ B és indispensable per l'activitat basal de MMP-9 així com per la inducció mediada per agents tals com el PMA, actuant sinèrgicament amb altres elements reguladors com el lloc AP-1 proximal (Gum et al., 1997; Sato and Seiki, 1993; Yokoo and Kitamura, 1996). Contràriament, el motiu NF κ B és indispensable per la repressió transcripcional de MMP-9 induïda per TGF- β en monòcits/macròfags (Ogawa et al., 2004). Els factors de transcripció NF κ B s'uneixen al DNA com a homodímers o heterodímers que poden estar formats per cinc possibles subunitats en ratolí i humà: RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 i p52 (Huber et al., 2004). Els nostres resultats indiquen que almenys la subunitat p65 forma part del complex que interacciona amb l'element NF κ B del promotor de MMP-9, atès que és reconegut per anticossos específics. En la majoria de cèl·lules no estimulades, els dímers NF κ B són inactius degut a l'associació amb les proteïnes I κ B (inhibidor κ B) que emmascaren la seva seqüència de localització nuclear retenint-los en el citoplasma i prevenint la unió al DNA. L'estimulació de les cèl·lules, per exemple amb citocines com el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o la interleuquina 1 (IL-1), resulta en la fosforilació d'I κ B mediada per les quinases IKK (quinasa I κ B) causant la seva degradació pel proteosoma i la conseqüent alliberació dels dímers NF κ B que poden translocar-se al nucli i desenvolupar les seves funcions (Karin and Ben-Neriah, 2000). Atès que els nivells d'expressió de la proteïna p65 no estan alterats en el nostre model cel·lular (dada no mostrada), probablement té lloc una major activació en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. El mecanisme que porta a l'activació de NF κ B en aquestes cèl·lules no es coneix, tot i que podria estar mediat per la via de senyalització PI3K/Akt (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999).

De fet, s'ha demostrat que les cèl·lules MDCK-Snail tenen aquesta via molt activada. Aquests resultats concorden amb els de treballs previs que impliquen NF κ B en el procés de TEM (Huber et al., 2004) i en fenotips malignes molt agressius de carcinomes de pell escamosos (Dong et al., 2001) i de carcinomes de mama (Sovak et al., 1999), jugant un paper important en el potencial metastàtic (Andela et al., 2000), en la mesura que intervé en l'activació transcripcional de gens involucrats en l'angiogènesi i la invasió.

Una altra de les regions del promotor de MMP-9 que mereixen la nostra atenció és la proximal que conté la caixa GC (GGGGCGGGG), diana pel reconeixement de factors de transcripció de la família Sp. Aquest element és present en el promotor de MMP-9 de moltes espècies (Campbell et al., 2001), però en el genoma humà correspondria a una caixa GT (GGGGTGGGG). S'ha descrit que la substitució d'una caixa GC per una caixa GT afecta la resposta del promotor de MMP-9 a v-src (Sato et al., 1993). La seqüència de la caixa GT ha estat identificada com un element de control del retinoblastoma (RCE) present en el promotor de c-myc, c-fos, TGF- β i altres gens (Kim et al., 1991). De forma similar, les seqüències riques en GC dels promotors de junB i EGR-1 han estat identificades com a RCEs. Mentre que no ha estat demostrat que l'element RCE pot estimular el promotor de MMP-9, Sp1 podria unir-se a aquesta seqüència i activar la transcripció de MMP-9 humà (Kim et al., 1991). De fet, Rb regula positivament els elements RCE mitjançant l'activitat transcripcional de Sp1.

Els nostres resultats indiquen que la regió proximal del promotor de MMP-9 murí sosté l'estimulació de l'activitat promotora de MMP-9 induïda per E47 i *Snail*, i per això vam explorar la contribució dels diferents elements putatius reguladors d'aquesta regió. Efectivament, la regió compresa entre -97 i -75 pb anteriors a l'inici de transcripció és essencial per l'activació mediada per E47 i *Snail*. L'anàlisi *in silico* d'aquesta regió indica que hi ha dos possibles llocs d'unió a Ets-1, dos llocs Sp1-LA (de baixa afinitat) i un lloc Sp1-HA (d'alta afinitat). La mutació d'aquests elements ha revelat que concretament el segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i el lloc Sp1-HA són els implicats en l'activació transcripcional de MMP-9 mediada per E47 i *Snail*. S'ha vist que tant Ets-1 com Sp1 són capaços d'activar el promotor de MMP-9 mitjançant la unió a aquests elements. A més a més, els resultats de sobreexpressió d'aquests factors de transcripció suggereixen que Sp1 té major capacitat activadora que Ets-1, ja que transfectant la mateixa quantitat de vector d'expressió s'obté un increment de l'activitat promotora major per Sp1 que per Ets-1. No es pot descartar, però, una diferència en l'eficiència d'expressió dels vectors.

Paral·lelament i mitjançant assajos d'EMSA, hem demostrat que l'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK comporta la formació *in vitro* de complexes específics proteïna-DNA en els elements Ets-1 i Sp1 proximals. Nosaltres proposem que l'activació transcripcional de MMP-9 en resposta a E47 i *Snail* implica una associació física entre els dos factors de transcripció Ets-1 i Sp1 en la regió proximal del

promotor de MMP-9 donant lloc a un multicomplexe. Tal cooperativitat entre Ets-1 i Sp1 s'ha observat en altres promotors. Per exemple, Ets-1/Sp1 activen l'expressió del lligand de Fas (FasL) que és una proteïna implicada en apoptosi (Kavurma et al., 2002), de la proteïna relacionada amb l'hormona paratiroidea (PTHrP) (Dittmer et al., 1994) o de la glicoproteïna de la MEC tenascina C (Jinnin et al., 2004).

Ets-1 pertany a l'àmplia família de factors de transcripció Ets, que reconeixen la seqüència consens GGA. En teixits adults la seva expressió elevada només s'associa a teixits limfoides. Regula gens implicats en diversos processos cel·lulars com la proliferació, la diferenciació, el desenvolupament, la transformació o l'apoptosi (Oikawa and Yamada, 2003). Hi ha moltes evidències que els factors de la família Ets juguen un paper important en la regulació de l'expressió dels diferents components de la MEC, o bé de les proteïnes que els degraden, i en aquest sentit els membres de la família Ets podrien potenciar els canvis en l'expressió de gens que acompanyen les TEM, tant durant el desenvolupament com en la progressió tumoral (Trojanowska, 2000). De fet, anàlisis d'immunohistoquímica i d'hibridacions *in situ* han demostrat la coexpressió d'Ets-1 i diverses proteases que degraden la MEC, particularment en tumors invasius. Aquest és el cas de la coexpressió d'Ets-1 i MMP-1 i/o uPA i/o MMP-3 en carcinomes de pulmó (Bolon et al., 1995) i angiosarcomes de pell (Naito et al., 2000). A favor també d'aquesta hipòtesi, l'expressió d'Ets-1 en tumors benignes i no invasius és rarament detectable (Calmels et al., 1995).

Ets-1 es pot fosforilar en resposta a molts factors de creixement, la qual cosa afecta la unió proteïna-DNA, l'activitat transcripcional i l'associació amb altres factors de transcripció. S'ha descrit que pot ser activat per la via Erk/MAPK (Goetze et al., 2001; Paumelle et al., 2002), la via p38/MAPK (Tanaka et al., 1998a) i la quinasa PKC (Lindemann et al., 2001).

Per altra banda, Sp1 és un factor de transcripció expressat ubícuament en cèl·lules de diversos òrgans i teixits, que reconeix les seqüències riques en GC presents en molts gens *housekeeping* i en gens implicats en la diferenciació, el cicle cel·lular, el desenvolupament i el càncer (Black et al., 2001). Prèviament als nostres estudis, la unió de Sp1 al promotor de MMP-9 ha estat demostrada i correlacionada amb el potencial invasiu induït per v-Src (Sato et al., 1993). Sp1 i Sp3, tots dos membres de la família Sp, també han estat trobats implicats en la regulació de l'expressió constitutiva de MMP-2 (Qin et al., 1999). No és estrany, doncs, haver trobat que també en el nostre sistema la unió del factor Sp1 a la corresponent regió proximal del promotor de MMP-9 sigui clau en l'activació promotora. Contràriament, el que sí que ens va sorprendre és la presència de la banda corresponent als complexos DNA-Sp1 observada en els extractes nuclears de MDCK-Snail i encara més en els de MDCK-E47, però pràcticament nul·la en

els de les cèl·lules MDCK-CMV. Aquest fet va suggerir un augment en la quantitat d'aquest factor de transcripció o bé una major afinitat per les corresponents seqüències.

Atès que Sp1 sofreix moltes modificacions posttraduccionals com la glicosilació i la fosforilació (Black et al., 2001; Bouwman and Philipsen, 2002), és plausible que aquestes siguin les responsables de les diferències observades en els EMSAs. Mentre que la glicosilació permetria la localització nuclear i la unió al DNA i podria determinar l'estabilitat de la proteïna (Han and Kudlow, 1997), la fosforilació estabilitzaria els complexos proteïna-DNA (Black et al., 2001). S'han descrit algunes quinases que fosforilen Sp1, incloent la proteïna quinasa depenent de DNA (Jackson et al., 1993), la quinasa caseïna II (Armstrong et al., 1997) i la proteïna quinasa C- γ (Rafty and Khachigian, 2001), però els llocs de fosforilació d'aquestes quinases *in vivo* encara no es coneixen del tot. Tanmateix, s'ha descrit la fosforilació de Sp1 humà per la ciclina A-CDK2 en la serina 59 (Fojas de Borja et al., 2001), i per altra banda, s'ha demostrat que Erk1/Erk2 fosforilen directament Sp1 en les treonines 453 i 739 *in vitro* i *in vivo* afavorint la seva unió al DNA (Milanini-Mongiat et al., 2002). Com en el nostre cas, l'increment de la unió de Sp1 al DNA a causa a la seva fosforilació ha estat implicada en la regulació d'altres gens relacionats amb la invasió de la MEC com el receptor d'uPA (uPAR) (Ibanez-Tallon et al., 2002), VEGF (Reisinger et al., 2003) i MMP-2 (Pan and Hung, 2002).

En aquest sentit i corroborant aquestes dades en d'altres promotors, hem trobat que la unió d'Ets-1 i Sp1 al promotor de MMP-9 es correspon amb una major activació de la via Erk/MAPK en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail i de la via PI3K/Akt almenys en les cèl·lules MDCK-Snail. Aquestes vies de senyalització alhora regulen l'activació del promotor de MMP-9 actuant sobre la regió proximal, ja que el tractament amb els inhibidors sintètics PD98059 i wortmannina específics de les quinases MEK1/2 i PI3K, respectivament, redueix l'activitat del promotor proximal. Suggerim que aquestes vies de senyalització podrien estar implicades en l'activació dels factors Ets-1 i Sp1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, afavorint la formació de complexos cooperatius d'ambdós factors, establint les diferències amb les cèl·lules MDCK-CMV. De fet, ja s'havia descrit que les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt contribueixen en el procés invasiu, i en particular en l'activació del promotor de MMP-9 (Ellerbroek et al., 2001; Gum et al., 1997; Lakka et al., 2000; Moon et al., 2004). Per altra banda, les dues vies de senyalització estan activades en la TEM (Janda et al., 2002a; Montesano et al., 1999; Schramek et al., 1997a; Schramek et al., 1997b), fet que dóna suport a la present hipòtesi.

És possible, però, que no tot sigui atribuït a la fosforilació d'aquests factors per les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt. En el cas d'Ets-1, nosaltres no hem pogut disposar de les eines necessàries per evidenciar-ho. No podem descartar que les diferències en la

formació dels complexos en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les control MDCK-CMV responguin a l'abundància de proteïna. Treballs previs indiquen que Ets-1 només s'expressa en cèl·lules epitelials transientment durant processos de TEM (Fafeur et al., 1997), la qual cosa explicaria els nostres resultats. Malgrat que ni per RT-PCR ni *Northern blot* hem trobat diferències en el mRNA (dades no mostrades), no podem tampoc descartar la diferent disponibilitat d'aquest factor en les distintes línies cel·lulars del nostre model de TEM. En tot cas, ja sigui per diferent disponibilitat d'Ets-1 o afinitat per la seqüència de DNA a conseqüència de la possible fosforilació, el factor Ets-1 juga un paper clau en l'activació transcripcional de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail.

En el cas de Sp1 es va detectar un increment dels nivells de proteïna així com de la seva fosforilació en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV. El mecanisme que regula la inducció de Sp1 no el coneixem. S'ha descrit que el gen Sp1 pot ser regulat transcripcionalment per ell mateix, és a dir, per la unió de la proteïna Sp1 al seu promotor, donant lloc a un mecanisme de *feedback* positiu (Nicolas et al., 2003). Aquest mecanisme podria contribuir a la inducció detectada en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail.

Per altra banda, els assajos de transfecció en les cèl·lules SL2 de *Drosophila* deficientes en factors Sp (Schneider, 1972) demostren que l'activació del promotor proximal de MMP-9 per Sp1 requereix l'activació de la via Erk/MAPK. En aquest sentit, el bloqueig de la via Erk-MAPK amb un dominant negatiu de MEK1 redueix la unió del complex proteïna-DNA que formen Ets-1 i Sp1 en la regió proximal del promotor de MMP-9. En conjunt, aquests resultats indiquen que l'activació de Sp1 probablement per fosforilació per les quinases Erk/MAPK activades en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail estimula la seva unió al DNA i contribueix a l'increment de l'activitat promotora de MMP-9. Aquesta fosforilació per la via Erk/MAPK, però, no es dona en les treonines 453 i 739 que en treballs previs s'havien descrit com llocs de fosforilació per les quinases Erk (Milanini-Mongiati et al., 2002), o si més no aquestes treonines no hi intervenen. Els assajos en el sistema experimental de SL2 emprant vectors d'expressió de Sp1 mutants en aquests aminoàcids ho han evidenciat, i en conseqüència suggerim que d'altres serines o treonines presents a la seqüència de Sp1 haurien de ser les responsables (de fet, es segueix treballant per identificar-les).

En aquests moments al laboratori s'estan realitzant assajos d'immunoprecipitació de cromatina (Chips) per confirmar *in vivo* els resultats obtinguts mitjançant EMSA.

Simultàniament a l'estudi de la influència de les vies de senyalització de MAPK, es va assajar l'efecte de l'expressió de la forma activada de H-Ras (RasVal12) en la inducció de l'activitat promotora de MMP-9 en el nostre sistema experimental. Els

nostres resultats confirmen que l'expressió de RasVal12 en les cèl·lules MDCK activa la transcripció i a més a més l'activitat de la gelatinasa MMP-9, tal com s'havia descrit en alguns carcinomes (Gum et al., 1996; Shibata et al., 1998). Per altra banda, Ras o els seus efectors *downstream* com són les vies de senyalització de c-Raf-MEK (Karin, 1995; Webb et al., 1998) són necessaris en l'activació del promotor de MMP-9 per *Snail* ja que l'expressió d'un dominant negatiu de Ras redueix aquesta activació. Aquests resultats concorden amb els descrits prèviament de l'efecte dels inhibidors de MEK1/2 i PI3K. A més a més, hem observat un sinergisme en la inducció de l'activitat promotora de MMP-9 quan ambdós, RasVal12 i *Snail*, són coexpressats. Una explicació possible a aquestes troballes podria ser que les vies de senyalització Erk/MAPK i PI3K/Akt provoquen alhora l'activació del promotor de *Snail* (Barbera et al., 2004; Peinado et al., 2003) que potenciarà encara més l'activació del promotor del gen MMP-9 establint un circuit de producció de MAPK activades.

Així bé, l'activació de l'expressió de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail explicaria la seva capacitat invasiva (Cano et al., 2000; Peinado et al., 2004a; Perez-Moreno et al., 2001), tot i que també hi estarien implicades altres molècules de degradació de la MEC com MMP-3 o SPARC que també estan sobreexpressats en aquestes línies cel·lulars respecte les cèl·lules MDCK-CMV.

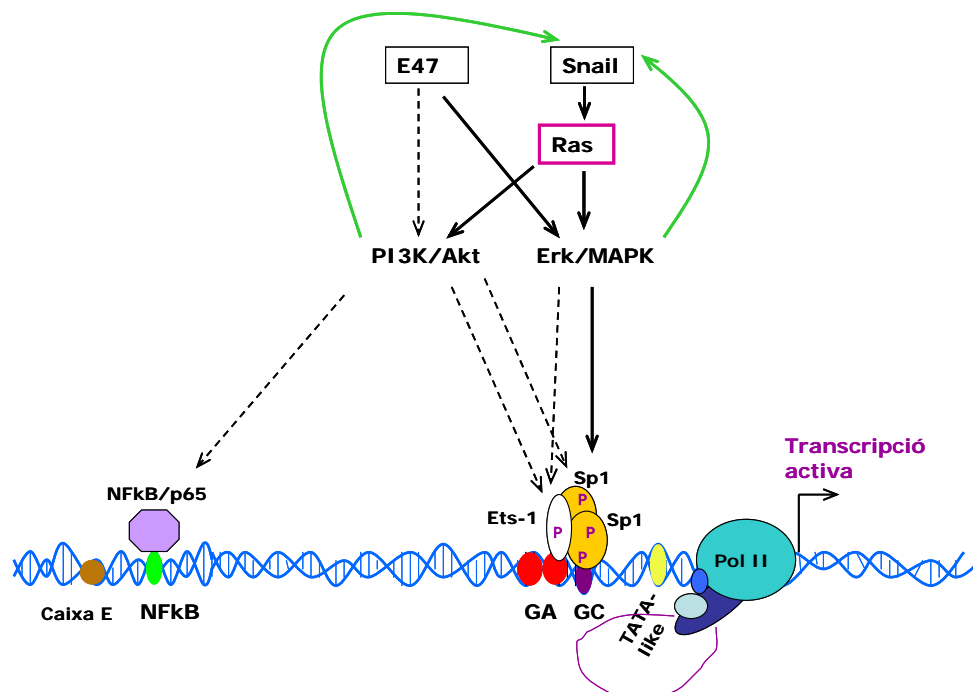


Figura D.3. Esquema del mecanisme d'activació transcripcional de MMP-9 induït per E47 i *Snail*. Les línies puntejades són hipotètiques, les línies negres representen els resultats que hem demostrat i les línies verdes provenen de dades bibliogràfiques. Breument, E47 i *Snail* activen indirectament les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt que regulen positivament el promotor de MMP-9 activant factors de transcripció, probablement per fosforilació, com NFκB, que s'uneix en la regió distal, i Ets-1 i Sp1, que s'uneixen en la regió proximal i cooperen sinèrgicament. En el cas de *Snail* l'activació d'aquestes vies de senyalització seria via Ras, iniciant un mecanisme de *feedback* positiu ja que està descrit que alhora activen l'expressió de *Snail*.

En conjunt, els nostres resultats indiquen que els factors E47 i *Snail* no s'uneixen a la caixa E del promotor de MMP-9 sinó que la unió diferencial de NFκB/p65 a la regió distal i la cooperació d'Ets-1 i Sp1 en la regió proximal són responsables de l'activació d'aquest promotor en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. A més a més, la unió d'almenys Sp1 és afavorida per l'activació de la via Erk/MAPK.

En la figura D.3, es mostra un esquema simplificat del mecanisme de regulació de l'activació transcripcional del gen MMP-9 induïda per E47 i *Snail* en les cèl·lules MDCK.

5. Mecanisme d'activació de l'expressió d'Id-1 induïda per E47 i *Snail*

La decisió d'iniciar una TEM i canviar cap a un fenotip migratori deu ser un procés difícil per les cèl·lules epitelials com les MDCK sota la pressió dels factors de transcripció E47 o *Snail* que reprimeixen transcripcionalment la cadherina E, implicant la pèrdua de les funcions d'aquesta en l'estabilització de les unions cèl·lula a cèl·lula característiques i necessàries pel manteniment del fenotip epitelial. Si la inducció dels membres de la família Id és conseqüència de l'oposició de la cèl·lula epitelial a esdevenir una cèl·lula fibroblàstica (evitant, per exemple, la unió d'E47) o bé n'és el resultat de la TEM iniciada, és ara per ara motiu de polèmica. El fet és que en la recerca dels efectors de les propietats invasives que adquireixen les cèl·lules que experimenten una TEM mediada per l'expressió estable d'E47 o *Snail*, vam trobar el gen Id-1 sobreexpressat significativament en comparació amb les cèl·lules epitelials control. Aquest fet no és sorprenent atès que l'expressió aberrant d'Id-1 s'ha trobat en carcinomes invasius de mama (Lee et al., 2004a; Schoppmann et al., 2003), de pròstata (Ouyang et al., 2002; Schindl et al., 2001), d'ovari (Schindl et al., 2003), de tiroide (Kebebew et al., 2000), escamós de pell (Nishimine et al., 2003), gàstric (Wang et al., 2004), etc., i també en tumors d'origen diferent com són els cervicals (Schindl et al., 2001) i on es considera un marcador de mal pronòstic. La persistència en l'expressió d'aquest gen en les cèl·lules invasives fa pensar que els proporciona avantatges en la invasió. En aquest sentit, estudis previs han demostrat la vinculació de l'expressió dels gens Id amb la inducció de l'angiogènesi i la neovascularització (Lee et al., 2004a; Lyden et al., 1999; Volpert et al., 2002) i en la invasió tumoral i metàstasi (Fong et al., 2003).

En el nostre model de TEM, la presència de sèrum no és suficient per induir Id-1 en les cèl·lules epitelials MDCK-CMV, tal i com s'havia descrit en moltes línies cel·lulars de procedència tumoral però poc agressives (Lin et al., 2000; Ling et al., 2002; Sumida et al., 2004). En canvi, les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail tenen la maquinària

necessària per activar l'expressió d'Id-1 independentment de la presència del sèrum (similar al que ocorre en línies tumorals molt agressives). Tot i això, no podem descartar els possibles efectes inductors del sèrum per les raons que expliquem a continuació. En l'assaig de *Western blot* es van detectar dues bandes amb l'anticòs policlonal contra la proteïna Id-1 que podrien correspondre a dues isoformes originades per *splicing* alternatiu del gen d'Id-1 (Id-1A i Id-1B) (Hernandez et al., 1996; Springhorn et al., 1994). S'ha descrit que aquestes isoformes difereixen en l'extrem carboxiterminal degut a la inserció d'un intró codificant en la regió 3' del gen i que el seu patró d'expressió és molt similar, però en canvi presenten diferències d'afinitat pels factors bHLH (Hernandez et al., 1996). En aquest cas, seria d'esperar que en el *Northern blot* també es detectessin els dos productes de l'*splicing* alternatiu, i no és així, la qual cosa descartaria aquesta hipòtesi. Però també s'observa en el *Western blot* que en presència de sèrum en el medi de cultiu els nivells d'una de les "isoformes" són molt baixos (de fet, cal un llarg temps d'exposició per detectar-la), i atès que el RNA utilitzat s'ha extret de cèl·lules cultivades en medi amb sèrum, podria ser que no es detectés el transcrit corresponent per falta de sensibilitat de la tècnica. Ambdues bandes, però, també podrien correspondre a la forma fosforilada i no fosforilada d'Id-1 ja que s'ha descrit la fosforilació d'aquesta proteïna per diferents quinases (Deed et al., 1994). Resulta curiós que l'expressió de la banda superior s'incrementa en absència de sèrum en el medi de cultiu, però fins la data no podem donar cap explicació a aquest fet.

Atès que l'increment de l'expressió d'Id-1 s'ha detectat tant a nivell de proteïna com de mRNA és possible que tingui lloc una activació transcripcional del gen directament o indirectament per E47 i *Snail*.

Estudis previs van identificar elements de resposta a sèrum en el promotor d'Id-1 que eren crucials per la regulació depenent de sèrum (Tournay and Benezra, 1996), Tanmateix, nosaltres hem observat una expressió constitutiva d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail independentment del sèrum la qual cosa suggereix la no implicació d'aquests elements en l'activació d'Id-1 induïda per E47 i *Snail*.

Per l'estudi de la regulació transcripcional d'Id-1 es va utilitzar el promotor d'Id-1 humà, ja que disposàvem d'ell i atès el grau de conservació d'aquest gen en la filogènia. Mitjançant l'anàlisi *in silico* del promotor es van identificar quatre caixes E (CANNTG) les quals són seqüències de reconeixement d'E47 i *Snail*, i per tant es podrien considerar candidates a la unió d'aquests factors de transcripció amb la conseqüent activació del promotor del gen. Els nostres resultats han mostrat que la inducció del promotor d'Id-1 mediada per E47 i *Snail* es dona per diferents mecanismes sinèrgics: per una banda, per la unió directa de factors de transcripció a diferents elements reguladors tals com les caixes E situades a -1256 i -1125 pb i la caixa GC

situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció, i per altra banda, per la via de senyalització Erk/MAPK.

La caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció és essencial en la inducció per E47 i *Snail* ja que la deleció o mutació d'aquest element redueix l'activitat promotora aproximadament un 90%. A més a més, assajos d'EMSA han demostrat que aquesta regió promotora dona lloc a la formació d'un complexe específic de molt baixa mobilitat electroforètica en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però absent en les cèl·lules MDCK-CMV. L'elevada massa molecular d'aquest complexe suggereix que es tracta d'un complexe multiproteic. Per aquest motiu, hem focalitzat la major part d'aquest estudi en els factors de transcripció que podrien estar implicats en la unió a les seqüències d'aquesta caixa E i del seu voltant, concretament una caixa GC, suggerint que són importants en l'activació del promotor d'Id-1 per E47 i *Snail*.

Mitjançant assajos d'EMSA i emprant anticossos específics s'ha demostrat que en les cèl·lules MDCK-E47 el factor E47 s'uneix a la caixa E situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció. En canvi, la presència de *Snail* en l'esmentat complexe format en les cèl·lules MDCK-Snail no s'ha pogut demostrar directament per manca d'un bon anticòs específic contra aquesta proteïna (tot i que n'hem provat tant de comercials com de generats en altres laboratoris i cap ens ha funcionat en els assajos d'EMSA). El que sí s'ha confirmat és que *Snail* directament o indirectament influencia la formació d'aquest complexe, ja que silenciant la seva expressió mitjançant la tècnica de RNA d'interferència en les cèl·lules MDCK-Snail, el complexe específic detectat en els assajos d'EMSA no es forma, situació similar a la que s'observa en les cèl·lules epitelials MDCK-CMV. És a dir, *Snail* podria unir-se directament a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció o induir l'expressió i/o regular la unió d'altres factors de transcripció a la caixa E i seqüències adjacents, o fins i tot podrien donar-se totes les situacions. De fet, tot i que s'ha demostrat que E47 s'uneix a aquesta caixa E, també podria induir l'expressió d'altres factors i/o influenciar-ne el reclutament a aquesta regió.

Curiosament, el complexe generat amb els extractes de les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail té una mobilitat electroforètica molt similar, tot i que E47 no hi participa en les cèl·lules MDCK-Snail. Aquest fet podria explicar-se per la limitada resolució de la tècnica d'EMSA que no permetria apreciar les diferències de mobilitat entre l'oligomerització d'ambdós factors i/o altres components, principalment degut a l'elevada massa molecular del complexe. Per tant, hipotitzem que E47 i *Snail* o algun factor induït per *Snail* capaç d'unir-se a la caixa E no serien els únics components implicats en la formació d'aquest complexe de tan baixa mobilitat electroforètica en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, respectivament. En aquest sentit, quan en els assajos d'EMSA s'empren sondes que només contenen la caixa E o la caixa GC augmenta la

mobilitat electroforètica del complexe, la qual cosa indica que fan falta els dos motius perquè es formi el complexe de baixa mobilitat electroforètica. De fet, mitjançant assajos d'EMSA i utilitzant un anticòs específic per Sp1, s'ha demostrat que aquesta proteïna s'uneix a aquesta caixa GC.

Per tant, els resultats indiquen que la caixa E situada a -1125 pb i la caixa GC adjacent situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció recluten diferents factors de transcripció que formen un complexe multiproteic que seria responsable de l'activació del promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. Tanmateix, el fet que la mutació de la caixa GC afecti només lleugerament l'activitat promotora d'Id-1 mentre que la mutació de la caixa E pràcticament l'aboleix senyala que aquest darrer element, la caixa E, és imprescindible per l'activació d'Id-1 induïda per E47 i *Snail*, mentre que la caixa GC per sí sola no és suficient. Això mateix indiquen els assajos d'EMSA, ja que la mutació de la caixa E abroga completament la formació del complexe multiproteic mentre que la mutació de la caixa GC redueix parcialment la seva formació.

En aquests moments, al laboratori s'estan realitzant assajos d'immunoprecipitació de cromatina (Chips) per confirmar els resultats obtinguts mitjançant EMSA.

Per últim, els nostres resultats demostren que la via Erk/MAPK intervé en la regulació de l'expressió d'Id-1, ja que el seu bloqueig amb l'inhibidor sintètic PD98059 de les quinases MEK1/2 redueix l'activitat promotora fins un 60% tant en les cèl·lules MDCK-E47 com a les MDCK-Snail, i també disminueix els nivells de proteïna Id-1, concretament de les dues formes proteiques detectades per *Western blot*. En el cas que la forma de major massa molecular fos Id-1 fosforilat, els resultats suggereixen que la fosforilació seria via Erk/MAPK. De la mateixa manera que ocorre amb el promotor de MMP-9, H-Ras també és capaç d'activar la transcripció d'Id-1 en les cèl·lules epitelials MDCK a través dels seus efectors Erk/MAPKs en absència d'E47 i *Snail*. De fet, les Erks també incrementen la síntesi i/o l'activitat de diversos factors de transcripció incloent membres de les famílies AP-1 i c-fos (Gille et al., 1992). L'activació del promotor d'Id-1 mediada per Ras podria explicar l'increment d'Id-1 observat en molts carcinomes en els que les mutacions de Ras són freqüents. La connexió entre l'expressió de les proteïnes Id i la via Erk/MAPK ha estat recentment descrita demostrant que la inducció d'Id-3 en timòcits immadurs mediada per la senyalització del receptor de les cèl·lules T (TCR) és controlada per la via Erk/MAPK (Bain et al., 2001). L'expressió d'Id-1 també ha estat associada a la via Erk/MAPK en càncer de pròstata (Ling et al., 2002).

A més a més, els resultats d'EMSA indiquen que la via Erk/MAPK afavoreix la formació dels complexos proteïna-DNA que es generen en la regió del promotor d'Id-1 compresa entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció que conté la caixa E i la caixa GC d'interès. Això es deu, almenys en part, a la fosforilació de Sp1 per Erk/MAPKs

(que també ocorria en l'activació transcripcional de MMP-9), com demostren els assajos de transfecció en les cèl·lules SL2 de *Drosophila* deficientes en els factors Sp (Schneider, 1972), indicant que cal que Sp1 s'activi per la via Erk/MAPK perquè tingui lloc l'activació transcripcional d'Id-1 en aquest context cel·lular. No es descarta que altres factors del complexe multiproteic també necessitin ser fosforilats per aquesta via.

En la figura D.4, es mostra un esquema del mecanisme de regulació de l'activació transcripcional del gen Id-1.

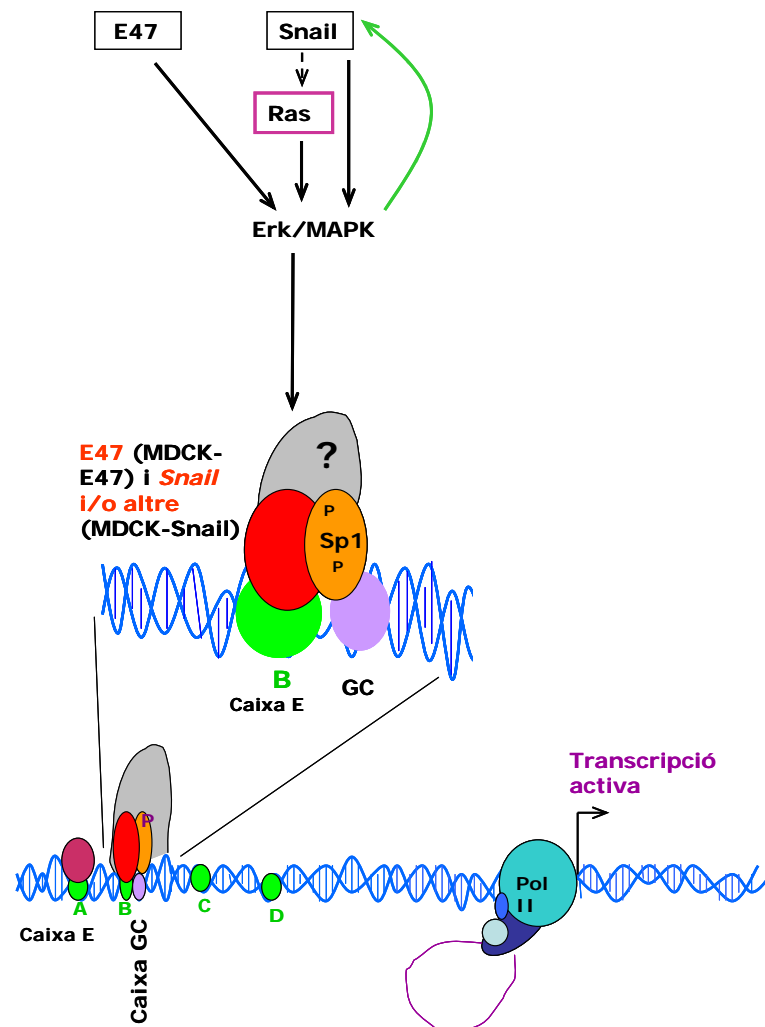


Figura D.4. Esquema del mecanisme d'activació transcripcional d'Id-1 induït per E47 i Snail. La línia puntejada és hipotètica i les línies negres representen els resultats que hem demostrat. E47 i Snail activen el promotor d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, respectivament, unint-se a la caixa E situada a -1125 pb (B) respecte l'inici de transcripció formant un multicomplexe amb Sp1 i altres possibles factors de transcripció o coactivadors. Alhora, E47 i Snail activen la via Erk/MAPK, directament o indirectament, que regula positivament la unió d'aquest(s) factor(s) de transcripció, almenys de Sp1, probablement per fosforilació.

Tots els resultats que hem presentat en aquest apartat efectivament demostren la inducció transcripcional d'Id-1 en les cèl·lules epitelials MDCK que han sofert la TEM com a conseqüència de l'expressió d'E47 o Snail. Tornant a la polèmica que esmentàvem al principi, ens seguim qüestionant els possibles beneficis d'aquesta

inducció i antecedents similars en d'altres contextos cel·lulars. De fet, ja s'havia descrit que les proteïnes Id, inhibidors dels factors bHLH, podien ser regulades pels mateixos factors bHLH. És el cas dels factors bHLH ME1, ME2 i NSCL1 que activen la transcripció d'Id-2 durant el desenvolupament neuronal (Neuman et al., 1995). El fet que E47 reguli transcripcionalment l'expressió del seu inhibidor Id-1 dóna lloc a un mecanisme de *feedback* molt interessant. En una cèl·lula normal, E47 desenvoluparia les seves funcions i paral·lelament induiria l'expressió d'Id-1, de manera que quan s'assolís el balanç E47/Id-1 apropiat, E47 deixaria de ser funcional i al mateix temps s'aturaria la inducció d'Id-1, tornant així a la situació basal. L'expressió constitutiva d'E47 en les cèl·lules MDCK-E47 impediria arribar a un equilibri E47/Id-1. D'aquesta manera hi hauria una expressió aberrant d'Id-1 semblant al que ocorre en molts carcinomes.

Aquests fets suggereixen que l'expressió d'Id-1 i la via Erk/MAPK podrien cooperar de forma sinèrgica incrementant la magnitud dels canvis fenotípics en les cèl·lules MDCK induïts per l'expressió estable d'E47 i *Snail*.

6. Mecanismes comuns de la regulació transcripcional dels gens coexpressats durant la TEM induïda per E47 o *Snail*.

Els nostres resultats de l'estudi de l'activació transcripcional de MMP-9 i Id-1 induïda per E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK que han sofert una TEM demostren que en el primer cas la caixa E, que és la seqüència que reconeixen aquests factors, no hi està implicada mentre que en el segon cas hi juga un paper crucial. Això suggereix que els gens activats durant la TEM induïda per E47 i *Snail* es podrien agrupar en dos grups, aquells en que l'activació transcripcional és directa per la unió d'aquests factors de transcripció als seus promotors, i aquells que s'activen indirectament per acció d'altres vies activades per aquests factors de transcripció o subsidiàries a la pèrdua de la cadherina E, com és la via Erk/MAPK. De fet, estudis previs en morfogènesi demostren que la repressió transcripcional de la cadherina E porta a l'activació de la via Ras-MAPK com a conseqüència de l'alliberament de proteïnes d'adhesió associades a contactes cel·lulars que tenen funcions duals en la senyalització cel·lular (Jamora et al., 2005).

Comparant els mecanismes de regulació de l'activació transcripcional de MMP-9 i Id-1 induïda per E47 i *Snail* s'observa que en ambdós casos és essencial la participació de la via Erk/MAPK que actua fosforilant, almenys Sp1, i afavorint la seva unió a les regions promotores. Això suggereix que podria tractar-se d'un mecanisme més generalitzat a les TEMs com a conseqüència de l'activació de la via Erk/MAPK probablement subsidiària a la pèrdua de la funció de la cadherina E, la qual cosa concorda amb la participació de la via Erk/MAPK en les TEMs, ja descrit en estudis

previs (Janda et al., 2002a; Montesano et al., 1999; Schramek et al., 1997a; Schramek et al., 1997b).

Atesos aquests resultats, en el laboratori estem analitzant el mecanisme d'activació d'altres gens també sobreexpressats en les TEMs. En la figura D.5 es mostra un esquema mecanístic de l'activació transcripcional de gens induïda per E47 i *Snail* basat en els resultats que s'han obtingut en aquest treball i en l'anàlisi *in silico* dels promotors d'alguns dels gens trobats diferencialment activats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV.

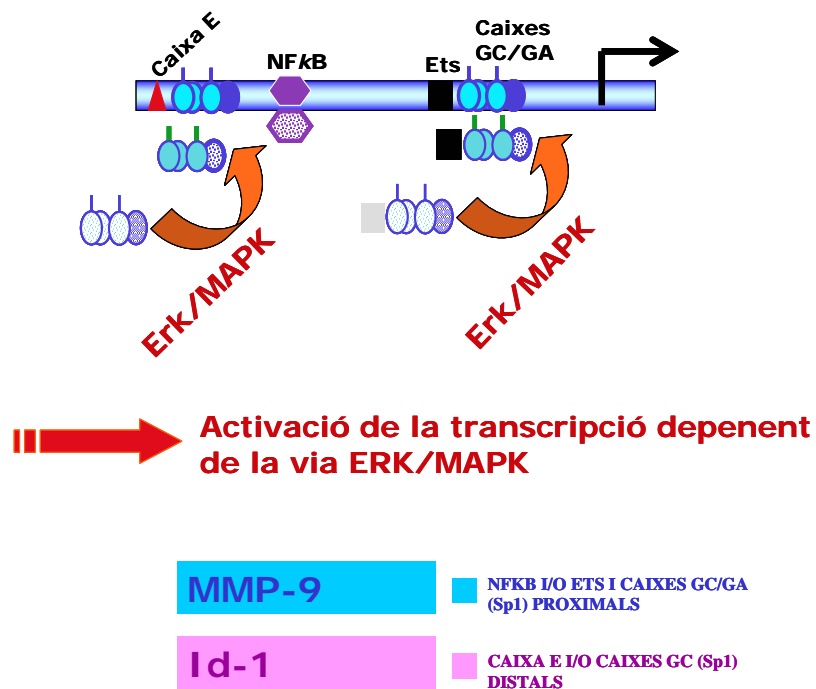


Figura D.5. Mecanismes generals de l'activació transcripcional de gens induïda per E47 i/o *Snail* en la TEM. Els gens induïts per E47 i *Snail* durant la TEM es classificarien en dos grups segons el mecanisme d'activació transcripcional: els que s'activen directament per la unió d'aquests factors de transcripció a les caixes E dels seus promotors, com Id-1, i els que s'activen indirectament per l'activació d'altres factors de transcripció, com MMP-9. En tots dos casos, l'activació és dependent de la via Erk/MAPK.

CONCLUSIONS

- 1 El nostre model de transició epiteli-mesènquima (TEM), que inclou la línia cel·lular epitelial MDCK (*Madin Darvy Canine Kidney*) i les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que han sofert una TEM, és una bona eina per la identificació de gens involucrats en la TEM i l'estudi dels mecanismes moleculars responsables dels canvis en l'expressió gènica. La tècnica de *RNA arbitrarily primed-PCR (RAP-PCR)* és una tècnica sensible, reproducible i precisa que permet la detecció de RNAs arbitraris corresponents a gens que s'expressen diferencialment, en aquest cas, durant la TEM. La RAP-PCR i els *microarrays* són tècniques complementàries i aplicables a l'expressió diferencial associada a la TEM.

- 2 L'expressió estable d'E47 o *Snail* en les cèl·lules MDCK causa guanys i pèrdues d'expressió en gens que codifiquen per productes amb funcions cel·lulars diverses com adhesió cel·lular, reorganització del citoesquelet, remodelació de la matriu extracel·lular, apoptosi, metabolisme, cicle cel·lular, entre altres.
 - 2.1 El total de canvis (guanys i pèrdues) d'expressió respecte les cèl·lules epitelials MDCK és superior a les cèl·lules que expressen *Snail* que a les que expressen E47.
 - 2.2 El percentatge de guanys d'expressió és superior al de pèrdues en les cèl·lules que expressen E47.
 - 2.3 El percentatge de guanys d'expressió és inferior al de pèrdues en les cèl·lules que expressen *Snail*.
 - 2.4 Dels gens diferencialment expressats trobats per RAP-PCR el 65% són comuns en ambdues línies cel·lulars mentre que segons els *microarrays* de cDNA els comuns representen el 33%.
 - 2.5 Un 39%, segons les RAP-PCRs, i un 33 %, segons els *microarrays*, del total de gens detectats diferencialment expressats estan associats a invasió i migració cel·lular. A més a més, la majoria d'aquests gens estan diferencialment expressats i de la mateixa manera en les dues línies cel·lulars.
 - 2.6 Els canvis d'expressió restringits a les cèl·lules MDCK-E47 respecte a les MDCK-CMV són sempre guanys.
 - 2.7 Els canvis d'expressió restringits a les cèl·lules MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV són majoritàriament pèrdues.

- 3 L'expressió estable d'E47 o *Snail* en les cèl·lules MDCK provoca l'activació, directa o indirecta, de les vies de senyalització d'Erk/MAPK i/o PI3K/Akt.

- 4 L'expressió estable d'E47 o *Snail* en les cèl·lules MDCK produeix un augment de l'expressió del factor de transcripció Sp1 a nivell de proteïna així com del seu estat de fosforilació, aquest darrer mediat, almenys en part, per la via Erk/MAPK.

- 5 L'expressió estable d'E47 o *Snail* en les cèl·lules MDCK indueix l'expressió de la metal·loproteasa MMP-9 a nivell de mRNA i de proteïna així com l'activitat gelatinolítica. Aquesta activació és major en les cèl·lules MDCK-E47 que en les cèl·lules MDCK-Snail.
 - 5.1 L'augment de l'expressió és conseqüència de l'activació transcripcional del gen MMP-9 mediada per la unió diferencial de diversos factors de transcripció a diferents elements reguladors: un lloc NFκB, un lloc Ets-1, un lloc Sp1-LA (de baixa afinitat) i un lloc Sp1-HA (d'alta afinitat).
 - 5.2 L'activació de la transcripció de MMP-9 no és dona per la unió directa d'E47 o de *Snail* a la única caixa E del promotor situada a -644 pb respecte l'inici de transcripció.
 - 5.3 Almenys la subunitat p65 forma part del dímer NFκB que s'uneix a l'element localitzat a -561 pb respecte l'inici de transcripció del promotor de MMP-9, i la unió és major a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que a les cèl·lules MDCK-CMV.
 - 5.4 Ets-1 i Sp1 activen l'activitat promotora de MMP-9 de forma sinèrgica per unió directa al lloc Ets-1 situat a -86 pb, al lloc Sp1-LA situat a -89 pb i al lloc Sp1-HA situat a -82 pb respecte l'inici de transcripció, formant un multicomplexe en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. La formació d'aquest multicomplexe és regulada, almenys en part, per la via Erk/MAPK.
 - 5.5 L'augment i/o fosforilació de Sp1 mediada per la via Erk/MAPK afaforeix la seva unió al promotor proximal de MMP-9 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV i influencia positivament en l'activitat transcripcional de MMP-9. En les cèl·lules MDCK-Snail la via PI3K/Akt coopera amb la via Erk/MAPK en aquesta activació.
 - 5.6 L'oncogen H-Ras activa la transcripció de MMP-9 i pot cooperar sinèrgicament amb *Snail*. La via Erk/MAPK participa en aquesta activació. A més a més, Ras és necessari per l'activació mediada per *Snail*.

- 6 L'expressió estable d'E47 o *Snail* en les cèl·lules MDCK indueix l'expressió del factor HLH Id-1 a nivell de mRNA i de proteïna, independentment del sèrum.
 - 6.1 L'augment de l'expressió és conseqüència de l'activació de la transcripció d'Id-1. Aquesta activació es dona per la unió directa de factors de transcripció a

diferents elements reguladors tals com les caixes E situades a -1256 i -1125 pb i la caixa GC situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció.

- 6.2 En les cèl·lules MDCK-E47, el factor E47 s'uneix a la caixa E situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció i interacciona almenys amb Sp1 reclutat per la caixa GC adjacent formant un complex multiproteic de molt poca mobilitat electroforètica.
- 6.3 En les cèl·lules MDCK-Snail també es forma un multicomplexe de molt baixa mobilitat electroforètica que inclou almenys Sp1 i probablement *Snail*.
- 6.4 La via Erk/MAPK regula positivament els nivells de proteïna d'Id-1 i influencia positivament l'activitat transcripcional. L'augment i/o fosforilació de Sp1 mediada per la via Erk/MAPK afavoreix la seva unió al promotor distal d'Id-1 en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV.
- 6.5 L'oncogen H-Ras activat augmenta l'activitat transcripcional d'Id-1 via Erk/MAPKs.

BIBLIOGRAFIA

- Agrez, M. V., and Bates, R. C. (1994). Colorectal cancer and the integrin family of cell adhesion receptors: current status and future directions. *Eur J Cancer* 30A, 2166-2170.
- Ahonen, M., Baker, A. H., and Kahari, V. M. (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 58, 2310-2315.
- Akao, M., Ueshima, S., Okada, K., Fukao, H., Seki, T., Ariga, T., and Matsuo, O. (2003). Cellular density regulation of plasminogen gene expression in mouse hepatocytes. *Life Sci* 72, 1695-1704.
- Akhurst, R. J., and Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11, S44-51.
- Akiyoshi, S., Ishii, M., Nemoto, N., Kawabata, M., Aburatani, H., and Miyazono, K. (2001). Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res* 92, 257-268.
- Ala-Aho, R., Johansson, N., Baker, A. H., and Kahari, V. M. (2002). Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Int J Cancer* 97, 283-289.
- Alani, R. M., Hasskarl, J., Grace, M., Hernandez, M. C., Israel, M. A., and Munger, K. (1999). Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9637-9641.
- Alexander, C. M., Howard, E. W., Bissell, M. J., and Werb, Z. (1996). Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol* 135, 1669-1677.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-5354.
- Andela, V. B., Schwarz, E. M., Puzas, J. E., O'Keefe, R. J., and Rosier, R. N. (2000). Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res* 60, 6557-6562.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225.
- Armstrong, S. A., Barry, D. A., Leggett, R. W., and Mueller, C. R. (1997). Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 272, 13489-13495.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., and Walker, M. D. (1993a). Cell-specific expression of helix-loop-helix transcription factors encoded by the E2A gene. *Nucleic Acids Res* 21, 1601-1606.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., and Walker, M. D. (1993b). The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8063-8067.
- Atchley, W. R., and Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5172-5176.
- Bain, G., Cravatt, C. B., Loomans, C., Alberola-Ila, J., Hedrick, S. M., and Murre, C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* 2, 165-171.
- Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Volland, J. R., Sharp, L. L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-4791.
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., and et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.

- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L., and Arteaga, C. L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* *275*, 36803-36810.
- Ban, S., Goto, Y., Mitsuki, N., Kamada, K., Fujita, T., and Takahama, M. (2002). Change in cytoskeletal phenotype and extracellular matrix production of muscularis mucosae during early invasive colorectal adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* *21*, 401-407.
- Barbera, M. J., Puig, I., Dominguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiro, S., Baulida, J., Franci, C., Dedhar, S., Larue, L., and Garcia De Herreros, A. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene*.
- Barrett, A. J. (1981). Alpha 2-macroglobulin. *Methods Enzymol* *80 Pt C*, 737-754.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* *2*, 84-89.
- Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J. R., and Hofler, H. (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* *54*, 3845-3852.
- Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L., and Birchmeier, W. (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 11495-11499.
- Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M., and Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* *108*, 2435-2447.
- Belien, A. T., Paganetti, P. A., and Schwab, M. E. (1999). Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol* *144*, 373-384.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lassar, A., Tapscott, S., Thayer, M., Lockshon, D., and Weintraub, H. (1990a). Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci* *599*, 1-11.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., and Weintraub, H. (1990b). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* *61*, 49-59.
- Benezra, R., Rafii, S., and Lyden, D. (2001). The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* *20*, 8334-8341.
- Bernhard, E. J., Muschel, R. J., and Hughes, E. N. (1990). Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* *50*, 3872-3877.
- Berry, M. G., Goode, A. W., Puddefoot, J. R., Vinson, G. P., and Carpenter, R. (2003). Integrin beta1-mediated invasion of human breast cancer cells: an ex vivo assay for invasiveness. *Breast Cancer* *10*, 214-219.
- Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van de Vijver, M., Cornelisse, C., and van Roy, F. (1995). E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo J* *14*, 6107-6115.
- Berx, G., Nollet, F., and van Roy, F. (1998). Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* *6*, 171-184.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., and Brand-Saberi, B. (1996). Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)* *156*, 217-226.
- Birchmeier, W., Weidner, K. M., Hulsken, J., and Behrens, J. (1993). Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* *4*, 231-239.

- Black, A. R., Black, J. D., and Azizkhan-Clifford, J. (2001). Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188, 143-160.
- Blanco, M. J., Moreno-Bueno, G., Sarrío, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J., and Nieto, M. A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241-3246.
- Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandebunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 147, 1298-1310.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511.
- Bottinger, E. P., and Kopp, J. B. (1998). Lessons from TGF-beta transgenic mice. *Miner Electrolyte Metab* 24, 154-160.
- Boulay, J. L., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1987). The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* 330, 395-398.
- Bounpheng, M. A., Dimas, J. J., Dodds, S. G., and Christy, B. A. (1999). Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J* 13, 2257-2264.
- Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38.
- Boyer, B., Dufour, S., and Thiery, J. P. (1992). E-cadherin expression during the acidic FGF-induced dispersion of a rat bladder carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 201, 347-357.
- Boyer, B., Valles, A. M., and Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 60, 1091-1099.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradshaw, A. D., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107, 1049-1054.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* 19, 569-580.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 19, 816-827.
- Brenner, K. A., Corbett, S. A., and Schwarzbauer, J. E. (2000). Regulation of fibronectin matrix assembly by activated Ras in transformed cells. *Oncogene* 19, 3156-3163.
- Brockbank, E. C., Bridges, J., Marshall, C. J., and Sahai, E. (2005). Integrin beta1 is required for the invasive behaviour but not proliferation of squamous cell carcinoma cells in vivo. *Br J Cancer* 92, 102-112.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Brown, L. M., Fox, H. L., Hazen, S. A., LaNoue, K. F., Rannels, S. R., and Lynch, C. J. (1997). Role of the matrixin MMP-2 in multicellular organization of adipocytes cultured in basement membrane components. *Am J Physiol* 272, C937-949.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Burdsal, C. A., Damsky, C. H., and Pedersen, R. A. (1993). The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* 118, 829-844.
- Byers, S., Park, M., Sommers, C., and Seslar, S. (1994). Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast Cancer Res Treat* 31, 203-215.
- Calmels, T. P., Mattot, V., Wernert, N., Vandebunder, B., and Stehelin, D. (1995). Invasive tumors induce c-ets1 transcription factor expression in adjacent stroma. *Biol Cell* 84, 53-61.
- Campbell, S. E., Nasir, L., Argyle, D. J., and Bennett, D. (2001). Molecular cloning and characterization of canine metalloproteinase-9 gene promoter. *Gene* 273, 81-87.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F., and Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21, 8184-8188.
- Caulin, C., Scholl, F. G., Frontelo, P., Gamallo, C., and Quintanilla, M. (1995). Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth Differ* 6, 1027-1035.
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., and Guan, J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 270, 16995-16999.
- Chen, Q., Lin, T. H., Der, C. J., and Juliano, R. L. (1996). Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras [corrected]. *J Biol Chem* 271, 18122-18127.
- Chen, W. C., and Obrink, B. (1991). Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells. *J Cell Biol* 114, 319-327.
- Chen, Y., Lu, Q., Schneeberger, E. E., and Goodenough, D. A. (2000). Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11, 849-862.
- Cheng, C. W., Wu, P. E., Yu, J. C., Huang, C. S., Yue, C. T., Wu, C. W., and Shen, C. Y. (2001). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20, 3814-3823.
- Chintala, S. K., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., Majumder, S., Giri, D. K., Kyritsis, A. P., Gokaslan, Z. L., and Rao, J. S. (1998). Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells. *J Biol Chem* 273, 13545-13551.
- Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Christy, B. A., Sanders, L. K., Lau, L. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nathans, D. (1991). An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1815-1819.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133, 1403-1415.
- Ciruna, B., and Rossant, J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 7, 37-49.

- Collo, G., Starr, L., and Quaranta, V. (1993). A new isoform of the laminin receptor integrin alpha 7 beta 1 is developmentally regulated in skeletal muscle. *J Biol Chem* *268*, 19019-19024.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* *7*, 1267-1278.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A., and Shapiro, S. D. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* *161*, 6845-6852.
- Cui, W., Fowles, D. J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A., and Akhurst, R. J. (1996). TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* *86*, 531-542.
- Dalal, S. S., Welsh, J., Tkachenko, A., Ralph, D., DiCicco-Bloom, E., Bordas, L., McClelland, M., and Chada, K. (1994). Rapid isolation of tissue-specific and developmentally regulated brain cDNAs using RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). *J Mol Neurosci* *5*, 93-104.
- Damjanov, I., Damjanov, A., and Damsky, C. H. (1986). Developmentally regulated expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in peri-implantation mouse embryos and extraembryonic membranes. *Dev Biol* *116*, 194-202.
- Davis, L. G., Dibner, M. D., and Battey, J. F. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier.
- Davis, R. L., Cheng, P. F., Lassar, A. B., and Weintraub, H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* *60*, 733-746.
- De Bruin, A., Muller, E., Wurm, S., Caldelari, R., Wyder, M., Wheelock, M. J., and Suter, M. M. (1999). Loss of invasiveness in squamous cell carcinoma cells overexpressing desmosomal cadherins. *Cell Adhes Commun* *7*, 13-28.
- Deed, R. W., Armitage, S., and Norton, J. D. (1996). Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism. *J Biol Chem* *271*, 23603-23606.
- Deed, R. W., Bianchi, S. M., Atherton, G. T., Johnston, D., Santibanez-Koref, M., Murphy, J. J., and Norton, J. D. (1993). An immediate early human gene encodes an Id-like helix-loop-helix protein and is regulated by protein kinase C activation in diverse cell types. *Oncogene* *8*, 599-607.
- Deed, R. W., Hara, E., Atherton, G. T., Peters, G., and Norton, J. D. (1997). Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* *17*, 6815-6821.
- Deed, R. W., Jasiok, M., and Norton, J. D. (1994). Nucleotide sequence of the cDNA encoding human helix-loop-helix Id-1 protein: identification of functionally conserved residues common to Id proteins. *Biochim Biophys Acta* *1219*, 160-162.
- del Barrio, M. G., and Nieto, M. A. (2002). Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* *129*, 1583-1593.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* *29*, 117-129.
- Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 577-584.
- Desiderio, S. (1995). Lymphopoiesis. Transcription factors controlling B-cell development. *Curr Biol* *5*, 605-608.
- Desprez, P. Y., Hara, E., Bissell, M. J., and Campisi, J. (1995). Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* *15*, 3398-3404.
- Desprez, P. Y., Lin, C. Q., Thomasset, N., Sympton, C. J., Bissell, M. J., and Campisi, J. (1998). A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* *18*, 4577-4588.

- Dittmer, J., Gegonne, A., Gitlin, S. D., Ghysdael, J., and Brady, J. N. (1994). Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem* *269*, 21428-21434.
- 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. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* *23*, 5078-5089.
- Dong, G., Loukinova, E., Chen, Z., Gangi, L., Chanturita, T. I., Liu, E. T., and Van Waes, C. (2001). Molecular profiling of transformed and metastatic murine squamous carcinoma cells by differential display and cDNA microarray reveals altered expression of multiple genes related to growth, apoptosis, angiogenesis, and the NF-kappaB signal pathway. *Cancer Res* *61*, 4797-4808.
- Eberhardt, W., Beeg, T., Beck, K. F., Walpen, S., Gauer, S., Bohles, H., and Pfeilschifter, J. (2000). Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int* *57*, 59-69.
- Echtermeyer, F., Schober, S., Poschl, E., von der Mark, H., and von der Mark, K. (1996). Specific induction of cell motility on laminin by alpha 7 integrin. *J Biol Chem* *271*, 2071-2075.
- Edelman, G. M., Gallin, W. J., Delouree, A., Cunningham, B. A., and Thiery, J. P. (1983). Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 4384-4388.
- Edme, N., Downward, J., Thiery, J. P., and Boyer, B. (2002). Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways. *J Cell Sci* *115*, 2591-2601.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* *2*, 161-174.
- Eichner, R., Sun, T. T., and Aebi, U. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol* *102*, 1767-1777.
- Ellerbroek, S. M., Halbleib, J. M., Benavidez, M., Warmka, J. K., Wattenberg, E. V., Stack, M. S., and Hudson, L. G. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* *61*, 1855-1861.
- Engelman, J. A., Wykoff, C. C., Yasuhara, S., Song, K. S., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1997). Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* *272*, 16374-16381.
- Ephrussi, A., Church, G. M., Tonegawa, S., and Gilbert, W. (1985). B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* *227*, 134-140.
- Evans, S. M., and O'Brien, T. X. (1993). Expression of the helix-loop-helix factor Id during mouse embryonic development. *Dev Biol* *159*, 485-499.
- Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X., and Vandembunder, B. (1997). The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ* *8*, 655-665.
- Farah, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J., and Turner, D. L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* *127*, 693-702.
- Faraldo, M. L., and Cano, A. (1993). The 5' flanking sequences of the mouse P-cadherin gene. Homologies to 5' sequences of the E-cadherin gene and identification of a first 215 base-pair intron. *J Mol Biol* *231*, 935-941.
- Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W., and Cano, A. (1997). Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* *20*, 33-47.
- Farina, A. R., Tacconelli, A., Vacca, A., Maroder, M., Gulino, A., and Mackay, A. R. (1999). Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to

neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ* 10, 353-367.

Fernandez-Garcia, N. I., Palmer, H. G., Garcia, M., Gonzalez-Martin, A., Del Rio, M., Baretino, D., Volpert, O., Munoz, A., and Jimenez, B. (2005). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene*.

Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M., and Beug, H. (1996). The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 132, 1115-1132.

Fidler, I. J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50, 6130-6138.

Filmus, J., Zhao, J., and Buick, R. N. (1992). Overexpression of H-ras oncogene induces resistance to the growth-inhibitory action of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) and alters the number and type of TGF-beta 1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones. *Oncogene* 7, 521-526.

Fini, M. E., Bartlett, J. D., Matsubara, M., Rinehart, W. B., Mody, M. K., Girard, M. T., and Rainville, M. (1994). The rabbit gene for 92-kDa matrix metalloproteinase. Role of AP1 and AP2 in cell type-specific transcription. *J Biol Chem* 269, 28620-28628.

Fisher, C., Gilbertson-Beadling, S., Powers, E. A., Petzold, G., Poorman, R., and Mitchell, M. A. (1994). Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 162, 499-510.

Fojas de Borja, P., Collins, N. K., Du, P., Azizkhan-Clifford, J., and Mudryj, M. (2001). Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *Embo J* 20, 5737-5747.

Fong, S., Itahana, Y., Sumida, T., Singh, J., Coppe, J. P., Liu, Y., Richards, P. C., Bennington, J. L., Lee, N. M., Debs, R. J., and Desprez, P. Y. (2003). Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13543-13548.

Freije, J. M., Balbin, M., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., Puente, X. S., and Lopez-Otin, C. (2003). Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 532, 91-107.

Fridman, R., Toth, M., Chvyrkova, I., Meroueh, S. O., and Mobashery, S. (2003). Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev* 22, 153-166.

Fridman, R., Toth, M., Pena, D., and Mobashery, S. (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 55, 2548-2555.

Fujita, N., Jaye, D. L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C. S., and Wade, P. A. (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* 113, 207-219.

Furuchi, T., and Anderson, R. G. (1998). Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem* 273, 21099-21104.

Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403-411.

Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J. A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R. G., and Lisanti, M. P. (1998). Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *Embo J* 17, 6633-6648.

Garbisa, S., Onisto, M., Peron, A., Perissin, L., Rapozzi, V., Zorzet, S., and Girdali, T. (1997). Suppression of metastatic potential and up-regulation of gelatinases and uPA in LLC by protracted in vivo treatment with dacarbazine or razoxane. *Int J Cancer* 72, 1056-1061.

Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.

Gille, H., Sharrocks, A. D., and Shaw, P. E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358, 414-417.

- Gilles-Gonzalez, M. A., and Gonzalez, G. (2004). Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J Appl Physiol* *96*, 774-783.
- Gimond, C., van Der Flier, A., van Delft, S., Brakebusch, C., Kuikman, I., Collard, J. G., Fassler, R., and Sonnenberg, A. (1999). Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol* *147*, 1325-1340.
- Goetze, S., Kintscher, U., Kaneshiro, K., Meehan, W. P., Collins, A., Fleck, E., Hsueh, W. A., and Law, R. E. (2001). TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* *159*, 93-101.
- Goldfarb, A. N., Lewandowska, K., and Pennell, C. A. (1998). Identification of a highly conserved module in E proteins required for in vivo helix-loop-helix dimerization. *J Biol Chem* *273*, 2866-2873.
- Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* *74*, 111-122.
- Gomez, M., and Cano, A. (1995). Expression of beta 1 integrin receptors in transformed mouse epidermal keratinocytes: upregulation of alpha 5 beta 1 in spindle carcinoma cells. *Mol Carcinog* *12*, 153-165.
- Gorelik, L., and Flavell, R. A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* *7*, 1118-1122.
- Gotzmann, J., Huber, H., Thallinger, C., Wolschek, M., Jansen, B., Schulte-Hermann, R., Beug, H., and Mikulits, W. (2002). Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *J Cell Sci* *115*, 1189-1202.
- Govindarajan, B., Bai, X., Cohen, C., Zhong, H., Kilroy, S., Louis, G., Moses, M., and Arbisser, J. L. (2003). Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling. *J Biol Chem* *278*, 9790-9795.
- Graff, J. R., Herman, J. G., Lapidus, R. G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D. F., Isaacs, W. B., Pitha, P. M., Davidson, N. E., and Baylin, S. B. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* *55*, 5195-5199.
- Greenwood, M. D., Marsden, M. D., Cowley, C. M., Sahota, V. K., and Buxton, R. S. (1997). Exon-intron organization of the human type 2 desmocollin gene (DSC2): desmocollin gene structure is closer to "classical" cadherins than to desmogleins. *Genomics* *44*, 330-335.
- Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B., and Tschlis, P. N. (1996). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* *16*, 6263-6272.
- Grooteclaes, M. L., and Frisch, S. M. (2000). Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* *19*, 3823-3828.
- Gross, J., and Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* *48*, 1014-1022.
- Grosshans, J., and Wieschaus, E. (2000). A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* *101*, 523-531.
- Grunert, S., Jechlinger, M., and Beug, H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 657-665.
- Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S. J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J. W., Liddington, R. C., and Lipton, S. A. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* *297*, 1186-1190.
- Guaïta, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A. G., and Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* *277*, 39209-39216.

- Guedez, L., Courtemanch, L., and Stetler-Stevenson, M. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* *92*, 1342-1349.
- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., and Reeve, A. E. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* *392*, 402-405.
- Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M., and Boyd, D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* *271*, 10672-10680.
- Gum, R., Wang, H., Lengyel, E., Juarez, J., and Boyd, D. (1997). Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* *14*, 1481-1493.
- Gumbiner, B. M. (1995). Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 634-640.
- Gutman, A., and Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *Embo J* *9*, 2241-2246.
- Hajra, K. M., and Fearon, E. R. (2002). Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *34*, 255-268.
- Han, I., and Kudlow, J. E. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* *17*, 2550-2558.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *35*, 307-340.
- Hasskarl, J., and Munger, K. (2002). Id proteins--tumor markers or oncogenes? *Cancer Biol Ther* *1*, 91-96.
- Hata, K., and Mizuguchi, J. (2004). Genomic organization and characterization of the promoter for the E2A gene. *Gene* *325*, 53-61.
- Hatzfeld, M., and Franke, W. W. (1985). Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J Cell Biol* *101*, 1826-1841.
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* *154*, 8-20.
- Hazzalin, C. A., and Mahadevan, L. C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 30-40.
- Hemavathy, K., Ashraf, S. I., and Ip, Y. T. (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* *257*, 1-12.
- Henderson, A. M., Wang, S. J., Taylor, A. C., Aitkenhead, M., and Hughes, C. C. (2001). The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* *276*, 6169-6176.
- Hennig, G., Behrens, J., Truss, M., Frisch, S., Reichmann, E., and Birchmeier, W. (1995). Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene* *11*, 475-484.
- Hennig, G., Lowrick, O., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1996). Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem* *271*, 595-602.

- Henthorn, P. S., Stewart, C. C., Kadesch, T., and Puck, J. M. (1991). The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* *11*, 374-378.
- Herman, M. P., Sukhova, G. K., Kisiel, W., Foster, D., Kehry, M. R., Libby, P., and Schonbeck, U. (2001). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* *107*, 1117-1126.
- Hernandez, M. C., Andres-Barquin, P. J., and Israel, M. A. (1996). Molecular cloning of the cDNA encoding a helix-loop-helix protein, mouse ID1B: tissue-specific expression of ID1A and ID1B genes. *Biochim Biophys Acta* *1308*, 28-30.
- Himmelstein, B. P., Canete-Soler, R., Bernhard, E. J., Dilks, D. W., and Muschel, R. J. (1994). Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis* *14*, 246-258.
- Hu, M. H., Bauman, E. M., Roll, R. L., Yeilding, N., and Abrams, C. S. (1999). Pleckstrin 2, a widely expressed paralog of pleckstrin involved in actin rearrangement. *J Biol Chem* *274*, 21515-21518.
- Hua, J., and Muschel, R. J. (1996). Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res* *56*, 5279-5284.
- Hubank, M., and Schatz, D. G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* *22*, 5640-5648.
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* *114*, 569-581.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., and Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* *59*, 3-10.
- Huhtala, P., Tuuttila, A., Chow, L. T., Lohi, J., Keski-Oja, J., and Tryggvason, K. (1991). Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem* *266*, 16485-16490.
- Hujanen, E. S., Vaisanen, A., Zheng, A., Tryggvason, K., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (1994). Modulation of M(r) 72,000 and M(r) 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. *Int J Cancer* *58*, 582-586.
- Hurlin, P. J., Ayer, D. E., Grandori, C., and Eisenman, R. N. (1994). The Max transcription factor network: involvement of Mad in differentiation and an approach to identification of target genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *59*, 109-116.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
- Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., and Israel, M. A. (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* *8*, 1270-1284.
- Ibanez-Tallon, I., Ferrai, C., Longobardi, E., Facetti, I., Blasi, F., and Crippa, M. P. (2002). Binding of Sp1 to the proximal promoter links constitutive expression of the human uPA gene and invasive potential of PC3 cells. *Blood* *100*, 3325-3332.
- Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* *116*, 1959-1967.
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D., and Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* *322* (Pt 3), 809-814.
- Imhof, B. A., Vollmers, H. P., Goodman, S. L., and Birchmeier, W. (1983). Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* *35*, 667-675.

- Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R., and Uehira, M. (1999). Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17, 177-181.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., and Itohara, S. (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58, 1048-1051.
- Jackson, S., Gottlieb, T., and Hartley, K. (1993). Phosphorylation of transcription factor Sp1 by the DNA-dependent protein kinase. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 28, 279-286.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., and Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422, 317-322.
- Jamora, C., and Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4, E101-108.
- Jamora, C., Lee, P., Kocieniewski, P., Azhar, M., Hosokawa, R., Chai, Y., and Fuchs, E. (2005). A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis. *PLoS Biol* 3, e11.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grunert, S. (2002a). Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156, 299-313.
- Janda, E., Litos, G., Grunert, S., Downward, J., and Beug, H. (2002b). Oncogenic Ras/Her-2 mediate hyperproliferation of polarized epithelial cells in 3D cultures and rapid tumor growth via the PI3K pathway. *Oncogene* 21, 5148-5159.
- Javaux, F., Donda, A., Vassart, G., and Christophe, D. (1991). Cloning and sequence analysis of TFE, a helix-loop-helix transcription factor able to recognize the thyroglobulin gene promoter in vitro. *Nucleic Acids Res* 19, 1121-1127.
- Jechlinger, M., Grunert, S., Tamir, I. H., Janda, E., Ludemann, S., Waerner, T., Seither, P., Weith, A., Beug, H., and Kraut, N. (2003). Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 22, 7155-7169.
- Jiang, R., Lan, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., and Gridley, T. (1998). The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol* 198, 277-285.
- Jiang, Y., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21, 2245-2252.
- Jin, F., Nathan, C. F., and Ding, A. (1999). Paradoxical preservation of a lipopolysaccharide response in C3H/HeJ macrophages: induction of matrix metalloproteinase-9. *J Immunol* 162, 3596-3600.
- Jinnin, M., Ihn, H., Asano, Y., Yamane, K., Trojanowska, M., and Tamaki, K. (2004). Tenascin-C upregulation by transforming growth factor-beta in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene* 23, 1656-1667.
- Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Johnson, S. E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E. J., and Konieczny, S. F. (1996). Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation. *Mol Cell Biol* 16, 1604-1613.
- Jones, J. L., Glynn, P., and Walker, R. A. (1999). Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 189, 161-168.
- Joo, Y. E., Seo, K. S., Kim, H. S., Rew, J. S., Park, C. S., and Kim, S. J. (2000). Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 45, 114-121.
- Kageyama, R., Ishibashi, M., Takebayashi, K., and Tomita, K. (1997). bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1389-1399.

- Kageyama, R., Sasai, Y., Akazawa, C., Ishibashi, M., Takebayashi, K., Shimizu, C., Tomita, K., and Nakanishi, S. (1995). Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Crit Rev Neurobiol* *9*, 177-188.
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* *153*, 893-904.
- Kang, Y., Chen, C. R., and Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* *11*, 915-926.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* *270*, 16483-16486.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* *18*, 621-663.
- Kasai, Y., Nambu, J. R., Lieberman, P. M., and Crews, S. T. (1992). Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 3414-3418.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* *127*, 1755-1766.
- Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S., and Kita, T. (2000). A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* *28*, 626-633.
- Kavurma, M. M., Bobryshev, Y., and Khachigian, L. M. (2002). Ets-1 positively regulates Fas ligand transcription via cooperative interactions with Sp1. *J Biol Chem* *277*, 36244-36252.
- Kebebew, E., Treseler, P. A., Duh, Q. Y., and Clark, O. H. (2000). The helix-loop-helix transcription factor, Id-1, is overexpressed in medullary thyroid cancer. *Surgery* *128*, 952-957.
- Kee, B. L., and Murre, C. (1998). Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med* *188*, 699-713.
- Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* *9*, 317-321.
- Kemler, R., Ozawa, M., and Ringwald, M. (1989). Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* *1*, 892-897.
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., and Greenspan, D. S. (1996). Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* *271*, 360-362.
- Kho, C. J., Huggins, G. S., Endege, W. O., Hsieh, C. M., Lee, M. E., and Haber, E. (1997). Degradation of E2A proteins through a ubiquitin-conjugating enzyme, UbcE2A. *J Biol Chem* *272*, 3845-3851.
- Kiemer, A. K., Takeuchi, K., and Quinlan, M. P. (2001). Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene* *20*, 6679-6688.
- Kim, D., Peng, X. C., and Sun, X. H. (1999). Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* *19*, 8240-8253.
- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1998). Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* *94*, 353-362.
- Kim, S. J., Lee, H. D., Robbins, P. D., Busam, K., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1991). Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 3052-3056.

- Kim, S. J., Onwuta, U. S., Lee, Y. I., Li, R., Botchan, M. R., and Robbins, P. D. (1992). The retinoblastoma gene product regulates Sp1-mediated transcription. *Mol Cell Biol* *12*, 2455-2463.
- Kim, Y. S., Kang, Y. K., Kim, J. B., Han, S. A., Kim, K. I., and Paik, S. R. (2000). beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas. *Pathol Int* *50*, 725-730.
- Kinsella, M. G., Bressler, S. L., and Wight, T. N. (2004). The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* *14*, 203-234.
- Kirkness, E. F., Bafna, V., Halpern, A. L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D. B., Delcher, A. L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C. M., and Venter, J. C. (2003). The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* *301*, 1898-1903.
- Klambt, C., Knust, E., Tietze, K., and Campos-Ortega, J. A. (1989). Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* *8*, 203-210.
- Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* *130*, 67-77.
- Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J., and Parker, P. J. (1994). The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* *4*, 798-806.
- Koizume, S., Tachibana, K., Sekiya, T., Hirohashi, S., and Shiraishi, M. (2002). Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res* *30*, 4770-4780.
- Koleske, A. J., Baltimore, D., and Lisanti, M. P. (1995). Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 1381-1385.
- Kondapaka, S. B., Fridman, R., and Reddy, K. B. (1997). Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* *70*, 722-726.
- Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S. K., Kin, Y., Jasti, S. L., Nirmala, C., Lakka, S. S., Adachi, Y., Kyritsis, A. P., Ali-Osman, F., *et al.* (2000). Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res* *60*, 6851-6855.
- Konduri, S. D., Tasiou, A., Chandrasekar, N., Nicolson, G. L., and Rao, J. S. (2000). Role of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in amelanotic melanoma (C-32) invasion. *Clin Exp Metastasis* *18*, 303-308.
- Koop, S., Khokha, R., Schmidt, E. E., MacDonald, I. C., Morris, V. L., Chambers, A. F., and Groom, A. C. (1994). Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res* *54*, 4791-4797.
- Kramer, R. H., McDonald, K. A., and Vu, M. P. (1989). Human melanoma cells express a novel integrin receptor for laminin. *J Biol Chem* *264*, 15642-15649.
- Kupferman, M. E., Fini, M. E., Muller, W. J., Weber, R., Cheng, Y., and Muschel, R. J. (2000). Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* *157*, 1777-1783.
- Lakka, S. S., Jasti, S. L., Kyritsis, A. P., Yung, W. K., Ali-Osman, F., Nicolson, G. L., and Rao, J. S. (2000). Regulation of MMP-9 (type IV collagenase) production and invasiveness in gliomas by the extracellular signal-regulated kinase and jun amino-terminal kinase signaling cascades. *Clin Exp Metastasis* *18*, 245-252.
- Lakka, S. S., Rajan, M., Gondi, C., Yanamandra, N., Chandrasekar, N., Jasti, S. L., Adachi, Y., Siddique, K., Gujrati, M., Olivero, W., *et al.* (2002). Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion. *Oncogene* *21*, 8011-8019.
- Lane, T. F., and Sage, E. H. (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *Faseb J* *8*, 163-173.

- Lasorella, A., Iavarone, A., and Israel, M. A. (1996). Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol Cell Biol* *16*, 2570-2578.
- Lasorella, A., Uo, T., and Iavarone, A. (2001). Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* *20*, 8326-8333.
- Ledda, M. F., Adris, S., Bover, L., Bravo, A. L., Mordoh, J., and Podhajcer, O. L. (1996). [The role of SPARC gene in tumorigenic capacity of human melanoma cells]. *Medicina (B Aires)* *56*, 51-54.
- Lee, J. D., Ulevitch, R. J., and Han, J. (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* *213*, 715-724.
- Lee, K. T., Lee, Y. W., Lee, J. K., Choi, S. H., Rhee, J. C., Paik, S. S., and Kong, G. (2004a). Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. *Br J Cancer* *90*, 1198-1203.
- Lee, S. W., Reimer, C. L., Oh, P., Campbell, D. B., and Schnitzer, J. E. (1998). Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* *16*, 1391-1397.
- Lee, Y. I., Kwon, Y. J., and Joo, C. K. (2004b). Integrin-linked kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* *316*, 997-1001.
- Lefebvre, V., Peeters-Joris, C., and Vaes, G. (1991). Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochim Biophys Acta* *1094*, 8-18.
- Lemercier, C., To, R. Q., Carrasco, R. A., and Konieczny, S. F. (1998). The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *Embo J* *17*, 1412-1422.
- Li, G., Fridman, R., and Kim, H. R. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* *59*, 6267-6275.
- Li, Q., Li, Z., Sun, C. X., and Yu, A. C. (2002). Identification of transcripts expressed under functional differentiation in primary culture of cerebral cortical neurons. *Neurochem Res* *27*, 147-154.
- Li, Y., Yang, J., Dai, C., Wu, C., and Liu, Y. (2003). Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* *112*, 503-516.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* *257*, 967-971.
- Lijnen, H. R. (2001). Role of the fibrinolytic and matrix metalloproteinase systems in arterial neointima formation after vascular injury. *Verh K Acad Geneesk Belg* *63*, 605-622.
- Lin, C. Q., Parrinello, S., Campisi, J., and Desprez, P. Y. (1999). Regulation of mammary epithelial cell phenotypes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Endocr Relat Cancer* *6*, 49-50.
- Lin, C. Q., Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., Parrinello, S., Liang, S. H., Gillett, C. E., Campisi, J., and Desprez, P. Y. (2000). A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* *60*, 1332-1340.
- Lindemann, R. K., Ballschmieter, P., Nordheim, A., and Dittmer, J. (2001). Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *J Biol Chem* *276*, 46661-46670.
- Ling, M. T., Wang, X., Lee, D. T., Tam, P. C., Tsao, S. W., and Wong, Y. C. (2004). Id-1 expression induces androgen-independent prostate cancer cell growth through activation of epidermal growth factor receptor (EGF-R). *Carcinogenesis* *25*, 517-525.
- Ling, M. T., Wang, X., Ouyang, X. S., Lee, T. K., Fan, T. Y., Xu, K., Tsao, S. W., and Wong, Y. C. (2002). Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* *21*, 8498-8505.

- Ling, M. T., Wang, X., Ouyang, X. S., Xu, K., Tsao, S. W., and Wong, Y. C. (2003). Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* 22, 4498-4508.
- Liotta, L. A., Abe, S., Robey, P. G., and Martin, G. R. (1979). Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2268-2272.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Reaves, T. A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C. A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2363-2374.
- Llorens, A., Rodrigo, I., Lopez-Barcons, L., Gonzalez-Garrigues, M., Lozano, E., Vinyals, A., Quintanilla, M., Cano, A., and Fabra, A. (1998). Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab Invest* 78, 1131-1142.
- Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M., and Munoz-Canoves, P. (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *Embo J* 24, 974-984.
- Locascio, A., Vega, S., de Frutos, C. A., Manzanares, M., and Nieto, M. A. (2002). Biological potential of a functional human SNAIL retrogene. *J Biol Chem* 277, 38803-38809.
- Lochter, A., Srebrow, A., Sympton, C. J., Terracio, N., Werb, Z., and Bissell, M. J. (1997). Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J Biol Chem* 272, 5007-5015.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J. L., and Ventura, F. (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* 277, 3176-3185.
- Lozonschi, L., Sunamura, M., Kobari, M., Egawa, S., Ding, L., and Matsuno, S. (1999). Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinase inhibitor, KB-R7785, in two tumor models. *Cancer Res* 59, 1252-1258.
- Lu, J., and Sloan, S. R. (2002). The basic helix-loop-helix domain of the E47 transcription factor requires other protein regions for full DNA binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1521-1528.
- Lund, L. R., Romer, J., Bugge, T. H., Nielsen, B. S., Frandsen, T. L., Degen, J. L., Stephens, R. W., and Dano, K. (1999). Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *Embo J* 18, 4645-4656.
- Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K., and Benezra, R. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670-677.
- Manzanares, M., Locascio, A., and Nieto, M. A. (2001). The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet* 17, 178-181.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *Embo J* 14, 3136-3145.
- Markus, M., Du, Z., and Benezra, R. (2002). Enhancer-specific modulation of E protein activity. *J Biol Chem* 277, 6469-6477.
- Martin, F., Neil, S., Kupsch, J., Maurice, M., Cosset, F., and Collins, M. (1999). Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J Virol* 73, 6923-6929.
- Massague, J., and Chen, Y. G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14, 627-644.
- Massari, M. E., Grant, P. A., Pray-Grant, M. G., Berger, S. L., Workman, J. L., and Murre, C. (1999). A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell* 4, 63-73.

- Massari, M. E., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-440.
- Measure, S., Nys, G., Fiten, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1993). Mouse gelatinase B. cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophages and gene organisation. *Eur J Biochem* 218, 129-141.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 21, 3951-3957.
- McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V., and Hudson, L. G. (1999). Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem* 274, 4347-4353.
- Mehta, P. B., Jenkins, B. L., McCarthy, L., Thilak, L., Robson, C. N., Neal, D. E., and Leung, H. Y. (2003). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 22, 1381-1389.
- Michaely, P. A., Mineo, C., Ying, Y. S., and Anderson, R. G. (1999). Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol Chem* 274, 21430-21436.
- Mielenz, D., Hapke, S., Poschl, E., von Der Mark, H., and von Der Mark, K. (2001). The integrin alpha 7 cytoplasmic domain regulates cell migration, lamellipodia formation, and p130CAS/Crk coupling. *J Biol Chem* 276, 13417-13426.
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R., and Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127, 2021-2036.
- Milanini-Mongiati, J., Pouyssegur, J., and Pages, G. (2002). Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 277, 20631-20639.
- Mira, E., Lacalle, R. A., Buesa, J. M., de Buitrago, G. G., Jimenez-Baranda, S., Gomez-Mouton, C., Martinez, A. C., and Manes, S. (2004). Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci* 117, 1847-1857.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., and Yamada, K. M. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131, 791-805.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y., and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 90, 1265-1273.
- Montesano, R., Soriano, J. V., Hosseini, G., Pepper, M. S., and Schramek, H. (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Growth Differ* 10, 317-332.
- Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M., and Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296, 1644-1646.
- Moon, S. K., Cha, B. Y., and Kim, C. H. (2004). ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol* 198, 417-427.
- Muller, P., Kietz, S., Gustafsson, J. A., and Strom, A. (2002). The anti-estrogenic effect of all-trans-retinoic acid on the breast cancer cell line MCF-7 is dependent on HES-1 expression. *J Biol Chem* 277, 28376-28379.
- Munaut, C., Salonurmi, T., Kontusaari, S., Reponen, P., Morita, T., Foidart, J. M., and Tryggvason, K. (1999). Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem* 274, 5588-5596.

- Munemitsu, S., Souza, B., Muller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res* 54, 3676-3681.
- Munshi, H. G., Ghosh, S., Mukhopadhyay, S., Wu, Y. I., Sen, R., Green, K. J., and Stack, M. S. (2002). Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in premalignant oral keratinocytes. *J Biol Chem* 277, 38159-38167.
- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R., and Stuver, M. H. (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218, 129-135.
- Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul* 7, 37-44.
- Nagata, Y., Shoji, W., Obinata, M., and Todokoro, K. (1995). Phosphorylation of helix-loop-helix proteins ID1, ID2 and ID3. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 916-926.
- Naito, S., Shimizu, K., Nakashima, M., Nakayama, T., Ito, T., Ito, M., Yamashita, S., and Sekine, I. (2000). Overexpression of Ets-1 transcription factor in angiosarcoma of the skin. *Pathol Res Pract* 196, 103-109.
- Nakajima, M., Welch, D. R., Wynn, D. M., Tsuruo, T., and Nicolson, G. L. (1993). Serum and plasma M(r) 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 53, 5802-5807.
- Nakayama, H., Scott, I. C., and Cross, J. C. (1998). The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 199, 150-163.
- Navarro, P., Lozano, E., and Cano, A. (1993). Expression of E- or P-cadherin is not sufficient to modify the morphology and the tumorigenic behavior of murine spindle carcinoma cells. Possible involvement of plakoglobin. *J Cell Sci* 105 (Pt 4), 923-934.
- Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Polette, M., Martinella-Catusse, C., Bonnet, N., Puchelle, E., Foidart, J. M., Van Roy, F., and Birembaut, P. (2003). E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am J Pathol* 163, 653-661.
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B., and Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11, 2323-2334.
- Neuman, K., Nornes, H. O., and Neuman, T. (1995). Helix-loop-helix transcription factors regulate Id2 gene promoter activity. *FEBS Lett* 374, 279-283.
- Nibu, Y., Zhang, H., and Levine, M. (1998). Interaction of short-range repressors with Drosophila CtBP in the embryo. *Science* 280, 101-104.
- Nickoloff, B. J., Chaturvedi, V., Bacon, P., Qin, J. Z., Denning, M. F., and Diaz, M. O. (2000). Id-1 delays senescence but does not immortalize keratinocytes. *J Biol Chem* 275, 27501-27504.
- Nicolas, M., Noe, V., and Ciudad, C. J. (2003). Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J* 371, 265-275.
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.
- Nilsson, I., and Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4, 107-114.

- Nishimine, M., Nakamura, M., Mishima, K., Kishi, M., Kirita, T., Sugimura, M., and Konishi, N. (2003). Id proteins are overexpressed in human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 32, 350-357.
- Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M., and Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114, 111-118.
- Norton, J. D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 22), 3897-3905.
- Norton, J. D., and Atherton, G. T. (1998). Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol Cell Biol* 18, 2371-2381.
- Norton, J. D., Deed, R. W., Craggs, G., and Sablitzky, F. (1998). Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 8, 58-65.
- Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D. E., Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G., and Raz, A. (1994). Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* 33, 14109-14114.
- Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-450.
- Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H., and Reichmann, E. (1996). TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 10, 2462-2477.
- Ogata, T., Wozney, J. M., Benezra, R., and Noda, M. (1993). Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9219-9222.
- Ogawa, K., Chen, F., Kuang, C., and Chen, Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *Biochem J* 381, 413-422.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R. M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D. B., *et al.* (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107, 789-800.
- Oikawa, T., and Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303, 11-34.
- Ojakian, G. K., Nelson, W. J., and Beck, K. A. (1997). Mechanisms for de novo biogenesis of an apical membrane compartment in groups of simple epithelial cells surrounded by extracellular matrix. *J Cell Sci* 110 (Pt 22), 2781-2794.
- Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1992). Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267, 21712-21719.
- Okada, Y., Tsuchiya, H., Shimizu, H., Tomita, K., Nakanishi, I., Sato, H., Seiki, M., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1990). Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 610-617.
- Olson, E. N. (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev* 4, 1454-1461.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18, 2230-2239.

- Orlowski, R. Z., and Baldwin, A. S., Jr. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* *8*, 385-389.
- Ouyang, X. S., Wang, X., Lee, D. T., Tsao, S. W., and Wong, Y. C. (2002). Over expression of ID-1 in prostate cancer. *J Urol* *167*, 2598-2602.
- Owens, D. W., McLean, G. W., Wyke, A. W., Paraskeva, C., Parkinson, E. K., Frame, M. C., and Brunton, V. G. (2000). The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* *11*, 51-64.
- Ozawa, M., Engel, J., and Kemler, R. (1990). Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* *63*, 1033-1038.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* *401*, 82-85.
- Pan, M. R., and Hung, W. C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J Biol Chem* *277*, 32775-32780.
- Parise, L. V., Lee, J., and Juliano, R. L. (2000). New aspects of integrin signaling in cancer. *Semin Cancer Biol* *10*, 407-414.
- Park, H. (1999). Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxia- and dioxin-induced gene expression. *Mol Cells* *9*, 172-178.
- Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* *21*, 2309-2319.
- Paznekas, W. A., Okajima, K., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E. W. (1999). Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). *Genomics* *62*, 42-49.
- Pei, D., and Weiss, S. J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* *375*, 244-247.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H. J., Fusenig, N., Nieto, M. A., and Cano, A. (2004a). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* *117*, 2827-2839.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004b). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* *48*, 365-375.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* *278*, 21113-21123.
- Pepper, M. S. (2001). Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* *86*, 346-355.
- Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* *276*, 27424-27431.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* *392*, 190-193.
- Petersen, I. (2003). Comparative genomic hybridization of human lung cancer. *Methods Mol Med* *75*, 209-237.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A., and Oft, M. (2000). TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev* *14*, 3093-3101.

- Peverali, F. A., Ramqvist, T., Saffrich, R., Pepperkok, R., Barone, M. V., and Philipson, L. (1994). Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins. *Embo J* 13, 4291-4301.
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G., and Parks, W. C. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 137, 1445-1457.
- Pocsik, E., Mihalik, R., Ali-Osman, F., and Aggarwal, B. B. (1994). Cell density-dependent regulation of cell surface expression of two types of human tumor necrosis factor receptors and its effect on cellular response. *J Cell Biochem* 54, 453-464.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837-1851.
- Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A. G., Varnai, A., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K. (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276, 24661-24666.
- Potempa, S., and Ridley, A. J. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* 9, 2185-2200.
- Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S. T., and Sun, X. H. (1997). Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol* 17, 5888-5896.
- Qin, C., Wilson, C., Blancher, C., Taylor, M., Safe, S., and Harris, A. L. (2001). Association of ARNT splice variants with estrogen receptor-negative breast cancer, poor induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia, and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 7, 818-823.
- Qin, H., Sun, Y., and Benveniste, E. N. (1999). The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 274, 29130-29137.
- Rafty, L. A., and Khachigian, L. M. (2001). Sp1 phosphorylation regulates inducible expression of platelet-derived growth factor B-chain gene via atypical protein kinase C-zeta. *Nucleic Acids Res* 29, 1027-1033.
- Racic, J. M., Maillard, C., Jost, M., Bajou, K., Masson, V., Devy, L., Lambert, V., Foidart, J. M., and Noel, A. (2003). Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 60, 463-473.
- Rao, J. S., Steck, P. A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., and Sawaya, R. (1993). Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* 53, 2208-2211.
- Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E. M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M., and Beug, H. (1992). Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 71, 1103-1116.
- Reisinger, K., Kaufmann, R., and Gille, J. (2003). Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci* 116, 225-238.
- Reiss, M. (1997). Transforming growth factor-beta and cancer: a love-hate relationship? *Oncol Res* 9, 447-457.
- Rempel, S. A., Ge, S., and Gutierrez, J. A. (1999). SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 5, 237-241.
- Reponen, P., Sahlberg, C., Huhtala, P., Hurskainen, T., Thesleff, I., and Tryggvason, K. (1992). Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Biol Chem* 267, 7856-7862.
- Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I., and Tryggvason, K. (1994). High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 124, 1091-1102.

- Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J., and Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14, 8333-8342.
- Ricca, A., Biroccio, A., Del Bufalo, D., Mackay, A. R., Santoni, A., and Cippitelli, M. (2000). bcl-2 over-expression enhances NF-kappaB activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7(ADR) breast-cancer cells. *Int J Cancer* 86, 188-196.
- Richards, E. J., and Elgin, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489-500.
- Riechmann, V., and Sablitzky, F. (1995). Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system. *Cell Growth Differ* 6, 837-843.
- Riechmann, V., van Cruchten, I., and Sablitzky, F. (1994). The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res* 22, 749-755.
- Rimm, D. L., Sinard, J. H., and Morrow, J. S. (1995). Reduced alpha-catenin and E-cadherin expression in breast cancer. *Lab Invest* 72, 506-512.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dolz, R., Jahnig, F., Epplen, J., Mayer, S., and et al. (1987). The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *Embo J* 6, 3647-3653.
- Rodriguez-Boulan, E., and Nelson, W. J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725.
- Romashkova, J. A., and Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.
- Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Lubber, B., Busch, R., Hofler, H., and Becker, K. F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161, 1881-1891.
- Ross, D. T., and Perou, C. M. (2001). A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers* 17, 99-109.
- Ruvkun, G., and Hobert, O. (1998). The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 282, 2033-2041.
- Ruzinova, M. B., and Benezra, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13, 410-418.
- Sage, E. H. (1997). Terms of attachment: SPARC and tumorigenesis. *Nat Med* 3, 144-146.
- Salo, T., Makela, M., Kylmaniemi, M., Autio-Harmanen, H., and Larjava, H. (1994). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 70, 176-182.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel, S. K., Hurta, R. A., Kondaiah, P., Khalil, N., Turley, E. A., Wright, J. A., and Greenberg, A. H. (1992). Autocrine induction of tumor protease production and invasion by a metallothionein-regulated TGF-beta 1 (Ser223, 225). *Embo J* 11, 1599-1605.
- Santibanez, J. F., Frontelo, P., Iglesias, M., Martinez, J., and Quintanilla, M. (1999). Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor beta1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *J Cell Biochem* 74, 61-73.
- Sarras, M. P., Jr. (1996). BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: a potential link between the extracellular matrix, growth factors and pattern formation. *Bioessays* 18, 439-442.

- Sato, H., Kita, M., and Seiki, M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* *268*, 23460-23468.
- Sato, H., and Seiki, M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* *8*, 395-405.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* *270*, 467-470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O., and Davis, R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10614-10619.
- Schindl, M., Oberhuber, G., Obermair, A., Schoppmann, S. F., Karner, B., and Birner, P. (2001). Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer Res* *61*, 5703-5706.
- Schindl, M., Schoppmann, S. F., Strobel, T., Heinzl, H., Leisser, C., Horvat, R., and Birner, P. (2003). Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res* *9*, 779-785.
- Schlegel, J., Vogt, T., Munkel, K., and Ruschoff, J. (1996). DNA fingerprinting of mammalian cell lines using nonradioactive arbitrarily primed PCR (AP-PCR). *Biotechniques* *20*, 178-180.
- Schlissel, M., Voronova, A., and Baltimore, D. (1991). Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev* *5*, 1367-1376.
- Schnaper, H. W., Grant, D. S., Stetler-Stevenson, W. G., Fridman, R., D'Orazi, G., Murphy, A. N., Bird, R. E., Hoythya, M., Fuerst, T. R., French, D. L., and et al. (1993). Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol* *156*, 235-246.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* *27*, 353-365.
- Schneller, M., Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1997). Alpha_vbeta₃ integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *Embo J* *16*, 5600-5607.
- Schonbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (1998). Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* *161*, 3340-3346.
- Schoppmann, S. F., Schindl, M., Bayer, G., Aumayr, K., Dienes, J., Horvat, R., Rudas, M., Gnant, M., Jakesz, R., and Birner, P. (2003). Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. *Int J Cancer* *104*, 677-682.
- Schramek, H., Feifel, E., Healy, E., and Pollack, V. (1997a). Constitutively active mutant of the mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 induces epithelial dedifferentiation and growth inhibition in madin-darby canine kidney-C7 cells. *J Biol Chem* *272*, 11426-11433.
- Schramek, H., Schumacher, M., Wilflingseder, D., Oberleithner, H., and Pfaller, W. (1997b). Differential expression and activation of MAP kinases in dedifferentiated MDCK-focus cells. *Am J Physiol* *272*, C383-391.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* *17*, 6419.
- Schubert, F. R., Mootoosamy, R. C., Walters, E. H., Graham, A., Tumiotta, L., Munsterberg, A. E., Lumsden, A., and Dietrich, S. (2002). Wnt6 marks sites of epithelial transformations in the chick embryo. *Mech Dev* *114*, 143-148.

- Sefton, M., Sanchez, S., and Nieto, M. A. (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* *125*, 3111-3121.
- Sehgal, I., Baley, P. A., and Thompson, T. C. (1996). Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res* *56*, 3359-3365.
- Sehgal, I., and Thompson, T. C. (1999). Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell* *10*, 407-416.
- Semenza, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* *64*, 993-998.
- Shankavaram, U. T., DeWitt, D. L., Funk, S. E., Sage, E. H., and Wahl, L. M. (1997). Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* *173*, 327-334.
- Sherman, P. M., Lawrence, D. A., Yang, A. Y., Vandenberg, E. T., Paielli, D., Olson, S. T., Shore, J. D., and Ginsburg, D. (1992). Saturation mutagenesis of the plasminogen activator inhibitor-1 reactive center. *J Biol Chem* *267*, 7588-7595.
- Shibata, K., Kikkawa, F., Nawa, A., Thant, A. A., Naruse, K., Mizutani, S., and Hamaguchi, M. (1998). Both focal adhesion kinase and c-Ras are required for the enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion by fibronectin in ovarian cancer cells. *Cancer Res* *58*, 900-903.
- Shimajiri, S., Arima, N., Tanimoto, A., Murata, Y., Hamada, T., Wang, K. Y., and Sasaguri, Y. (1999). Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett* *455*, 70-74.
- Shirakata, M., Friedman, F. K., Wei, Q., and Paterson, B. M. (1993). Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues. *Genes Dev* *7*, 2456-2470.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L., and Orkin, S. H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* *373*, 432-434.
- Shoji, W., Inoue, T., Yamamoto, T., and Obinata, M. (1995). MIDA1, a protein associated with Id, regulates cell growth. *J Biol Chem* *270*, 24818-24825.
- Simon, C., Goepfert, H., and Boyd, D. (1998). Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res* *58*, 1135-1139.
- Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., and Desprez, P. Y. (2002). Constitutive expression of the Id-1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF-1/Rb/HDAC-1 transcription repressor complex. *Oncogene* *21*, 1812-1822.
- Sloan, S. R., Shen, C. P., McCarrick-Walmsley, R., and Kadesch, T. (1996). Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol Cell Biol* *16*, 6900-6908.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., and Bussolino, F. (1999). Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo J* *18*, 882-892.
- Somasiri, A., Howarth, A., Goswami, D., Dedhar, S., and Roskelley, C. D. (2001). Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells. *J Cell Sci* *114*, 1125-1136.
- Sovak, M. A., Arsur, M., Zanieski, G., Kavanagh, K. T., and Sonenshein, G. E. (1999). The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression. *Cell Growth Differ* *10*, 537-544.
- Spicer, D. B., Rhee, J., Cheung, W. L., and Lassar, A. B. (1996). Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* *272*, 1476-1480.

- Springhorn, J. P., Singh, K., Kelly, R. A., and Smith, T. W. (1994). Posttranscriptional regulation of Id1 activity in cardiac muscle. Alternative splicing of novel Id1 transcript permits homodimerization. *J Biol Chem* *269*, 5132-5136.
- Srivastava, D. (1999). HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc Med* *9*, 11-18.
- Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* *10*, 415-433.
- Stanton, H., Gavrilovic, J., Atkinson, S. J., d'Ortho, M. P., Yamada, K. M., Zardi, L., and Murphy, G. (1998). The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J Cell Sci* *111 (Pt 18)*, 2789-2798.
- Stemmler, M. P., Hecht, A., and Kemler, R. (2005). E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development* *132*, 965-976.
- Stetler-Stevenson, W. G., and Yu, A. E. (2001). Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* *11*, 143-152.
- Stoker, M., and Perryman, M. (1985). An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* *77*, 209-223.
- Sugimachi, K., Tanaka, S., Kameyama, T., Taguchi, K., Aishima, S., Shimada, M., and Tsuneyoshi, M. (2003). Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* *9*, 2657-2664.
- Sumida, T., Itahana, Y., Hamakawa, H., and Desprez, P. Y. (2004). Reduction of human metastatic breast cancer cell aggressiveness on introduction of either form a or B of the progesterone receptor and then treatment with progestins. *Cancer Res* *64*, 7886-7892.
- Sun, X. H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Baltimore, D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* *11*, 5603-5611.
- Swarbrick, A., Akerfeldt, M. C., Lee, C. S., Sergio, C. M., Caldon, C. E., Hunter, L. J., Sutherland, R. L., and Musgrove, E. A. (2005). Regulation of cyclin expression and cell cycle progression in breast epithelial cells by the helix-loop-helix protein Id1. *Oncogene* *24*, 381-389.
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* *102*, 639-655.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* *251*, 1451-1455.
- Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* *5*, 806-811.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 619-627.
- Tamura, R. N., Rozzo, C., Starr, L., Chambers, J., Reichardt, L. F., Cooper, H. M., and Quaranta, V. (1990). Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4. *J Cell Biol* *111*, 1593-1604.
- Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A. G., and Dedhar, S. (2001). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene* *20*, 133-140.
- Tanaka, K., Oda, N., Iwasaka, C., Abe, M., and Sato, Y. (1998a). Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol* *176*, 235-244.

- Tanaka, K., Pracyk, J. B., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Deshpande, S. S., Ozaki, M., Hwang, P. M., Lowenstein, C. J., Irani, K., and Finkel, T. (1998b). Expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redox-dependent mechanism. *J Biol Chem* *273*, 25922-25928.
- Tang, B., Bottinger, E. P., Jakowlew, S. B., Bagnall, K. M., Mariano, J., Anver, M. R., Letterio, J. J., and Wakefield, L. M. (1998). Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med* *4*, 802-807.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* *25*, 64-70.
- Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., and Hirokawa, N. (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* *155*, 65-76.
- Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, T., and Hartenstein, V. (1996). shotgun encodes Drosophila E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neuroectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* *10*, 672-685.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., and Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 91-100.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* *2*, 442-454.
- Tietze, K., Oellers, N., and Knust, E. (1992). Enhancer of splitD, a dominant mutation of Drosophila, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 6152-6156.
- Touab, M., Villena, J., Barranco, C., Arumi-Uria, M., and Bassols, A. (2002). Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* *160*, 549-557.
- Tournay, O., and Benezra, R. (1996). Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* *16*, 2418-2430.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4354.
- Trojanowska, M. (2000). Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* *19*, 6464-6471.
- Uzui, H., Lee, J. D., Shimizu, H., Tsutani, H., and Ueda, T. (2000). The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *149*, 51-59.
- Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L., and Fuchs, E. (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* *3*, 1076-1085.
- Vastrik, I., Makela, T. P., Koskinen, P. J., Klefstrom, J., and Alitalo, K. (1994). Myc protein: partners and antagonists. *Crit Rev Oncog* *5*, 59-68.
- Vega, S., Morales, A. V., Ocana, O. H., Valdes, F., Fabregat, I., and Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* *18*, 1131-1143.
- Veltmaat, J. M., Orelia, C. C., Ward-Van Oostwaard, D., Van Rooijen, M. A., Mummery, C. L., and Defize, L. H. (2000). Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation. *Int J Dev Biol* *44*, 297-307.
- Virata, M. L., Wagner, R. M., Parry, D. A., and Green, K. J. (1992). Molecular structure of the human desmoplakin I and II amino terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 544-548.

- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* *92*, 827-839.
- Volpert, O. V., Pili, R., Sikder, H. A., Nelius, T., Zaichuk, T., Morris, C., Shiflett, C. B., Devlin, M. K., Conant, K., and Alani, R. M. (2002). Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* *2*, 473-483.
- Voronova, A., and Baltimore, D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4722-4726.
- Vu, T. H., and Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* *14*, 2123-2133.
- Wagenaar-Miller, R. A., Gorden, L., and Matrisian, L. M. (2004). Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* *23*, 119-135.
- Wang, Q., Tsao, S. W., Fu, S., Xue, W., Meng, X., Feng, H., Wong, Y. C., and Wang, X. (2004). Overexpression of Id-1 in gastric adenocarcinoma: implication for a novel diagnostic marker. *Anticancer Res* *24*, 881-886.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E., and Giancotti, F. G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* *87*, 733-743.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* *94*, 625-634.
- Webb, C. P., Van Aelst, L., Wigler, M. H., and Woude, G. F. (1998). Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8773-8778.
- Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J. A., and Chapman, H. A. (1999). A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol* *144*, 1285-1294.
- Welch, D. R., Fabra, A., and Nakajima, M. (1990). Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 7678-7682.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D., and McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* *20*, 4965-4970.
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* *18*, 7213-7218.
- Welsh, J., Rampino, N., McClelland, M., and Perucho, M. (1995). Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. *Mutat Res* *338*, 215-229.
- Westermarck, J., Seth, A., and Kahari, V. M. (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* *14*, 2651-2660.
- Wice, B. M., and Gordon, J. I. (1998). Forced expression of Id-1 in the adult mouse small intestinal epithelium is associated with development of adenomas. *J Biol Chem* *273*, 25310-25319.
- Wight, T. N. (2002). Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 617-623.
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* *264*, 17213-17221.
- Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P., and Perrin-Schmitt, F. (1991). The M-twist gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus* X-twi and the *Drosophila* twist genes. *Dev Biol* *143*, 363-373.
- Xie, B., Dong, Z., and Fidler, I. J. (1994). Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J Immunol* *152*, 3637-3644.

- Xie, B., Laouar, A., and Huberman, E. (1998). Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor- α via $\alpha 5 \beta 1$ integrin in HL-60 cells. *J Biol Chem* *273*, 11583-11588.
- Yan, Q., and Sage, E. H. (1999). SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* *47*, 1495-1506.
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927-939.
- Yao, C. C., Ziober, B. L., Sutherland, A. E., Mendrick, D. L., and Kramer, R. H. (1996). Laminins promote the locomotion of skeletal myoblasts via the $\alpha 7$ integrin receptor. *J Cell Sci* *109* (Pt 13), 3139-3150.
- Yao, J., Xiong, S., Klos, K., Nguyen, N., Grijalva, R., Li, P., and Yu, D. (2001). Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin- $\beta 1$ in human breast cancer cells. *Oncogene* *20*, 8066-8074.
- Yates, P. R., Atherton, G. T., Deed, R. W., Norton, J. D., and Sharrocks, A. D. (1999). Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *Embo J* *18*, 968-976.
- Yokoo, T., and Kitamura, M. (1996). Dual regulation of IL-1 β -mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF- κ B and AP-1. *Am J Physiol* *270*, F123-130.
- Yokota, H., Kumata, T., Taketaba, S., Kobayashi, T., Moue, H., Taniyama, H., Hirayama, K., Kagawa, Y., Itoh, N., Fujita, O., *et al.* (2001). High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* *1568*, 7-12.
- Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., and Nagayama, M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* *22*, 891-898.
- Yokoyama, K., Kamata, N., Hayashi, E., Hoteiya, T., Ueda, N., Fujimoto, R., and Nagayama, M. (2001). Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* *37*, 65-71.
- Yoshiji, H., Gomez, D. E., and Thorgeirsson, U. P. (1996). Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer. *Int J Cancer* *69*, 131-134.
- Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T., and Hirohashi, S. (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7416-7419.
- Yu, W. H., Woessner, J. F., Jr., McNeish, J. D., and Stamenkovic, I. (2002). CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* *16*, 307-323.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y. C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Bottinger, E. P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6686-6691.
- Zebedee, Z., and Hara, E. (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* *20*, 8317-8325.
- Zeigler, M. E., Chi, Y., Schmidt, T., and Varani, J. (1999). Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* *180*, 271-284.
- Zeng, Z. S., Cohen, A. M., Zhang, Z. F., Stetler-Stevenson, W., and Guillem, J. G. (1995). Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* *1*, 899-906.

Zhao, F., Vilardi, A., Neely, R. J., and Choi, J. K. (2001). Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A. *Mol Cell Biol* 21, 6346-6357.

Zheng, P. S., Wen, J., Ang, L. C., Sheng, W., Vilorio-Petit, A., Wang, Y., Wu, Y., Kerbel, R. S., and Yang, B. B. (2004). Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *Faseb J* 18, 754-756.

Zhou, A., Huntington, J. A., Pannu, N. S., Carrell, R. W., and Read, R. J. (2003). How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 10, 541-544.

Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., and Hung, M. C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.

Zhou, G., Bao, Z. Q., and Dixon, J. E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270, 12665-12669.

Ziober, B. L., Vu, M. P., Waleh, N., Crawford, J., Lin, C. S., and Kramer, R. H. (1993). Alternative extracellular and cytoplasmic domains of the integrin alpha 7 subunit are differentially expressed during development. *J Biol Chem* 268, 26773-26783.

Zucker, S., Drews, M., Conner, C., Foda, H. D., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Bahou, W. F., Docherty, A. J., and Cao, J. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* 273, 1216-1222.

ANNEXES

Índex de les figures de l'apartat de resultats

- Figura R.1.** Influència de la concentració de RNA i cDNA en els *fingerprints*. P93
- Figura R.2.** Reproduïbilitat intrassaig de la tècnica de RAP-PCR. P94
- Figura R.3.** Exemples de *fingerprints* obtinguts per RAP-PCR emprant els encebadors PLC511 (5' TCC GAA TGA GTG GGC AGA GG 3') o VEGFR2 (5' CCT CGG CTT GTC ACA TCT GCA 3'), respectivament. P95
- Figura R.4.** Comprovació de l'aïllament i clonatge de la banda seleccionada. p100
- Figura R.5.** Validació dels resultats de la RAP-PCR mitjançant *Northern blot*. P100
- Figura R.6.** Validació dels resultats dels *microarrays* de cDNA. p105
- Figura R.7.** L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK induïx la secreció de MMP-9 així com la seva expressió a nivell de proteïna i de mRNA. p111
- Figura R.8.** El silenciament de *Snail* induïx la reexpressió de la cadherina E i la repressió de MMP-9. p113
- Figura R.9.** L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK incrementa l'activitat del promotor de MMP-9. p115
- Figura R.10.** La inducció de l'activitat del promotor de MMP-9 mediada per *Snail* és abrogada pel silenciament de *Snail*. p117
- Figura R.11.** Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail contenen proteïnes que s'uneixen a les caixes E situades a -644/-637 pb de l'inici de transcripció. p118
- Figura R.12.** E47 i *Snail* no s'uneixen a les caixes E situades a -644/-637 pb de l'inici de transcripció. p119
- Figura R.13.** NFkB, compost almenys per p65, s'uneix al motiu NFkB del promotor de MMP-9 amb major grau en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail que en les cèl·lules MDCK-CMV. p120-121
- Figura R.14.** La mutació dels llocs Ets-1 i Sp1 de la regió proximal del promotor de MMP-9 abroga l'activació indirecta mediada per E47 i *Snail*. p122
- Figura R.15.** Ets-1 i Sp1 activen la transcripció de MMP-9 de forma depenent de dosi en les cèl·lules MDCK i poden actuar sinèrgicament. p124
- Figura R.16.** Sondes emprades en els assajos d'EMSA per l'estudi de la regió proximal del promotor de MMP-9. p125
- Figura R.17.** El segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i el lloc Sp1-HA proximals del promotor de MMP-9 recluten un complex proteïna-DNA específic en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no en les cèl·lules MDCK-CMV. p126
- Figura R.18.** El segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i el lloc Sp1-HA proximals del promotor de MMP-9 recluten un complex proteïna-DNA específic en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no en les cèl·lules MDCK-CMV. p127

Figura R.19. Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail no s'uneixen al primer lloc Ets-1 i Sp1-LA de la regió proximal del promotor de MMP-9. p128

Figura R.20. Ets-1 i Sp1 s'uneixen al segon lloc Ets-1 i Sp1-LA i al lloc Sp1-HA formant un complex multiproteic. p129

Figura R.21. Les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail expressen més nivells de proteïna Sp1, tant fosforilada com no fosforilada, que les cèl·lules MDCK-CMV. p130

Figura R.22. Activació de la via Erk/MAPK en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV. p131

Figura R.23. L'activació del promotor de MMP-9 mediada indirectament pels factors E47 i *Snail* depèn en part de la via Erk/MAPK. p132

Figura R.24. La via Erk/MAPK activa Sp1, probablement per fosforilació, activant el promotor de MMP-9. p134

Figura R.25. La via Erk/MAPK influeix almenys en la unió de Sp1 a la regió proximal del promotor de MMP-9. p135

Figura R.26. Activació de la via PI3K/Akt en les cèl·lules MDCK-Snail respecte les cèl·lules MDCK-CMV. p136

Figura R.27. L'activació del promotor de MMP-9 induïda per *Snail* depèn en part de les vies Erk/MAPK i PI3K/Akt. p137

Figura R.28. H-Ras activa la transcripció de MMP-9 i pot actuar sinèrgicament amb *Snail*. p138

Figura R.29. H-Ras indueix la secreció de MMP-9. p139

Figura R.30. L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK indueix l'expressió d'Id-1 a nivell de mRNA i de proteïna. p141

Figura R.31. L'expressió ectòpica d'E47 i *Snail* en les cèl·lules epitelials MDCK incrementa l'activitat del promotor d'Id-1. p143

Figura R.32. La mutació de la caixa E situada a -1125 pb de l'inici de transfecció abroga l'activitat del promotor d'Id-1. p144

Figura R.33. Els extractes nuclears de les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail no contenen proteïnes que s'uneixin específicament a les caixes E situades a -1038 i -880 pb de l'inici de transcripció del promotor d'Id-1. p145

Figura R.34. La caixa E anomenada "A" forma un complex proteïna-DNA específic i diferencial a les cèl·lules MDCK-E47 i menys abundant a les MDCK-Snail però no a les cèl·lules MDCK-CMV. p146

Figura R.35. La regió que conté la caixa E anomenada "B" adjacent a una caixa GC forma un complex proteïna-DNA específic i diferencial a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no a les cèl·lules MDCK-CMV. p148

Figura R.36. Sondes emprades en els assajos d'EMSA per l'estudi de la regió del promotor d'Id-1 humà compresa entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció. p148

Figura R.37. La regió del promotor d'Id-1 compresa entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció forma diversos complexos proteïna-DNA específics i diferencials a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail però no a les cèl·lules MDCK-CMV. p149

Figura R.38. La caixa E situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció i la caixa GC adjacent participen en la formació d'un multicomplexe. p150

Figura R.39. La proteïna GST-E47 és capaç d'unir-se a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb de l'inici de transcripció. p151

Figura R.40. El factor de transcripció E47 de les cèl·lules MDCK-E47 s'uneix a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció. p151

Figura R.41. El factor de transcripció E47 de les cèl·lules MDCK-E47 s'uneix a la caixa E del promotor d'Id-1 situada a -1125 pb respecte l'inici de transcripció. p152

Figura R.42. El silenciament de *Snail* en les cèl·lules MDCK-Snail impedeix la formació del complexe proteïna-DNA a la caixa E situada a -1125 pb de l'inici de transcripció. p153

Figura R.43. El factor de transcripció Sp1 s'uneix a la caixa GC del promotor d'Id-1 situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. p154

Figura R.44. El factor de transcripció Sp1 s'uneix a la caixa GC del promotor d'Id-1 situada a -1118 pb respecte l'inici de transcripció en les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail formant un multicomplexe. p155

Figura R.45. La via Erk/MAPK regula l'expressió de la proteïna Id-1 en es cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail. p156

Figura R.46. L'activació del promotor d'Id-1 mediada pels factors E47 i *Snail* depèn en part de la via Erk/MAPK. p157

Figura R.47. La via Erk/MAPK afavoreix la unió de factors de transcripció a la regió del promotor d'Id-1 situada entre -1135 i -1102 pb respecte l'inici de transcripció. p158

Figura R.48. La via Erk/MAPK activa Sp1, probablement per fosforilació, activant el promotor d'Id-1. p159

Figura R.49. H-Ras activa la transcripció d'Id-1 via Erk/MAPKs. p159

Índex de les taules de l'apartat de resultats

Taula R.1. Anàlisi de les bandes amb diferència d'intensitat trobades mitjançant RAP-PCR en les cèl·lules MDCK-E47 o MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV segons presenten un augment o una disminució. p96

Taula R.2. Moltes de les bandes que presenten diferències d'intensitat són comunes a les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-Snail, mentre que algunes bandes només són diferents entre les cèl·lules MDCK-E47 i MDCK-CMV o entre les cèl·lules MDCK-Snail i MDCK-CMV. p97

Taula R.3. Resum dels gens trobats diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV mitjançant RAP-PCR. p98

Taula R.4. Classificació funcional dels gens trobats diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 i/o MDCK-Snail respecte les MDCK-CMV mitjançant RAP-PCR. P101

Taula R.5. Anàlisi mitjançant *microarrays* de cDNA dels gens diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-E47 o MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV segons presenten un augment o una disminució. p103

Taula R.6. Molts dels gens trobats mitjançant la tècnica de *microarrays* de cDNA estan diferencialment expressats tant en les cèl·lules MDCK-E47 com en les MDCK-Snail respecte les cèl·lules control MDCK-CMV, mentre que altres només estan diferencialment expressats en una de les dues línies cel·lulars. p104

Taula R.7. Classificació funcional dels gens trobats diferencialment expressats en les cèl·lules MDCK-CMV, MDCK-E47 i MDCK-Snail mitjançant *microarrays* de cDNA. p106-108

Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor

Mireia Jordà¹, David Olmeda², Antònia Vinyals¹, Eva Valero¹, Eva Cubillo², Ana Llorens¹, Amparo Cano² and Angels Fabra^{1,*}

¹Centre d'Oncologia Molecular, IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, Barcelona, Spain

²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM) and Departamento de Bioquímica (UAM), Madrid, Spain

*Author for correspondence (e-mail: afabra@iro.es)

Accepted 28 April 2005

Journal of Cell Science 118, 3371-3385 Published by The Company of Biologists 2005
doi:10.1242/jcs.02465

Summary

Overexpression of the transcription factor Snail in epithelial MDCK cells promotes the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the acquisition of an invasive phenotype. We report here that the expression of Snail is associated with an increase in the promoter activity and expression of the matrix metalloproteinase MMP-9. The effect of Snail silencing on MMP-9 expression corroborates this finding. Induced transcription of MMP-9 by Snail is driven by a mechanism dependent on the MAPK and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signalling pathways. Although other regions of the promoter were required for a complete stimulation by Snail, a minimal fragment (nucleotides -97 to +114) produces a response following an increased phosphorylation of Sp-1 and either

Sp-1 or Ets-1 binding to the GC-box elements contained in this region. The expression of a dominant negative form of MEK decreased these complexes. A moderate increase in the binding of the nuclear factor κ B (NF κ B) to the upstream region (nucleotide -562) of the MMP-9 promoter was also observed in Snail-expressing cells. Interestingly, oncogenic H-Ras (RasV12) synergistically co-operates with Snail in the induction of MMP-9 transcription and expression. Altogether, these results indicate that MMP-9 transcription is activated in response to Snail expression and that it might explain, at least in part, the invasive properties of the Snail-expressing cells.

Key words: Snail, MMP-9, MAPK

Introduction

The Snail family of transcription factors can induce the process of cellular invasion and indeed, Snail itself regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) both during embryonic development and in epithelial cell lines (Batlle et al., 2000; Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000). The phenotypic changes associated with this transition include both an increase in cell motility (Cano et al., 2000; Janda et al., 2002; Thiery, 2002) and in the production of extracellular matrix (ECM)-degrading enzymes, and they are always accompanied by the disruption of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion (Christofori and Semb, 1999; Takeichi, 1995).

The matrix metalloproteinases (MMPs) is one of the most extensive families of ECM-degrading enzymes involved in EMT (Chakraborti et al., 2003; Kerkela and Saarialho-Kere, 2003). Along with other family members, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) plays a key role in cell migration and cell invasion both in physiological and pathological process (Freije et al., 2003; Fridman et al., 2003; Himmelstein et al., 1994). Secretion of MMP-9 can be stimulated by a variety of factors including cytokines, growth factors, phorbol esters and bacterial endotoxins. Indeed, epidermal growth factor and amphiregulin stimulate the production of MMP-9 in the SKBr3 human breast cancer cell line (Kondapaka et al., 1997), as does heregulin- β 1 (Yao et al., 2001). Moreover, TGF-

β also activates MMP-9 in breast and prostate cancer cells (Samuel et al., 1992; Sehgal and Thompson, 1999; Welch et al., 1990) and in keratinocytes (Caulin et al., 1995). Significantly, recent studies in MDCK cells have shown that Snail mediates the EMT and the depletion of E-cadherin, triggered by TGF- β (Peinado et al., 2003). In addition, we have demonstrated that the loss of E-cadherin expression in mouse keratinocytes is related to an increase of MMP-9 mRNA levels and promoter activity (Llorens et al., 1998). However, oncogenic Ras and v-Src also induce MMP-9 expression in cancer cells and in the rat embryo (Ballin et al., 1988; Sato et al., 1993), suggesting that multiple cellular signalling pathways may drive MMP-9 expression (Gum et al., 1996).

One of the main mechanism through which extracellular signals are transmitted to the nucleus involves the activation of kinases related to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily. Interestingly, these kinases have been shown to be responsible for the activation of MMP-9 expression in keratinocytes (McCawley et al., 1999; Zeigler et al., 1999), glioma tumour cells (Lakka et al., 2002) prostate cancer (Mehta et al., 2003) and melanoma cells (Govindarajan et al., 2003). In addition, phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) has been implicated in the EGF-induced cell surface association of pro-MMP-9 in ovarian cancer cells (Ellerbroek et al., 2001).

Many studies of invasive tumours suggest that Snail and MMP-9 expression might be related since they have both been implicated in similar invasive processes (Blanco et al., 2002; Himelstein et al., 1994). However, an association between the expression of these two molecules has not been examined previously. To gain further insight into the mechanisms by which Snail induces the invasive phenotype, and whether or not MMP-9 is involved, we have analysed the molecular events underlying the EMT in the prototypic epithelial MDCK cell line. In this study, we demonstrate that Snail induces MMP-9 secretion via multiple signalling pathways that, in cooperation with oncogenic H-Ras (*RasV12*), lead to the transcriptional upregulation of MMP-9.

Materials and Methods

Cell culture

MDCK-CMV and MDCK-Snail cells (Cano et al., 2000) were grown in DMEM-Ham's F-12 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, sodium pyruvate, non-essential amino acids and L-glutamine (Gibco). The cultures were plated on plastic and incubated in 5% CO₂-95% air at 37°C in a humidified incubator. The cell lines were shown to be free of mycoplasma before performing in vitro experiments (assayed using the Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR Venor GeM, purchased from Minerva Biolabs, Berlin, Germany).

Gelatin zymography

Exponential cultures of MDCK-CMV, MDCK-Snail and MDCK-Snail-siSnail cells were incubated for 24 hours with serum-free media. These conditioned media were centrifuged to clarify debris and concentrated by centrifugation in Centricon-30 microconcentrators (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) prior to their use for gelatinase assays. Volumes for each cell line were adjusted to 12 µg protein as determined by BCA (Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, USA). Conditioned medium from MXT-c1.1 cells (a metastatic mouse mammary carcinoma cell line) was included as a control for secreted gelatinases (Llorens et al., 1997).

Membrane-associated protein fractions were prepared from cultured cells by incubation for 30 minutes at 4°C with 200 µl of 2.5% Triton X-114 in cold TBS buffer and then centrifuged (3000 g for 15 minutes at 4°C) to remove Triton X-114-insoluble material. Homogenates were subjected to phase separation by incubation at 37°C for 5 minutes and spun at 3,000 g. Aliquots of the hydrophobic phase containing integral membrane protein were analysed by zymography.

Gelatin zymography was performed as described elsewhere (Llorens et al., 1998). Samples were mixed with SDS sample buffer without reducing agent and separated on 7.5% SDS-PAGE gels containing 0.1% gelatin. The gels were incubated at 37°C after removing the SDS by washing with 2.5% Triton X-100-containing buffer. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250, and the gelatinolytic activities were detected as clear bands against a blue background.

RT-PCR and primers

For RT-PCR, 100 ng of Poly(A)⁺ RNA samples were reverse transcribed in a total reaction volume of 10 µl containing: 1× RT buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl and 3 mM MgCl₂), 20 U RNase inhibitor (Promega Madison, WI, USA), 10 mM dithiothreitol, 50 mM deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), 0.1 mM random primer (Perkin Elmer), and 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV-RT; Life Technologies,

Gaithersburg, MD, USA). The mixture was incubated at 37°C for 60 minutes and 95°C for 5 minutes, using a programmable thermal cycler (PTC-100 TM; MJ Research, Watertown, MA, USA). The PCR reaction was performed with the specific forward and reverse primers for canine MMP-9 described in GenBank, accession number: AF169244 (MMP-9 forward (F): 5' GGTCTGGGTGACTCCAAAGCC 3' and MMP-9 reverse (R): 5' GGTGAGGGTAGTGGTGTGTCT 3') in a thermal cycler over 35 high-stringency cycles (denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 65°C for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute). Oligodeoxynucleotides were purchased from Pharmacia Biotech (Genosys, Cambridge, UK). Cyclophilin-specific primers (CYCLO F: 5' CACCACATGCTTGCCATCC 3' and CYCLO R: 5' CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG 3'). Specific primers for mouse Snail and canine E-cadherin or GAPDH were used in parallel reactions proceeding as described elsewhere (Bolos et al., 2003; Peinado et al., 2003). The PCR products were visualised in ethidium bromide-stained agarose gels and the identity of the PCR products was confirmed by automated DNA sequencing at the IRO DNA Sequencing Core Facility after cloning into the pCR2.1 vector (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA). All the PCR reactions were performed at least twice and the results were similar in all cases.

Western blot analysis

SDS-containing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out as described previously, and proteins separated on the gel were transferred to a PVDF membrane. Following blocking with 5% fat-free dry milk in Tris-buffered saline, the membrane was probed with primary antibodies specific to MMP-9 protein (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001) (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA; cat. no. AB 19047) at a dilution of 1:1000; specific to total Erk1 and Erk2, the p44/42 MAP kinase polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) was used at a 1:1000 dilution; and the anti-Sp-1 monoclonal antibody (clone 1C6, BD Pharmingen Technical, BD, San Diego, CA, USA) at 1:200 dilution. For detection of the levels of Akt phosphorylation we used the PhosphoPlus Akt (Ser 473) antibody (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) at 1:200 dilution. The membranes were further probed with HRP-conjugated goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse immunoglobulin (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) for 1 hour at room temperature (1:1000). Antibody binding was visualized by ECL (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden).

MMP-9 immunostaining

Cells cultured on coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS containing 75 mM lysine. After blocking with 5% goat serum and 3% bovine serum albumin in TBS for 1 hour at room temperature, cells were reacted with anti-MMP-9 rabbit polyclonal antibody (Chemicon Int. Inc., cat. no. AB 19047) (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001) and incubations were carried out at room temperature for 1 hour using a dilution of 1:500 in Tris-buffered saline (TBS). CaCl₂ (1 mM) was included throughout the washing and incubation for the staining with the anti-MMP-9 antibody. Fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG was used to visualize the antigen signal. DAPI was used to stain the nuclei. Negative controls were performed by incubation of fixed cells in the absence of primary antibody.

MMP-9 promoter constructions

The mouse wild-type MMP-9 promoter sequences [nucleotides (nts) -1170 to +142] was amplified by PCR from genomic DNA using specific oligonucleotides (pMMP9-1170F: 5' TGGGAGAACCACCCAGCTCTCTC 3' and pMMP9R: 5' CTCTGCCAGCTGGTGTCCG 3'). The amplified fragment was cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) and then into the *KpnI/XhoI* sites of pGL2-basic vector (Promega Corp.) fused to a luciferase

reporter gene. Several fragments of the 5' end of the mouse MMP-9 promoter were generated by PCR as follows: for the pMMP9-588 construct (nts -588 to +142) the primers (p MMP9-558F: 5' GGAGCTAGGGGTTTGCC 3' and pMMP9R: 5' CTCTGCCAGCTGGTGTCCG 3') were used, and the pMMP9-389 construct was generated by amplifying of region spanning from nts -389 to +142 with the forward and reverse primers (pMMP9-389 F: 5' GGTCTCGGCCTCAGGTCTC 3' and pMMP9 R: 5' CTCTGCCAGCTGGTGTCCG 3'). For the pMMP9-117 construct (nts -117 to +142) the primers (pMMP9-117F: 5' ACACACACGCTGAGTCAGGCATA 3' and pMMP9R: 5' CTCTGCCAGCTGGTGTCCG 3') were used; for the pMMP9-97 construct (nts -97 to +142), pMMP9-97F: 5' TAAGCCTGGAGGGGAGGGGCGG 3' and pMMP9R: 5' CTCTGCCAGCTGGTGTCCG 3'; and finally for pMMP-75 construct (nts -75 to +142) the primers pMMP9-75 F: 5' GGTCAGTATCCCGTTTA 3' and pMMP9R: 5' CTCTGCCAGCTGGTGTCCG 3'. The PCR reaction with *Taq* polymerase and specific primers for the MMP-9 promoter constructs was performed in a thermal cycler over 30 high-stringency cycles (denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 1 minute and extension at 72 °C for 1 minute). The PCR products were cloned into the pCR2.1 vector and then into the appropriate site of pGL2-basic vector directing luciferase reporter expression. The constructs containing the luciferase gene driven by the specific promoter regions were called pMMP9-1170luc (construct I); pMMP9-588luc (construct II); pMMP9-389luc (construct III); pMMP9-117luc (construct IV); pMMP9-97luc (construct V) and pMMP9-75luc (construct VI) according the regions described above.

Site-directed mutagenesis was used to introduce point mutations into the putative binding sites in the MMP-9 promoter. The PCR reactions for mutagenesis were performed on 10 ng of wild-type construct V as a template and using 100 ng of each mutated primer set, 25 mM of each dNTP, 2.5 U of pFu-Turbo-DNA polymerase (Stratagene) and its corresponding buffer. After PCR, the parental supercoiled double-stranded DNA was digested with *Dpn* I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and competent *E. coli* cells (TOP F10) were transformed by thermal shock. Mutant construction at nts -89 and -87 was generated by using the forward primer pMMP9-M⁸⁹⁻⁸⁷F: 5' TAAGCCTGAtGGGAGGGGCGG 3'. Mutant construction at nts -85 and -82 was generated by using the forward primer pMMP9-M⁸⁵⁻⁸²F: 5' TAAGCCTGGAGGtGAtGGGCGG 3'. The promoter constructs and the novel mutations were confirmed by sequencing.

Expression vectors and transfections

pcDNA3-DN-MEK1, a dominant negative expression vector of MEK1 was provided by Ana Aranda (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, Spain); pCELF- *H-Ras* (RasV12) and pCELF-*N-Ras* (RasE12) were a gift from Piero Crespo (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, Spain). The amount of DNA transfected was kept constant by addition of the appropriate amount of empty vector.

As indicated in the figures, the cells were incubated for 5 hours with 50 μM of PD 098059 (or UO126); 40 nM wortmannin and 10 μM SB 203580 purchased from Sigma.

For generation of siRNA expression vectors, oligonucleotides containing specific sequences against mouse Snail nucleotide 19 (5'-GATGCACATCCGAAGCCAC-3') were cloned into the pSuperior-Puro vector (Oligoengine, Seattle, WA), according to manufacturing instructions. pSuperior-Puro and pSuperior-siSnail vectors were transfected in the indicated cell lines using lipofectamine (Gibco-BRL). Stable transfectants were generated after selection with 1 μg/ml puromycin (siRNA-derived cells) for 2-4 weeks and characterized for expression of Snail and E-cadherin.

Transient transfections were carried out with lipofectamine plus reagent (Promega Corp.), essentially following the manufacturer's instructions. MDCK-CMV cells and MDCK-Snail stable transfectants

(MDCK-Snail) were transiently cotransfected with 1 μg of the MMP-9 promoter of wt and deletion mutants fused to a luciferase reporter gene and 100 ng of TK renilla plasmid in 6-well plates. Cells were transfected in FBS-free medium for 5 hours and switched to the media with 10% FCS for an additional 24 hours and then collected to determine the luciferase/renilla activity. The cells were lysed in 80 μl of 1× lysis buffer (Promega Corp.), and after 3 freeze/thawing cycles and centrifuging at 3000 g for 10 minutes. Luciferase and renilla activities were measured in supernatants using the Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega Corp.). As indicated, MDCK-CMV cells were cotransfected with the indicated expression vectors in the same conditions as described above.

Electrophoretic mobility shift assays

For electrophoretic mobility shift assays (EMSA), 10 μg of each forward and reverse oligonucleotides (synthesized by Life Tech., Invitrogen) were annealed in a final reaction volume of 20 μl with 1× buffer M (Boehringer Mannheim). After heating for 5 minutes, the temperature was gradually lowered overnight. A double-strand oligonucleotide (100 ng) was radiolabelled using T4 polynucleotide kinase (Promega) and [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. The radiolabelled oligonucleotide was purified on SC-200 columns (Pharmacia) and used as a probe. Mobility shift assays were performed with 10 μg MDCK-CMV and MDCK-Snail nuclear extracts. Nuclear protein extraction was carried out by the procedure described previously (Perez-Moreno et al., 2001) and mixed with 1×10⁵ c.p.m. of radiolabelled probe. The different probes used were: NFκB binding site wild type (NFκB wt: 5' TGCCCCATGGAATTCCCCAA 3') at nucleotide (nt) -562 and its mutant (NFκB m: 5' TGCCCCATGGAATTCCCCAA 3'); E-box putative binding site wild-type sequence from nts -650 to -630 of MMP-9 promoter (E-box wt: 5' TGCTCCACATGTGTGTGC 3'); E-pal E-cadherin promoter (E-pal wt: 5' GGCTGCCACCTGCAGGTGCGTCCC 3'); Sp-1 binding site wild-type sequence from nts -97 to -76 of the MMP-9 promoter that contains a putative low affinity Sp-1 binding site, a high affinity Sp-1 binding site and Ets-1 binding sites (Sp-1 wt: 5' TAAGCCTGGAGGGGAGGGGCGG 3') and the wild-type sequence from nts -85 to -65 (5' GGA GGGGCGGGTCACTGAT 3') that contains a putative high affinity Sp-1 and an Ets-1 binding sites. For super-shift experiments 1 μg of the corresponding polyclonal antibody: anti Sp-1 (sc-59x); anti NFκB p65 (sc-109) and anti-Ets-1 (sc-111x) or non-immune rabbit IgG (all from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was added to the reaction mixture and incubated for 20 minutes on ice. Where indicated, 5 μg of rabbit polyclonal anti-Snail antibody (Bolos et al., 2003) was added and incubated before addition of the labelled probe. In competition assays, 500-fold molar excess of the corresponding cold double-stranded DNA oligonucleotide was added and the reaction was incubated for 10 minutes on ice. DNA-protein complexes were separated on 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 0.5× TBE (Tris-borate-EDTA) at room temperature. The gels were dried and the complexes were visualised by autoradiography.

Results

Snail induces MMP-9 secretion in MDCK cells

We previously demonstrated that the expression of Snail in the prototypic epithelial MDCK cell line triggers phenotypic changes commonly known as EMT (Cano et al., 2000). Snail-induced disruption of cell-cell contacts, cell dissociation and an increase in cell motility, which is reminiscent of the behaviour of MMP-9 expressing cells at the invasive edges of tumours (Kupferman et al., 2000). To examine whether MMP-9 was involved in this process, MDCK cells that ectopically

expressed mouse Snail were analysed (Cano et al., 2000). A significant increase in MMP-9 gelatinolytic activity was found in these cells, but not of another closely related gelatinase, MMP-2. In zymographic assays, MMP-9 activity was detected both in the extracellular media and associated with the cell membrane (Fig. 1A). The predominant band was detected at 110 kDa corresponding to the proactive form that becomes active during zymography. RT-PCR analysis indicated that MDCK-Snail cells contain more MMP-9 mRNA than MDCK-

CMV cells (Fig. 1B), and the increase in MMP-9 expression was clearly observed by immunofluorescence at the surface of MDCK-Snail cells, with a mixed granular and fibrillar pattern (Fig. 1C). Western blot analysis using the same specific antibody also indicated the increased level of MMP-9 protein, detected as two bands at 110 kDa and 90 kDa, both recognized by the antibody (Fig. 1D), although the correspondence of the 90 kDa band with the active form could not be definitively established.

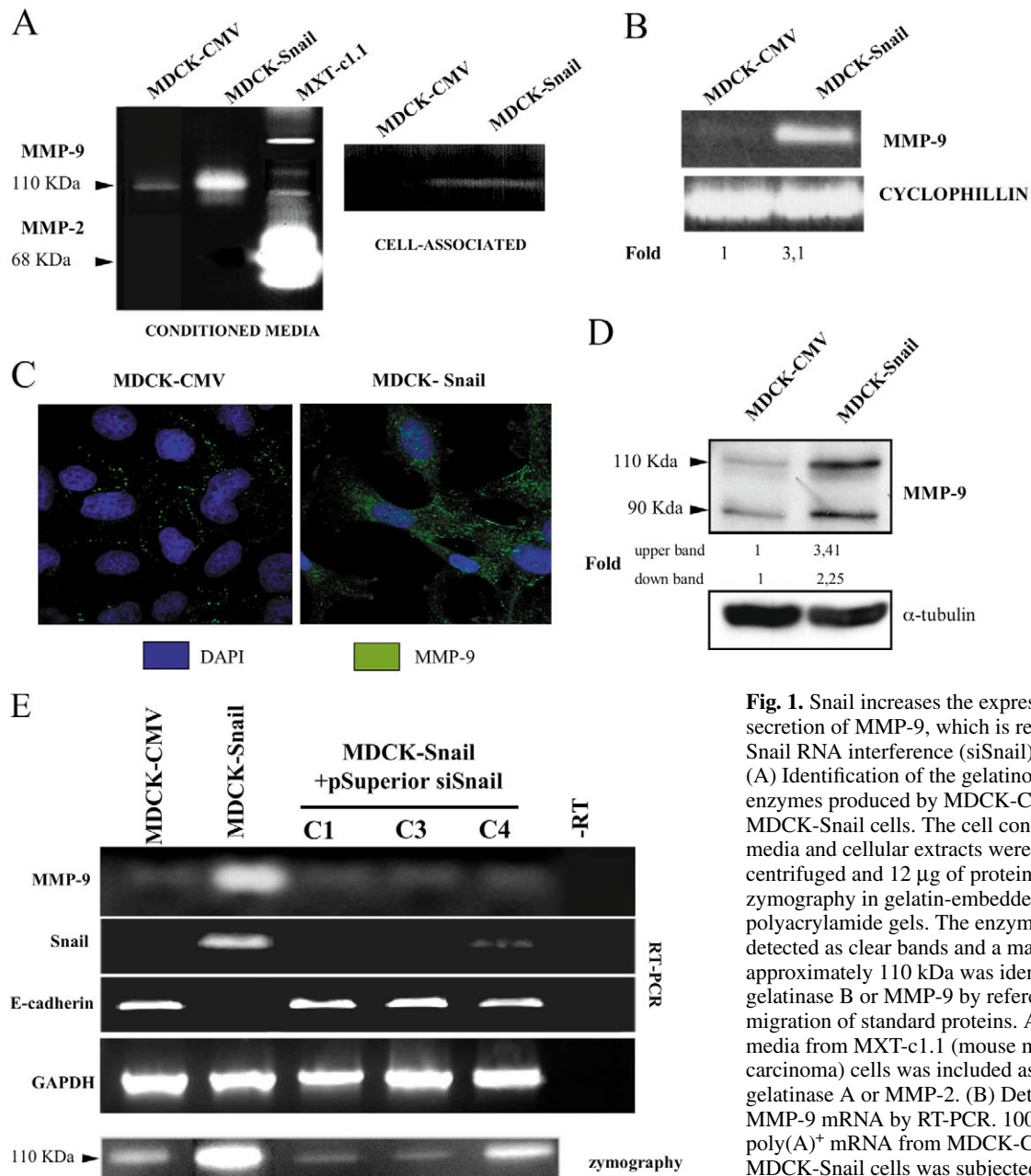


Fig. 1. Snail increases the expression and secretion of MMP-9, which is relieved by Snail RNA interference (siSnail). (A) Identification of the gelatinolytic enzymes produced by MDCK-CMV and MDCK-Snail cells. The cell conditioned media and cellular extracts were collected, centrifuged and 12 μ g of protein analysed by zymography in gelatin-embedded SDS polyacrylamide gels. The enzymes were detected as clear bands and a major band of approximately 110 kDa was identified as gelatinase B or MMP-9 by reference to the migration of standard proteins. A conditioned media from MXT-c1.1 (mouse mammary carcinoma) cells was included as control for gelatinase A or MMP-2. (B) Detection of MMP-9 mRNA by RT-PCR. 100 ng of poly(A)⁺ mRNA from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells was subjected to RT-PCR. The amplification of cyclophilin was used to

normalise for loading (lower panel). (C) Immunofluorescence detection of MMP-9 in MDCK-CMV (left) and MDCK-Snail (right) cells. Note the intense fibrillar and granular staining in MDCK-Snail cells. (D) Cells collected from subconfluent cultures of MDCK-CMV and MDCK-Snail cells were lysed, and the expression of MMP-9 was analysed by western blotting using an anti-MMP-9 polyclonal antibody. α -Tubulin was used as loading control. (E) Snail silencing blocks the induction of MMP-9 expression. Upper four panels: RT-PCR analysis of MMP-9, Snail and E-cadherin mRNA levels in MDCK-CMV, MDCK-Snail and in three independent stable clones (C1, C3 and C4) generated after siSnail transfection (MDCK-siSnail) in MDCK-Snail cells. GAPDH mRNA levels are shown as loading control. Lower panel: the effects of Snail interference on secreted MMP-9 were analysed by zymography in gelatin-embedded SDS polyacrylamide gels.

To provide a link between Snail expression and MMP-9 induction we used a Snail interference technique with a 19-mer siRNA oligonucleotide directed to the N-terminal region of the first zing finger of mouse *Snail* mRNA (position 573-591 in mouse cDNA; accession number NM011247). To this end, the pSuperior-siSnail vector was stably transfected in the MDCK-Snail cells and its effect on E-cadherin and MMP-9 expression was analysed by semiquantitative RT-PCR analysis. The efficiency of Snail interference was observed in three independent clones with either complete absence or very low levels (less than 10% over the corresponding control in clone C4) of Snail mRNA (Fig. 1E). Analysis of E-cadherin mRNA levels indicated robust expression of E-cadherin in all independent clones with silenced Snail expression. Interestingly, the stable interference of Snail obtained in the MDCK-Snail system, apart from reactivating E-cadherin expression, also abrogated the MMP-9 mRNA in all analysed independent clones, while control MDCK-Snail cells showed robust levels of MMP-9 transcript. In agreement with these data, an important reduction of secreted MMP-9 activity after Snail interference in the individual clones as compared to MDCK-Snail cells was detected by zymography (Fig. 1E lower panel). Only the MDCK-Snail C4 clone shows a less effective silencing of Snail compared to the other analysed clones, since some level of Snail transcript is still detected (Fig. 1E, Snail panel). Indeed, MMP-9 activity could be detected in the conditioned medium from C4 clone (Fig. 1E, lower panel), even when no apparent MMP-9 mRNA is observed by RT-PCR (Fig. 1E, upper panel). A similar situation to the C4 clone is in fact observed in control MDCK-CMV cells (compare the corresponding lanes in Fig. 1E). Controls performed with a siRNA oligonucleotide directed to the unrelated gene EGFP showed no alteration in any of the analysed markers (Snail, E-cadherin and MMP-9) as compared with control MDCK-Snail cells (data not shown).

Snail increases the activity of the MMP-9 promoter in MDCK cells

To determine whether the increase in MMP-9 mRNA levels was due to increased transcription, we analysed the activity of the MMP-9 promoter using a luciferase reporter gene. The activity of a 1.17 kb fragment of the MMP-9 mouse promoter region was examined as well as several deletion mutant constructs (Fig. 2A). MDCK cells that

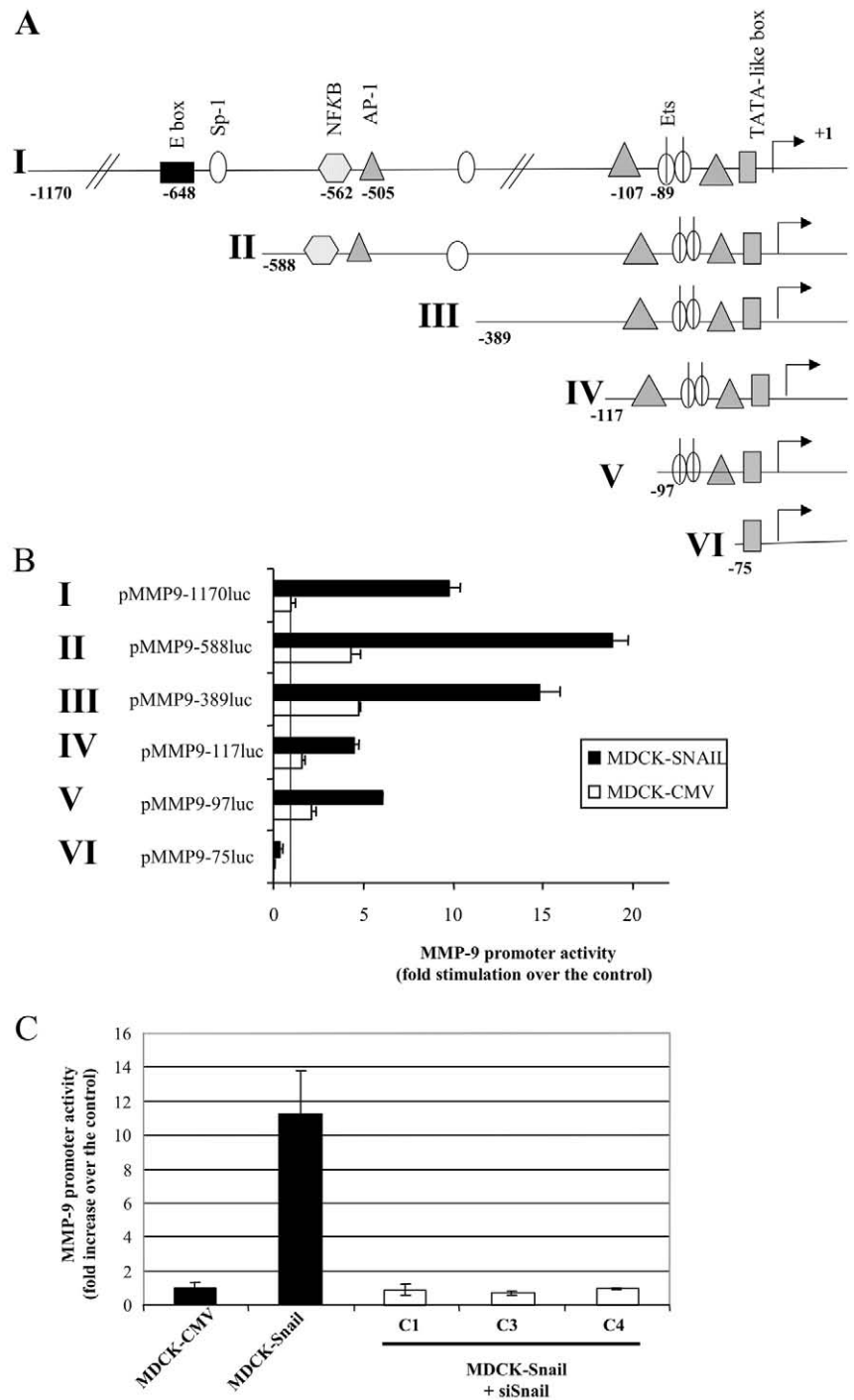


Fig. 2. Stable expression of Snail induces MMP-9 promoter activity and is relieved by siSnail. (A) Schematic representation of the MMP-9 promoter and the deletion mutant constructs (I-VI), indicating the position of potential regulatory control elements. (B) Diagram showing the increase in activity of the different constructs transiently expressed in MDCK-CMV cells (white bars) or MDCK-Snail cells (black bars). Luciferase and renilla activities of each promoter construct are relative to that obtained with the pGL2 control plasmid, expressed as the mean \pm s.d. of three independent experiments. (C) Induction of MMP-9 promoter mediated by Snail is relieved by siSnail. Analysis of -1170 MMP-9 promoter activity (construct I) in control (MDCK-CMV, MDCK-Snail) and in the indicated individual clones obtained after stable transfection of Snail siRNA. Promoter activity was determined as in B. Results represent the mean \pm s.d. of four independent experiments.

ectopically express Snail show an approximately 10-fold increase of luciferase activity when driven by the pMMP9-1.170luc promoter (construct I in Fig. 2B). In addition, the pMMP9-588luc construct (construct II) displayed a 4-fold higher level of activity in MDCK-Snail cells compared to MDCK-CMV control cells. The Snail-mediated induction of the shorter constructs IV and V was twofold, indicating that sequences present in the proximal promoter were contributing

to the activation. (Fig. 2B, promoter constructs IV and V). In agreement with these results, analysis of MMP-9 promoter activity in MDCK-Snail clones in which efficient Snail blockade was obtained, showed a strong reduction of the transcriptional activity. As shown in Fig. 2C, the MMP-9 promoter activity analysed in the stable siSnail clones was similar to that of MDCK-CMV cells. Taken together, the promoter analysis data indicated a direct link between

Snail expression and induction of MMP-9. To confirm this observation, the effect of transient Snail expression was analysed by co-transfecting the pMMP-9-reporter plasmids into MDCK cells with 1 μ g of the full-length mouse Snail cDNA. As shown in Fig. 3A, luciferase activity was increased in MMP-9 reporters I to V, when Snail was co-expressed with these constructs in MDCK cells (Fig. 3A). Concomitantly to these experiments, transfection of the siSnail expression vector completely abrogated the induction of MMP-9 promoter activity by Snail (Fig. 3B).

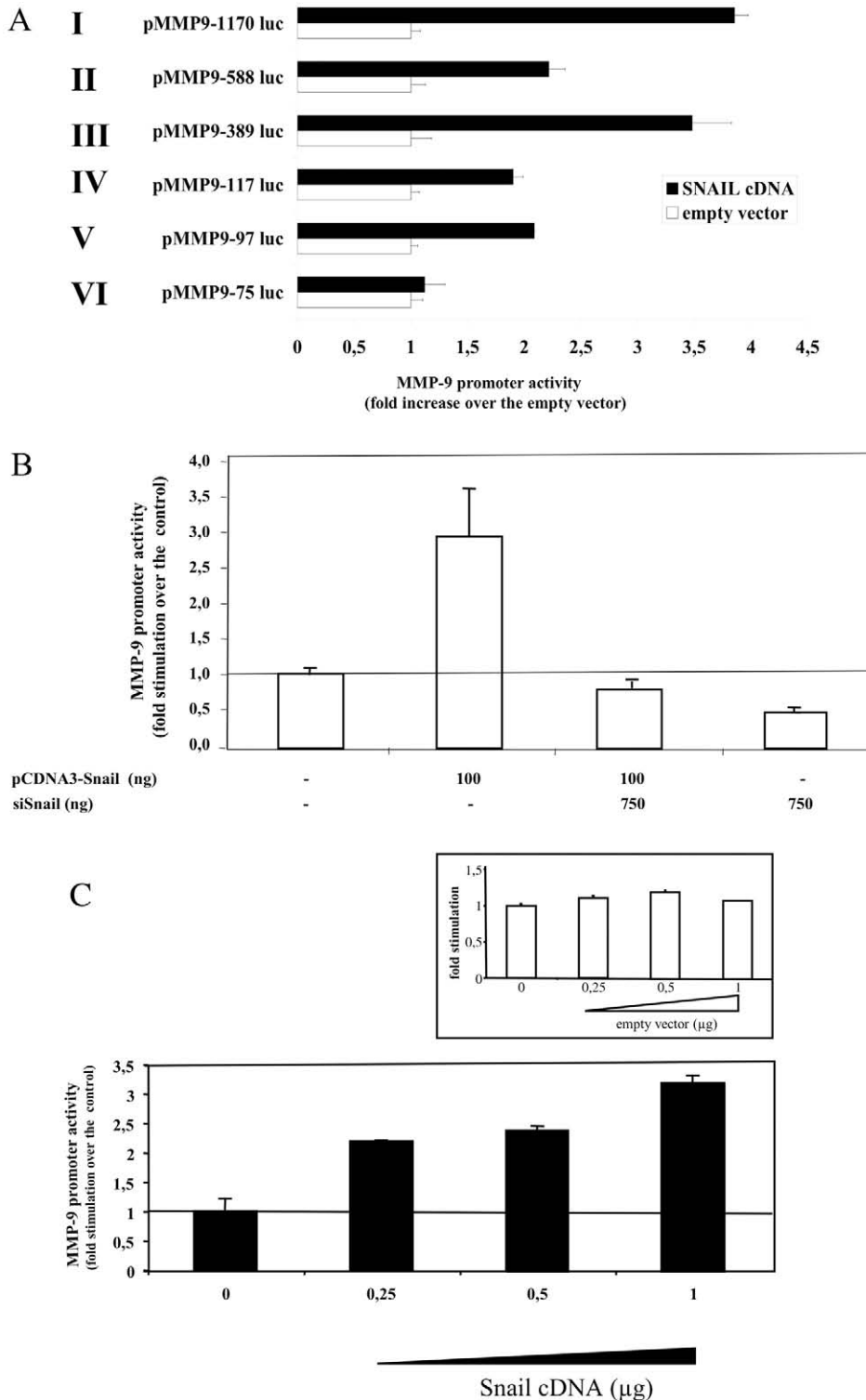


Fig. 3. Transient expression of Snail induces MMP-9 promoter activity and is relieved by siSnail. (A) Activity of the different constructs was analysed in MDCK-CMV cells transiently transfected with Snail cDNA (black bars) or with the empty expression vector (white bars). The effect of Snail is represented for each MMP-9 reporter as fold stimulation of the activity over the empty vector as the mean \pm s.d. of three independent experiments. (B) The effect of siSnail on MMP-9 promoter activity (construct I) was measured in MDCK-CMV cells growing in T24 plates, after transfection of the indicated amounts of the different vectors and compensated with the empty plasmid. Promoter activity is given as fold stimulation over that with the empty plasmid (mean \pm s.d. of four independent experiments). (C) Dose-dependent effect of Snail cDNA on the -389 MMP-9 (construct III) promoter activity was analysed in MDCK-CMV cells as described in A. The amount of the Snail cDNA was compensated with empty plasmid up to 1 μ g of total DNA. Promoter activity is given as fold stimulation over that obtained in the absence of Snail cDNA. The small panel at the top shows the dose-dependent effect of the empty plasmid on the activity of this promoter construct. Values are the mean \pm s.d. of three independent experiments.

Binding analysis of transcription factors to the MMP-9 promoter in Snail expressing cells

Snail has previously been shown to bind to DNA elements (CAGGTG) that conforms to the E-box consensus (CANNTG). One E-box element is detected at position -648 in the -1.17 MMP-9 promoter (Fig. 2A), but is absent from the -588 MMP-9 promoter and other deletion constructs that also show increased promoter activity in the presence of Snail (Fig. 2B and Fig. 3A). To further explore the capacity of Snail to modulate the activity of the proximal MMP-9 promoter, the activity of the pMMP9-389luc construct (III) was analysed by transient transfection with increasing doses of Snail cDNA. Results shown in Fig. 3C demonstrated that Snail cDNA stimulated the activity of the MMP-9 promoter in a dose-responsive manner. Other deletion constructs of the MMP-9 promoter also responded to transient Snail expression with an approximately twofold increase in activity. These results suggest that additional regulatory elements in the MMP-9 gene are involved in Snail-mediated upregulation of the MMP-9 promoter.

To analyse the potential of Snail to interact with the MMP-9 promoter, band-shift studies (EMSA) were performed using the putative E-box element (CACATG) of the promoter. As a control, we included a labelled probe corresponding to the E-pal element of the mouse E-cadherin promoter containing two adjacent E-boxes (Behrens et al., 1991) containing a consensus Snail binding element. As can be observed in Fig. 4A, the nuclear extracts of MDCK-Snail cells did not bind the E-box element at position -648 of the MMP-9 promoter whereas the same extracts bound to the E-pal element (CAGGTG) of the E-cadherin promoter that has been shown to bind this factor with high affinity (Bolos et al., 2003). Indeed, a large complex (indicated by an arrowhead in Fig. 4A,B) was generated in MDCK-Snail cells by using the E-pal probe, which was effectively competed by an excess ($\times 500$) of the cold wild-type oligonucleotide but not competed by a similar excess of the cold mutant E-pal oligonucleotide (Fig. 4B). The

specificity of the Snail complex was further confirmed by the use of the anti-Snail polyclonal antibody (shown in Fig. 4A, lane 11) and is in close agreement with previous results (Bolos et al., 2003). The rest of the complexes were considered nonspecific, or unrelated to Snail, since they were not recognized by the Snail antibody. Taken together, the results indicate that the activation of the MMP-9 promoter by Snail is not achieved by direct binding of this transcription factor to this nt -648 E-box element and that binding of other transcription factors should be responsible.

NF κ B has been reported to regulate MMP-9 expression in different systems (Farina et al., 1999; Kondraganti et al., 2000). Therefore, we analysed whether extracts from stable MDCK-Snail cells could bind to the NF κ B transcription factor motif (TGGAAATCCCCA), included in the construct II, in EMSA assays. Similar complexes (indicated as 'i and ii' in Fig. 5)

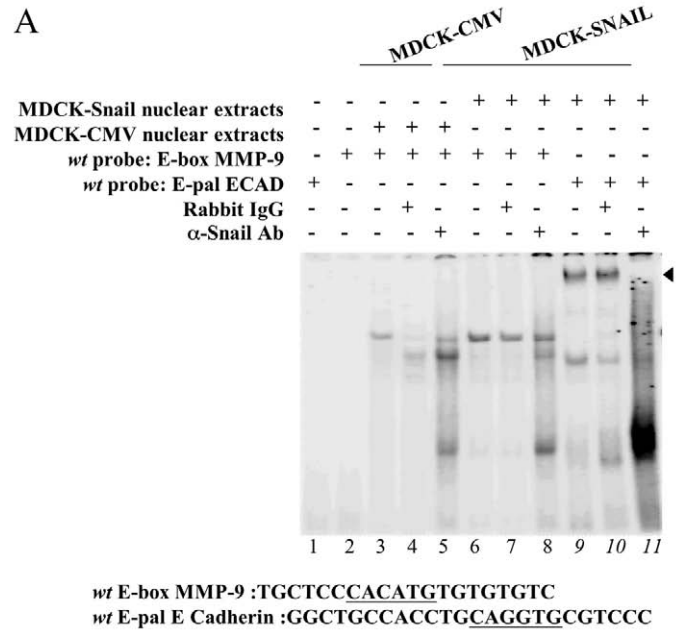
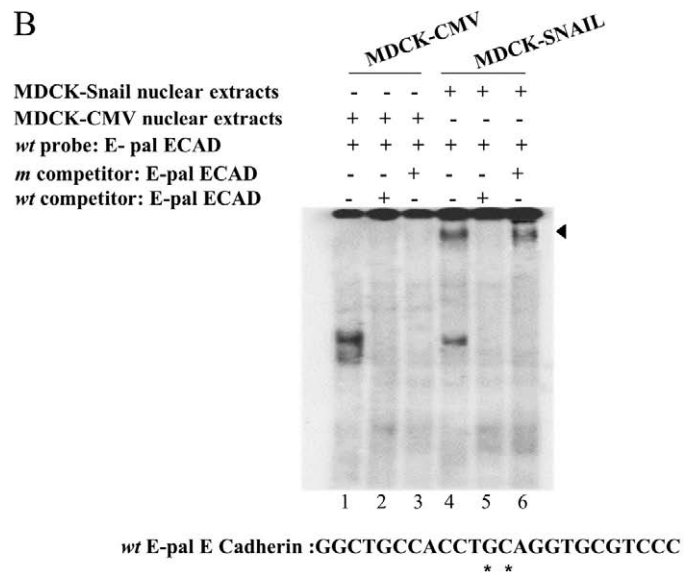


Fig. 4. Nuclear extracts from MDCK-Snail cells did not bind to the putative E-box element of the MMP-9 promoter but bound to the E-pal element of E-cadherin promoter. (A) Nuclear extracts from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells were analysed in band-shift assays using the ³²P-labelled E-box wild-type probe of the MMP-9 promoter containing the putative E-box at nt -648 (lanes 2-8), or the E-pal element of the mouse E-cadherin promoter (lanes 1, 9-11). Lanes 1 and 2 show EMSA in which the nuclear extract was not added. The retarded complexes were detected when using the E-pal probe of the E-cadherin promoter and are indicated by a black arrowhead. Incubation of the MDCK-Snail nuclear extracts in the presence of control rabbit IgG or an anti-Snail antibody is shown in lanes 10 and 11, respectively. The complete sequence of the E-box MMP-9 probe and the E-pal E-cadherin probe are shown at the bottom of the figure with position of E-boxes underlined. The gel shown is representative of at least two independent experiments. (B) Nuclear extracts from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells were analysed in band-shift assays using as a probe the E-pal element of the E-cadherin promoter. Nuclear extracts were incubated with the ³²P-labelled E-pal probe in the presence of 500-fold molar excess of wild-type (lanes 2 and 5) or mutant cold oligonucleotides (lanes 3 and 6). A black arrowhead indicates a retarded complex. The complete sequence of the E-pal probe is shown at the bottom with the position of the mutated nucleotides indicated by asterisks.



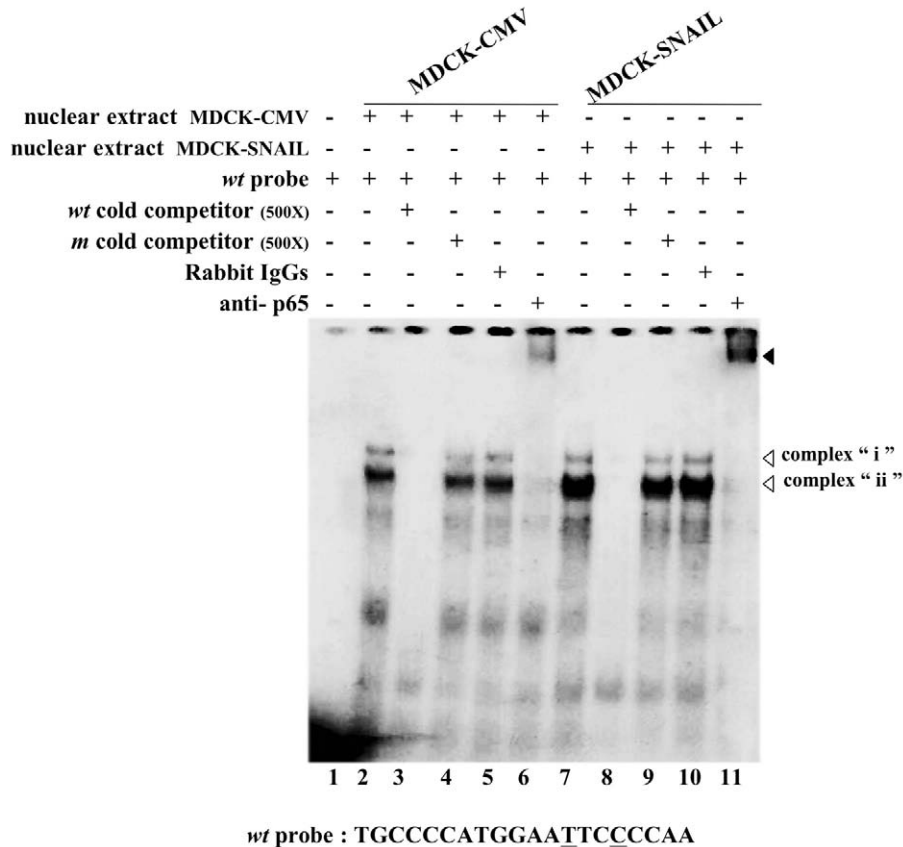


Fig. 5. Nuclear extracts from MDCK-Snail cells contain specific NF κ B-binding complexes. Nuclear extracts from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells were analysed in band-shift assays showing the binding of nuclear proteins to the 32 P-labeled NF κ B wild-type probe, in the absence or presence of 500-fold molar excess of wild-type (lanes 3 and 8) or mutant cold oligonucleotides (lanes 4 and 9) or in the presence of anti-p65 (lanes 6 and 11) or control mouse IgG (lanes 5 and 10). Lane 1 shows a control in the absence of the nuclear extract. White arrowheads indicate the complexes detected (i and ii). A black arrowhead indicates the supershifted complex. The complete sequence of the NF κ B probe is shown at the bottom of the figure. The specific nucleotides mutated in the NF κ B oligonucleotide are underlined. The gel shown is representative of at least two independent experiments.

were detected in nuclear extracts from both MDCK-Snail and MDCK-CMV cells but the main retarded complex (ii) showed a much lower intensity in MDCK-CMV control cells (Fig. 5). Binding could be competed with an excess of the unlabelled specific NF κ B oligonucleotide TGGAATTCCCCA but not with the mutated oligonucleotide TGGAACTACCA (Fig. 5, lanes 3, 8 and 4, 9, respectively). Inclusion of an anti-p65 antibody supershifted both complexes, indicating that the p65 proteins were involved in binding to the NF κ B sequence in these cells (Fig. 5, lanes 6 and 11).

The -389 nt MMP-9 region (shown in construct III, Fig. 2A) contains several potential regulatory elements, including two AP-1 binding sites at nts -505 and -107, shown previously to be important for MMP-9 promoter activity (Fini et al., 1994; Sato and Seiki, 1993). In addition, a further putative AP-1 binding site (GCGGGGTCACT) was found between nts -79 and -69 in the proximal promoter. However, we observed no differences in the binding to AP-1 motifs in nuclear extracts from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells in EMSA (data not shown), suggesting that AP-1 elements are not involved in Snail-mediated regulation of MMP-9.

Sp-1 and Ets-1 binding drive transcriptional activity of the minimal MMP-9 promoter

We focused on the activity of the constructs IV-VI to further analyse other Snail-responsive element(s) in the proximal MMP-9 promoter. Both constructs exhibited similar promoter activity that was 2-3 times greater in MDCK-Snail cells or after transient Snail transfection (Fig. 2B and Fig. 3A). However,

the shorter construct VI that only contains a putative GATA-1 element and the TATA box was virtually inactive in these cells (Fig. 2B and Fig. 3A). Deletion of the promoter region from nts -97 to -75 was associated with a substantial reduction in the activation of the MMP-9 promoter by Snail. Hence, we wondered whether transcription factor binding sites in this part of the promoter were required for MMP-9 activation by the Snail protein. A computer search of this part of the sequence detected a GC-rich segment with one high-affinity binding site for Sp-1 at nt -81 (GGGCGG; HA), several low affinity Sp1 sites (GGGAGG; LA), and two contiguous putative Ets-1 binding sites (GGAGG) at positions -90 and -85 which overlapped the two low-affinity binding sites for the Sp1 family of transcription factors. We explored the function of the different sites in this region by generating independent mutations in the Ets- and Sp1-consensus sites of the proximal promoter (construct V; Fig. 6A). Mutation of the Ets-1/Sp1 LA sites to GAATGGGAGG (construction V^{M89/87}) did not reduce the activity of the promoter but instead increased the activity of the reporter. This result might reflect the functional contribution of both HA Sp-1 and proximal Ets-1 sites that still are present in this construct. In agreement with this proposal, the introduction of mutations on the HA-Sp-1 site between nts -85 and -82 to GGAGGTGATG (construction V^{M85/82}) reduced the reporter activity by 85% with respect to the wild-type construct (Fig. 6B). This suggests that both the HA Sp-1 and proximal Ets-1 elements are crucial to sustain the basal activity and the response of MMP-9 promoter to Snail expression.

DNA binding activity in nuclear extracts of MDCK-CMV

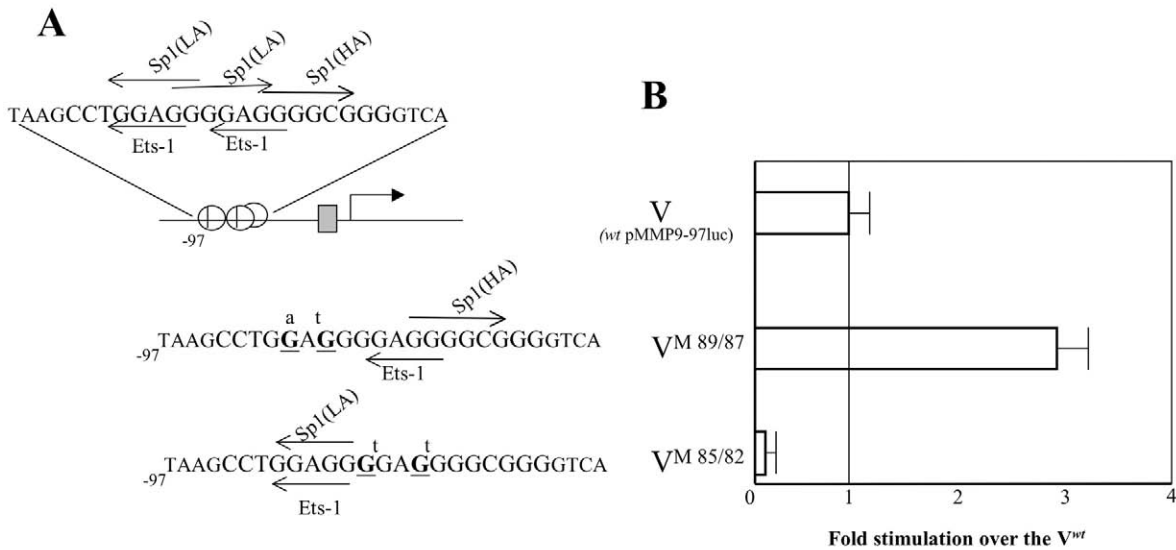


Fig. 6. Ets-1 and Sp-1(HA) elements are responsible for the increase in MMP-9 proximal promoter activity in MDCK-Snail cells. (A) Top, schematic representation of the proximal 5' region -97 bp from the initiation transcription site, indicating the position of the potential regulatory control elements Ets-1, Sp-1 low affinity (LA) or high affinity (HA) and TATA-like (grey box). Middle and lower sequences: point mutations and putative Ets-1 and Sp-1(LA or HA) binding sites are indicated in each mutant construction. (B) The wild-type pMMP9-97 construct (construct V^{wt}) or mutants (construct V^{M 89/87} and V^{M 85/82}) fused to the *luc* reporter gene, were co-transfected with TK renilla into MDCK-Snail cells. Luciferase activity of each construction was determined and represented as fold stimulation of the activity over the -97 MMP-9 promoter (construct V^{wt}) as the mean±s.d. of three independent experiments.

and MDCK-Snail cells was analysed by EMSA using a labelled probe encompassing nucleotides at positions -85 to -65 from the MMP-9 promoter that includes the HA-Sp-1 and Ets-1 sites. As shown in Fig. 7A, lane 7, a major DNA-protein complex was detected in MDCK-Snail cells in the absence of serum that was absent in MDCK-CMV cells cultured under the same conditions. The specificity of this complex was confirmed by its competition with an excess of the unlabelled wild-type oligonucleotide but not with the mutant (Fig. 7A lanes 8 and 10, respectively). The results presented in Fig. 7B were obtained using a probe encompassing all the Sp-1 and Ets-1 sites (nucleotides at positions -97 to -76) and also show a main retarded complex generated by MDCK-Snail cells compared to MDCK-CMV control cells (Fig. 7B lane 3 and 2 respectively). Indeed, both wild-type probes (encompassing nts -85 to -65 and -97 to -76) from this region of the MMP-9 promoter generated the same complexes (data not shown). Furthermore, to confirm that the indicated complex was attributable to the binding of both the Sp-1 and Ets-1 transcription factors, specific anti-Sp-1 or anti-Ets-1 antibodies were included. Both anti-Ets-1 and anti-Sp1 antibodies lowered the intensity of the complex and the anti-Sp-1 antibody also induced a weak supershifted band visible after long exposure of the gel (data not shown) suggesting that both transcription factors participate in the generation of the specific complex in MDCK-Snail cells.

Oncogenic H-Ras (*RasV12*) synergistically co-operates with Snail in activating MMP-9 transcription

There is strong evidence that the *Ras* oncogene itself is a potent stimulus for MMP-9 transcription and secretion (Bernhard et al., 1995; Gum et al., 1996). Hence, we explored whether

activated H-*Ras* collaborates with Snail in inducing MMP-9 promoter activation. MDCK cells were transiently co-transfected with an expression vector encoding an activated H-*Ras* (*RasVal12*) or a dominant negative version (*RasN17*). While Snail and *RasVal12* alone induced modest promoter activity in construct III (2- and 3.5-fold, respectively), a strong synergistic effect was observed when activated *Ras* and Snail were co-transfected, producing a 20-fold increase in the activity of the MMP-9 promoter (construct III) in MDCK cells (Fig. 8). Furthermore, transient expression of a dominant negative version of *Ras* (*RasN17*) led to a 60% reduction in Snail-mediated activation of the MMP-9 promoter (Fig. 8A). These results strongly suggest that activated H-*Ras* is required for, and synergistically co-operates with Snail in MMP-9 promoter induction. Furthermore, the proximal AP-1 site at position -107 in construct III might not be the only element implicated in the induction of MMP-9 promoter through H-*Ras*. Deletion of this region (construct V and smaller constructs) did not significantly alter the synergistic co-operation between H-*Ras* and Snail (data not shown), suggesting that the proximal AP-1 motif at nt -79 is also important.

Consistent with the promoter activity, induction of MMP-9 activity in MDCK-Snail cells by activated H-*Ras* (*RasVal12*) was confirmed as assessed by gelatin zymography analysis (Fig. 8C). In addition, a strong reduction of MMP-9 activity was observed in the presence of a dominant negative version of *Ras* (*RasN17*).

Multiple signalling pathways regulate Snail-induced MMP-9 secretion

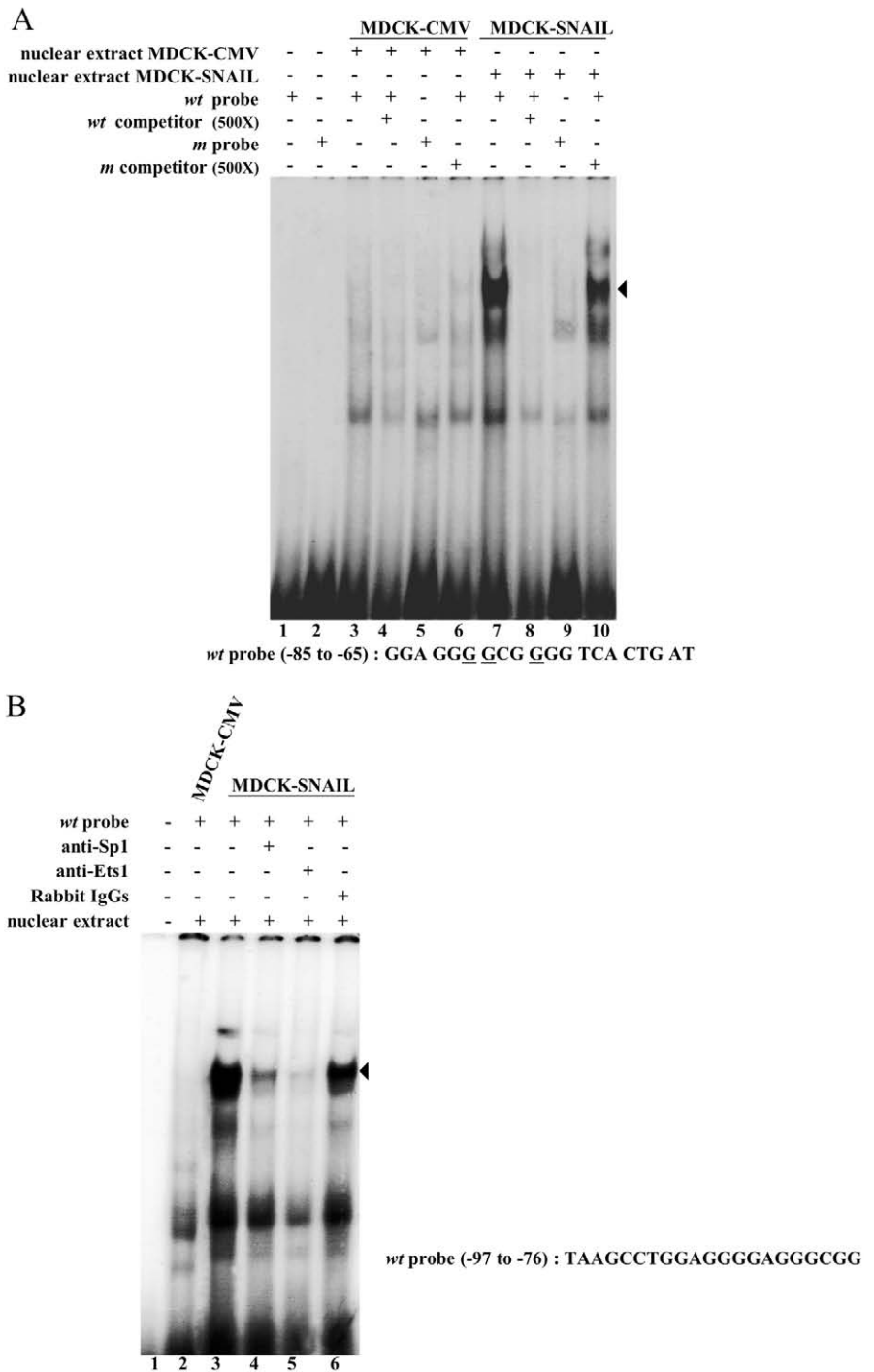
Oncogenic H-*Ras* activates multiple downstream signal transduction pathways, including the Raf/MAPK module and

the PI3K-PKB/Akt pathway implicated in regulating the expression of MMP-9 (Gum et al., 1996). We analysed the *Ras*-activated pathways that might be required for Snail-mediated induction of MMP-9, employing specific low molecular mass inhibitors that selectively block either the MAPK pathway (UO126) or PI3K signalling (wortmannin). The treatment of MDCK-CMV cells with UO126 (10 μ M) led to a 30% decrease in the activity of promoter construct III induced by either *Ras*V12 alone, or Snail and *Ras*V12 together (Fig. 8A). In addition, the MAPK inhibitor significantly reduced MMP-9 transcriptional activity (construct III) induced by Snail by 30%

(Fig. 9A). Furthermore, treatment with a combination of MAPK and PI3K inhibitors (UO126 and wortmannin) reduced activity by 47% (Fig. 9A).

However, the *jun* amino-terminal kinase (JNK) has also been shown to regulate expression of MMP-9 (Gum et al., 1997). Since JNK, via JNKK, is a downstream effector of the protein kinase MEKK, we asked whether Snail-induced transcriptional activation of MMP-9 was modulated through JNK. The MDCK-CMV cells were exposed to a synthetic inhibitor of JNK signalling (JNK inhibitor II), but this did not reduce the activity of the MMP-9 reporter constructs (Fig. 9A). Neither

Fig. 7. Nuclear extracts from MDCK-Snail cells contain specific Ets-1 and Sp-1 binding complexes not observed in MDCK-CMV cells. (A) Nuclear extracts from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells were analysed by EMSA showing the binding of nuclear proteins to the HA-SP-1 and Ets-1 elements. Nuclear proteins from serum free cultures were incubated with the 32 P-labelled wild-type probe encompassing the sequence from nts -85 to -75 of MMP-9 promoter in the absence or presence of 500-fold molar excess of wild-type (lanes 3 and 8) or mutant cold oligonucleotides (lanes 6 and 10). Lanes 1 and 2 show EMSA in which the nuclear extracts were not added. The 32 P-labelled mutant probe was used in lanes 5 and 9. Black arrowhead indicates the main complex detected. The complete sequence of the wild-type probe is shown at the bottom of the figure in which the mutated nucleotides are underlined. The gel shown is representative of at least two independent experiments. (B) Nuclear extracts of MDCK-CMV (lane 2) and MDCK-Snail cells (lanes 3-6) were analysed in band-shift assays. The 32 P-labelled wild-type (wt) oligonucleotide encompassing the sequence from nts -97 to -75 of the MMP-9 promoter is shown at the bottom. Nuclear extracts were incubated with either an anti-Sp-1 (lane 4) or anti-Ets-1 (lane 5) antibodies, or control rabbit IgG (lane 6). A black arrowhead indicates the main complex detected, the intensity of which is lowered by both antibodies. The gel shown is representative of four independent experiments.



did an inhibitor of the p38 pathway, SB 203580, modify Snail-induced activity of the MMP-9 promoter (Fig. 9A).

Increased levels of active ERKs (phospho-p42 and phospho-p44) and active Akt in MDCK-Snail cells were confirmed by western blots (Fig. 9B,C). In addition, an antibody that recognised both the phosphorylated and unphosphorylated forms of Sp-1, detected increased levels of both forms of Sp-1 protein in Snail-expressing cells but not in MDCK-CMV (Fig. 9D). Phosphorylation of Sp-1 by ERK provokes an increase in the transcriptional activity of Sp1-dependent genes (Black et al., 2001; Reisinger et al., 2003). To evaluate whether phosphorylation of Sp-1 through Erk may influence the DNA-binding activity of this transcription factor to the proximal MMP-9 promoter, we performed EMSA experiments with nuclear extracts of MDCK-Snail cells expressing a dominant negative mutant of MEK (MEK-DN) with the -97 to -76 nt probe. As shown in Fig. 9E, transfection of this MEK mutant provoked a clear reduction in the intensity of complexes. As expected, anti-Erk1/2 antibodies were able to detect a decrease in the phosphorylated forms of Erk after the expression of MEK-DN (Fig. 9E, lower panels). These results clearly demonstrate that phosphorylated Sp-1 is recruited to the MMP-9 promoter following activation of the Erk1/Erk2 pathway.

Discussion

The recent identification of Snail as a strong repressor of E-cadherin and a potent mediator of EMT (Cano et al., 2000), suggests that Snail may act on other target genes that contribute to the phenotypic changes associated with this process (Guaita et al., 2002; Vega et al., 2004). One of the hallmarks of the EMT, both in embryogenesis and in pathological situations such as tumour invasion, is the enhanced capacity to invade and migrate through the basal membranes. As such, a functional link between E-cadherin and the MMPs has been established (Llorens et al., 1998; Nawrocki-Raby et al., 2003). Indeed, Snail has recently been shown to induce MMP-1, MMP-2, MMP-7 and MT1-MMP in HepG2 and Huh-7 hepatocellular cell lines and squamous cell carcinomas (Miyoshi et al., 2004; Yokoyama et al., 2003). We show here that Snail expression induces an increase in the gelatinolytic activity of MMP-9, accompanied by a significant increase in MMP-9 mRNA levels. Secondly, we show that the induction of MMP-9 promoter activity by Snail is partly mediated through multiple elements located in the region upstream from the transcription start site.

When human and mouse MMP-9 gene sequences are compared the major binding sites for AP-1 and NF κ B are conserved in both genomes, as is an E-box element located

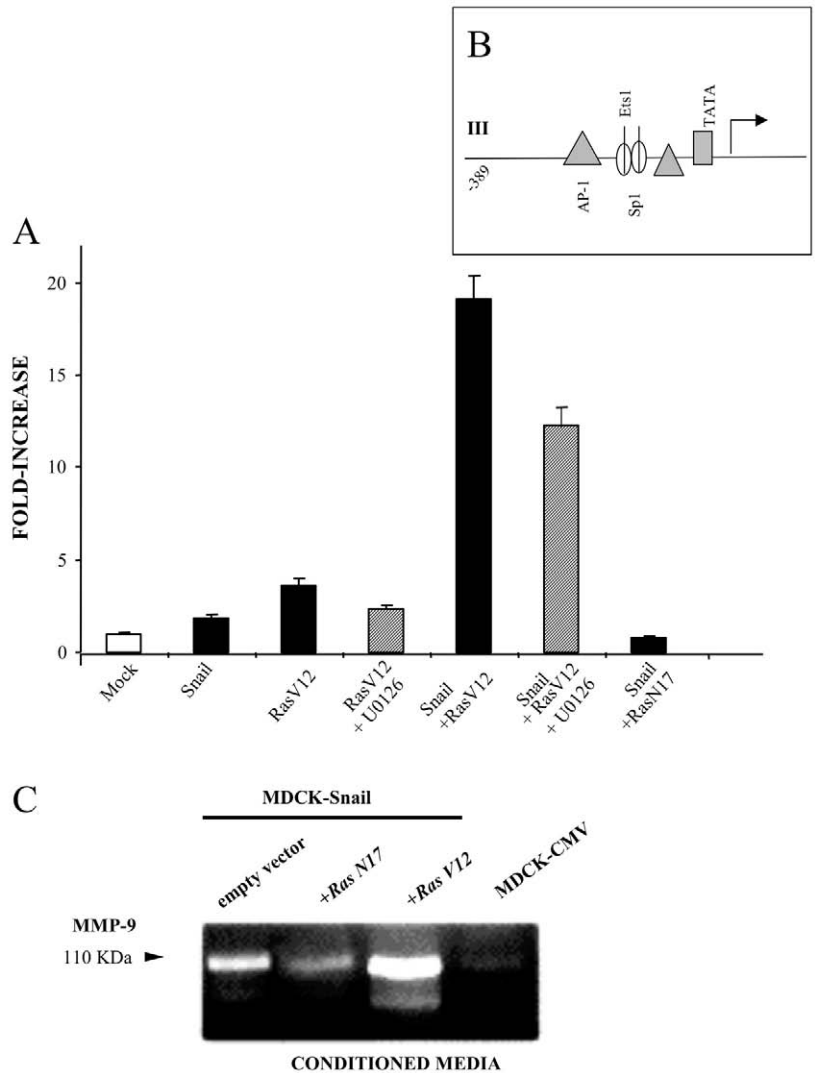


Fig. 8. Induction of MMP-9 promoter activity and gelatinolytic expression by synergistic co-operation of oncogenic *RasVal12* and Snail. (A) MDCK-CMV cells were transiently co-transfected with the pMMP9-392luc reporter construct and the indicated combinations of oncogenic *Ras* (*RasVal12*), Snail, a dominant negative *Ras* (*RasN17*) or the pCDNA3 expression vector (Mock), as well as TK renilla. After transfection, the cells were treated for an additional 5 hours with UO126 inhibitor (10 μ M) or DMSO, prior to determining luciferase activity. The data are expressed as the mean \pm s.d. of the relative normalised luciferase values from three independent experiments. (B) Schematic representation of the proximal 5' region examined in these experiments. The pMMP9-389luc (construct III) contains 389 bp from the initiation transcription site and the positions of potential regulatory control elements are indicated. (C) The effects of Snail and *Ras* oncogene were analysed in the conditioned media by zymography in gelatin-embedded SDS polyacrylamide gels. MDCK-Snail cells were transiently transfected with oncogenic *Ras* (*RasVal12*), a dominant negative *Ras* (*RasN17*) or the empty plasmid and media were collected after 24 hours. Conditioned medium from MDCK-CMV cells was also included as control.

at nt -648. Although this element seems to be involved in Snail-mediated induction of MMP-9 expression through the activation of the large -1.17 nt MMP-9 promoter construct, we have not observed specific binding to this element in vitro in MDCK-Snail cells, probably because it differs from the consensus Snail binding element. Nevertheless, the specific

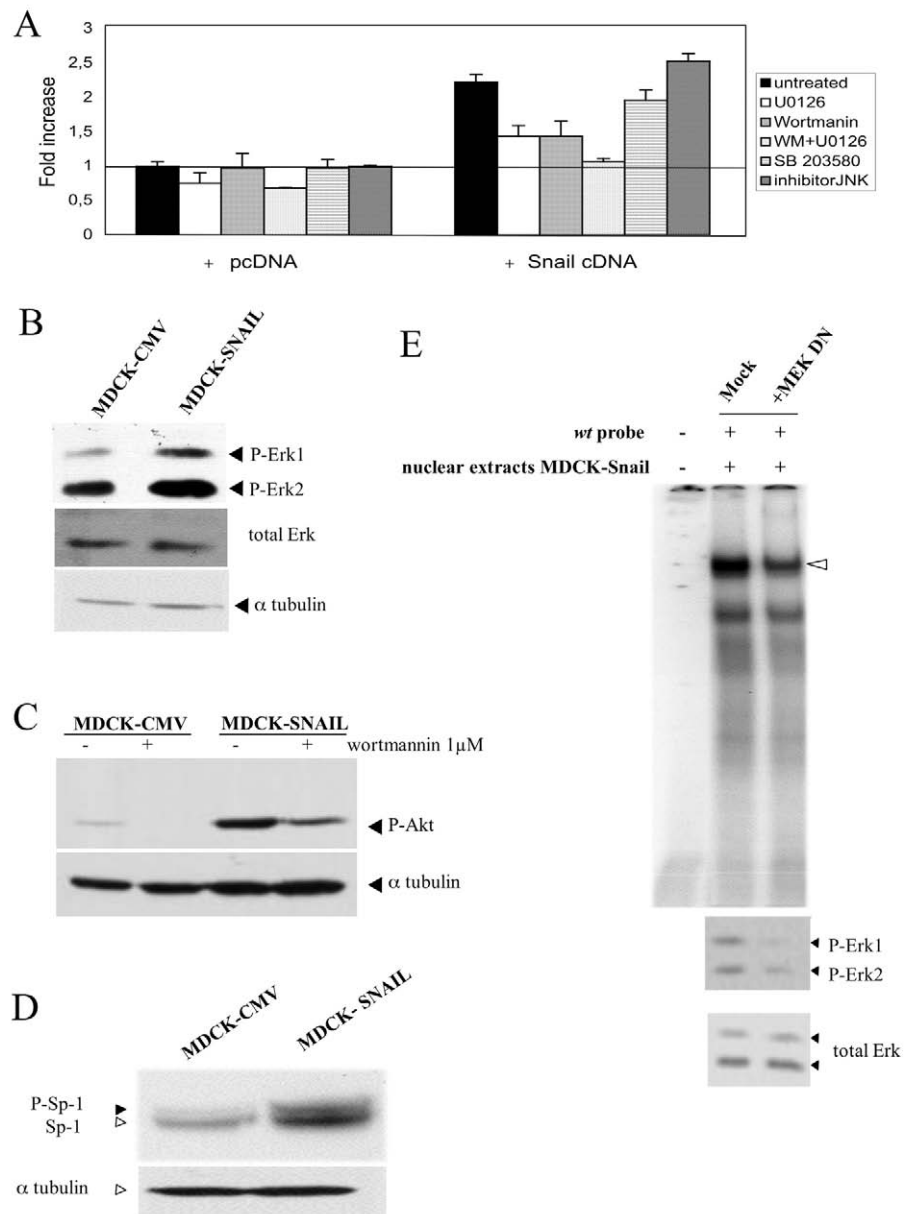
binding of factors to elements such as NF κ B, Sp-1 and Ets-1 is augmented in Snail-expressing cells.

The NF κ B site is indispensable for TGF- β -mediated transcriptional downregulation of MMP-9 in monocytes/macrophages (Ogawa et al., 2004) as well as for both basal and PMA-induced transcription, acting together with AP-1 (Sato and Seiki, 1993). The mechanism leading to the activation of NF κ B is not well understood in our system, although it might be mediated, at least in part, by PKB/AKT signalling (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). Nevertheless, it is worth mentioning that the amount of p65 protein was not altered by Snail expression in MDCK cells (data not shown), suggesting that differential binding to NF κ B sites probably results from the activation of NF κ B-p65 transcription factors. *Trans*-acting activity of the MMP-9 promoter-bound transcription factors, appears to be crucial but not exclusive for MMP-9 expression. Indeed, the enforced expression of the metastases-associated gene *MTA1* has been

shown to reduce basal and PMA-induced MMP-9 protein and mRNA levels without altering the occupancy of these sites through a mechanism that is both dependent on and independent of histone deacetylation (Yan et al., 2003). Irrespective of the specific mechanisms, our results are consistent with previous reports showing that NF κ B expression is associated with more malignant phenotypes in squamous cell skin carcinomas (Dong et al., 1999) and breast carcinoma (Sovak et al., 1999). Moreover, increased NF κ B activity and signalling regulates MMP-9 expression (Farina et al., 1999; Kondraganti et al., 2000), and has a dramatic impact on metastatic potential (Andela et al., 2000) and invasion through Matrigel (Huang et al., 2001).

In addition to the aforementioned elements, a region lying upstream of the AP-1/TRE, the GGGGAGGGG motif, and related sequences are also conserved in the mouse genome (from nts -87 to -79). However, an important difference in the region located between the proximal AP-1 site (at nt -107) and

Fig. 9. MAPK and PI3K signalling pathways are involved in the induction of MMP-9 proximal promoter by Snail. (A) MMP-9 promoter activity was measured in MDCK-CMV cells by using the reporter construct pMMP9-389luc in the absence or presence of the Snail expression vector, and in the presence or absence of the following inhibitors: UO126 (10 μ M); wortmannin (40 nM); SB 203580 (10 μ M) or JNK inhibitor II (100 nM). Control cells (untreated) were unstimulated and treated with DMSO alone. Promoter activity is expressed relative to the value obtained in MDCK-CMV untreated cells and results are expressed as the mean \pm s.d. of three independent experiments. (B,C) Effect of Snail on Erk (B) and Akt (C) phosphorylation. Total cellular protein was extracted from MDCK-CMV and MDCK-Snail untreated cells and cells treated with wortmannin (C). 150 μ g were analysed by western blotting using specific antibodies for the phosphorylated forms of these protein kinases. α -tubulin was used as a loading control. (D) Cell extracts (30 μ g) from MDCK-CMV and MDCK-Snail cells were used in western blots to determine Sp-1 phosphorylation status using a specific antibody that recognizes the phosphorylated and unphosphorylated isoforms. α -tubulin was used as a loading control. One representative experiment out of five is shown. (E) Nuclear extracts of MDCK-Snail cells cultured for 24 hours in serum-free medium were analysed by EMSA after transient transfection with MEK-DN expression vector or empty plasmid. The 32 P-labelled wild-type (wt) oligonucleotide encompassing the sequence from nts -97 to -76 is the same as that in Fig. 7B. The same nuclear extracts were analysed by western blotting using specific antibodies for the phosphorylated forms of Erk protein kinases. Anti-total Erk antiserum was used in the same membrane as a loading control.



the TATA box, was that this GC-rich motif (GGGGAGGGGCGGGG) in the mouse gene corresponds to a GT-box (GGGGTGGGG) in the human gene. Substitution of a GT box for a GA box, has been reported to have dramatic effects on the response of the MMP-9 promoter to *Src* (Sato et al., 1993). Moreover, GT-box sequences have been mapped as RCEs (retinoblastoma control elements) and they are present in the promoter regions of *Myc*, *Fos*, transforming growth factor β 1 (*Tgfb1*), insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) and many other genes (Kim et al., 1991). Similarly, the GC-rich sequences in the *JunB* and *EGR-1* gene promoters have also been identified as RCEs. While it has not yet been demonstrated that the RCE stimulates the MMP-9 promoter, Sp-1 might bind to the RCE and activate transcription of human MMP-9 (Kim et al., 1992). Indeed, Rb positively regulates RCE-mediated transcriptional activity by Sp-1. Similarly, the proximal region between -97 bp and the TATA box sustained Snail-induced stimulation of MMP-9 promoter activity and we explored the contribution of several putative elements within this region.

We found evidence that the elements located within the -97 to -75 nt region are sufficient for minimal activation of the MMP-9 promoter by Snail. However, while the AP-1 motif GCGGGGTCCT (from nts -79 to -69) overlapping the GC box might contribute to the MMP-9 response, the presence of Snail did not alter binding to this element in vitro (data not shown). In contrast, Snail expression increased the binding to the Ets-1 and Sp-1 elements in vitro, accounting for the increased activity of the MMP-9 proximal promoter. We suggest that binding of both factors exerts a co-operative effect on promoter activation through the MAPK- and PI3K-dependent signalling pathways. Indeed, disruption of ERK and PI3K-dependent signalling inhibits the Snail-mediated increase in MMP-9 promoter activity in MDCK cells. Activated ERK kinases may phosphorylate either Ets-1 or Sp-1 proteins enhancing transcription of the genes responsive to these elements (Black et al., 2001; Milanini-Mongiati et al., 2002; O'Neill et al., 1994). Indeed, increased phosphorylation of Sp-1 was detected in MDCK-Snail cells.

The constitutive activation of ERK 2 kinase in MDCK-Snail cells may activate the MMP-9 proximal promoter through different effectors. These results are consistent with reports showing that ERK 1/2 increases the activation and activity of the MMP-9 promoter via MEK1 (Gum et al., 1996; Gum et al., 1997). However, since specific inhibitors only reduced activity by 30%, it seems likely that other signal pathways also modulate the effects of Snail on MMP-9 promoter activity. Indeed, the PI3K pathway co-operates with ERK 2 in activating the MMP-9 promoter in MDCK cells in the presence of Snail. Taken together, our results support a role for the MAPK and PI3K pathways in Snail-mediated MMP-9 induction. Both pathways participate in EMT and an invasive MDCK cell phenotype has been reported in cells with activated MEK1 following TGF- β treatment (Janda et al., 2002; Peinado et al., 2003), as well as with an inducible form of Raf (Raf-ER) which leads to the autocrine production of TGF- β (Lehmann et al., 2000). Furthermore, the MAPK and PI3K signalling pathways are involved in the activation of Snail transcription (Barbera et al., 2004; Peinado et al., 2003) suggesting that it might contribute to sustain the activation of the MMP-9 gene in MDCK-Snail cells. Taken together, Snail expression confers a double selective

advantage to cells, making them resistant to cell death (Vega et al., 2004) and enabling them to degrade the major components of basement membranes, which are requisites for malignant cells to disseminate and form metastasis.

Significantly, we also observed a synergism between *Ras* and Snail in the induction of MMP-9 promoter activity. This may also be the result of augmenting the activity of the MAPK and PI3K pathways, since *Ras* can stimulate both signalling proteins (Karin, 1995; Webb et al., 1998). Importantly, ERKs also increase the synthesis and/or activity of several transcription factors, including members of the AP-1 families and *Fos* (Gille et al., 1992), as well as Ets and Sp-1 (Bouwman and Philipsen, 2002; O'Neill et al., 1994). Participation of the AP-1 factors seems only to be required for *Ras*-mediated induction of the MMP-9 promoter, suggesting that it contributes to the synergistic activation of the promoter by *Ras* and Snail.

Taken together, our results confirm previous reports of elements that control MMP-9 expression, including the AP-1, NF κ B, Sp-1 and Ets-1 sites within the -670 bp region upstream to the transcription start site (Farina et al., 1999; Sato et al., 1993; Takahara et al., 2004; Troussard et al., 2000; Yan et al., 2004). Moreover, they support an important role for activated MAPK on the activation of the proximal MMP-9 promoter, mainly within the -97 bp region upstream of the transcription start site. While the involvement of MAPK and PI3K in EMT is well documented (Janda et al., 2002; Montesano et al., 1999; Schramek et al., 1997), the nature of the transduction pathways used by Snail and that lead to the activation of MAPK remain unknown. These pathways appear to be particularly significant and might enable Snail to co-ordinate the events that lead to the expression of genes required for the EMT, and that facilitate tumour progression.

In conclusion, MMP-9 transcription is activated in response to Snail expression concomitantly with the activation of the MAPK and PI3K signalling pathways. The increased expression of this matrix metalloproteinase may explain, at least in part, the invasive properties acquired by Snail-expressing cells in the context of the EMT as well as in tumour progression.

We thank A. Aranda, P. Crespo and A. Bigas for providing vectors. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF 2002-817 to A.F. and SAF 2004-00361 to A.C.) and the Instituto de Salud Carlos III, RTICCC, FIS 03-C03/10. D.O. was supported by a grant from Advancell, S.L.; E.V. and E.C. were supported by predoctoral fellowships from Fondo de Investigacion Sanitaria (FIS) and M.J. was a PhD student at the Biochemistry and Molecular Biology Department of the UAB, Bellaterra, Spain.

References

- Andela, V. B., Schwarz, E. M., Puzas, J. E., O'Keefe, R. J. and Rosier, R. N. (2000). Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res.* **60**, 6557-6562.
- Ballin, M., Gomez, D. E., Sinha, C. C. and Thorgeirsson, U. P. (1988). Ras oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 832-838.
- Barbera, M. J., Puig, I., Dominguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiro, S., Baulida, J., Franci, C., Dedhar, S., Larue, L. et al. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* **23**, 7345-7354.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a

- repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84-89.
- Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L. and Birchmeier, W.** (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11495-11499.
- Bernhard, E. J., Hagner, B., Wong, C., Lubenski, I. and Muschel, R. J.** (1995). The effect of E1A transfection on MMP-9 expression and metastatic potential. *Int. J. Cancer* **60**, 718-724.
- Black, A. R., Black, J. D. and Azizkhan-Clifford, J.** (2001). Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J. Cell Physiol.* **188**, 143-160.
- Blanco, M. J., Moreno-Bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J. and Nieto, M. A.** (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* **21**, 3241-3246.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M. and Cano, A.** (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* **116**, 499-511.
- Bouwman, P. and Philipsen, S.** (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol. Cell Endocrinol.* **195**, 27-38.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76-83.
- Caulin, C., Scholl, F. G., Frontelo, P., Gamallo, C. and Quintanilla, M.** (1995). Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth Differ.* **6**, 1027-1035.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. and Chakraborti, T.** (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell Biochem.* **253**, 269-285.
- Christofori, G. and Semb, H.** (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 73-76.
- Dong, G., Chen, Z., Kato, T. and Van Waes, C.** (1999). The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **59**, 3495-3504.
- Ellerbroek, S. M., Halbleib, J. M., Benavidez, M., Warmka, J. K., Wattenberg, E. V., Stack, M. S. and Hudson, L. G.** (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res.* **61**, 1855-1861.
- Farina, A. R., Tacconelli, A., Vacca, A., Maroder, M., Gulino, A. and Mackay, A. R.** (1999). Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ.* **10**, 353-367.
- Fini, M. E., Bartlett, J. D., Matsubara, M., Rinehart, W. B., Mody, M. K., Girard, M. T. and Rainville, M.** (1994). The rabbit gene for 92-kDa matrix metalloproteinase. Role of AP1 and AP2 in cell type-specific transcription. *J. Biol. Chem.* **269**, 28620-28628.
- Freije, J. M., Balbin, M., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., Puente, X. S. and Lopez-Otin, C.** (2003). Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **532**, 91-107.
- Fridman, R., Toth, M., Chvyrkova, I., Meroueh, S. O. and Mobashery, S.** (2003). Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metast. Rev.* **22**, 153-166.
- Gille, H., Sharrocks, A. D. and Shaw, P. E.** (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**, 414-417.
- Govindarajan, B., Bai, X., Cohen, C., Zhong, H., Kilroy, S., Louis, G., Moses, M. and Arbiser, J. L.** (2003). Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase (MAPKK) signalling. *J. Biol. Chem.* **278**, 9790-9795.
- Gaaita, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A. G. and Baulida, J.** (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 39209-39216.
- Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M. and Boyd, D.** (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.* **271**, 10672-10680.
- Gum, R., Wang, H., Lengyel, E., Juarez, J. and Boyd, D.** (1997). Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signalling cascades. *Oncogene* **14**, 1481-1493.
- Himmelstein, B. P., Canete-Soler, R., Bernhard, E. J., Dilks, D. W. and Muschel, R. J.** (1994). Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invas. Metast.* **14**, 246-258.
- Huang, S., Pettaway, C. A., Uehara, H., Bucana, C. D. and Fidler, I. J.** (2001). Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* **20**, 4188-4197.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. and Grunert, S.** (2002). Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signalling pathways. *J. Cell Biol.* **156**, 299-313.
- Karin, M.** (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486.
- Kerkela, E. and Saarialho-Kere, U.** (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp. Dermatol.* **12**, 109-125.
- Kim, S. J., Lee, H. D., Robbins, P. D., Busam, K., Sporn, M. B. and Roberts, A. B.** (1991). Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibility gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3052-3056.
- Kim, S. J., Onwuta, U. S., Lee, Y. I., Li, R., Botchan, M. R. and Robbins, P. D.** (1992). The retinoblastoma gene product regulates Sp1-mediated transcription. *Mol. Cell Biol.* **12**, 2455-2463.
- Kondapaka, S. B., Fridman, R. and Reddy, K. B.** (1997). Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **70**, 722-726.
- Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S. K., Kin, Y., Jasti, S. L., Nirmala, C., Lakka, S. S., Adachi, Y., Kyritsis, A. P., Ali-Osman, F. et al.** (2000). Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res.* **60**, 6851-6855.
- Kupferman, M. E., Fini, M. E., Muller, W. J., Weber, R., Cheng, Y. and Muschel, R. J.** (2000). Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am. J. Pathol.* **157**, 1777-1783.
- Lakka, S. S., Jasti, S. L., Gondi, C., Boyd, D., Chandrasekar, N., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M. and Rao, J. S.** (2002). Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro. *Oncogene* **21**, 5601-5608.
- Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C. E., Rytomaa, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C. S., Beug, H. and Downward, J.** (2000). Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* **14**, 2610-2622.
- Llorens, A., Vinyals, A., Alia, P., Lopez-Barcons, L., Gonzalez-Garrigues, M. and Fabra, A.** (1997). Metastatic ability of MXT mouse mammary subpopulations correlates with clonal expression and/or membrane-association of gelatinase A. *Mol. Carcinog.* **19**, 54-66.
- Llorens, A., Rodrigo, I., Lopez-Barcons, L., Gonzalez-Garrigues, M., Lozano, E., Vinyals, A., Quintanilla, M., Cano, A. and Fabra, A.** (1998). Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab. Invest.* **78**, 1131-1142.
- McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V. and Hudson, L. G.** (1999). Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J. Biol. Chem.* **274**, 4347-4353.
- Mehta, P. B., Jenkins, B. L., McCarthy, L., Thilak, L., Robson, C. N., Neal, D. E. and Leung, H. Y.** (2003). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* **22**, 1381-1389.
- Milanini-Mongiati, J., Pouyssegur, J. and Pages, G.** (2002). Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 20631-20639.

- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y. and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **90**, 1265-1273.
- Montesano, R., Soriano, J. V., Hosseini, G., Pepper, M. S. and Schramek, H. (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **10**, 317-332.
- Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Polette, M., Martinella-Catusse, C., Bonnet, N., Puchelle, E., Foidart, J. M., Van Roy, F. and Birembaut, P. (2003). E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am. J. Pathol.* **163**, 653-661.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for Drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* **78**, 137-147.
- Ogawa, K., Chen, F., Kuang, C. and Chen, Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *Biochem. J.* **381**, 413-422.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. and Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85.
- Peinado, H., Quintanilla, M. and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* **278**, 21113-21123.
- Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A. and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* **276**, 27424-27431.
- Reisinger, K., Kaufmann, R. and Gille, J. (2003). Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J. Cell Sci.* **116**, 225-238.
- Rodriguez-Manzanique, J. C., Lane, T. F., Ortega, M. A., Hynes, R. O., Lawler, J. and Iruela-Arispe, M. L. (2001). Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12485-12490.
- Romashkova, J. A. and Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86-90.
- Samuel, S. K., Hurta, R. A., Kondaiah, P., Khalil, N., Turley, E. A., Wright, J. A. and Greenberg, A. H. (1992). Autocrine induction of tumor protease production and invasion by a metallothionein-regulated TGF-beta 1 (Ser223, 225). *EMBO J.* **11**, 1599-1605.
- Sato, H. and Seiki, M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8**, 395-405.
- Sato, H., Kita, M. and Seiki, M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **268**, 23460-23468.
- Schramek, H., Feifel, E., Healy, E. and Pollack, V. (1997). Constitutively active mutant of the mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 induces epithelial dedifferentiation and growth inhibition in madin-darby canine kidney-C7 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 11426-11433.
- Sehgal, I. and Thompson, T. C. (1999). Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol. Biol. Cell* **10**, 407-416.
- Sovak, M. A., Arsur, M., Zanieski, G., Kavanagh, K. T. and Sonenshein, G. E. (1999). The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression. *Cell Growth Differ.* **10**, 537-544.
- Takahara, T., Smart, D. E., Oakley, F. and Mann, D. A. (2004). Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 353-363.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 619-627.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442-454.
- Troussard, A. A., Costello, P., Yoganathan, T. N., Kumagai, S., Roskelley, C. D. and Dedhar, S. (2000). The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* **19**, 5444-5452.
- Vega, S., Morales, A. V., Ocana, O. H., Valdes, F., Fabregat, I. and Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* **18**, 1131-1143.
- Webb, C. P., Van Aelst, L., Wigler, M. H. and Woude, G. F. (1998). Signalling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8773-8778.
- Welch, D. R., Fabra, A. and Nakajima, M. (1990). Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7678-7682.
- Yan, C., Wang, H., Toh, Y. and Boyd, D. D. (2003). Repression of 92-kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism, which is both dependent on and independent of histone deacetylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 2309-2316.
- Yan, C., Wang, H., Aggarwal, B. and Boyd, D. D. (2004). A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *FASEB J.* **18**, 540-541.
- Yao, J., Xiong, S., Klos, K., Nguyen, N., Grijalva, R., Li, P. and Yu, D. (2001). Multiple signalling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin-beta1 in human breast cancer cells. *Oncogene* **20**, 8066-8074.
- Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H. and Nagayama, M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int. J. Oncol.* **22**, 891-898.
- Zeigler, M. E., Chi, Y., Schmidt, T. and Varani, J. (1999). Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J. Cell Physiol.* **180**, 271-284.

Date: Tue, 30 Aug 2005 14:51:09 +0100
Subject: JCS 15600
From: Sue Chamberlain <sue@biologists.com>
To: <afabra@iro.es>
X-Authenticated-Sender: sue
X-Server: VPOP3 V2.1.0g - Registered

Re: JCS 15600 'Regulation of the Id-1 gene by Snail and E47 transcription factors concomitantly with the activation of the MAPK signaling pathway '.

Dear Dr Fabra,

Thank you for submitting your manuscript online to Journal of Cell Science.

Your manuscript number is JCS 15600.

If you wish to check on the progress of your paper at any time, please feel free to contact us at the JCS Editorial Office in Cambridge. Please note, JCS does not update the status fields on Espere to show when referees are assigned.

We will contact you again as soon as we have some news.

Yours sincerely,

Sue Chamberlain

Sue Chamberlain
Journal of Cell Science
Bidder Building
140 Cowley Road
Cambridge
CB4 0DL
UK

Tel: 44 (0) 1223 424430
Fax: 44 (0) 1223 424781
E-mail: Sue@biologists.com

**Regulation of the Id-1 gene by Snail and E47 transcription factors
concomitantly with the activation of the MAPK signaling pathway**

Mireia Jordà¹, Antònia Vinyals¹, Eva Cubillo², David Olmeda², Anna Marazuela¹, Eva Valero¹, Cristina Broceño¹, Amparo Cano² and Àngels Fabra^{1*}

¹ IDIBELL- Institut de Recerca Oncològica, Centre d'Oncologia Molecular, Barcelona, Spain.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) and Departamento de Bioquímica (UAM), Madrid, Spain.

* Corresponding Author: Dr Àngels Fabra, Centre d'Oncologia Molecular, IDIBELL- Institut de Recerca Oncològica, Barcelona, Spain. Tel: (+34) 93 2607405; Fax: (+34) 93 2607426; e-mail: afabra@iro.es

Running title: Upregulation of Id-1 by Snail, E47 and MAPK

Keywords: Id-1, E47, Snail, MAPK.

Word count: 7985 (including the Summary, Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion and Figure legends).

SUMMARY

E47 and Snail repressors of the E-cadherin promoter trigger epithelial-mesenchymal transitions, endowing epithelial cells with invasive and angiogenic properties. We show here that the stable expression of both transcription factors in MDCK epithelial cell line activates the Id-1 gene promoter and induces Id-1 mRNA and protein. The upregulation of the Id-1 gene occurs concomitantly with the activation of the MAPK signaling pathway and involves an E-box element at -1125 nt upstream of the Id-1 promoter. Mutation of this element completely abrogates the induction of the promoter in response to E47 and Snail expression. Gel shift analysis detected a new generated low-mobility complex in Snail- expressing cells, which was absent in silenced Snail-RNA cells. A similar low-mobility complex was detected in E47-expressing cells and recognized by anti-E47 antibodies. Furthermore, the complex was affected by MEK inhibitor treatment suggesting that the activated Erks may contribute to the recruitment or assembly of different protein partners such as SP-1 to the multiprotein-complex. Moreover, oncogenic Ras is also able to activate Id-1 promoter in MDCK cells in the absence of both E47 and Snail transcription factors. These results, together with the known expression of these factors and the presence of Ras activating mutations in carcinoma cell lines may explain the upregulation of Id-1 gene in the tumors.

Introduction

Recent evidences support that both E47 and Snail transcription factors interact with proximal E-boxes of the E-cadherin promoter to repress transcription during epithelial mesenchymal transition (EMT) in developmental processes such as mesoderm specification (Nieto, 2002; Perez-Moreno et al., 2001). Moreover, functional loss of E-cadherin is involved in the development and progression of numerous carcinomas as well (Thiery, 2002). Furthermore, epithelial cells undergoing EMT by stable expression of these factors suffer tremendous changes in morphology and motility and acquire tumorigenic and invasive properties (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Changes in gene expression resulting in mesenchymal-like phenotype suggest that both E47 and Snail repressors of the E-cadherin also modulate other genes to fully drive the EMT process. Indeed, Snail directly suppresses the gene expression of several tight junction components independently of E-cadherin downregulation (Ikenouchi et al., 2003; Ohkubo and Ozawa, 2004), as well as other epithelial genes such as MUC1 and cytokeratin 18 (Guaita et al., 2002). In a recent study, it was demonstrated that Snail may also bind genes involved in signalling and metabolism as well as some transcription factors (De Craene et al., 2005a) that may contribute to the mesenchymal-like phenotype. Apparently, the repression of these target genes seems to be dependent on E-box sequences (CAGGTG or CACCTG) present in the corresponding promoter (De Craene et al., 2005b). In agreement with this observation, two E-boxes of the cyclin D2 promoter participate in the transcriptional repression of this cell cycle gene previously shown to be a target of Snail (Vega et al., 2004). In contrast to the repressive effect elicited by Snail transcription factors, it is also known that several mesenchymal markers such as LEF-1, vimentin and fibronectin are upregulated after Snail expression (Cano et al., 2000; Guaita et al., 2002). Snail is also upstream of molecules involved in the degradation of the basement membrane and angiogenesis such as MMP-2 (Yokoyama et al., 2003) and MMP-9 (Jorda et al., 2005). However, until now, few studies have focused on the Snail-induced genes compared with the repressed ones, and information on the responsible mechanisms for their upregulation by Snail or E47 remains open. Recent evidence suggests that upregulation is elicited, at least in the case of the MMP-9 gene, by distinct cascades of intracellular events that culminate in changes in gene expression (Jorda et al., 2005). An additional point worth mentioning is that transcriptional activation of target genes might result

from either direct E47 or Snail binding to E-boxes elements in the promoters or by recruitment of transcriptional activators/repressors.

Id proteins (inhibitor of differentiation or DNA binding) are a group of helix-loop-helix (HLH) transcription factors that lack the DNA binding domain. They act as dominant negative regulators of basic HLH transcriptional factors by heterodimerization (Benezra et al., 1990). The resultant heterodimers render the specific bHLH proteins unable to target genes containing E-boxes (CANNTG) in their promoters. Four members of the Id gene family (Id-1 to Id-4) have been already described and show important differences in their pattern of expression and binding specificity for particular bHLH proteins. Since bHLH proteins are involved in tissue-specific differentiation, aberrant Id expression may interfere with cellular differentiation and growth programs of a wide variety of cell types (Norton, 2000). Recent studies suggest that Id proteins, especially Id-1, may function as oncogenes leading to similar changes to those induced in cell transformation (Hara et al., 1996; Lasorella et al., 2002; Perk et al., 2005; Zebedee and Hara, 2001). Id-1 has been recently proposed as a key regulator in tumor progression since it provides clues in favor of tissue invasion (Desprez et al., 2003; Sumida et al., 2004), tumor angiogenesis (Benezra et al., 2001; Lee et al., 2004; Lyden et al., 1999; Sikder et al., 2003; Volpert et al., 2002), tumor cell survival (Cheung et al., 2004; Ling et al., 2003; Wong et al., 2004) and metastasis (Fong et al., 2003). Moreover, it has been shown that Id-1 regulates the invasive phenotype of breast epithelial cells, in part through the activity of a 120-kDa gelatinase, both during normal mammary-gland development and remodeling (Desprez et al., 1998). In addition, an association between the Id-1 expression and MT1-MMP in breast cancer cells has recently been demonstrated (Fong et al., 2003).

Many studies of invasive tumours suggest that Snail and Id-1 expression might be related since both have been implicated in similar invasive processes. Indeed, in most non-invasive breast cancer cell lines Id-1 expression is absent when the cells are cultured in a serum-free medium, whereas the most aggressive ones exhibit high levels of constitutive Id-1 expression (Sumida et al., 2004). Similarly, Snail has been detected in most aggressive cell lines and in invasive regions of breast and hepatocellular carcinomas (Blanco et al., 2002; Cano et al., 2000; Peinado et al., 2004b; Sugimachi et al., 2003). On the other hand, the relationship between Id-1 and E47, a member of the bHLH family, appears to be critical to understand the mechanisms by which E47 triggers an invasive phenotype (Peinado et al., 2004a; Perez-Moreno et al., 2001). However, an association between the expressions of these molecules has

not been examined previously. To gain further insight into these relationships, we have analysed the expression of Id-1 and its transcriptional regulation in the EMT triggered on the prototypic epithelial MDCK cell line by both E47 and Snail transcription factors. In this study, we demonstrate that both E47 and Snail induce Id-1 expression, which results from transcriptional activation of the Id-1 promoter through binding of transcription factors to functional elements within the upstream region of the Id-1 gene and via Ras-MAPK signaling pathways.

Materials and Methods

Cell culture

MDCK (immortalized canine epithelial kidney cells) and MDCK- derived cell lines were previously described and fully characterized (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Generation of and siSnail cell lines has been recently described and characterized ((Jorda et al., 2005) and Olmeda et al., in preparation). Enhanced green fluorescent protein (EGFP)-E47 construction was generated by PCR using the full-length E47 cDNA as template (Perez-Moreno et al., 2001) with the following primers (restriction sites are indicated in bold): 5'-CTCGAGGGATGATGAACCAAGTCTCA-3' (forward) and 5'-GAATTCGGCTCACAGGTGCCCGGCTGGGT-3' (reverse). The PCR product was cloned in pEGFP-C1 vector (Clontech). MDCK-EGFP and MDCK-EGFP-E47 cell lines were generated by stable transfection with 3 mg of plasmids pEGFP-C1 and pEGFP-E47, respectively, and selection with 400 mg of G 418 mg/ml for 3 to 4 weeks. Three independent clones were isolated from pEGFP-E47 and from control pEGFP transfections.

All canine cell lines were grown in Ham's F-12 : DMEM (1:1) medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum, sodium pyruvate, non-essential amino acids, and L-glutamine (GIBCO, Grand Island, NY), and 400 µg/ml G418. Cells were incubated in 5% CO₂-95% air at 37°C in a humidified incubator. Before performing *in vitro* experiments, these cell lines were shown to be free of Mycoplasma (assayed by Mycoplasma detection kit for conventional PCR Venor GeM, purchased from Minerva Biolabs). Schneider (SL2 *Drosophila*) cells were maintained at 23°C in Schneider's Insect Media (Sigma, St. Louis, MO) as described previously (Schneider, 1972).

Northern blot analysis

Northern blot analysis of RNA was performed under standard conditions. Total RNA was extracted from 1×10^8 MDCK control cells, MDCK-E47 or MDCK-Snail cells growing in exponential cultures using the RNeasy Qiagen isolation kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA). Approximately 15 μg of total RNA was applied to a 1.1% agarose gel and separated by electrophoresis in the presence of 2.2 M formaldehyde as described previously (Jordà et al., 2005). RNA was transferred to a nylon membrane (Amersham, Little Chalfont, UK) and hybridized at 42 °C under high-stringency conditions, using ^{32}P -labeled probes (4 x 10^8 c.p.m. μg^{-1}). To visualize the transcripts in Northern blots the membrane was exposed to X-ray film for 3 days.

Western blot analysis

Proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to a PVDF membrane, blocked and incubated with appropriate antibodies. The primary antibodies used included: antibodies specific to Id-1 protein (Santa Cruz Biotechnology, Inc cat#sc-488) at a dilution of 1:200; p44/42 MAP Kinase polyclonal antiserum to determine total Erk1 and Erk2 (Cell Signalling Technology) at a dilution of (1:1000); phospho-p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204) antibody to detect phospho-Erks (Cell Signalling Technology) (1:1000); and a mouse monoclonal anti- α -tubulin (1:5000) (Sigma Chemical Co). Subsequently, the membrane was probed with HRP-conjugated goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse immunoglobulin (Bio-Rad Laboratories) (1:1000), followed by incubation with ECL Western blot reagent (Amersham Biosciences).

Confocal Immunofluorescence

Cells grown on glass cover slides were washed 3 times with PBS with 1% formaldehyde in PBS for 30 minutes and thereafter permeabilised with 0.2% Triton X-100 in PBS for 15 minutes. Slides were incubated with the Id-1 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) at optimal dilution for 1 h, washed in PBS and incubated with the appropriate secondary antibody coupled to anti-rabbit Alexa 594 for 45 min. DAPI (Sigma Chemical Co.) was used for DNA stain. Confocal images were obtained with a Leica TCS SPII Spectral microscope and 63X/1.3 NA oil objective.

Plasmid constructs

The plasmids containing the promoter region of the human *Id1* gene (either -1370 or -1046 to +86 nt, referred thereafter as proId-1370 and proId-1046, respectively) were previously subcloned into the promoterless luciferase reporter vector pGL2-basic, pId1 lux and pId-1046 (proId-1370 and proId-1046) (Lopez-Rovira et al., 2002), and provided by Dr Francesc Ventura (Fac. Medicina, UB, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain).

The pId1-1179 construct was a 5' deletion generated by PCR using the primers pId-1179F: 5'-AGCGGTGAAGAAACCCCAAG-3' (forward) and pId-R: 5'-ACTGGCTGAACAGAATGGG-3' (reverse). Site-directed mutagenesis was used to introduce point mutations into the putative binding sites in the Id-1 promoter. The forward (F) and reverse (R) primers used to mutate the putative binding site at the E-box located at -1125 were: F: 5'-GAGACTCGttGGTcTGGGGCGG-3' and R: 5'-GCGCCCCAGACCAACGAGTCTC-3'. For mutation the SP-1 site the primers were: F: 5'-CTCGCAGGTGTGTGTCTTGGAGGTAAGGTG-3' and R: 5'-CACCTTACCTCCAAGCACACCTGCCAG-3'. The PCR reactions for mutagenesis were performed on 10 ng of DNA (proId-1370), using 100 ng of each mutated primer set, 25mM of each dNTP, 2.5U of pFu-Turbo-DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and its corresponding buffer. After PCR, the parental supercoiled double-stranded DNA was digested with *Dpn* I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and competent *E. coli* cells (TOP F10) were transformed by thermal-shock. Construct integrity was confirmed by restriction analysis and sequencing.

Both mouse E47 and Snail expression vectors were described previously (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). The pcDNA3-DN-MEK1, a dominant negative expression vector of MEK1, and pCELF- H-RasVal12 were provided by Dr Ana Aranda (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, Spain); pMyc-ERK2-MEK1, a constitutively active Erk2, was a gift from Dr Piero Crespo (Unidad de Biomedicina, Universidad de Cantabria, CSIC, Santander, Spain); pMyc-SP1-HA was a kindly gift of Dr Gilles Pages (Institute of Signalling, Nice, France); pPac plasmid coding for the LacZ gene under control of the *Drosophila* actin promoter was a kindly gift of Dr Miguel A. Fernández (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, Spain).

Transfections and Luciferase assays

Transfections were carried out with lipofectamine plus reagent (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's instructions. To assay Id-1 promoter activity, the indicated cell lines were transiently cotransfected in a 6-well plate with 1 μ g of the indicated promoter constructs in the presence or absence of 1 μ g of DN-MEK1 or RasVal 12 expression vectors and 100 ng of TK *renilla* plasmid. Cells were transfected in FBS-free medium for 5 h and then switched to 10% FCS media for further 24 h before determining the Luciferase/Renilla activity. Where indicated, 18 h after transfection the cells were serum-starved and the Erk inhibitor PD 98059 (50 μ M) was added 5 h prior to collection. Cells were lysed in 80 μ l of 1x lysis buffer (Promega), and after 3 freeze/thaw cycles and centrifuging at 13.000 rpm for 10 min, Luciferase and Renilla activities were measured from the supernatant using a Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega).

Schneider (SL2 *Drosophila*) cells were grown at 23°C to 80% confluence in a 12-well plate and were transfected with 2 μ g of the proId-1370 reporter plasmid and 2 μ g of SP-1 expression vector, in the presence or absence of 2 μ g of ERK2-MEK1 plasmid encoding Erk2 constitutively active. 100 ng of pPac plasmid coding for the LacZ gene under control of the *Drosophila* actin promoter was also included as a control of transfection efficiency. The amount of DNA transfected was kept constant by adding the appropriate amount of empty vector. All transfections were made according to a standard calcium phosphate protocol. After transfection cells were incubated at 23°C in Schneider's Insect Media supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum for four days before determining the Luciferase activity.

Electrophoretic mobility shift assays

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA), were performed with 10 μ g of nuclear protein extracts that were obtained by the procedure described previously (Jorda et al., 2005), and mixed with 1x10⁵ cpm of [³²P γ ATP] - radiolabeled binding probe. DNA-protein complexes were separated on 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 0.5x TBE (Tris-borate-EDTA) at room temperature. The different oligonucleotides used as probes or competitors were designed according to the presence or absence of putative binding sites near to the E-box at position -1125 (B-I^{wt}: 5'-GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG-3'; the B-II^{wt}: 5'-GACTCGCAGGTGTGGG-3'; the B-III^{wt}: 5'-TGTGGGGCGGGGAGGTAAGG-3'; and the mutant B-I^m: 5'-GAGACTCGttGGTcTGGGGCGG-3'). In competition assays, a 500-

fold molar excess of the corresponding cold double stranded DNA oligonucleotide was added, and the reaction was incubated for 20 min at room temperature.

When indicated 2 μ g of the corresponding polyclonal antiserum: anti SP-1 (sc-59x), anti E47 (sc-763x) or non-immune rabbit IgG (all from Santa Cruz Biotechnology), was added to the reaction mixture and incubated for 30 min at room temperature.

Results

Stable expression of E47 and Snail transcription factors induces Id-1 expression

We previously demonstrated that stable expression of either the E47 or Snail transcription factors in the prototypic epithelial MDCK cell line triggers several phenotypic changes commonly known as EMT with loss of cell-cell contacts and an increase in cell motility (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Indeed, the induced changes in phenotype are similar to those reported previously in Id-1 expressing cells (Desprez et al., 1995; Fong et al., 2003; Lin et al., 1999). We observed that Id-1 mRNA was in fact expressed in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells but not in control mock transfected MDCK-CMV cells (Fig. 1A). Moreover, western blot indicates that stable expression of either mouse E47 or Snail transcription factors induced constitutive expression of Id-1 protein, since similar levels were detected either in the absence or in the presence of serum, whereas there were no detectable levels of Id-1 protein in control MDCK-CMV cells (Fig. 1B). Interestingly, levels of the lower migrating Id-1 form were decreased in the presence of serum in both Snail- and E47-expressing cells, although its significance is presently unknown.

Id-1 expression was further confirmed by immunofluorescence analysis. Id-1 protein was localized mainly in the nuclei of MDCK-EGFP-E47 (Fig. 1C) and MDCK-Snail (Fig. 1C) cells. The MDCK-EGFP-E47 cell line exhibits a full EMT phenotype and similar behaviour as MDCK-E47 cells (E. Cubillo & A. Cano, unpublished results). As expected, the MDCK-EGFP and MDCK-CMV cells yielded no staining with the antibody (compare upper row with the lower row of panels in Fig. 1C and 1D).

Id-1 promoter activity is increased in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells

To determine whether the increase in Id-1 mRNA levels was due to an increase in transcription, we analyzed the activity of the human Id-1 promoter using a luciferase reporter gene (Lopez-Rovira et al., 2002). We found that the activity of the -1.37 Kb promoter construct (referred thereafter as proId-1370) was increased 13-fold in MDCK-E47 and 5-fold in MDCK-Snail cells with respect to its activity in mock MDCK-CMV cells (Fig. 2). An *in silico* analysis of the -1.37 Kb upstream region of the human Id-1 promoter revealed the presence of canonical “E-box” recognition sequences (CANNTG) at positions -1256, -1125, -1046 and -900 nt from the transcription initiation site, henceforth denominated boxes A, B, C, and D, respectively. To explore whether these E-boxes might regulate promoter activity in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells, we made a series of 5’ deletions of the -1.37 Kb luciferase construct. These deletions remove the indicated E-box sites and are summarized in Fig. 2 left panel. Deletion of E-box “A” and the encompassing sequences up to -1179 nt (proId-1179 construct) produced a significant decrease in the activity of the promoter in MDCK-E47 cells (9.5-fold induction) and a slighter decrease in MDCK-Snail cells (3-fold induction) with respect to the activity of proId-1370, suggesting that distal elements (-1370 to -1179) are needed to mediate full induction of the Id-1 promoter in both cell types. Further removal of the “B” site and the encompassing sequences up to nt -1046 (proId-1046 construct), results in a dramatic loss of luciferase activity with respect to the long construct (Fig. 2, right panel). However, neither deletion of box “C” nor mutation of box “D” significantly affected the activity of the Id-1 promoter in these cells (data not shown). To further explore whether the E-box “B” contributes to the constitutive activity of the Id-1 promoter, we generated a new proId-1370 construct with a mutated E-box motif located at position -1125 (proId-1370 B^m). As shown in Fig. 2, mutation of this site virtually abolishes the promoter activity, since the luciferase activity was reduced by 95% of that detected with the proId-1370 wild type in either cell type.

On the other hand, the *in silico* analysis of the -1370 promoter identified a putative binding site for members of SP- transcription factor family near to the E-box B (see Fig. 3A). Therefore, we analyzed the single contribution of this site to Id-1 transcription. As shown in Fig. 2 left panel, the mutation of the SP-1 motif at position -1118 nt resulted in a limited

influence on the Id-1 promoter activity in either cell type as compared to the wild type proId-1179 construct, suggesting that this element alone is not responsible for the activation of the Id-1 promoter observed in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells.

Activation of the Id-1 promoter in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells involves binding to E-box sequences

In order to determine whether the luciferase activity observed in Id-1 promoter constructs containing the E-box “B” in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells correlates with binding of specific protein complex(es), double strand-labeled synthetic oligonucleotides spanning the region near to this element were used in gel shift experiments with nuclear extracts from MDCK-E47, MDCK-Snail and MDCK-CMV cells grown in the presence of serum. The different probes are indicated in Fig. 3A. Notably, the incubation of nuclear extracts from both MDCK-E47 and MDCK-Snail cells with the B-I probe resulted in the formation of new retarded DNA-protein complexes with respect to the nuclear extracts from MDCK-CMV cells (Fig. 3B; compare lanes 7 and 11 with lane 3). Remarkably, a low mobility complex of similar mobility appeared in both nuclear extracts from MDCK-E47 and MDCK-Snail (indicated by a double black arrowhead in Fig. 3B). The specificity of this complex was demonstrated by competition with a 500-fold molar excess of unlabeled oligonucleotide, whereas incubation with an oligonucleotide containing a mutation in the E-box (B-I^m : TTGGTC) yielded no modification of these complexes (Fig. 3B, lanes 10 and 14). In addition, the mutant B-I^m oligonucleotide failed to produce specific complexes when used as labeled probe (Fig. 3B lanes 5, 9 and 13). These results suggest that both E47 and Snail proteins, and/or other induced factors, present in nuclear extracts from MDCK-E47 and MDCK-Snail cells, respectively, could participate in the transcriptional regulation of Id-1 promoter through binding to the E-box binding site “B” located at –1125 nt with respect to the transcription initiation site.

To directly ascertain if E47 protein interacts with this region of the Id-1 promoter, supershift analysis were performed with nuclear extracts from MDCK-E47 cells using anti-E47 antibodies or unspecific rabbit IgG. A shorter B-II oligonucleotide, containing mainly E-box “B” (see Fig. 3A) was used in these assays. Notably, when using the B-II probe the low-mobility complex increased its mobility as compared with the B-I probe (compare Fig. 3C

lanes 1 and 3, the low migrating complex is indicated by a single or double black arrowhead). In addition, the probe B-II leads to the detection of an additional faster migrating complex not seen with the longer B-I probe (indicated by an empty arrowhead in Fig. 3C). The specificity of the complexes generated by both B-I^{wt} and B-II^{wt} probes was confirmed by competition with cold B-I^{wt} and B-II^{wt} oligonucleotides, respectively. Incubation with the antibodies against E47 significantly decreased the intensity of the two complexes detected with the B-II probe (Fig. 3C lane 6), while no effect was detected after incubation with unspecific IgG (Fig. 3C lane 5). Similar intensity reduction of the low-migrating complex obtained with the B-I probe was observed after the incubation of MDCK-E47 nuclear extracts with polyclonal E47 antibodies (data not shown). These results indicate that E47 protein is a component of the protein complex that binds to the E-box “B” sequence of the Id-1 promoter in MDCK-E47 cells.

Nuclear extracts from MDCK-Snail cells incubated with B-II probe generated similar results to those obtained with MDCK-E47 extracts (data not shown). However, analysis of the direct involvement of Snail by supershift assays was hampered by the lack of anti-Snail antibodies properly working with nuclear extracts. Therefore, to explore the influence of the Snail in the complexes bound to the B-I probe we used Snail interference technique with a 19-mer siRNA oligonucleotide directed to the N-terminal region of the first zinc finger of mouse Snail mRNA (Jorda et al., 2005). EMSA was performed using siSnail clone 3 nuclear extracts, a MDCK-Snail derived clone in which Snail message was efficiently silenced (Jorda et al., 2005). As can be seen in Fig. 3D lane 2, the nuclear proteins from siSnail clone 3 failed to generate the low migrating complex observed with MDCK-Snail nuclear extracts. Indeed, the pattern of complexes detected with siSnail c3 was identical to that observed with nuclear extracts of control MDCK-CMV cells (Fig.3 lane 3), further supporting that Snail protein, either directly or indirectly, influences the generation of the low migrating complex detected in MDCK-Snail cells.

MAPK is involved in the induction of Id-1

To get further insights into the molecular mechanisms/signaling pathways affected by Snail or E47 expression that finally impinge on Id-1 regulation, we investigated the influence of the MAPK pathway. This was based on the potential link between MAPK and Id-1 (Cheung

et al., 2004; Ling et al., 2002) and on the recently reported fact that Snail induces an increased phosphorylation of MEK/Erk (Vega et al., 2004) which is, at least in part, responsible for the induction of MMP-9 transcription in MDCK-Snail cells (Jorda et al., 2005). We tested whether activation of MEK/Erk conferred similar effects on Id-1 regulation. To this end, Id-1 promoter activity was analyzed in MDCK-E47, MDCK-Snail and MDCK-CMV cells in the presence or absence of a synthetic MEK1 inhibitor. As shown in Fig. 4A, Id-1 promoter activity (proId-1370 construct) was reduced to about 58% in both MDCK-E47 and MDCK-Snail cells in the presence of PD 98059 (50 μ M), without affecting the basal activity of MDCK-CMV cells. Moreover, western blots performed on cell extracts from MDCK-CMV, MDCK-E47 and MDCK-Snail cells in the presence or absence of PD 98059 (50 μ M) confirmed the responsiveness of Id-1 expression to MEK activity at the protein level. A significant reduction in the expression of Id-1 protein was observed in MDCK-E47 and, to a lower extent, in MDCK-Snail cells after treating the cells with the inhibitor when compared to treatment with DMSO (Fig. 4B). This analysis also confirmed the constitutive activation of Erk1/2 in MDCK-Snail and MDCK-E47 cells, in agreement with previous analysis in Snail-expressing cells (Jorda et al., 2005; Vega et al., 2004). Taken together, these results indicate that the activated Erk signaling cascade appears to be responsible for the activation of the Id-1 promoter, as well as for Id-1 protein production in both MDCK-E47 and MDCK-Snail cells.

We then examined whether Ras, an upstream effector of MAPK, might regulate Id-1 transcription in epithelial cells. To this end, MDCK-CMV cells were transiently co-transfected with an expression vector encoding an activated H-Ras (Ras Val12) in the presence or absence of a dominant negative version of MEK (MEK-DN) (Fig. 4C). We observed that the proId-1370 construct responded to the expression of the Ras Val12 in MDCK-CMV cells leading to a ~ 6-fold increase of luciferase activity. Furthermore, transfection of a dominant negative (DN) MEK-1 construct abrogated the induction of Id-1 promoter by Ras (Fig. 4C). These results support the functional contribution of Erk1/2 pathway to Id-1 promoter regulation.

p42/p44 MAP kinase pathway influences the specific binding of nuclear proteins from MDCK-E47 and MDCK-Snail to the Id-1 promoter

After we had observed that the Erk signaling cascade is constitutively active in both MDCK-E47 and MDCK-Snail cells and activates the Id-1 transcription, we wanted to assess

whether it might influence the binding of transcription factors to the E-box “B” region of Id-1 promoter. This was assessed by EMSA analysis using nuclear extracts of cells that has been pretreated for 5h with PD 98059 inhibitor or control DMSO vehicle. As can be seen in Fig. 5A, the treatment of cells with PD 98059 led to a significant decrease in the intensity of the low-mobility complex generated by incubation the B-I probe with either MDCK-E47 or MDCK-Snail nuclear extracts (Fig. 5A, compare lanes 5 and 7 with 4 and 6, respectively). In contrast, PD 98059 treatment had no consequence on MDCK-CMV protein binding to this region of the Id-1 promoter since this specific complex was not generated with these nuclear extracts (Fig. 5A, lanes 1 and 2).

Several studies have been shown that active ERKs provoke the phosphorylation of SP-1 transcription factor and favour the binding to SP-1 consensus sequences present in the corresponding promoters (Benasciutti et al., 2004; Jorda et al., 2005; Milanini-Mongiat et al., 2002; Reisinger et al., 2003). Despite the observation that the proId-1179 construct carrying a mutated SP-1 site was apparently insensitive to the expression of Snail and E47, the proximity of this potential SP-1 site to the E-box “B” suggested that this factor could participate in the regulation of Id-1, perhaps being recruited to the low-migrating complex detected in both MDCK-E47 and MDCK-Snail nuclear extracts. To test this hypothesis, we incubated nuclear extracts from MDCK-E47 and MDCK-Snail cells with antibodies raised against SP-1 protein or unspecific rabbit IgG prior to the binding to B-I probe. As shown in Fig. 5B, the addition of the specific SP-1 antibody strongly decreased the intensity of the low migrating complex in both MDCK-E47 and MDCK-Snail cells (Fig. 5B lanes 4 and 7, respectively, black arrowhead) albeit no supershifted complexes were detected. The presence of active SP-1 factors in nuclear extracts from Snail and E47-expressing cells was confirmed by EMSA assays with a probe containing only the putative SP-1 site (probe B-III) adjacent to E-box “B” of the Id-1 promoter (Fig. 5C). As can be observed, the addition of SP-1 antibodies to MDCK-E47 and MDCK-Snail nuclear extracts prior the incubation with the B-III probe lead to a significant decrease in the intensity of the main band (Fig. 5C, compare lanes 2 and 7 with lanes 4 and 9, respectively). Taken together, these results support the participation of SP-1 factor in a multiprotein complex binding to the E-Box “B” and adjacent sequences in the Id-1 promoter.

The potential contribution of the SP-1 and MAPK on Id-1 promoter transactivation was further analyzed in SL2 *Drosophila* cells (Schneider, 1972) which lack endogenous SP-1

(Santoro et al., 1988). To this end, we transiently transfected the reporter construct proId-1370 in the presence or absence of Erk2 and SP-1 expression vectors. In this system, the expression of wild type SP-1 cDNA stimulated Id-1 promoter activity by 6.5-fold with respect to the empty expression vector. In agreement with our hypothesis, the Id-1 promoter activity was further increased up to about 11-fold when a constitutive active form of Erk2 was co-expressed (Fig. 5D). Taken together, the results obtained in SL2 cells indicate that SP-1 activation through the Erk pathway activates the Id-1 promoter. Thus, this mechanism presumably might contribute to the activation of the Id-1 promoter in many other cellular contexts such as MDCK-E47 and MDCK-Snail cells in which the Erk pathway is constitutively activated.

Discussion

The mesenchymal-like phenotype triggered by stable expression of both E47 and Snail in epithelial cells (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001) suggests that, in addition to repress E-cadherin, they may act on other target genes that actively contribute to the invasive and migratory phenotype (Peinado et al., 2004a; Vega et al., 2004). Indeed, some recent studies have identified several gene expression changes in epithelial cells undergoing EMT by ectopic expression of Snail. These changes culminate in the disassembly of cell-cell adherent junctions (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Ikenouchi et al., 2003; Ohkubo and Ozawa, 2004); loss of epithelial markers and acquisition of the mesenchymal markers (Cano et al., 2000; Guaita et al., 2002); production of extracellular matrix-degrading enzymes (Jorda et al., 2005; Miyoshi et al., 2004; Yokoyama et al., 2003), and the impaired proliferation and survival advantage (Vega et al., 2004) as well.

In the present work, we identify the Id-1 gene as a novel target of both E47 and Snail transcription factors. We describe here the increase in the Id-1 mRNA and protein levels in MDCK cells stably expressing E47 or Snail factors. The induction of Id-1 expression is particularly interesting since it is coincident with the invasive properties acquired by these cells (Peinado et al., 2004a) and thus, directly connecting with previous observations of Id-1

overexpression in later stages of tumorigenesis (Wilson et al., 2001), particularly at the invasive steps (Fong et al., 2003). Moreover, Id-1 protein levels in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells may account for the angiogenic response from the host stromal tissue observed in the xenografts of both cell types (Peinado et al., 2004a), and it is also in accordance with the often-induced angiogenesis observed in tumors (Benezra et al., 2001; Lyden et al., 1999; Sikder et al., 2003). It thus seems likely that Id-1 expression may be crucial to accomplish the prominent role of E47 and Snail in the promotion of local invasion and the angiogenic properties. Furthermore, the MDCK cell system and derived cell lines, facilitates the study of the mechanisms that operate at both the signal transduction and transcriptional levels to upregulate the expression of Id-1 protein during tumor progression.

We show here that the increase in Id-1 protein and mRNA levels is accompanied by a significant increase in Id-1 promoter activity. Previous studies of the Id-1 promoter identified serum- response elements that are critical for serum-regulated expression of Id-1 (Tournay and Benezra, 1996), as well as the overlapping SP-1, NF-1 and RB sites at the -200 bp necessary for proper Id-1 repression in non-aggressive breast cancer cell lines (Singh et al., 2002). In addition, two independent Smad-binding elements have been identified in the proximal Id-1 promoter that are critical for the BMP-2 responsiveness (Lopez-Rovira et al., 2002). However, we observed constitutive induction of Id-1 expression in MDCK-E47 and MDCK-Snail cells, suggesting that none of the previously identified proximal sites appears to be essential for E47 and Snail regulation of Id-1 promoter. Nevertheless, the existence of posttranscriptional mechanisms operating in response to either factor cannot be fully discarded.

In light of our data and since E47 and Snail proteins function primarily via binding and repression of E-boxes, at least for E-cadherin promoter (Bolos et al., 2003), three different possibilities might account for activated Id-1 transcription in MDCK cells after stable expression of E47 or Snail proteins: (i) direct implication of putative E-boxes by recruitment of activators and binding factors within this region, (ii) indirect activation throughout signaling pathways activated as a consequence of the decrease in E-cadherin gene expression and function and (iii) release of ubiquitous E proteins bound to the E-box binding sites in the Id-1 promoter which could act as active Id-1 repressors in MDCK epithelial cells.

Interestingly, no meaningful information has been so far available regarding the contribution of Id-1 promoter region between -1370 and -1046 and much less about the

function of the E-box elements in the regulation of Id-1 expression. Our present results provide evidence that the E-box located at -1125 nt (E-box “B”) of the human Id-1 gene is responsible for the induced activity of the promoter triggered by stable expression of either E47 or Snail transcription factors. Indeed, mutation of the E-box “B” site virtually abolished the induction of Id-1 promoter detected in Snail and E47 stable transfectants relative to the respective wild type construct. Furthermore, we have shown by gel shift experiments that this E-box site and adjacent sequences are unoccupied in epithelial MDCK-CMV cells whereas new complexes are generated in both E47- and Snail-expressing cells. The similar mobility of newly formed complexes (particularly the low-migrating complex) between MDCK-E47 and MDCK-Snail cells can be explained by the limited resolution provided by the EMSA technique that cannot distinguish between oligomerization of both factors, and/or additional components, mostly due to the large size of the complex. Therefore, we hypothesize that E47 or Snail factors are not the solely components of this complex. Indeed, gel shift analysis shows that, coincident with the binding to this E-box, SP-1 proteins can be recruited to the nearest region and assembled into the low migrating complex. The fact that the SP-1 site by itself is not sufficient to transactivate the promoter, (as shown by the activity of reporter construct proId-1179^M containing a SP-1 mutation), suggest that the main effect of binding to this motif might be reinforcement of the formation of the multiprotein-DNA complex. Interestingly, the multicomplex seems to be influenced by the activation of MEK 1/2 kinase pathway. Moreover, in agreement with the increased phosphorylation of MEK/Erk recently reported in Snail-expressing cells (Jorda et al., 2005; Vega et al., 2004), we also found a significantly higher degree of Erk phosphorylation in E47-expressing cells. This is not surprising since activation of the MEK/Erk pathway has been previously associated to EMT processes (Janda et al., 2002; Montesano et al., 1999; Schramek et al., 2003). Indeed, recent findings in hair follicle morphogenesis demonstrate that transcriptional downregulation of E-cadherin leads to Ras-MAPK activation as a consequence of the release from cell-cell contacts of associated adhesion proteins which have dual functions in cell signaling (Jamora et al., 2005). In addition, the MAPK and PI3K signaling pathways are involved in the activation of Snail transcription (Barbera et al., 2004; Peinado et al., 2003) providing a feed-forward loop for expression of these mediators. Thus, a possible interpretation of our present results is that the loss of E-cadherin expression and function in E47- and Snail-expressing

cells leads to the activation of the MAPK signaling pathway, which in turn contributes to the transactivation of the Id-1 promoter.

In this context, recent reports sustain the link between MAPK and Id-1 expression. For example, Id-1 function has been associated with the MAPK signaling pathway in prostate (Ling et al., 2002) and nasopharyngeal carcinoma cells (Cheung et al., 2004). Interestingly, we observed that the activity of the Id-1 promoter was reduced by up to 58% in MDCK-Snail and MDCK-E47 cells in the presence of an inhibitor of MEK1, indicating that the transcription of the helix-loop-helix proteins Id-1, like Id-3 (Bain et al., 2001), is regulated by the Erk/ MAPK module. The activation of ERK signaling pathway has also been associated to increased phosphorylation of SP-1 protein (Bouwman and Philipsen, 2002) that leads to an increase in the transcriptional activity of SP-1-dependent genes (Benasciutti et al., 2004; Black et al., 2001; Milanini-Mongiat et al., 2002; Reisinger et al., 2003). Consistently, we show on SL2 *Drosophila* cells devoid of endogenous SP-1 protein that activated ERK reinforces the induction of Id-1 promoter activity mediated by the ectopic expression of SP-1, thus providing strong argument for the involvement of SP-1 and MAPK in regulation of Id-1 expression.

Taken together, our results indicate that Id-1 is upregulated in response to expression of the E47 and Snail transcription factors. A distal E-box at -1125 nt of the Id-1 gene is involved in the transcription concomitantly with the activation of the MAPK signaling pathway. Both E47 and Snail proteins may directly be the partners of a multiprotein-DNA complex, or indirectly may influence the recruitment of other factors to the E-box region. Interestingly, this complex is sensitive to MEK1/2 inhibitors suggesting that this signaling pathway contributes to the recruitment or functional assembly of different protein partners, such as SP-1. Nevertheless, it is worth mentioning that Ras-MAPK is also able to activate Id-1 promoter in MDCK cells in the absence of both E47 and Snail transcription factors. Indeed, Erks also increase the synthesis and/or activity of several transcription factors, including members of the AP-1 families and *c-fos* (Gille et al., 1992), as well as the Ets (Bouwman and Philipsen, 2002; O'Neill et al., 1994) that may also contribute to the Id-1 promoter activation.

Ras-mediated induction of the Id-1 promoter might explain the increased expression of Id-1 observed in carcinomas in which activating mutations in Ras frequently occurs. When deregulated, Id proteins greatly contribute to tumor progression through their pleiotropic capacity to influence multiple molecular and cellular pathways (Lasorella et al., 2001; Perk et al., 2005). The induction of Id-1 expression may explain, at least in part, the invasive and/or

angiogenic properties acquired by E47 and Snail-expressing cells on epithelial-to mesenchymal transitions (EMT) both during embryonic development and tumor progression.

Acknowledgements

We thank Dr F. Ventura, Dr A. Aranda, Dr P.Crespo and Dr G. Pages for providing plasmids and expression vectors; Dr M.A. Fernández for providing *Drosophila* SL2 cells and the pPAC plasmid and A. Llorens for technical support. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF 2002-817 to AF and SAF 2004-00361 to AC) and the Instituto de Salud Carlos III, RTICCC, FIS 03-C03/10. EV and EC are predoctoral fellowships from Instituto de Salud Carlos III (EV: 01/1695 and EC : 02/9402) and MJ was a PhD student at the Biochemistry and Molecular Biology Department of the UAB, Bellaterra, Spain.

Abbreviations

Id, inhibitor of differentiation or DNA binding; bHLH, basic Helix-Loop-Helix; nt, nucleotide (s); bp, base pair(s); CMV, cytomegalovirus; EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMT(s), Epithelial Mesenchymal Transition(s); ERK, Extracellular Signal-Regulated Kinase; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase; MDCK, Madin-Darby Canine Kidney; MEK, Mitogen-activated protein kinase kinase; wt, wild type.

References

Bain, G., Cravatt, C. B., Loomans, C., Alberola-Ila, J., Hedrick, S. M. and Murre, C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* **2**, 165-71.

Barbera, M. J., Puig, I., Dominguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiro, S., Baulida, J., Franci, C., Dedhar, S., Larue, L. et al. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* **23**, 7345-54.

Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herrerros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**, 84-9.

Benasciutti, E., Pages, G., Kenzior, O., Folk, W., Blasi, F. and Crippa, M. P. (2004). MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. *Blood* **104**, 256-62.

Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59.

Benezra, R., Raffi, S. and Lyden, D. (2001). The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* **20**, 8334-41.

Black, A. R., Black, J. D. and Azizkhan-Clifford, J. (2001). Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* **188**, 143-60.

Blanco, M. J., Moreno-Bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J. and Nieto, M. A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* **21**, 3241-6.

Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M. and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* **116**, 499-511.

Bouwman, P. and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* **195**, 27-38.

Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76-83.

Cheung, H. W., Ling, M. T., Tsao, S. W., Wong, Y. C. and Wang, X. (2004). Id-1-induced Raf/MEK pathway activation is essential for its protective role against taxol-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* **25**, 881-7.

De Craene, B., Gilbert, B., Stove, C., Bruyneel, E., van Roy, F. and Berx, G. (2005a). The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* **65**, 6237-44.

De Craene, B., van Roy, F. and Berx, G. (2005b). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* **17**, 535-47.

Desprez, P. Y., Hara, E., Bissell, M. J. and Campisi, J. (1995). Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* **15**, 3398-404.

Desprez, P. Y., Lin, C. Q., Thomasset, N., Sympson, C. J., Bissell, M. J. and Campisi, J. (1998). A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* **18**, 4577-88.

Desprez, P. Y., Sumida, T. and Coppe, J. P. (2003). Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 225-39.

Fong, S., Itahana, Y., Sumida, T., Singh, J., Coppe, J. P., Liu, Y., Richards, P. C., Bennington, J. L., Lee, N. M., Debs, R. J. et al. (2003). Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13543-8.

Gille, H., Sharrocks, A. D. and Shaw, P. E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**, 414-7.

Guaita, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A. G. and Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to

mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* **277**, 39209-16.

Hara, E., Uzman, J. A., Dimri, G. P., Nehlin, J. O., Testori, A. and Campisi, J. (1996). The helix-loop-helix protein Id-1 and a retinoblastoma protein binding mutant of SV40 T antigen synergize to reactivate DNA synthesis in senescent human fibroblasts. *Dev Genet* **18**, 161-72.

Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M. and Tsukita, S. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* **116**, 1959-67.

Jamora, C., Lee, P., Kocieniewski, P., Azhar, M., Hosokawa, R., Chai, Y. and Fuchs, E. (2005). A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis. *PLoS Biol* **3**, e11.

Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. and Grunert, S. (2002). Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* **156**, 299-313.

Jorda, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A. and Fabra, A. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* **118**, 3371-85.

Lasorella, A., Boldrini, R., Dominici, C., Donfrancesco, A., Yokota, Y., Inserra, A. and Iavarone, A. (2002). Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma. *Cancer Res* **62**, 301-6.

Lasorella, A., Uo, T. and Iavarone, A. (2001). Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* **20**, 8326-33.

Lee, K. T., Lee, Y. W., Lee, J. K., Choi, S. H., Rhee, J. C., Paik, S. S. and Kong, G. (2004). Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. *Br J Cancer* **90**, 1198-203.

Lin, C. Q., Parrinello, S., Campisi, J. and Desprez, P. Y. (1999). Regulation of mammary epithelial cell phenotypes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Endocr Relat Cancer* **6**, 49-50.

Ling, M. T., Wang, X., Ouyang, X. S., Lee, T. K., Fan, T. Y., Xu, K., Tsao, S. W. and Wong, Y. C. (2002). Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* **21**, 8498-505.

Ling, M. T., Wang, X., Ouyang, X. S., Xu, K., Tsao, S. W. and Wong, Y. C. (2003). Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* **22**, 4498-508.

Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J. L. and Ventura, F. (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* **277**, 3176-85.

Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K. et al. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* **401**, 670-7.

Milanini-Mongiat, J., Pouyssegur, J. and Pages, G. (2002). Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* **277**, 20631-9.

Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y. and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* **90**, 1265-73.

- Montesano, R., Soriano, J. V., Hosseini, G., Pepper, M. S. and Schramek, H.** (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Growth Differ* **10**, 317-32.
- Nieto, M. A.** (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 155-66.
- Norton, J. D.** (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* **113** (Pt 22), 3897-905.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M.** (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for Drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* **78**, 137-47.
- Ohkubo, T. and Ozawa, M.** (2004). The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* **117**, 1675-85.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H. J., Fusenig, N., Nieto, M. A. and Cano, A.** (2004a). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* **117**, 2827-39.
- Peinado, H., Portillo, F. and Cano, A.** (2004b). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* **48**, 365-75.
- Peinado, H., Quintanilla, M. and Cano, A.** (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **278**, 21113-23.
- Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A. and Cano, A.** (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **276**, 27424-31.
- Perk, J., Iavarone, A. and Benezra, R.** (2005). Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 603-14.
- Reisinger, K., Kaufmann, R. and Gille, J.** (2003). Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci* **116**, 225-38.
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P. C. and Tjian, R.** (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* **334**, 218-24.
- Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol* **27**, 353-65.
- Schramek, H., Feifel, E., Marschitz, I., Golochtchapova, N., Gstraunthaler, G. and Montesano, R.** (2003). Loss of active MEK1-ERK1/2 restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C652-61.
- Sikder, H., Huso, D. L., Zhang, H., Wang, B., Ryu, B., Hwang, S. T., Powell, J. D. and Alani, R. M.** (2003). Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell* **4**, 291-9.
- Singh, J., Murata, K., Itahana, Y. and Desprez, P. Y.** (2002). Constitutive expression of the Id-1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF-1/Rb/HDAC-1 transcription repressor complex. *Oncogene* **21**, 1812-22.
- Sugimachi, K., Tanaka, S., Kameyama, T., Taguchi, K., Aishima, S., Shimada, M., Sugimachi, K. and Tsuneyoshi, M.** (2003). Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**, 2657-64.

Sumida, T., Itahana, Y., Hamakawa, H. and Desprez, P. Y. (2004). Reduction of human metastatic breast cancer cell aggressiveness on introduction of either form A or B of the progesterone receptor and then treatment with progestins. *Cancer Res* **64**, 7886-92.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-54.

Tournay, O. and Benezra, R. (1996). Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* **16**, 2418-30.

Vega, S., Morales, A. V., Ocana, O. H., Valdes, F., Fabregat, I. and Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* **18**, 1131-43.

Volpert, O. V., Pili, R., Sikder, H. A., Nelius, T., Zaichuk, T., Morris, C., Shiflett, C. B., Devlin, M. K., Conant, K. and Alani, R. M. (2002). Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* **2**, 473-83.

Wilson, J. W., Deed, R. W., Inoue, T., Balzi, M., Becciolini, A., Faraoni, P., Potten, C. S. and Norton, J. D. (2001). Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res* **61**, 8803-10.

Wong, Y. C., Wang, X. and Ling, M. T. (2004). Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis* **9**, 279-89.

Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H. and Nagayama, M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* **22**, 891-8.

Zebedee, Z. and Hara, E. (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* **20**, 8317-25.

Figure Legends.

Figure 1. Stable expression of E47 and Snail transcription factors in MDCK epithelial cells leads to Id-1 expression.

Panel A. 15 μg of total RNA from subconfluent cultures of MDCK-CMV, MDCK-E47 and MDCK-Snail cells were subjected to Northern blot analysis. Id-1 transcript was detected in both E47- and Snail-expressing cells but not in MDCK-CMV controls. In the lower panel, 18S rRNA was used as loading control.

Panel B. A Western blot of cell extracts from MDCK- E47, MDCK-Snail and MDCK-CMV cells was performed using specific antibodies for Id-1. Briefly, cells extracts were collected from subconfluent cultures of grown in the presence of serum (+FCS) or switched to serum free media for 24 h before lysis (-FCS). Detection of α -tubulin was used as loading control.

Panel C and D. Confocal immunofluorescence analyses of the subcelular localization of Id-1 (red) in (C) control MDCK-EGFP (upper panels) and MDCK-EGFP-E47 cells (bottom panels) and (D) control MDCK-CMV (upper panels) and MDCK-Snail cells (bottom panels). Merge images (right panels) include DNA stain by DAPI (blue), shown also in middle panels. Bars, 40 μm .

Figure 2. Stable expression of E47 and Snail transcription factors induces activation of the Id-1 promoter.

Left panel, schematic representation of the human wild type Id-1(-1370) promoter and the independent deletions/mutants constructs, indicating the position of potential regulatory E-box elements (A, B, C and D squares) and SP-1 site (oval). Point mutations in E-box B and SP-1 site are indicated by crossed symbol.

Right panel, diagram showing the activity of the different constructs of the Id-1 promoter transiently transfected in MDCK-CMV control cells (white bars), MDCK-E47 cells (black bars) or MDCK-Snail cells (hashed bars). Luciferase and Renilla activities of each promoter construct were determined and the fold-increase is represented relative to that obtained in

control MDCK-CMV cells. Results represent the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Figure 3. Binding to the E-box “B” of the Id-1 promoter by both MDCK-E47 and MDCK-Snail nuclear extracts

Panel A. Schematic representation of the proximal 5' region nearest to the E-box “B” (from -1135 to -1109 bp referred to the transcription initiation site), indicating the position of the potential regulatory elements. The sequences used as probes or competitor oligonucleotides in EMSA assays are shown and mutated nucleotides in the B-I^m probe are indicated by asterisks. The nucleotides underlined correspond to E-box “B” (solid line) or SP-1 (dashed line) elements.

Panel B. Nuclear extracts from MDCK-CMV (lanes 3-6), MDCK-E47 (lanes 7-10) or MDCK-Snail cells (lanes 11-14) were incubated with ³²P-labelled wild type E-box “B” (B-I^{wt}) probe or the mutant probe (B-I^m), either in the presence or absence of 500-fold molar excess of the wild type or mutant cold oligonucleotides as indicated. Specific retarded complexes were observed in MDCK-E47 and MDCK-Snail extracts with the wild type probe but not with the mutant E-box “B” probe. Lanes 1 and 2 show EMSA in which the nuclear extract was not added; the low mobility complexes detected in lanes 7, 10, 11 and 14 are indicated by double arrowhead. The sequence of the probes is shown at the bottom of the figure (the E-box sequence is underlined). The gel shown is representative of two independent experiments.

Panel C. Nuclear extracts from MDCK-E47 cells were analysed in band-shift assays using the ³²P-labeled B-I (lanes 1 and 2) and B-II wild type probes (lanes 3-6) in the presence of cold E-box competitor B-I^{wt} (lane 2) or B-II^{wt} (lane 4), or after the incubation with anti E47 antibodies (lane 6) or unspecific IgG (lane 5). The retarded low-mobility complex detected with probe B-I^{wt} is indicated by solid double arrowhead and those generated with the probe B-II^{wt} by single arrowhead. Note the increased mobility of the larger complex generated with probe B-II^{wt} (solid arrowhead) compared to B-I^{wt} and the new faster migrating band (empty arrowhead) detected with the B-II probe. Also note that the free oligonucleotide probe runs

below the region of the gel displayed. The complete sequence of the probes is shown at the bottom with position of E-box underlined. The gel shown is representative of two independent experiments.

Panel D. Nuclear extracts from MDCK-CMV, MDCK-Snail cells and siSnail c3, a clone derived from MDCK-Snail cells in which the Snail message was silenced by stable RNA interference (Jorda et al., 2005), were analysed in band-shift assays using the ³²P-labeled B-I probe. The position of the low-mobility complex detected only in MDCK-Snail extracts is shown by a double arrowhead. The complete sequence of the probe is shown at the bottom of the figure. The gel shown is representative of two independent experiments.

Figure 4. Activated Ras (Ras Val 12) and MAPK signaling pathways are involved in the induction of the Id-1 promoter by E47 and Snail expression.

Panel A. In MDCK-E47 and MDCK-Snail cells, the activity of the Id-1 promoter was significantly reduced by the treatment with PD 98059, an inhibitor of MEK. Briefly, the effects of MEK inhibition were assayed on the activity of the proId-1370 construct in DMSO treated cells (white bars) or PD 98059 treated cells (*solid bars*). The Luciferase / Renilla values were normalized to those obtained in vehicle-treated MDCK-CMV cells. The data shown are the mean of two independent experiments (\pm S.D.).

Panel B. The level of active Erks (phospho-Erk 1 and phospho-Erk 2) were analyzed by Western blot in cell extracts from E47- and Snail-expressing cells and found to be increased with respect to mock controls. Treatment with the MEK inhibitor PD 98059 significantly reduced these levels in all cases. Total Erk1/2 was used as a control for gel loading. Increased levels of Id-1 protein were also detected in vehicle- E47- and Snail-expressing cells as detected in the same membrane. α tubulin detection was used as control for gel loading. The results shown are representative of two independent experiments.

Panel C. MDCK-CMV cells were transiently co-transfected with proId-1370 construct and the combinations of oncogenic Ras (Ras Val 12) and a dominant negative expression vector of MEK (MEK-DN), as well as the TK Renilla. Luciferase activity was determined and

represented as fold stimulation of the activity over the pCDNA3 expression vector (empty vector). Results represent the mean (\pm S.D.) from three independent experiments.

Figure 5. MAPK signaling pathway mediates the induction of the Id-1 promoter through phosphorylation of the SP-1 and the complexes bound to distal region (-1128/-1102)

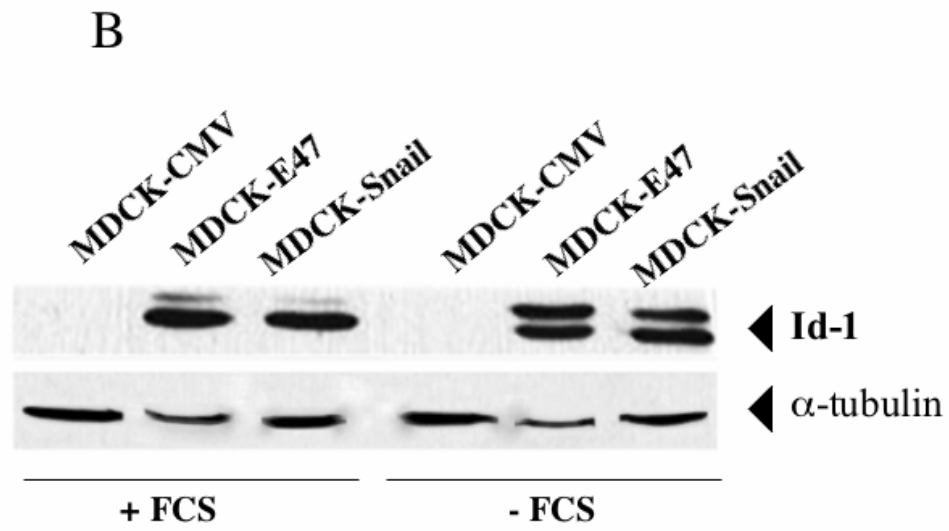
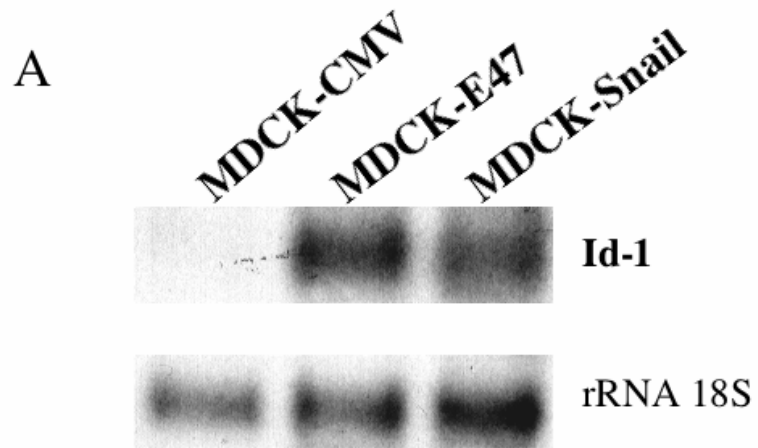
Panel A. The treatment with Erk inhibitor PD 98059 significantly reduced the intensity of the low-mobility complex detected by EMSA in E47- and Snail-expressing cells using the B-I probe containing the E-box “B” site at -1125nt of the Id-1 promoter. Briefly, MDCK-CMV, MDCK-E47 or MDCK-Snail cells were serum-starved for 18 h in serum free media. Where indicated, PD 98059 (lanes 3, 5 and 7) or the vehicle alone (lanes 2, 4 and 6) were added and the cells were incubated for a further 6 h. Nuclear extracts were analysed by EMSA using the wild type B-I probe. The low-mobility complex is indicated by a solid arrowhead; lane 1 represents EMSA without the nuclear extract. The sequence of B-I probe is shown at the bottom with indication of the E-box “B” (underlined) and the SP-1 (dashed line) elements contained within these sequences. The gel shown is representative of two independent experiments.

Panel B. Nuclear extracts from MDCK-CMV (lane 2), MDCK-E47 (lanes 3-5) and MDCK-Snail cells (lanes 6-8) were analysed in band-shift assays using the ³²P-labeled B-I probe after incubation with an anti-SP-1 antibody (lanes 4 and 7) or control rabbit IgG (lanes 5 and 8) as indicated. Lane 1 shows EMSA in which the nuclear extract was not added. The low-mobility complex is indicated by a solid arrowhead. In MDCK-CMV extracts this complex was not detected (lane 2). Anti-SP-1 antibodies diminished the intensity of the complex formed in extracts from E47- and Snail-expressing cells (lanes 4 and 7, respectively) whereas the unspecific IgG was ineffective in both cell lines. The gel shown is representative of two independent experiments.

Panel C. Nuclear extracts of MDCK-E47 (lanes 2-5) and MDCK-Snail cells (lanes 7-10) were analysed in band-shift assays using the ³²P-labeled B-III probe in the absence (lanes 2-4 and 7-9) or presence of 500-fold molar excess of wild type cold oligonucleotides (lanes 5 and 10) or anti-SP-1 or control rabbit IgG. Lanes 1 and 6 show EMSA in which the nuclear extract

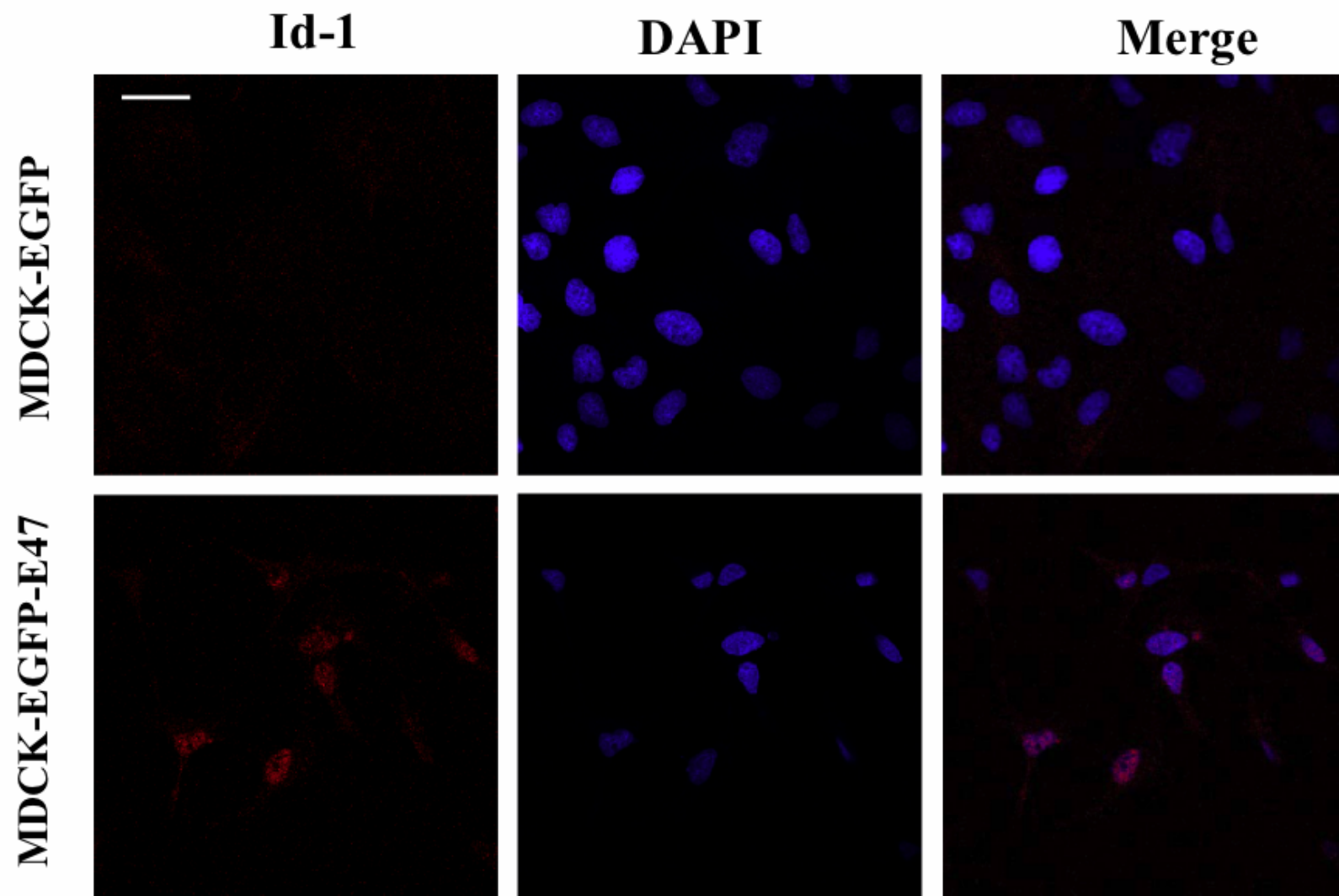
was not added. Anti-SP-1 antibodies diminished the intensity of the complex generated in nuclear extracts from MDCK-E47 (lane 4) and MDCK-Snail cells (lane 9) (solid arrowhead). The sequence of the B-III probe is indicated at the bottom with indication of the SP-1 element (underlined). The gel shown is representative of two independent experiments.

Panel D. Induction of the Id-1 promoter activity by SP-1 and activated Erk in SL2 *Drosophila* cells. *Drosophila* SL2 cells were transfected with proId-1370 construct in the absence (empty vector) or presence of expression vectors for wild type SP-1 and/or an activated form of Erk2 (ERK2-MEK1). A vector coding for β -galactosidase under control of the *Drosophila* actin promoter (pPAC) was cotransfected in all cases to normalise the Luciferase activity. The activity of the Id-1 promoter was normalized to β -galactosidase activity and represented as fold stimulation over the empty vector. One representative experiment out of three is shown.



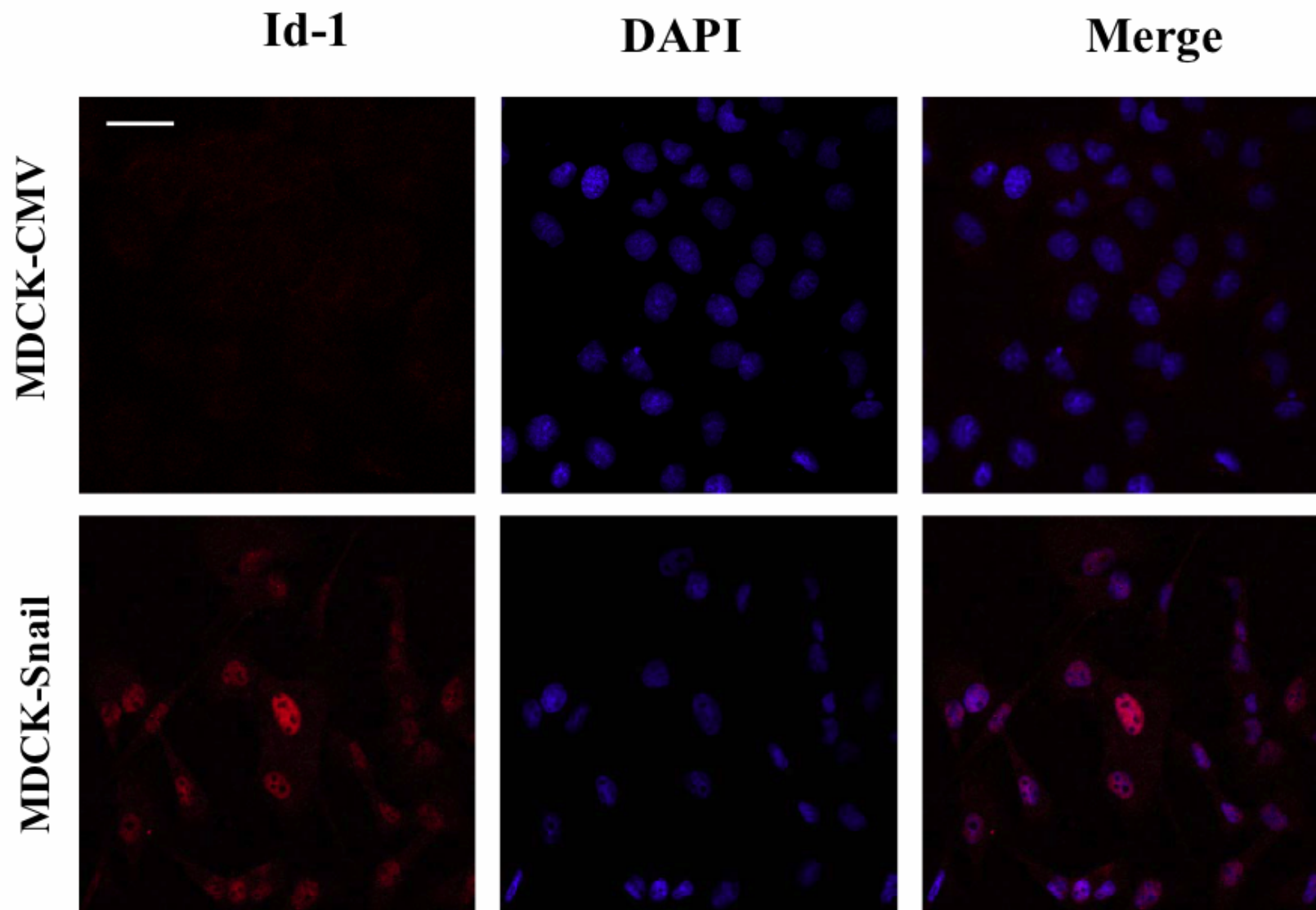
Jordà et al., Fig. 1

C



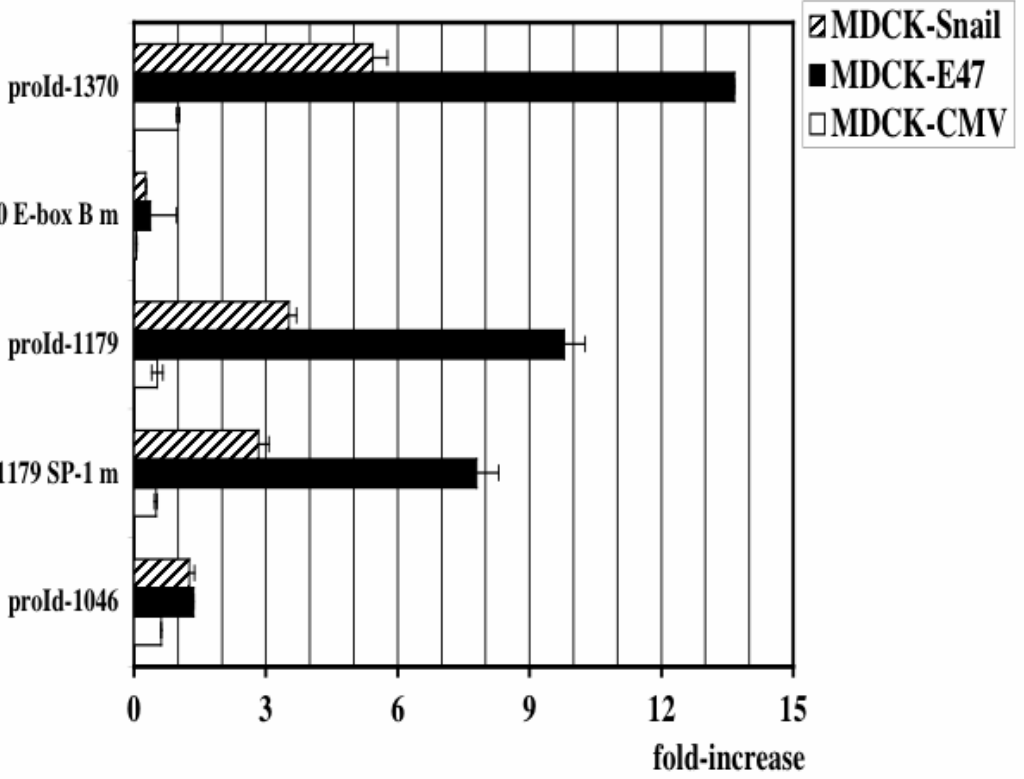
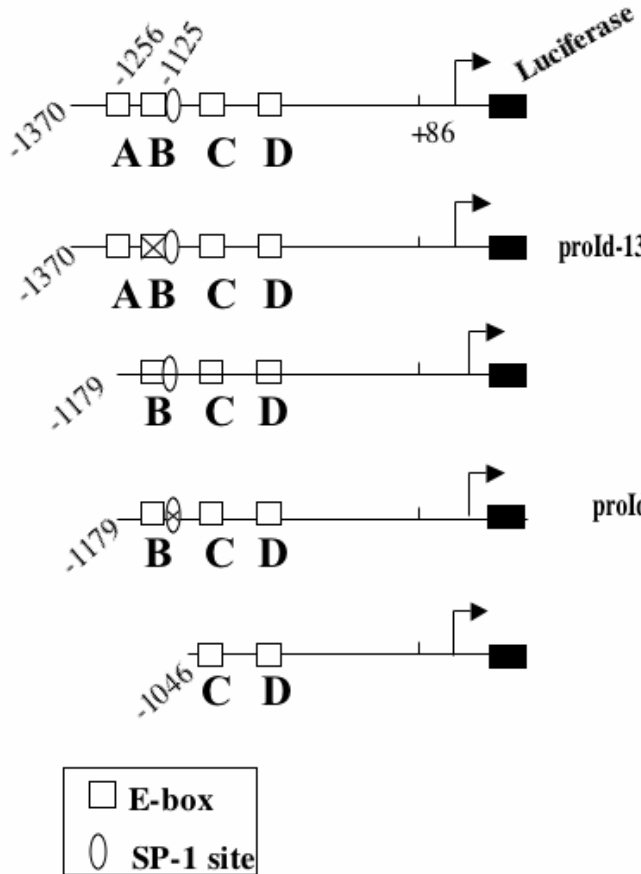
Jordà et al., Fig.1

D



Jordà et al., Fig. 1

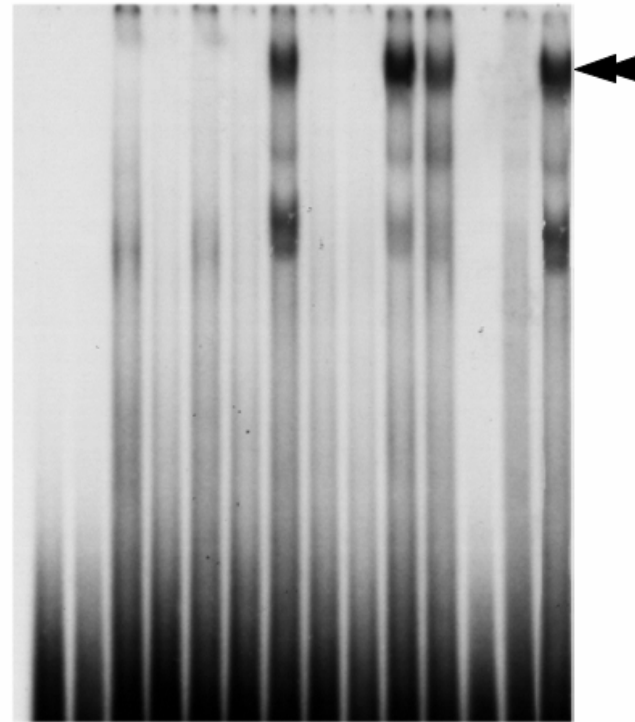
Id-1 promoter activity



Jordà et al., Fig. 2

B

	MDCK-CMV			MDCK-E47			MDCK-Snail		
B-I ^{wt} probe	+	-	+	+	-	+	+	-	+
B-I ^m probe	-	+	-	-	+	-	-	+	-
B-I ^{wt} competitor (500X)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
B-I ^m competitor (500X)	-	-	-	-	+	-	-	+	-
nuclear extract	-	-	+	+	+	+	+	+	+



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

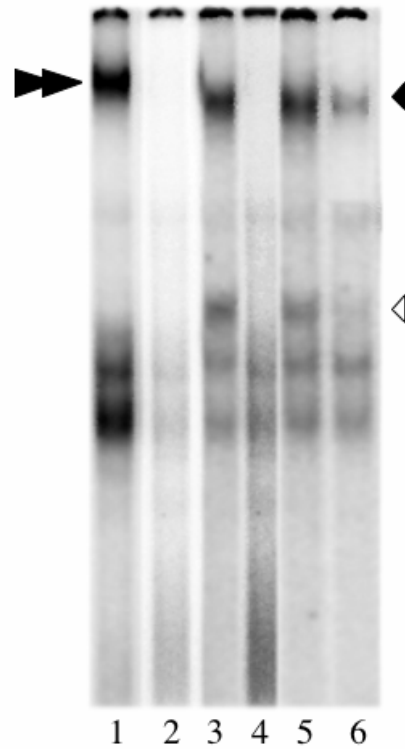
B-I^{wt} probe : GAGACTCGCAGGTGTTGGGGCGG

B-I^m probe : GAGACTCG ttGGTc TGGGGCGG

Jordà et al., Fig. 3

C

B-I ^{wt} probe	+	+	-	-	-	-
B-II ^{wt} probe	-	-	+	+	+	+
E-box competitor B-I ^{wt} (500x)	-	+	-	-	-	-
E-box competitor B-II ^{wt} (500x)	-	-	-	+	-	-
unspecific IgG	-	-	-	-	+	-
anti-E47 antibody	-	-	-	-	-	+
MDCK-E47 nuclear extract	+	+	+	+	+	+

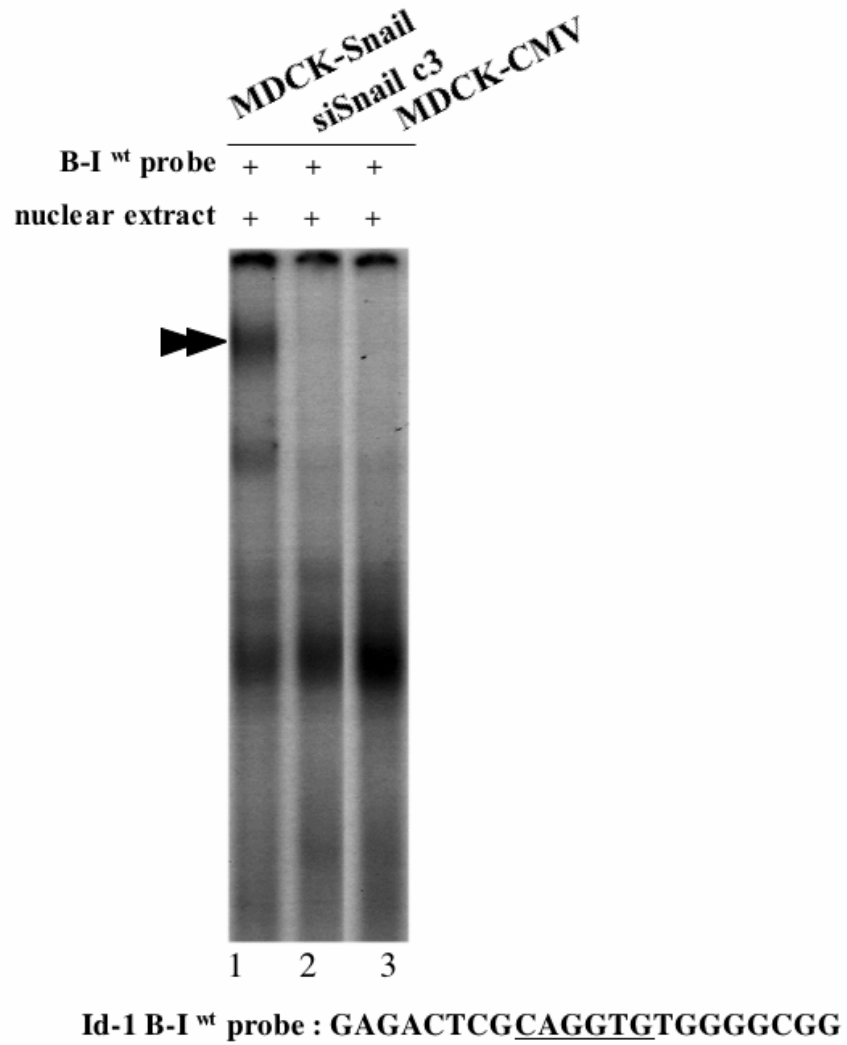


Id-1 B-I^{wt} probe : GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG

Id-1 B-II^{wt} probe : GACTCGCAGGTGTGGG

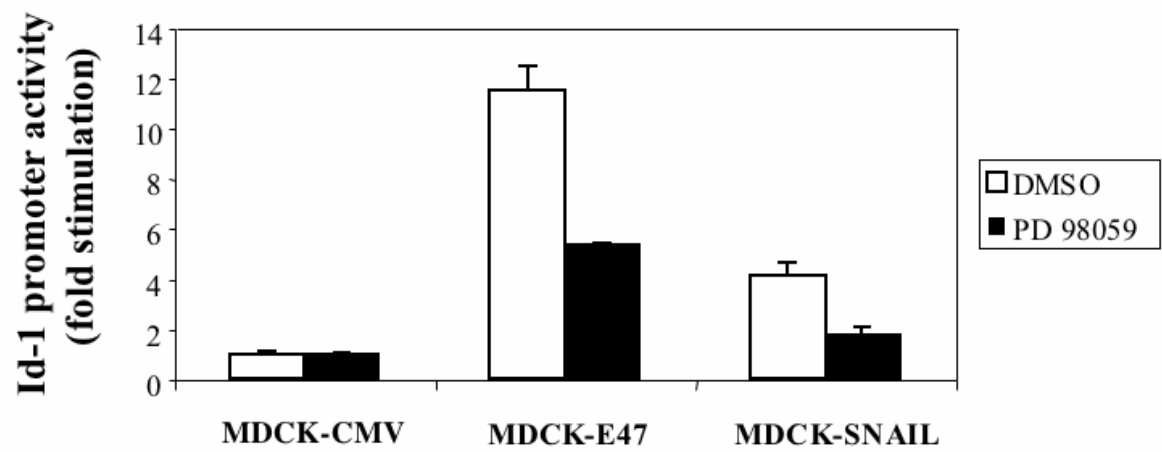
Jordà et al., Fig. 3

D



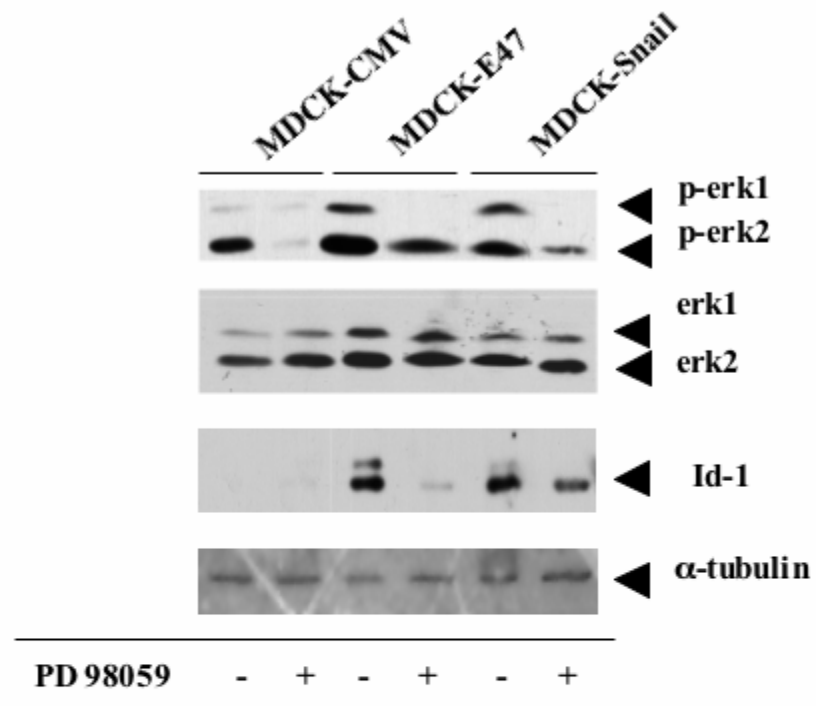
Jordà et al., Fig. 3

A



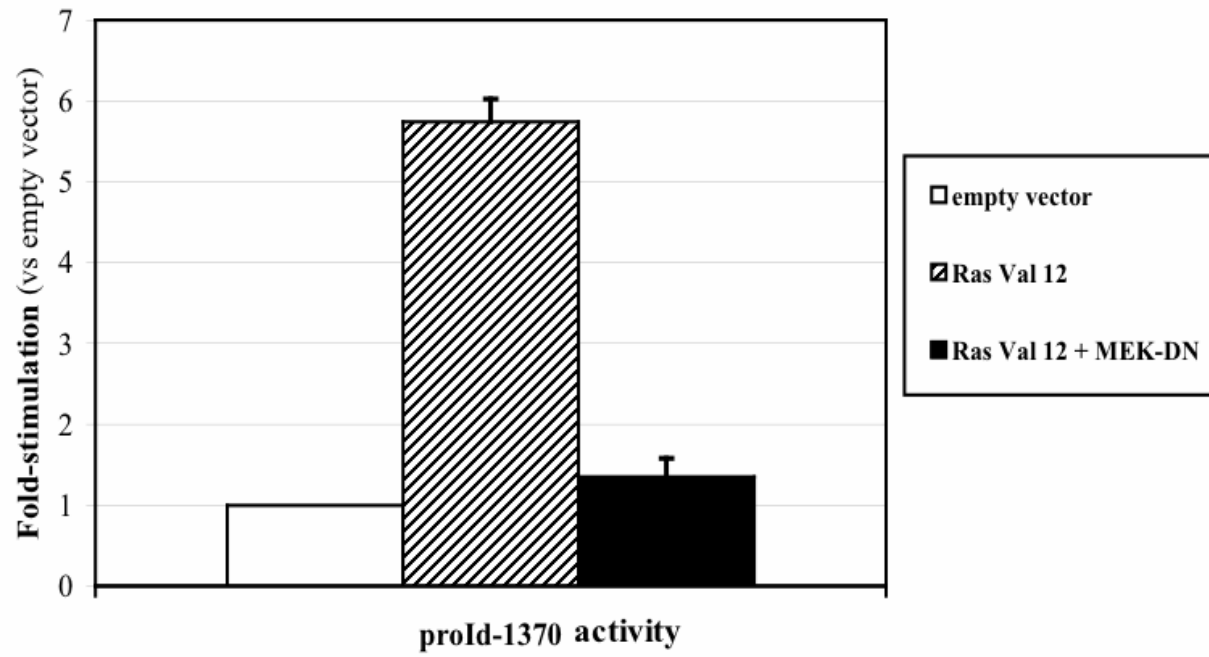
Jordà et al., Fig. 4

B



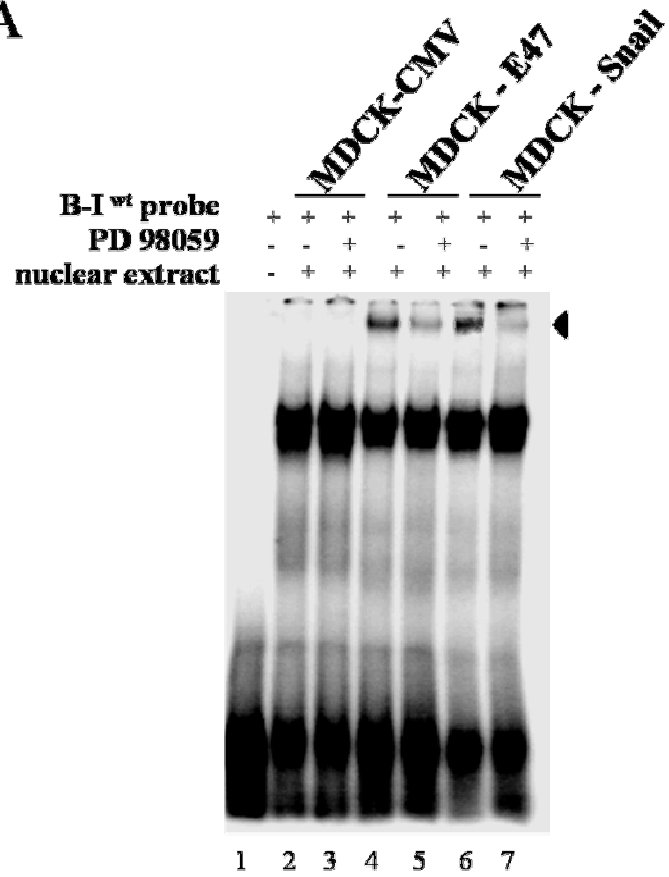
Jordà et al., Fig. 4

C



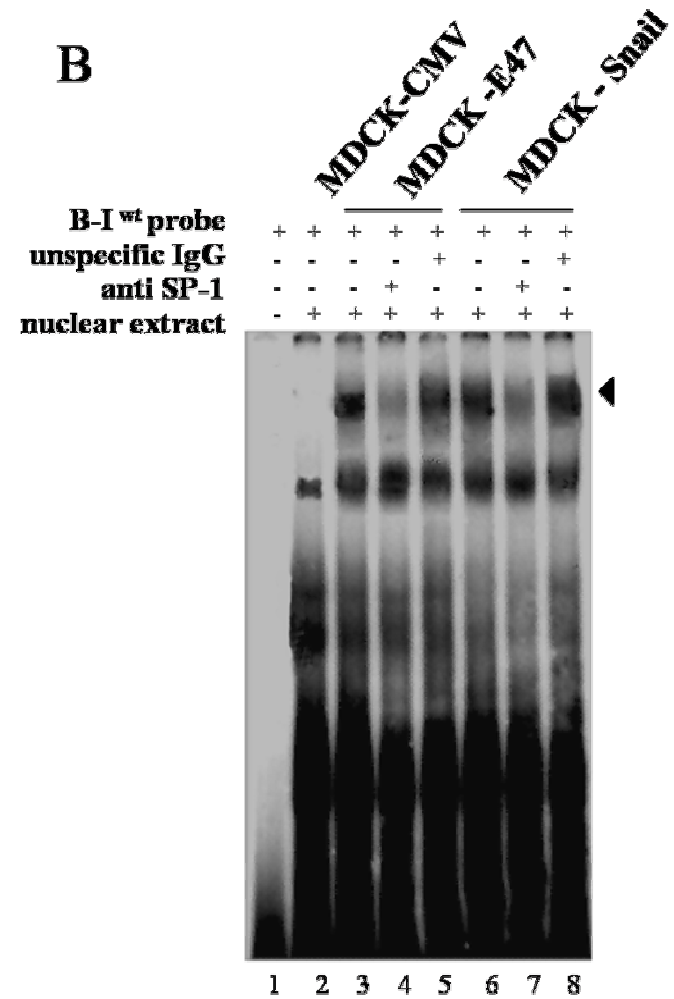
Jordà et al., Fig. 4

A



B-I^{wt} probe: **GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG**

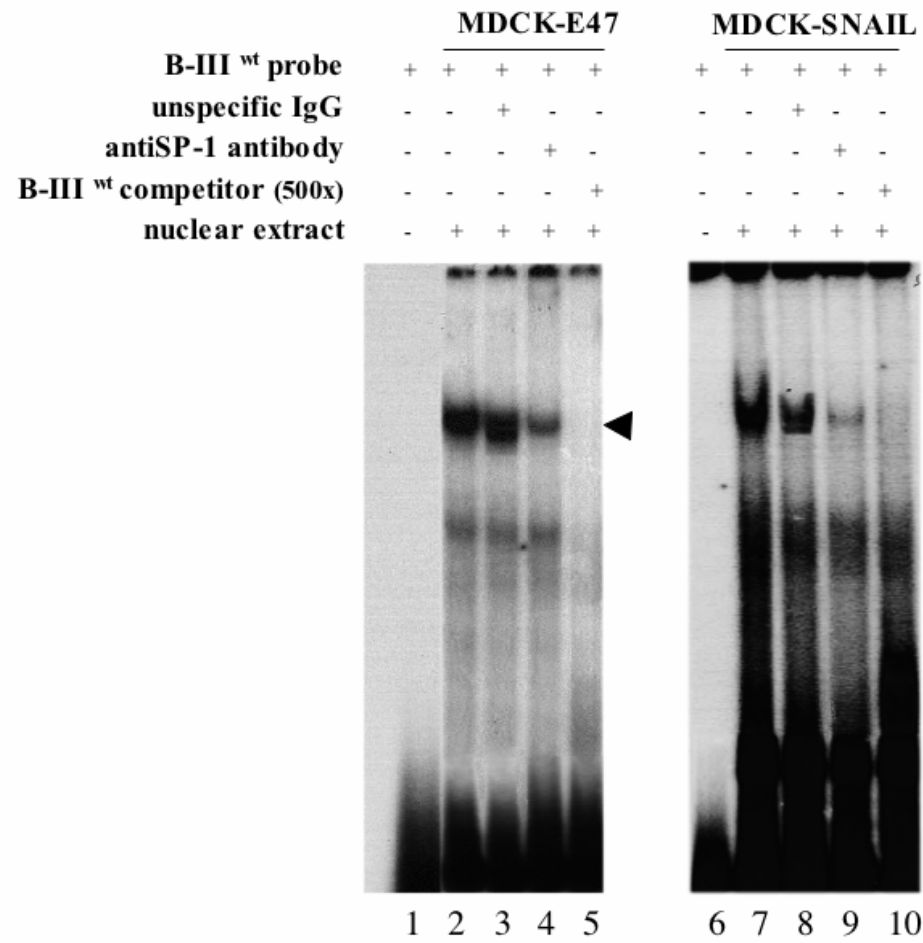
B



B-I^{wt} probe: **GAGACTCGCAGGTGTGGGGCGG**

Jordà et al., Fig. 5

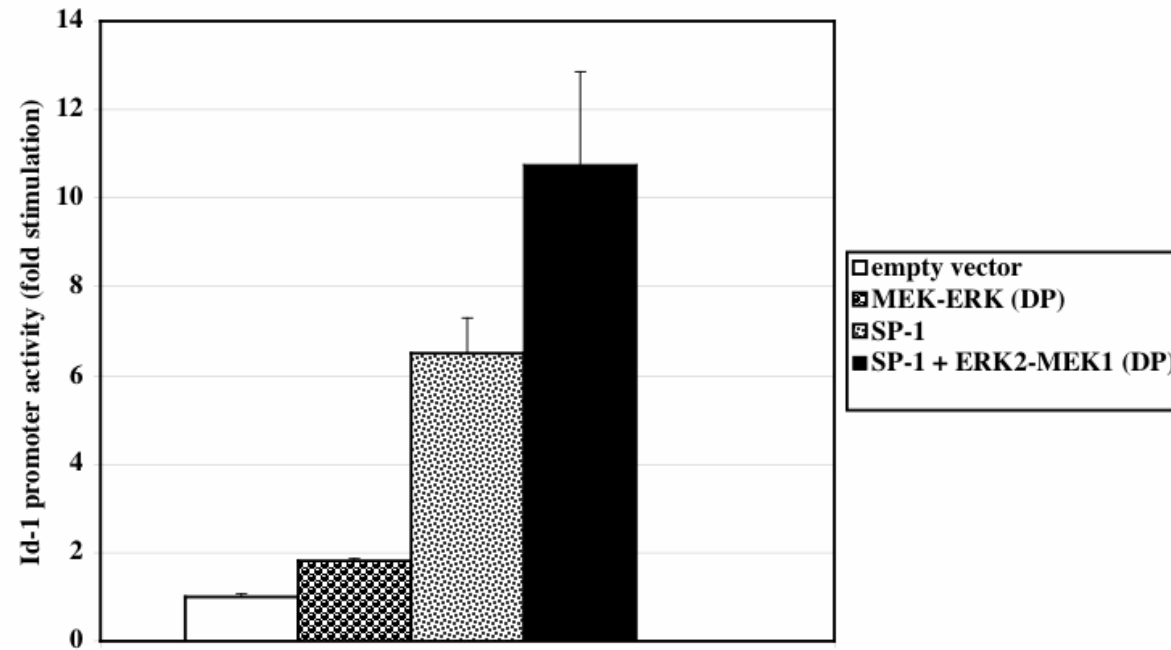
C



Id-1 B- III^{wt} probe : TGTGGGGCGGGGAGGTAAGG

Jordà et al., Fig. 5

D



Jordà et al., Fig. 5