

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**REGULACION DE LA EXPRESION Y
FUNCION DE LA MOLECULA DE ADHESION
CELULAR CADHERINA E DURANTE
LA PROGRESION TUMORAL EN LA
CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATON.**

TESIS DOCTORAL

M^a ISABEL RODRIGO CASTRO

Madrid, 1997

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**REGULACION DE LA EXPRESION Y
FUNCION DE LA MOLECULA DE ADHESION
CELULAR CADHERINA E DURANTE
LA PROGRESION TUMORAL EN LA
CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATON.**

Memoria que presenta, para optar al grado de
Doctor en Farmacia, la licenciada

M^a ISABEL RODRIGO CASTRO

Director de tesis: **Dra. Amparo Cano García**
Profesora Titular de la Universidad Autónoma de Madrid
Dpmto. de Bioquímica, Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Madrid, Diciembre de 1997

Esta Tesis ha sido realizada gracias a la concesión a Isabel Rodrigo Castro de una Beca de Formación de Personal Investigador por parte de la Comunidad Autónoma de Madrid.

*A mis padres
y a mi hermana*

AGRADECIMIENTOS

Realmente tengo muchas cosas que agradecer, muchas, a mucha gente que me ha ayudado durante estos años, tanto en el trabajo, como personalmente, y la mayoría de las veces las dos cosas.

Por supuesto, a Amparo, mi directora de tesis, por todo lo que me ha enseñado, por su dedicación y por su esfuerzo.

También me gustaría agradecer a la gente del Instituto que me ha ayudado en determinados momentos: a Javier y Beatriz, por echarme un cable con los ordenadores; a Javier, el delineante, por enseñarme a manejar el MacDraw; a Antonio y a Ricardo, los fotógrafos, por estar siempre dispuestos; a Jorge Martín por su ayuda con el Endnote. A Begoña, y a René, que mientras estuvo en el IIB siempre se preocupó por nosotros.

Me gustaría recordar a mi primera "jefa" María de Ceballos, por iniciarme en este mundo. Y volviendo más atrás en el tiempo a Mario, mi profesor de física en Getafe, por traer a unos alumnos de COU a visitar "un" centro de Investigación en Madrid, donde me quedé una temporada.

A Angels Fabra y Ana Llorens por su colaboración en el trabajo de la metástasis. También a Angela Nieto, por su aportación a este trabajo con relación a los genes slug y snail. A Andrew Cato, por aceptarme en su laboratorio para aprender técnicas de transcripción. Y también a Jorge Martínez, por la calurosa acogida que me brindó en su laboratorio en Chile.

Quiero agradecer también a la gente que conocí en Karlsruhe, por su ayuda y compañía, y por hacerme más agradable la estancia allí: Andreas, Jutta, Erik, Michael y a Markus, por sus consejos y su paciencia.

A mis amigas "de toda la vida", Carmen (Rueda) y Teresa, y a mis amigos de la carrera, Carmen "de Móstoles" y Carmen "la rubia", Merche y Alejandro, por estar siempre ahí. También a Cristina, Yolanda, Mari Luz y Teresa, por el cariño con el que me han tratado.

Y, como no, a mis amigos y compañeros del instituto y la facultad, donde he conocido a gente estupenda, de verdad. Por supuesto, una mención muy especial a Marisa, que me enseñó prácticamente a andar en el laboratorio, por toda su entrega desinteresada, por ser tan buena maestra y por ser tan buena amiga.

A Pilar (gracias, Pilar, que habría hecho yo sin tu ayuda estos últimos días locos) y a Cata, gracias por su amistad, y por los buenos y malos ratos compartidos y que compartiremos. A los demás amigos y compañeros del 1.7, Oscar, Maite, Jesús, Damaris, Juan Francisco, Amalia y Miguel; y por supuesto gracias también a los que estuvieron un día por el 1.7 pero andan ahora por otros lugares: Carlos, Encarni, Mónica...

A Juan, por ser tan buen amigo y por ayudarme tanto. También a Vicky y a María por hacerme pasar muy buenos ratos. A Paloma, por ser como es. Y también a Gemma,

Carmela, Belén (vaya cocidos más ricos), Marga, Aurora, Ana, Raúl, Rafa, Jose, Cris, Alberto García y mucha más gente del IIB y la facultad, por compartir cafés, comidas y por su ayuda e interés.

También me gustaría agradecer a mi familia el que se preocupara tanto por "la célula" en estos años de tesis.

Y por último, a quien más ha soportado mis cambios de humor, a quien me ha apoyado incondicionalmente, sin los cuales no habría podido realizar este trabajo: a mis padres y a mi hermana. Gracias por su comprensión, su cariño, su esfuerzo, su ayuda ilimitada, su paciencia y su apoyo.

Me hubiera gustado llegar un poco más lúcida a este momento de escribir esta página. Sin embargo, los que me conocen, saben que mi agradecimiento es sincero, que soy consciente de que sin su ayuda no me habría sido posible realizar esta Tesis, y que este ha sido un trabajo de grupo. Gracias a todos.

ABREVIATURAS

APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCIP	bromocloroindolilfosfato
BCA	ácido bicinconínico
BSA	albúmina de suero bovina
CAT	cloranfenicol acetil transferasa
Ci	curio
CD-E	cadherina E
CD-P	cadherina P
CMV	citomegalovirus
cpm	cuentas por minuto
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMBA	dimetilbenza-antraceno
DMS	dimetilsulfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
fpu	unidad de footprinting
GADPH	gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
h	hora
HaMSV	virus del sarcoma murino de Harvey
HBSS	solución salina equilibrada de Hank.
Hepes	ácido 3-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico
Kb	kilo pares de bases
KDa	kilo dalton
MMP	metaloproteinasas de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
NBT	nitro-blue-tetrazolio
pb	pares de bases
PAC	puromicina N-acetil transferasa
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RNA	ácido ribonucleico
RSV	Virus del Sarcoma de Rous
RT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR
SDS	dodecil sulfato sódico
SV40	Virus Simio 40
TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	tampón Tris salino
T-TBS	tampón TBS con Tween-20
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
tPA	activador tisular del plasminógeno
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
U	unidad enzimática (según la definición del proveedor)
uPA	activador del plasminógeno tipo uroquinasa

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1- Procesos de adhesión celular	6
2- Uniones celulares en tejidos epiteliales.....	6
3. La piel y la epidermis	9
4. Las cadherinas	10
4.1. Superfamilia de las cadherinas. Clasificación, características y estructura.....	10
4.2. Complejos cadherinas-cateninas	12
4.3. Importancia biológica de las cadherinas clásicas	13
4.3.1. Papel morforregulador de las cadherinas	13
4.3.2. Papel de las cadherinas en la señalización celular.	15
4.3.3. Papel de las cadherinas en procesos tumorales, invasión y metástasis.	16
5. Invasión y metástasis: papel de proteasas de matriz extracelular	18
6. Regulación de la expresión génica en sistemas epiteliales. El promotor de CD-E.....	21
6.1. Regulación de la expresión de CD-E.....	21
6.2. Caracterización de regiones reguladoras del gen de CD-E.....	23
6.3. Regulación de la expresión epitelio-específica.....	24
7. El modelo de carcinogénesis de piel de ratón.....	27
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
MATERIALES	33
1. Reactivos químicos y bioquímicos.	33
2. Tampones y soluciones.....	33
3. Medios empleados en cultivo de células.....	33
4. Líneas celulares	34
5. Animales de experimentación	36
6. Anticuerpos y reactivos inmunológicos.....	36
6.1. Anticuerpos primarios	36
6.2. Anticuerpos secundarios.....	36
7. Sondas empleadas en experimentos de Northern-blot	37
8. Plásmidos.....	37
8.1. Plásmidos empleados en la obtención de transfectantes estables.....	37
8.2. Plásmidos empleados en los experimentos de transfección transitoria	38
8.2.1. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-E.....	38
8.2.2. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-P.....	40
8.2.3. Plásmidos control en los experimentos de actividad promotora de CD-E y de CD-P.....	40
8.2.4. Vectores de expresión empleados en los experimentos de cotransfección.....	40

9. Oligonucleótidos.....	41
9.1. Oligonucleótidos empleados en la generación del plásmido m-Ets.....	41
9.2. Oligonucleótidos y fragmentos de DNA empleados en experimentos de retardo en gel.....	41
9.3. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de footprinting <i>in vivo</i>	43
MÉTODOS.....	44
1. Cultivo celular	44
2. Obtención de transfectantes estables.....	44
3. Métodos inmunológicos.....	44
3.1. Inmunofluorescencia.....	44
3.2. Obtención de extractos celulares para inmunoblot.....	45
3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunoblot	45
4. Ensayos de migración <i>in vitro</i> en geles de colágeno	46
5. Ensayos del comportamiento <i>in vivo</i> de los clones transfectantes.....	46
5.1. Ensayos de tumorigenicidad.....	46
5.2. Ensayos de metástasis espontánea	47
6. Detección de proteasas por zimografía	47
6.1. Detección de la actividad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).....	47
6.2. Detección de actividad gelatinolítica.....	47
7. Análisis de RNA por transferencia a membrana (Northern-blot).....	48
7.1. Obtención de RNA.....	48
7.2. Purificación y marcaje de sondas.....	48
7.3. Ensayo de Northern-blot.....	48
8. Ensayos de expresión transitoria.....	49
8.1. Transfección transitoria.....	49
8.2. Preparación de extractos celulares.....	49
8.3. Ensayos CAT	49
8.4. Medida de actividad luciferasa	50
8.5. Medida de actividad β -galactosidasa.....	50
9. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética en gel.....	50
9.1. Obtención de extractos nucleares.....	50
9.2. Ensayos de retardo en gel.....	50
9.3. Ensayos de competición.....	51
9.4. Ensayos de super-retardo.....	51
10. Experimentos de protección a DNAasaI o de footprinting <i>in vitro</i>	51
10.1. Proteínas purificadas y extractos nucleares.....	51
10.2. Obtención y marcaje de la sonda.....	51
10.3. Secuenciación química por Maxam-Gilbert.....	52
10.4. Digestión con DNAasaI y separación de los fragmentos en gel.....	52
11. Análisis del estado de metilación endógena del DNA.....	52

11.1 Obtención de DNA genómico.....	52
11.2. Purificación y marcaje de la sonda	52
11.3. Digestión del DNA y ensayo de Southern-blot.....	52
12. Experimentos de footprinting <i>in vivo</i>	53
12.1. Metilación y obtención del DNA.....	53
12.2. Digestión con piperidina.....	53
12.3. Amplificación por PCR mediada por adaptador.....	53
12.4. Separación en gel y visualización.....	55
RESULTADOS.....	56
1. Papel de la cadherina-E en el comportamiento maligno de queratinocitos tumorales del ratón.....	57
1.1. Generación de transfectantes de la línea celular E24 con un vector de CD-E antisentido.....	58
1.2. Caracterización inicial de los transfectantes	62
1.3. Ensayos de migración <i>in vitro</i>	62
1.4. Comportamiento <i>in vivo</i> de los transfectantes	65
1.5. Niveles de Ha-ras.....	67
1.6. Papel de proteasas de matriz extracelular.....	68
1.6.1. Activador del plasminógeno tipo urokinasa	68
1.6.2. Metaloproteinasas de matriz	68
1.7. Estudio de la relación entre CD-E y MMP-9	71
2. Regulación de la expresión de CD-E en la carcinogénesis de piel de ratón.....	74
2.1. Actividad del promotor de CD-E en queratinocitos de ratón.....	74
2.2. Unión de factores nucleares al promotor de CD-E.....	81
2.2.1. Interacción de factores nucleares con la región 5' proximal.....	81
2.2.2. Análisis de los factores que interaccionan con el elemento E-pal.....	84
2.2.3. Análisis de los factores que interaccionan con la caja CCAAT.....	87
2.2.4. Análisis de los factores que interaccionan con la región rica en GC.....	89
2.2.5. Análisis de los factores que interaccionan con la región ECE.....	94
2.3. Análisis funcional de la región ECE y del elemento Ets en la actividad promotora de CD-E.....	97
2.4. Estudios del promotor endógeno de CD-E.....	102
2.4.1. Estado de metilación endógena del promotor de CD-E.....	102
2.4.2. Estudios de footprinting <i>in vivo</i>	104
2.5. Estudio comparativo de los promotores de CD-E y CD-P de ratón.....	108
DISCUSIÓN.....	117
1. Implicación de la CD-E en la metástasis. Relación con la MMP-9.....	118
1.1. CD-E y propiedades tumorales: Papel en la metástasis	118
1.2. Mecanismos implicados en la mayor capacidad metastásica e invasiva por la pérdida de CD-E: Papel de MMP9.....	120
2. Mecanismos que controlan la expresión de CD-E en la carcinogénesis de piel de ratón.	122
2.1. Región -178/+92. Elementos reguladores	123

2.1.1. Elemento represor E-pal	124
2.1.2. La región GC y la caja CCAAT regulan positivamente la transcripción	126
2.1.3. Papel regulador negativo del sitio Ets.....	128
2.2. Promotor endógeno de CD-E. Mecanismos reguladores de su transcripción en queratinocitos de ratón	130
2.3. Mecanismos de regulación comunes y diferenciales de los promotores de CD-E y CD-P	131
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFIA	136
ANEXO	159

RESUMEN

Durante la progresión tumoral, y en concreto en la carcinogénesis de piel de ratón, la desaparición de la molécula de adhesión celular cadherina E (CD-E) se ha relacionado con una mayor capacidad invasiva. Para estudiar más a fondo el papel de esta molécula, así como la regulación de su expresión, hemos analizado en este estudio diferentes líneas celulares representativas de distintos estadios de la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón. La transfección de un cDNA antisentido de CD-E en la línea celular E24, tumorigénica pero no metastásica, bloqueó la expresión de CD-E sin afectar a otras moléculas relacionadas. Los transfectantes anti-sentido aumentaron su capacidad invasiva en geles de colágeno y, de forma interesante, adquirieron capacidad metastásica tras su inyección intradérmica en ratones inmunodeprimidos. El análisis de la actividad de varias proteasas de matriz extracelular mostró que las células que habían perdido la CD-E presentaban una actividad gelatinolítica MMP-9 muy elevada. Esta relación inversa entre CD-E y actividad MMP-9 se puso de manifiesto en otros sistemas celulares dentro del modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, sugiriendo que puede ser un mecanismo general, por el que la CD-E controla el comportamiento invasivo y metastásico.

Por otra parte, para estudiar la regulación de la expresión de la CD-E en la carcinogénesis, hemos analizado la actividad transcripcional de la región 5' del gen de CD-E en diferentes líneas celulares representativas de los distintos estadios de la progresión y con niveles variables de CD-E. Una región comprendida entre las posiciones -178/+92 respecto del inicio de la transcripción mostró actividad específica, siendo activa en líneas celulares CD-E positivas y prácticamente inactiva en líneas que no expresaban CD-E. Un análisis detallado de esta región, mediante estudios de footprinting *in vivo* e *in vitro*, análisis de retardo en gel y ensayos de transfección transitoria con distintas construcciones del promotor de CD-E silvestre y mutado, permitió definir diversos elementos reguladores de la transcripción de CD-E. Así, una región rica en GC, situada en posición -58 a -32, con capacidad de unir los factores de transcripción SP1 y AP2 y una caja CCAAT, en posición -65, controlan positivamente la transcripción; mientras que un elemento palindrómico E-pal, situado de -86 a -75, lo hace negativamente. Adicionalmente, se ha identificado una región de unión a factores Ets, en posición -95, que controla de forma negativa la transcripción en células que expresan CD-E, posiblemente por interacción con otros factores de transcripción. Los resultados obtenidos sugieren también que el bloqueo de la transcripción en las células CD-E negativas se realiza principalmente por el fuerte efecto represor que ejerce el elemento E-pal. Por otra parte, la comparación de las regiones promotoras de los genes de CD-E y cadherina P, la otra cadherina clásica expresada en queratinocitos de piel, mostró que existen mecanismos reguladores comunes que actúan a través de la caja CCAAT y de la región rica en GC, así como mecanismos adicionales en la regulación de la expresión del gen de CD-E. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de mecanismos complejos de regulación de la expresión de CD-E, alterados durante la progresión tumoral.

ABSTRACT

During tumor progression, specifically in mouse skin carcinogenesis, the disappearance of the cell adhesion molecule E cadherin (E-CD) has been correlated with an increase in the invasive capacity. To further understand the role of this molecule, as well as the regulation of its expression, we have analysed in the present study several cell lines representative of different stages of tumor progression in mouse skin carcinogenesis. Transfection of an E-CD antisense cDNA in the tumorigenic but non metastatic E24 cell line, blocked E-CD expression without affecting other related molecules. The anti-sense transfectants showed an increase in invasiveness through collagen gels and, interestingly, they became metastatic after intradermal injection in immunosuppressed mice. The analysis of the activity of several extracellular matrix proteinases showed that cells that had lost E-CD had an increase in MMP-9 gelatinase activity. This inverse correlation between E-CD and MMP-9 activity was also evident in other cell systems belonging to the mouse skin carcinogenesis model, suggesting that it may be a general mechanism by which E-CD controls the invasive and metastatic behaviour.

On the other hand, to study the regulation of expression of E-CD in carcinogenesis, we have analysed the transcriptional activity of the 5' region of the mouse E-CD gene in a collection of cell lines representative of different stages of tumor progression and with variable levels of E-CD. An area comprised between -178/+92 positions, regarding the transcription start site, showed specific activity being active in positive E-CD cell lines and almost inactive in non expressing E-CD cell lines. A detailed analysis on this area, using *in vivo* and *in vitro* footprinting studies, gel shift analysis and transient transfection assays with different constructs of wild type and mutated E-CD promoter, allowed us to define several E-CD transcription regulatory elements. Thus, a GC-rich region, located at -58 to -32 position, with binding capacity for SP1 and AP2 transcription factors and a CCAAT box, at -65 position, are positive control elements of transcription; while a palindromic element, E-pal, located at -86 to -75, is a negative control element. In addition, an Ets-binding sequence, at -95 position, acts as a negative control element of transcription in E-CD expressing cell lines, possibly by interacting with other transcription factors. The results obtained so far let us also to suggest that the lack of expression in E-CD negative cell lines is mainly performed by the strong repressor effect of the E-pal element in those cells. On the other hand, comparison between promoter regions of the E- and P-cadherin murine genes (the two classical cadherins expressed in skin keratinocytes) showed that there are common regulatory mechanisms that act through the CCAAT-box and the GC- rich region, as well as additional mechanisms in E-CD gene regulation. Taken together, these results suggest the existence of complex mechanisms of regulation of E-CD expression, impaired during tumor progression.

INTRODUCCIÓN

1- PROCESOS DE ADHESIÓN CELULAR.

Los organismos multicelulares están compuestos de tipos celulares heterogéneos que organizan distintos patrones durante el desarrollo para formar tejidos y órganos. Entre los procesos más importantes implicados en regular el establecimiento y mantenimiento de esta estructura tisular están los procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, y la existencia de procesos de adhesión selectiva.

Los receptores de membrana implicados en estos procesos se denominan en su conjunto CAMs (del inglés Cell Adhesion Molecules, moléculas de adhesión celular) y estructuralmente son glicoproteínas transmembrana. Existen dos tipos de CAMs funcionalmente diferentes: dependientes de calcio (cadherinas) e independientes de calcio (inmunoglobulinas, integrinas, selectinas y sindecanos). Son las moléculas de adhesión dependientes de calcio, las cadherinas, las que parecen tener un papel fundamental en la adhesión celular específica de tejido que ocurre durante el desarrollo embrionario en vertebrados, esencial para la correcta formación del organismo adulto. Las cadherinas desempeñan además un papel primordial en el mantenimiento de la estructura del organismo adulto, y se encuentran prácticamente en todos los tipos celulares de vertebrados (Takeichi, 1991).

Durante el desarrollo de esta Tesis se ha estudiado el papel y regulación de las cadherinas en un tipo tisular concreto: la epidermis, un epitelio compuesto estratificado, donde se expresan varios miembros de esta familia de moléculas. En la epidermis, las cadherinas se localizan principalmente en uniones celulares estructuradas localizadas en la membrana plasmática. Por tanto, a continuación vamos a describir los tipos de uniones celulares que existen en los tejidos epiteliales, así como la estructura de la epidermis de un organismo adulto, para pasar posteriormente al estudio más detallado de la familia de las cadherinas.

2- UNIONES CELULARES EN TEJIDOS EPITELIALES.

Los tejidos epiteliales se caracterizan por una fuerte asociación de las células individuales que lo componen, formando láminas (los epitelios). A su vez, estas células se unen a la matriz extracelular subyacente, la lámina basal. En el mantenimiento de la estructura de este tejido, que tiene que soportar un fuerte estrés mecánico, juegan un papel fundamental las uniones celulares (célula-célula o célula-matriz), estructuras especializadas de la membrana plasmática formadas entre membranas de células adyacentes o con la lámina basal.

En los epitelios existen tres tipos de uniones celulares, que aparecen representadas en la figura 1: uniones estrechas, uniones de anclaje y canales de comunicación o "gap junctions" (Alberts *et al.*, 1994). En las uniones de anclaje puede intervenir el citoesqueleto de actina, en las uniones adherentes (célula-célula) y en los contactos focales (célula-matriz), o el citoesqueleto de filamentos intermedios, en los desmosomas (célula-célula) y hemidesmosomas (célula-matriz).

Mientras que las uniones estrechas y las gap junctions tienen papeles fisiológicos determinados en el control de la permeabilidad transepitelial y la comunicación intercelular, el resto de uniones celulares desempeñan un papel fundamental en los procesos de adhesión celular. En concreto, moléculas de la familia de las cadherinas participan en la formación de las uniones adherentes y de los desmosomas. Las cadherinas, que son proteínas transmembrana, se asocian con proteínas del citoesqueleto a través de un conjunto de proteínas citoplásmicas de anclaje, formando una "placa" citoplásmica al interior de la membrana plasmática (Cowin y Burke, 1996).

Las uniones adherentes contienen cadherinas (como la cadherina-E, también llamada uvomorulina, en células epiteliales) que interactúan en su dominio intracelular con unas moléculas citoplásmicas llamadas cateninas: α , β y γ catenina, esta última denominada también plakoglobina (Kemler, 1993). En algunos casos se ha encontrado una catenina adicional, la fosfoproteína p120 (Reynolds *et al.*, 1994). Las cateninas se anclan al citoesqueleto de actina, que forma un anillo alrededor de las células. Existen otras proteínas intracelulares que también participan en la formación de estos complejos como vinculina, α -actinina, ezrina, radixina y moesina (Tsukita *et al.*, 1992).

Los desmosomas, de forma análoga, conectan de modo puntual el citoesqueleto de filamentos intermedios (constituído por citoqueratinas) de células adyacentes. Las proteínas transmembrana son desmogleínas y desmocolinas (pertenecientes a la familia de las cadherinas), que interactúan con las proteínas puente intracelulares desmoplaquina y plakoglobina (Garrod, 1993).

En células migratorias embrionarias no se ha observado una estructuración en uniones de anclaje, a pesar de ocurrir procesos de adhesión celular selectiva. Se ha sugerido que estos procesos de adhesión celular sin uniones celulares inician los procesos adhesivos selectivos, que son posteriormente orientados y estabilizados por la formación de uniones celulares estructuradas. Así, se cree que la formación de uniones intercelulares en los epitelios es necesaria para lograr la fuerza mecánica y para la polarización y orientación de las células (Gumbiner, 1996). En cualquier caso, la formación de uniones celulares debe ser un proceso flexible y altamente regulado, para permitir fenómenos como, por ejemplo, la regeneración de ciertos epitelios, donde debe existir migración celular sin pérdida de la integridad tisular.

CÉLULAS EPITELIALES

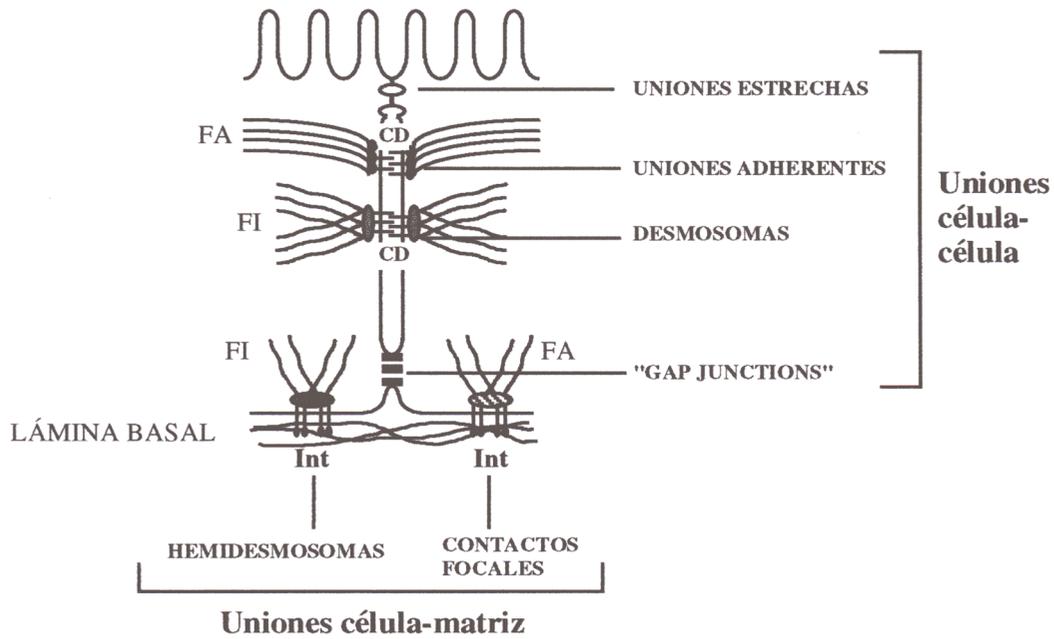


Fig. 1. Esquema de los tipos de uniones que existen en las células epiteliales.

FA, filamentos de actina; FI, filamentos intermedios; CD, cadherinas; Int, integrinas.

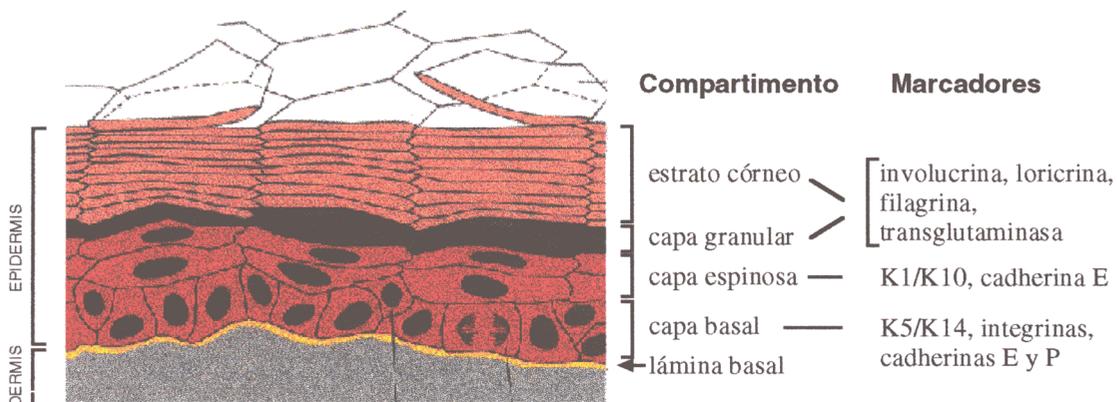


Fig. 2. Estructura de la piel y de los marcadores de diferenciación presentes en cada capa de la epidermis. K, queratina. Adaptado de Alberts *et al.*, 1994.

3. LA PIEL Y LA EPIDERMIS.

La piel está constituida por dos tipos de tejidos: uno epitelial, cuyas células tienen origen ectodérmico, la epidermis, y un tejido conjuntivo subyacente, de células mesodérmicas denominado dermis, separados por una fina lámina basal (Fig. 2). La lámina basal está compuesta mayoritariamente por colágeno tipo IV, laminina, nidogen/entactina y proteoglicanos (Yurchenco y O'Rear 1994).

La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado compuesto principalmente por células epiteliales denominadas queratinocitos, aunque también están presentes, en pequeño número, otros tipos celulares como melanocitos, células de Langerhans (tipo macrófagos) y células de Merkel (asociadas a terminaciones nerviosas). Los queratinocitos se organizan en distintas capas dentro de la epidermis: capa basal, espinosa, granulosa y córnea (Fig. 2). Las células de la capa basal son las que están en contacto con la lámina basal, y las únicas células con capacidad de proliferar, entre las que se encuentran las células primordiales o células "stem". Por repetidas divisiones de estas células stem se originan células hijas que diferencian y migran hacia la superficie de la piel, hasta su desprendimiento, sufriendo cambios morfológicos y bioquímicos que en su conjunto reciben el nombre de diferenciación terminal (Fuchs, 1990; Fuchs y Byrne, 1994). Entre los cambios bioquímicos que sufren los queratinocitos durante la diferenciación terminal se encuentran cambios en la expresión de receptores de adhesión, como las cadherinas e integrinas y de proteínas estructurales como las citoqueratinas.

Las células de la capa basal expresan receptores de adhesión como la cadherina E (CD-E) y la cadherina P (CD-P) (Nose y Takeichi, 1986; Shimoyama *et al.*, 1989), integrinas de la subfamilia β_1 ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$) y $\alpha_6\beta_4$ (Tennenbaum *et al.*, 1992; Watt y Hertle, 1994) y queratinas K5 y K14 (Leube *et al.*, 1988). A medida que la célula va diferenciando se pierde la expresión de integrinas y de CD-P (restringidas sólo a la capa basal), manteniéndose la expresión de CD-E en los estratos espinoso y granular (Hirai *et al.*, 1989b; Adams y Watt, 1990, 1991). Asimismo, se producen cambios en la expresión de citoqueratinas, de manera que las células del estrato espinoso pierden la expresión de K5 y K14 y expresan K1 y K10 (Fuchs, 1990; Fuchs y Byrne, 1994). En las capas exteriores del estrato granuloso, y en el estrato córneo, se expresan involucrina, loricrina y filagrina, proteínas citoplásmicas que refuerzan la membrana plasmática y que se han empleado como marcadores de diferenciación terminal (Nicholson *et al.*, 1991; Bickenbach *et al.*, 1995). Los cambios morfológicos que sufren los queratinocitos son el aplanamiento de las células, la pérdida del núcleo y la formación de una estructura córnea que invade el citoplasma, cambios que ocurren en las últimas etapas del proceso de diferenciación. Así, las células de la capa córnea son células muertas reducidas a escamas rellenas de queratina.

Entre las uniones celulares que mantienen la morfología y las propiedades de elasticidad y resitencia de la epidermis, los hemidesmosomas se encuentran exclusivamente

en células de la capa basal, manteniendo contacto con la lámina basal, mientras que las uniones adherentes y los desmosomas se encuentran en todas las capas de la epidermis, aunque éstos últimos se localizan mayoritariamente en la capa espinosa (Garrod, 1993; Cowin y Burke, 1996).

4. LAS CADHERINAS.

4.1. Superfamilia de las cadherinas. Clasificación, características y estructura.

Las cadherinas constituyen una superfamilia de glicoproteínas transmembrana que en general median adhesión celular homotípica (por interacción con otra cadherina de igual tipo) dependiente de calcio, tanto en organismos vertebrados como invertebrados y en todos los tejidos sólidos del organismo (Takeichi, 1991, 1995). La primera cadherina fue identificada en 1977 en ratón (Kemler *et al.*, 1977) y se denominó uvomorulina. En los años 80 se descubrieron muchas otras en diversas especies con anticuerpos que bloqueaban la adhesión celular en ensayos de agregación dependientes de calcio y que pertenecían al grupo que se ha denominado de cadherinas clásicas (Bertolotti *et al.*, 1980; Yoshida y Takeichi, 1982; Hatta *et al.*, 1985; Nose y Takeichi, 1986; Nose *et al.*, 1987). En los últimos años se han identificado, por homología estructural y mediante técnicas de biología molecular, numerosos nuevos miembros de la familia, para algunos de los cuales aún no se ha demostrado una función en adhesión celular, pudiendo incluso tener otras funciones biológicas (Hoffmann y Balling, 1995; Thomson *et al.*, 1995; Tashiro *et al.*, 1995; Franklin y Sargent, 1996; Lee, 1996; Sugimoto *et al.*, 1996).

Todas las cadherinas identificadas hasta la fecha, con la excepción de la cadherina T (anclada a la membrana por fosfatidilinositol, Vestal y Ranscht, 1992) son proteínas integrales de membrana tipo I organizadas en una región extracelular, una región hidrofóbica que atraviesa la membrana una única vez y un dominio citoplásmico. La región extracelular contiene dominios repetidos denominados EC, cada uno de los cuales contiene 1-2 sitios de unión a calcio. En general la porción intracelular se ancla con el citoesqueleto a través de proteínas citoplásmicas (cateninas) (Gumbiner, 1996).

Las cadherinas se han clasificado, según características funcionales y homología de secuencia, en tres grandes subfamilias: protocadherinas, cadherinas desmosomales y cadherinas clásicas (Marrs y Nelson, 1996; Suzuki, 1996). Además, el proto-oncogen c-ret, codifica para una molécula tipo cadherina, pero con función tirosina quinasa en su dominio citoplásmico (Scheider, 1992; Iwamoto *et al.*, 1993).

Las protocadherinas o cadherinas tipo *fat* son una familia heterogénea de moléculas identificadas en *Drosophila* por primera vez como moléculas que controlaban negativamente el crecimiento del epitelio de los discos imaginales, por lo que se les ha otorgado un papel como genes supresores de tumores (Mahoney *et al.*, 1991; Sano *et al.*, 1993; Suzuki, 1996).

Contienen dominios EC en su porción extracelular, mientras que la porción citoplásmica carece de homología con los otros tipos de cadherinas y no se ha encontrado hasta la fecha interacción con proteínas citoplásmicas.

Las desmogleínas y desmocollinas, con secuencias de homología con las cadherinas clásicas en la región extracelular, constituyen la subfamilia de cadherinas desmosomales, y se encuentran localizadas en los desmosomas (Koch *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1991; Buxton *et al.*, 1993). Cada una de ellas presenta diferentes isoformas con especificidad tisular y un patrón de expresión específico dentro de las distintas capas de la epidermis (Arnemann *et al.*, 1993; Legan *et al.*, 1994). Las cadherinas desmosomales forman interacciones por su porción extracelular (Chitaev y Troyanovsky, 1997), mientras que por su dominio citoplásmico interactúan con la plakoglobina, al igual que las cadherinas clásicas (Troyanovsky *et al.*, 1994; Kowalczyk *et al.*, 1994).

Las cadherinas clásicas comprenden una gran familia de genes (Kemler 1992), de los que actualmente se conocen más de 40 miembros entre los que se encuentran los primeros miembros de la superfamilia identificados, cadherinas E, P y N (Kemler *et al.*, 1977; Takeichi 1977; Hyafil *et al.*, 1981; Hatta *et al.*, 1985; Peyrieras *et al.*, 1985; Nose y Takeichi, 1986; Schuh *et al.*, 1986; Shirayoshi *et al.*, 1986a; Nose *et al.*, 1987; Ringwald *et al.*, 1987). Presentan entre sí una alta homología: el dominio extracelular muestra un 30-60% de homología de secuencia entre las diferentes cadherinas, mientras que la homología del dominio citoplásmico puede alcanzar el 90% dentro de la misma especie y hasta un 60% entre cadherinas de mamíferos y *Drosophila* (Takeichi, 1988; Kemler, 1992; Oda *et al.*, 1994a). Las cadherinas clásicas regulan la adhesión célula-célula dependiente de calcio en las uniones adherentes y también en lugares donde no existe una organización ultraestructural (Boller *et al.*, 1985).

Se sintetizan inicialmente como precursores largos que se procesan a formas maduras de 120-130 KDa. El dominio extracelular de las cadherinas clásicas posee cinco dominios EC, en los que aparecen motivos repetidos formados por 3-5 aminoácidos (Fig. 3). En general, en el dominio EC1 aparece la secuencia aminoacídica HAV que determina la especificidad de unión homotípica (Blaschuk *et al.*, 1990; Nose *et al.*, 1990). En las zonas limítrofes entre los dominios EC se han descrito varios dominios de interacción con calcio (Ringwald *et al.*, 1987; Kemler *et al.*, 1989; Ozawa *et al.*, 1990). La región extracelular sufre N-glicosilación en varios sitios, en posición y número variable entre las distintas cadherinas, pero, al menos en la CD-E, estas modificaciones no parecen ser indispensables para su funcionalidad (Shirayoshi *et al.*, 1986b). Cerca del dominio transmembrana hay 4 cisteínas, en posiciones muy conservadas entre las distintas cadherinas.

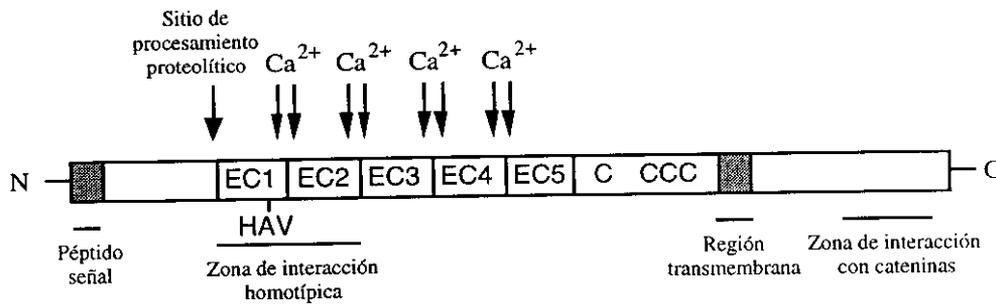


Fig. 3. Estructura consenso de las cadherinas clásicas. Por procesamiento proteolítico del propéptido se origina la proteína madura compuesta de un dominio transmembrana delimitado por una región extracelular y otra intracelular. La región extracelular comprende 5 regiones repetidas con zonas de unión a calcio y 4 cisteínas muy conservadas. La región HAV, en el dominio EC1, interviene en la interacción homotípica entre cadherinas. La zona intracelular, altamente conservada, presenta una zona de 31 aminoácidos de unión a cateninas.

Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional del dominio EC1 de las cadherinas clásicas E y N por resonancia magnética nuclear (Overduin *et al.*, 1995) y por cristalografía de rayos X (Shapiro *et al.*, 1995), respectivamente. A pesar de existir ciertas discrepancias entre ambos estudios, se apunta a una organización en dímeros de las moléculas de cadherinas. Estudios más recientes de estructura cristalina muestran que tres iones calcio se incorporan a la molécula de cadherina entre los dominios EC1 y EC2 obligando a la molécula a adquirir cierta estructura tridimensional rígida (Nagar *et al.*, 1996). En conjunto, se cree que la región extracelular forma dímeros sencillos que al unirse con otro dímero en la membrana de la célula adyacente forma dímeros de adhesión, que podrían asociarse en forma lineal, como una cremallera que une dos membranas de células adyacentes, o bien como oligómeros en forma de cilindros (Pokutta *et al.*, 1994).

4.2. Complejos cadherinas-cateninas.

El dominio intracelular de las cadherinas clásicas, a las que nos referiremos de ahora en adelante, es indispensable para su función adhesiva (Nagafuchi y Takeichi, 1988; Kintner, 1992) y se ancla con el citoesqueleto de actina a través de proteínas intracelulares llamadas cateninas, entre las que se encuentran α -catenina, β -catenina y γ -catenina (plakoglobina) (Ozawa *et al.*, 1989; Kemler, 1993; Aberle *et al.*, 1996). Además, la proteína p120, que es un sustrato de la tirosina quinasa src, se une al complejo de las cadherinas y se ha sugerido que puede representar otra catenina (Reynolds *et al.*, 1994).

La α -catenina presenta homología de secuencia con la vinculina e interacciona directa o indirectamente a través de α -actinina con el citoesqueleto de actina (Rimm *et al.*, 1995; Knudsen *et al.*, 1995). Se han descrito al menos dos isoformas de α -catenina: α E-catenina, específica de epitelios y α N-catenina, de tejido nervioso (Herrenknecht *et al.*, 1991; Nagafuchi *et al.*, 1991; Hirano *et al.*, 1992).

La β -catenina y la plakoglobina pertenecen a la familia de proteínas tipo armadillo, por tener secuencias repetidas (secuencias arm) homólogas a las que existen en el gen de polaridad segmental *armadillo* de *Drosophila* (Butz *et al.*, 1992; Peifer *et al.*, 1992).

Las cadherinas interaccionan, de forma independiente, con β -catenina o con plakoglobina, y éstas a su vez, interaccionan con la α -catenina, que se une al citoesqueleto de actina, por lo que existen al menos dos tipos de complejos cadherinas/cateninas (Butz y Kemler, 1994; Hinck *et al.*, 1994)

Recientemente se ha demostrado que las cateninas también interaccionan con otras proteínas citoplásmicas o transmembrana. Así, tanto plakoglobina como β -catenina interaccionan con la tirosina quinasa c-erbB2 (Kanai *et al.*, 1995) y con la proteína supresora de tumores "Adenomatous Polyposis Coli" (APC) (Su *et al.*, 1993; Rubinfeld *et al.*, 1993). La interacción de β -catenina o plakoglobina con APC es excluyente de su interacción con la cadherina, de forma que APC compite con la cadherina por su unión a las cateninas (Hülsken *et al.*, 1994). Además se ha descrito que la β -catenina se asocia con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (Hoschuetzky *et al.*, 1994) y con la proteína de uniones estrechas ZO-1 (Rajasekaran *et al.*, 1996).

4.3. Importancia biológica de las cadherinas clásicas.

4.3.1. Papel morforregulador de las cadherinas.

Las cadherinas clásicas, además de regular el reconocimiento físico y la adhesión entre células, realizan funciones especializadas que les permiten actuar como moléculas morforreguladoras durante la embriogénesis y la diferenciación, haciendo de ellas moléculas indispensables en el mantenimiento de la arquitectura tisular y de la homeostasis del organismo adulto (Takeichi, 1991; Cunningham, 1995; Takeichi, 1995; Gumbiner, 1996; Marrs y Nelson, 1996).

La participación de las cadherinas en la morfogénesis se planteó inicialmente por la existencia de procesos de adhesión selectiva: fibroblastos transfectados con distintas cadherinas tendían a adherirse con células que expresaban igual tipo de cadherina (Nose *et al.*, 1988); y se comprobó mediante el uso de anticuerpos bloqueantes de su función y el análisis de los efectos en desarrollo o en cultivo de órganos (Takeichi, 1988; Hirai *et al.*, 1989a y 1989b). Recientemente se ha mostrado, mediante el empleo de células embrionarias stem, que cadherinas específicas pueden estimular la formación de tejidos específicos (CD-E epitelio y CD-N cartílago y neuroepitelio), lo que apoya la idea de la participación de las cadherinas en la histogénesis (Larue *et al.*, 1996).

La función de las cadherinas en el mantenimiento de la estructura tisular y la homeostasis es particularmente evidente en el caso de los tejidos epiteliales. Las células epiteliales presentan un alto grado de polarización, y la CD-E es la principal molécula que

controla la polaridad de las mismas, pudiendo inducir la redistribución de la Na⁺,K⁺-ATPasa en las regiones de contacto célula-célula, mediada por la reorganización del citoesqueleto (McNeill *et al.*, 1990; Marrs *et al.*, 1995). Así, el bloqueo de la función de CD-E *in vitro* con anticuerpos específicos induce la pérdida de la polaridad celular y de la formación de uniones epiteliales (Imhof, *et al.*, 1983; Behrens *et al.*, 1985; Gumbiner, 1990). Por otro lado, la expresión de cadherinas en fibroblastos, origina una transformación hacia un fenotipo epitelioide, con crecimiento de las células en colonias en vez de en células aisladas y reorganización del citoesqueleto de actina (Edelman *et al.*, 1987; Nagafuchi *et al.*, 1987).

Asimismo, la CD-E es necesaria para el control de la diferenciación de los queratinocitos y para la organización correcta de las distintas capas celulares de la epidermis, como ponen de manifiesto experimentos en los que se altera la diferenciación de queratinocitos o piel en cultivo por el uso de anticuerpos bloqueantes o dominantes negativos anti-cadherinas (Hirai *et al.*, 1989b; Wheelock y Jensen, 1992; Hodivala y Watt, 1994; Amagai *et al.*, 1995; Zhu y Watt, 1996).

Por otro lado, el papel de las cadherinas en tejidos adultos se ha podido comprobar también mediante el empleo de ratones transgénicos, en los que se dirige la expresión de cadherinas o dominantes negativos de cadherinas a ciertos tejidos (Dahl *et al.*, 1996; Hermiston y Gordon, 1995a, 1995b; Hermiston *et al.*, 1996). Así, la sobreexpresión de CD-E en enterocitos, induce un descenso en el movimiento y proliferación celular, así como la inducción de apoptosis (Hermiston *et al.*, 1996). Estos experimentos sugieren la existencia de un nexo entre los procesos de adhesión celular, señalización y apoptosis.

Las cadherinas, además de tener un papel morforregulador en el organismo adulto, desempeñan un papel morfogénico fundamental durante el desarrollo embrionario. La expresión de distintas cadherinas en poblaciones de células separadas, gracias a sus propiedades de adhesión selectiva, hace que las células discriminen entre sí y que segreguen en distintas capas durante el desarrollo (Takeichi, 1988; Takeichi, 1991; Huber *et al.*, 1996a; Takeichi, 1995; Marrs y Nelson, 1996).

Las cadherinas tienen un patrón de expresión definido durante el desarrollo embrionario, que apoya la idea de su papel como moléculas morforreguladoras. En concreto, la expresión de CD-E (primero materna y después embrionaria) se observa en todos los estadios del embrión de ratón. En un principio, la CD-E aparece dispersa por la superficie del oocito. En el estadio de 8-16 células, cuando se produce la compactación y polarización celular de los blastómeros, la CD-E se distribuye y localiza en los contactos celulares (Hyafil *et al.*, 1980). Posteriormente, durante el desarrollo, la CD-E se localiza principalmente en células epiteliales, de origen ecto o endodérmico. El primer tipo celular que es negativo para CD-E es el mesodermo, que se forma en el estadio de la gastrulación. Los derivados mesodérmicos permanecen negativos para CD-E, pero ésta se reexpresa en células que sufren procesos de transición mesénquima-epitelio (Takeichi, 1988). La CD-E también se

expresa en el cerebro embrionario de ratón, en un conjunto de neuronas sensoriales y en las uniones adherentes autotípicas de las células de Schwann (Shimamura y Takeichi, 1992; Fannon *et al.*, 1995; Redies y Takeichi, 1996).

Experimentos de microinyección en *Xenopus* de mRNAs de formas truncadas de cadherinas que actúan como dominantes negativos, y que perturban la integridad de las estructuras embrionarias confirman el papel de las cadherinas en la morfogénesis (Fujimori *et al.*, 1990; Kintner, 1992; revisado en Huber *et al.*, 1996a).

Asimismo, recientemente se han realizado experimentos de pérdida de función de cadherinas, con ratones "knock-out" y con mutantes en *Drosophila*.

Los ratones en los que se ha eliminado el gen de la CD-E mediante técnicas de knock-out son letales embrionarios (Larue *et al.*, 1994; Riethmacher *et al.*, 1995). Los embriones se desarrollan normalmente hasta el estadio de 8 células, siendo capaces de compactarse en el estadio de mórula, probablemente por la existencia de CD-E materna, pero posteriormente el embrión es incapaz de implantarse y de formar el blastocisto (primera monocapa epitelial del embrión) correctamente.

En *Drosophila*, la cadherina-DE (gen *shotgun*) es la homóloga en vertebrados de la CD-E. Mutantes nulos de la cadherina-DE no muestran en general defectos severos en la organización epitelial, debido a la existencia de cadherina materna. Sin embargo, sí se ve alterada la formación de epitelios que requiere grandes remodelaciones morfogénicas (como los túbulos de Malpigio o los conductos de la tráquea). La ausencia total de expresión de cadherina-DE, embrionaria y materna, impide la formación de todos los epitelios (Uemura *et al.*, 1996; Tepass *et al.*, 1996; Knust y Leptin, 1996).

4.3.2. Papel de las cadherinas en la señalización celular.

La variedad de funciones en las que intervienen las cadherinas hace pensar que además de mediar adhesión celular, también puedan participar en rutas de señalización intracelular, que desencadenen las respuestas fenotípicas.

La homología de la β -catenina y la plakoglobina con la proteína de polaridad segmental *armadillo* de *Drosophila*, que participa en la ruta señalización de Wingless durante la embriogénesis, hizo pensar que la β -catenina pudiera participar en la ruta de señalización de Wnt, homólogo a Wingless en organismos superiores. Wnt y su homólogo Wingless son proteínas secretadas que interaccionan con receptores de membrana, iniciando una cascada que desemboca en la generación de una respuesta, implicada en la polaridad segmental en *Drosophila* y en el patrón dorso-ventral en *Xenopus* (Klingensmith y Nusse, 1994; Moon, 1993).

La idea de la participación de la β -catenina en esta vía surgió porque la inyección en oocitos de *Xenopus* de mRNA de β -catenina era capaz de inducir duplicación del eje axial, al igual que ocurría con la inyección de algunos miembros de la familia Wnt (Funayama *et al.*, 1995). Investigaciones recientes han aportado nuevos datos sobre el mecanismo por el cual

la β -catenina podría participar en esta ruta. Se cree que la transmisión de la señal Wnt, mediante la inhibición de una quinasa citoplásmica, tiene como efecto un aumento de la cantidad de β -catenina libre en el citoplasma (Peifer *et al.*, 1994; Yost *et al.*, 1996; Papkoff *et al.*, 1996). Estudios recientes basados en la técnica del doble híbrido han mostrado que la β -catenina interacciona con el factor de transcripción LEF-1 (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996b) del tipo HMG (Travis *et al.*, 1991). Estudios de sobreexpresión en diferentes sistemas indican que la unión de LEF-1 a β -catenina es suficiente para su translocación nuclear, e igual sucede para XTcf-3, el homólogo en *Xenopus* de LEF-1 (Molenaar *et al.*, 1996). Asimismo, se ha demostrado la formación de un complejo ternario formado por LEF-1, β -catenina y DNA conteniendo la secuencia consenso para LEF-1 (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que la interacción de β -catenina citoplásmica con el factor LEF-1 y su translocación al núcleo modifica las propiedades transcripcionales de LEF-1, originando la respuesta a la señal. En apoyo de este modelo está el hecho de que la sobreexpresión de LEF-1 en embriones de *Xenopus* provoca también la duplicación del eje embrionario (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996b; revisado en Kühl y Wedlich, 1997).

El papel que las cadherinas desempeñarían en este modelo sería el de secuestrar a la β -catenina, impidiéndola interaccionar con el factor LEF-1 o TCF y realizar su función señalizadora (Fagotto *et al.*, 1996). Por otra parte, la función señalizadora de β -catenina es modulada por APC, que interacciona con ella y dirige su degradación proteolítica (Munemitsu *et al.*, 1995; Rubinfeld *et al.*, 1996). En este sentido, es interesante mencionar que recientemente se ha encontrado actividad transcripcional constitutiva del complejo β -catenina/TCF-4 en células de carcinomas colorrectales con mutaciones en APC o en β -catenina que impiden su degradación (Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997).

4.3.3. Papel de las cadherinas en procesos tumorales, invasión y metástasis.

Las cadherinas son moléculas imprescindibles para el mantenimiento de la arquitectura epitelial de un tejido y, en condiciones normales, las células epiteliales permanecen fuertemente unidas entre sí gracias a estas moléculas. Sin embargo, durante la transformación tumoral la asociación intercelular se desorganiza, las células pierden adhesividad y pueden separarse fácilmente unas de otras. Este hecho favorece la invasión de los tejidos que rodean al tumor.

Experimentos *in vitro*, empleando diversos modelos experimentales, ponen de manifiesto el papel anti-invasivo de las cadherinas, especialmente de la CD-E. Así, la pérdida de expresión de CD-E o el bloqueo de su actividad funcional confiere a las células epiteliales una mayor capacidad invasiva, mientras que la reexpresión de la CD-E en células tumorales deficientes en esta molécula es capaz de inhibir su capacidad invasiva (Behrens *et al.*, 1989; Frixen *et al.*, 1991; Vleminckx *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1992). Por otra parte, la reexpresión de CD-E en células tumorales es capaz de revertir parcialmente el fenotipo

tumoral en algunos tipos celulares (Navarro *et al.*, 1991), mientras que en otros puede hacer disminuir su capacidad metastásica (Mbalaviele *et al.*, 1996). Por todos estos datos se ha sugerido que la CD-E puede ser un potencial gen supresor de tumores.

Análisis *in vivo* confirman que muchos carcinomas (tumores epiteliales) que expresan niveles bajos de cadherinas tienden a ser más invasivos. En general se observa una correlación directa entre la presencia de CD-E y el grado de diferenciación del tumor o línea celular, e inversa entre la CD-E y las propiedades invasivas y metastásicas (Umbas *et al.*, 1992; Brabant *et al.*, 1993; Gamallo *et al.*, 1993; Pizarro *et al.*, 1994; Umbas *et al.*, 1994; revisado en Takeichi, 1993 y en Birchmeier y Behrens, 1994).

En muchas células tumorales, a pesar de existir altos niveles de cadherinas, la función mediada por ellas es baja, debido a otras alteraciones que impiden su función como mutaciones en las cadherinas, observado en carcinomas gástricos (Becker *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1994b), de ovario (Risinger *et al.*, 1994) y de mama (Berx *et al.*, 1995a); deficiencias en α -catenina (Hirano *et al.*, 1992; Breen *et al.*, 1993; Shimoyama *et al.*, 1992; Watabe *et al.*, 1994; Ewing *et al.*, 1995), en β -catenina (Oyama *et al.*, 1994; Kawanishi *et al.*, 1995) o en plakoglobina (Sommers *et al.*, 1994), o bien por modulaciones del complejo cadherina/cateninas mediada por determinados factores (factores de crecimiento, activación de tirosina quinasas, etc). Así, productos de oncogenes como src, ras, fos y met pueden desestabilizar las uniones intercelulares; src y los receptores de EGF y de HGF fosforilan a la β -catenina en residuos de tirosina, lo que lleva a la disociación de los complejos adherentes, modulando así las propiedades adhesivas de las células (Matsuyoshi *et al.*, 1992; Reichmann *et al.*, 1992; Behrens *et al.*, 1993; Hamaguchi *et al.*, 1993; Shibamoto *et al.*, 1994). Este último tipo de regulación puede ser transitorio en algunas etapas del proceso neoplásico, como se ha sugerido durante el proceso de invasión (Takeichi, 1993).

Por otro lado, se ha sugerido que los complejos adherentes cadherina-cateninas funcionales pueden controlar de forma negativa la velocidad de crecimiento celular (Watabe *et al.*, 1994; Zhu y Watt, 1996). Otro mecanismo propuesto por el que las cadherinas podrían influir en el comportamiento invasivo y metastásico de las células tumorales es controlando la actividad de proteasas de la matriz extracelular. Así, se ha observado que la CD-E puede contribuir a la localización del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en los contactos celulares (Jensen y Wheelock, 1992) y que el tratamiento de células de carcinoma que expresan CD-E con un anticuerpo bloqueante anti-CD-E induce un aumento en la secreción de uPA al medio extracelular relacionado con un comportamiento más invasivo (Frixen y Nagamine, 1993). En este sentido, la transfección en una línea de carcinoma de colon con el cDNA de CD-E, además de disminuir su capacidad invasiva, indujo un descenso en la secreción al medio extracelular de la metaloproteinasas MMP-2 (Miyaki *et al.*, 1995).

5. INVASIÓN Y METÁSTASIS: PAPEL DE PROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

La metástasis es la etapa de la progresión tumoral más amenazante para la supervivencia. Actualmente está bien establecido que el desarrollo tumoral y el comportamiento metastásico están bajo controles genéticos independientes, aunque muchas veces relacionados entre sí. La generación de la metástasis es un proceso complejo que abarca diferentes etapas secuenciales: invasión local de las células del tumor primario en el tejido adyacente; acceso a la circulación sanguínea o linfática; extravasación en un órgano distante; y colonización y proliferación de las células dicho órgano. El proceso de invasividad local es, por tanto, indispensable para el desarrollo de la metástasis, y según Liotta consta básicamente de tres etapas: alteración de procesos de adhesión celular (pérdida de adhesión intercelular y adhesión de las células tumorales a la membrana basal), degradación de la membrana basal y migración celular (Liotta *et al.*, 1983; Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Así, la degradación de la membrana basal que rodea los epitelios y del tejido conectivo subyacente es indispensable para la invasión y la metástasis, y es consecuencia de las actividades proteolíticas de diversos sistemas que degradan diferentes componentes de la matriz extracelular.

Destacan cuatro tipos de actividades proteolíticas implicadas en la degradación de la matriz extracelular: serín-proteasas (plasmina y activadores del plasminógeno tipo uroquinasa, uPA, y tisular, tPA), cisteinil-proteasas (catepsinas B, C, H y L), aspartil-proteasas (catepsina D) y metaloproteasas de matriz (MMPs). Los estudios de los últimos años han puesto de manifiesto que las serín-proteasas (uPA) y las MMPs desempeñan un papel primordial en el proceso de invasión en una gran variedad de carcinomas (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Andreasen *et al.*, 1997).

La mayoría de estas proteasas que participan en la degradación de la membrana basal se secretan en forma de precursores inactivos (zimógenos), siendo activados en el medio extracelular por diversos mecanismos que implican proteólisis. Además, la actividad de las diferentes proteasas depende del balance entre ellas y sus inhibidores específicos (TIMPs y serpinas). Por otro lado, la degradación de la MEC se realiza de forma focalizada en las zonas de invasión debido, principalmente, a la existencia de receptores de las proteasas en la superficie celular (Basbaum y Werb, 1996).

Las MMPs constituyen una amplia familia de endopeptidasas dependientes de zinc (o calcio), con bajos niveles de expresión en tejidos adultos, pero cuya expresión aumenta en procesos normales o patológicos de remodelación de tejidos (desarrollo embrionario, reparación de tejidos, ciclo menstrual, inflamación, invasión tumoral y metástasis) (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1993; Birkedal-Hansen, 1995). En función de sus características

estructurales, localización celular y especificidad de sustrato se han clasificado en cuatro subfamilias, reflejadas en la Tabla I.

Las MMPs forman generalmente complejos no covalentes con sus inhibidores, los TIMPs (inhibidores tisulares de MMPs). Hasta la fecha se han identificado 4 miembros (TIMP-1, -2, -3 y -4). TIMP-1 y TIMP-2 actúan específicamente sobre las colagenasas MMP-9 (o gelatinasa B) y MMP-2 (o gelatinasa A), respectivamente (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Las MMPs se secretan en forma inactiva y se activan en el entorno extracelular por proteólisis (Birkedal-Hansen, 1995). Se ha demostrado que la MMP-3 es capaz de activar la proMMP-9 *in vitro* (Ogata *et al.*, 1992). En el caso de la MMP-2, la activación se realiza en la membrana plasmática por interacción con la proteasa de membrana MT-1 MMP, formando un complejo ternario con TIMP-2 (Sato *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1995; Strongin *et al.*, 1995). El uPA también puede actuar activando a varias pro-MMPs (Mazzieri *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha observado que la integrina $\alpha v \beta 3$ (receptor de vitronectina) puede actuar como receptor y activar la MMP-2 en células de melanoma (Brooks *et al.*, 1996).

La expresión de MMPs está controlada por factores que estimulan (IL-1, TNF- α , TGF- α , EGF, FGF y PDGF) o inhiben (TGF- β , IL-4, ácido retinoico, progesterona, glucocorticoides, etc.) su transcripción (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Birkedal-Hansen, 1995). El éster de forbol TPA también puede estimular la expresión de varias MMPs, probablemente por inducción del factor de transcripción AP1 (jun y fos) que actuaría sobre los sitios de unión que existen en los promotores de MMPs como colagenasas o estromelisin (Gutman y Wasyluk, 1990; Matrisian, 1990; Pendas *et al.*, 1997). La EMMPRIN ("Extracelular Matrix Metaloproteinase Inductor"), también llamada basigina, es una proteína transmembrana de la familia de las moléculas de adhesión de las inmunoglobulinas liberada por las células tumorales que induce la expresión de varias MMPs en los fibroblastos del estroma (Biswass *et al.*, 1995). La luz UV también es un potente inductor de la expresión de colagenasa de la dermis *in vivo* (Fisher *et al.*, 1996).

El análisis de la expresión de diferentes metaloproteasas en una variedad de carcinomas ha mostrado la existencia de una fuerte correlación entre la sobreexpresión de algunos miembros y el carácter invasivo los carcinomas (Basset *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1992; Freije *et al.*, 1994; Canete-Soler *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1994; Witty *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1996). Asimismo inhibidores sintéticos de MMPs bloquean el crecimiento tumoral en modelos animales (Wang *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1995). Estos datos, junto con estudios en modelos celulares y experimentales de las MMPs y sus inhibidores (DeClerk *et al.*, 1992; Khokha, 1994) apoyan firmemente su papel activo durante el proceso invasivo.

En concreto, la MMP-9 es producida por varios tipos de células tumorales (Wilhem *et al.*, 1989; Juarez *et al.*, 1991), relacionándose niveles elevados de MMP-9 con una mayor capacidad metastásica (Yamagata *et al.*, 1988; Nakajima *et al.*, 1993; Bernhard *et al.*, 1994;

Tabla I. Clasificación de las principales MMPs y sustratos prioritarios que degradan.

Nombre	Sustratos
Colagenasas intersticiales	
Colagenasa 1 (MMP-1)	Col I, II, III, VII, VIII, X
Colagenasa 3 (MMP-13)	Col I, II, III, IV, FN
MMP-8	?
Estromelisininas	
Estromelisinina 1 (MMP-3)	PG, FN, LN, EL, Col IV, V, IX, X
Estromelisinina 2 (MMP-10)	"
Estromelisinina 3 (MMP-11)	?
Matrilisina (Pump-1, MMP-7)	FN, LN, Col IV, PG
Metaloelastasa (MMP-12)	EL
Gelatinasas/Colagenasas	
Colagenasa IV-A (MMP-2)	Col desnaturalizados, Col IV, V, VII, X, EL, FN
Colagenasa IV-B (MMP-9)	"
MMPs ancladas a membrana (MT-MMPs)	
MT-1 MMP (MMP-14)	Progelatinasa IV-A, colagenasa 3
MT-2 MMP (MMP-15)	?
MT-3 MMP (MMP-16)	?
MT-4 MMP (MMP-17)	?

Todas las MMPs indicadas son secretadas, excepto el grupo de MT-MMPs, que son transmembrana. Abreviaturas: Col, colágeno(s); I-X, tipo de colágeno; PG, proteoglicanos; FN, fibronectina; LN, laminina; EL, elastina.

MacDougall *et al.*, 1995). Por otro lado, la transformación de fibroblastos embrionarios de rata o de fibroblastos NIH3T3 con Ha-ras induce la secreción de colagenasa tipo IV (Garbisa *et al.*, 1987; Ballin *et al.*, 1988; Bernhard *et al.*, 1994).

La MMP-9, a pesar de expresarse en muchos tipos celulares en cultivo, parece estar limitada en condiciones normales esencialmente a células osteoclasticas durante el desarrollo de ratón (Reponen *et al.*, 1994), mientras que en el organismo adulto se ha encontrado en células estromales en el endometrio humano durante ciertas etapas del ciclo menstrual (Rodgers *et al.*, 1994) y en neutrófilos, monocitos y macrófagos (Wilhem *et al.*, 1989).

El sistema uPA también está implicado en la degradación de la matriz extracelular y en los procesos de invasión tumoral. Los activadores del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y tipo tisular (tPA) actúan sobre el plasminógeno inactivo para convertirlo mediante proteólisis en plasmina activa. La plasmina es una proteasa de amplia especificidad de sustrato, que además de participar en la trombolisis, es capaz de degradar muchas proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina y fibrina. También puede catalizar la activación de formas zimógenas de varias MMPs (Mazzieri *et al.*, 1997), que a su vez degradan la membrana basal. Se cree que, mientras que el tPA participa principalmente en la trombolisis, el uPA juega un papel principal en degradación de la matriz extracelular, por lo que el uPA ha sido más estudiado en su relación con el cáncer y la metástasis (revisado en Andreasen *et al.*, 1997).

Muchos sistemas modelo *in vitro* han aportado evidencias sobre el papel del uPA en migración celular e invasión, así como evidencias de su papel causal en procesos metastásicos. Estas evidencias experimentales están apoyadas por el hecho de que en muchos cánceres humanos de mal pronóstico se han encontrado niveles elevados de uPA, de su inhibidor PAI-1 y del receptor de uPA (Blasi, 1993; Andreasen *et al.*, 1997; Scmitt *et al.*, 1997).

6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN SISTEMAS EPITELIALES. EL PROMOTOR DE CD-E.

6.1. Regulación de la expresión de CD-E.

El patrón de expresión espacial y temporal tan complejo de las cadherinas en el organismo, hace necesaria la existencia de mecanismos reguladores de la expresión de las mismas, también complejos y precisos. Además, por su implicación en procesos tumorales es importante conocer sus mecanismos de regulación. Hasta el momento, tan solo se conoce información fragmentaria sobre tales mecanismos. En concreto, nos centraremos en el estudio de los factores que controlan la expresión de la CD-E, ya que ésta juega un papel fundamental en el desarrollo, con un patrón concreto de expresión, y está alterada en un gran número de carcinomas.

Son múltiples los factores que pueden alterar la expresión de los genes de cadherinas, observándose en ocasiones efectos diferentes según el tipo celular analizado. Varios oncogenes pueden inducir desdiferenciación epitelial inhibiendo la expresión de CD-E. Así, células epiteliales transformadas con oncogenes como *ras* pierden la CD-E (Behrens *et al.*, 1989; Vleminckx *et al.*, 1991). La sobreexpresión prolongada del oncogen *fos* en una línea epitelial de mama induce asimismo su desdiferenciación junto con pérdida de CD-E y de otros marcadores epiteliales, a la vez que se adquieren marcadores mesenquimales (Reichmann *et al.*, 1992), mientras que la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa c-erbB2 en células epiteliales de mama inhibe la transcripción del gen de CD-E (D'Souza y Taylor-Papadimitriou, 1994). Por otra parte, se ha descrito que la expresión del gen E1a en una línea celular de rhabdomyosarcoma humano induce morfología epitelioide y la expresión de marcadores epiteliales como CD-E (Frisch 1994).

En algunos tipos celulares la expresión de CD-E puede estar controlada hormonalmente. Así, el estradiol regula positivamente los niveles de CD-E en células de granulosa de rata (Blaschuk y Farookhi, 1989), en el ovario de rata (MacCalman *et al.*, 1994) y en una línea humana de próstata (Carruba *et al.*, 1995), mientras que en células de carcinoma de endometrio bien diferenciadas reprime su expresión (Fujimoto *et al.*, 1996).

Otros estudios sugieren que el receptor de EGF (Sorscher *et al.*, 1995), el ácido retinoico (Anzano *et al.*, 1994), el ácido γ -linoleico (Jiang *et al.*, 1995) y la proteína Tax del virus de inmunodeficiencia humano tipo I (HTLV-1) (Kitajima *et al.*, 1996) regulan positivamente la CD-E; mientras que el HGF (Tannapfel *et al.*, 1994) y el TPA (Fabre y García de Herreros, 1993; Brabant *et al.*, 1995) lo hacen negativamente. Por otro lado, en la línea de carcinoma de mama MCF-7 el tratamiento con AMPc aumenta los niveles de CD-E (Revillion *et al.*, 1993), y en tirocitos en cultivo los niveles de mRNA de CD-E aumentan tras el tratamiento con TSH y forskolina, que actúan regulando positivamente la vía del AMPc (Brabant *et al.*, 1995).

El estudio de las regiones promotoras de los genes de cadherinas, que se analizará con más detalle en el Apartado 6.2, constituye otro tipo de abordaje experimental para la caracterización de factores que controlan su expresión. Sin embargo, son los estudios funcionales *in vivo* los que aportan datos más informativos sobre el control de la expresión de las cadherinas, especialmente en el desarrollo, aunque hasta ahora son escasos los trabajos de este tipo. Experimentos de "knock-out" del gen Wnt-1 en ratón indican que en la línea media dorsal del cerebro fetal, Wnt-1 suprime la expresión de CD-E, manteniendo la de α N-catenina (Shimamura *et al.*, 1994). Por otro lado, en *Drosophila*, el factor de transcripción de tipo dedo de zinc Escargot, relacionado con la familia de genes de *snail*, induce la expresión de DE-cadherina al menos en un tipo de células que formarán la tráquea, y probablemente en más tipos celulares (Tanaka-Matakatsu *et al.*, 1996).

6.2. Caracterización de regiones reguladoras del gen de CD-E.

El control de la transcripción del gen de CD-E, tanto murino como humano, ha sido objeto recientemente de varios estudios que se han centrado principalmente en la caracterización de zonas reguladoras situadas en la región 5' o en intrones del gen. Previamente se había localizado el gen de CD-E de ratón en el extremo distal del cromosoma 8 (Eistetter *et al.*, 1988), en una región sinténica al cromosoma 16q humano (16q.22.1), donde se había localizado el gen homólogo humano (Mansouri *et al.*, 1988). Curiosamente el gen de CD-P está localizado en el mismo cromosoma que el de la CD-E (Hatta *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1994b), lo que podría sugerir que compartieran algún tipo de regulación. Los genes de CD-E de ratón (Ringwald *et al.*, 1991), humano (Berx *et al.*, 1995b) y de pollo (L-CAM) (Sorkin *et al.*, 1988) están organizados en 16 exones, distribuidos en una amplia región genómica (más de 40 Kb en ratón y más de 100 Kb en humano), con una estructura intrón/exón muy conservada entre sí, y que no se corresponde estrictamente con dominios estructurales o funcionales definidos de la proteína. En todos los casos el segundo intrón es mucho mayor que el resto (al menos 12 Kb en ratón y 65 Kb en humano).

En 1991 aparecieron los primeros estudios de caracterización de la región promotora de CD-E de ratón, realizados por los grupos de Kemler y Birchmeier (Ringwald *et al.*, 1991; Behrens *et al.*, 1991). El promotor de CD-E de ratón carece de caja TATA y en el sitio de inicio de la transcripción, situado 127 bp en dirección 5' respecto del sitio de inicio de la traducción, se encuentra una secuencia consenso iniciadora. Toda la región situada en 5' respecto a la región transcrita es en general una zona rica en GC, que asemeja a las islas CpG, típicas de genes "housekeeping". Estudios funcionales con distintos fragmentos de la región promotora del gen de CD-E han mostrado que un fragmento que incluye hasta la posición -178 respecto del sitio de inicio de la transcripción (-178 a +92) posee actividad específica epitelial, ya que este fragmento es activo en células epiteliales que expresan CD-E, pero no lo es en células no epiteliales (fibroblastos y células de músculo liso) o en células de carcinoma poco diferenciado que no expresan CD-E (Behrens *et al.*, 1991). Este fragmento del promotor contiene una región rica en GC (posiciones -25/-58), con sitios consenso para SP1 y AP2; una caja CCAAT (en -65); y una secuencia palindrómica llamada E-pal (-75/-86) de 12 bp flanqueada por dos repeticiones invertidas de 4 bp. Las posiciones de la región rica en GC y de la caja CCAAT son similares a las encontradas en otros promotores (Ringwald *et al.*, 1991; Behrens *et al.*, 1991). Estudios iniciales de la región promotora del gen de CD-E humano indican que éste tiene una estructura similar: carece de caja TATA, y posee una región rica en GC, con un sitio de unión a SP1 y una caja CCAAT localizada en la misma posición (-65). El elemento E-pal se encuentra solamente conservado en la mitad 3' y es capaz de unir factores nucleares (Bussemakers *et al.*, 1994a).

Estudios más profundos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la caja CCAAT y los dos sitios AP2 de la región rica en GC actúan estimulando la transcripción del gen de CD-E de ratón, mientras que el elemento E-pal activaría o reprimiría la transcripción, en células epiteliales o mesenquimales, respectivamente (Hennig *et al.*, 1995; Hennig *et al.*, 1996). Asimismo, se ha propuesto la existencia de un elemento amplificador (enhancer) en el primer intrón del gen de CD-E de ratón. Este enhancer estimula la transcripción y une factores nucleares de forma específica solamente en células epiteliales. Tiene una estructura modular con 3 elementos (EI a EIII), dos de los cuales unen AP2 (Hennig *et al.*, 1996). Además se ha sugerido que la transcripción específica epitelial puede estar mediada por la estructura de la cromatina, ya que se han encontrado sitios de hipersensibilidad a DNase I, indicativos de una estructura relajada de la cromatina, alrededor del gen de CD-E específicos de células que expresan dicha molécula (Hennig *et al.*, 1995).

Adicionalmente se han sugerido otros sitios posibles de regulación en el promotor de CD-E de ratón, como sitios de unión al receptor de glucocorticoides y de progesterona (Ringwald *et al.*, 1991) o sitios de unión a LEF-1, de regulación por el complejo β -catenina/LEF-1 (Huber *et al.*, 1996b). Sin embargo, la relevancia funcional de estos sitios de unión aún está por confirmar.

Por otro lado, también se ha propuesto que el estado de metilación endógeno alrededor de la región 5' del gen de CD-E puede ser un mecanismo de inactivación transcripcional, ya que algunas líneas humanas de carcinomas de distinto origen (gástrico, de mama, de próstata, etc) que no expresan CD-E, presentan esta región metilada de forma endógena y el tratamiento con el agente demetilante 5-azacitidina es capaz de inducir, en algunos casos, la expresión de CD-E (Yoshiura *et al.*, 1995; Graff *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1997).

En cuanto a la regulación del gen de CD-E de pollo, L-CAM, se ha identificado el promotor y secuencias enhancer que aportan especificidad tisular (Sorkin *et al.*, 1993), y que son activados por los factores homeobox HoxD9 y HNF-1 (Goemer *et al.*, 1994).

Existen también estudios funcionales del promotor de CD-P (Faraldo y Cano, 1993; Hatta y Takeichi, 1994; Faraldo *et al.*, 1997) que sugieren que puede haber mecanismos comunes en la regulación de los dos tipos cadherinas que expresan los queratinocitos.

6.3. Regulación de la expresión epitelio-específica.

Existe una cuestión abierta sobre cuales son los mecanismos que controlan el fenotipo epitelial y de si existe algún factor/es de transcripción "epiteliogénicos", que confieran o mantengan el fenotipo epitelial, de forma similar a como ocurre en el músculo esquelético, donde los factores de transcripción miogénicos Myo-D y myf-5 mantienen todo un programa de expresión muscular.

En el caso del programa de diferenciación epitelial, aún no se han encontrado tales factores, a pesar de los esfuerzos investigadores. El análisis de promotores y de zonas reguladoras de genes con expresión restringida en sistemas epiteliales, como genes de citoqueratinas o de papilomavirus humano (HPV) 16 y 18 ha sido de gran ayuda en la búsqueda de factores que puedan regular la expresión epitelio-específica (Hoppe-Seyler y Butz, 1994; Byrne, 1997). Los factores de transcripción comunes a estos promotores tienden a ser de tipo genérico, con predominio de AP1, AP2 y SP1. Aunque algunos de estos factores están enriquecidos en tejidos epiteliales, tienen patrones de expresión adicionales en otros tipos de tejidos. Por tanto, la especificidad epitelial podría llevarse a cabo mediante la combinación factores de transcripción no exclusivos de células epiteliales. (Byrne, 1997; Davies y Garrod, 1997). Aún así, también se han encontrado algunos factores de transcripción epitelio-específicos o que contribuyen a la especificidad epitelial, como pueden ser: KRF-1 (Mack y Laimins, 1991); los factores tipo dedos de zinc basonuclina y EZF, expresados en queratinocitos (Tseng y Green, 1994; Garrett-Sinha *et al.*, 1996); las proteínas con dominios Pou de unión a octámeros Oct 11 (Skin 1a-i o Epc-1) y Oct-6 (Andersen *et al.*, 1993; Yukawa *et al.*, 1993; Faus *et al.*, 1994); o el factor KSF, recientemente identificado, exclusivo de epitelios escamosos estratificados (Nakagawa *et al.*, 1997), entre otros.

En el caso de la CD-E, se ha sugerido que la especificidad epitelial viene conferida en parte por el elemento E-pal, que contiene dos cajas E (secuencia consenso CANNTG), de unión a factores tipo hélice-lazo-hélice básico (bHLH) (Hennig *et al.*, 1996). Max es una proteína de tipo bHLH que puede homodimerizar o asociarse con miembros de la familia Myc o con las proteínas relacionadas Mad (Mad1, 3 y 4) y Mxi1. Tanto los complejos Max/Myc como los complejos Max/Mad (o Max/Mxi1) pueden unirse a las caja E, pero los primeros activan la transcripción y promueven la proliferación celular, mientras que los segundos promueven represión transcripcional (Ryan y Birnie, 1996). Se ha encontrado que en la epidermis existe una compartimentalización de estos factores con expresión de c-Myc en las capas basales, Mad en estratos suprabasales y Mxi1 en ambos (Hurlin *et al.*, 1995a; Hurlin *et al.*, 1995b; Gandarillas y Watt, 1995). Así, en las capas basales proliferantes de la epidermis, predominarían los complejos transcripcionalmente activos c-Myc/Max, mientras que en las capas diferenciadas predominarían los complejos Mad/Max.

AP2 es un factor de transcripción inducible por ácido retinoico que contiene un dominio de dimerización tipo hélice-tramo-hélice (HSH) y una región básica adyacente de unión a DNA (Williams y Tjian, 1991). También se ha otorgado a AP2 un papel en la expresión específica epitelial, debido a su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario, principalmente en piel y en derivados de la cresta neural, y a que se han encontrado secuencias de unión a AP2 en muchos promotores de genes expresados en la epidermis (Leask *et al.*, 1991; Meier *et al.*, 1995). Sin embargo, ratones mutantes nulos para

el gen AP2 no muestran anomalías en la epidermis, sino que mueren principalmente por defectos craneo-faciales (Zhang *et al.*, 1996; Schorle *et al.*, 1996).

Por otro lado, también son interesantes en este sentido los miembros de la familia Ets. La familia Ets de factores de transcripción comprende un amplio número de miembros, todos ellos caracterizados por la presencia de un dominio de unión a DNA, el dominio Ets, que interacciona específicamente con secuencias de DNA que contienen el trinucleótido común GGA. Las secuencias de DNA flanqueantes a este núcleo común son variables y se cree que ayudan a determinar el tipo de proteína Ets que se unirá (Wasylyk *et al.*, 1993). La homología entre los distintos miembros es muy baja fuera del dominio Ets, pudiéndose establecer grupos de factores similares dentro de la familia (Macleod *et al.*, 1992). La familia Ets está implicada en la regulación de la expresión génica en numerosos y variados procesos biológicos (desarrollo embrionario, diferenciación, angiogénesis, control del ciclo celular, etc), y la pérdida del control normal los puede convertir en oncoproteínas. Se han encontrado sitios de unión a factores Ets que regulan la transcripción de numerosos promotores de genes (muchos de ellos específicos de tejidos epiteliales) y casi siempre actúan en asociación con otros factores de transcripción, generalmente AP1 (Wasylyk *et al.*, 1990; Wasylyk *et al.*, 1993; Gum *et al.*, 1996).

Ets-1 fué el primer miembro de la familia identificado. Su patrón de expresión en células mesodérmicas en el embrión de ratón y en tumores humanos, específicamente en las zonas de transición epitelio-mesénquima sugiere un papel para esta molécula en procesos dinámicos de invasión y migración (Kola *et al.*, 1993; Wernert *et al.*, 1994). Recientemente se ha detectado expresión de Ets-1 en células epiteliales del embrión de pollo transitoriamente, en zonas de migración (migración de las células de la cresta neural y dispersión de las somitas en el esclerotomo mesenquimal), lo que apoya su papel en procesos migratorios y de transición epitelio-mesénquima (Fafeur *et al.*, 1997).

E1AF es otro miembro de la familia recientemente caracterizado que puede jugar también un papel importante en procesos invasivos, ya que activa la transcripción de varias MMPs y su transfección induce en la línea no invasiva MCF-7 motilidad, invasividad y un aumento en la expresión de la metaloproteasa MMP-9 (Kaya *et al.*, 1996).

El grupo de factores PEA 3 está formado por tres miembros de la familia Ets: PEA3, ERM y ER81. ERM es prácticamente ubicuo en ratón y humano, mientras que los otros dos miembros muestran un patrón más restringido de expresión (de Launoit *et al.*, 1997). En concreto, en el ratón adulto, ER81 se expresa principalmente en cerebro y riñón (Monté *et al.*, 1994); mientras que el factor PEA 3 de ratón se expresa en fibroblastos y en algunas células epiteliales en cultivo, y en el ratón adulto la expresión está restringida a epidídimo y cerebro (Xin *et al.*, 1992). Es interesante destacar que, a pesar de ser negativo en epitelio normal de mama, PEA 3 se ha encontrado sobreexpresado en adenocarcinomas de mama inducidos en ratones transgénicos para el oncogén *neu/c-erbB-2*, así como en algunas líneas de carcinoma de mama humanas y de ratón (Trimble *et al.*, 1993; Baert *et al.*, 1997).

Por último, recientemente se ha aislado y caracterizado un nuevo miembro de la familia específico de células epiteliales: ESE-1 (Oettgen *et al.*, 1997). ESE-1 contiene el dominio Ets de unión a DNA y además un dominio de tipo "gancho A/T", encontrado en proteínas de la familia HMG y en otros factores nucleares (Reeves y Nissen, 1990). ESE-1 es el primer factor de la familia Ets expresado exclusivamente en células epiteliales. Además ESE-1 se induce durante la diferenciación terminal que sufren los queratinocitos en cultivo cuando se aumenta la concentración de calcio (Oettgen *et al.*, 1997).

Sin embargo, la realidad de no haberse encontrado hasta la fecha ningún factor epiteliogénico claro, junto con el hecho de que las primeras células del embrión son en sí epiteliales, originando los demás tipos celulares por segregación y diferenciación a partir de ellas, ha hecho surgir la hipótesis, mantenida por Frisch (1997) de que el estado epitelial es el estado "por defecto", y de que, por tanto, no hace falta ningún factor específico que mantenga este fenotipo. Sin embargo esta es una hipótesis tentadora que tendrá que ser comprobada.

7. EL MODELO DE CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN.

El modelo experimental de la carcinogénesis química de piel de ratón ha constituido un paradigma para establecer las bases biológicas de la naturaleza multiseccional del cáncer. Este modelo se basa en la inducción progresiva de tumores por tratamiento de la piel de los ratones con una dosis única de un carcinógeno químico como DMBA (iniciador) y posteriores aplicaciones de un promotor tumoral, generalmente el éster de forbol TPA. Estos tratamientos originan papilomas benignos que pueden progresar espontáneamente hacia carcinomas epidermoides malignos con diferente grado de diferenciación (Yuspa, 1994). Los últimos estadios de progresión en este sistema están representados por la aparición de carcinomas fusiformes indiferenciados (Buchman *et al.*, 1991). Aunque la aparición de metástasis en este modelo es un evento raro, se ha observado su generación a partir de carcinomas epidermoides y fusiformes (Klein-Szanto, 1991). Estudios exhaustivos de los últimos años han permitido establecer la naturaleza de algunas de las alteraciones génicas asociadas a estadios de progresión definidos en este sistema, como la activación de Ha-ras en la iniciación y la inactivación de p53 en la transición de papilomas a carcinomas, incremento en las dosis de Ha-ras oncogénico y adquisición de trisomías en los cromosomas 6 y 7 durante la progresión tumoral (Fig.4) (revisado en Portella *et al.*, 1994). La participación de Ha-ras en el proceso de iniciación se puso de manifiesto porque el carcinógeno químico iniciador puede sustituirse por la aplicación de HaMSV (virus del sarcoma murino de Ha-ras) (Brown *et al.*, 1986). La posibilidad de obtener líneas celulares a partir de los tumores inducidos por este sistema facilita el estudio de los mecanismos implicados en la carcinogénesis de piel. Asimismo, cultivos primarios de queratinocitos de ratón pueden transformarse *in vitro*, por ejemplo, por tratamiento con

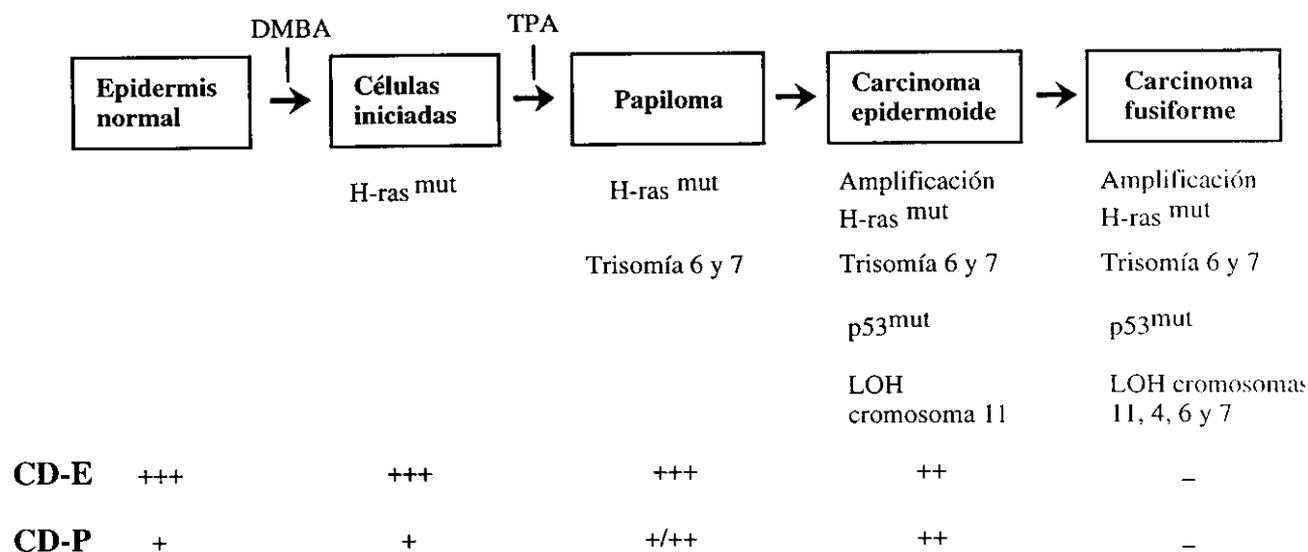


Fig. 4. Estadios de progresión en el modelo de la carcinogénesis química de piel de ratón. Se indican las principales alteraciones genéticas y la expresión de cadherinas. LOH, pérdida de heterocigosidad.

carcinógenos químicos o por transfección con Ha-ras. De esta forma pueden obtenerse líneas celulares en cultivo representativas de distintos estadios de la progresión tumoral.

El estudio previo de la expresión de cadherinas en la piel normal y en carcinomas mostró que en la epidermis normal se expresan tanto CD-E como CD-P (Fig. 4); la expresión de CD-E disminuye durante la progresión a carcinoma epidermoide; y la expresión de ambas moléculas desaparece en el último estadio de la progresión, carcinoma fusiforme (Navarro *et al.*, 1991; Ruggeri *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1996). Asimismo, estudios de otros marcadores de diferenciación de epidermis pusieron de manifiesto la expresión aberrante de la integrina $\alpha 6\beta 4$ (Gómez *et al.*, 1992; Tennenbaum *et al.*, 1993) y de la queratina K13 (Giménez-Conti *et al.*, 1990) en estadios tempranos de progresión; y de la queratina K8 en estadios posteriores (Larcher *et al.*, 1992; Caulín *et al.*, 1993). La mayoría de los marcadores epiteliales analizados (incluyendo cadherinas, integrina $\alpha 6\beta 4$, queratinas y plakoglobina) se pierden en los carcinomas fusiformes y líneas derivadas (Navarro *et al.*, 1991; Gómez *et al.*, 1992; Díaz-Guerra *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1993; Stoler *et al.*, 1993), mientras que se adquieren marcadores típicos de células mesenquimales como fibronectina y su receptor $\alpha 5\beta 1$ (Gómez *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1995). Por tanto, la transición fenotípica epitelio-fibroblasto que ocurre en los últimos estadios de progresión de la carcinogénesis de piel de ratón es similar en muchos aspectos a las transiciones epitelio-mesénquima que ocurren durante el desarrollo embrionario (Hay, 1995; Birchmeier *et al.*, 1996).

Por otro lado, estudios previos en este modelo muestran una correlación inversa entre la expresión de CD-E y el grado de tumorigenicidad, así como con la capacidad invasiva *in vitro* de las células (Navarro *et al.*, 1991; Ruggeri *et al.*, 1992; Caulín *et al.*, 1996). El importante papel de la CD-E en la progresión tumoral se puso de manifiesto mediante estudios de transfección del cDNA de CD-E en la línea derivada de carcinoma epidermoide HaCa4, que no expresaba CD-E. Esta transfección revirtió parcialmente la tumorigenicidad y originó un fenotipo más diferenciado (Navarro *et al.*, 1991). Sin embargo, todas las líneas originadas, que expresaban CD-E, permanecieron metastásicas, al igual que la línea parental, con la excepción de la línea E24, que se volvió no metastásica. Esta línea, además de reexpresar CD-E, había disminuido de forma considerable los niveles de Ha-ras viral y de la proteína p21 ras (Caulín *et al.*, 1996). Queda abierta la cuestión de si en este sistema niveles reducidos de Ha-ras son suficientes para evitar el fenotipo metastásico, o si además la presencia de la molécula de adhesión CD-E es también necesaria.

OBJETIVOS

Los estudios previos sobre la expresión de cadherinas en el modelo de carcinogénesis de piel de ratón habían puesto de manifiesto la importancia de la molécula de adhesión celular cadherina E en la carcinogénesis, existiendo pérdida de la expresión de dicha molécula durante la progresión tumoral. Sin embargo no estaba claro el papel específico que podía desempeñar en el comportamiento metastásico. Por otra parte, se desconocían cuales son los mecanismos que controlaban la pérdida de expresión de cadherina E durante la progresión maligna.

Por lo tanto, nos planteamos los siguientes objetivos al inicio de la realización de esta Tesis:

1. Estudio de la influencia de la cadherina E en el fenotipo invasivo y metastásico en la carcinogénesis de piel de ratón.
2. Análisis de la regulación génica de cadherina E durante la progresión tumoral. Caracterización de los factores implicados que actúan en cis o en trans.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS.

Los productos químicos y bioquímicos fueron adquiridos de las casas comerciales Amersham, BAbCO, Bio 101 Inc., Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Carlo Erba, Du Pont, Gibco BRL, Invitrogene, Jackson, L.K.B., Merck, Millipore, Nucleopore, Pharmacia, Probus, Promega Corporation, Quiagen, Santa Cruz Biotechnology y Sigma Chemical Co. Cuando se considera oportuno se indica en la descripción la casa comercial. Todos los reactivos utilizados en la experimentación fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y cultivo celular.

2. TAMPONES Y SOLUCIONES.

La composición de la mayoría de los tampones y soluciones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de métodos o en las citas correspondientes. La composición de algunas de las soluciones más comunes, no especificada más adelante, se describe a continuación.

- **Solución de Denhardt** (1x): 0.2 g/l BSA (fracción V, Sigma), 0.2 g/l Ficoll-400 (Pharmacia), 0.2 g/l polivinil-pirrolidona.
- **HBS 2x**: 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM Hepes pH 7.12.
- **HMF-Ca²⁺**: 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Hepes pH 7.4.
- **Tampón de carga Laemmli**: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerol, 0.005% azul de bromofenol.
- **NET**: 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 0.05% NP-40, 0.25% gelatina.
- **PBS** : 136 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4.
- **TBE** (1x): 90 mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8.0.
- **TBS**: 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6.
- **Tris-glicina** (1x): 192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8.7.
- **T-TBS**: 0.05% Tween-20 en TBS.
- **SSC** (1x): 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico.

3. MEDIOS EMPLEADOS EN CULTIVO DE CÉLULAS.

- Medio de cultivo DMEM - Gibco BRL.
- Medio de cultivo Ham's F12 suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales - Gibco BRL.

4. LÍNEAS CELULARES.

Las líneas celulares utilizadas, a excepción de la línea fibroblástica NIH3T3, son queratinocitos de ratón obtenidos por diferentes abordajes (Fig. 5) y con distinto grado de tumorigenicidad (Tabla II). MCA3D es una línea no tumorigénica; PDV y E24 presentan tumorigenicidad intermedia; y el resto son altamente tumorigénicas. La mayoría de las células presentan una morfología epitelial o epiteloide, excepto CarB y MSC11A5 que exhiben un fenotipo fibroblastoide. El origen y propiedades de todas estas líneas han sido descritos previamente (Navarro *et al.*, 1991; Caulín *et al.*, 1996; Díaz-Guerra *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 1991; Stoler *et al.*, 1993) y aparece esquematizado en la Figura 5 y en la Tabla II.

Tabla II. Características morfológicas, tumorigénicas y expresión de cadherinas de las líneas celulares empleadas en esta tesis.

Línea celular	Morfología	Tumorigenicidad ⁽¹⁾	CD-E ⁽²⁾	CD-P ⁽²⁾
MCA3D	Epitelial	-	++	+ / ++
PDV	Epitelial	+	+	+++
HaCa4	Epiteloide	++	-	++
Neo3	Epiteloide	++	-	++
E58	Epiteloide	++	-	++
E62	Epitelial	+	++	++
E24	Epitelial ⁽³⁾	+	+ / ++	+++
CarB	Fibroblastoide	++	-	-
MS11A5	Fibroblastoide	++	-	-

(1) La capacidad tumorigénica se determinó por inyección en ratones nu/nu, teniendo en cuenta el número de tumores originados y el período de latencia.

(2) Los niveles relativos de CD-E y de CD-P se estimaron a partir de datos de Northern-blot y de inmunoblot.

(3) La línea celular E24 muestra propiedades de pseudo-estratificación en cultivo.

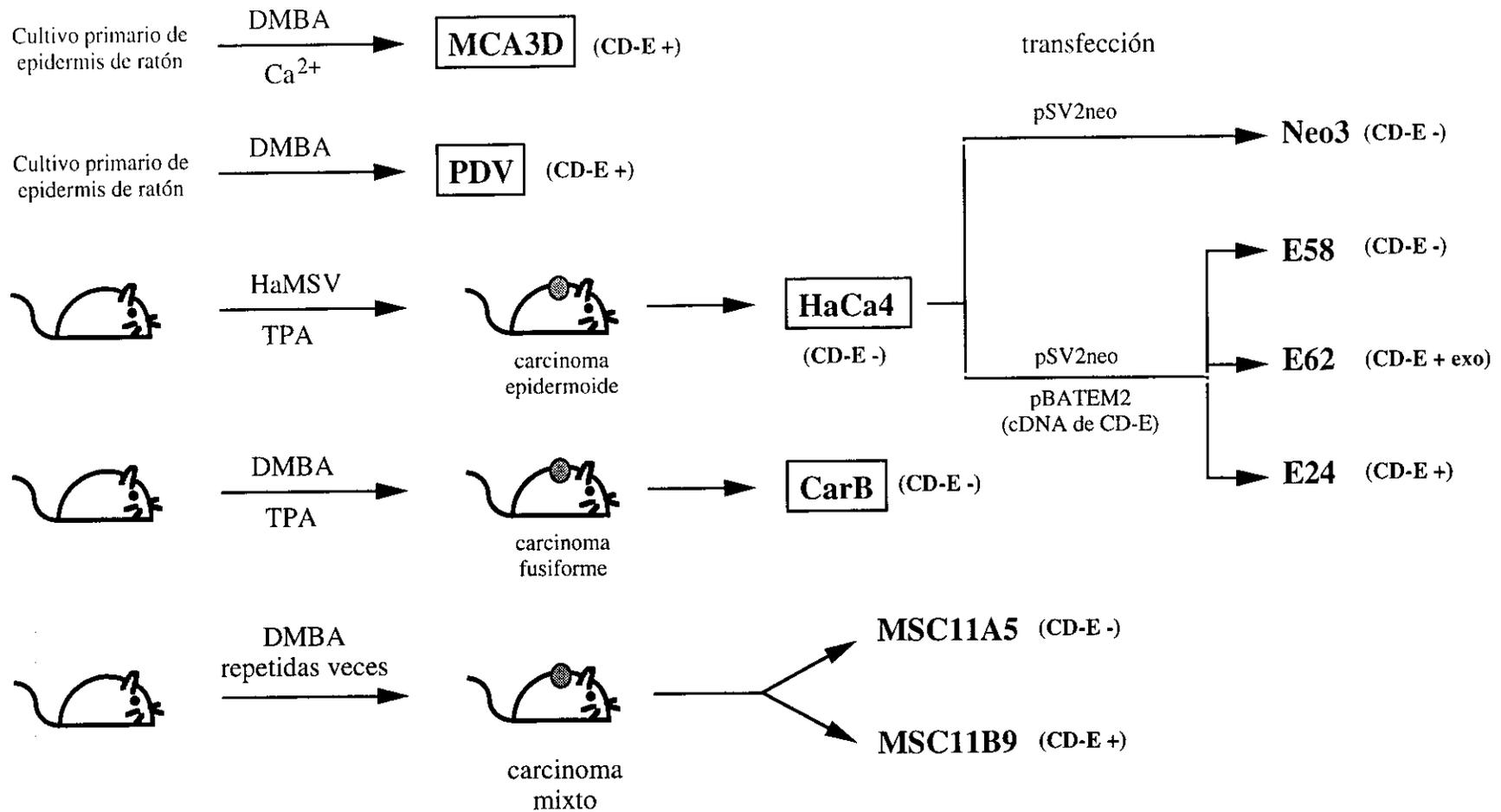


Figura 5. Representación esquemática del origen de las líneas celulares empleadas en esta Tesis. Se indica si las líneas celulares originadas expresan (CD-E +) o no expresan (CD-E -) CD-E. Exo, CD-E exógena. Ver texto para más detalles.

5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para los ensayos de tumorigenicidad se utilizaron ratones atímicos nu/nu de la cepa Swiss (suministrados por IFA.Credo, Barcelona) entre 8 y 10 semanas de edad. Para los experimentos de inducción de metástasis espontánea se utilizaron ratones atímicos BALB/c de 8 semanas de edad (suministrados por el Area de Producción Animal del CRIFFA Inc., Lyon, Francia) y los experimentos se realizaron en el Departamento de Invasión y Metástasis del IRO (Barcelona). Los animales se mantuvieron en condiciones de esterilidad.

6. ANTICUERPOS Y REACTIVOS INMUNOLÓGICOS.

6.1. Anticuerpos primarios:

- **ECCD-2:** anticuerpo monoclonal de rata anti-cadherina E de ratón, cedido por el Dr. M. Takeichi (Universidad de Kyoto, Japón). La dilución a la que se emplea este anticuerpo varía entre 1:100 y 1:250.
- **PCD-1:** anticuerpo monoclonal de rata anti-cadherina P de ratón, cedido asimismo por el Dr. M. Takeichi. La dilución empleada osciló entre 1:10 y 1:20.
- **Anti-involucrina:** antisuero policlonal de conejo anti-involucrina suministrado por BAbCO. La dilución empleada fue 1:100.
- **Ets-1/Ets-2 (C-275):** anticuerpo policlonal de conejo anti-Ets-1 purificado por afinidad. Presenta alta reactividad cruzada con otros miembros de la familia Ets. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology.
- **AP2 (C-18) X:** anticuerpo policlonal de conejo anti-AP2 purificado por afinidad. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology. Concentrado para ensayos de super-retardo en gel.
- **SP1 (PEP 2):** IgG policlonal de conejo anti-SP1. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology. Concentrado para ensayos de super-retardo en gel.

6.2. Anticuerpos secundarios:

- Antisuero de cabra anti-IgG de rata conjugado a rodamina (Jackson) para los ensayos de inmunofluorescencia.
- Antisuero de oveja anti-Ig de rata y antisuero de burro anti-Ig de conejo conjugados a peroxidasa (Amersham) para ensayos de inmunoblot.
- Antisuero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) para inmunoblot.
- Antisuero de oveja anti-Ig de rata marcado con ^{125}I (Amersham), igualmente para inmunoblot.

7. SONDAS EMPLEADAS EN EXPERIMENTOS DE NORTHERN-BLOT.

- **CD-E:** fragmento de 0.9 Kb obtenido por digestión del plásmido pBATEM-2 (ver más adelante, Apto. 8) con la enzima de restricción BamHI. Contiene las secuencias codificantes de los nucleótidos 993 a 1920 del cDNA de CD-E de ratón.
- **CD-P:** fragmento correspondiente a las secuencias codificantes de los nucleótidos 1281 a 2469, así como secuencias no codificantes del cDNA de CD-P de ratón. Obtenido por digestión del plásmido p β act-Pcad (ver Apto. 8) con HindII-EcoRI.
- **Ha-ras:** se empleó el plásmido BS9 (Ellis *et al.*, 1980) que detecta Ha-ras viral y celular de ratón.
- **MMP-9:** obtenida a partir del plásmido pGEL 2SK(-) (Tanaka, H. *et al.*, 1993) que contiene el cDNA de la gelatinasa de ratón de 105 KDa (MMP-9). Se empleó un fragmento de 3.2 Kb obtenido por digestión con NotI/EcoRI.
- **MMP-3:** obtenida por RT-PCR a partir de mRNA de células NIH3T3 según la secuencia del cDNA de transina-1 de ratón (Ostrowski *et al.*, 1988). Comprende los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 896 y 1238.
- **TIMP-1:** generada por RT-PCR a partir de mRNA de células NIH3T3. Contiene secuencias comprendidas entre las posiciones 236 y 455 de TIMP-1 de ratón (Edwards *et al.*, 1986).
- **β -actina:** sonda de 500 bp del cDNA de β -actina de ratón.
- **GADPH:** sonda de 983 bp del cDNA de GADPH de ratón, obtenida por RT-PCR según se describe en Wilson *et al.* (1995).

8. PLÁSMIDOS.

8.1. Plásmidos empleados en la obtención de transfectantes estables.

- **pBATEM-2** (Nose *et al.*, 1988): contiene el cDNA de CD-E de ratón bajo el control del promotor de β -actina.
- **p β ac-Pcad** (Nose *et al.*, 1988): plásmido de expresión con el cDNA de CD-P de ratón bajo el control del promotor de β -actina. Los plásmidos pBATEM-2 y p β ac-Pcad fueron cedidos amablemente por el Dr. M Takeichi.
- **p β ac-dacE:** contiene secuencias del cDNA de CD-E de ratón (posiciones 640 a 3170) en posición antisentido respecto al promotor de β -actina. Su generación se describe en Resultados (Apto. 1.1).
- **pBSpac Δ P** (Luna *et al.*, 1988): vector de expresión del gen PAC (puromicina N-acetil transferasa) que confiere resistencia al antibiótico puromicina. Este plásmido fue cedido por el Dr. J. Ortín (CNB, Madrid).

8.2. Plásmidos empleados en los experimentos de transfección transitoria.

8.2.1. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-E.

Los plásmidos **-1.4**, **-0.8**, **-178**, **-94**, **-78**, **-58** y **-21** de CD-E (Behrens *et al.*, 1991; Hennig *et al.*, 1996) contienen secuencias de la región promotora del gen de CD-E de ratón. El extremo 3' es común en todas ellas, y corresponde con la posición +92 del gen de CD-E de ratón, tomando como +1 el sitio de inicio de la transcripción. La posición del extremo 5' corresponde con el nombre del plásmido (expresado en pb, excepto los plásmidos -1.4 y -0.8 en Kb). Estos fragmentos están clonados en el vector pCAT-Basic (Promega) justo delante del gen de expresión de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

Los plásmidos **mE-pal**, **Δ E-pal**, **mut GC1** y **mut GC2** se derivaron a partir del plásmido -178. En el plásmido **m-Epal** (Hennig *et al.*, 1996) los dos nucleótidos centrales GC de la secuencia palindrómica E-pal del promotor de CD-E se sustituyeron por TT. En los plásmidos **mut GC1** y **mut GC2** (Hennig *et al.*, 1995), la secuencia rica en GC (posiciones -32 a -58) del promotor de CD-E:

-58 GCGGCGCCGGGGGCGGTGCCTGCGGGC -32

se sustituyó por las secuencias mutadas:

mut GC1 GCGGCGCCGTTTTTCGGTGCCTGCGGGC

mut GC2 GCGGCGCCGGGGGCGACTTCTGCGGGC

El plásmido **Δ E-pal** se construyó eliminando la secuencia -103 a -79 del promotor de CD-E por digestión del plásmido -178 con PstI, romando los extremos con T4 DNA polimerasa y religando.

Todos estos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. J. Behrens (Centro Max-Delbrück de Medicina Molecular, Berlín).

El plásmido **m-Ets** también tiene como base el plásmido -178 y contiene una doble mutación en las posiciones -93/-94, en las que los nucleótidos CC del potencial sitio de unión a c-Ets1 se sustituyeron por los nucleótidos AA. Este plásmido se generó en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida por PCR (Innis *et al.*, 1990). En la figura 6 se muestra un esquema de la estrategia seguida para la generación de este mutante: El plásmido -178 se utilizó como DNA molde en las reacciones de PCR 1 y 2. La PCR 1 se realizó con los oligonucleótidos rev y mEts-2 (ver Apto. 9.1) como cebadores, y la PCR-2 con los oligonucleótidos mEts-3 y mEts-4. Las condiciones de PCR fueron 30x (94°C 1'30", 45°C 3', 72°C 3'). Los fragmentos generados en ambas reacciones de PCR se purificaron en gel de agarosa y se emplearon como DNA molde para la PCR 3, que se realizó en las mismas condiciones y empleando como cebadores los oligonucleótidos rev y mEts-4. El fragmento generado se purificó en gel de agarosa. Este fragmento se sustituyó por el endógeno del plásmido -178 tras digestión con las enzimas HindIII y NotI y posterior ligación. Se comprobó la correcta secuencia del plásmido m-Ets por digestión (pérdida de sitio StyI) y secuenciación.

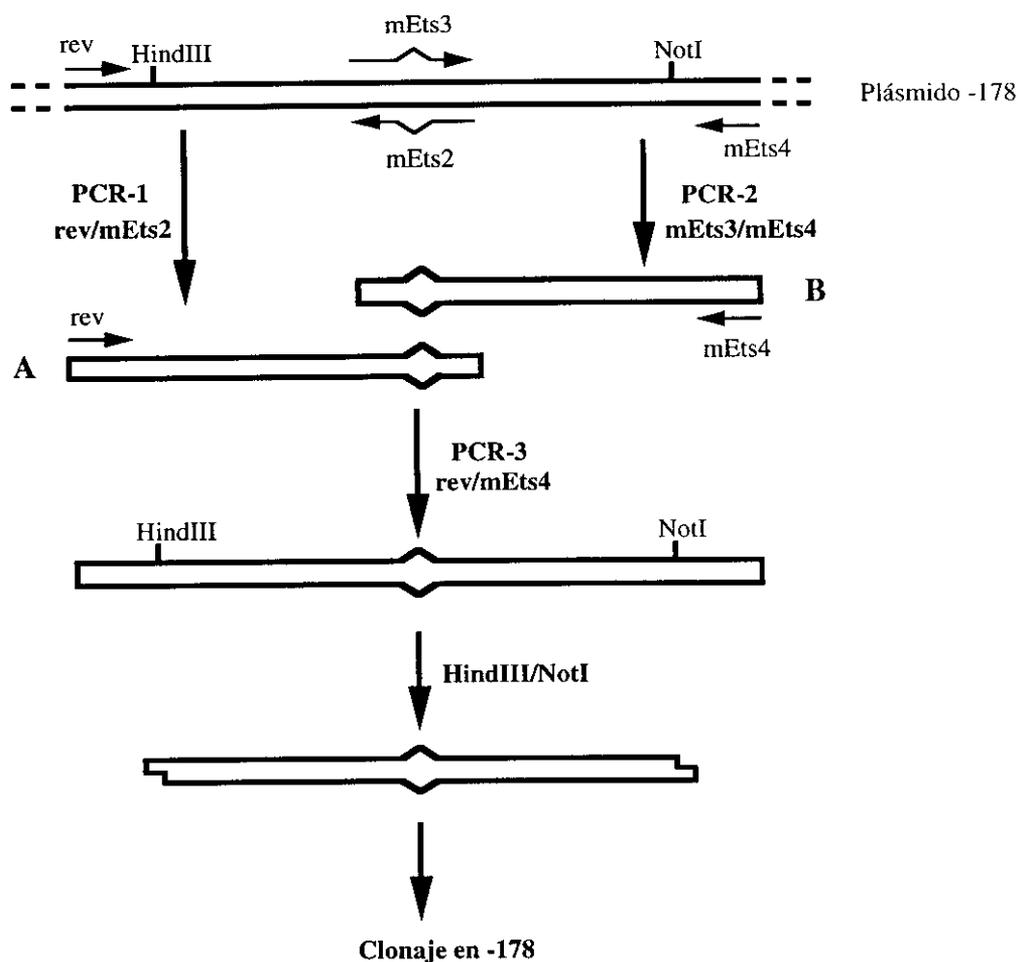


Figura 6. Diseño experimental para la construcción del plásmido m-Ets mediante mutagénesis por PCR. El plásmido -178 se empleó como molde para las reacciones de PCR 1 y 2 con los oligonucleótidos cebadores que se indican. Los cebadores mEts2/mEts3 portan la mutación a introducir en el sitio consenso Ets (^). Los productos de las reacciones A y B sirvieron como molde para la PCR 3 con los cebadores indicados. El producto generado, que porta la mutación, se digirió con los enzimas HindIII/NotI para reemplazarlo por el fragmento silvestre en plásmido -178.

8.2.2. Plásmidos testigo de actividad promotora de CD-P.

Los plásmidos **-200P** y **-75P** de CD-P (Faraldo *et al.*, 1997) contienen las secuencias del promotor de CD-P de ratón comprendidas entre los nucleótidos -200/+47 y -75/+47, respecto del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias se insertaron en posición 3' del gen de la luciferasa en el vector pXP1 (Nordeen, 1988).

La construcción híbrida **GC-E/-75P** se generó insertando el oligonucleótido GC-E del promotor de CD-E (posición -60/-23, ver Oligonucleótidos) en el sitio BamHI del plásmido -75P, en posición 5' del promotor de CD-P. La construcción híbrida **E-pal/-200P** se generó insertando un oligonucleótido conteniendo la secuencia E-pal del promotor de CD-E (posición -92/-69, ver Oligonucleótidos) en el sitio XhoI del plásmido -200P, en posición 5' del promotor de CD-P (Faraldo *et al.*, 1997).

8.2.3. Plásmidos control en los experimentos de actividad promotora de CD-E y de CD-P.

- **pCAT-Control Vector** (Promega): vector de expresión de CAT bajo el control del promotor de SV40. Se empleó para normalizar los niveles de actividad CAT dirigidos por las construcciones del promotor de CD-E entre las distintas líneas celulares.
- **CMV-luc**: vector de expresión de la enzima luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), donado por la Dra. P. Santisteban (IIB, Madrid). Se utilizó para medir la eficiencia de transfección y para normalizar la actividad del promotor de CD-P entre las diferentes líneas celulares.
- **RSV-βgal** (Promega). Vector de expresión de la enzima βgalactosidasa bajo el control del promotor de RSV. Se empleó para medir la eficiencia de transfección.

8.2.4. Vectores de expresión empleados en los experimentos de cotransfección.

- **pSG5-ERM** (Monté *et al.*, 1994): vector de expresión de ERM bajo el control del promotor de SV40, clonado en el vector pSG5. El vector vacío **pSG5** (Pharmacia) contiene el promotor temprano de SV40 unido a secuencias no codificantes y se empleó como control en los ensayos de cotransfección con pSG5-ERM.
- **AP2-ΔTA** (Hennig *et al.*, 1996): vector de expresión del factor AP2 (Willians, y Tjian, 1991) con el dominio de transactivación delecionado, bajo el control del promotor de RSV. Como control para normalizar las cantidades de DNA transfectadas se empleó el vector vacío **RSV-0**, que contiene el promotor RSV unido a secuencias no codificantes.
- Los vectores de expresión de Max y c-Myc humano **pMTmax** y **pHEBoMTmyc2,3** (Grignani *et al.*, 1990), respectivamente, contienen el cDNA de dichos factores bajo el control del promotor de metalotioneína I de ratón, en el vector vacío **pHEBoMT**. Estos plásmidos fueron donados amablemente por el Dr. J. León (Universidad de Cantabria, Santander).

- Los vectores de expresión de Slug y Snail de pollo **CMV-sna** y **CMV-slug**, respectivamente, contienen los cDNA de dichos factores bajo el control del promotor de CMV. Los cDNAs de snail y slug, clonados en el vector pBS-SK (cedidos por A. Nieto, Instituto Cajal, Madrid) se aislaron por digestión con HindIII/XbaI y ApaI/NotI, respectivamente y se insertaron en el vector vacío pcDNA3 (Invitrogene). El vector **pcDNA3** se empleó como control, y para igualar las cantidades de DNA a transfectar, en los experimentos de cotransfección.

9. OLIGONUCLEÓTIDOS.

9.1. Oligonucleótidos empleados en la generación del plásmido m-Ets.

Para la construcción del plásmido m-Ets se emplearon los siguientes oligonucleótidos en las reacciones de PCR. Los oligonucleótidos mEts-2 y mEts-3 corresponden a la cadena no codificante y codificante, respectivamente, de las posiciones -111/-82 del promotor de CD-E conteniendo una doble mutación en el sitio consenso Ets. Los oligonucleótidos rev y mEts-4 son oligonucleótidos, de la cadena codificante y no codificante respectivamente, situados en los extremos de la zona a amplificar por PCR; rev está situado en la zona 5' del polilinker del vector, y mEts-4 en la posición -3/+17 del promotor de CD-E.

rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
mEts-2	5'-AGGTGGCAGCCAATTAAGTGCAGGGCCCTC-3'
mEts-3	5'-GAGGGCCCTGCAGTTAATTGGCTGCCACCT-3'
mEts-4	5'-GCGGCTCCCACACCAGTGAG-3'

9.2. Oligonucleótidos y fragmentos de DNA empleados en experimentos de retardo en gel.

Los oligonucleótidos o fragmentos de DNA empleados en los experimentos de retardo en gel y de competición se describen a continuación. Todos los oligonucleótidos están escritos en dirección 5'-3'. Para realizar los ensayos cada oligonucleótido descrito se hibridó con su complementario, antes de la reacción de marcaje. Para los oligonucleótidos y fragmentos de los genes de CD-E y de CD-P, se indica la posición inicial y final de la secuencia, tomando como +1 el sitio de inicio de la transcripción. Los oligonucleótidos PEA y mPEA contenían adaptadores HindIII y BamHI en los extremos 5' y 3', respectivamente (no mostrado en la secuencia). El resto de oligonucleótidos, salvo ECE y sus derivados mutados, contenían adaptadores BamHI en los extremos (GATCC en 5' y G en 3').

Oligonucleótidos del promotor de CD-E:		Posición
E-pal	GGCTGCCACCTGCAGGTGCGTCC	-92/-69
E-pal mut	GGCTGCCACCTTTAGGTGCGTCC	"
CCAAT-E	CGTCCCCAGCCAATCAGCG	-74/-56
GC-E	CAGCGGCGCCGGGGGCGGTGCCTGCGGGCTCACCTGGC	-60/-23
ECE	GAGGGCCCTGCAGTTCCTTGGCTGCCACC	-111/-83
mA	GAGGGCCCTGCAGTTAATTGGCTGCCACC	"
mB	GAGGGCAATGCAGTTCCTTGGCTGCCACC	"
mAB	GAGGGCAATGCAGTTAATTGGCTGCCACC	"
mC	GAGGGCCCTGCTGTTTCCTTGGCTGCCACC	"

Oligonucleótidos del promotor de CD-P:		Posición
CCAAT-P	GTTGGACCAATCAGCAGC	-70/-53
GC-P	TCGACCCACCTGCGAGGGGGCGGGACC	-105/-78
SP1-P	CGAGGGGGCGGGACCTTG	-92/-75
AP2-P	GCCTCGACCCACCTGCG	-108/-90

Oligonucleótidos con sitios consenso de unión a factores de transcripción:

CP-1	CTACACCTATAAACCAATCAC	(Chodosh <i>et al.</i> , 1988)
CP-2	TGACCAGTTCAGCCACT CTT	(Chodosh <i>et al.</i> , 1988)
C/EBP	TTCAATTGGGCAATCAGGA	(Ryden y Beemon, 1989)
NF1	ATTTTGGCTACAAGCCAATATGAT	(Courtois <i>et al.</i> , 1990)
SP1-SV40	TGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACT	(Kadonaga <i>et al.</i> , 1987)
AP2-SV40	AAAGTCCCCAGGCTCCCCA	(Imagawa <i>et al.</i> , 1987)
PEA 3	TTAAGCAGGAAGTGACTAACTGA	(Wasylyk <i>et al.</i> , 1990)
mPEA 3	TTAAGCATTAAGTGACTAACTGA	mutación del sitio PEA3

Fragmentos de CD-E:

Los fragmentos A, B, C y D de la región 5' del gen de CD-E se obtuvieron por digestión del plásmido -178 o -58 y purificación del fragmento deseado en gel de agarosa o acrilamida. Se indican a continuación las enzimas empleadas y las posiciones correspondientes del promotor de CD-E.

- Fragmento A: digestión con XbaI del plásmido -178, abarca las posiciones -178/+92.
- Fragmento B: digestión con XbaI/ApaI del plásmido -178, abarca las posiciones -178/-109.

- Fragmento C: digestión con ApaI/NotI del plásmido -178, abarca las posiciones -109/-24.
- Fragmento D: digestión con XbaI del plásmido -58, abarca las posiciones -58/+92.

9.3. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de footprinting *in vivo*.

A continuación se describen los oligonucleótidos empleados en los experimentos de footprinting *in vivo*, escritos en dirección 5'-3'. Para amplificar y marcar la cadena codificante del promotor de CD-E se emplearon los oligonucleótidos U1, U2 y U3 (Hennig, G. *et al.*, 1995), y para la cadena no codificante se emplearon los oligonucleótidos L1, L2 y L3. Los oligonucleótidos "largo" y "corto" (Mueller y Wold, 1989) se hibridaron para generar el adaptador, de cadena doble.

		Posición
U1	5'-ACG CCG AGC AAA CAC TGA G-3'	+113/+95
U2	5'-GGG CAG GAG TCT AGC AGA AGT TCT T-3'	+61/+37
U3	5'-AAG TTC TTG GGA ACT CAG TAG TGC GCC G-3'	+44/+17
L1	5'-AAG TCC TTT GTA ACT CCA TGT-3'	-247/-227
L2	5'-ACT CCA TGT CTC CGT GGG TCA GA-3'	-235/-213
L3	5'-CCA TGT CTC CGT GGG TCA GAG CAC AGC TAG GCT-3'	-232/-200
Largo	5' HO-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C-OH	3'
Corto	5' HO-GAA TTC AGA TC-OH	3'

1. CULTIVO CELULAR.

Todas las líneas celulares se crecieron en medio Ham's F12, salvo las líneas NIH3T3 y MSC11A5 que se crecieron en medio DMEM. Los medios de cultivo se suplementaron con 2mM glutamina y 10% suero fetal bovino. Asimismo, se adicionó a los medios de cultivo ampicilina (100 µg/ml), gentamicina (32 µg/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml).

Todas las células se crecieron en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

2. OBTENCIÓN DE TRANSFECTANTES ESTABLES.

La línea celular E24, que expresa el gen endógeno de CD-E, se transfectó con el vector de expresión antisentido de CD-E pβact-dacE por el método del fosfato cálcico para células adherentes (Sambrook *et al.*, 1989).

Se crecieron las células a subconfluencia en placas de 6 cm de diámetro y se sustituyó el medio de crecimiento por medio DMEM-10% suero 4 h antes de la transfección. Las células se transfectaron con 5 µg del plásmido pβact-dacE, 0.5 µg del vector de resistencia a puromicina pBSpacΔP y 10 µg de timo de ternera como "carrier". Asimismo, se realizó en paralelo una transfección control sobre E24, en idénticas condiciones pero sólo con el vector de resistencia al antibiótico. El DNA a transfectar se precipitó en solución HBS 1x, 125 mM CaCl₂. Una vez formado el precipitado, se agregó a las placas de cultivo y se mantuvo durante 18 h, tras las cuales se lavó el medio con el DNA y se sustituyó por medio de crecimiento Ham's F12 10% suero. Las células se dejaron crecer durante 24 h hasta llegar a confluencia, tras lo cual se inició la selección de los transfectantes estables con el antibiótico puromicina (1.5 µg/ml) hasta la obtención de clones aislados de células resistentes. Las colonias resistentes se subclonaron y se analizó la expresión de CD-E por inmunofluorescencia e inmunoblot. Los diferentes clones se crecieron en presencia del antibiótico de selección durante al menos 10 pases.

3. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

3.1. Inmunofluorescencia.

Las células se crecieron en cubreobjetos de cristal de 10 mm de diámetro hasta alcanzar la confluencia. Se lavaron 2 veces en HMF-Ca²⁺ y se fijaron y permeabilizaron con metanol frío (-20°C) durante 4 minutos. Los cristales se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios 1 h en cámara húmeda a 37°C a la dilución correspondiente conteniendo 0.1% BSA. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda, también con 0.1% BSA. Tras las incubaciones con cada uno de los anticuerpos, los cristales se lavaron con PBS 4 veces durante 10 minutos a

temperatura ambiente y en agitación. Finalmente se lavaron con agua destilada y se montaron sobre portaobjetos con mowiol (Harlow y Lane, 1988). Las preparaciones se observaron en un fotomicroscopio Axiophot (Zeiss) equipado con epifluorescencia.

3.2. Obtención de extractos celulares para inmunoblot.

a) Extractos para inmunodetección de CD-E, CD-P e involucrina.

Las células se crecieron en placas de 10 cm de diámetro a confluencia y se lavaron 2 veces con HMF-Ca²⁺. Se añadió 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 1% NP-40, 1% Tritón X-100) con inhibidores de proteasas (2 mM PMSF y 20 µg/ml de aprotinina) y se extrajeron las proteínas durante 20-25 minutos a 4°C. Se rasparon las células, se recogieron y se centrifugaron en frío durante 15 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se procesó inmediatamente o bien se guardó a -70°C.

b) Extractos para inmunodetección de Ets.

Las células se crecieron de igual forma, se lavaron con PBS y se les añadió 1 ml de solución RIPA fría (1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% Na-deoxicolato en PBS) conteniendo inhibidores de proteasas (1mM PMSF y 60 µg/ml de aprotinina) e inhibidores de fosfatasa (1mM Na-ortovanadato). Las células se recogieron, se pasaron por agujas 20Gx1 in, y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Posteriormente se centrifugaron en frío para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se procesó inmediatamente o se guardó a -70°C.

3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunoblot.

Muestras con idéntica cantidad de proteína (35 µg, excepto en el caso de extractos para detección de Ets, que fué 10 µg) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10% (detección de Ets) o al 7.5% (resto de anticuerpos), tal como describió Laemmli (1970). Las proteínas contenidas en los geles de poliacrilamida se transfirieron electroforéticamente a membranas de Immobilon-P (Millipore) a 3 mA/cm² durante 45 minutos en aparato de transferencia semiseco en Tris-glicina 1x, 20% metanol. Las membranas se tiñeron con 0.1% Rojo Ponceau en 1% ácido acético para comprobar la eficiencia de la transferencia y se destiñeron con 1% ácido acético.

Posteriormente las membranas se incubaron con solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente o 16 h a 4 °C, se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente o 16 h a 4°C, se lavaron con solución de lavado 4 veces durante 15 minutos, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, se volvieron a lavar, y se revelaron.

En el caso de detección de CD-E y de CD-P el bloqueo se hizo en 2% ovoalbúmina en NET y los lavados e incubaciones en NET. El anticuerpo secundario anti-rata empleado para detección de CD-E estaba acoplado a la enzima peroxidasa y el revelado se realizó por luminiscencia con el reactivo ECL (Amersham). En el caso de CD-P se empleó ¹²⁵I-anti-Ig de rata y se detectó por exposición a película autorradiográfica.

La solución de bloqueo para detección de involucrina fué 2% leche desnatada (Central Lechera Asturiana) en T-TBS y los lavados e incubaciones se realizaron en T-TBS. El anticuerpo secundario anti-conejo estaba acoplado a fosfatasa alcalina y el revelado se realizó con los reactivos BCIP y NBT.

Para inmunodetección de Ets se empleó como solución de bloqueo 5% leche desnatada en T-TBS. Las incubaciones se realizaron en T-TBS, 0.4% BSA y los lavados en T-TBS. El anticuerpo secundario anti-conejo estaba acoplado a peroxidasa. El revelado se realizó por luminiscencia con el reactivo ECL (Amersham).

4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN *IN VITRO* EN GELES DE COLÁGENO.

La capacidad migratoria de las células a través de geles de colágeno se midió utilizando la cámara Boyden de dos compartimentos modificada. Se recubrieron filtros de policarbonato de 8 μm de diámetro de poro (Nucleopore) con 5 μg por filtro de colágeno tipo IV durante 16 h y se colocaron en la cámara modificada de Boyden. Se rellenó el compartimento inferior con medio condicionado de fibroblastos NIH3T3 (que actúa como quimioatrayente) o con 0.1% BSA como control negativo. El medio condicionado se obtuvo por incubación de cultivos semiconfluentes de NIH3T3 con medio sin suero durante 48 h. Posteriormente se sembraron 2×10^6 células resuspendidas en medio completo con 0.1% BSA en el compartimento superior de la cámara, sobre el filtro recubierto de colágeno. Las cámaras se colocaron en un incubador a 37°C, 5% CO₂, durante 6 h. Finalmente las células del compartimento inferior, y las células adheridas a la parte inferior de los filtros se recogieron y contaron. Los ensayos se efectuaron con las células creciendo a alta densidad. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

5. ENSAYOS DEL COMPORTAMIENTO *IN VIVO* DE LOS CLONES TRANSFECTANTES.

5.1. Ensayos de tumorigenicidad.

Para los ensayos de tumorigenicidad de las distintas líneas celulares éstas se inyectaron subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (nu/nu) entre 8 y 10 semanas de edad. Las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS a una densidad de 10^7 células/ml. Se inyectaron 10^6 células en cada costado del ratón.

Tras la inyección se observaron los ratones hasta detectar la aparición de tumores, considerándose como tiempo de latencia el tiempo que tardó en desarrollar un tumor detectable de 0.5 cm³ de volumen. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño entre 1.5 y 2 cm de diámetro los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores para su posterior análisis.

5.2. Ensayos de metástasis espontánea.

Las células en cultivo se tripsinizaron con 0.25% tripsina, 0.02% EDTA, se lavaron con medio de cultivo y se resuspendieron en HBSS (Gibco BRL) a una concentración de 5×10^6 células/ml. Se inocularon intradérmicamente 0.2 ml de esta suspensión en un costado del ratón. Cuando el tamaño de los tumores generados alcanzó 1.2 cm de diámetro, los ratones se anestesiaron, se extirparon los tumores y se cerraron las incisiones con puntos. Los ratones se sacrificaron y examinaron cuando estaban moribundos o hasta 60 días después de extirpar el tumor primario. Se investigó la existencia de tumores en todos los órganos viscerales, siguiendo criterios morfológicos e histológicos. Los pulmones se extirparon, se fijaron y se examinó la presencia de metástasis.

6. DETECCIÓN DE PROTEASAS POR ZIMOGRAFÍA.

6.1. Detección de la actividad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).

- Obtención de células y medio condicionado.

Se crecieron las células hasta un 90% de confluencia, se lavaron con PBS y se sustituyó el medio normal de crecimiento por medio sin suero. Se condicionó este medio durante 24 h, tras las cuales se recogió el medio condicionado y las células, raspándolas en PBS. La concentración de proteína se cuantificó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

- Detección de uPA por difusión reversa.

Las muestras (medio condicionado o extracto total) se resuspendieron en solución Laemmli de carga sin β -mercaptoetanol y se sometieron a electroforesis en geles de 10% poliacrilamida-SDS. El SDS se eliminó por lavados (2 x 30 minutos) en 1.5% Triton X-100. Tras lavar con agua destilada se superpuso el gel sobre otro gel de agarosa al 1% conteniendo 0.5% caseína, 2 μ g/ml plasminógeno, 20 mM CaCl_2 , o bien, como control, el mismo gel sin plasminógeno.

Los geles se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda hasta la visualización de bandas transparentes de degradación de la caseína por el plasminógeno activado por el uPA. La reacción se paró con 5% CuCl_2 .

6.2. Detección de actividad gelatinolítica.

- Obtención de medio condicionado.

Las células crecidas a 90% de densidad se incubaron con medio sin suero durante 24 h. Este medio condicionado se centrifugó para eliminar sedimentos (3500 g, 15 minutos a 4°C) y se concentró en microconcentradores Centricon-30. La concentración de proteína se midió por por BCA (Bio-Rad).

- Zimografía para detección de la actividad gelatinolítica del medio condicionado.

La detección de actividad gelatinasa en el medio condicionado de los cultivos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Welch *et al.* (1990). El medio condicionado de cada línea correspondiente a 12 µg de proteína se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS embebidos en gelatina. Posteriormente se eliminó el SDS del gel mediante lavados en 2.5% Tritón X100, 50mM Tris-HCl pH 7.5. Los geles se incubaron durante 48 h a 37°C en 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, NaN₃ 0.05%. Se tiñó el gel con azul de Coomassie durante 3 h y se destiñó con 10% ácido acético, 10% isopropanol. La actividad gelatinasa se detectó como bandas transparentes sobre el fondo azul del gel.

7. ANÁLISIS DE RNA POR TRANSFERENCIA A MEMBRANA (NORTHERN-BLOT).

7.1. Obtención de RNA.

Para analizar los niveles de RNA mensajero de CD-E y de CD-P se aisló RNA total de las distintas líneas celulares por el método del tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Para analizar la expresión de las diferentes metaloproteinasas se aisló mRNA poli-A⁺, empleando el kit de aislamiento de mRNA "Ribosept" (Collaborative Biomedical Products).

7.2. Purificación y marcaje de sondas.

Cada uno de las sondas obtenidas por digestión de plásmidos se purificó por el sistema "GeneClean" (Bio 101 Inc.) o columnas "Quiakit" (Quiagen) a partir de geles de agarosa.

El marcaje con ³²P-αdCTP (Amersham) de las distintas sondas se realizó por el método del cebado de los oligonucleótidos al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

7.3. Ensayo de Northern-blot.

30 µg de RNA total o 15 µg de RNA poli-A⁺ se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% con tampón formaldehído-fosfato (Rave *et al.*, 1979) y se transfirieron al vacío (5 in. Hg, 2 h) a membranas de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) en tampón 10x SSC. El RNA se fijó a la membrana con luz UV (aparato UV 2400 Stratallinker, Stratagene).

Las membranas se hibridaron durante 2 h a 65°C con tampón de prehibridación (4x SSC, 5 mM EDTA, 2% SDS, 10x solución Denhardt, 20 mM H₂NaPO₄ pH 7.0, y 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado) y posteriormente con las sondas apropiadas marcadas con ³²P en tampón de prehibridación durante 16-20 h a 65°C. Las membranas se lavaron con 2xSSC, 0.1% SDS durante 10 minutos a temperatura ambiente y

2 veces durante 30 minutos a 65°C. Finalmente se lavaron con 0.1xSSC, 0.1% SDS 20 minutos a 65°C. Las membranas se expusieron a -70°C con película autorradiográfica empleando pantallas amplificadoras.

8. ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA.

8.1. Transfección transitoria.

Las transfecciones transitorias se realizaron por el método de precipitación con fosfato cálcico para células adherentes siguiendo el protocolo descrito para las transfecciones estables (Aptdo. 2). En general se empleó 5 µg de plásmido de interés y 2 µg de plásmido control de eficiencia de transfección. A las 16 h se lavó el DNA con PBS y se añadió medio de crecimiento. Las células se recogieron transcurridas 24 h, a confluencia, para medir actividad CAT, luciferasa, o β-galactosidasa.

8.2. Preparación de extractos celulares.

Las células transfectadas y a confluencia se recogieron y lavaron varias veces con PBS 1x frío. Tras la última centrifugación se resuspendieron en tampón de lisis (0.1 M KH₂PO₄ pH7.8) y se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se empleó directamente para medida de actividad enzimática o se congeló a -20°C.

8.3. Ensayos CAT.

La actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT), como medida de actividad del promotor de CD-E, se determinó en cantidades de extracto celular normalizadas según la actividad luciferasa. El extracto celular se incubó a 37°C durante 4-8 h con 0.1 µCi de [¹⁴C]-cloranfenicol (54mCi/mmol, DuPont) y acetilcoenzima A 4 mM en presencia de Tris-HCl 250 mM pH 7.8, EDTA 5mM (Gorman *et al.*, 1982). La reacción se paró con 1 ml de acetato de etilo, se separaron las fases orgánicas y acuosas por centrifugación, y se recogió la fase orgánica, que contenía el [¹⁴C]-cloranfenicol. Las formas acetiladas y no acetiladas de [¹⁴C]-cloranfenicol se separaron mediante cromatografía en capa fina en placas de silicagel (Merck), utilizando como solvente una mezcla de cloroformo y metanol (92.5:7.5).

El porcentaje de acetilación se determinó mediante la cuantificación de la radiactividad presente en cada una de las formas acetiladas y no acetiladas, con la ayuda de un equipo Instant-Imager (Hewlett-Packard) o mediante la cuantificación de las bandas cortadas utilizando un contador de centelleo.

8.4. Medida de actividad luciferasa.

En los experimentos de análisis de actividad del promotor de CD-E, se midió la actividad de CMV-luc como control de eficiencia de transfección. En cada experimento se emplearon volúmenes iguales de extracto celular de cada muestra.

En los experimentos de análisis de actividad transcripcional dirigida por el promotor de CD-P o construcciones híbridas CD-E/CD-P acopladas al gen de luciferasa, las cantidades de extracto celular empleadas para medir actividad luciferasa se normalizaron respecto a la actividad β -galactosidasa.

La actividad luciferasa se valoró siguiendo las indicaciones del sistema de ensayo de luciferasa de Promega, empleando luciferina como sustrato, en un luminómetro Berthold-BioLumat.

8.5. Medida de actividad β -galactosidasa.

La medida de actividad β -galactosidasa se empleó como control de eficiencia de transfección en los experimentos de análisis de actividad promotora de CD-P y de promotores híbridos CD-E/CD-P. Se midió la actividad en volúmenes iguales de extracto celular, en cada experimento, según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

9. ENSAYOS DE CAMBIO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL.

9.1. Obtención de extractos nucleares.

Los extractos nucleares se obtuvieron según el protocolo descrito por Shapiro (1988) para células HeLa. La concentración de proteína se midió con el reactivo de Bradford (Bio-Rad), y los extractos se conservaron a -70°C en alícuotas pequeñas.

9.2. Ensayos de retardo en gel.

El oligonucleótido o fragmento, de cadena doble y con extremos 5' protuberantes, se marcó por incubación con la enzima Klenow, los deoxinucleótidos apropiados y ^{32}P - αdCTP (Amersham).

2-10 μg de extractos nucleares se incubaron con 10.000 cpm de la sonda marcada (aprox. 0.2 ng) en tampón de retardo en gel (60mM KCl, 2mM MgCl_2 , 10% glicerol, 0.1-5mM EDTA, 1mM DTT, 20 mM Hepes pH7.9), en un volumen final de 10-15 μl . Cuando la presencia de zinc era necesaria para la formación de los complejos, se incluía en la mezcla de incubación 1-4 mM de Zn_2SO_4 . Como competidor inespecífico se incluyó 1 μg de poli(dI-dC), y en ocasiones también 90 μg de BSA. Las incubaciones se realizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, salvo en el caso del oligonucleótido ECE, que fueron durante 30 minutos a 0°C .

Los complejos DNA-proteína formados se analizaron en geles de poliacrilamida al 5% en TBE 0.5x. Posteriormente los geles se secaron (80°C a vacío) y se expusieron a películas autorradiográficas a -70°C.

9.3. Ensayos de competición.

En los experimentos de competición se añadió a la mezcla de incubación un exceso (40 a 250 veces) del oligonucleótido frío empleado en cada caso, previo a la adición del oligonucleótido marcado.

9.4. Ensayos de super-retardo.

Aproximadamente 1.5 µg de anticuerpo de conejo policlonal anti-AP2 o anti-SP1 (Santa Cruz Biotechnology) o de IgG de conejo purificada se añadió a la mezcla de incubación, después de la adición del oligonucleótido marcado y de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo se realizó a temperatura ambiente durante otros 20 minutos adicionales.

10. EXPERIMENTOS DE PROTECCIÓN A DNAasaI O DE FOOTPRINTING IN VITRO.

10.1. Proteínas purificadas y extractos nucleares.

Los extractos nucleares se obtuvieron de igual forma que para los ensayos de cambio de movilidad electroforética en gel.

Las factores de transcripción recombinantes humanos purificados SP1 y AP2 se obtuvieron de Promega.

10.2. Obtención y marcaje de la sonda.

Se empleó como sonda un fragmento de la región promotora de CD-E que comprendía la secuencia entre -178 y +17, marcado en el extremo 3' de la cadena no codificante.

El plásmido -178 (ver Materiales, Apto. 8.2.1) se digirió con la enzima de restricción XbaI y se marcó en los extremos generados por incubación con la enzima Klenow, los deoxinucleótidos apropiados y ³²P-αdCTP. Tras la posterior digestión con el enzima de restricción KspI (que corta en la posición +17 del promotor) los fragmentos originados se separaron en gel de acrilamida al 5%. Los fragmentos marcados se visualizaron por exposición del gel a película autorradiográfica y se recortó la banda de poliacrilamida que contenía el fragmento deseado. El DNA así marcado se eluyó del fragmento de gel y se purificó en columnas NACS PREPAC (Gibco, BRL).

10.3. Secuenciación química por Maxam-Gilbert.

Para las reacciones control de secuencia se empleó el kit de secuenciación de Maxam-Gilbert (Merck). Se emplearon 100.000 cpm (reacciones de G) o 250.000 cpm (reacciones de A+G) de la sonda marcada.

10.4. Digestión con DNAasaI y separación de los fragmentos en gel.

La reacción de digestión con DNAasaI se realizó como se describe en Hennighausen y Lubon (1987). Alrededor de 50 µg de extractos nucleares o 1 fpu de los factores puros SP1 o AP2 se incubaron con 15.000 cpm (alrededor de 1-2 ng) de la sonda marcada en presencia de 1 µg de poli(dI-dC) en tampón de equilibrado (50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glicerol, 20 mM Hepes-KOH pH7.5) en un volumen de 50 µl. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió MgCl₂ y CaCl₂ a una concentración final de 5mM y 1 mM, respectivamente, tras lo cual se añadió a la mezcla de incubación de 60 a 100 ng de la enzima DNAasa I. A los 30 segundos se paró la reacción de digestión con solución de parada (0.37% SDS, 15 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH7.6).

Las reacciones control se realizaron de igual forma pero en ausencia de extracto nuclear o proteína purificada y en ausencia también del competidor inespecífico poli(dI-dC). La cantidad de DNAasa I empleada en este caso fué alrededor de 10 ng.

Los fragmentos generados por la digestión con DNAasa I y por la secuenciación química de Maxam-Gilbert se separaron en geles de secuenciación (8% acrilamida, 8M urea en TBE 1x). Los geles se secaron a 80°C a vacío y se expusieron a película autorradiográfica a -70°C.

11. ANÁLISIS DEL ESTADO DE METILACIÓN ENDÓGENA DEL DNA.

11.1 Obtención de DNA genómico.

El DNA se obtuvo a partir de las células en cultivo según métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989).

11.2. Purificación y marcaje de la sonda.

Un fragmento correspondiente a las posiciones -800/+92 del promotor de CD-E obtenido por digestión del plásmido -800 (ver Materiales, Apto. 8.2.1) con XbaI se aisló a partir de gel de agarosa y se marcó con ³²P-αdCTP (Amersham) por el método del cebado de los oligonucleótidos al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

11.3. Digestión del DNA y ensayo de Southern-blot.

El DNA de cada una de las líneas celulares a analizar se sometió a digestión con el enzima de restricción BamHI (15 U/ µg de DNA). Alícuotas de 10 µg de DNA se sometieron a una segunda digestión con 15 U/ µg de las enzimas de restricción HaeII (sensible a

metilación), HpaII (sensible a metilación), o MspI (isoesquizómero de HpaII, no sensible a metilación).

El DNA se fraccionó en geles de agarosa al 1% (digestiones control y HaeII) o al 1.2% (digestiones con HpaII y MspI), se transfirió al vacío (5 in. Hg, 2 h) a membranas de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad) en tampón 10x SSC y se fijó el DNA a las membranas con luz UV (aparato UV 2400 Stratallinker, Stratagene).

Las membranas se hibridaron durante 2 h a 65°C con tampón de prehibridación (6x SSC, 0.5% SDS, 5x solución Denhardt, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado) y posteriormente con la sonda marcada con ³²P en tampón de hibridación (igual composición que el tampón de prehibridación excepto 2x solución Denhardt) durante 16-20 h a 65°C. Las membranas se lavaron comenzando con 2x SSC-0.5% SDS a temperatura ambiente y terminando con 0.1x SSC- 0.5% SDS a 65°C. Las membranas se expusieron a -70°C con película autorradiográfica empleando pantallas amplificadoras.

12. EXPERIMENTOS DE FOOTPRINTING *IN VIVO* .

12.1. Metilación y obtención del DNA.

Las células, crecidas en placas de 15 cm de diámetro y a confluencia, se sometieron a metilación *in vivo* por tratamiento con el agente metilante dimetilsulfato (DMS). Se retiró el medio de crecimiento y se sustituyó por medio de crecimiento conteniendo 0.5% DMS (tamponado con Hepes-KOH pH 7.5) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron posteriormente con PBS frío, se recogieron, y se extrajo el DNA por procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la obtención del DNA control, metilado *in vitro*, 20 µg de DNA genómico de las líneas celulares se trataron durante 1 minuto a temperatura ambiente con 0.5% DMS en 200 µl de solución 1mM EDTA, 50 mM Na-cacodilato. La reacción de metilación se paró con 50 µl de solución de parada (1.5M Na acetato, 1M β-mercaptoetanol).

12.2. Digestión con piperidina.

Tanto el DNA metilado *in vivo* como el DNA control metilado *in vitro* se sometieron a digestión química en los residuos metilados con el agente piperidina. El DNA se resuspendió en 100 µl de piperidina al 10% y se digirió durante 30 minutos a 90°C.

12.3. Amplificación por PCR mediada por adaptador.

A continuación la escalera de DNA generada por digestión con piperidina se amplificó específicamente en la región 5' proximal del gen de CD-E y se marcó con ³²P, según el protocolo descrito en Mueller y Wold (1989). Todos los oligonucleótidos empleados en estos experimentos se describen en Métodos (Aptdo 9.3). En la Fig. 7 se muestra una representación esquemática de las reacciones llevadas a cabo:

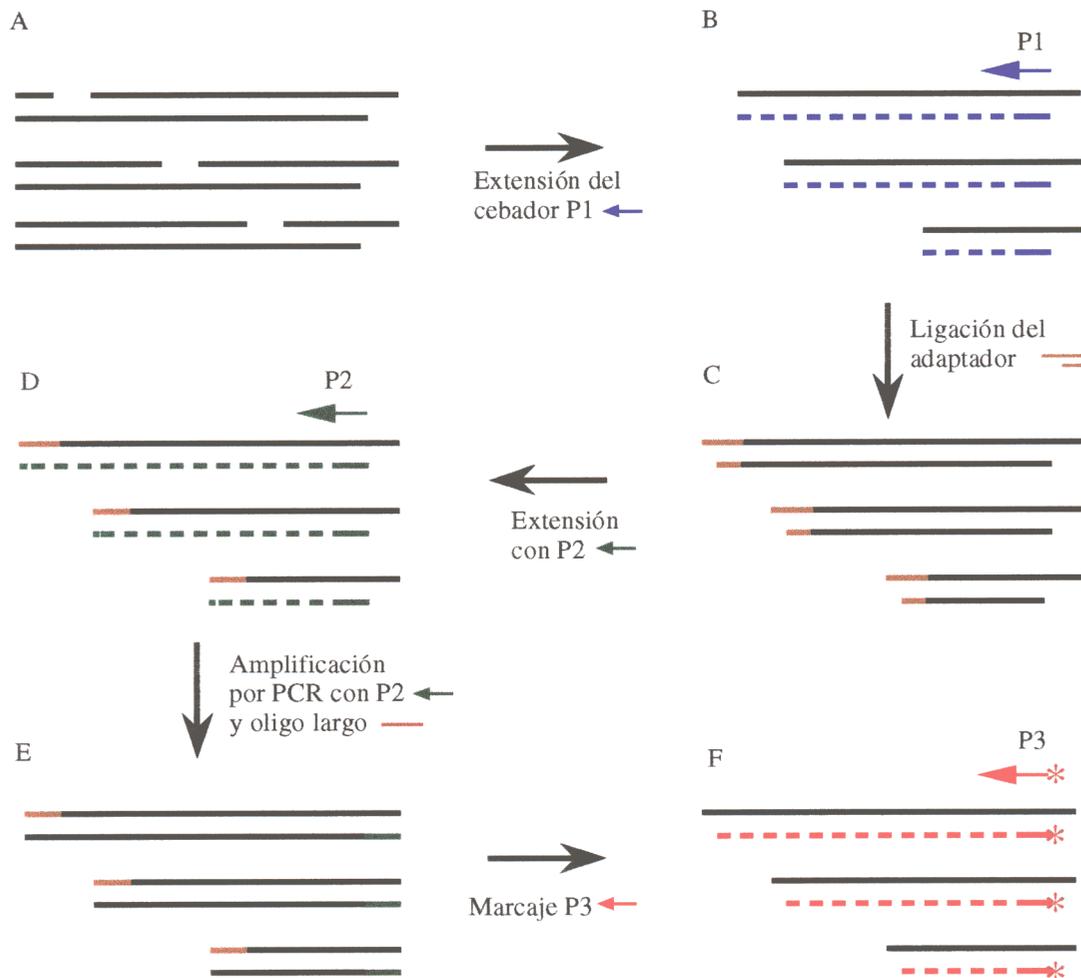


Figura 7. Representación esquemática de los experimentos de footprinting *in vivo* por amplificación mediada por adaptador. El DNA genómico metilado con DMS *in vivo* o *in vitro* y cortado con piperidina, sirve como punto de partida (A) para la reacción de extensión del cebador con el oligonucleótido P1, específico del gen a estudiar. Así se genera DNA de doble cadena con un extremo romo (B). Después se añade una secuencia definida de DNA a los extremos variables mediante ligación del adaptador común a los extremos romos de las moléculas de DNA (C). La posterior extensión con el cebador P2, más interno a P1, aumenta la especificidad y genera DNA con extremos definidos (D) apropiados para amplificación por PCR con los cebadores P2 y el oligonucleótido largo del adaptador. Se genera así una población de fragmentos de DNA de tamaño variable según el residuo de guanina metilado y cortado con piperidina (E). Estos fragmentos de DNA se marcan por extensión con el oligonucleótido P3 marcado radioactivamente (F) y se separan en gel de secuenciación.

a) Extensión del cebador.

3 μ g de DNA digerido con piperidina se sometieron a la reacción de extensión del cebador empleando los oligonucleótidos P1 (U1 o L1 para la cadena codificante o no codificante, respectivamente). La reacción se llevó a cabo incubando el DNA con 0.6 pmoles del oligonucleótido cebador durante 30 minutos a 45°C, tras lo cual se añadieron los deoxinucleótidos (dNTPs) y enzima Sequenasa (Sequenasa versión 2, USB) y se incubó durante 15 minutos a 45°C. La reacción se paró en hielo y la Sequenasa se inactivó por calor (67°C).

b) Reacción de ligación del adaptador.

A la mezcla de reacción anterior se añadió el adaptador (ver Materiales, Apto. 9.3), ATP y la enzima T4 DNA ligasa. Se incubó durante 16 h a 15°C y se paró la reacción a 70°C durante 10 minutos.

c) Amplificación por PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un aparato Perkin-Elmer 2400. Se emplearon como cebadores el oligonucleótido P2 (U2 o L2 según se trate de la cadena codificante o no codificante) y el oligonucleótido largo del adaptador. Se preparó una mezcla de reacción con el DNA, los oligonucleótidos cebadores, dNTPs y la enzima Taq polimerasa. Las condiciones de la reacción de PCR fueron:

Cadena codificante: 30 ciclos (1 minuto 94°C, 2 minutos 65°C, 3 minutos 76°C).

Cadena no codificante: 20 ciclos (1 minuto 94°C, 1 minuto 45°C, 3 minutos 72°C).

d) Marcaje.

Los oligonucleótidos P3 (U3 y L3) se marcaron en el extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido kinasa y ^{32}P - γ ATP.

El DNA se marcó mediante un último ciclo de PCR (2 minutos 94°C, 2 minutos 65.5°C, 10 minutos 72°C) tras agregar 2 pmoles del oligonucleótido P3 marcado con ^{32}P , nueva enzima Taq polimerasa y dNTPs.

12.4. Separación en gel y visualización.

Los productos de las reacciones de la amplificación por PCR mediada por adaptador se separaron en geles de secuenciación (8% acrilamida, 8M urea en TBE 1x). Los geles se secaron y se expusieron a película autorradiográfica -70°C.

RESULTADOS

1. PAPEL DE LA CADHERINA-E EN EL COMPORTAMIENTO MALIGNO DE QUERATINOCITOS TUMORALES DE RATÓN.

Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto el papel de la molécula de adhesión CD-E como molécula anti-invasiva. En concreto, en queratinocitos transformados de ratón, y empleando el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, estudios previos pusieron de manifiesto una relación inversa entre la CD-E y la capacidad invasiva (Caulín *et al.*, 1996), como se ha indicado en la Introducción. En este estudio, en el que se analizaron los mecanismos moleculares que inducen un comportamiento invasivo y metastásico, se analizó la línea celular HaCa4 y una serie de líneas originadas por transfección de HaCa4 con el cDNA de CD-E (Navarro *et al.*, 1991; ver también Tabla II y Fig. 5). Así, se pudo comprobar que tanto la capacidad tumorigénica como la capacidad invasiva *in vitro* estaban relacionadas con la ausencia de CD-E en las líneas celulares estudiadas (Tabla III). También se analizó la capacidad metastásica de dichas líneas celulares, y en este caso no se encontró una relación clara con la CD-E, ya que algunas de las líneas celulares que expresaban dicha molécula por transfección, como E62, seguían mostrando un comportamiento metastásico; mientras que la línea celular E24, que había reactivado por mecanismos desconocidos la expresión de CD-E endógena, era no metastásica.

Tabla III. Características de las líneas celulares empleadas en los estudios de funcionalidad de CD-E.

Línea celular	Niveles de CD-E ⁽¹⁾	Niveles de v-Ha-ras ⁽²⁾	Migración <i>in vitro</i> ⁽³⁾	Capacidad metastásica ⁽⁴⁾
HaCa4	-	+++	+	+
Neo3	-	+++	+	+
E58	-	+++	+	+
E62	++	+++	-	+
E24	+ / +++	+	-	-
MCA3D	++	-	-	-

(1) Los niveles relativos de CD-E se estimaron a partir de datos de Northern-blot e inmunoblot (Navarro *et al.*, 1991; ver también Fig. 8).

(2) Los niveles de v-Ha-ras se estimaron a partir de datos de Northern-blot e inmunoprecipitación con anti-p21 ras (Caulín *et al.*, 1996).

(3) Capacidad migratoria a través de geles de colágeno (Caulín *et al.*, 1996; ver Métodos).

(4) La capacidad metastásica se estimó analizando la metástasis espontánea (inyección intradérmica en ratones nu/nu y extirpación del tumor primario) y la metástasis experimental (inyección de las células en la vena de la cola del ratón). Se determinaron las metástasis pulmonares (Caulín *et al.*, 1996).

Como se muestra en la figura 8A, el tamaño del mensajero transfectado (3.9 Kb, líneas celulares E62 y E54) era sensiblemente menor al endógeno (4.5 Kb). Sin embargo, el tamaño de proteína de CD-E sintetizada era el mismo (124 KDa, Fig 8C) y la CD-E exógena era funcional y se asociaba con cateninas, de igual forma que la CD-E endógena (Caulín *et al.*, 1996).

Debido al origen de la línea HaCa4 (ver Materiales, Apto.4), estas líneas tienen integrado en su genoma secuencias de Ha-ras viral (v-Ha-ras). El análisis en estas líneas de los niveles de Ha-ras mostró que la línea celular E24 presentaba niveles mucho menores de mRNA de v-Ha-ras y de proteína p21 ras que el resto de líneas celulares. Por tanto, en este sistema, el comportamiento metastásico podría estar relacionado con los niveles de Ha-ras, más que con la expresión de CD-E (Caulín *et al.*, 1996).

Nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos de invasividad y metástasis, y en concreto caracterizar mejor los mecanismos que hacen que la línea celular E24 sea menos agresiva y presente un fenotipo no metastásico. Nos interesaba también estudiar el posible papel que la CD-E pudiera tener en este comportamiento, puesto que, aunque la CD-E exógena transfectada en la línea metastásica E62 era funcional, no se podía descartar alguna característica diferencial con la CD-E endógena de la línea E24.

El abordaje experimental para conseguir este objetivo fue bloquear la CD-E endógena de la línea E24 por transfección de un cDNA antisentido de CD-E y analizar el fenotipo y comportamiento tumoral y metastásico de los transfectantes obtenidos.

1.1. Generación de transfectantes de la línea celular E24 con un vector de CD-E antisentido.

El vector antisentido para CD-E p β act-dacE se construyó a partir de los vectores pBATEM-2 y p β act-Pcad (Nose *et al.*, 1988), vectores de expresión de CD-E y de CD-P de ratón, respectivamente. Se aisló un fragmento de 2.5 Kb del cDNA de CD-E de ratón (nucleótidos 640 a 3170), por digestión de pBATEM-2 con EcoRI. Dicho inserto se clonó en posición antisentido en el vector de expresión p β act-Pcad, tras eliminar el fragmento correspondiente al cDNA de CD-P por digestión con EcoRI, originando así el vector p β act-dacE (Fig. 9). Por cortes con enzimas de restricción adecuadas (SmaI) y secuenciación del vector se comprobó la correcta orientación (inversa) del cDNA de CD-E. Por tanto, el vector p β act-dacE contiene un fragmento de 2529 nucleótidos (exones 4 a 16) del cDNA de CD-E de ratón en dirección inversa, situado detrás del promotor de β -actina.

Se transfectó la línea celular E24 (CD-E positiva) por el método del fosfato cálcico con el vector p β act-dacE y el vector de resistencia a puromicina pBSpac Δ P (clones antisentido) o el vector de resistencia a puromicina solo (clones control) (Fig. 10). Se seleccionaron los clones resistentes a puromicina y se analizó inicialmente la expresión de

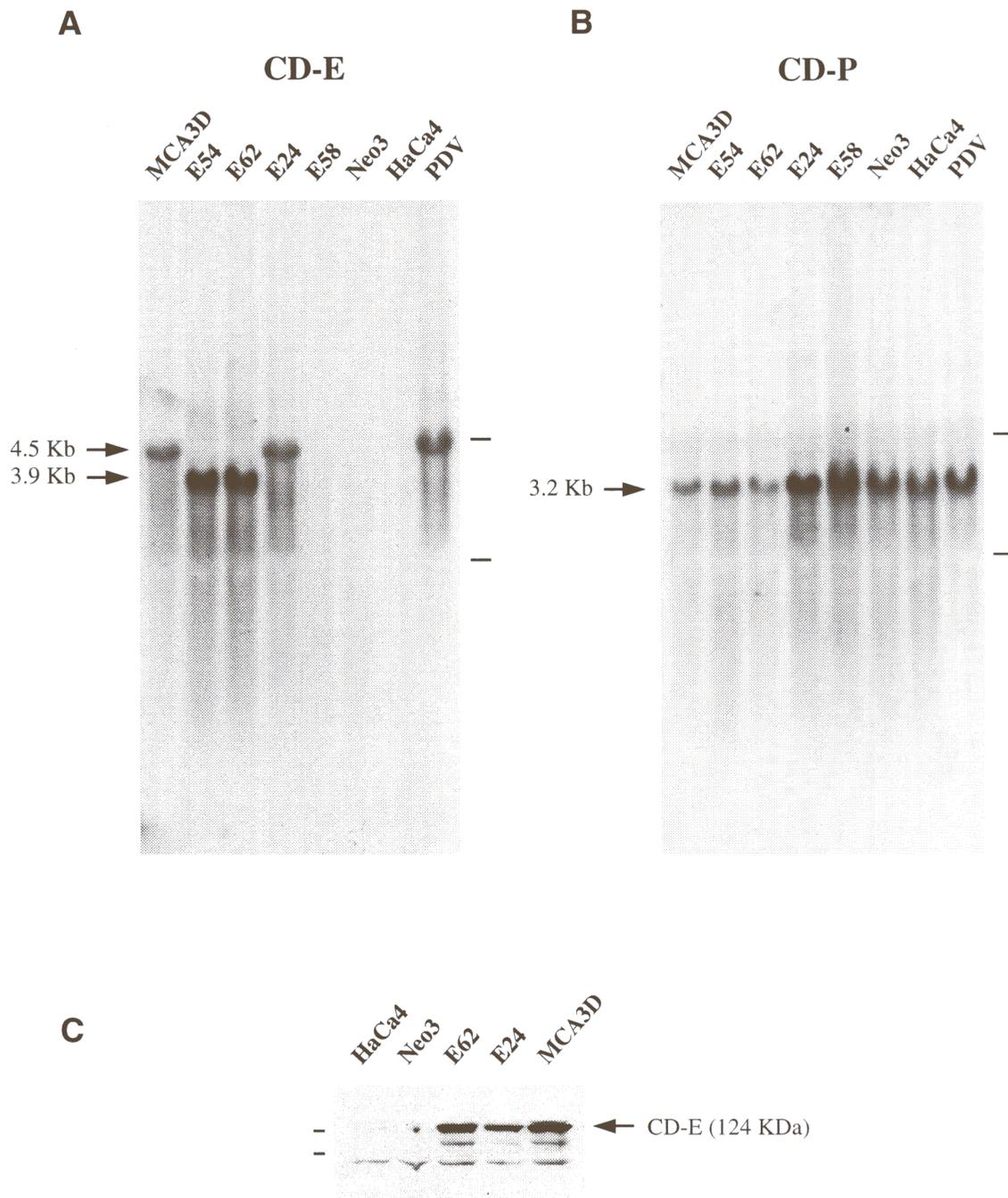


Fig. 8. Expresión de cadherinas en las líneas de queratinocitos de ratón.

A y B. Análisis de Northern-blot para CD-E y CD-P. 30 μ g de RNA total se sometieron a ensayos de Northern-blot con una sonda de cDNA de CD-E (A) y posteriormente con una sonda de cDNA de CD-P (B). Se indican con barras la migración de los RNA ribosómicos 28S y 18S. Las bandas de RNA correspondientes a CD-E y CD-P se indican con flechas a la izquierda. Observar que el tamaño del mRNA de CD-E endógeno es ligeramente mayor (4.5 Kb) al transfectado (3.9 Kb, carriles de E54 y E62). E54 es una línea obtenida en el experimento de transfección de HaCa4 con el cDNA de CD-E (Navarro *et al.*, 1991). El resto de líneas celulares se describe en el texto.

C. Ensayo de inmunoblot para CD-E. 35 μ g de extracto de proteína de las líneas indicadas se sometieron a inmunoblot con el anticuerpo ECCD-2. Se indica con una flecha la banda específica correspondiente a CD-E y con pequeñas barras a la izquierda los marcadores de peso molecular de 116 y 97.4. La banda de aproximadamente 105 KDa corresponde a un fragmento de degradación de CD-E, mientras que la banda de aproximadamente 95 KDa es inespecífica.

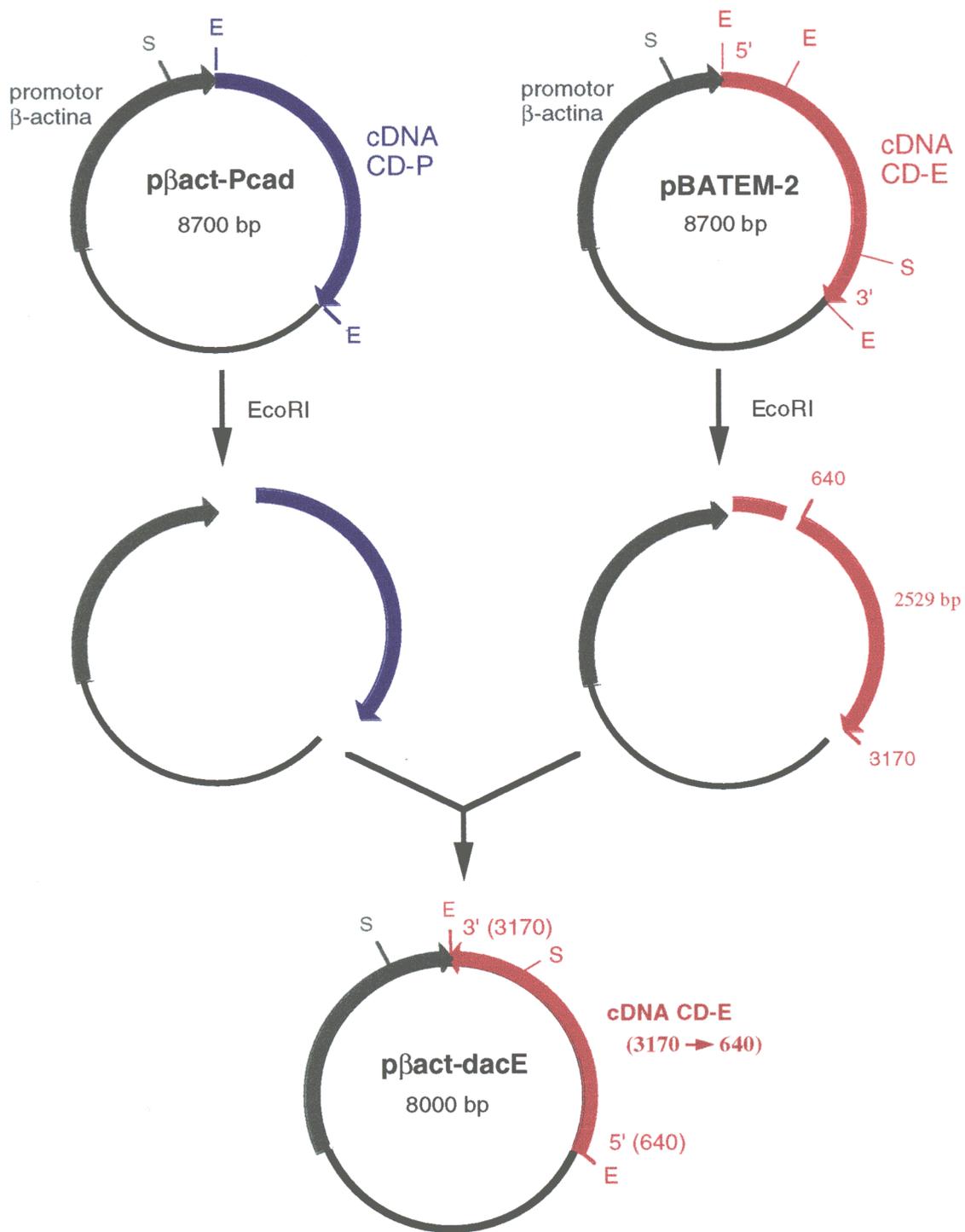


Fig. 9. Construcción del vector antisense de CD-E $p\beta\text{act-dacE}$. El fragmento EcoRI de 2.5 Kb correspondiente a los nucleótidos 640 a 3170 del cDNA de CD-E (rojo) se insertó en dirección inversa en el vector $p\beta\text{act-Pcad}$ tras eliminar la región codificante de CD-P (azul). De esta forma, el vector $p\beta\text{act-dacE}$ contenía un fragmento del cDNA de CD-E en dirección inversa, respecto al promotor de β -actina (verde). E, EcoRI. S, SmaI. El sitio SmaI se empleó para comprobar la orientación del inserto.

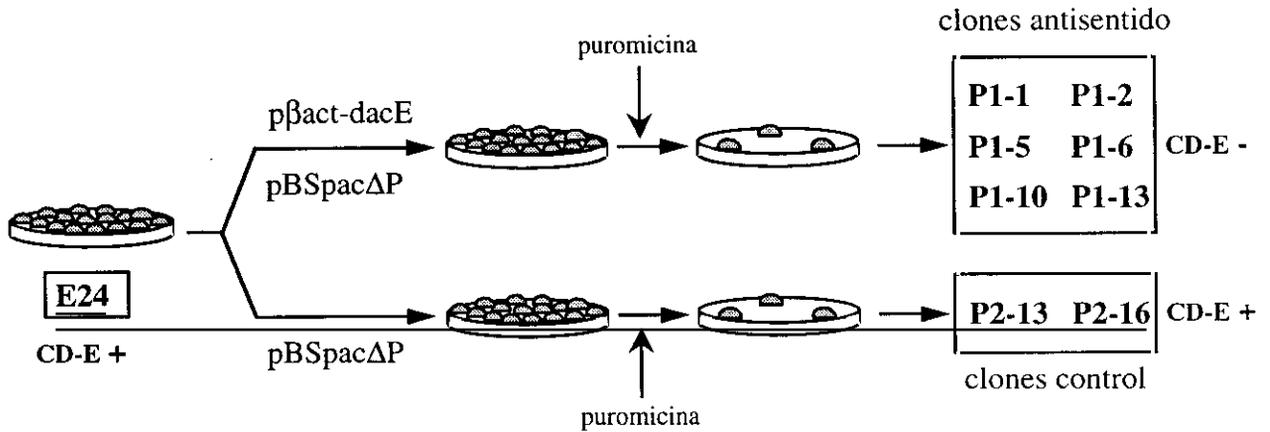


Fig. 10. Esquema del experimento de transfección con el vector antisentido de CD-E y de los clones obtenidos. La línea celular E24 (que expresa CD-E y es resistente al antibiótico G418) se transfectó con el vector de resistencia a puromicina pBSpac ΔP sólo o junto con el vector de expresión antisentido del cDNA de CD-E p βact-dacE. Se seleccionaron clones aislados resistentes al atibiótico puromicina: clones control que mantenían la expresión de CD-E (P2-13 y P2-16) y clones antisentido que habían perdido la CD-E (P1-1, P1-2, P1-5, P1-6, P1-10 y P1-13). CD-E + y CD-E -, clones que expresan y no expresan CD-E, respectivamente.

CD-E en dichos clones por inmunofluorescencia. Se seleccionaron así, para su posterior estudio los siguientes clones :

Antisentido: P1-1, P1-2, P1-5, P1-6, P1-10, P1-13.

Control: P2-13 y P2-16.

1.2. Caracterización inicial de los transfectantes.

Análisis de inmunofluorescencia y de inmunoblot mostraron que, tanto la línea parental (E24) como los clones control (P2-13 y P2-16) expresaban CD-E que se localizaba principalmente en los contactos célula-célula (Fig. 11 y 12A). En cambio, los clones transfectados con el vector antisentido de CD-E (P1-1, P1-2, P1-5, P1-6, P1-10 y P1-13) eran negativos o expresaban muy bajos niveles de CD-E (Fig. 12A). Tan sólo en algunos clones aparecían esporádicamente células aisladas o pequeños grupos de 2-3 células teñidas para CD-E, en capas suprabasales (observar Fig. 11, clon P1-5). Esta tinción esporádica también se observó ocasionalmente en la línea HaCa4.

La CD-P, la otra molécula de la familia de las cadherinas que se expresa en queratinocitos, presenta alta homología con la CD-E (58% de identidad aminoacídica). Por tanto, para comprobar la especificidad del experimento de transfección, fué necesario corroborar que el vector antisentido de CD-E no bloqueaba también la expresión de CD-P. Análisis de inmunofluorescencia (Fig. 11) y de inmunoblot (Fig. 12B) con el anticuerpo PCD-1 mostraron que todos los clones seguían manteniendo la expresión de CD-P, y que ésta se localizaba en las uniones celulares, como corresponde a su función adherente.

La morfología de los transfectantes (Fig. 11) no se alteró significativamente, manteniendo el fenotipo epitelial, aunque en algunos caso las células tienden a ser más pequeñas y redondeadas. La única diferencia morfológica destacable fué la pérdida a la tendencia a estratificar, característica de E24, que se mantuvo en las líneas control (observar Fig. 11). Esta tendencia a la estratificación se ha relacionado con un estado más diferenciado, a semejanza de lo que ocurre en una piel normal estratificada, donde las capas superiores son las más diferenciadas. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de involucrina (Fig. 12C), marcador de diferenciación terminal en células epiteliales.

1.3. Ensayos de migración *in vitro*.

La línea parental E24, el clon antisentido P1-5 y el control P2-13 se seleccionaron para una primera caracterización de la capacidad invasiva de estas células. Se midió su capacidad migratoria a través de geles de colágeno y se comparó con la de la línea celular HaCa4 (CD-E negativa).

Como se puede observar en la figura 13, el clon control P2-13 mantuvo una muy baja capacidad migratoria, al igual que la línea E24, mientras que el transfectante antisentido

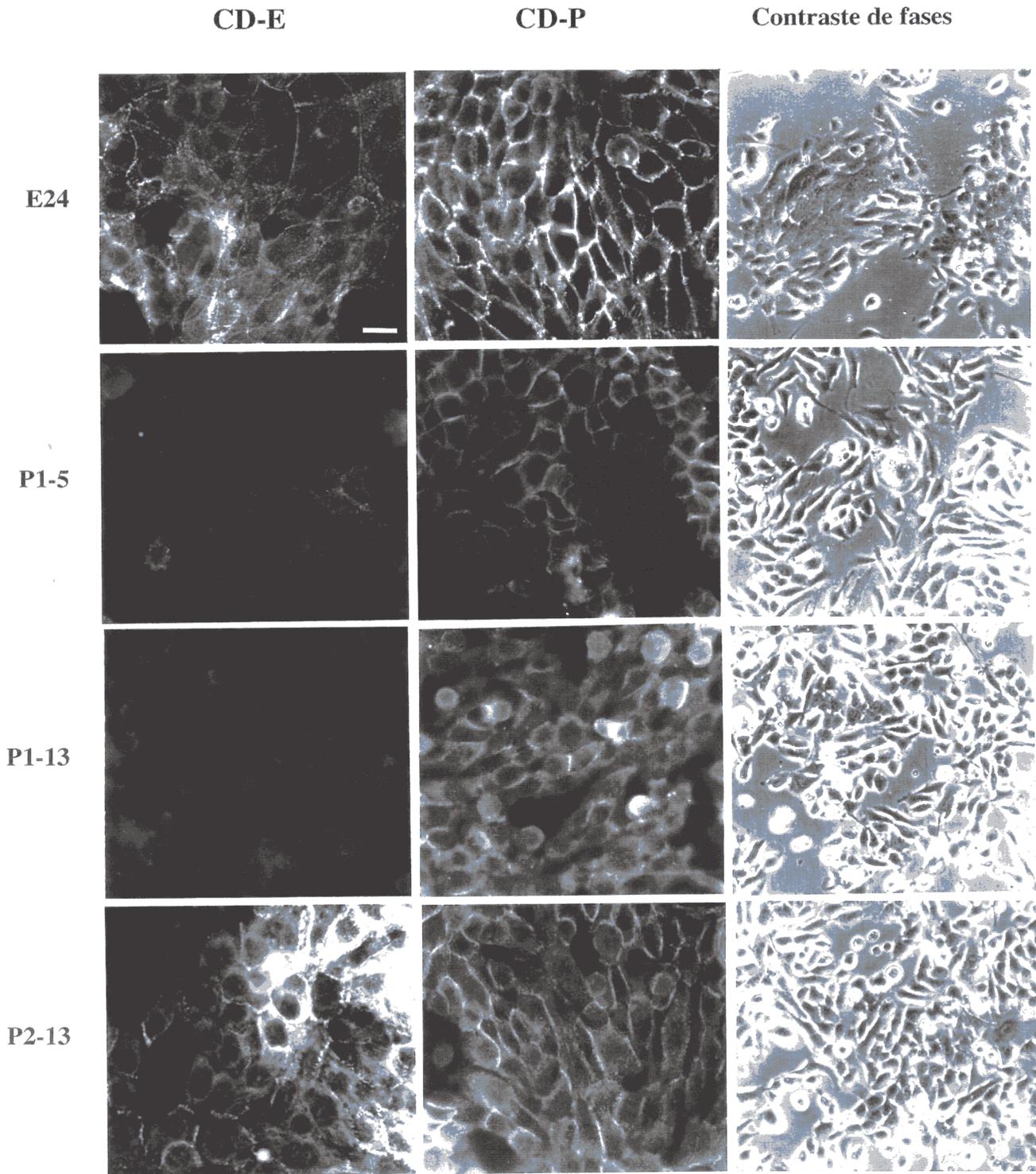


Fig. 11. Análisis morfológico y por inmunofluorescencia de los transfectantes.

Paneles izquierdo y central: Las células crecidas en cubreobjetos y fijadas con metanol se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD-E (ECCD-2) y anti-CD-P (PCD-1), respectivamente, seguido de anticuerpos secundarios anti-rata acoplados a rodamina. La barra de aumento corresponde a 15 μm .

Panel derecho: las células en cultivo se fotografiaron con un microscopio de contraste de fases (objetivo de 10 aumentos).

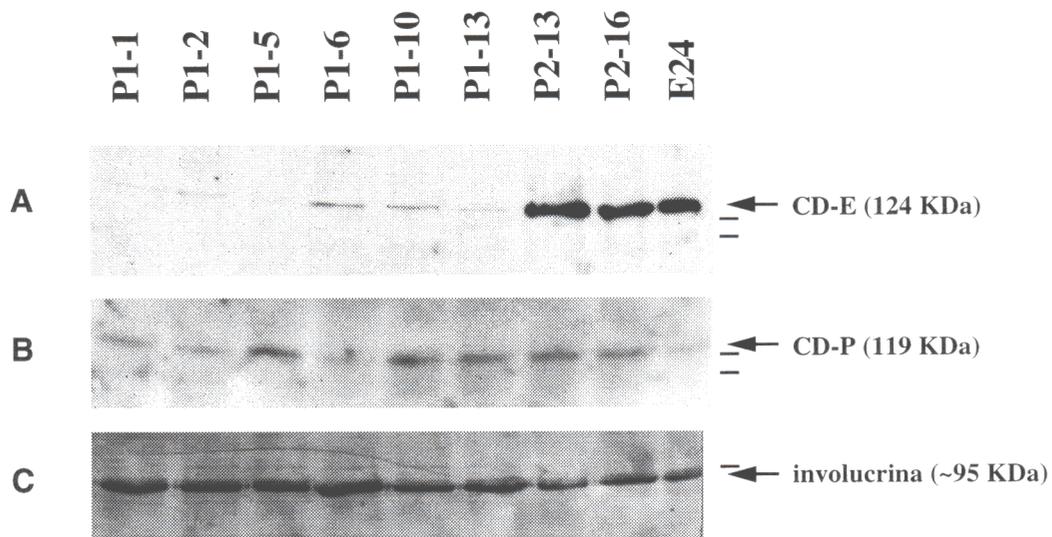


Fig. 12. Análisis por inmunoblot de marcadores epiteliales en los transfectantes. 35 μ g de extracto total de las distintas líneas celulares se sometieron a inmunoblot con anticuerpos anti-CD-E (ECCD-2) (panel A), anti-CD-P (PCD-1) (panel B) o anti-involucrina (panel C). Las flechas indican las bandas correspondientes a CD-E (124 KDa), CD-P (119 KDa) e involucrina (95 KDa aprox.). Los marcadores de peso molecular de 116 y 97.4 KDa para las cadherinas, y de 97.4 KDa para involucrina se indican con pequeñas barras a la derecha de cada panel.

P1-5 presentó una elevada capacidad migratoria a través de geles de colágeno, muy similar a la de la línea HaCa4.

Estos resultados muestran una correlación inversa entre la expresión de CD-E y la capacidad invasiva *in vitro* de las líneas celulares, corroborando observaciones previas.

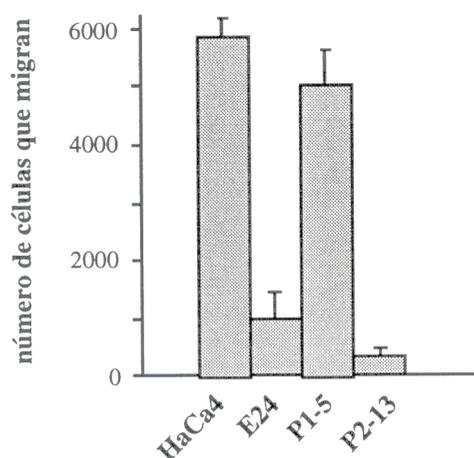


Fig. 13. Ensayo de migración en geles de colágeno tipo IV. Se midió la capacidad migratoria de las líneas indicadas en geles de colágeno tipo IV empleando la cámara de Boyden modificada y utilizando medio condicionado de fibroblastos NIH3T3 como quimioatrayente (ver Métodos, Apto. 4). En ordenadas se indica el número de células que atravesaron el filtro y pasaron al compartimento inferior. Las medidas se hicieron por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones standard.

1.4. Comportamiento *in vivo* de los transfectantes.

Para comprobar si la mayor capacidad migratoria *in vitro* inducida por la ausencia de CD-E se correspondía con un comportamiento más agresivo *in vivo*, se analizó la capacidad tumorigénica y metastásica de los transfectantes.

Los ensayos de tumorigenicidad se realizaron por inyección subcutánea de las células en ratones atímicos. Las diferentes líneas celulares (transfectantes antisentido y control) originaron tumores epidermoides moderadamente diferenciados en todos los sitios de inyección, similares a los producidos por E24 (Tabla IV y resultados no mostrados). No se apreciaron diferencias significativas ni en los períodos de latencia ni en la velocidad de crecimiento de los tumores entre las líneas antisentido y control y la línea parental E24.

La capacidad metastásica de las líneas celulares se analizó inyectando intradérmicamente las células en ratones atímicos y extirpando los tumores generados cuando alcanzaron un tamaño de 1.2 cm de diámetro. Los ratones se sacrificaron a los 10-60 días

tras la extirpación del tumor primario o cuando estaban moribundos. Ni E24 ni los controles de la transfección generaron focos metastásicos (hasta 60 días después de extirpar el tumor) (Tabla IV). Por el contrario, los transfectantes antisentido analizados (P1-5, P1-10 y P1-13) originaron metástasis pulmonares en todos los casos, con un nivel variable de focos por pulmón. Sólo se encontraron focos metastásicos en los pulmones, y no en otras vísceras.

Estos resultados apoyan fuertemente el papel de la CD-E como molécula anti-invasiva. El bloqueo de la expresión de CD-E en la línea E24 induce un fenotipo invasivo y metastásico.

Tabla IV. Análisis de la capacidad metastásica de HaCa4, E24 y los clones transfectados con el cDNA antisentido de CD-E⁽¹⁾.

Línea celular	Metástasis pulmonar			experimento
	Incidencia tumoral ⁽²⁾	Incidencia de metástasis ⁽²⁾	nº de focos por ratón	
HaCa4	5/5	5/5	1-19	c
HaCa4	2/2	2/2	>10	a
E24	6/6	0/6	-	c
E24	5/5	0/5	-	d
P1-5	4/4	4/4	1-3	b
P1-10	4/4	4/4	5-19	b
P1-13	5/5	5/5	1-19	b
P2-13	6/6	0/6	-	d
P2-16	5/5	0/5	-	b
P2-16	6/6	0/6	-	d
MCA3D	0/6	-	-	c

(1) 1×10^6 células de las líneas indicadas se inocularon en un flanco de ratones BALB/c inmunodeprimidos. Los tumores se extirparon cuando alcanzaron un diámetro de 1.2 cm. Los ratones se sacrificaron para analizar las metástasis pulmonares cuando estaban moribundos o a los 10-21 (a), 20-40 (b), 30-47(c) o 60 (d) días después de la excisión del tumor primario. Sólo se encontraron focos metastásicos en los pulmones y no en otras vísceras.

(2) La incidencia tumoral y de metástasis se expresa como número de ratones que generaron tumor o metástasis pulmonar / número de ratones totales inoculados.

1.5. Niveles de Ha-ras.

A continuación tratamos de determinar cuales eran los mecanismos mediante los cuales la ausencia de CD-E inducía este comportamiento más agresivo, volviendo a las células metastásicas. Una posible explicación, teniendo en cuenta los estudios previos sobre la relación entre la dosis de Ha-ras oncogénico y la capacidad metastásica, sería que los transfectantes antisentido hubieran incrementado los niveles de Ha-ras, debido a la transfección o por un proceso de selección.

Por tanto, se analizaron los niveles de Ha-ras viral y celular mediante ensayos de Northern-blot en las líneas transfectantes antisentido y control y se compararon con los niveles de las líneas E24 y HaCa4. La línea celular MCA3D, que sólo expresa Ha-ras endógeno de ratón, se utilizó como control. Todos los clones, salvo MCA3D, expresaban el mRNA genómico viral de 5.4 Kb y una serie heterogénea de transcritos de tamaños comprendidos entre 1.4 y 5.4 Kb (Caulín *et al.*, 1996 y resultados no mostrados). Los resultados, después de normalizar respecto a la cantidad de mRNA de actina, aparecen reflejados en la Tabla V. La línea celular HaCa4 presentaba niveles elevados de v-Ha-ras, mientras que los transfectantes, control y antisentido, mostraron niveles de v-Ha-ras semejantes a los de la línea E24, y menores a los de HaCa4.

Por tanto, la dosis de Ha-ras no se modificó por la transfección con el vector antisentido, por lo que no parece ser la responsable del fenotipo metastásico inducido por la ausencia de CDE en la línea E24.

Tabla V. Expresión de v-Ha-ras en HaCa4, E24 y los clones transfectantes con el cDNA antisentido de CD-E ⁽¹⁾.

Línea celular ⁽²⁾	v-Ha-ras ⁽³⁾
HaCa4	3.97
E24	0.62
P2-13	0.63
P1-5	0.70
P1-13	0.85
MCA3D	-

(1) 15 µg de mRNA poli-A⁺ se sometieron a ensayos de Northern-blot hibridando sucesivamente con una sonda de Ha-ras y con una sonda de β-actina como control.

(2) La línea celular MCA3D sólo expresa Ha-ras celular endógeno y se incluyó como control.

(3) Los valores representan la relación de los niveles de mensajero de v-Ha-ras y de β-actina en cada línea celular, tras su cuantificación densitométrica.

1.6. Papel de proteasas de matriz extracelular.

1.6.1. Activador del plasminógeno tipo urokinasa.

El activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular y su expresión se ha relacionado con la capacidad invasiva y metastásica de un amplio espectro de tumores y líneas celulares (Andreasen *et al.*, 1997).

Por tanto, nos planteamos averiguar si en nuestro sistema experimental el bloqueo de CD-E también era capaz de inducir un aumento de la actividad uPA, que fuera responsable del comportamiento más maligno observado. Se midió la actividad uPA en extractos totales y en el medio condicionado de los transfectantes en geles de caseína-plasminógeno. La figura 14 muestra que existen variaciones en los niveles de actividad uPA, especialmente del secretado al medio extracelular, entre los diferentes clones, pero la ausencia de CD-E no provocó en estas células un incremento de la actividad uPA. Por lo tanto, el uPA no parece ser el agente que induce el fenotipo más invasivo y metastásico que muestran los transfectantes.

1.6.2. Metaloproteinasas de matriz.

Como se ha indicado en la Introducción, las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son proteasas que degradan y remodelan la matriz extracelular y que juegan un importante papel en procesos de invasión tumoral y metástasis (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Para estudiar si las MMPs estaban jugando un papel en el comportamiento invasivo inducido por la ausencia de CD-E se analizó la actividad gelatinolítica de los transfectantes. La figura 15A muestra un zimograma donde se ensayó la actividad gelatinolítica del medio condicionado de las células en geles de gelatina (colágeno soluble desnaturizado). Como se puede observar, ni la línea parental E24, ni la línea control P2-13, mostraron actividad gelatinolítica. En cambio, los transfectantes antisentido presentaron una destacable actividad gelatinolítica, que migraba con un tamaño aparente de 105 KDa, correspondiente con la gelatinasa B o MMP-9 de ratón (Tanaka *et al.*, 1993). Asimismo, las líneas HaCa4 y Neo3 (control de transfección de HaCa4) presentaron niveles elevados de actividad MMP-9. Tan solo después de largos tiempos de incubación se pudo observar además una banda de degradación a 68 KDa, correspondiente a la MMP-2, de similar intensidad en todas las células. MMP-9 y MMP-2 son las únicas MMPs conocidas capaces de degradar colágenos desnaturizados (ver Tabla I).

Estudios de Northern-blot (Fig. 15B) mostraron que el transfectante antisentido P1-5 expresaba cantidades significativas de mRNA de MMP-9, mientras que los transfectantes P1-10 y P1-13 y el clon P2-16 expresaban pequeñas cantidades. Sin embargo, E24 no presentó niveles apreciables de mRNA de MMP-9. La sonda de MMP-9 identificó dos transcritos de 3.5 y 2.7 Kb, probablemente resultantes de diferentes señales de poliadenilación (Tanaka *et al.*, 1993).

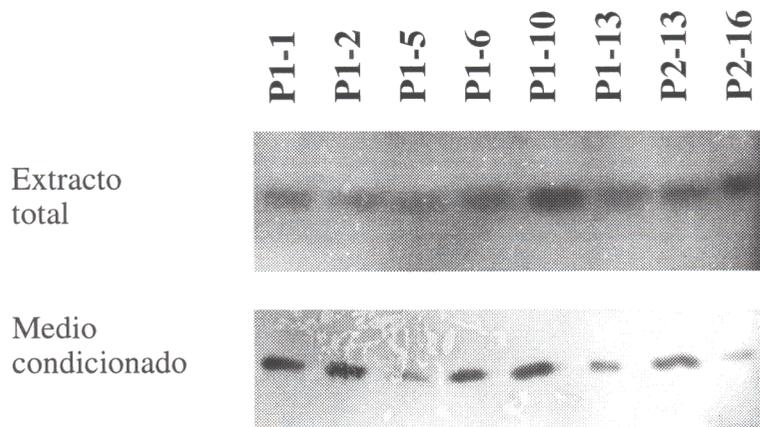


Fig. 14. Zimograma para detección de uPA en extracto total y en el medio condicionado de los transfectantes antisentido de CD-E. 35 μ g de extracto total (parte superior) o 10 μ g de medio condicionado (parte inferior) de las líneas indicadas se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS). Tras eliminar el SDS de los geles por lavados en Triton-X100, éstos se superpusieron sobre geles de agarosa con caseína-plasminógeno-Cl₂Ca o sobre geles control que carecían de plasminógeno, y se incubaron durante 20 h a 37°C. Al colocar los geles sobre un fondo oscuro se aprecian las bandas transparentes de degradación de la caseína por el plasminógeno activado por el uPA. Los geles control sin plasminógeno no presentaron bandas de degradación (no mostrado).

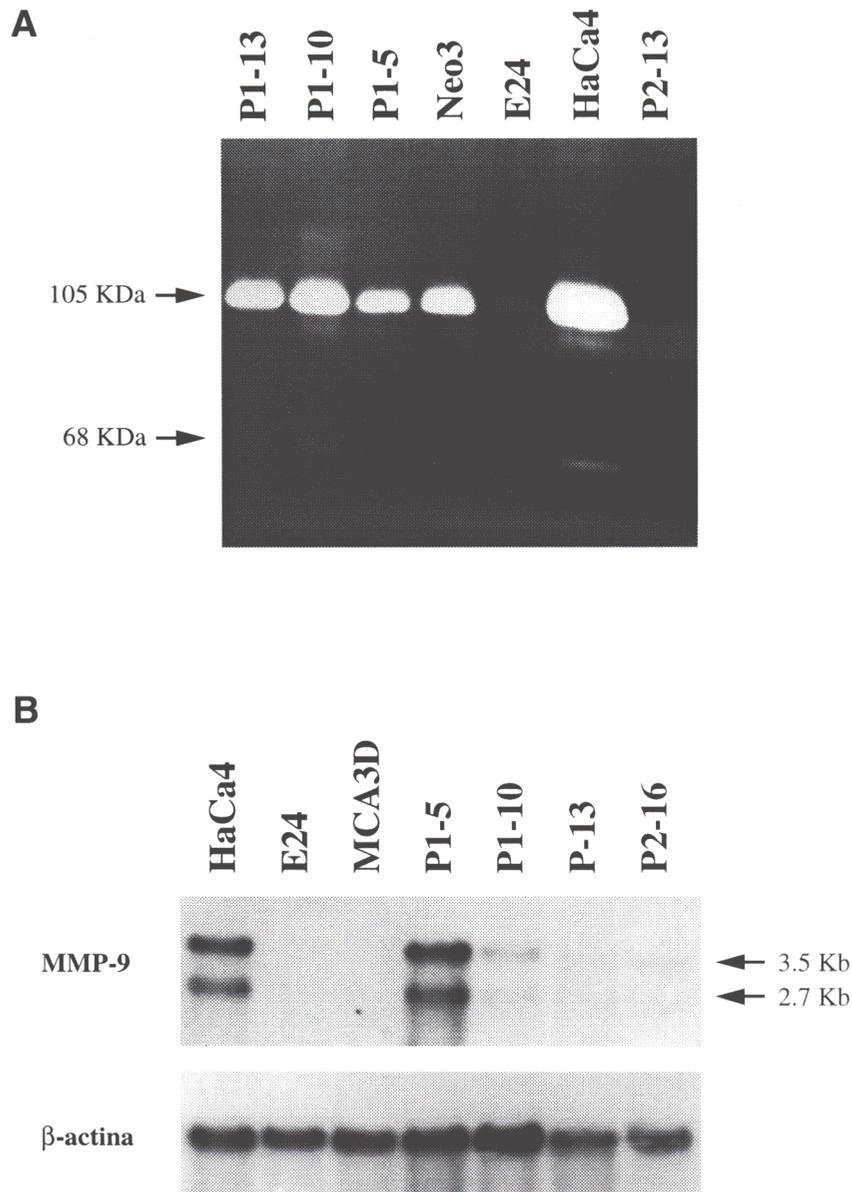


Fig. 15. Análisis de gelatinasas en las líneas HaCa4, E24 y los clones antisentido de CD-E.

A. Análisis por zimografía en gel de gelatina de las MMPs secretadas por las líneas celulares.

Cantidades equivalentes (12 μ g de proteína) de medio condicionado de las líneas celulares indicadas se corrieron en geles PAGE-SDS embebidos en gelatina. Tras renaturalizar los geles e incubar durante 48 h las gelatinasas presentes se detectaron como bandas claras de degradación. Se indican con flechas las dos bandas detectadas y los pesos moleculares aproximados calculados. La banda principal de 105 KDa corresponde con el tamaño de la gelatinasa B o MMP-9 de ratón.

B. Análisis por Northern-blot de la expresión de MMP-9. 15 μ g de mRNA poli-A+ de las líneas indicadas se sometieron a ensayo de Northern-blot con una sonda para detectar MMP-9. La misma membrana se hibridó posteriormente con una sonda para β -actina, como control de carga. Se señalan con flechas los dos transcritos detectados de MMP-9 de tamaño aproximado 3.5 y 2.7 Kb.

Estos resultados sugieren que la ausencia de CD-E en los transfectantes antisentido induce un aumento en la actividad de la metaloproteinasa MMP-9, que podría deberse en parte al aumento en sus niveles de expresión. Un aumento en la actividad de dicha enzima podría favorecer las capacidades invasivas de estas células, al dotarles de un mecanismo por el que pueden degradar la matriz extracelular, escapar del tumor primario y producir metástasis.

1.7. Estudio de la relación entre CD-E y MMP-9.

Los resultados anteriores apoyan una interesante relación inversa entre CD-E y MMP-9, ya que al eliminar la CD-E se indujo en estas células un aumento en la actividad MMP-9. Asimismo, la línea celular MCA3D, no tumorigénica y con altos niveles de CD-E, carecía de actividad MMP-9 (no mostrado) y de mensajero de MMP-9 (Fig. 15B).

Para corroborar esta hipótesis se estudió la actividad y expresión de MMP-9 en relación con la CD-E en un conjunto de líneas originadas a partir de la transfección del cDNA de CD-E en HaCa4 (ver Tabla III y Figura 8).

La figura 16A muestra un zimograma sobre gelatina del medio condicionado secretado por estas líneas. Se observó que las líneas HaCa4, el control de la transfección Neo3 y E58 (CD-E negativa) mostraron niveles elevados de actividad MMP-9, mientras que las líneas que después de la transfección expresaban CD-E (E24 y E62), habían disminuido considerablemente la actividad gelatinolítica de 105 KDa correspondiente a MMP-9. Análisis de Northern-blot en estas líneas celulares mostraron asimismo altos niveles de mensajero de MMP-9 en las líneas celulares CD-E negativas HaCa4 y E58 y muy bajos niveles en las líneas CD-E positivas E24 y E62 (Fig. 16B).

El análisis mediante Northern-blot de los niveles del inhibidor específico de MMP-9, TIMP-1, indica que los niveles se mantienen constantes en todas estas líneas celulares (Fig. 17), independientemente de los niveles de CD-E o de MMP-9. Por tanto, los cambios en la actividad MMP-9 no se pueden explicar por cambios en los niveles de su inhibidor.

Por otro lado, también se analizó la expresión de otras MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-7) mediante Northern-blot o RT-PCR, siendo sus niveles apenas detectables en todas las líneas celulares. En la figura 17 aparece un experimento de Northern-blot para MMP-3 donde se observa que los niveles, extremadamente bajos (se muestra una autorradiografía tras un mes de exposición), son similares en todas las líneas.

Por tanto, la expresión de CD-E en la línea celular HaCa4 induce un descenso en los niveles y actividad de la gelatinasa MMP-9, corroborando la hipótesis de una regulación opuesta, por mecanismos desconocidos, entre CD-E y MMP-9 en líneas celulares de queratinocitos de ratón. Esta represión de MMP-9 mediada por CD-E podría ser uno de los mecanismos que contribuyen al fenotipo más agresivo mostrado tras la pérdida de CD-E en muchos tipos de carcinomas, y en especial durante la carcinogénesis de piel de ratón.

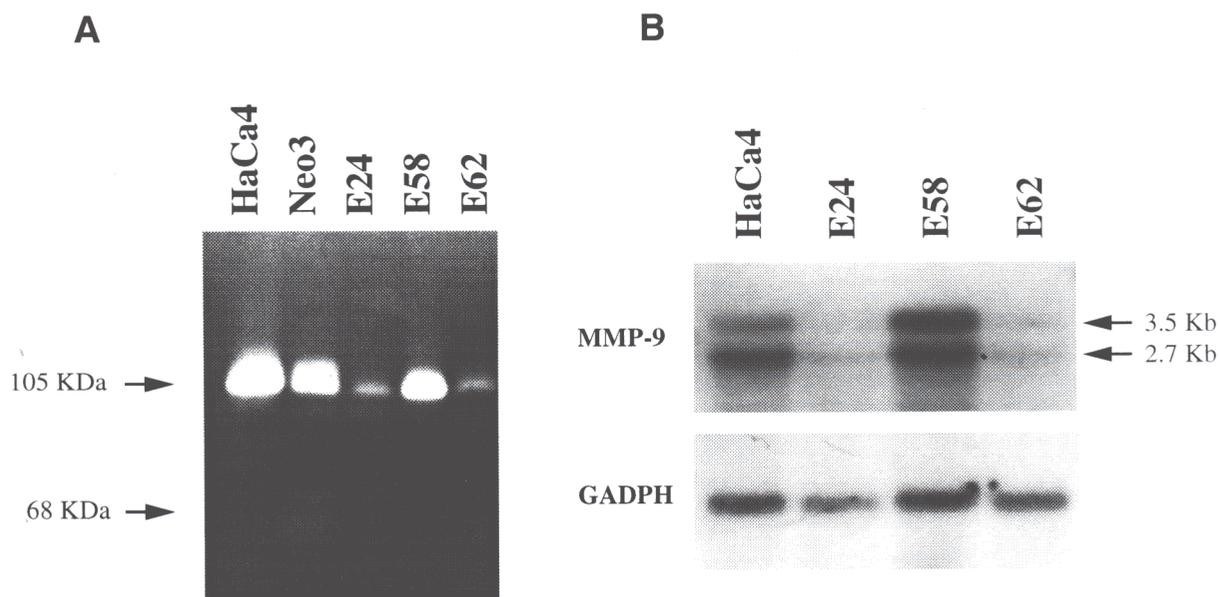


Fig. 16. Detección de actividad gelatinolítica y de expresión de MMP-9 en los clones derivados de la transfección de HaCa4 con el cDNA de CD-E.

A. El medio condicionado de cada línea celular que contenía 12 μ g de proteína se fraccionó en geles PAGE-SDS embebidos en gelatina. Tras renaturalizar los geles e incubar durante 48 h, las gelatinasas presentes se detectaron como bandas claras de degradación. Se indican los pesos moleculares aproximados calculados de las bandas de degradación. La banda principal de 105 KDa corresponde con el tamaño de la gelatinasa B o MMP-9. Las líneas celulares HaCa4, Neo3 y E58 no expresan CD-E, mientras que E24 y E62 sí lo hacen (ver detalles en el texto).

B. 15 μ g de mRNA poli-A+ de las líneas indicadas se sometieron a ensayo de Northern-blot con una sonda para MMP-9. La misma membrana se hibridó posteriormente con una sonda para detectar GADPH, como control de carga. Se señalan con flechas los dos transcritos detectados de MMP-9 (3.5 y 2.7 Kb).

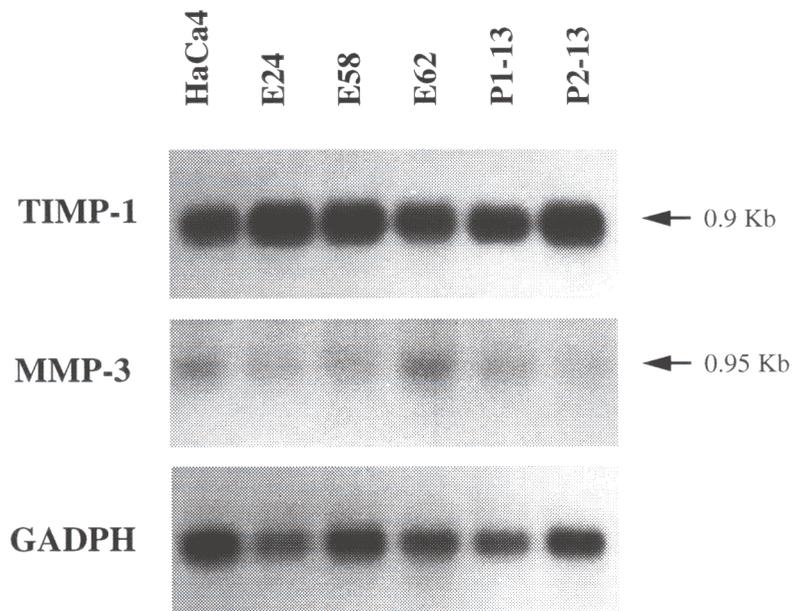


Fig. 17. Análisis de la expresión de MMP-3 y TIMP-1 en líneas celulares de queratinocitos de ratón. 15 μ g de mRNA poli-A+ de las líneas indicadas se sometieron a ensayo de Northern-blot. La misma membrana se hibridó, en sucesivas veces, con una sonda para TIMP-1, MMP-3 y GADPH como control de carga. Se indican los tamaños de los transcritos detectados.

2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD-E EN LA CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATÓN.

Como hemos visto, la molécula de adhesión celular CD-E desempeña un papel clave en el control de la capacidad tumorogénica, invasiva y metastásica durante la progresión tumoral. Por tanto, para comprender en último término los mecanismos de la progresión maligna, es necesario también conocer los mecanismos de control de la expresión y función de CD-E.

En concreto nos propusimos analizar los mecanismos que regulan de la expresión de CD-E, y utilizamos, asimismo, el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón. Este modelo resultaba útil para estudiar, por una parte, los mecanismos que controlan la expresión específica de tejido epitelial de CD-E y, por otra parte, los mecanismos que conducen a la desaparición de la expresión de CD-E durante la progresión tumoral.

2.1. Actividad del promotor de CD-E en queratinocitos de ratón.

Para abordar estos objetivos empleamos un conjunto de líneas celulares de queratinocitos de ratón que representaban distintos estadios de la progresión tumoral, provenientes de tumores epidermoides e indiferenciados o derivadas *in vitro* a partir de cultivos primarios de epidermis (ver Fig. 5), que abarcan desde queratinocitos inmortalizados no tumorogénicos hasta líneas altamente malignas, y que mostraban diferentes niveles de expresión de CD-E.

En la Tabla VI se resumen las características más significativas de dichas líneas celulares. Brevemente, la línea celular MCA3D, como ya se ha indicado, es una línea inmortal no tumorogénica, de fenotipo epitelial, y que presenta niveles elevados de expresión de CD-E. Las líneas celulares PDV y E24 son tumorogénicas, pero aún conservan un fenotipo epitelial y expresan CD-E. La línea HaCa4 presenta ya un fenotipo epiteloide y ha perdido la expresión de CD-E. Todas estas líneas celulares expresan CD-P. Por último, las líneas celulares CarB y MSC11A5, representantes del último estadio de la carcinogénesis, son líneas altamente malignas, con fenotipo fibroblastoide, que han perdido la expresión de CD-E, CD-P y muchos otros marcadores epiteliales (Navarro *et al.*, 1991; Díaz-Guerra *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1992; Stoler *et al.*, 1993).

La pérdida de CD-E en estas líneas, al igual que en muchos tumores epiteliales, es a nivel de mRNA (ver Fig. 8A). Estudios previos de Southern-blot descartaron la existencia de grandes alteraciones en el gen de CD-E en las líneas celulares mencionadas (Navarro *et al.*, 1991), sugiriendo que probablemente sean mecanismos transcripcionales los que controlen la desaparición de dicha molécula. Para testar esta hipótesis se analizó la actividad promotora de un fragmento situado en posición 5' del gen de CD-E de ratón, que comprendía los

Tabla VI . Características de las líneas celulares de queratinocitos de ratón empleadas en los estudios sobre el promotor de CD-E.

línea celular	Morfología*	Niveles[#] de CD-E	Niveles[#] de CD-P	Tumoroge-^{&}nicidad
MCA3D	E	++	+ / ++	-
PDV	E	+	+++	+
E24	E	+ / ++	+++	+
HaCa4	Ep	-	++	++
CarB	F	-	-	++
MSC11A5	F	-	-	++

* E, epitelial; Ep, epiteloide; F, fibroblastoide.

Los niveles relativos de CD-E y de CD-P se estimaron a partir de datos de Northern e inmunoblot (Navarro y col., 1991, ver también Fig. 8).

& La capacidad tumorogénica se determinó por inyección en ratones nu/nu, teniendo en cuenta el número de tumores originados y el período de latencia.

nucleótidos -178/+92 respecto del sitio de inicio de la transcripción (construcción -178, Fig. 18). Este fragmento contiene potenciales elementos reguladores: elemento E-pal (posición -90 a -71), conteniendo una secuencia palindrómica (-86/-75), caja CCAAT (posición -65 a -61) y región rica en GC (posición -58 a -32) y se había demostrado previamente, en otros sistemas celulares, que poseía actividad promotora específica de líneas celulares epiteliales (Behrens *et al.*, 1991).

Se realizaron ensayos de transfección transitoria en las distintas líneas de queratinocitos de ratón con plásmidos que contenían dicho fragmento, y varias construcciones menores de esta región, acoplados al gen chivato CAT. Como se muestra en la figura 18 la construcción -178 presentaba actividad específica de tipo celular, ya que mostraba niveles elevados de actividad transcripcional en la línea celular MCA3D, con altos niveles de mRNA de CD-E; niveles moderados en las líneas PDV y E24; y niveles muy bajos de actividad o era prácticamente inactiva en las líneas que no expresan CD-E (HaCa4 y CarB). La eliminación de la zona 5' hasta la posición -78, que comprende el elemento E-pal, provocó un aumento de la actividad promotora, sugiriendo la existencia de elementos que regulan negativamente la transcripción en esta región. Por otro lado, la supresión de otro

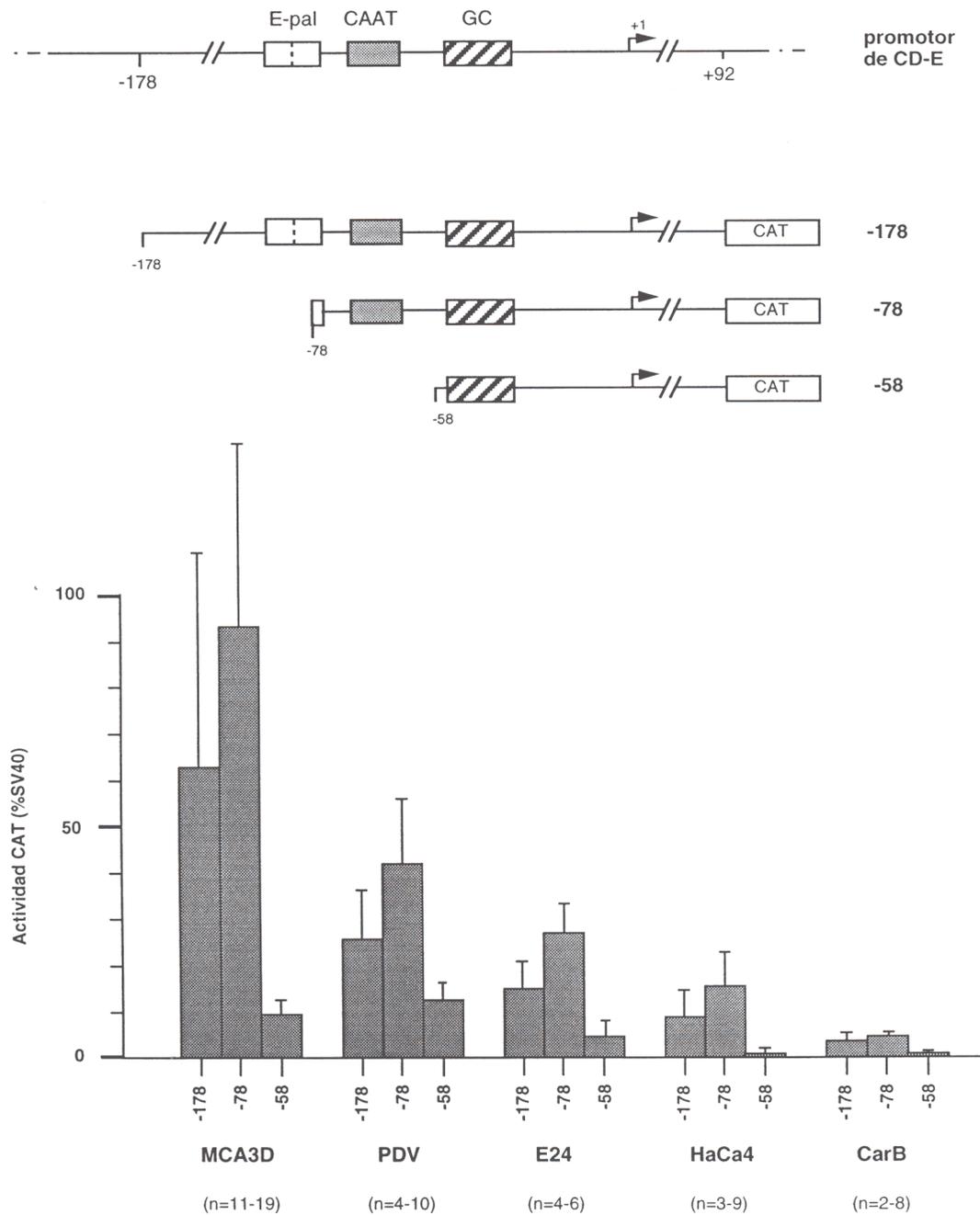


Fig. 18. Actividad transcripcional de distintas construcciones del promotor de CD-E en líneas de queratinocitos de ratón. Los valores de actividad CAT de las diferentes construcciones (panel superior) se normalizaron respecto a la actividad de CMV-luc en cada experimento y se expresaron como porcentaje de la actividad del promotor de SV40 en cada línea celular (panel inferior). Los valores representan la media de n experimentos independientes. Las barras de error indican las desviaciones standard.

fragmento hasta la posición -58, que incluye la caja CCAAT, indujo un dramático descenso de la actividad en todas las líneas celulares, lo que apoya que esta caja CCAAT estaría jugando un importante papel en el control positivo de la transcripción de CD-E. Esta construcción que comprende los nucleótidos -58/+92 presentaba ya niveles muy bajos de actividad promotora, pero aún retenía una cierta actividad específica de tipo celular.

La Tabla VII muestra un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de transfección transitoria con éstas y otras construcciones adicionales del promotor de CD-E. La construcción -94 mostró niveles de actividad muy similares a los de la construcción -178 en las líneas celulares examinadas. Asimismo, una construcción que comprendía los nucleótidos -21/+92 poseía niveles muy bajos de actividad transcripcional, próximos a los de la construcción -58, en las dos líneas celulares analizadas. El análisis de la actividad transcripcional de dos construcciones adicionales conteniendo secuencias hasta 800 bp y 1.4 Kb en dirección 5' respecto del sitio de inicio de la transcripción, en dos líneas positivas para la expresión de CD-E (MCA3D y E24), mostró valores similares a los de la construcción -178, aunque con variaciones entre las dos líneas. Estas observaciones están de acuerdo con estudios previos en otras líneas epiteliales (Behrens *et al.*, 1991). Por ello, y aunque no se pueda descartar la existencia de otras zonas de regulación, nos centramos en el estudio de la región -178/+92, que mostraba actividad transcripcional específica en las líneas de queratinocitos.

Para investigar el posible papel del elemento palindrómico E-pal en la actividad promotora de CD-E en este sistema celular, se midió la actividad de dos construcciones adicionales del promotor en ensayos de transfección transitoria en las diferentes líneas (Fig. 19). Tanto la construcción Δ E-pal, en la que se ha eliminado el elemento E-pal, como la construcción mE-pal, con una doble mutación puntual en los 2 nucleótidos centrales del palíndromo, mostraron mayor actividad promotora que la construcción silvestre (de 2 a 7 veces), siendo el aumento más significativo en las líneas que no expresan CD-E: un incremento de unas 3 veces en HaCa4 y de hasta casi 7 veces en la línea altamente indiferenciada CarB. Estos resultados sugieren un papel inhibitorio para el elemento E-pal en todas las líneas de queratinocitos analizadas. Este elemento podría estar jugando un papel en la especificidad de la actividad transcripcional del promotor de CD-E, ya que el efecto represor es mayor en células CD-E negativas.

Asimismo, y para analizar la función de la región rica en GC se midió la actividad promotora de dos construcciones con mutaciones en los sitios consenso para AP2 y SP1 (construcciones mut GC1 y mut GC2, figura 20). Ambas mutaciones indujeron un descenso en la actividad promotora (60% en mut GC1 y 40-50% en mut GC2) en las líneas MCA3D y HaCa4, representantes de líneas que expresan y no expresan CD-E. Estos resultados indican que la región rica en GC, a través de los elementos de unión a SP1 y AP2, juega un papel regulador positivo en la transcripción de CD-E.

Tabla VII. Valores de actividad promotora de distintas construcciones del promotor de CD-E en las diferentes líneas celulares.

línea celular	Construcciones del promotor de CD-E *						
	-1.4	-0.8	-178	-94	-78	-58	-21
MCA3D	36.9	62.9	62.8	46.9	93.3	9.6	11.4
PDV	N.D.	N.D.	25.2	N.D.	41.9	12.3	N.D.
E24	13.4	6.7	14.7	N.D.	26.9	4.9	N.D.
HaCa4	N.D.	N.D.	8.5	11.0	15.7	0.8	0.7
CarB	N.D.	N.D.	3.3	3.2	4.7	0.9	N.D.

Los valores se indican como porcentaje de la actividad del promotor de SV40 en cada línea celular. Los datos representan la media de los resultados de un mínimo de dos experimentos. N.D., no determinado.

* Las construcciones tienen todas el extremo 3' común en la posición +92. La posición del extremo 5' corresponde con el nombre de la construcción en Kb (-1.4 y 0.8) o en pb (el resto de las construcciones).

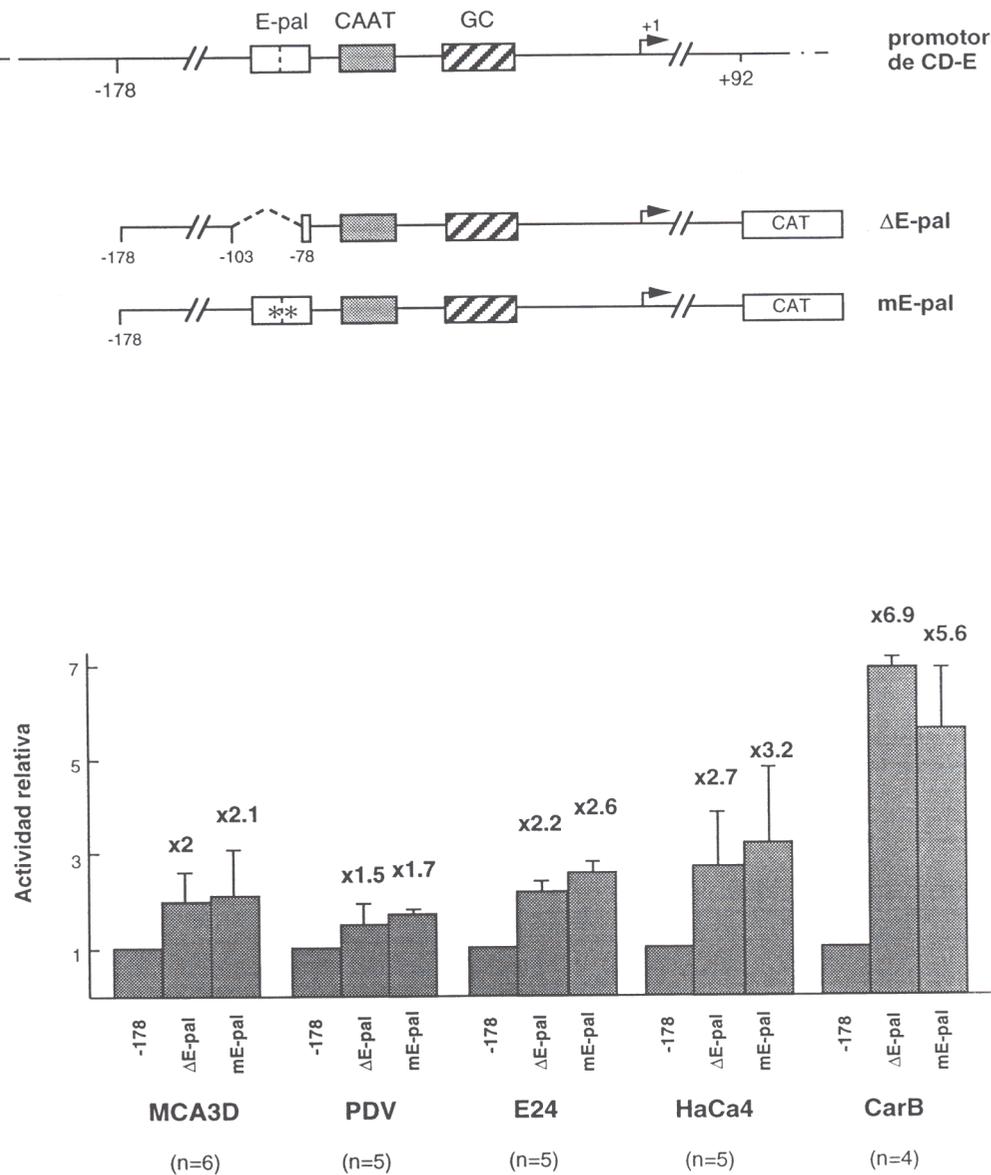


Fig. 19. Papel del elemento E-pal en la actividad transcripcional del promotor de CD-E. La actividad CAT de las construcciones del promotor de CD-E con el elemento E-pal mutado o truncado (panel superior) se normalizó respecto a la actividad CMV-luc. Los valores se muestran como actividad relativa respecto a la actividad de la construcción -178 en cada línea celular y representan la media de *n* experimentos independientes (panel inferior). Las desviaciones standard se representan como barras de error. Los números sobre las barras representan el número de veces de inducción en la actividad promotora, respecto al valor de la construcción silvestre -178.

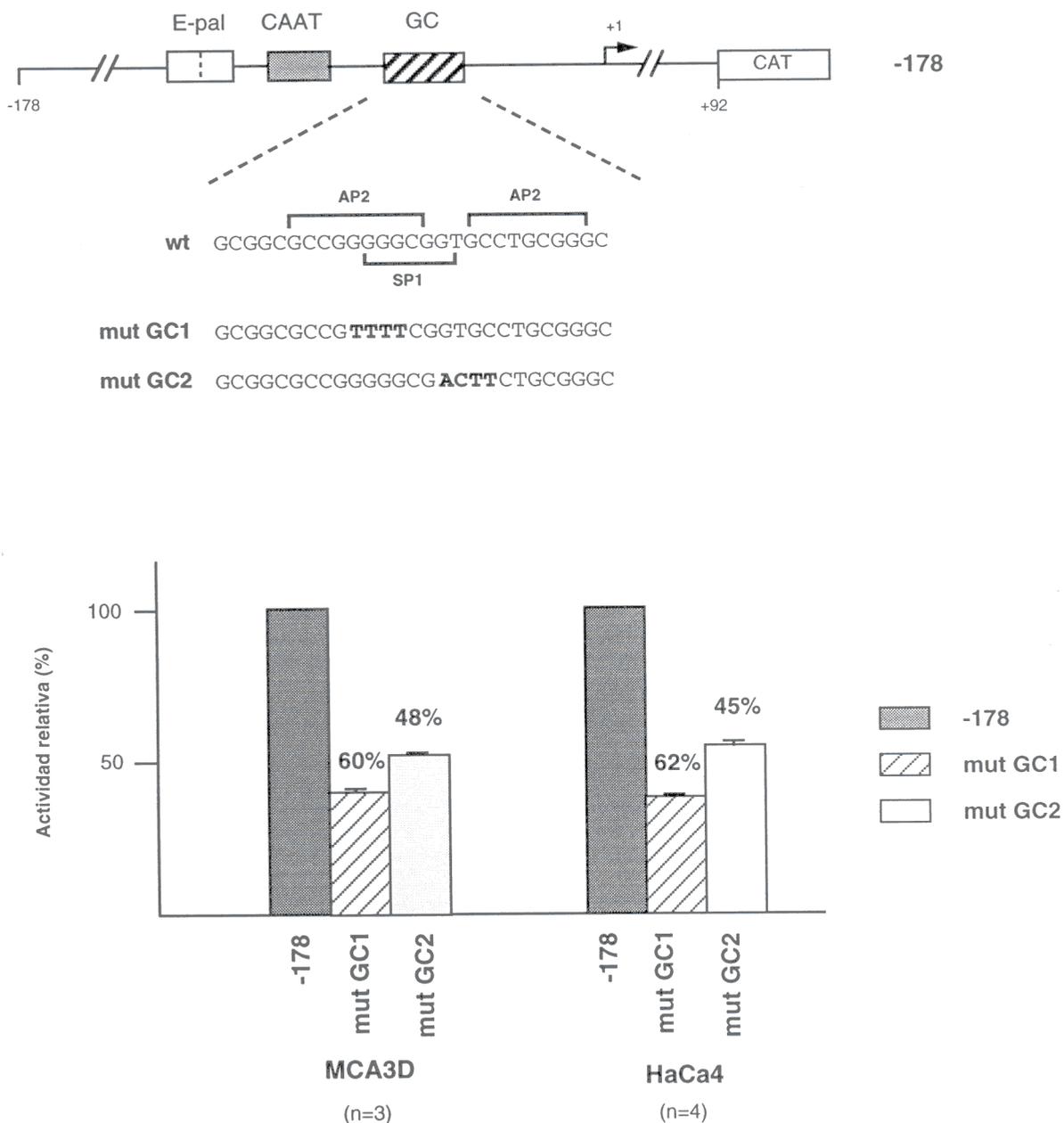


Fig. 20. Influencia de la región rica en GC en la actividad transcripcional del promotor de CD-E. La actividad CAT de las construcciones que se muestran en el panel superior se normalizó respecto a la actividad de CMV-luc. Los valores se muestran como actividad relativa respecto a la actividad de la construcción silvestre (wt) -178 en cada línea celular y representan la media de n experimentos independientes. Las desviaciones standard se representan como barras de error. Sobre las barras se indica el porcentaje de inhibición en la actividad transcripcional que induce la mutación.

2.2. Unión de factores nucleares al promotor de CD-E.

2.2.1. Interacción de factores nucleares con la región 5' proximal.

Como primera aproximación al estudio de los factores que interaccionan con la región 5' proximal en las diferentes líneas, y para delimitar las posibles secuencias de regulación de una forma más fina, se realizaron estudios de protección a DNAsa I o de footprinting *in vitro*.

La figura 21 muestra el patrón de protección que generaron extractos nucleares de las diferentes líneas celulares utilizando como sonda la región del promotor comprendida entre los nucleótidos -178/+17. Experimentos con extractos nucleares de las líneas positivas para CD-E, MCA3D y E24, mostraron 3 regiones protegidas (zonas a, b y c) y un sitio de hipersensibilidad, que corresponden a:

- región rica en GC y caja CCAAT (a);
- zona 3' del elemento E-pal (b);
- extremo 5' del elemento E-pal y región más distal (c);
- sitio de hipersensibilidad en la posición -85 de la secuencia E-pal (marcado con una flecha).

Por simplicidad, a partir de ahora llamaremos a la región protegida (c) como región ECE, ya que un análisis detallado de la misma mostró que contiene dos secuencias consenso para factores de la familia Ets y otra para factores tipo CREB/ATF (ver más adelante).

Por otro lado, extractos nucleares de líneas que no expresan CD-E (HaCa4 y CarB) mostraron un patrón de protección diferente:

- protección muy débil o prácticamente ausencia de protección en la región rica en GC/CCAAT (a);
- protección, aunque más débil, de la mitad 3' del elemento E-pal (b);
- ausencia del sitio de hipersensibilidad;
- ausencia de protección en la región ECE más distal (c).

Estos datos sugieren que en los queratinocitos que no expresan CD-E existe una pérdida o modificación de factores nucleares capaces de interaccionar con determinadas secuencias de la región 5' del gen de CD-E.

Para caracterizar los factores responsables del reconocimiento de la región 5' proximal, se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando como sonda, en primer lugar, el fragmento A, correspondiente a los nucleótidos -178/+92 de promotor de CD-E (ver figura 22A). Se emplearon extractos nucleares de las diferentes líneas de queratinocitos y de fibroblastos NIH3T3 como control adicional de células no epiteliales, que no expresan CD-E. Los extractos nucleares de todas las líneas celulares generaron una banda de retardo mayoritaria, y una serie de complejos de menor intensidad y mayor movilidad electroforética (Fig. 22B). Como se puede observar, el patrón de bandas generado fué básicamente el mismo con los extractos de todas las líneas, con la única diferencia de que la intensidad de la

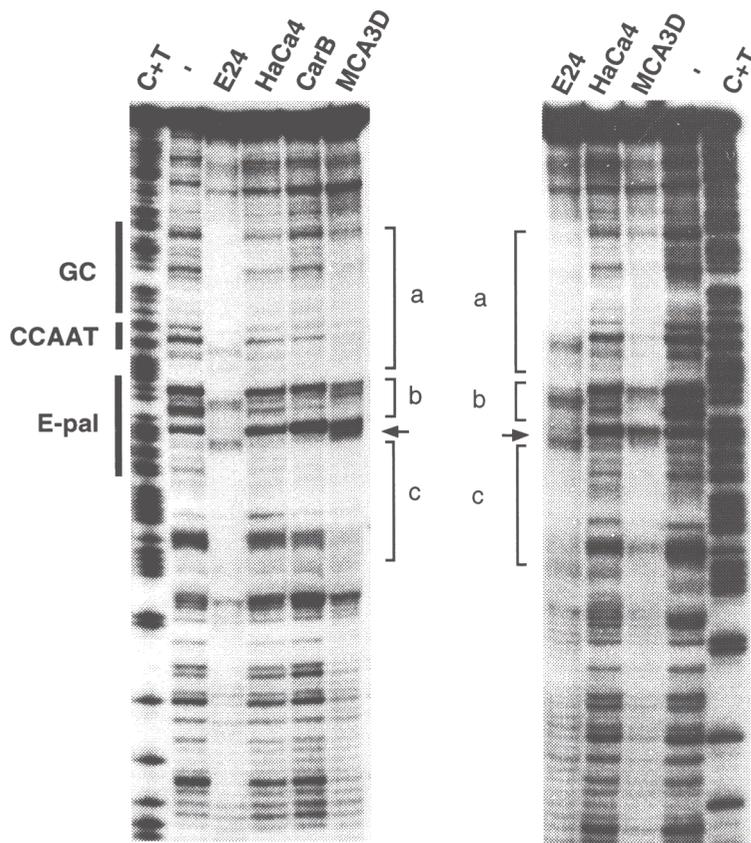


Fig. 21. Análisis de protección a DNAasaI o footprinting *in vitro* de la región 5' proximal del gen de CD-E en diferentes líneas de queratinocitos. La región -178/+17 del promotor de CD-E se utilizó como sonda para experimentos de protección a DNAasaI. La cadena no codificante se marcó en el extremo 3', se incubó en ausencia (-) o en presencia de extractos nucleares de las distintas líneas (45-70 μ g) y se sometió a digestión con DNAasaI. Los productos obtenidos se analizaron en gel de secuencia. Los corchetes (a, b, c) marcan regiones protegidas y la flecha un sitio de hipersensibilidad. C+T, productos de las reacciones de secuenciación G+A de Maxam-Gilbert sobre la sonda. Al ser la sonda la cadena no codificante, las bandas de este carril corresponden con las C y T de la secuencia de la cadena codificante del promotor de CD-E. La localización de las regiones E-pal, CCAAT y región rica en GC se indica con barras a la izquierda. Los paneles de la derecha e izquierda muestran dos experimentos independientes.

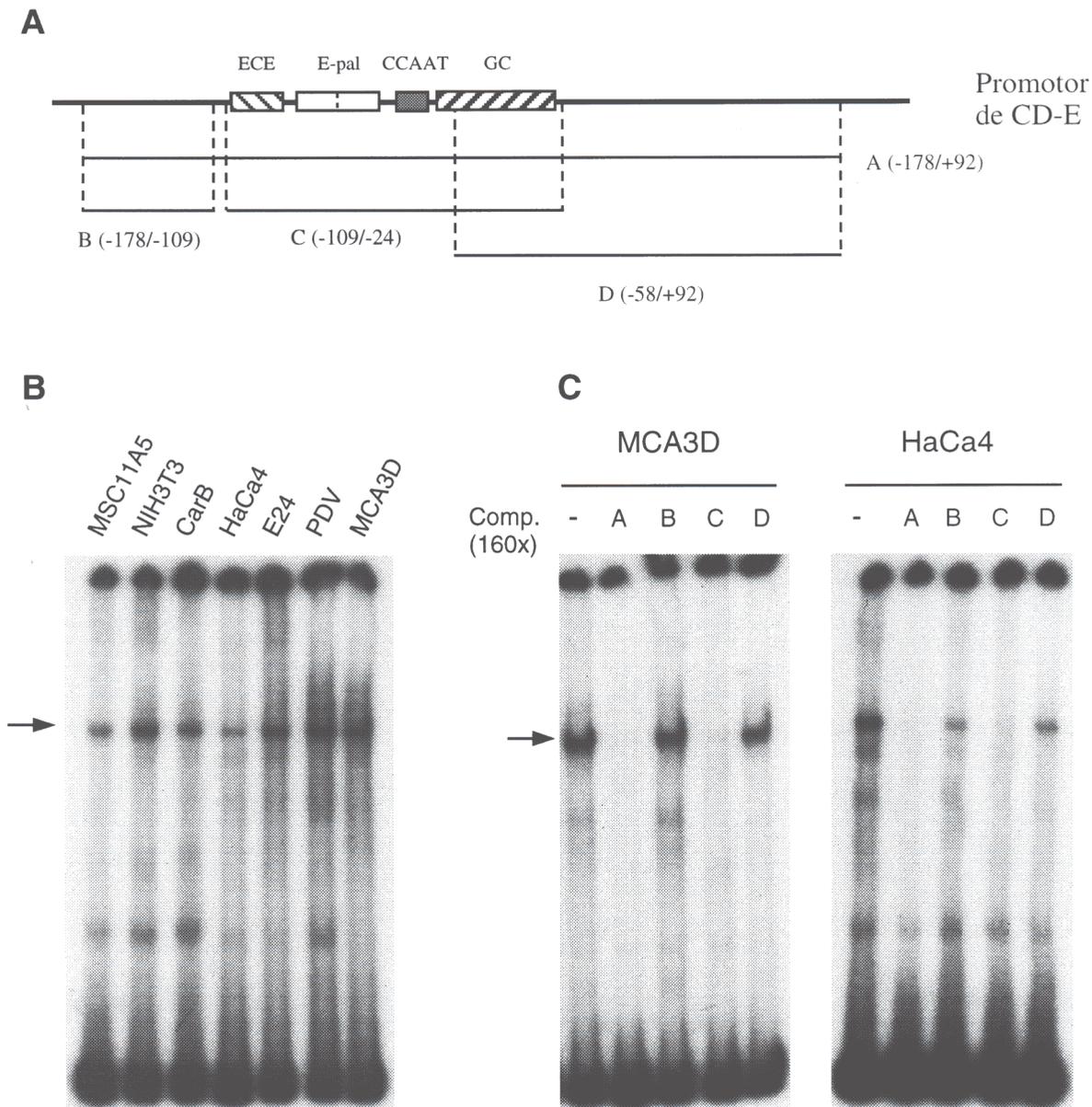


Fig. 22. Unión de factores nucleares a la región 5' proximal del promotor de CD-E.

A. Representación esquemática de los fragmentos del promotor de CD-E empleados como sonda y en los experimentos de competición.

B. Ensayos de retardo en gel empleando el fragmento A como sonda marcada y 2 μ g de extractos nucleares de las líneas indicadas. Se observa la aparición de un complejo de retardo mayoritario (indicado con una flecha) y una serie de bandas de mayor movilidad electroforética.

C. Experimentos de competición realizados en las mismas condiciones que en (B), con extractos de las líneas MCA3D y HaCa4, en ausencia (-) o presencia de un exceso 160x molar de los fragmentos indicados (Comp.).

banda de menor movilidad era mayor con los extractos de las líneas CD-E positivas MCA3D y PDV.

Se realizaron ensayos de competición de la unión con distintos fragmentos de DNA frío en exceso: fragmentos A, B, C y D, según se muestra en la figura 22A. El patrón de competición fué el mismo con extractos de todas las líneas analizadas, aunque en la figura 22C sólo se muestran los resultados obtenidos con extractos de las líneas MCA3D y HaCa4, como representantes de líneas positivas y negativas para la expresión de CD-E, respectivamente. El patrón de competición obtenido indicó que la interacción de la mayoría de los complejos proteicos es a través de la región C (-109/-24), que contiene todos los elementos reguladores previamente postulados, corroborando los datos obtenidos en los experimentos de footprinting *in vitro*. El fragmento B no compitió ninguna de las bandas de retardo. Por otro lado, el fragmento D fué capaz de competir los complejos de mayor movilidad, pero no el complejo mayoritario. La competición de los complejos minoritarios por los fragmentos C y D indicaría que probablemente estos complejos se originan por interacción con la región rica en GC. De acuerdo con esto, un exceso de un oligonucleótido que comprendía la región GC del promotor proximal de CD-E (posiciones -60/-23) era capaz de competir las mismas bandas que el fragmento D (resultados no mostrados).

Para analizar con más detalle la implicación de los diferentes elementos reguladores postulados, contenidos en la región -178/+92, se procedió a estudiar cada uno de ellos por separado.

2.2.2. Análisis de los factores que interaccionan con el elemento E-pal.

Ensayos de retardo en gel utilizando como sonda un oligonucleótido (posiciones -92/-69) que contenía el elemento E-pal (Fig. 23A) mostraron que se formaba un complejo de retardo mayoritario con extractos nucleares de todas las líneas de queratinocitos examinadas (Fig. 23B). Dicho complejo se competía específicamente por un exceso del mismo oligonucleótido frío, pero no por un oligonucleótido irrelevante (CCAAT-E). Tampoco se competía por un oligonucleótido con una doble mutación puntual en el centro del palíndromo (E-pal mut), indicando que la integridad de los dos nucleótidos centrales es necesaria para la interacción del factor/es al elemento E-pal. El oligonucleótido E-pal mut porta la misma mutación que la construcción del promotor mE-pal, que mostró mayor actividad promotora en ensayos de transfección transitoria (ver Fig. 19).

El elemento E-pal contiene dos cajas E, secuencias consenso de interacción con factores de transcripción del tipo bHLH. Los factores de la familia Myc/Max son factores de transcripción tipo bHLH que se expresan en la epidermis (ver Introducción, Apto. 5.3), lo que nos inclinó a considerarlos como posibles factores de interacción con la región E-pal. Por tanto, hicimos experimentos preliminares para testar si alguno de estos factores era capaz de modificar la actividad promotora de CD-E. Como se indica en la Tabla VIII, la cotransfección de la construcción -178 con vectores de expresión de los factores c-Myc y/o

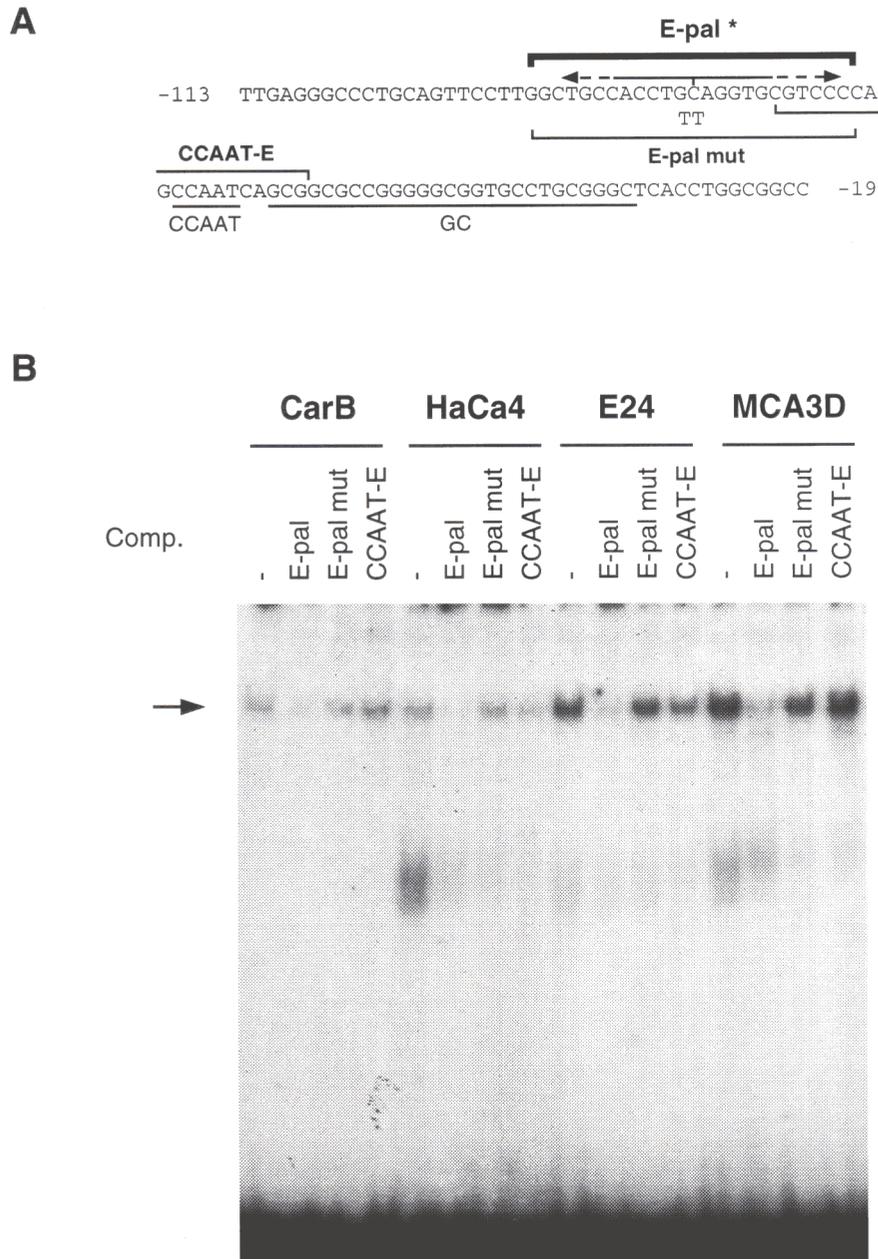


Fig. 23. Unión de factores nucleares al elemento E-pal del promotor de CD-E.

A. Región 5' proximal del gen de CD-E donde se muestran los oligonucleótidos empleados como sonda (E-pal*, corchete grueso) o como competidores (E-pal mut y CCAAT-E, corchetes finos) en los experimentos de retardo.

B. Ensayo de retardo en gel empleando 2.3 μ g (CarB), 3.4 μ g (HaCa4), 4.2 μ g (E24) o 4.5 μ g (MCA3D) de extracto nuclear de las distintas líneas en ausencia (-) o presencia de un exceso 40x (E-pal) o 100x (E-pal mut y CCAAT-E) de competidor frío (Comp.). Se observa la formación de un complejo de retardo mayoritario (indicado con una flecha) con extractos nucleares de todas las líneas analizadas.

Tabla VIII. Influencia de posibles factores de interacción con el elemento E-pal en la actividad transcripcional de la construcción -178 del promotor de CD-E.

factor *	μg	Actividad -178 (%)#		factor &	μg	Actividad -178 (%)#	
		MCA3D	HaCa4			MCA3D	HaCa4
-		100	100	-		100	100
c-Myc	0.5	133	110	snail	2.5	123	104
"	2	136	110	"	5	118	67
Max	0.5	117	120	slug	2.5	129	62
"	2	136	120	"	5	284	58
c-Myc + Max	0.3+0.3	116	140				
"	1+1	139	140				

* Las cantidades de plásmido cotransfectado se igualaron completando con las cantidades necesarias de plásmido control. Los plásmidos de expresión y control empleados fueron: pHEBoMTmyc2,3, pMTmax (vectores de expresión de c-Myc y Max humano, respectivamente, bajo el control del promotor de metalotioneína) y pHEBoMT (control) (ver Materiales, Apto. 8.2.4). La expresión de c-Myc y Max se indujo con 100 mM ZnSO₄; también se trataron las células control con igual concentración de ZnSO₄.

& Las cantidades de plásmido cotransfectado se igualaron completando con las cantidades necesarias de plásmido control. Los plásmidos de expresión y control empleados fueron: CMV-sna, CMV-slug (vectores de expresión de Snail y Slug de pollo, respectivamente) y pcDNA3 (control) (ver Materiales, Apto. 8.2.4).

La actividad CAT de la construcción -178 se normalizó respecto a la de CMV-luc en cada experimento. A la actividad CAT en presencia de los vectores control se le asignó el valor de 100%.

Max en las líneas HaCa4 y MCA3D indujo un ligero aumento, aunque probablemente no significativo, en la actividad promotora de CD-E (Tabla VIII).

Por otro lado, la mitad 3' del elemento E-pal contiene también un sitio consenso de unión a factores de la familia slug/snail (Mauhin *et al.*, 1993). Por su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario, en zonas de migración de células de la cresta neural e invaginación del ectodermo para formar el mesodermo en la gastrulación (Nieto *et al.*, 1994), se ha postulado la participación de estos factores en las transiciones epitelio-mesénquima. Estas transiciones van acompañadas de pérdida de expresión de CD-E y son reminiscentes de las que ocurren en etapas avanzadas del proceso tumoral, donde también hay pérdida de marcadores epiteliales como CD-E. Por tanto, factores de la familia slug/snail podrían unirse al elemento E-pal, regulando negativamente la transcripción de CD-E.

Para investigarlo se realizaron de igual forma experimentos de cotransfección de la construcción -178 con vectores de expresión de los factores snail y slug en las líneas HaCa4 y MCA3D. Como se puede observar en la Tabla VIII estos factores no indujeron un descenso de la actividad transcripcional de CD-E en la línea MCA3D, sino más bien el factor slug (5 µg de vector de expresión) era capaz de activar la transcripción. En la línea celular HaCa4 la cotransfección de estos factores (5 µg de vector de expresión de snail y 2.5 o 5 µg de slug) indujo un ligero descenso del 40% en la actividad promotora.

2.2.3. Análisis de los factores que interaccionan con la caja CCAAT.

De la misma forma, para tratar de caracterizar el factor/es que se pudieran unir a la caja CCAAT se realizaron experimentos de retardo en gel con un oligonucleótido (posiciones -74/-56) que comprendía la región CCAAT del promotor de CD-E (Fig. 24A).

La figura 24B muestra el patrón obtenido con extractos nucleares de la línea PDV. Aparecían tres complejos de retardo que se competían específicamente por un exceso del mismo oligonucleótido frío y por oligonucleótidos que contienen los sitios consenso para los factores CP1 y CP2. Asimismo, los dos complejos de mayor movilidad (complejos 2 y 3) se competían también por un exceso de un oligonucleótido con el sitio consenso de unión a C/EBP, mientras que ninguno de los complejos era competido por un oligonucleótido con el sitio consenso para NF1. Todos estos factores (CP1, CP2, C/EBP y NF1) son factores de transcripción descritos de unión a cajas CCAAT (Chodosh *et al.*, 1988; Ryden y Beemon, 1989). Por otro lado, un oligonucleótido que contenía la caja CCAAT del promotor de la CD-P (CCAAT-P) era capaz de competir, asimismo, el complejo 1 de menor movilidad. Resultados similares se obtuvieron con extractos de CarB (no mostrados).

Estos datos sugieren que la región CCAAT del promotor de CD-E es reconocida por factores del tipo CP1, CP2 y C/EBP, tanto en las líneas CD-E positivas como CD-E negativas.

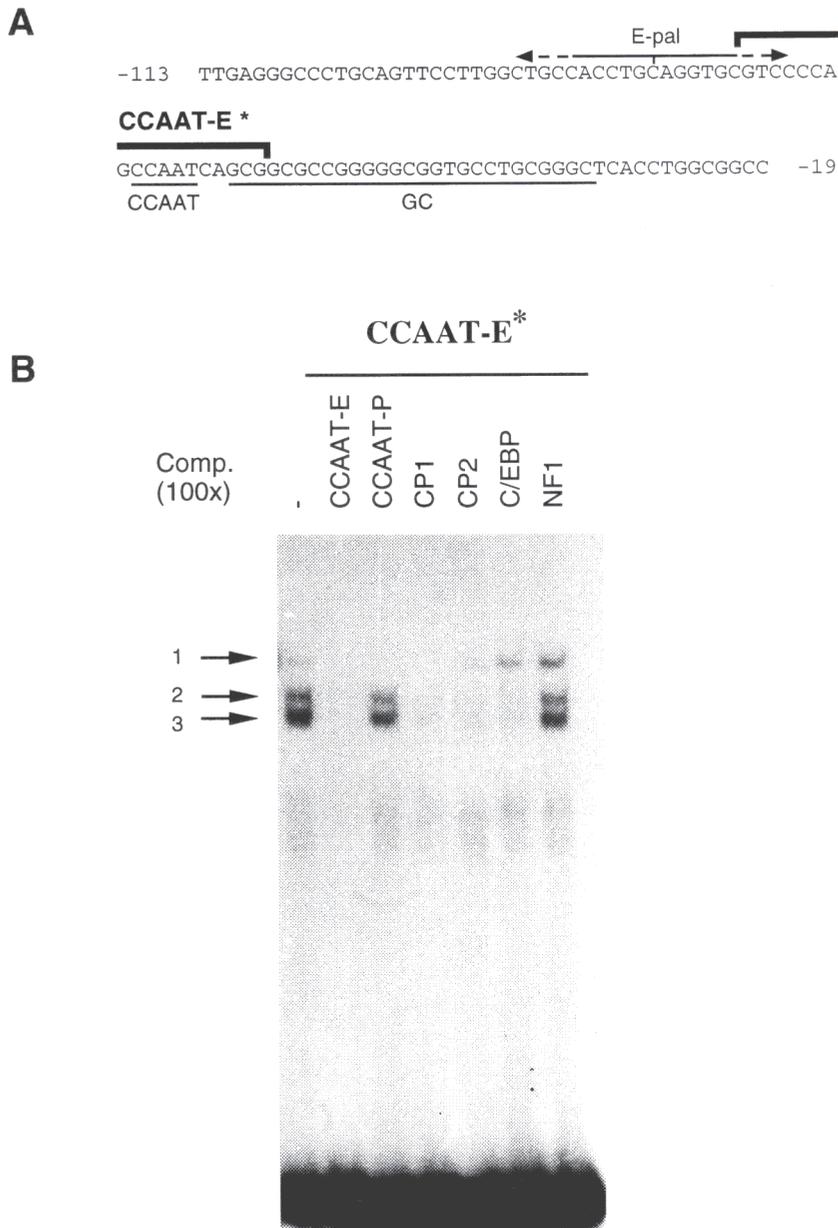


Fig. 24. Análisis de la unión de factores nucleares de la línea celular PDV a la caja CCAAT del promotor de CD-E. La sonda CCAAT-E, mostrada en la parte A de la figura (CCAAT-E *, corchete grueso), se incubó con 4 μ g de extracto nuclear de la línea celular PDV en ensayos de retardo en gel (B). Se empleó como competidores un exceso 100x de la sonda fría utilizada (CCAAT-E), o de oligonucleótidos fríos que contenían la caja CCAAT del promotor de CD-P (CCAAT-P) o sitios consenso de unión de diferentes factores que se unen a la caja CCAAT (CP1, CP2, C/EBP y NF1, ver Materiales, Apto. 9.2). (-), ausencia de competidor. Los tres principales complejos de retardo formados se indican con flechas (1, 2 y 3).

2.2.4. Análisis de los factores que interaccionan con la región rica en GC.

Experimentos de retardo en gel con la región rica en GC (posiciones -60/-23) del promotor de CD-E (Fig. 25A) mostraron la existencia de tres complejos capaces de interaccionar con dicho oligonucleótido. Estos tres complejos se formaban con extractos nucleares de todas las líneas celulares analizadas (CarB, HaCa4, E24, PDV y MCA3D) (Fig. 25B y datos no mostrados).

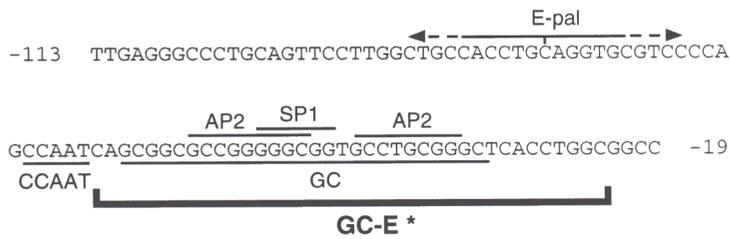
La región rica en GC del promotor de CD-E contiene dos secuencias consenso para el factor de transcripción AP2 y otra para el factor de tipo dedo de zinc, SP1 (Fig. 25A). Como una primera aproximación para identificar la naturaleza de los tres complejos de retardo, se realizaron ensayos de competición con oligonucleótidos consenso para dichos factores. Así, un oligonucleótido con la secuencia de unión a SP1 del promotor de SV40 desplazaba la unión de los complejos de retardo 1 y 2, mientras que un oligonucleótido con la secuencia de unión a AP2 del promotor de SV40 desplazaba la unión de los tres complejos formados con extractos de PDV, pero sólo el complejo 3 de movilidad intermedia formado con extractos de HaCa4 y CarB (Fig. 25B).

Por otro lado, se realizaron ensayos de competición con un oligonucleótido que contenía la región rica en GC del promotor de CD-P (GC-P), que también contiene secuencias consenso de unión a SP1 y AP2 (Faraldo y Cano, 1993). El oligonucleótido GC-P desplazaba la unión de los complejos 1 y 2 obtenidos con todos los extractos, pero no del complejo 3. El mismo comportamiento exhibía un fragmento de este oligonucleótido que contenía sólo la secuencia de unión a SP1 (SP1-P), mientras que un fragmento que contenía sólo la secuencia AP2 (AP2-P) no era capaz de desplazar ningún complejo (Fig. 25B).

Estos resultados, junto con el hecho de que la presencia de zinc era necesaria para la formación del complejo 1 (no mostrado), sugieren que probablemente SP1 sea el factor responsable de la formación de los complejos 1 y 2, mientras que el complejo 3 estaría más relacionado con AP2. Por otro lado, las diferencias observadas en el patrón de competición entre las líneas PDV y HaCa4/CarB, sugieren que los complejos 1 y 3 presentan propiedades diferentes en líneas que expresan y que no expresan CD-E.

Para confirmar la naturaleza de los factores implicados en la formación de los complejos de la región GC se realizaron experimentos de super-retardo con las líneas PDV, HaCa4 y CarB, añadiendo anticuerpos específicos a la mezcla de incubación con la sonda y los diferentes extractos nucleares. La figura 26 muestra los resultados de estos experimentos. Un anticuerpo anti-SP1 originó una clara banda de super-retardo en las tres líneas examinadas e indujo, asimismo, una disminución en la intensidad del complejo 1, y en algún caso (CarB) también del complejo 2. Por otro lado, un anticuerpo anti-AP2 generó una banda de super-retardo (HaCa4), una disminución en la intensidad del complejo 3 (PDV) o bien ambos efectos a la vez (CarB).

A



B

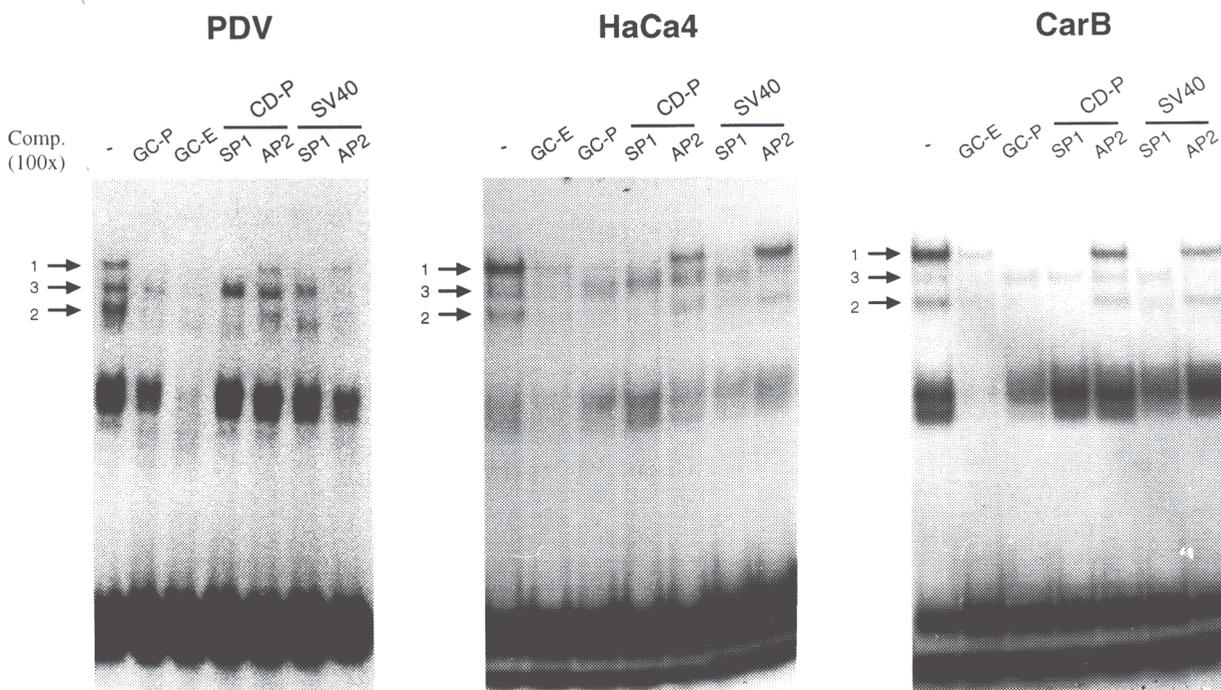


Fig. 25. Unión de factores nucleares de distintas líneas de queratinocitos de ratón a la región rica en GC del promotor de CD-E.

A. Esquema donde se muestra el oligonucleótido GC-E (GC-E *, corchete grueso) empleado como sonda en los ensayos de retardo en gel. Los sitios consenso para los factores de transcripción SP1 y AP2 también se indican.

B. Ensayos de retardo en gel utilizando la sonda GC-E y 2.5 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas. Los tres principales complejos de retardo formados se indican con flechas (1, 2 y 3). Se empleó un exceso 100x de oligonucleótidos competidores: GC-P (región rica en GC del promotor de CD-P), GC-E (sonda fría) y oligonucleótidos que contenían los sitios consenso de unión a SP1 y AP2 de la región rica en GC del promotor de CD-P y del promotor de SV40 (ver Materiales, Apto. 9.2). (-), ausencia de competidor.

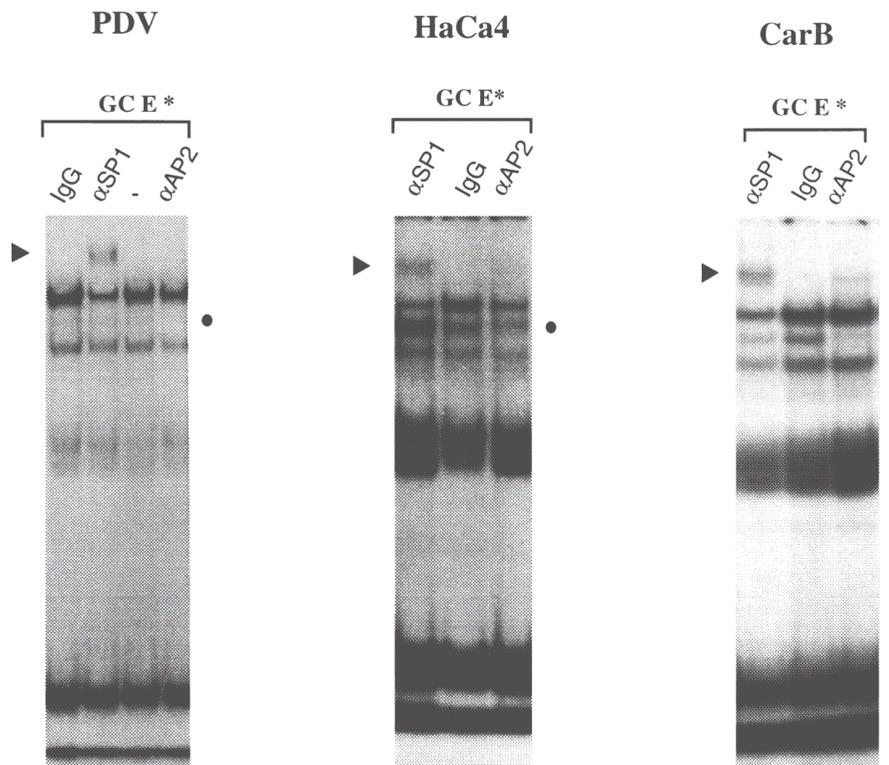


Fig. 26. Factores tipo SP1 y AP2 de los queratinocitos de ratón interactúan con la región rica en GC del promotor de CD-E. El oligonucleótido GC-E (ver Fig. 25) se empleó como sonda en experimentos de super-retardo. La sonda se incubó con 2.5 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas, en ausencia (-) o presencia de 1.5 μ g de anticuerpo anti-SP1 (α SP1), anti-AP2 (α AP2) o IgG de conejo (IgG) como control. Las bandas de super-retardo se indican con una punta de flecha y la desaparición parcial del complejo 3 con un punto.

Estos datos permiten confirmar la participación de factores de transcripción del tipo SP1 y AP2 en la formación de complejos de interacción con la región GC de CD-E en las líneas de queratinocitos analizadas.

Evidencias adicionales acerca de la implicación de los factores SP1 y AP2 en el reconocimiento de la región rica en GC se obtuvieron por experimentos de footprinting *in vitro* de la región 5' proximal de CD-E utilizando los factores de transcripción puros SP1 y AP2. Como se puede ver en la figura 27, en efecto, dichos factores eran capaces de interaccionar con la región rica en GC del promotor de CD-E.

Por otra parte, y para determinar si la unión del factor AP2 tiene una consecuencia funcional en la actividad promotora, se realizaron experimentos de cotransfección con un vector de expresión de una forma truncada del factor AP2 (AP2- Δ TA), que carece del dominio de transactivación y actúa como dominante negativo (Hennig *et al.*, 1996). Como se muestra en la tabla IX esta forma truncada de AP2 fué capaz de reprimir, de forma dependiente de dosis, la actividad promotora de la construcción -178 (un 70% con 5 μ g de AP2- Δ TA), pero no de forma significativa la de la construcción -21. Estos resultados, junto con los valores de actividad promotora de los mutantes mut GC1 y mut GC2 (ver Fig. 20), apoyan que la región GC, que contiene sitios de unión a SP1 y AP2, está jugando un papel positivo en la regulación de la transcripción de CD-E.

Tabla IX. Un dominante negativo de AP2 suprime parcialmente la actividad promotora de CD-E en MCA3D.

Δ AP2*	% Actividad # (MCA3D)		
	μ g	-178	-21
-	100	100	100
1	72	56	82
5	28	28	73

* Se cotransfectaron 1 o 5 μ g del vector dominante negativo de AP2 (AP2- Δ TA), completando en el primer caso hasta 5 μ g con la cantidad necesaria del vector control RSV-0 (ver Materiales. Apto. 8.2.4).

La actividad CAT de la construcción -178 o -21 en la línea celular MCA3D se normalizó respecto a la actividad de CMV-luc. A la actividad de dichas construcciones en presencia del vector control y en ausencia de AP2- Δ TA se le otorgó el valor de 100%. Para la construcción -178 se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

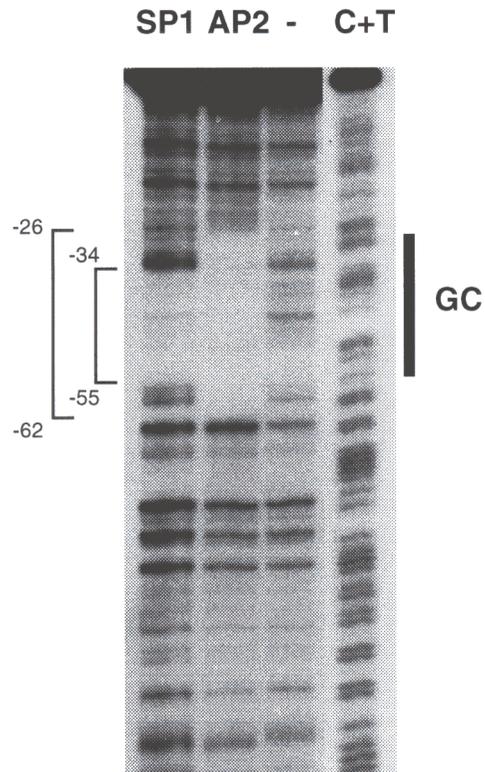


Fig. 27. Interacción de los factores SP1 y AP2 con la región rica en GC de la zona 5' proximal del gen de CD-E. Los factores recombinantes puros SP1 y AP2 (1fpu) se incubaron con la sonda -178/+17 del promotor de CD-E marcada en el extremo 3' de la cadena no codificante, se digirieron con DNAasaI y se analizaron en gel de secuenciación. (-), control de DNA digerido en ausencia de factor de transcripción. C+T, productos de la reacción de secuenciación G+A de Maxam-Gilbert sobre la sonda. Las bandas corresponden, por tanto, con las C y T de la cadena codificante. Las regiones protegidas por SP1 (-55/-34) y AP2 (-62/-26) se indican con corchetes a la izquierda y corresponden con la región rica en GC, señalada con una barra gruesa a la derecha.

2.2.5. Análisis de los factores que interaccionan con la región ECE

En experimentos de footprinting *in vitro* la región ECE, comprendida entre los nucleótidos -108/-86 aproximadamente, se protegía sólo con extractos nucleares de líneas que expresaban CD-E (ver Fig. 21). Los potenciales factores implicados en el reconocimiento de esta región se analizaron mediante ensayos de retardo en gel utilizando como sonda el oligonucleótido ECE (posiciones -111/-83) que aparece en la figura 28A, tanto en líneas positivas como negativas para CD-E. Como se puede observar, esta región, que también es rica en GC, contiene secuencias consenso de unión a factores de la familia Ets (Wasylyk *et al.*, 1993) y la secuencia CRE (elemento de respuesta a AMPc) de unión a factores CREB/ATF (Hoeffler *et al.*, 1988; Benbrook y Jones, 1994).

La figura 28B muestra que se formaron dos complejos de retardo mayoritarios (1 y 2), y una serie de complejos de menor intensidad y mayor movilidad electroforética. De forma interesante, la intensidad del complejo 2 formado en presencia de extractos nucleares de líneas que expresaban CD-E (E24 y sobre todo MCA3D y PDV) era mucho mayor que la del formado con extractos de líneas CD-E negativas. Así, con extractos de fibroblastos NIH3T3 o de la línea derivada de carcinoma MSC11A5 la intensidad del complejo 2 disminuía hasta llegar a igualar en intensidad al complejo 1, siendo el complejo 2 apenas detectable en extractos de CarB.

Estudios de competición de los complejos de retardo sugirieron la participación de algún miembro de la familia Ets en la interacción. Así en la figura 28C se observa que el oligonucleótido PEA 3, que porta un sitio consenso para el factor PEA 3, era capaz de competir una de las bandas de movilidad intermedia (complejo 3), mientras que el mismo oligonucleótido con una mutación en el sitio consenso no competía dicha banda de retardo. Se ha descrito que la mayoría de los miembros de la familia Ets se unen al motivo PEA 3 (MacLeod *et al.*, 1992). Sin embargo, los complejos mayoritarios 1 y 2 no se competían por PEA 3. El mismo patrón de competición se observó en una línea CD-E positiva (E24) y en una línea CD-E negativa (HaCa4).

Para determinar de forma más clara el lugar de interacción de las proteínas nucleares con el DNA y la posible participación de factores de la familia Ets y/o de factores tipo CREB en el reconocimiento de la región ECE, se realizaron análisis de retardo en gel compitiendo con el oligonucleótido ECE mutado en distintas posiciones (ver Fig. 29A). Así, se hicieron competiciones con el oligonucleótido ECE portando mutaciones en cada uno de los sitios Ets independientemente (mA y mB) o en combinación (mAB), y en el sitio CREB (mC).

Los resultados, que aparecen en la figura 29B, indican que la integridad del sitio Ets situado más en 3' (Ets-A) es necesaria para la interacción del factor o factores nucleares con la región ECE, ya que los oligonucleótidos mA y mAB, con el sitio Ets-A mutado, eran incapaces de desplazar la unión. En cambio, los oligonucleótidos mB y mC desplazaban la unión de igual forma que el oligonucleótido ECE silvestre. El patrón de competición era similar en todas las líneas analizadas (MCA3D, HaCa4 y CarB) con la única diferencia de

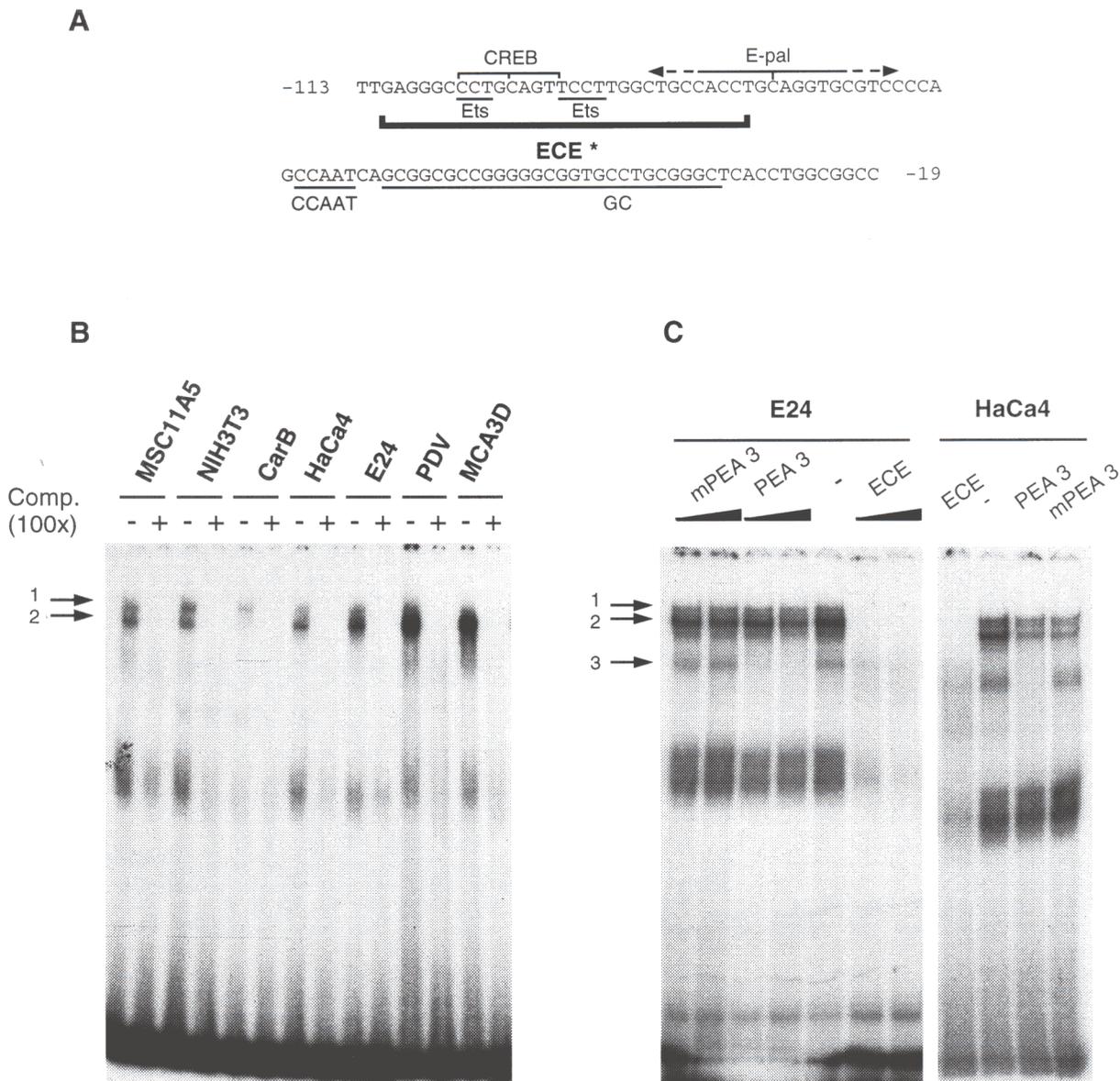


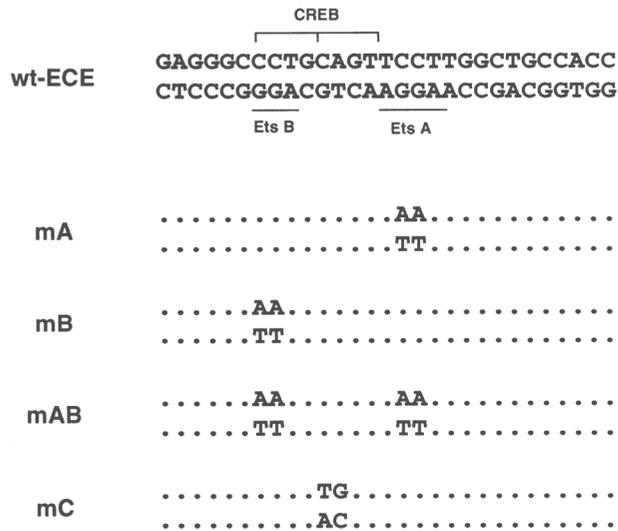
Fig. 28. Interacción de factores nucleares de las líneas de queratinocitos de ratón con la región ECE

A. Esquema donde se señala el oligonucleótido ECE empleado como sonda (ECE *, corchete grueso) y los sitios consenso Ets y CREB de esta región.

B. Ensayos de retardo en gel con la sonda ECE y 10 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas. Los dos principales complejos de retardo formados se indican con flechas (1 y 2).

C. Ensayos de competición en ausencia (-) o presencia de un exceso 100x y 250x (E24), 100x (ECE en HaCa4) o 150x (PEA 3 y mPEA 3 en HaCa4), de los oligonucleótidos indicados. Los oligonucleótidos PEA 3 y mPEA 3 contienen el sitio consenso, silvestre y mutado respectivamente, de unión al factor de la familia Ets PEA 3 (ver Materiales, Apto. 9.2). El complejo 3, indicado con una flecha, se compete con el oligonucleótido PEA 3 pero no con mPEA 3.

A



B

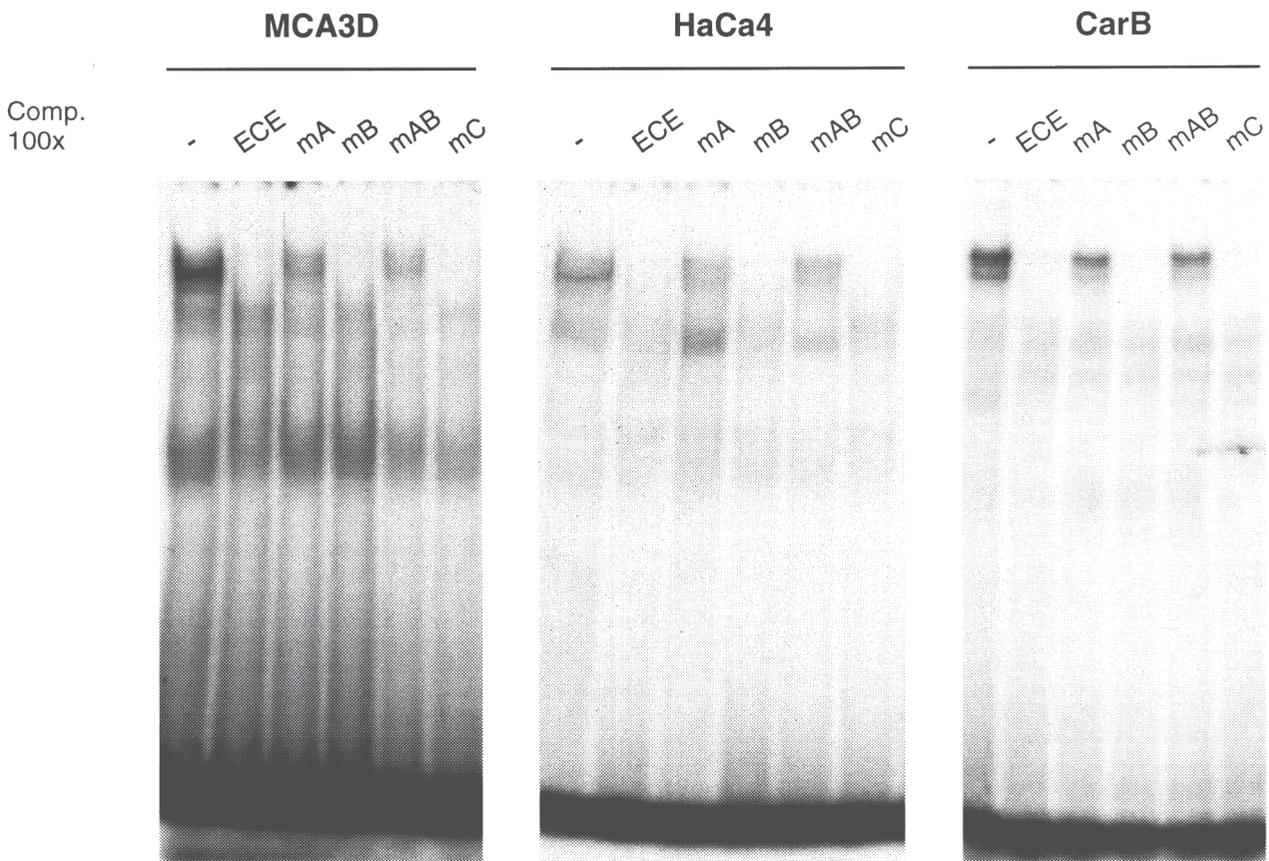


Fig. 29. La interacción de factores nucleares a la región ECE se realiza principalmente a través del sitio Ets-A.

A. Esquema del oligonucleótido ECE empleado como sonda y de los oligonucleótidos mutados en los sitios consenso empleados en los ensayos de competición.

B. Patrón de competición de la unión a ECE de 10 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas con un exceso 100x de los oligonucleótidos que se indican. (-), ausencia de competidor. La mutación en el sitio Ets-A induce un descenso total o parcial de la capacidad de competir la unión.

que los oligonucleótidos mA y mAB eran capaces de competir parcialmente los complejos formados con extractos nucleares de MCA3D (CD-E positiva). Estos resultados sugieren además la existencia de diferencias o modificaciones en los factores que reconocen la región ECE en líneas que expresan y no expresan CD-E.

2.3. Análisis funcional de la región ECE y del elemento Ets en la actividad promotora de CD-E.

La región ECE, como se mencionó anteriormente, contiene, además de los sitios Ets, un consenso casi perfecto de unión a factores de tipo CREB de respuesta a AMPc. Para determinar si factores de esta familia pudieran regular la actividad transcripcional de CD-E en las líneas de queratinocitos de ratón, se midió la actividad del promotor en células estimuladas con forskolina, un agente inductor de AMPc. Los resultados, que aparecen en la Tabla X, mostraron que este agente no modificó de forma sustancial la actividad promotora de la construcción -178. El ligero incremento observado también se apreció en algunas ocasiones con la construcción -78, que carece del sitio CREB. Estos resultados, junto a la ausencia de efecto de la mutación en el sitio CREB en los experimentos de retardo en gel (ver Fig. 29), sugieren que el sitio CREB de la región ECE no estaría ejerciendo un papel regulador de la actividad del promotor de CD-E en las líneas analizadas.

Por otro lado, y para determinar si el sitio Ets-A, necesario para la interacción de factores proteicos, era funcional, se realizaron ensayos de transfección transitoria utilizando una construcción del promotor de CD-E (nucleótidos -178/+92) que portaba una mutación en el sitio Ets-A (construcción m-Ets) (Fig. 30). Como puede observarse, la construcción mutada mostró una actividad transcripcional alrededor de 2 veces mayor respecto a la actividad de la construcción silvestre en las líneas CD-E positivas MCA3D y PDV. En cambio, en líneas CD-E negativas (CarB y Haca4), las construcciones silvestre y mutada mostraron niveles similares de actividad. Estos resultados sugieren que el elemento Ets jugaría un moderado papel regulador negativo en líneas que expresan CD-E. En líneas que no expresan este elemento podría no desempeñar ningún papel regulador, o bien podría estar enmascarado por el fuerte papel represor del elemento E-pal en dichas líneas.

Por tanto, si este sitio Ets es funcional, la cotransfección del promotor de CD-E con vectores de expresión de factores de la familia Ets debería inducir un cambio en la actividad transcripcional. Para comprobarlo se realizaron experimentos de cotransfección con vectores de expresión de c-Ets-1 (pollo) y ERM (humano). Los efectos sobre la actividad transcripcional fueron más significativos con el factor ERM, y son los que se muestran en la figura 31. La sobreexpresión de este factor indujo un aumento de 2.3 y 3.6 veces en la actividad del promotor de CD-E en las líneas MCA3D y HaCa4, respectivamente (Fig.31A). El efecto estimulador del factor ERM en la línea MCA3D parece ejercerse a través del sitio

Tabla X. Influencia de la forskolina en la actividad transcripcional de CD-E.

Línea celular	FK # (μ M)	Actividad * +FK/-FK	
		-178	-78
MCA3D	12	1.25	1.40
PDV	12	1.35	1.12
PDV	40	1.35	0.78
HaCa4	12	1.35	0.84

* La actividad CAT de las construcciones -178 o -78 se normalizó en cada experimento respecto a la actividad de CMV-luc. Los valores de actividad de dichas construcciones en presencia de forskolina (+FK) se relacionó con los valores de actividad en ausencia de la misma (-FK).

La FK se añadió a las células en cultivo después de la transfección y se mantuvo durante 22 horas, hasta recoger los extractos para medir actividad.

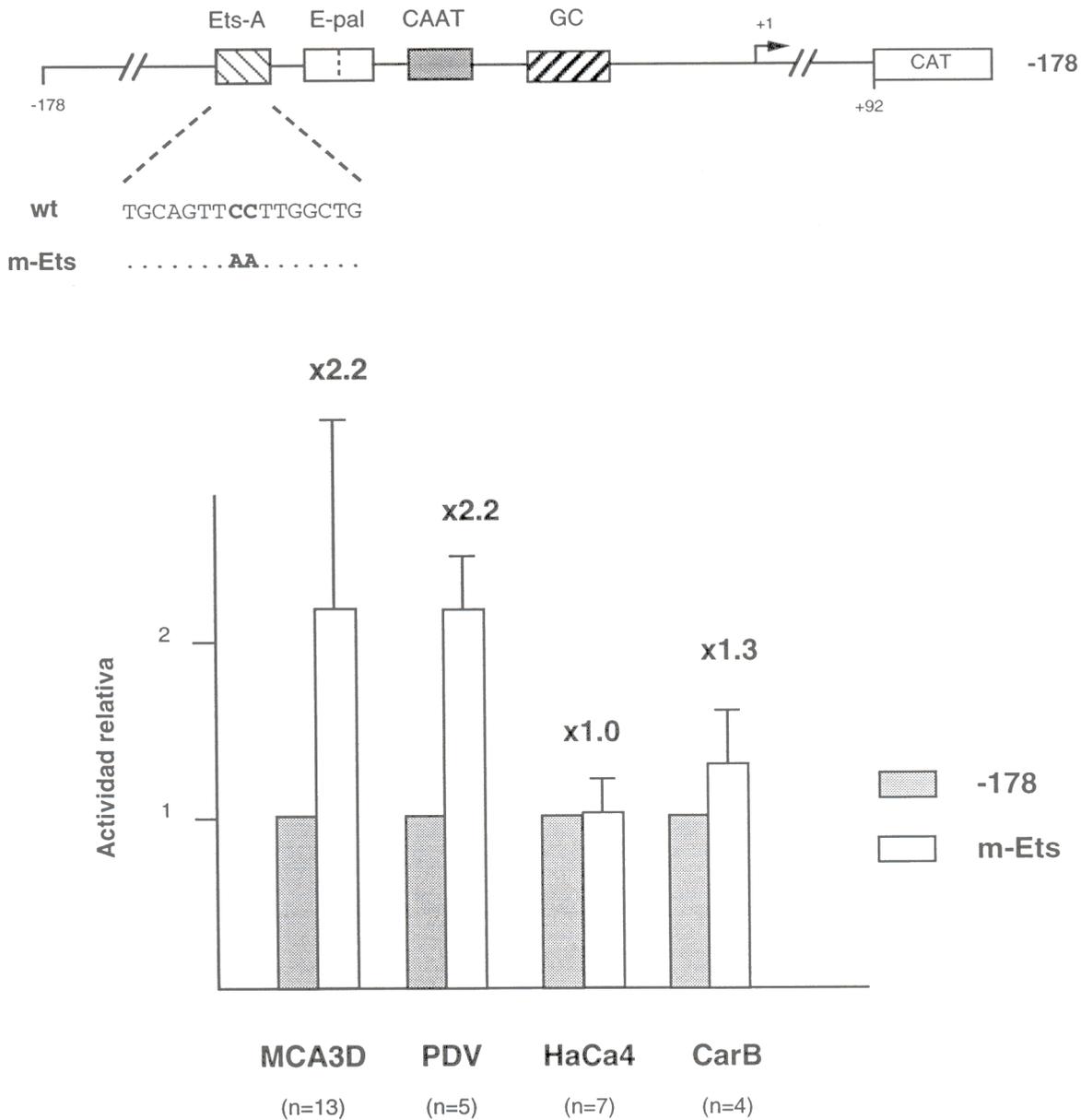


Fig. 30. La mutación del sitio Ets-A induce un aumento en la actividad promotora de CD-E en líneas de queratinocitos que expresan CD-E. Los valores de actividad CAT de la construcción -178 (w.t.) o de la misma construcción mutada en el sitio Ets-A, m-Ets (parte superior de la figura), se normalizaron en cada experimento respecto a la actividad de CMV-luc. La actividad de la construcción m-Ets en cada línea celular se indica como actividad relativa respecto a la actividad de -178. Los valores representan la media de n experimentos y las desviaciones standard se muestran como barras de error. Los números sobre las barras representan la inducción en la actividad promotora que provoca la mutación.

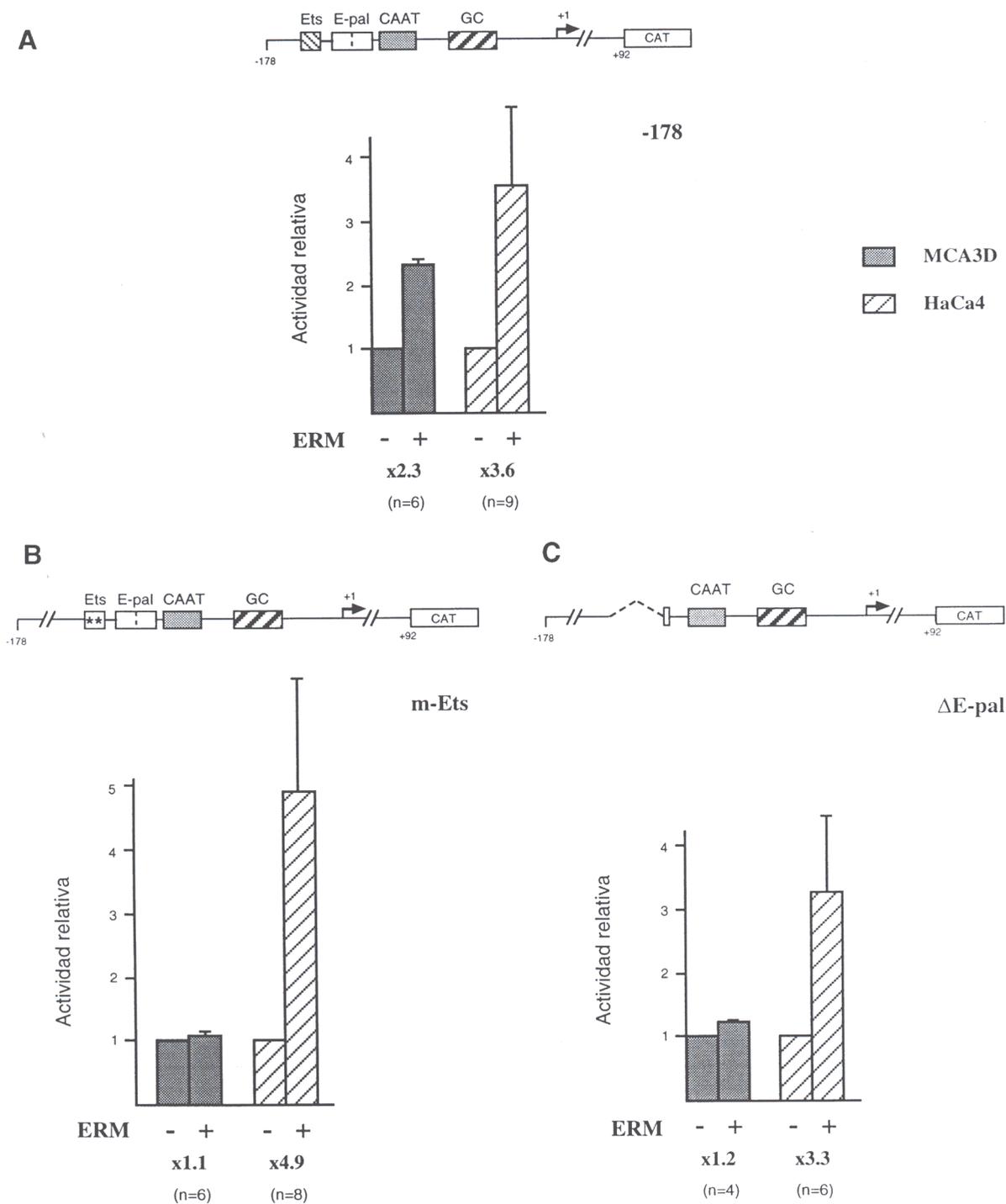


Fig. 31. La cotransfección de ERM induce un incremento en la actividad transcripcional del promotor de CD-E. Las construcciones del promotor de CD-E -178 (Panel A), m-Ets (Panel B) o Δ E-pal (Panel C) se cotransfectaron con 1 μ g del vector de expresión de ERM, pSG5-ERM, (+) o del vector control pSG5 (-) (ver Materiales, aptdo. 8.2.4), en las líneas celulares MCA3D (columnas grises) o HaCa4 (columnas rayadas). La actividad CAT se normalizó en cada experimento con la de CMV-luc. Los valores de actividad en presencia de ERM se relacionaron con los valores en ausencia de ERM (vector control) al que se dió el valor de uno, en cada experimento. n, número de experimentos. Los valores corresponden a la media de los valores de los experimentos indicados y las barras de error indican las desviaciones standard. El valor que aparece bajo la barra de abscisas indica el número de veces de inducción en la actividad promotora que provoca el factor ERM.

Ets-A, ya que cuando la construcción que se cotransfectó en esta línea fué la construcción m-Ets, la sobreexpresión de ERM no indujo ningún cambio en la actividad transcripcional del promotor de CD-E (Fig. 31B). En cambio, en la línea celular HaCa4 la estimulación por ERM debe efectuarse por mecanismos distintos a la interacción con el sitio Ets-A, ya que la mutación en este sitio no alteró el efecto inductor de ERM. Resultados similares se obtuvieron con la construcción Δ E-pal, que también carece del sitio Ets y del elemento palindrómico E-pal (Fig. 31C).

Para estudiar la presencia endógena de miembros de la familia Ets en estas líneas, y si existía alguna diferencia, en los niveles de expresión o en el tipo de factor expresado, que pudiera dar cuenta del distinto comportamiento exhibido por líneas positivas y negativas, se realizaron ensayos de inmunoblot con un anticuerpo que reconocía distintos miembros de la familia Ets, como primera aproximación. Como se puede ver en la figura 32, todas las líneas analizadas expresaban algún miembro de esta familia, y no se observaron diferencias entre ellas. Sin embargo, ya que el anticuerpo es de amplio espectro, estos resultados no permiten descartar una expresión diferencial, cuantitativa o cualitativa, de miembros de la familia Ets en las diferentes líneas celulares.

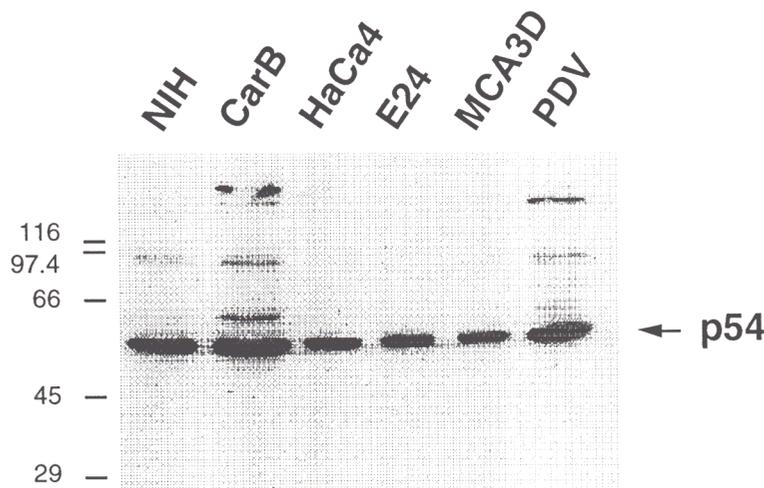


Fig. 32. Detección de factores de la familia Ets por inmunoblot en las distintas líneas de queratinocitos de ratón. 10 μ g de extracto total de las líneas celulares indicadas se sometieron a inmunoblot con un anticuerpo anti-Ets1 que reconoce varios miembros de la familia Ets. La banda específica de 54 KDa se indica a la derecha con una flecha. A la izquierda se señalan los marcadores de peso molecular en KDa.

2.4. Estudios del promotor endógeno de CD-E.

2.4.1. Estado de metilación endógena del promotor de CD-E.

Los ensayos de transfección transitoria con el promotor exógeno de CD-E mostraron la existencia de una serie de factores capaces de regular la expresión de CD-E y que actúan en trans, algunos de los cuales pueden estar alterados durante la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón. Sin embargo, estudios previos en líneas de carcinomas humanos han sugerido que la metilación endógena de la región 5' del gen de CD-E en islas CpG es uno de los mecanismos implicados en la represión de su expresión (Graff *et al.*, 1995; Yoshiura *et al.*, 1995).

Para analizar si la pérdida de expresión de CD-E durante la progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón pudiera estar también relacionada con mecanismos de represión transcripcional por metilación, decidimos estudiar el estado de metilación endógena del promotor de CD-E en las distintas líneas de queratinocitos de ratón. Para ello se realizaron análisis de Southern-blot sobre DNA genómico aislado de las distintas líneas celulares, digerido con BamHI, y sometido a una segunda digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación. La sonda que se utilizó correspondía a la región 5' del gen de CD-E (-800/+92) (Fig. 33A).

La figura 33B muestra cómo la digestión del DNA con BamHI originó una banda de aproximadamente 6 Kb en la región promotora de CD-E. En las líneas celulares MSC11A5 y HaCa4 aparece una banda adicional con un tamaño correspondiente a 4.1 Kb. Esta banda sugiere la existencia de alguna alteración o polimorfismo en alguna de las copias del gen de CD-E, en la región 5', en estas dos líneas celulares.

El enzima HaeII es un enzima sensible a metilación. Según se muestra en la figura 33A, la digestión con HaeII debería originar, en DNAs no metilados, la desaparición de la banda de 6 Kb y la aparición de dos bandas menores. En la parte B de la figura 33 se puede observar cómo la digestión con HaeII no modificó el tamaño de la banda de 6 Kb, que se mantuvo en el DNA de todas las líneas estudiadas, tanto DNA de líneas que expresan CD-E (MCA3D, PDV y E24) como de líneas que no la expresan (HaCa4, CarB y MSC11A5). En el carril correspondiente a HaCa4 se puede observar la aparición de una banda de unas 1.8 Kb tras la digestión con BamHI y HaeII. Sin embargo lo más probable es que esta banda se origine a partir de la adicional de 4.1 Kb, ya que ésta desaparecía tras la digestión con HaeII. En la línea celular MSC11A5, que también presentaba la banda de 4.1 Kb, no se apreció la banda de 1.8 Kb, pero esto puede deberse a la poca intensidad que posee en general este carril, puesto que la banda de 4.1 Kb sí desaparecía tras la digestión con HaeII en esta línea celular. Estos resultados sugieren que la banda anómala de 4.1 Kb que aparece en HaCa4 y MSC11A5 porta al menos un sitio HaeII que no está metilado, mientras que el sitio HaeII del promotor endógeno de CD-E en la posición -56 estaría metilado en todas las líneas celulares.

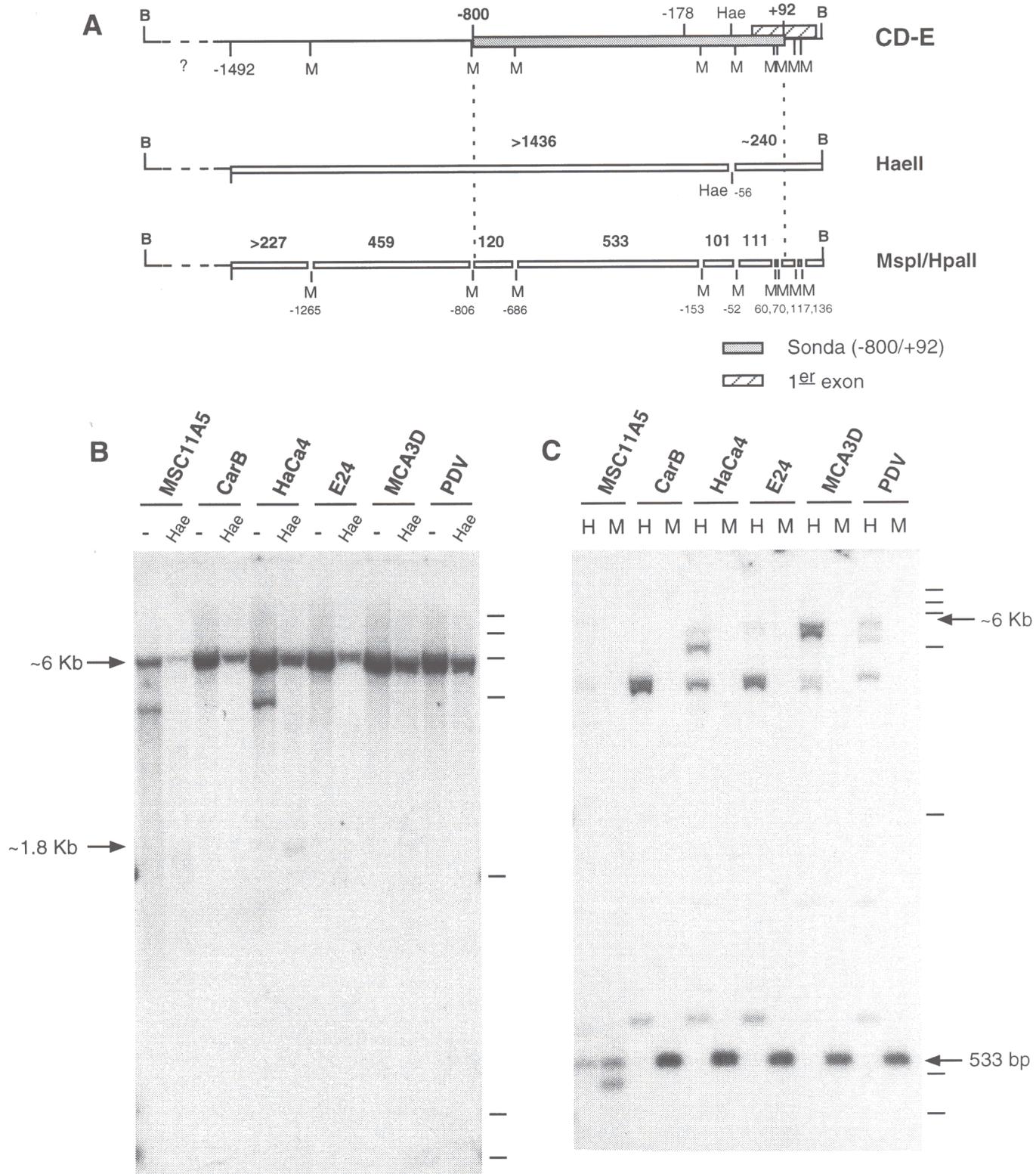


Fig. 33. Estudio del estado endógeno de metilación del promotor de CD-E por Southern-blot.

A. Representación esquemática y mapa de restricción de la región 5' del gen de CD-E, donde se indican las dianas de restricción conocidas de BamHI (B), HaeII (Hae) y MspI/HpaII (M). El fragmento empleado como sonda se representa con un rectángulo gris y la región correspondiente al primer exón con un rectángulo rayado. En la parte inferior se indican los tamaños de los fragmentos de DNA que resultarían de la digestión total con las enzimas señaladas.

B y C. Southern-blot del DNA de las líneas indicadas, digerido con BamHI solamente (-) o BamHI y HaeII (Hae), parte B; o bien con BamHI junto con MspI (M) o con HpaII (H), parte C. Se empleó la sonda correspondiente a la región -800/+92 del promotor de CD-E indicada en la parte A de la figura. Las pequeñas barras a la derecha corresponden con los marcadores de peso molecular de 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 1.6, 0.51 y 0.39 Kb.

Para confirmar la existencia de metilaciones en la región promotora del gen de CD-E se realizaron también ensayos de Southern-blot digiriendo con la enzima sensible a metilación HpaII, y comparando con el patrón generado por su isoesquímico MspI, que reconoce la misma diana de restricción pero no es sensible a metilación. Tal como se muestra en el esquema de la figura 33A, en la región promotora de CD-E reconocida por la sonda empleada (-800/+92) la digestión con MspI debe cortar el DNA en pequeños fragmentos, siendo el mayor de 533 bp. En la figura 33C se observa en los carriles correspondientes a la digestión con MspI esta banda de 533 bp. En el carril correspondiente a MSC11A5 se observó adicionalmente otra banda de unos 490 bp, lo que reafirma la existencia de alteraciones o polimorfismos en la región del promotor de CD-E en esta línea celular.

La digestión con HpaII debería originar el mismo patrón si el DNA no estuviera metilado en ninguno de los sitios de corte HpaII de la región promotora. En caso contrario, se originarían bandas de mayor tamaño. Los resultados obtenidos correspondían con esta segunda opción, ya que en ningún caso, salvo en el DNA de MSC11A5, aparecía la banda de 533 bp, sino bandas mayores correspondientes a digestiones parciales con HpaII, llegando incluso a aparecer la banda de 6 Kb, correspondiente al fragmento BamHI sin digerir. En el caso de la línea celular MSC11A5 sí aparecía tras la digestión con BamHI y HpaII una banda de un tamaño que podría corresponder con 533 bp. Sin embargo, aparecían también bandas de mayor tamaño y la banda de 6 Kb (que se aprecian bien en la autorradiografía original), indicando que también el promotor endógeno está metilado en esta línea, aunque no se puede descartar que sea en posiciones diferentes a las del resto de líneas estudiadas.

Estos resultados indican que la región 5' del gen de CD-E está metilada endógenamente en todas las líneas de queratinocitos analizadas. Al menos la posición -685 o la posición -152 del promotor de CD-E, sitios HpaII/MspI (flanqueantes a la banda de 533 bp), están metiladas en todas las líneas, salvo en la línea indiferenciada MSC11A5, donde no se ha podido demostrar de forma concluyente. También la posición -56 (sitio HaeII) está metilada de forma endógena en todas las líneas de queratinocitos analizadas. Por otra parte, estos resultados no descartan la existencia de metilaciones en otras regiones con islas CpG del promotor.

Por tanto, en este sistema celular no se puede atribuir la pérdida de expresión de CD-E durante la progresión a mecanismos de hipermetilación de su región promotora, ya que esta región se encuentra metilada tanto en líneas que expresan CD-E como en líneas que no la expresan.

2.4.2. Estudios de footprinting in vivo.

Todas las evidencias indicaban que al menos uno de los mecanismos de la pérdida de expresión de CD-E en el sistema de la carcinogénesis de piel de ratón era las alteraciones de factores que actúan en trans sobre el promotor de CD-E (factores de transcripción, sus

cofactores, o señales que conducen a la puesta en marcha de un programa transcripcional), pero que en último término actuarían por interacción con la región 5' promotora del gen de CD-E. Para confirmar esta hipótesis y detectar si los elementos reguladores postulados mediante experimentos *in vitro* y de transfección transitoria estaban realmente ejerciendo un papel regulador, decidimos analizar el estado de ocupación y la estructura del promotor endógeno mediante experimentos de footprinting *in vivo*.

Las células en cultivo se trataron con el agente metilante DMS, que metila *in vivo* los residuos de DNA no protegidos. El DNA se digirió con piperidina, en los residuos metilados, se amplificó y marcó con cebadores específicos para la región promotora de CD-E, tal como se indica en Métodos, Apto. 12. De esta forma, y por comparación con un DNA control metilado *in vitro* (Co), se pudieron detectar los residuos protegidos o hipersensibles indicativos de diferente estructuración del DNA en líneas que expresan y no expresan CD-E. La figura 34A muestra los resultados obtenidos con la cadena codificante del promotor de CD-E en las líneas celulares MCA3D (CD-E positiva) y CarB (CD-E negativa). Los resultados obtenidos con la cadena no codificante se muestran en la figura 34B, incluyendo además las líneas HaCa4 (CD-E negativa) y E24 (CD-E positiva). En la figura 35 se muestra un esquema donde se recogen todos los sitios hipersensibles (triángulos opacos) o protegidos (triángulos punteados) *in vivo* del promotor de CD-E, en las líneas celulares MCA3D y CarB.

En la línea celular CarB, que no expresa CD-E, sólo aparecían protegidas las posiciones -80, en el centro del palíndromo E-pal, y la posición -101, próxima al sitio Ets de la región ECE. (Fig. 34 y 35).

En la línea celular MCA3D, por el contrario, aparecían numerosos sitios de protección o hipersensibilidad, sugiriendo una configuración del promotor mucho más abierta, que probablemente refleje un estado transcripcional más activo (Fig. 34 y 35). Así, muchos de los sitios de regulación postulados mostraron modificaciones, en comparación con un DNA control metilado *in vitro*. Especialmente en la región rica en GC, con protecciones en los sitios SP1 y AP2 y sitios hipersensibles en los bordes de esta región; en la caja CCAAT; en el elemento E-pal; y en los bordes de la región ECE. Asimismo, aparecía un sitio de hipersensibilidad en el sitio de inicio de la transcripción +1, y sitios protegidos e hipersensibles en posiciones muy cercanas, indicando que probablemente la RNA polimerasa II esté actuando, unida al promotor, en esta línea celular. Por otro lado, en MCA3D se observaron posiciones adicionales potencialmente importantes como los sitios de hipersensibilidad en -139 y -16, y las protecciones de las posiciones -167/-169 y -126/-117, situadas en regiones ricas en GC. Estas regiones ricas en GC, que contienen sitios consenso de unión a los factores de transcripción SP1 y Ets, podrían ser importantes para la actividad transcripcional de CD-E.

El patrón obtenido en los análisis de footprinting *in vivo* con la línea celular PDV, que expresa CD-E, fué prácticamente igual al obtenido con la línea MCA3D (resultados no

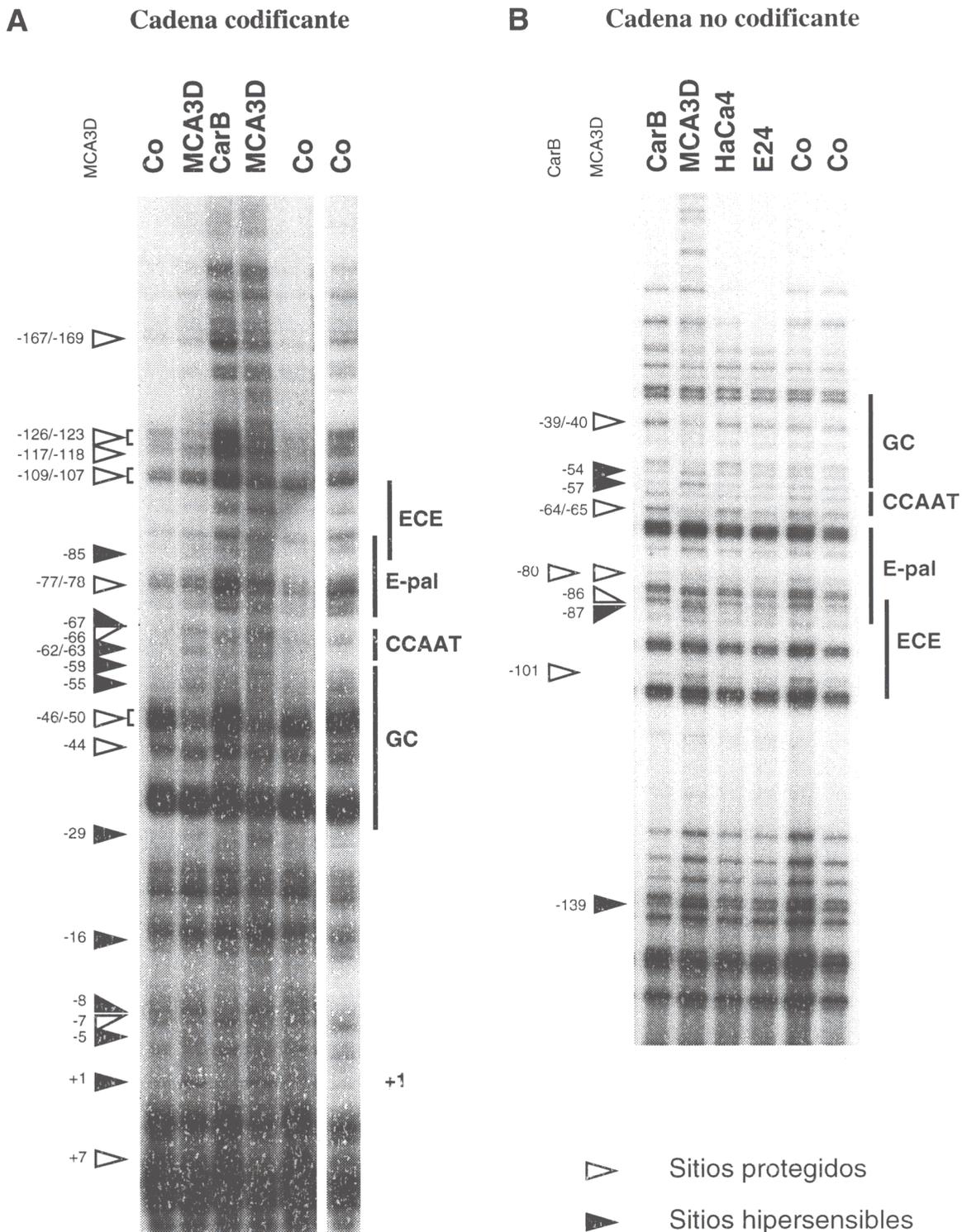


Fig. 34. Análisis por footprinting *in vivo* del promotor de CD-E en líneas de queratinocitos de ratón. Las células en cultivo se metilaron *in vivo* con DMS y el DNA se digirió con piperidina en los residuos metilados. Se emplearon los oligonucleótidos cebadores adecuados (ver Materiales, Apto. 9.3) para amplificar y marcar la cadena codificante (A) o la cadena no codificante (B) en la región 5' del gen de CD-E. Co, DNA control metilado *in vitro*. En la figura se marcan los sitios protegidos (triángulos blancos) o hipersensibles (triángulos negros), por comparación con el carril control, en las líneas MCA3D y CarB. Las regiones potenciales de regulación también se indican en la figura, así como el sitio de inicio de la transcripción (+1).

mostrados). La línea celular E24 (CD-E positiva) también originó un patrón similar (Fig. 34B y resultados no mostrados para la cadena codificante), sobre todo en torno a la región E-pal y CCAAT. En la región rica en GC se observaron protecciones, pero de menor intensidad, y en menos sitios que en la línea celular MCA3D. Los sitios de hipersensibilidad en las posiciones -29, -16 y en el sitio de inicio de la transcripción también aparecieron. Asimismo, la posición -101 de la zona ECE, que se protegía en CarB, también se protegió en E24 (ver Fig. 34B).

Por otro lado, la línea celular HaCa4 (CD-E negativa) mostró un patrón mucho más parecido al de CarB, con protección en el centro del E-pal y en la posición -101, destacando la ausencia de protección en la caja CCAAT y sobre todo en la región rica en GC (Fig. 34B y resultados no mostrados)

En conjunto, estos resultados muestran una estructuración del promotor endógeno de CD-E diferente en líneas que expresan y no expresan CD-E, siendo en las primeras mucho más abierta, acorde con un estado transcripcional activo. Asimismo, en las líneas que expresan CD-E hay numerosas posiciones protegidas *in vivo*, probablemente por la interacción de factores de transcripción. Por otro lado, tanto el centro de la región E-pal como el borde del sitio Ets de la región ECE parecen estar interaccionando con factores nucleares en líneas celulares que no expresan CD-E.

2.5. Estudio comparativo de los promotores de CD-E Y CD-P de ratón.

Tal como se ha mencionado en la Introducción, la molécula de adhesión celular CD-P coexiste con la CD-E en las células de la capa basal de la epidermis, mientras que en las capas suprabasales desaparece la expresión de CD-P, manteniéndose la de CD-E. Por otro lado, mientras que la CD-E suele desaparecer en los primeros estadios de la progresión tumoral, la CD-P se mantiene, para desaparecer en los últimos estadios de la progresión, carcinomas fusiformes. Estos hechos hacen suponer una regulación compleja de la expresión de ambas moléculas, y la posibilidad de la existencia de mecanismos reguladores comunes para las dos moléculas de adhesión.

Estudios previos de nuestro grupo sobre el promotor de CD-P de ratón (Faraldo y Cano, 1993) indicaron que este promotor, al igual que el de CD-E, carecía de caja TATA y en su lugar había una secuencia consenso iniciadora, en el sitio de inicio de la transcripción (ver Fig. 36). Asimismo, se detectó la presencia de sitios potenciales de regulación, algunos de ellos comunes con los existentes en el promotor de CD-E. Así, en el promotor de CD-P existe una región rica en GC, en posición -101/-80, con un sitio consenso para SP1 (-85) y otro para AP2 (-95), y una caja CCAAT, situada en la misma posición (-65) que la del promotor de CD-E. No se detectó ninguna secuencia palindrómica semejante a E-pal en el promotor de CD-P.

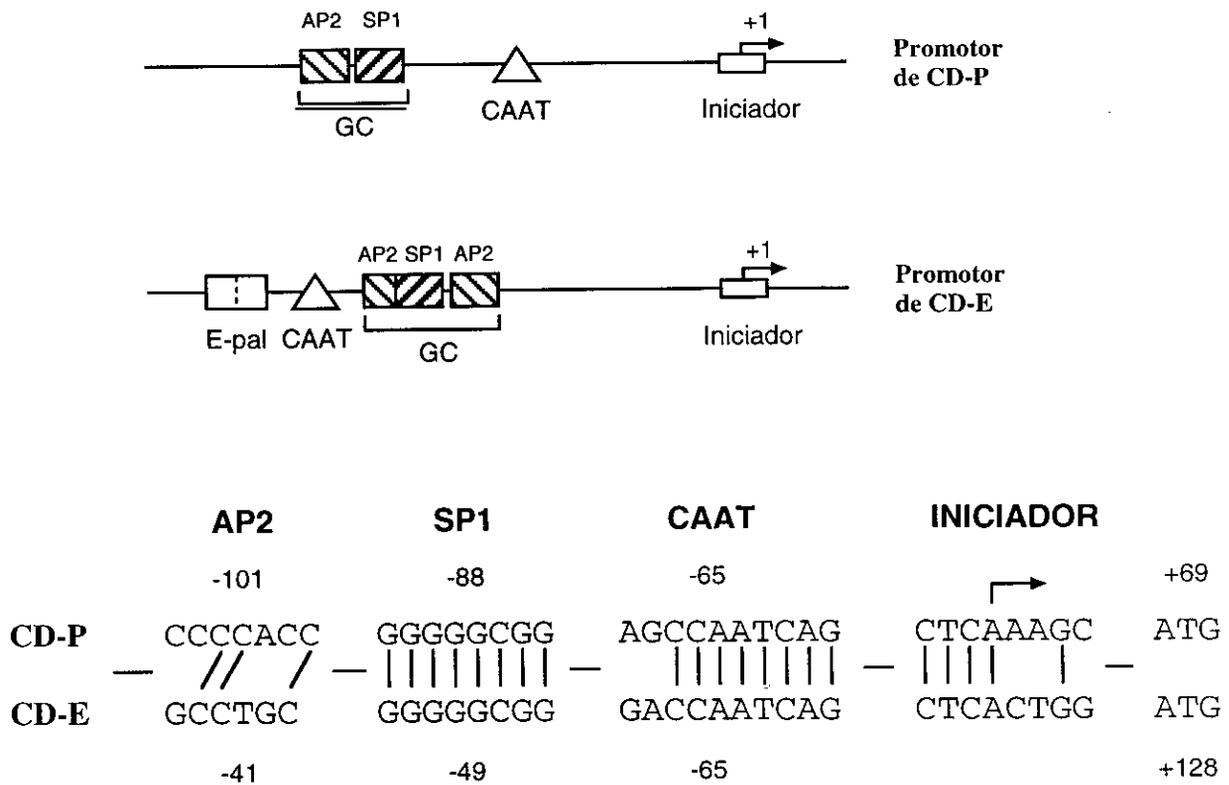


Fig. 36. Esquema comparativo de los promotores de CD-E y CD-P.

Parte superior: representación esquemática de las regiones 5' de los genes de CD-P y CD-E. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (+1) y posibles elementos reguladores en ambos promotores: regiones ricas en GC con sitios AP2 y SP1, cajas CCAAT, elemento E-pal y secuencia iniciadora.

Parte inferior: Comparación de las secuencias de varios elementos comunes de regulación entre el promotor de CD-P y el de CD-E, con indicación de su posición respecto al sitio de inicio de la transcripción en cada gen.

Se empleó también el modelo de la carcinogénesis de piel de ratón para estudiar la regulación de la expresión de la CD-P, puesto que esta molécula desaparecía en las líneas celulares representantes del último estadio de la progresión maligna, CarB y MSC11A5, siendo positiva en el resto de líneas celulares de queratinocitos estudiadas (ver Fig. 8B y Tabla VI). Estudios recientes de la actividad promotora de CD-P en estas líneas habían mostrado que la actividad específica de tipo celular recaía en la región -200 a +47, y que tanto la región rica en GC como la caja CCAAT ejercían un efecto positivo en la actividad transcripcional. Asimismo, ensayos de footprinting *in vitro* mostraron que factores nucleares de líneas que expresan y que no expresan CD-P se unían a la región rica en GC y a la caja CCAAT (Faraldo *et al.*, 1997).

Por tanto, nos propusimos estudiar si algunos de los mecanismos de regulación de la expresión de ambas moléculas de adhesión podían ser comunes, en concreto a través de la caja CCAAT o de la región rica en GC.

Se realizaron ensayos de retardo en gel en paralelo empleando como sondas oligonucleótidos que incluían la caja CCAAT de los promotores de CD-P (CCAAT-P) o de CD-E (CCAAT-E). Como se puede observar en la Fig 37, que muestra el patrón obtenido con extractos nucleares de la línea PDV (CD-E y CD-P positiva), la sonda CCAAT-P originó un complejo de retardo mayoritario con movilidad electroforética similar a la del complejo 1 originado con la región homóloga de CD-E, aunque de mayor intensidad. Un exceso del oligonucleótido CCAAT-E era capaz de competir parcialmente el complejo 1 originado con la sonda CCAAT-P, mientras que un exceso del oligonucleótido CCAAT-P competía exclusivamente el complejo 1 originado con la sonda CCAAT-E, pero no afectaba a los otros dos complejos, tal como se ha comentado previamente (ver Fig. 24). Experimentos de competición con oligonucleótidos con sitios consenso para factores de unión a CCAAT mostraron que sólo el oligonucleótido de unión a CP1 era capaz de desplazar parcialmente la unión del complejo originado con la región CCAAT de CD-P (Fig. 37). Idénticos resultados se obtuvieron con extractos nucleares de CarB (CD-E y CD-P negativa) (datos no mostrados).

Estos resultados de competición cruzada indican que factores comunes, probablemente relacionados con CP1, participan en el reconocimiento de la región CCAAT de ambos promotores, mientras que factores adicionales, probablemente del tipo CP2 o C/EBP, participan específicamente en la interacción con la caja CCAAT del promotor de CD-E.

De igual modo se realizaron ensayos de retardo en gel y competiciones cruzadas utilizando como sondas oligonucleótidos conteniendo las regiones ricas en GC de los promotores de CD-P (GC-P) y de CD-E (GC-E). La figura 38 muestra el patrón que se obtuvo con extractos de la línea celular HaCa4 (CD-P positiva y CD-E negativa). El oligonucleótido GC-P originó dos bandas de retardo (1 y 2) con igual movilidad electroforética que las bandas 1 y 2 originadas con la región rica en GC de CD-E. El

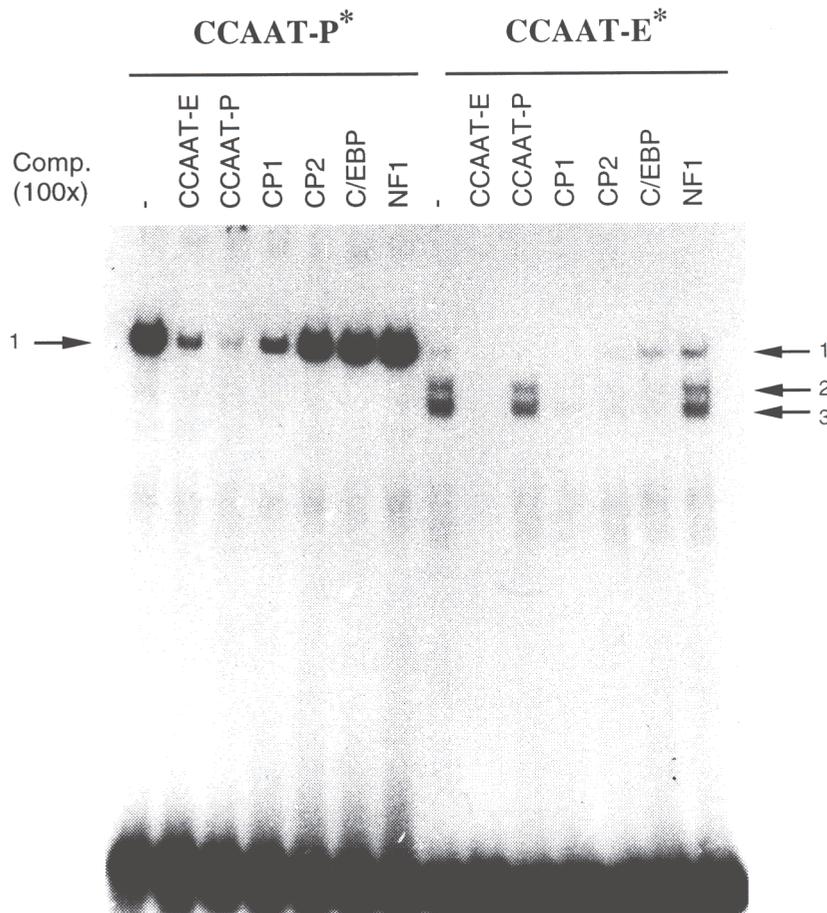
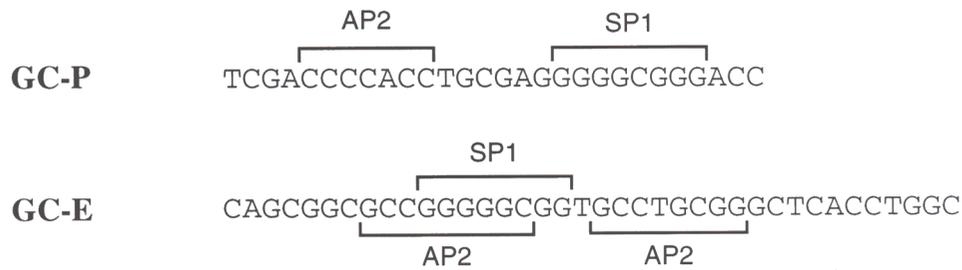


Fig. 37. Análisis comparativo de la unión de factores a la región CCAAT de los promotores de CD-P y CD-E. Experimentos de retardo en gel con 4 μ g de extracto nuclear de la línea PDV empleando una sonda que contenía la región CCAAT del promotor de CD-P (CCAAT-P *, parte izquierda) o del promotor de CD-E (CCAAT-E *, parte derecha). Se realizaron ensayos de competición en ausencia (-) o presencia de un exceso 100x de los oligonucleótidos indicados (los mismos que en la Fig. 24). Los complejos de retardo formados se indican con flechas (1, 2 y 3 con la sonda de CD-E y 1 con la sonda de CD-P).

A



B

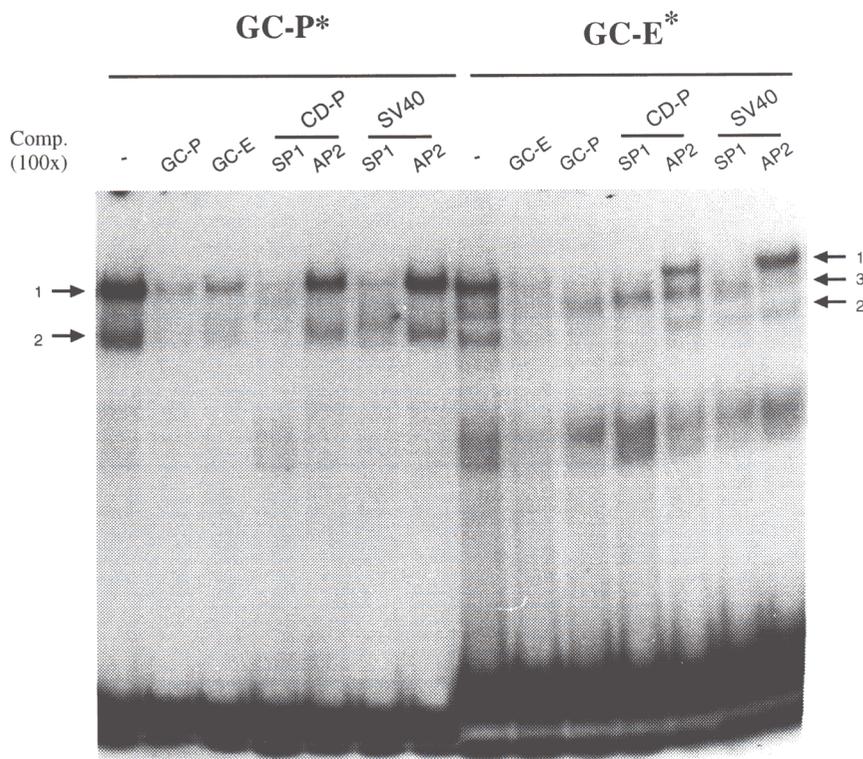


Fig. 38. Comparación de la unión de factores nucleares a la región rica en GC de los promotores de CD-P y de CD-E.

A. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de retardo en gel conteniendo la región rica en GC del promotor de CD-P (GC-P) o del promotor de CD-E (GC-E). Los sitios consenso de unión a los factores SP1 y AP2 también se indican.

B. Ensayos de retardo en gel y de competición con 2.5 μ g de extracto nuclear de HaCa4 y las sondas GC-P* (parte izquierda) o GC-E* (parte derecha). Se empleó un exceso 100x de los oligonucleótidos indicados. (-), ausencia de competidor. Los complejos formados con ambas sondas se indican con flechas (1, 2 y 3) a los lados de la figura.

oligonucleótido GC-E desplazó la unión de los dos complejos formados con la sonda de CD-P, mientras que el oligonucleótido GC-P sólo desplazó la unión de los complejos 1 y 2 originados con la sonda de CD-E, pero no del complejo 3 (Fig. 38B), tal como se mostró en la Fig. 25.

Los complejos 1 y 2, originados con la sonda de CD-P y la sonda de CD-E se competían con un fragmento de GC-P que contenía sólo el sitio SP1 (SP1-P) y con un oligonucleótido con el sitio consenso de unión a SP1 del promotor de SV40 (SP1-SV40). En cambio, oligonucleótidos que contenían el elemento AP2 de GC-P (AP2-P) o del promotor de SV40 (AP2-SV40) no eran capaces de desplazar la unión de ninguno de los dos complejos generados. El patrón de competición generado con extractos nucleares de PDV (CD-P positiva) y CarB (CD-P negativa) con la sonda GC-P fué prácticamente idéntico al generado con extractos de HaCa4 (resultados no mostrados).

Para determinar la naturaleza de los factores nucleares que interaccionan con la región rica en GC del promotor de CD-P, se realizaron experimentos de super-retardo con anticuerpos específicos. En la figura 39 aparecen los complejos y bandas de super-retardo obtenidas con la sonda GC-P, en comparación con los obtenidos con la sonda GC-E, previamente mostrados (Fig. 26). Como se puede observar, cuando se empleó un anticuerpo anti-AP2, el patrón de bandas originado con la sonda de la región GC del promotor de CD-P era el mismo que cuando se utilizaba una IgG control. En cambio, el empleo de un anticuerpo anti-SP1 inducía la generación de una banda de super-retardo, a la vez que la disminución de la intensidad de la banda 1, y en algunas ocasiones (CarB) también de la banda 2.

Todos estos datos, junto con el hecho de que el factor SP1 puro es capaz de interaccionar *in vitro* con las regiones GC-E y GC-P, mientras que el factor AP2 puro es capaz de interaccionar con la región GC-E pero no con GC-P en ensayos de retardo en gel (resultados no mostrados) y de footprinting *in vitro* (Fig. 27 y Faraldo *et al.*, 1997), sugieren que factores comunes del tipo SP1 reconocen las secuencias ricas en GC de ambos promotores de CD-E y CD-P, y que factores adicionales, del tipo AP2, estarían implicados de forma específica en el reconocimiento de la región rica en GC de CD-E.

Estas analogías y diferencias en las regiones reguladoras CCAAT y GC de ambos genes y en los factores que interaccionan con ellas nos plantearon la cuestión de si las regiones eran intercambiables. Por tanto, diseñamos construcciones de promotores híbridos, en los cuales las regiones reguladoras del promotor de CD-E se insertaron en posición 5' de secuencias reguladoras del gen de CD-P (Fig. 40).

La construcción -200P, que mostraba actividad específica de tipo celular, contiene secuencias 5' del gen de CD-P acopladas al gen chivato luciferasa, incluyendo la región rica en GC. La construcción -75P, que carece de la región rica en GC, mostró una actividad transcripcional sensiblemente menor (de un 12% a un 34% de la actividad de -200P) (Faraldo *et al.*, 1997 y Fig. 40A).

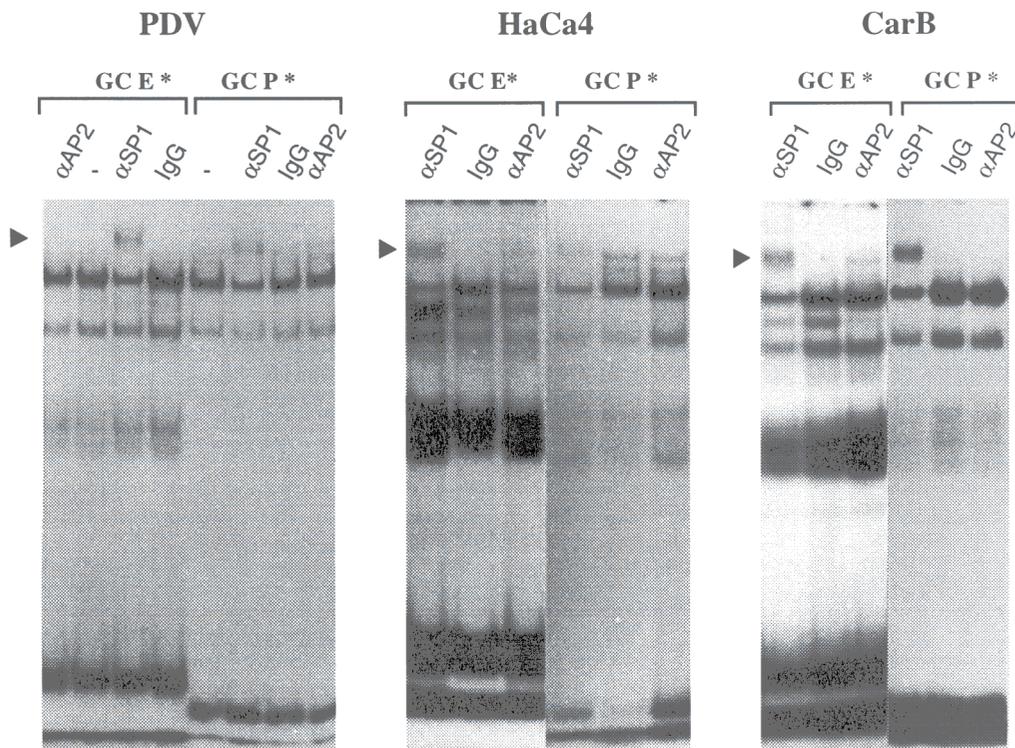
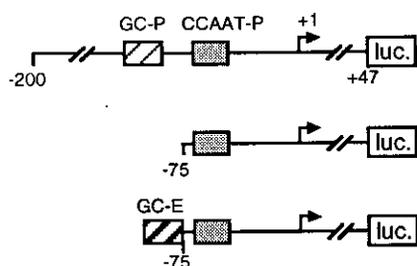


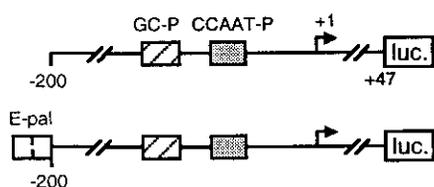
Fig. 39. La región rica en GC de CD-P reconoce factores tipo SP1. Experimentos de super-retardo empleando las sonda GC-E* (parte izquierda de cada panel) o GC-P* (parte derecha de cada panel) y 2.5 μ g de extracto nuclear de las líneas indicadas en ausencia (-) o presencia de 1.5 μ g de anticuerpo anti-SP1 (α SP1) o anti-AP2(α AP2) o de IgG de conejo (IgG) como control. Las bandas de super-retardo originadas por la presencia de anticuerpo se indican con una punta de flecha. Observar que en el caso de la sonda de CD-P solamente el anticuerpo anti-SP1 origina una banda de super-retardo.

A



	Actividad promotora			
	MCA3D	PDV	HaCa4	CarB
-200P	1.75	5.90	1.90	0.63
-75P	0.35	2.00	0.22	0.13
GC-E/-75P	0.83	3.70	0.80	0.50
Inducción*	x2.37	x1.85	x3.63	x3.85

B



	Actividad promotora			
	MCA3D	PDV	HaCa4	CarB
-200P	2.63	8.30	3.55	0.86
E-pal/-200P	2.43	6.04	2.17	0.85
Inhibición#	x0.92	x0.73	x0.61	x0.99

Fig. 40. Efecto de la región rica en GC y del elemento E-pal del promotor de CD-E en la actividad transcripcional del promotor de CD-P. En la parte izquierda de la figura se muestran las construcciones empleadas en los ensayos de actividad. En las construcciones híbridas GC-E/-75P (panel A) y E-pal/-200P (panel B), la región rica en GC proximal (-60/-23) y el elemento E-pal de CD-E(-92/-69), respectivamente, se insertaron en posición 5' de secuencias del promotor de CD-P. La actividad luciferasa en cada experimento se normalizó respecto a la actividad RSV- β gal y se expresó como porcentaje de la actividad del promotor de CMV en cada línea celular.

A. Efecto de la región rica en GC de CD-E en la actividad basal del promotor de CD-P en las líneas celulares indicadas. Se indica en la parte inferior la relación de actividades entre la construcción mixta GC-E/-75P y la construcción -75P (*).

B. Efecto del elemento E-pal en la actividad del promotor de CD-P en las diferentes líneas celulares. En la parte inferior se indica la relación de actividades entre la construcción mixta E-pal/-200P y la construcción -200P (#).

Para analizar si las regiones ricas en GC de CD-E y CD-P eran intercambiables, se diseñó la construcción GC-E/-75P, en la que se insertó la región rica en GC proximal de CD-E (-60/-23) en posición 5' de la construcción -75P del promotor de CD-P. Como se aprecia en la Fig. 40A la región rica en GC de CD-E indujo un aumento del orden de 2 a 4 veces en la actividad de la construcción -75P en las distintas líneas celulares de queratinocitos, originando valores de actividad del promotor de CD-P próximos a los de la construcción -200P (de un 50% a un 80%). Estos resultados indican que la región rica en GC de CD-E es capaz de sustituir parcialmente a la región homóloga del promotor de CD-P.

Asimismo, para analizar la posible influencia del elemento E-pal sobre la actividad de un promotor heterólogo como el de la CD-P, se diseñó la construcción E-pal/-200P (Fig. 40B), en la que se había insertado el elemento E-pal en posición 5' del promotor de CD-P en la construcción -200P. La figura 40B muestra que el elemento E-pal indujo un moderado efecto inhibitor en la línea HaCa4, mientras que en las otras líneas examinadas el efecto era mucho menor o prácticamente nulo.

Todos estos datos sugieren que en la regulación de la expresión de ambas moléculas existen mecanismos comunes, pero también mecanismos diferenciales, y que la regulación de la transcripción del gen de CD-E de ratón probablemente sea más compleja e incluya mecanismos adicionales a los de la transcripción del gen de CD-P de ratón.

ABRIR DISCUSIÓN

