

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Estudio de los factores bHLH E2-2 en la represión de
cadherina-E y la transición epitelio-mesénquima.
Comparación con E47.

Verónica Romina Sobrado Utrera
Madrid, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Estudio de los factores bHLH E2-2 en la represión de
cadherina-E y la transición epitelio-mesénquima.
Comparación con E47.

Verónica Romina Sobrado Utrera
Licenciada en Ciencias Biológicas
presenta esta memoria para optar al Título de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora de Tesis: **Dra. Amparo Cano García**
Catedrática de Universidad

La presente Tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), Madrid y financiada por una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Madrid, 2008

Amparo Cano García,
Catedrática del Departamento de Bioquímica
de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA que:

Verónica Romina Sobrado Utrera, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina - Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM) de Madrid, el trabajo titulado "Estudio de los factores bHLH E2-2 en la represión de cadherina-E y la transición epitelio-mesénquima. Comparación con E47".

El presente trabajo cumple, a mi juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis doctoral.

Madrid, 18 de Abril de 2008

Fdo. Dra. Amparo Cano García

A mis padres

A Diego

*La ciencia no sirve sino para darnos cuenta
de cuán vasta es nuestra ignorancia*

Félicité Robert de Lamennais

Muchas son las personas a las que agradezco el haber hecho posible, de una u otra forma, la realización de esta Tesis doctoral. En estos cuatro años, he tenido la posibilidad de trabajar y formarme en un excelente clima de compañerismo y buen humor, lo cual ha facilitado enormemente mis tareas y ha hecho que los primeros tiempos hayan sido menos difíciles. En primer lugar, le agradezco a mi directora, Amparo, por aceptarme en su laboratorio, por la paciencia con la que gestionó mis solicitudes de beca desde Argentina, por permitirme trabajar en un área de la biología tan interesante como relevante, por sus consejos y meticulosidad. A Paco Portillo le agradezco su cordialidad y sencillez, por responder siempre todas mis dudas, por ayudarme con mis últimos experimentos de esta Tesis y por hacernos sentir como en nuestro laboratorio cuando tuvimos que trasladarnos al suyo por problemas edilicios. A Miguel Quintanilla, por su serenidad, por estar siempre con una sonrisa y por sus comentarios en los seminarios. También les agradezco a quienes fueron docentes míos en los cursos de doctorado, Leandro Sastre, Mario Vallejo y Angels Fabra, por su buen trato y amabilidad, a Marga Cervera, por preguntar por mí siempre que nos encontramos, a Jaime Renart y a mi tutora, Pilar Santisteban, por su buena predisposición.

Por su puesto les agradezco a mis compañeros de laboratorio (1.13/1.12)! Por su simpatía, por todo el material compartido y por ayudarme siempre. Quiero agradecerle a Eva por guiarme con mis primeros experimentos en el labo, por compartir su experiencia con los HLHs, y por sus consejos. A Héctor, por su buen humor, por responder siempre mis preguntas con una sonrisa, por ocuparse de que tuviera mi escritorio cuando entré en el laboratorio, y por su compañerismo. A David, le agradezco el haberme ayudado con tanta paciencia en mis experimentos más difíciles, por sus recomendaciones informáticas y por su generosidad. También le agradezco a Miri su ayuda y amistad en mis comienzos en el labo, y a Soni, por haber sido una compañera excelente y darme ánimo en los momentos difíciles. A Gema le agradezco lo que aporta a mis resultados, por el material que me ha brindado, por responder mis dudas una y otra vez, sus sugerencias y correcciones. Quiero agradecerle a Ester su calidez, los momentos divertidos que nos hizo pasar y su apoyo en todo momento. A Mar, por ser tan dulce y simpática; a Bea, por ser tan buena persona y a la vez graciosa. A Matthew, le agradezco su amistad, sus charlas divertidas y también las serias, por preguntar cómo estoy y su buen ánimo. A María Marta, su serenidad y sinceridad, y también su amistad. Quiero agradecerle a Patri, su simpatía, su compañía en los congresos y su ayuda siempre que la necesito, a Edu, por ser tan buena persona, y a Jesús, por su calidez y buen trato. A Amalia le agradezco el darme la bienvenida cuando me incorporé al laboratorio y por responder siempre a mis preguntas. A Vane, le agradezco su buen carácter y sus ganas de ayudar.

También les agradezco a Marta y a Mercedes, por ayudarme cuando lo he necesitado, y a Rodolfo, por transmitirme tranquilidad durante la escritura de esta Tesis.

También quiero agradecer a Pilar y a Jacinto, su simpatía, porque da gusto verlos cada vez que vienen al IIB y fuera de él, y a los chicos de laboratorios vecinos como el 1.9 (Jorge, Claudia, Jose, Maicha, Marta, etc.), 1.11 (María, Rosario, etc), por el buen clima de trabajo. Y a mis compañeros de los cursos de doctorado, Raquel, Marisa y Diego, por ser tan agradables. A su vez, quisiera agradecer a los servicios comunes del IIB, a la gente de Imagen Científica, por ser tan amables y eficientes, y también al personal del Animalario y Secuenciación. A Brenda, por sus amenas clases de inglés y su sensibilidad.

Por otra parte, me parece justo agradecer a aquellos que me han enseñado a tener un espíritu crítico, como mis profesores del CNBA y de Exactas, por inculcarme sus conocimientos con tanto esmero y dedicación. Por su puesto a los amigos que hice durante esos años y a los que se fueron sumando después, Mariana, Irene, Pablo, Esteban, Anahí, Luciano, Analía, Shunko, por los todos los momentos que pasamos juntos, los difíciles y los divertidos, y por los Trabajos Prácticos, que tantos buenos recuerdos me traen. A mis compañeras y amigas de la facultad, las Anas, Moni, Eulalia, Mariana, Eliana, por las innumerables reuniones para "ver dudas" antes de los exámenes, que tanto me han servido para entender mejor las ciencias duras. A Ramiro, Maxi y los chicos de San Justo, por su amistad. También les agradezco a mis nuevos amigos, Graeme, Lliwen, Roman y Monika, Allison, James, Adrián, por su sencillez, por los buenos momentos que pasamos juntos y por sus reflexiones.

Por último, les agradezco a mis padres, su amor incondicional y todo su esfuerzo para criarme y educarme. A mi padre, por haberme ayudado a elegir la carrera que me gusta. A mi madre, por transmitirme su avidez de conocimiento y por su generosidad. A sus amigos, Silda, Marta y Joaquín, Nilda y Ramón, Paulina, por preocuparse por ella y divertirse con su compañía. Por su puesto a mi abuela, por cuidarme y preocuparse por mí, a Ali, por ser tan buena y tratarme como a una hija más, y a Juli, por considerarme otra nieta. A Nachi, por ser tan generoso conmigo y por las vacaciones en Roma! A Ana María, por su cariño y generosidad, y a los primos, Edu y Gaby, Lean, Seba, María, por ser tan graciosos y por las Navidades bulliciosas. A mi tío Pedro y a Mabel, y a los tíos Piemonte. Y especialmente, le agradezco a Diego, por todo lo que hace por mí, por transmitirme tranquilidad y optimismo, por su paciencia, sus consejos, su compañía y su infinito amor.

Resumen

La pérdida de expresión de la proteína de adhesión intercelular cadherina-E es un evento esencial en el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) que permite la migración celular durante el desarrollo embrionario y en la invasión de tumores de origen epitelial (carcinomas). Las células que sufren dicho proceso, pierden su polaridad y la expresión de marcadores epiteliales y adquieren marcadores de fenotipo mesenquimático y propiedades migratorias. La represión transcripcional es uno de los principales mecanismos que conducen a la regulación negativa de la expresión de cadherina-E tanto en el desarrollo embrionario como durante la progresión tumoral. En los últimos años, se han caracterizado diferentes represores del gen de *cadherina-E* e inductores de TEM, entre los que se encuentran los factores de dedos de zinc Snail1 y Snail2, los factores de dobles dedos de zinc ZEB-1 y ZEB-2, y los factores bHLH E47 y Twist. Estudios previos de nuestro laboratorio, de análisis de los perfiles de expresión génica de células MDCK con expresión estable de los factores Snail1, Snail2 o E47, identificaron al *E2-2* (TCF4) como una diana directa o indirecta de dichos represores de cadherina-E/inductores de TEM. Asimismo, trabajos anteriores de nuestro grupo habían aislado a ambos productos del gen *E2-2* (*E2-2A* y *E2-2B*), por su capacidad de interacción con el elemento E-pal del promotor de *cadherina-E* de ratón. Los factores *E2-2A/B* son reguladores transcripcionales bHLH de clase I, implicados en diversos procesos biológicos, pero se desconoce si juegan algún papel en la TEM y/o en la progresión tumoral.

En esta Tesis se ha analizado la posible implicación de los factores *E2-2A* y *E2-2B* en la TEM y en el proceso tumoral. Ambos productos del gen *E2-2*, *E2-2A/B* reprimen el promotor de *cadherina-E* dependiendo de la integridad del elemento E-pal y de actividad histona deacetilasa (HDAC). A su vez, la expresión estable de *E2-2A/B* en la línea celular MDCK induce una TEM completa, con la adquisición de una alta capacidad invasiva *in vitro*, aunque sin alterar las propiedades tumorogénicas de dicho sistema celular. El análisis de la expresión del gen *E2-2* en embriones tempranos de ratón reveló un patrón inverso al de *cadherina-E*, de acuerdo a su capacidad represora. Asimismo, la expresión del gen *E2-2* está incrementada en líneas celulares derivadas de carcinomas, invasivas y que carecen de expresión de cadherina-E. Por otra parte, el análisis comparativo de los perfiles de expresión de células MDCK-*E2-2* y células MDCK-*E47* reveló la existencia de programas genéticos comunes y específicos para ambos tipos de factores. En conjunto, estos resultados sugieren un papel para *E2-2A/B* como represores adicionales de cadherina-E e inductores de TEM. Finalmente, el estudio de la acción de Snail1/2 sobre el promotor de *E2-2A*, y de *E2-2A/B* sobre los promotores de *Snail1/2*, indican una regulación cruzada a nivel transcripcional entre los factores *E2-2A/B* y Snail1/2.

Loss of expression of the cell-cell adhesion protein E-cadherin is an essential event for epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process that allows cell migration during embryonic development and invasion of tumours of epithelial origin (carcinomas). Cells undergoing EMT lose polarity and expression of epithelial markers, and acquire mesenchymal markers and migratory properties. Transcriptional repression is one of the main mechanisms responsible for E-cadherin negative regulation, both in embryonic development and tumour progression. During the last years, several *E-cadherin* gene repressors and EMT inducers have been characterized, including the zinc-finger factors Snail1 and Snail2, the two-zinc-finger factors ZEB-1 and ZEB-2, and the bHLH factors E47 and Twist. Previous results from our laboratory, from gene expression profile analysis of MDCK cells stably expressing Snail1, Snail2 or E47 factors, identified *E2-2* (TCF4) gene as a target (direct or indirect) of those E-cadherin repressors/EMT inducers. Other studies from our group had isolated both products of *E2-2* gene (*E2-2A* and *E2-2B*), for their capacity of interacting with the E-pal element of mouse *E-cadherin* promoter. *E2-2A/B* are bHLH class I transcriptional regulators, involved in diverse biological processes, but whether they play any role in EMT and/or in tumour progression is currently unknown.

In this Thesis, the possible implication of *E2-2A/B* factors in EMT and the tumoral process has been analysed. Both products of the *E2-2* gene, *E2-2A/B*, repress *E-cadherin* gene promoter, dependent on the integrity of the E-pal element and on histone-deacetylase (HDAC) activity. Moreover, *E2-2A/B* factors, induce a complete EMT when stably expressed in MDCK cell line, with the acquisition of highly invasive properties *in vitro*, but without affecting tumorigenicity of parental cells. Expression analysis of *E2-2* in early mouse embryos revealed an inverted pattern with respect to that of *E-cadherin*, according to its repression capacity. In addition, *E2-2* gene expression is upregulated in invasive, E-cadherin-negative, carcinoma-derived cell lines. Besides, comparative gene expression profile analysis of MDCK-*E2-2* and MDCK-E47 cells, showed the existence of common and specific genetic programmes for both type of factors. Taking together, these results suggest a role for *E2-2* factors as additional E-cadherin repressors and EMT inducers. Finally, the study of the action of Snail1/2 on *E2-2A* promoter, and that of *E2-2A/B* on *Snail1/2* promoters, indicate feedback loops of transcriptional regulation between *E2-2A/B* and Snail1/2 factors.

Abreviaturas	1
Introducción	5
1. La transición epitelio-mesénquima: un ejemplo de plasticidad celular.....	7
1.1. La TEM durante la progresión tumoral. El papel de cadherina-E.....	8
1.2. La TEM: activación de un programa genético.....	9
2. La cadherina-E y la homeostasis epitelial.....	10
2.1. Las uniones mediadas por cadherina-E.....	10
2.2. Regulación transcripcional de cadherina-E	11
3. La superfamilia de proteínas HLH.....	14
3.1. Características generales y clasificación.....	14
3.2. Nuevas funciones: los factores E47 y Twist.....	16
3.3. Los factores E2-2.....	17
3.3.1. Los factores E2-2: función biológica.....	17
3.3.2. Los factores E2-2: regulación transcripcional	18
3.4.2. Los factores IDs: su papel en la angiogénesis.....	20
3.4.1. Los factores IDs: regulación de la proliferación	20
3.4.2. Los factores IDs: su papel en la angiogénesis.....	20
3.4.3. Los factores IDs: su papel en la invasión celular	21
3.5. Relación de factores bHLH con otros reguladores de TEM	21
Objetivos	23
Materiales y Métodos.....	27
1. Ensayo de híbrido sencillo	29
2. Construcciones de DNA	29
2.1. Vectores de expresión.....	29
2.2. Vectores testigo	30
2.2.1. Promotor de <i>E2-2</i> humano	32
3. Líneas celulares y cultivos celulares	32
4. Transfecciones	33
4.1. Transfecciones transitorias	33
4.2. Transfecciones estables	33
5. Ensayos de actividad promotora.....	34
5.1. Determinación de la actividad promotora.....	34
5.2. Análisis estadístico	34
6. Análisis de RNAm	34
6.1. Extracción de RNA total.....	34
6.2. RT-PCR	34

7. Anticuerpos	35
8. Análisis de proteínas	36
8.1. Inmunotransferencia (Western blot).....	36
8.2. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	37
9. Ensayos de motilidad celular.....	37
10. Estudios de invasión	38
10.1. Ensayos de invasión en <i>transwells</i>	38
10.2. Cultivos organotípicos.....	38
11. Ensayos de proliferación.....	38
12. Ensayos de tumorigenicidad.....	39
13. Hibridación <i>in situ</i> de embriones de ratón.....	39
14. Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.....	39
14.1. Microarrays de cDNA (OncoChip CNIO).....	39
14.2. Extracción de RNA total.....	40
14.3. Amplificación lineal del RNAm.....	40
14.4. Marcaje fluorescente del RNAm amplificado	40
14.5. Hibridación.....	41
14.6. Cuantificación de la señal, normalización y pre-procesamiento de datos	41
14.7. Análisis estadístico	42
Resultados.....	43
1. Caracterización de los factores E2-2 como represores de cadherina-E y su papel en la transición epitelio-mesénquima	45
1.1. Análisis de la expresión de E2-2A/B en líneas celulares.....	45
1.2. Análisis de la acción de E2-2A/B sobre el promotor de <i>cadherina-E</i>	47
1.3. Efecto de la expresión estable de E2-2A y E2-2B en células MDCK.....	47
1.4. Caracterización de la represión mediada por E2-2A/B sobre el promotor de <i>cadherina-E</i> ..51	
1.5. Estudio de la relevancia biológica de los factores E2-2	53
1.6. Análisis de la expresión de E2-2 en embriones de ratón. Comparación con la expresión de E2A.....	57
2. Comparación de la acción de los factores E2-2 y E47: Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica inducidos por ambos tipos de factores bHLH	59
2.1. Perfiles de expresión génica de las células MDCK-E2-2 y MDCK-E47	59
2.2. Genes implicados en TEM.....	61
2.3. Genes implicados en ciclo celular, proliferación y señalización	61
2.4. Genes implicados en transcripción	62
2.5. Genes implicados en otras funciones.....	62

3. Estudio de la relación funcional entre los factores Snail1/Snail2/E2A y E2-2	68
3.1. Caracterización del promotor de E2-2A	68
3.2. Regulación de los promotores de <i>Snail1</i> , <i>Snail2</i> y <i>E2A</i> por E2-2	72
Discusión	75
1. Los factores E2-2 como represores de cadherina-E e inductores de TEM	77
1.1. Implicación de E2-2 en la TEM y la progresión tumoral	77
1.2. Represión del promotor de <i>cadherina-E</i> mediada por los factores E2-2A/B	79
2. E2-2 y E47: proteínas E con papeles no redundantes	80
3. Relación funcional entre diferentes inductores de TEM	81
3.1. Regulación cruzada entre factores Snail y bHLH de clase I a nivel transcripcional	82
3.2. ZEB-1 e IDs como dianas de los factores E2-2A/B, E47 y otros inductores de TEM	84
3.3. <i>E2-2</i> y <i>ZEB-2</i> están implicados en patologías similares en el ser humano.....	85
Conclusiones	87
Bibliografía	91
Anexo.....	111

Abreviaturas

AD:	dominio de transactivación
bHLH:	dominio básico hélice-lazo-hélice
BSA:	seroalbúmina bovina
CBP:	proteína de unión CREB
CBS:	proteína de unión a cateninas
CDC2:	ciclo de división celular 2
<i>CDH6</i> :	gen que codifica para cadherina-K
CMV:	citomegalovirus
CtBP:	proteína de unión al extremo carboxilo-terminal
CTGF:	factor de crecimiento de tejido conectivo
Cy3:	cianina-3-dUTP
Cy5:	cianina-5-dUTP
DMEM:	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA:	ácido desoxirribonucleico
cDNA:	DNA complementario
<i>E2A</i> :	gen que codifica para E12/E47
EC:	ectodominio
EDTA:	ácido etilén diamino tetracético
EGF:	factor de crecimiento epidérmico
EREG:	epiregulina
ESE:	potenciador específico de tejido
EST:	secuencia expresada
<i>FBXO11</i> :	gen que codifica para la proteína F-box, 11
FGF:	factor de crecimiento fibroblástico
<i>FGFBP1</i> :	gen que codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos, 1
FGFR:	receptor del factor de crecimiento fibroblástico
<i>FES</i> :	gen que codifica para el oncogén del sarcoma felino
GAPDH:	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<i>GPC3</i> :	gen que codifica para glipicano 3
Gfi-1:	factor de independencia del crecimiento, 1
HAV:	motivo aminoacídico His-Ala-Val
HDAC:	histona deacetilasa
HLH:	dominio hélice-lazo-hélice
HRP:	peroxidasa del rábano rústicano
ID:	inhibidor de unión a DNA o inhibidor de diferenciación
IGF:	factor de crecimiento similar a la insulina
LTBP:	proteína de unión a TGF- β latente, 1
MCAM:	molécula de adhesión celular de melanoma
MMP:	metaloproteasa de matriz
MPCD:	dominio proximal de membrana
MPED:	dominio extracelular próximo a la membrana
PAI1:	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PBS:	tampón fosfato salino
PCAF:	factor asociado a p300/CBP
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLAU:	activador del plasminógeno, uroquinasa
RAN:	miembro de la familia onogénica RAS
RNA:	ácido ribonucleico
RNAa:	RNA amplificado
RNAm:	RNA mensajero

RNAr:	RNA ribosómico
RT-PCR:	transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS:	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SIP-1:	proteína que interacciona con Smad, 1
SMA:	actina del músculo liso
Smad:	homólogo de <i>mothers against DPP</i> (<i>Drosophila</i>)
SNAG:	dominio común a Snail y Gfi-1
SPARC:	proteína secretada ácida rica en cisteína (osteonectina)
TBS:	tampón tris salino
<i>TCF</i> :	gen que codifica para el factor de células T
<i>TCF3</i> :	gen que codifica para E12/E47
<i>TCF4</i> :	gen que codifica para E2-2A/E2-2B
<i>TCF8</i> :	gen que codifica para ZEB-1/ δ EF1
<i>TCF12</i> :	gen que codifica para HEB α /HEB β
TEM:	transición epitelio-mesénquima
TGF- β :	factor de crecimiento transformante β
TIMP:	inhibidor tisular de metaloproteasa
TME:	transición mesénquima-epitelio
TSA:	tricostatina A
uPA:	activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
VEGF:	factor de crecimiento vascular endotelial
ZO-1:	proteína <i>zona occludens 1</i>
<i>Zfx1B</i> :	gen que codifica para ZEB-2/SIP-1

Introducción

1. La transición epitelio mesénquima: un ejemplo de plasticidad celular

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso complejo, que ocurre en situaciones biológicas que involucran movimiento celular. Durante dicha conversión, las células epiteliales pierden sus contactos intercelulares y su polaridad basoapical, y adquieren un fenotipo fusiforme (fibroblástico) con ganancia de marcadores mesenquimáticos y capacidad mótil/invasiva. (Thiery and Sleeman, 2006). La TEM ocurre en etapas críticas del desarrollo embrionario en la mayoría de los metazoos. En vertebrados, es el mecanismo mediante el cual, durante la gastrulación, se produce la migración de las células que darán origen al mesodermo y endodermo. Algo más tarde durante el desarrollo, permite a las células de la cresta neural (células de características epiteliales de la parte dorsal del tubo neural), cambiar a un fenotipo mesenquimático y migrar largas distancias, para luego diferenciarse a distintos tipos celulares (células óseas, condrocitos, células de músculo liso, neuronas o melanocitos (Hay, 1995; Thiery, 2002; Huang and Saint-Jeannet, 2004; Moustakas and Heldin, 2007). Por otra parte, la TEM ocurre como respuesta fisiológica al daño tisular, durante la reparación de heridas (Martin, 1997; Savagner et al., 2005).

En los últimos años, el estudio de los procesos de TEM ha ganado gran importancia, debido a su papel activo en procesos patológicos graves y con una alta incidencia en la población: la fibrosis crónica y el cáncer. En el caso de la fibrosis, estudios *in vivo* con modelos animales han mostrado que una proporción importante de los fibroblastos presentes en el órgano fibrótico, que destruyen la arquitectura del órgano y por ende, su normal funcionamiento, derivan de células epiteliales que han sufrido TEM. En el riñón, esos fibroblastos tienen su origen en células tubulares (Iwano et al., 2002), en el pulmón, derivan del epitelio alveolar (Kim et al., 2006), y en el hígado proceden de hepatocitos (Zeisberg et al., 2007).

Respecto al papel de la TEM en el proceso canceroso, se postula que algunas de las células epiteliales que forman un carcinoma *in situ*, sufrirían esta transición, lo que les permitiría disgregarse del tumor primario, invadir tejidos adyacentes y alcanzar un vaso sanguíneo o linfático y diseminarse a otros órganos (Figura 1). Todavía la existencia e importancia de la TEM durante la progresión tumoral es tema de controversia, sobre todo para oncólogos/patólogos (Tarin et al., 2005; Christiansen and Rajasekaran, 2006), debido a su difícil observación a nivel histológico. No obstante, cada vez hay más evidencias experimentales *in vivo* que avalan su implicación y relevancia en dicho proceso (Sarrió et al., 2008; Trimboli et al., 2008).

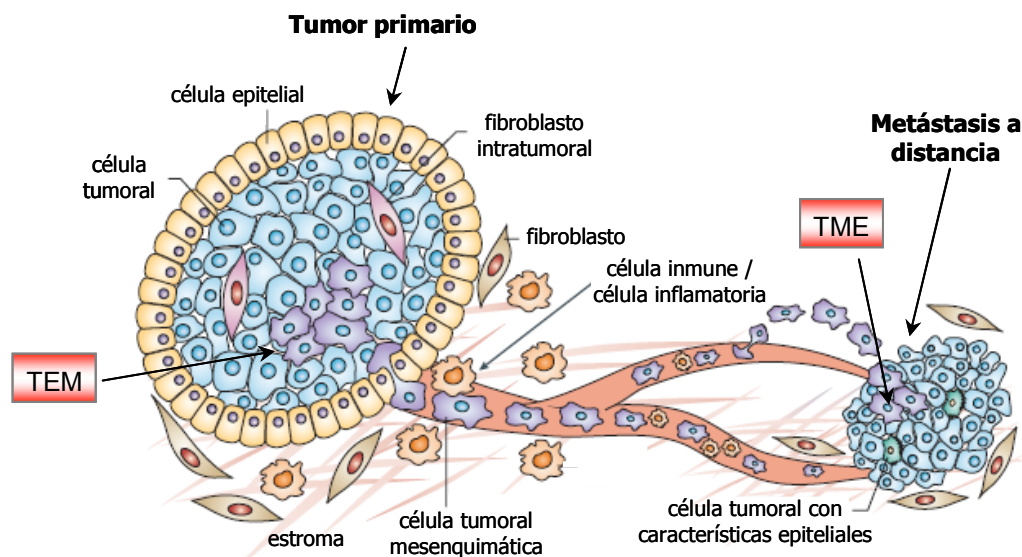


Figura 1. La TEM es un proceso dinámico. Representación esquemática del proceso de metástasis. En las primeras etapas de la progresión tumoral, algunas células epiteliales del tumor primario sufren una TEM, con pérdida de marcadores epiteliales, ganancia de marcadores mesenquimáticos, pérdida de polaridad y de adhesión intercelular. Estos cambios les permiten a dichas células tumorales invadir tejidos adyacentes y alcanzar un vaso sanguíneo o linfático, lo que permite la diseminación a otros órganos. Una vez establecido un foco metastásico a distancia, puede ocurrir el proceso inverso, es decir una TME, con re-expresión de marcadores epiteliales y adquisición de un fenotipo epitelial, similar al del tumor primario. Adaptado de Peinado et al. (2007).

1.1 La TEM durante la progresión tumoral. El papel de cadherina-E

A nivel molecular, un evento esencial en la TEM es la disminución en la expresión o función de la proteína de adhesión intercelular cadherina-E (Thiery, 2002; Huber et al., 2005). En la progresión tumoral, diferentes estudios han puesto de manifiesto que la pérdida de expresión y función de cadherina-E, correlaciona con una menor diferenciación y un mayor grado de progresión de diferentes tipos de carcinomas (revisado en Takeichi, 1993; Birchmeier and Behrens, 1994; Hajra and Fearon, 2002). Otros estudios, han mostrado una asociación entre la pérdida de expresión o función de cadherina-E y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimáticos y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas (Vleminckx et al., 1991; Behrens et al., 1992; Christofori and Semb, 1999). Más aun, experimentos con animales transgénicos han permitido establecer una relación de causalidad entre la pérdida funcional de cadherina-E y la transición de adenoma a carcinoma invasivo (Perl et al., 1998).

Así como los procesos de TEM son dinámicos y transitorios durante el desarrollo, observándose el fenómeno inverso de transición mesénquima-epitelio (TME) en diferentes contextos embrionarios, también se observa frecuentemente re-expresión de cadherina-E y características epiteliales en las metástasis (Figura 1). La identificación del factor Snail1 como represor transcripcional del gen de *cadherina-E* (Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000), y posteriormente, de otros represores (revisado en

Peinado et al., 2004a; Peinado et al., 2007), apoya la hipótesis de que la disminución en la expresión de *cadherina-E* es un proceso transitorio y reversible, coherente con una regulación a nivel transcripcional.

1.2 La TEM: activación de un programa genético

Se conocen al menos cinco rutas principales de señalización que controlan la TEM, tanto en los procesos morfogénicos como en el cáncer, entre ellas, las vías de WNT, TGF- β , Hedgehog, Notch, y rutas activadas por receptores con actividad tirosina-quinasa, las cuales están frecuentemente alteradas en el cáncer y pueden cooperar entre sí para inducir TEM. La mayoría de estas rutas convergen en la regulación positiva o estabilización de reguladores transcripcionales que reprimen la expresión de *cadherina-E* (Peinado et al., 2007; Berx et al., 2007; Moustakas and Heldin, 2007). Entre estos se encuentran los factores de dedos de zinc Snail1 (anteriormente Snail) (Cano et al., 2000, Batlle et al., 2000) y Snail2 (anteriormente Slug) (Hajra et al., 2002; Bolós et al., 2003), los factores de dobles dedos de zinc SIP-1/ZEB-2 (Comijn et al., 2001) y δ EF1/ZEB-1 (Grootclaes and Frisch, 2000; Eger et al., 2005), y los reguladores bHLH E12/E47 (Pérez-Moreno et al., 2001; Kondo M. et al., 2004) y Twist (Yang et al., 2004). Todos ellos inducen TEM cuando se sobreexpresan en células epiteliales, de acuerdo con sus patrones de expresión observados durante el desarrollo embrionario, en regiones que están sufriendo TEM o que ya han sufrido la transición. Por otra parte, estudios de los perfiles de expresión génica inducidos por estos factores han revelado que no sólo son capaces de reprimir la expresión de *cadherina-E*, sino que también regulan negativamente otras moléculas de adhesión y marcadores epiteliales, a la vez que modulan positivamente la expresión de genes cuyos productos favorecen la formación de estructuras móviles y la degradación de la matrix extracelular (Vandewalle et al., 2005; Moreno-Bueno et al., 2006; Aigner et al., 2007). Es decir, los represores de *cadherina-E* actúan como inductores de TEM a través de la regulación de un complejo programa genético que conlleva la ejecución del proceso de TEM.

En la TEM, tiene especial importancia la intercomunicación entre las células tumorales propiamente dichas y su entorno, debido a que, la mayoría de las veces, las señales que inducen TEM (TGF- β , EGF, HGF, PDGF) parecen tener su origen en las células que componen el estroma tumoral, como macrófagos y fibroblastos activados (Condeelis and Pollard, 2006; Scheel et al., 2007). En este contexto, algunas de las células epiteliales del tumor serían capaces de responder a estos estímulos y activarían el programa de TEM, lo cual les permitiría iniciar la cascada metastásica. De todas formas, es importante destacar que además de responder a su microentorno activando determinados programas transcripcionales, las células tumorales a lo largo de su existencia, van acumulando mutaciones y alteraciones epigenéticas que pueden conferirles una ventaja selectiva (Talmadge, 2007; Gupta and Massagué, 2006) y quizás, mayor capacidad de respuesta a señales de TEM (Scheel et al., 2007).

2. La cadherina-E y la homeostasis epitelial

La cadherina-E es una proteína que se expresa en las células epiteliales y que pertenece a la superfamilia de las cadherinas. La mayoría de los miembros de esta familia se caracterizan por ser glicoproteínas transmembrana, que forman uniones adherentes, dependientes de calcio, entre células adyacentes mediante interacción homotípica (es decir, entre miembros del mismo tipo). Las cadherinas, presentes en vertebrados e invertebrados, se han clasificado en 5 subfamilias, de acuerdo a su estructura y organización funcional: cadherinas tipo I o clásicas, tipo II o atípicas, cadherinas desmosomales (desmocollinas y desmogleínas), protocadherinas y otras proteínas relacionadas estructuralmente, como las cadherinas Flamingo y las tipo Fat (Nollet et al., 2000; Peinado et al., 2004a).

La cadherina-E es un importante morfógeno, que tiene un papel clave en el establecimiento del fenotipo epitelial, la polaridad celular, así como el mantenimiento del fenotipo epitelial y la arquitectura tisular. (Takeichi, 1988; Takeichi, 1995; Larue et al., 1996). Además, las uniones mediadas por cadherina-E se han implicado en la supervivencia celular (Day et al., 1999) y en el control de la proliferación celular (St Croix et al., 1998; Takahashi and Suzuki, 1996).

2.1 Las uniones mediadas por cadherina-E

La cadherina-E es el componente principal de las uniones adherentes de los tejidos epiteliales. Se ha postulado un modelo, según el cual las moléculas de cadherina-E forman homodímeros, unidos por interacciones no covalentes, que están anclados al citoesqueleto de actina, formando un complejo multiproteico que incluye α -catenina, β -catenina y catenina p120 (Figura 2A) (Nollet et al., 2000; Peinado et al., 2004a). La cadherina-E posee una estructura característica, con una región extracelular y otra citoplasmática. La región extracelular, está formada por 5 ectodominios (EC1-EC5) y un dominio extracelular adicional, próximo a la membrana (MPED). Los dominios EC, por una parte, median la interacción homotípica (a través de secuencias específicas HAV localizadas en el dominio EC1), y por otra, unen iones de calcio, los cuales confieren estabilidad a la región extracelular y permiten la conformación adecuada para las interacciones con la región correspondiente de la proteína de la célula contigua (Figura 2B) (Chappuis-Flament et al., 2001; Pertz et al., 1999). En cuanto a la región citoplasmática, ésta contiene un dominio conservado próximo a la membrana (MPCD), que interacciona con catenina p120, y un sitio de unión a cateninas (CBS) (Kemler, 1993; Stapper and Kemler, 1994; Pérez-Moreno and Fuchs, 2006), al que se unen β -catenina o γ -catenina/plakoglobina, de manera excluyente (Ozawa et al., 1989; Kemler, 1993; Lozano and Cano, 1998). La β - y la γ -catenina median la unión entre cadherina-E y la región aminoterminal de la α -catenina, que conecta al complejo de membrana directa o indirectamente con el citoesqueleto de actina (Rimm et al., 1995).

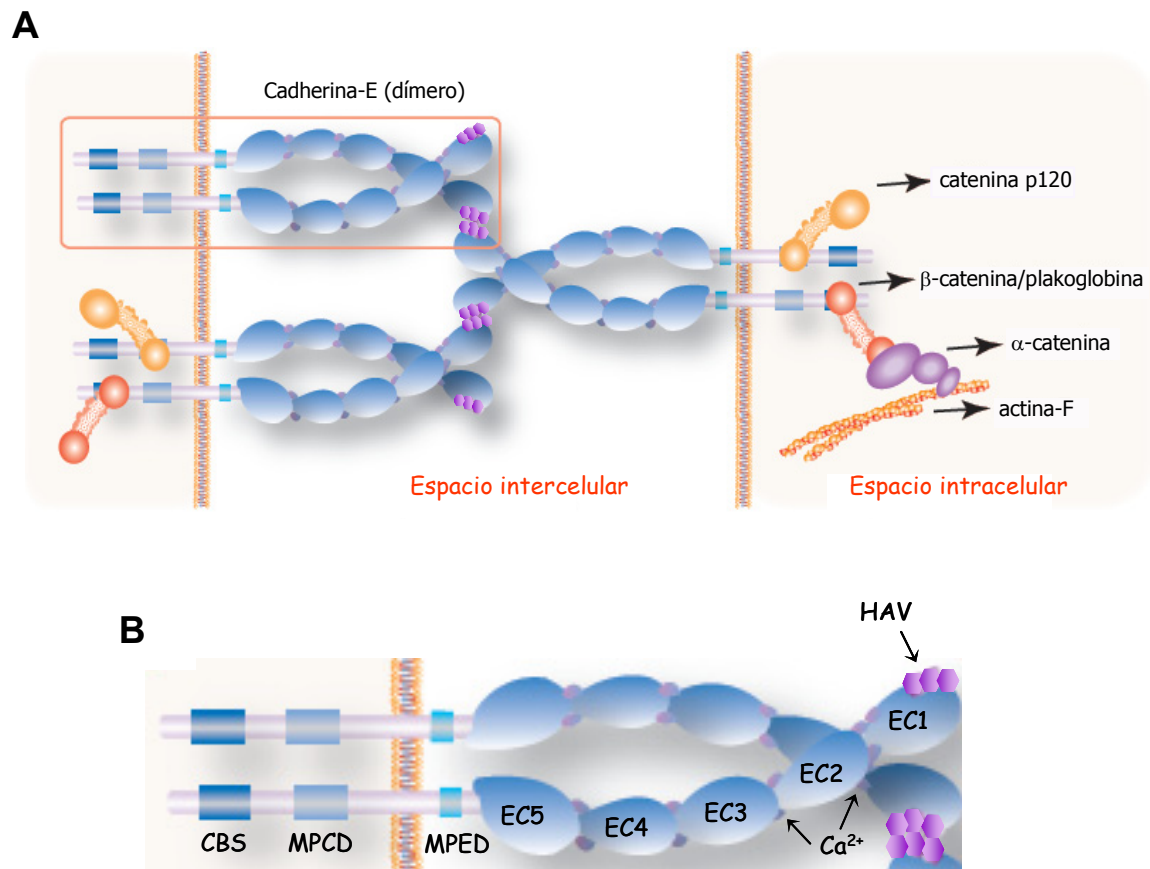


Figura 2. Representación esquemática de las uniones intercelulares mediadas por cadherina-E. A. Esquema de una unión adherente. A través de su región extracelular, las moléculas de cadherina-E establecen interacciones homotípicas dependientes de Ca^{2+} . La región citoplasmática permite su anclaje al citoesqueleto de actina-F a través de la unión con cateninas. **B. Esquema de la estructura de cadherina-E en membrana (ampliación de la región indicada en A).** Se indican los diferentes dominios de cadherina-E: EC, ectodominio; MPED, dominio extracelular próximo a la membrana; MPCD, dominio citoplasmático próximo a la membrana; CBS, dominio de unión a cateninas; HAV, secuencia conservada His-Ala-Val implicada en adhesión homotípica. Se indican también los sitios de unión para Ca^{2+} , localizados en la interfase de dominios EC.

Es importante destacar que la β -catenina tiene una importante función señalizadora en la vía de WNT, cuando se encuentra disociada de los complejos de adhesión y estabilizada en el citoplasma (Behrens, 1999; Nelson and Nusse, 2004). Por lo tanto, la unión de cadherina-E a β -catenina en los contactos intercelulares, resultaría en menores niveles de β -catenina disponibles para ejercer su función señalizadora (Fagotto et al., 1996; Wong and Gumbiner, 2003).

2.2 Regulación transcripcional de cadherina-E

Se ha visto que el gen de *cadherina-E* está inactivado somáticamente en ciertos tipos tumorales, tales como el carcinoma gástrico difuso, el carcinoma lobulillar de mama, y los sarcomas sinoviales (Becker et al., 1994; Berx et al., 1998; Sarrió et al., 2003; Saito et al., 2001). Sin embargo, la reducción

en los niveles de cadherina-E, en la mayoría de carcinomas, se debe principalmente a mecanismos epigenéticos, como hipermetilación de su promotor (Strathdee, 2002) y la acción de represores transcripcionales (Peinado et al., 2004a).

El promotor de *cadherina-E* de ratón, ha sido objeto de estudio de diferentes grupos. Posee varios elementos reguladores, entre los que se encuentran: una caja CCAAT, una región rica en GC y un elemento palindrómico denominado E-pal (Figura 3A). La región rica en GC y la caja CCAAT han sido implicadas en la regulación positiva de la actividad de este promotor, (Behrens et al., 1991; Hennig et al., 1996; Faraldo et al., 1997). El elemento palindrómico E-pal (-90/-70 con respecto al inicio de transcripción), está constituido por dos cajas E adyacentes, E1 (CAGGTG) y E2 (CACCTG), flanqueadas por cuatro nucleótidos invertidos (Behrens et al., 1991) (Figura 3B). Es pertinente aclarar que las cajas E son secuencias consenso del tipo CANNTG, donde N es cualquier nucleótido (Ephrussi et al., 1985; Lassar et al., 1989). El elemento E-pal fue inicialmente descrito como un regulador positivo específico de tejidos epiteliales (Behrens et al., 1991), pero posteriormente se lo caracterizó como un regulador negativo en células deficientes en expresión de cadherina-E (Henning et al., 1996; Faraldo et al., 1997; Rodrigo et al., 1999).

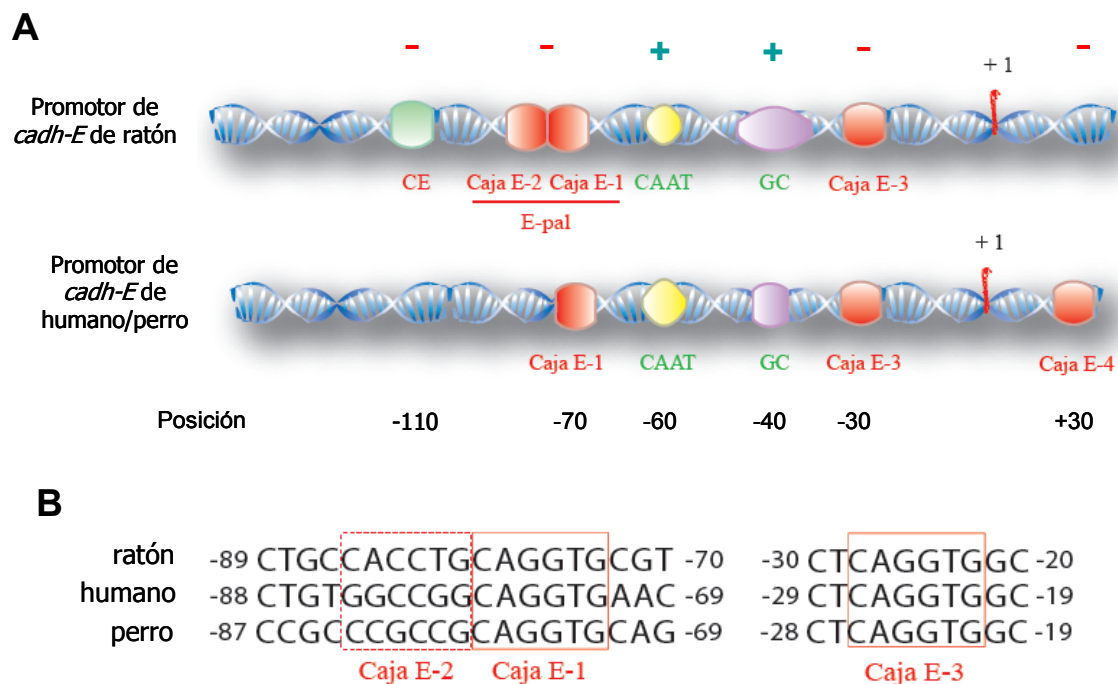


Figura 3. Elementos reguladores en el promotor proximal de *cadherina-E*. A. Representación esquemática del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón, perro y humano. Se indican elementos reguladores positivos (caja CAAT y región GC) y negativos (cajas E, región CE). La caja CAAT, la región rica en GC y las cajas E1 y E3 se encuentran conservadas en los tres promotores, mientras que la caja E2 y el elemento CE son exclusivos del promotor de ratón. Los promotores humano y canino poseen además una caja E4 río abajo del inicio de transcripción. **B. Secuencia de las cajas E del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón, canino y humano.** La conservación de las cajas E1 y E3 en las tres especies se indica con el recuadro en línea continua; la caja E2 en el promotor de ratón, se indica mediante línea discontinua. Adaptado de Peinado et al. (2004a).

Otros elementos del promotor de *cadherina-E*, identificados en la región proximal al inicio de transcripción, incluyen un regulador negativo denominado CE (Rodrigo et al., 1999) y una secuencia localizada en el primer intrón (potenciador específico de tejido epitelial, ESE), responsable de mantener los niveles de expresión en células epiteliales (Henning et al., 1996). Estudios más recientes han descrito la presencia de otros elementos reguladores en *cis* más río arriba del inicio de transcripción, y en el segundo intrón de este gen, requeridos para la expresión específica de tejido en el embrión (Stemmler et al., 2003).

Análisis comparativos del promotor de *cadherina-E* de distintas especies (humano, ratón y perro) han revelado la conservación de muchas de las secuencias reguladoras proximales, incluyendo una tercera caja E (caja E3, -30) (Comijn et al., 2001). Como excepción, cabe destacar la presencia de una caja E adicional (caja E4, +30) presente en los promotores humano y de perro (Battle et al., 2000), y la ausencia de conservación de la caja E2 del elemento E-pal murino (Figura 3B) (Comijn et al., 2001; Henning et al., 1996).

Diferentes estudios han mostrado que Snail1 actúa como un potente represor del promotor de *cadherina-E*, mediante la interacción con el elemento E-pal del promotor murino (Cano et al., 2000; Bolós et al., 2003) y cajas E proximales del promotor humano (Battle et al., 2000). Por su parte, Snail2, también es un importante represor de este gen (Hajra et al., 2002), aunque su afinidad por el elemento E-pal es menor que la de Snail1 (Bolós et al., 2003). Ambos factores de la superfamilia génica Snail, fueron descritos inicialmente como represores transcripcionales con un importante papel en la TEM durante el desarrollo embrionario (Hemavathy et al., 2000a; Nieto, 2002). Poseen un dominio de unión al DNA constituido por varios motivos de dedos de zinc (4-6 según la especie), que permite la unión a un tipo particular de caja E (C/A CAGGTG) (Mauhin et al., 1993; Hemavathy et al., 2000b). Además, presentan un dominio aminoterminal SNAG (conservado en las proteínas Snail y Gfi-1) (Grimes et al., 1996), que se requiere para la actividad represora de estos factores (Hemavathy et al., 2000a; Battle et al., 2000; Nieto, 2002). El mecanismo de represión sobre el promotor de *cadherina-E* propuesto en el caso de Snail1, depende del reclutamiento, a través de su dominio SNAG, del co-represor mSin3A y de actividades deacetilasas de histonas (HDAC1/HDAC2) (Peinado et al., 2004b). En el caso de Snail2, se ha propuesto que la interacción con CtBP, a través del dominio parcialmente conservado de interacción con esta molécula, junto al reclutamiento de HDACs, son necesarios para que pueda ejercer su función represora (Hemavathy et al., 2000b; Bolós, 2004, Tesis doctoral). Snail1 y Snail2 están involucrados en diversas fases del desarrollo embrionario y otros contextos biológicos que implican movimiento celular y/o supervivencia, y se consideran genes clave en el proceso de TEM (Nieto, 2002; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

Otros represores transcripcionales de *cadherina-E* son los dos miembros conocidos de la familia ZEB (dobles dedos de zinc y *homeobox*), ZEB1 y ZEB2, que también reprimen la actividad del promotor

a través de la unión a cajas E (Groteclaess and Frisch, 2000; Eger et al., 2005; Comijn et al., 2001). Ambos factores pueden actuar como represores o activadores transcripcionales, dependiendo de su interacción con co-represores (CtBP) o co-activadores (CBP/p300) (Postigo et al., 2003). Sin embargo, todavía se desconoce en gran medida el mecanismo por el cual reprimen el gen de *cadherina-E*.

3. La superfamilia de proteínas HLH

3.1 Características generales y clasificación

Las proteínas HLH son reguladores transcripcionales ampliamente distribuidos en los organismos eucariotas desde *Saccharomyces cerevisiae* hasta el ser humano, y desempeñan importantes funciones en muchos procesos esenciales del desarrollo, regulando el crecimiento celular y la diferenciación de diferentes tipos celulares (Massari and Murre, 2000; Jones, 2004). Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por la presencia de un dominio hélice-lazo-hélice (HLH), constituido por dos α -hélices anfipáticas, separadas por una región flexible, no helicoidal (lazo). A través de este dominio, las proteínas HLH homo- o hetero-dimerizan, lo cual es esencial para su función reguladora de la transcripción. En el proceso de dimerización (Figura 4), dichas α -hélices interactúan entre sí formando un núcleo hidrofóbico (Shirakata et al., 1993; Goldfarb et al., 1998). Adicionalmente, la mayoría de los factores HLH posee una región básica, N-terminal del motivo HLH, que media la unión al DNA (Davis et al., 1990; Voronova and Baltimore, 1990), dando lugar a lo que comúnmente se denomina dominio bHLH. Los sitios de unión más frecuentes de estas proteínas son las cajas E,

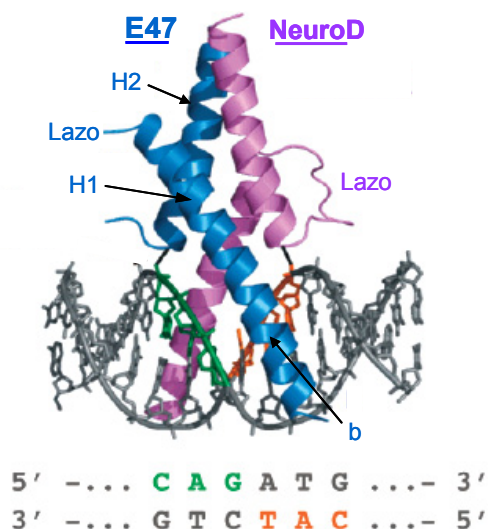









Figura 4. Representación de la dimerización y unión al DNA de proteínas bHLH. Imagen esquemática que representa el modelo de interacción de los dominios bHLH de los factores E47 (azul) y NeuroD (violeta) unidos al DNA, sobre el promotor de insulina. En el dímero, las cuatro hélices (dos por cada factor) se disponen de forma paralela, de modo que los residuos se agrupan formando un núcleo hidrofóbico. La región básica (indicada como b), que se continúa con la hélice 1 (H1), toma contacto con el surco mayor del DNA; nótese que cada factor interactúa con una mitad de la caja E. H2: hélice 2. Adaptado de Longo et al. (2008).

presentes en los promotores de numerosos genes. Estudios cristalográficos han determinado que cada monómero bHLH interactúa con una mitad de la caja E, interaccionando la región básica con el surco

mayor del DNA (Figura 4). Además, residuos adicionales del lazo y de la segunda hélice del dominio HLH también están implicados en la unión al DNA (Ellenberger et al., 1994; Longo et al., 2008).

Las proteínas HLH han sido clasificadas en siete clases (I-VII) (Tabla 1), de acuerdo a su distribución tisular, su capacidad de dimerización y su unión específica al DNA (Massari and Murre, 2000; Jones, 2004). Con excepción de la clase V, se trata de factores bHLH, con la secuencia de aminoácidos básicos próximos al dominio HLH. En mamíferos, existen tres genes bHLH de clase I: *E2A*, *HEB* y *E2-2*. Estos genes, codifican para seis proteínas, también denominadas proteínas E, las cuales se expresan en muchos tejidos, pero no son ubicuas. Los factores de clase I generalmente actúan como activadores transcripcionales, pero también pueden actuar como represores, dependiendo de la proteína bHLH con la que estén dimerizando y/o de la interacción con co-represores o co-activadores (Lemerrier

Tabla 1. Descripción de las diferentes clases de proteínas HLH

Clasificación	Características	Ejemplos	Funciones
Clase I 	Amplia expresión. Capaces de homo o heterodimerizar.	E12/E47; E2-2A/B. Proteínas E.	Linfogénesis, neurogénesis, miogénesis, etc.
Clase II 	Expresión específica de tejido. Suelen heterodimerizar con proteínas bHLH de clase I.	MyoD, NeuroD, MashI, Twist, Tal1	Miogénesis, neurogénesis, hematopoyesis, etc.
Clase III 	Poseen un motivo cremallera de leucinas adyacente al dominio bHLH.	Myc, MITF	Proliferación, diferenciación, apoptosis, melanogénesis, etc.
Clase IV 	Capaces de heterodimerizar con Myc o entre ellas	Max, Mad.	Proliferación, apoptosis, etc.
Clase V 	Carecen del dominio básico de unión al DNA; actúan como dominantes negativos de proteínas bHLH de clases I y II	Factores ID	Proliferación, diferenciación, angiogénesis, etc.
Clase VI 	Poseen una prolina conservada en la región básica.	HES, HERS1	Ruta de señalización de Notch, proliferación, etc.
Clase VII 	Presentan un dominio PAS adyacente al bHLH.	HIF1 α , AHR	Respuesta a hipoxia, a hidrocarburos aromáticos, etc.

H1-L-H2: dominio HLH (H1: hélice 1, L: lazo, H2: hélice 2); b: región básica, adyacente al dominio HLH; LZ: cremallera de leucinas (*leucine zipper*); PAS: dominio PAS; Pro: prolina. Adaptado de Massari and Murre, (2000).

et al., 1998; Pérez-Moreno et al., 2001; Muruyama et al., 2004; Zhang et al., 2004; Goardon et al., 2006). Las proteínas E generalmente heterodimerizan con factores bHLH de clase II, aunque también son capaces de homo- o heterodimerizar entre sí (Massari and Murre, 2000). La clase II está constituida por factores con expresión específica de tejido, como los factores miogénicos MyoD y miogenina (Weintraub et al., 1991; Hasty et al., 1993), factores neuronales como MashI y neurogenina (Guillemot et al., 1993; Ma et al., 1996), y los genes TAL involucrados en la hematopoyesis (Begley et al., 1989). En la mayoría de los casos, los factores de clase II forman dímeros con las proteínas de clase I (Massari and Murre, 2000). Por su parte, los factores HLH que forman la clase V, carecen de la región básica de unión al DNA, por lo que no pueden unirse a él (Benezra et al., 1990; Christy et al., 1991). Es por ello, que estas proteínas, denominadas ID (Inhibidores de unión al DNA o Inhibidores de diferenciación), actúan como dominantes negativos, ya que pueden dimerizar con factores bHLH de las clases I y II a través de sus dominios HLH, pero el heterodímero formado es incapaz de unirse al DNA (Perk et al., 2005).

3.2 Nuevas funciones: los factores E47 y Twist

Estudios recientes han permitido determinar que además de regular el establecimiento de linajes celulares y la diferenciación celular, las proteínas HLH pueden desempeñar funciones en otros procesos, como la TEM. El factor bHLH de clase I E47 (codificado por el gen *E2A*) fue el primer factor de esta familia implicado en este proceso, tanto en células epiteliales, en relación a la invasión tumoral, como durante el desarrollo embrionario (Pérez-Moreno et al., 2001) y, más recientemente, se lo ha asociado a procesos de TEM durante la fibrosis renal (Slattery et al., 2006, 2007). Por otra parte, el factor de clase II Twist, que cumple un papel destacado en la determinación del mesodermo durante el desarrollo, es a su vez, un importante inductor de TEM, con un papel clave en la metástasis (Baylies and Bates, 1996; Yang et al., 2004).

El factor E47 es uno de los dos productos del gen *E2A* (*TCF3*), que da origen por *splicing* alternativo del exón que codifica para la región bHLH, a dos RNAs que codifican para las proteínas E47 y E12 (Murre, et al., 1989; Watada et al., 1995). Ambos factores presentan un alto nivel de homología, diferenciándose exclusivamente en el dominio bHLH. E12/E47 son las proteínas bHLH de clase I más estudiadas. Ambas pueden actuar como reguladores transcripcionales positivos o negativos. Se ha visto que cuando funcionan como activadores (como en el caso de genes miogénicos), requieren la interacción con co-activadores con actividad acetilasa de histonas (HAT), como CBP/p300 y PCAF (Qiu et al., 1998; Bradney et al., 2003). Cuando actúan como represores (por ejemplo, de genes eritroides), lo hacen a través del reclutamiento de complejos co-represores con actividad HDAC (Zhang et al., 2004; Muruyama et al., 2004). Las proteínas E2A pueden formar homodímeros, o pueden heterodimerizar con otras proteínas de clase I, con factores bHLH de clase II específicos de tejido, o con los factores ID, y presentan, en muchas ocasiones, redundancia funcional con otras proteínas E, lo cual deriva en que se desconozcan muchas de sus funciones (Ik Tsen Heng and Tan, 2003). Además de estar implicados en

procesos de TEM, los factores E12/E47 podrían desempeñar otros papeles en la tumorigénesis, ya que en ciertos contextos, pueden promover la proliferación celular (por ejemplo, a través de la inducción de ciclinas (Zhao et al., 2001; Song et al., 2004)) y estimular la angiogénesis (Peinado et al., 2004c).

3.3 Los factores E2-2

El gen *E2-2* (también denominado *TCF4*) codifica para dos proteínas de la clase I, E2-2A y E2-2B (Henthorn et al., 1990; Corneliussen et al., 1991; Skerjanc et al., 1996). A diferencia de los productos de los otros genes de esta clase, *E2A* y *HEB* (*TCF12*) (Zhang et al., 1991; Gan et al., 2002), que se originan por splicing alternativo a partir de un único precursor, la expresión de las isoformas E2-2A y E2-2B parece estar dirigida por dos promotores distintos (Fearon et al., 2002). No obstante, las dos isoformas sólo difieren en sus extremos N-terminales, compartiendo toda la secuencia restante (Figura 5).

3.3.1 Los factores E2-2: función biológica

Los factores E2-2 han sido menos estudiados que las proteínas E2A. Estudios con ratones *knock out* condicionales para *E2-2* han determinado su implicación en el desarrollo de linfocitos B y T en etapas tardías, a diferencia de las proteínas E2A, que son críticas en el establecimiento de estos linajes (Wikstrom et al., 2006; Murre, 2005; Bergqvist et al., 2000; Zhuang et al., 1994). Por otra parte,

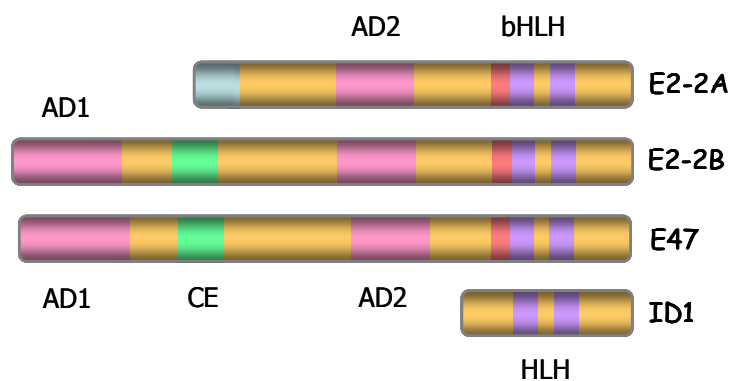


Figura 5. Representación de los principales dominios estructurales y funcionales de los factores E2-2A, E2-2B, E47 e ID1. Se indican los diferentes dominios de los cuatro factores: HLH, dominio hélice-lazo-hélice; b, región básica de unión al DNA; AD1, dominio de transactivación 1; AD2, dominio de transactivación 2. CE: dominio de represión. Se representa en celeste el extremo N-terminal de E2-2A, que es específico de esta isoforma.

los factores E2-2 se han asociado con procesos de diferenciación en diversos tipos celulares, como células de mama (Parrinello et al., 2001), trofoblastos (Scott et al., 2000), osteoblastos (Beck et al., 2001) y células de Sertoli (Muir et al., 2006), si bien el papel específico de E2-2A/B en la diferenciación de estos tipos celulares no ha sido del todo esclarecido.

Debido a su capacidad de interacción con factores neurogénicos, los factores E2-2 han sido implicados en la diferenciación neuronal (Persson et al., 2000). En este sentido, análisis genéticos recientes han mostrado que la pérdida de una copia funcional del gen *E2-2* causa el síndrome de Pitt–Hopkins (PHS), una enfermedad provocada por una alteración en el desarrollo de sistema nervioso, que se caracteriza por retraso mental, epilepsia, e hiperventilación (Pitt and Hopkins, 1978; Peippo et al., 2006), lo que indica que los factores E2-2 cumplirían un papel crítico durante el desarrollo del sistema nervioso en humanos (Amiel et al., 2007; Brockschmidt et al., 2007; Zweier et al., 2007).

En cuanto al proceso tumoral, la sobreexpresión de *E2-2* en adenocarcinomas de ovario que tienen alterada la vía de β -catenina (Zhai et al., 2002), ha llevado a determinar que este gen es una diana directa del complejo transcripcional TCF/ β -catenina y que es capaz de promover la transformación neoplásica de células RK3E (Kolligs et al., 2002). Además, también se ha visto sobreexpresión de E2-2 en tumores de próstata con respecto al tejido sano (Liu et al., 1997).

3.3.2 Los factores E2-2: regulación transcripcional

Diferentes estudios han caracterizado a E2-2B como represor transcripcional, como en el caso del gen de α -actina cardíaca, creatina-quinasa y genes melanogénicos (Skerjanc et al., 1996; Petropoulos and Skerjanc, 2000; Chen and Lim, 1997; Furumura et al., 2001). No obstante, E2-2B también puede activar genes, como los que codifican para el receptor II de somatostatina y el receptor P2X1 (Pscherer et al., 1996; Dhulipala et al., 2001). Por su parte, se ha visto que E2-2A puede funcionar como activador (por ejemplo, en el caso del gen de tirosina hidroxilasa) (Yoon and Chikaraishi, 1994) o como represor transcripcional. Curiosamente, en determinados contextos, ambas isoformas pueden funcionar de manera similar, como en la represión de genes melanogénicos (Furumura et al., 2001) o actuar de manera opuesta, como en el caso del gen de α -actina cardíaca, para el cual el heterodímero MyoD-E2-2A activa la transcripción, mientras que MyoD-E2-2B la reprime (Skerjanc et al., 1996). En otros casos, como el del gen que codifica para el receptor P2X1, sólo la isoforma E2-2B muestra actividad, mientras que la isoforma E2-2A parece inactiva (Dhulipala et al., 2001).

E2-2B posee dos regiones de transactivación, AD1 y AD2 (Quong et al., 1993; Aronheim et al., 1993), conservadas en las demás proteínas E, con excepción de E2-2A, que al ser una proteína más corta, sólo posee el dominio AD2 (Corneliussen et al., 1991; Skerjanc et al., 1996) (Figura 5). Diversos estudios han mostrado que el dominio AD1 de E2-2B y de E12/E47 es necesario tanto para la activación transcripcional como para la represión ejercida por estos factores (Skerjanc, 1996; Petropoulos and Skerjanc, 2000). Trabajos más recientes han revelado que el dominio AD1 de E12/E47, y en menor medida el AD2, pueden interactuar con CBP/p300 para activar la transcripción (Bayly, 2004). Otros estudios mostraron que en un contexto de activación transcripcional, el dominio AD1 de las proteínas E interactúa con el co-activador CBP/p300, mientras que, en un contexto de represión, se produce un intercambio de co-reguladores, pasando a interactuar el dominio AD1 con proteínas de la familia ETO,

que a su vez reclutan HDACs (Zhang et al., 2004). Este mecanismo de inhibición transcripcional, sería diferente al ejercido por las proteínas IDs (Figura 6).

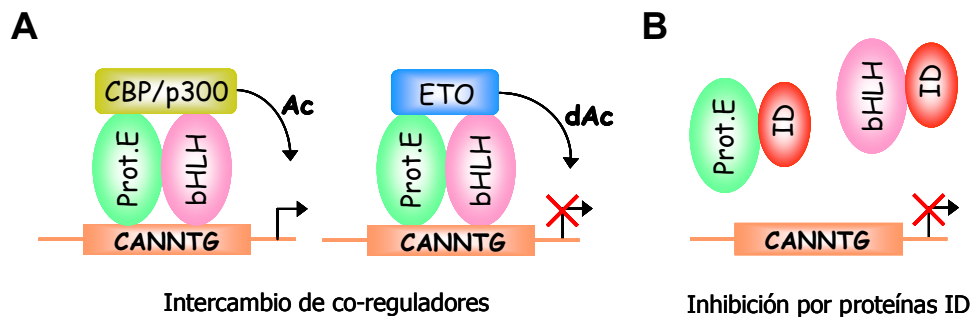


Figura 6. Modelos de regulación de la actividad transcripcional de las proteínas bHLH de clase I. A. Intercambio de co-reguladores. Las proteínas E pueden promover tanto la activación transcripcional como la represión. En el primer caso, las proteínas E pueden reclutar complejos con actividad acetilasa de histonas, como CBP/p300. En el segundo caso, se postula que se produce un intercambio de co-reguladores, lo que permite la interacción de las proteínas E con otras proteínas (como los factores de la familia ETO o VDR unido a ligando), capaces de reclutar complejos con actividad deacetilasa de histonas. **B. Mecanismo de inhibición transcripcional por factores ID.** Debido a la ausencia de la región básica de unión al DNA, las proteínas ID forman heterodímeros incapaces de unirse al DNA, por lo que actúan como dominantes negativos, secuestrando a los factores bHLH de clase I y II. Prot.E: proteína E (bHLH de clase I); bHLH: factor bHLH de clase II.

Estudios recientes revelaron la presencia en la proteína E2-2B, de un dominio que confiere actividad represora (denominado CE), que se encuentra conservado en las demás proteínas E, E12/E47 y HEB, pero no en E2-2A (Figura 5). El dominio CE posee varios residuos de lisina, esenciales para su función reguladora, que podrían ser susceptibles de modificaciones post-traduccionales como ubiquitinación y acetilación (Herbst and Kolligs, 2008).

3.4 Los factores IDs

Como se mencionó anteriormente, los factores ID constituyen la clase V de la familia de proteínas HLH, y se caracterizan por carecer de la región básica de unión al DNA. De este modo, los factores ID actúan secuestrando a las proteínas bHLH de clase I (o de clase II), ya que el heterodímero ID/bHLH no puede unirse al DNA (Figura 6B). Por otra parte, los factores ID son capaces de interactuar con otras proteínas diferentes a las HLH, como pRB, factores Ets, Pax y MIDA-1 (Norton, 2000; Sikder et al., 2003).

En vertebrados existen cuatro genes *ID*, *ID1-ID4* (Benezra et al., 1990; Sun et al., 1991; Christy et al., 1991; Biggs et al., 1992; Riechmann et al., 1994). Estudios de sus perfiles de expresión en ratón, revelaron que, *ID1* e *ID3* poseen una expresión similar y amplia, mientras que *ID4* se expresa en sólo en algunas regiones, más diferenciadas. Con respecto a *ID2*, su expresión en determinados órganos se restringe a estructuras epiteliales, mientras que *ID1* e *ID3* se expresan en células mesenquimales adyacentes (Jen et al., 1996; Jen et al., 1997). De todas formas, si bien en determinados contextos las

proteínas ID pueden presentar cierto grado de redundancia funcional, diversos estudios de pérdida de función han revelado papeles no redundantes para estos factores (Norton, 2000).

Las proteínas ID inhiben la diferenciación de diversos tipos celulares (Benezra et al., 1990; Lyden et al., 1999; Desprez et al., 1995) y estimulan la proliferación, la angiogénesis y la invasión celular, procesos que están íntimamente relacionados con el cáncer. A su vez, son dianas de oncogenes como Myc y Ras (Perk et al., 2005). Es por ello que estos factores han sido muy estudiados durante los últimos años.

3.4.1 Los factores IDs: regulación de la proliferación

Los factores ID pueden inducir proliferación mediante diversos mecanismos. Uno de ellos es a través de la interacción con pRB (en el caso de ID2), lo que promueve la progresión del ciclo celular. Otro, es inhibiendo la expresión de inhibidores del ciclo celular, como p21 (WAF1) y p16 (INK4a). (Norton, 2000; Sikder et al., 2003). La represión de p16 (considerado supresor tumoral) explica el retraso en la entrada en senescencia replicativa de queratinocitos y melanocitos, entre otros tipos celulares, inducida por los factores IDs (Alani et al., 1999, 2001; Cummings et al., 2008).

Los factores ID están también implicados en supervivencia celular. Por una parte, la sobreexpresión de proteínas ID promueve apoptosis en determinados contextos, como células epiteliales de mama (Parrinello et al., 2001). Por el contrario, se ha determinado que las proteínas ID inhiben la apoptosis y promueven la supervivencia celular en células endoteliales (Sakurai et al., 2004) y del epitelio prostático (Ling et al., 2003). Es importante destacar que la sobreexpresión de ID1 es capaz de promover resistencia a agentes quimioterapéuticos en células de carcinoma (Ling et al., 2006).

3.4.2 Los factores IDs: su papel en la angiogénesis

ID1, ID2 e ID3 desempeñan papeles importantes en la angiogénesis, tanto durante el desarrollo embrionario como en el proceso tumoral. La anulación completa de la expresión de los genes de ID1 e ID3 en ratones lleva a la muerte embrionaria debido a diferenciación neural prematura y a hemorragias por deficiencias en la vasculatura, lo cual ha revelado la implicación de estos factores en la angiogénesis durante el desarrollo (Lyden et al., 1999). Estudios posteriores han confirmado la participación de estos factores en la angiogénesis tumoral, aunque hay diferencias en cuanto al tipo de tumor y el grado de diferenciación. En general, los tumores más indiferenciados presentan mayores niveles de estos factores en la vasculatura asociada (Perk et al., 2005). En cuanto a los mecanismos implicados, se ha determinado que VEGF es una diana de ID1 (Ling et al., 2005). Por otra parte, ID1 e ID3 parecen ser necesarios para la movilización de precursores endoteliales de la médula ósea (Lyden et al., 2001).

3.4.3 Los factores IDs: su papel en la invasión celular

Diferentes estudios han permitido establecer la implicación de ID1 en la invasividad y la metástasis, especialmente en el cáncer de mama. La expresión de este factor se ha relacionado con un incremento en la capacidad migratoria/invasiva y metastásica de células del epitelio mamario y de líneas celulares de cáncer de mama (Desprez et al., 1998; Lin et al., 2000; Fong et al., 2003). Más recientemente, se lo ha asociado con la metástasis específica a pulmón, que suele producirse en este tipo de tumores (Minn et al., 2005). Por el contrario, ID2, en mama, está asociado con diferenciación y reducción de capacidad invasiva (Stighall et al., 2005), mientras que en células de cáncer de próstata, se asocia con mayor invasión (Coppe et al., 2004), lo cual pone de manifiesto, que la acción de estas moléculas depende en gran medida, del contexto celular.

En conjunto, los antecedentes mencionados muestran la complejidad de la familia de proteínas HLH y su importancia biológica como reguladores de múltiples procesos celulares, lo que puede derivar en cambios fenotípicos normales o patológicos.

3.5 Relación de factores bHLH con otros reguladores de TEM

Con respecto a la TEM, una cantidad creciente de estudios ha mostrado la existencia de una asociación inversa entre la expresión de factores como Snail1/2, E47, Twist y ZEB-1/2, y la expresión de cadherina-E en diferentes tipos tumorales (Peinado et al., 2007). Estas observaciones, junto a estudios funcionales recientes (Olmeda et al., 2007a; Olmeda et al., 2007b; Spaderna et al., 2008; Yang et al., 2008) apoyan la implicación de estos factores en la progresión tumoral. No obstante, hasta el momento se desconoce si existe una jerarquía en la actuación de los diferentes represores de *cadherina-E* y si juegan un papel redundante o específico en la tumorigénesis, por lo que resulta importante estudiar las posibles relaciones funcionales entre ellos. En este sentido, el análisis de los perfiles de expresión génica de líneas estables derivadas de MDCK que sobreexpresan los factores Snail1, Snail2 o E47, ha puesto de manifiesto que el gen *E2-2* es una diana (directa o indirecta), activada en células con expresión de dichos represores de *cadherina-E*/inductores de TEM (Moreno-Bueno et al., 2006). Asimismo, estudios anteriores del grupo indicaron que E2-2 interacciona con el elemento Epa1 del promotor de *cadherina-E* de ratón. No obstante, actualmente se desconoce si los factores E2-2 podrían desempeñar algún papel en la regulación de la expresión de *cadherina-E*, en la inducción de TEM y en la progresión tumoral.

Objetivos

En base a los antecedentes previos de la literatura y las aparentes relaciones observadas entre los factores E2-2 y otros reguladores de la expresión de cadherina-E/inductores de TEM, en la presente Tesis nos propusimos caracterizar la acción de los factores E2-2 en dichos procesos, a través de los siguientes objetivos concretos:

1- Caracterización de los factores E2-2 como represores de cadherina-E y su papel en la TEM.

- 1.a Analizar la expresión de E2-2 en las líneas celulares MDCK-Snail1, MDCK-Snail2 y MDCK-E47, y en modelos celulares de progresión tumoral.
- 1.b Analizar el efecto de la expresión estable de E2-2 sobre el fenotipo celular.
- 1.c Estudiar la acción de los factores E2-2 sobre el promotor de *cadherina-E*.

2- Comparación de la acción de los factores E2-2 con E47.

- 2.a Analizar los perfiles de expresión génica inducidos por ambos tipos de factores.

3- Estudio de la interrelación de los factores Snail y E47 con E2-2.

- 3.a Caracterizar el promotor de *E2-2* y estudiar su regulación por los factores Snail1, Snail2 y E47.
- 3.b Analizar la regulación de los promotores de *Snail1*, *Snail2* y *E2A* por E2-2.

Materiales y Métodos

1. Ensayo de híbrido sencillo

Brevemente, la metodología del híbrido sencillo permite aislar factores que se unan a una región o secuencia específica de DNA (Uowerkerk and Meijer, 2001). Para ello, se utilizan dos tipos de vectores: uno, en el cual se clonan repeticiones de la región de interés en posición 5' del gen testigo *HIS3*, que codifica para una enzima (imidazol glicerol-fosfato dehidratasa) implicada en la síntesis del aminoácido histidina, (vector 1). Es necesario aclarar que dicha enzima se inhibe de manera competitiva por 3-aminotriazol (3AT). El otro tipo de plásmido, portará un cDNA (proveniente de una librería) fusionado al dominio de activación (AD) del factor de transcripción Gal4 de levaduras, de modo que se genere una proteína de fusión cDNA-AD(Gal4), (vector 2). Si el cDNA del vector 2 codifica para un factor que es capaz de unirse a la región de DNA clonada en el vector 1, el dominio de activación de Gal4 activará la transcripción del gen testigo, que permitirá, por ejemplo, la síntesis de histidina. De este modo, si ambos plásmidos están presentes a la vez en las mismas levaduras, aquellas que crezcan en ausencia de histidina, serán las que porten el cDNA que codifique para un factor que interaccione con la región de DNA de interés.

El análisis de híbrido sencillo para el aislamiento de factores de interacción con el elemento E-pal se realizó como se describió (Cano et al., 2000; Pérez-Moreno et al., 2001). Brevemente, se clonó un fragmento de DNA conteniendo 6 copias repetidas del elemento E-pal en su versión silvestre (WT) o mutada (Mut), en el vector testigo pHISi (Clontech), que permite la expresión del gen *HIS3*, y cada uno de los fragmentos se integró en el *locus* cromosómico URA3 en la cepa de levaduras YM4271 (Clontech). Dichas levaduras, se transformaron con una librería de cDNA de fibroblastos NIH3T3, fusionada al AD(Gal4), en el vector pACT2 (Clontech). Los transformantes (3×10^6 clones independientes) se analizaron por su capacidad de crecer en medio sin histidina, en presencia del inhibidor 3AT, utilizado para eliminar los niveles de transcripción basales de *HIS3*. Los clones identificados (300) se analizaron posteriormente por su capacidad de transformar levaduras conteniendo la versión silvestre del elemento E-pal (E-pal-HIS WT) o mutada (E-pal-HIS Mut). Los plásmidos que confirieron expresión de *HIS3* sólo en la cepa E-pal-HIS WT, (130/300), se seleccionaron para su análisis posterior.

2. Construcciones de DNA

2.1 Vectores de expresión

Para la expresión exógena de los factores E2-2A y E2-2B, los cDNAs correspondientes se clonaron en vectores de expresión para células de mamífero, bajo el promotor constitutivo CMV. El cDNA completo de E2-2B murino (mE2-2B, número de acceso a la base de datos GeneBank: MMU16322) contenido en el plásmido pACT2 (Clontech) y seleccionado en el ensayo de híbrido

sencillo (Cano et al., 2000), se subclonó en el vector pcDNA3-HA (Invitrogen), en sitios EcoRI / XhoI mediante PCR. Para ello se diseñaron los cebadores, cuyas secuencias de muestran a continuación:

2B-EcoRI (directo): 5'TGTGAATTCGCTAAAATGCATCACCAA3',

2B-XhoI (reverso): 5'ACCCTCGAGCATCTGTCCCATGTGATTC3'. Los sitios de restricción están subrayados. La amplificación se realizó con la enzima Taq Expand High Fidelity (Roche) empleando pACT2-E2-2B como molde. Se realizaron 30 ciclos de amplificación: 95°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min, 30 seg. La construcción pcDNA3-E2-2A, que contiene el cDNA de la isoforma E2-2A murina (mE2-2A, número de acceso a la base de datos GeneBank: MMU16321), fue seleccionado en el ensayo de híbrido sencillo, y subclonado en el vector pcDNA3, se encontraba disponible en el laboratorio.

Además de los mencionados plásmidos, se utilizaron los vectores pZEO-hSnail1 y pcDNA3-hSnail2, disponibles en el laboratorio, y que contienen los cDNAs completos de Snail1 y Snail2 humanos en los vectores pZEO y pcDNA3, respectivamente.

2.2 Vectores testigo

Los plásmidos testigo contienen el cDNA de un gen testigo cuya expresión está dirigida por la secuencia de DNA del gen cuya actividad promotora se quiere estudiar. Los plásmidos utilizados en esta memoria contienen el gen testigo *Luciferasa* bajo el control de los siguientes fragmentos de DNA:

1. Promotor de *cadherina-E* de ratón (versión silvestre, WT, fragmento de ~270 pb (-178/+92, con respecto al inicio de transcripción) (Peinado et al., 2003).

2. Promotor de *cadherina-E* de ratón ΔE -pal, fragmento de ~265 pb (-178/+92, con respecto al inicio de transcripción), en el que el elemento E-pal está delecionado (Faraldo et al., 1997). Se subclonó a partir del plásmido pCAT, en el vector pGL2 (Promega), en sitios KpnI / HindIII mediante PCR, con los cebadores cuyas secuencias de muestran a continuación:

ΔE -pal-KpnI (directo): 5'AAGGTACCGGTGCGTCCCCAGCCAA3',

ΔE -pal-HindIII (reverso): 5'AAGAAGCTTGGGTGCGGTCGGGCAGG3'. Los sitios de restricción están subrayados. La amplificación se realizó con la enzima Taq Expand High Fidelity (Roche), utilizando 30 ciclos de amplificación: 95°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 1 min, 30 seg.

3. Promotor de *Snail1* de ratón, fragmento de ~900 bp (-905/+1, con respecto al ATG) (Bolós et al., 2003).

4. Promotor de *Snail1* humano, fragmento de ~1,7 kb (-1637/+129, con respecto al inicio de transcripción), clonado y cedido por el Dr. J. Renart (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM).

5. Promotor de *Snail2* de ratón, fragmento de ~2,8 kb (-2800/+1, con respecto al ATG), cedido por el Dr. P. Savagner (Centre de Recherche en Cancerologie, CRLC, Montpellier, Francia).

6. Promotor de *Snail2* humano, fragmento de ~900 pb (-900/+1, con respecto al ATG), clonado por el Dr. H. Peinado en nuestro laboratorio. Para su clonaje, se utilizaron los cebadores específicos:

directo, 5'AAATTTGGTACCTTGTCTCTAAAGACCCATACAACC3'

y reverso, 5'AAATTTAAGCTTCTTTACGAACTGAGCCCGTTTT3', portando dianas para las enzimas de restricción KpnI y HindIII (subrayadas), respectivamente. La amplificación se realizó con la enzima Taq Expand High Fidelity (Roche) a partir de DNA genómico de células MCF-7 (carcinoma de mama). Se realizaron 30 ciclos de amplificación: 95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min 30 seg. Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pGL2 (Promega).

7. Promotor de E2A de ratón, fragmento de ~3000 pb (-2994/+62, con respecto al inicio de transcripción) cedido por el Dr. J. Mizuguchi (Facultad de Medicina, Universidad de Tokio, Japón).

Tabla 2: Cebadores y condiciones utilizadas para el clonaje de regiones reguladoras del promotor de E2-2A humano mediante PCR

Construcción	Cebadores	Condiciones ¹	Tamaño del producto	Molde
A (-2820/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> GCTGGCAAGGTAAGTCTGTCCAGTTA 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 2 min - 72°C 2 min	~2900 pb	DNA de células HN19
B (-1744/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> AGTACTGTTACACAAACCTCTGGGGA 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 m 30 s - 72°C 1 m 30 s	~1830 pb	A
C (-1671/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> CTTCGATACGTGTGTGGATGTG 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 m 30 s - 72°C 1 m 30 s	~1760 pb	A
D (-1417/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> ATTTGGGATCAATTCCCAGAGGC 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 m 30 s - 72°C 1 m 30 s	~1500 pb	A
E (-1002/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> CGGTTCTGAAGGTACCAATAAACTTGC 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 m 30 s - 72°C 1 m 30 s	~1100 pb	A
F (-544/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> TACAATGCTGGGAGCTAGCCAGC 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 min - 72°C 1 m 30 s	~630 pb	A
G (-492/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> GTGCATCATACGATTCCCTCCTG 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 min - 72°C 1 m 30 s	~600 pb	A
H (-492/+90)	5' TGGCCCGGC <u>AAATATA</u> GGAAAATGCAACTGAAGGAATTGTTGTG3' 5' GCATTTCC <u>TATATT</u> GCCGGGCCAAGCGTGGTGAATATGC 3'	- 94°C 30 seg ² - 55°C 1 min - 68°C 6 min	~6,2 kpb ³	G
I (-19/+90)	5' AAT <u>ACGCGT</u> GGC <u>AAATAT</u> GGAAAATGCAACTG 3' 5' AAT <u>CTCGAGGGT</u> CTCGGATTCTTTTTCTCCTCAG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 min - 72°C 1 m 30 s	~100 pb	A

¹ En todos los casos (excepto construcción H) se utilizó DMSO 2,5%, la enzima High Fidelity (Roche) y 30 ciclos de amplificación.

² Se utilizó la enzima High Fidelity Plus (Roche) y 16 ciclos de amplificación.

³ El tamaño corresponde al plásmido pGL2 conteniendo el inserto. Tamaño del inserto: 600 pb.

Secuencias subrayadas en negro: dianas de restricción: MluI y XhoI, en los cebadores directo y reverso, respectivamente. Se indican en rojo los nucleótidos mutados de la caja E6, subrayada en verde, en los cebadores para las construcciones H e I.

2.2.1 Promotor de *E2-2* humano

Se amplificaron por PCR diferentes fragmentos desde la región -2820, hasta la región +90, del gen *E2-2 humano*, que contiene el inicio de transcripción de la isoforma E2-2A (a partir de ahora, promotor de *E2-2A*) (secuencia presente en el contig NT-025028.13), partiendo de DNA de células derivadas de carcinoma oral humano, HN19, como molde (Tabla 2). El primer producto generado fue el correspondiente a la construcción A, a partir del cual se obtuvieron los fragmentos B, C, D, E, F, G e I. Todos los fragmentos se clonaron, mediante digestión con las enzimas MluI y XhoI y posterior ligación, en el vector pGL2. Para la generación de la construcción H (con mutación puntual de la caja E6), se partió de la construcción G (-492/+90) y se utilizó un sistema que permite introducir mutaciones puntuales en una molécula de DNA circular (Zheng et al., 2004). Brevemente, este método consiste en la amplificación por PCR de un plásmido molde que porta el inserto en estudio, con cebadores que introducen las mutaciones deseadas, posterior digestión del DNA molde con la enzima DpnI (Roche), que reconoce específicamente DNA metilado, y transformación en bacterias para amplificar el producto obtenido. Los diferentes cebadores diseñados para las distintas construcciones, se detallan en la Tabla 2.

3. Líneas celulares y cultivos celulares

En esta tesis se ha utilizado la línea celular MDCK-II (*Madin-Darby Canine Kidney*) (derivada de epitelio simple de riñón de perro) y las derivadas de ella por transfección estable MDCK-Snail1, clon B1 (pcDNA3-Snail1) (Cano et al., 2000), MDCK-Snail2, clon NC3 (pcDNA3-Snail2) (Bolós et al., 2003) y MDCK-E47, clon B1 (pcDNA3-E47) (Pérez-Moreno et al., 2001), que expresan los factores murinos Snail1, Snail2 o E47, respectivamente, y MDCK-CMV, control que porta el vector pcDNA3 vacío. Además, se han utilizado las siguientes líneas de ratón: NMuMG (línea inmortalizada de epitelio mamario) y líneas de queratinocitos epidérmicos derivados del modelo de carcinogénesis química de piel de ratón: MCA3D (inmortalizados), PDV (transformados con DMBA), HaCa4 (derivada de carcinoma escamoso moderadamente diferenciado) y CarB (derivada de carcinoma indiferenciado de células fusiformes) (Navarro et al., 1991; Cano et al., 2000). Asimismo, se utilizaron diferentes líneas celulares humanas, derivadas de carcinomas: A431 (epidermoide de vulva), Hela (adenocarcinoma de cervix), SiHa y SW756 (escamosos de cervix, grado II y III, respectivamente); de ovario: MDAH2774 (adenocarcinoma, grado II-III), TOV21G y TOV112 (adenocarcinoma, grado III); endometriales: HEC1B (adenocarcinoma, grado II), SKUT1 (carcinosarcoma, grado III) y AN3CA (adenocarcinoma, grado III). Las líneas celulares humanas fueron proporcionadas por la Dra. G. Moreno-Bueno (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"), a excepción de la línea celular A431, cedida por la Dra. A. Fabra (IDIBELL, Barcelona).

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Gibco BRL), exceptuando las células MCA3D y PDV, que se cultivaron en HAM's F12/DMEM (1:1) (Gibco BRL) y HAM's F12,

respectivamente. Todos los medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL), 2 mM de glutamina (Invitrogen), 100 µg/ml de ampicilina, 32 µg/ml de gentamicina (Sigma) y 2,5 µg/ml de fungizona. Todas las líneas celulares se crecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Las células se analizaron regularmente para descartar la presencia de micoplasmas, mediante tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), y PCR. Las micrografías de células en cultivo con contraste de fase se tomaron con una cámara digital JVC acoplada a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 135 TV.

4. **Transfecciones**

Todas las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo Lipofectamine (Invitrogen), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

4.1 **Transfecciones transitorias**

Para los ensayos de actividad promotora, se sembraron $1,5-3 \times 10^4$ células de las líneas celulares MDCK, sus clones derivados, MCA3D o NMuMG por pocillo, en placas de 24 pocillos (Falcon). Al día siguiente, se transfectaron con 200 ng de las construcciones de los promotores de *cadherina-E*, *Snail1*, *Snail2* o *E2-2A*, según se indique en cada apartado de los resultados de esta memoria, y 10 ng del plásmido pCMV-βgal como control de la eficiencia de transfección. En el caso del análisis de la acción de los diferentes factores de manera transitoria, sus respectivos vectores de expresión fueron transfectados en las cantidades indicadas en cada caso (pcDNA3-E2-2A, pcDNA3-E2-2B-HA, pcDNA3-Snail2, pZEO-Snail1, pcDNA3-E47). La cantidad de DNA total transfectado en todos los puntos de un experimento se igualó añadiendo diferentes cantidades de los correspondientes vectores vacíos (pcDNA3, pcDNA3-HA, pZEO). Transcurridas 24-48 h. se determinaron las actividades luciferasa y galactosidasa como se describe en la sección 5.1 de este apartado.

En los casos en los que se indica, la células fueron tratadas con TSA (tricostatina A) (Sigma), la cual se añadió al medio de cultivo disuelta en etanol a una concentración de 100 nM, y se mantuvo durante 7 h. después de la transfección. En estos experimentos, las células control se trataron con el vehículo (etanol), durante el mismo tiempo, 7 h. post-transfección.

4.2 **Transfecciones estables**

Los vectores pcDNA3, pcDNA3-E2-2A, pcDNA3-HA y pcDNA3-E2-2B-HA se transfectaron de forma independiente, en las células MDCK-II. Para ello se sembraron $3,5 \times 10^5$ células en placas de 60 mm (Falcon) y se transfectaron al día siguiente con 3 µg de cada vector. La selección se realizó añadiendo 400 µg/ml de G418 (Calbiochen) 24 h. después, el cual se mantuvo durante un período de 3-4 semanas. Se aislaron en cada caso alrededor de 10 clones individuales resistentes al antibiótico, mediante cilindros de clonaje y posterior amplificación en presencia de antibiótico.

5. Ensayos de actividad promotora

5.1 Determinación de la actividad promotora

La actividad de los promotores de *cadherina-E*, *Snail1*, *Snail2*, *E2A* y *E2-2A* se determinó en ensayos de transfección transitoria (sección 3.1). Transcurridas 24-48 h. desde la transfección, las células se lavaron con tampón fosfato salino PBS 1X y se lisaron durante 15 min. a temperatura ambiente con tampón de lisis pasivo (Promega). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa de los extractos resultantes, se determinaron con el *kit* Luciferase Assay System (Promega), utilizando un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies). La actividad relativa luciferasa/ β -galactosidasa se normalizó para la actividad detectada en las células control transfectadas con el vector vacío. Todos los ensayos se realizaron en muestras por triplicado para cada punto del experimento, realizándose al menos tres experimentos de cada condición analizada.

5.2 Análisis estadístico

Para determinar la presencia o ausencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos, se aplicaron las pruebas de Student y ANOVA, utilizando para ello el programa informático GraphPad Prism versión 4.0.

6. Análisis de RNAm

6.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de las distintas líneas celulares se realizó con Trizol (Gibco, BRL) según las indicaciones del fabricante. La calidad del RNA obtenido se evaluó mediante geles de agarosa/formaldehído.

6.2 RT-PCR

Para la síntesis de cDNA se retrotranscribieron 2 μ g de RNA total con la enzima MLV-RT (Promega), utilizando oligo-dT como cebador, durante 90 min. a 37°C. En la [Tabla 3](#) se indican las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar fragmentos de los RNAm analizados, así como las condiciones empleadas en cada caso. El RNAm que codifica para la enzima *gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa* (*GAPDH*) se amplificó como control de la cantidad de cDNA presente en cada muestra.

Tabla 3: Cebadores y condiciones utilizados en los análisis mediante RT-PCR

Gen (RNAm)	Cebadores	Condiciones ¹	Tamaño	Enzima ²
<i>E2-2A/B</i> murino	Fw: 5' GAGCGTGTCTTCTGGTAGC 3' Rev: 5' CCATGTGATTCGCTGCGTC 3'	- 94°C 1 min - 65°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~500 pb	Gold
<i>E2-2A/B</i> humano	Fw: 5' GAGTGTCTCCTCTGGCAGC 3' Rev: 5' CCATGTGATTCGCTGCGTC 3'	- 94°C 1 min - 60°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~500 pb	HF
<i>E2-2A</i> murino	Dir: 5' CCATGTAAGTGCATACACCATCC 3' Rev: 5' GCTCAAACGTTTCGTGTGGATGCAGG 3'	- 94°C 1 min - 65°C 1 min - 72°C 30 seg	~300 pb	Gold
<i>E2-2A</i> canino	Dir: 5' CCATGTAAGTGCATACACCATCC 3' Rev: 5' GCTCAAACGTTTCGTGTGGATGCAGG 3'	- 94°C 1 min - 60°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~300 pb	Gold
<i>E2-2B</i> murino	Dir: 5' TCAAATGTAGAAGACAGAAGTAGCTCA 3' Rev: 5' TTGCTTGAATACTGATAGTACTGGGAG 3''	- 94°C 1 min - 65°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~300 pb	Gold
<i>E2-2B</i> canino/humano	Dir: 5' TCAAATGTAGAAGACAGAAGTAGCTCA 3' Rev: 5' TTGCTTGAATACTGATAGTACTGGGAG 3''	- 94°C 1 min - 60°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~300 pb	Gold / HF
<i>Cadherina-E</i> canino	Dir: 5'-GGAATCCTTGGAGGGATCCTC-3' Rev: 5'-GTCGTCTCCGCCACCGCCGTACAT-3'	- 94°C 1 min - 65°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~550 pb	Gold
<i>Cadherina-E</i> humano	Dir: 5'-CAAGCTATCCTTGCACCTCAG-3' Rev: 5'-GCATCAGAGAAGTCTTCTTG-3'	- 94°C 1 min - 65°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~560 pb	HF
<i>ZEB-1</i>	Dir: 5' CACCGAAGAGGACCAGAGGCAG 3' Rev: 5' ACACCCAGACTGCGTCACATGTC 3'	- 94°C 1 min - 60°C 1 min - 72°C 2 min	~300 pb	Gold
<i>SPARC</i>	Dir: 5' CCTGCCTGATGAGACAGAGGTGGTAG 3' Rev: 5' AGTGGCAG GAAGAGTCAAAGGTCTTG 3'	- 94°C 1 min - 58°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~300 pb	Gold
<i>PDGF-C</i>	Dir: 5' AAAGTGGAGACACAGAAGAGGGC 3' Rev: 5' TTCCTGGTACAGTACCAGAACCACA 3'	- 94°C 1 min - 56°C 1 min 30 seg - 72°C 1 min 30 seg	~600 pb	HF
<i>GAPDH</i>	Dir: 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' Rev: 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	- 94°C 1 min - 60/65°C 1 min - 72°C 1 min 30 seg	~900 pb	HF/Gold

¹ El número de ciclos es de 30-35 para todas las reacciones, excepto para PDGF-C, que es de 40 ciclos.

² Enzimas empleadas: HF = Taq Expand High Fidelity (Roche); Gold = polimerasa Taq Gold (Perkin Elmer).

7. Anticuerpos

Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria, así como su origen, procedencia y las diluciones utilizadas en cada caso, se describen en la [Tabla 4](#).

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en Western Blot e inmunofluorescencia

Anticuerpo	Dilución IF / WB	Fijación (M/FA)	Huésped / tipo	Procedencia
<u>Anticuerpos primarios</u>				
Anti-cadherina-E (ECCD-2)	1:100/1:200	M	Rata/monoclonal	Dr. M. Takeichi
Anti-β-catenina	1:250/1:500	M	Ratón/monoclonal	BD Transduction labs.
Anti-cadherina-N	1:50/1:500	M	Ratón/monoclonal	Zymed
Anti-Fibronectina	1:1000/1:4000	FA	Conejo/policlonal	Sigma Chemical Co.
Anti-Vimentina	1:200/1:1000	FA	Ratón/monoclonal	DakoCytomation
Anti-SPARC	1:100		Ratón/monoclonal	Novocastra
Anti-Id1	1:200	FA	Conejo/policlonal	Santa Cruz
Anti-α-tubulina	1:10000		Ratón/monoclonal	Sigma Chemical Co.
Anti-HA	1:500	M	Rata/monoclonal	Roche
<u>Anticuerpos secundarios</u>				
Anti- ratón Alexa-488	1:800		Cabra	Molecular Probes
Anti-rata Alexa-488	1:800		Cabra	Molecular Probes
Anti-conejo Alexa-488	1:800		Cabra	Molecular Probes
<u>Conjugados a peroxidasa</u>				
- anti-ratón	1:1000		Oveja	Amersham Biosciences
- anti-conejo	1:4000		Cabra	Pierce
- rata	1:10000		Cabra	Nordic

WB: Western Blot; IF: inmunofluorescencia; M: fijación con metanol; FA: fijación con formaldehído.

8. Análisis de Proteínas

8.1 Inmunotransferencia (Western blot)

Los extractos totales se prepararon lisando las células en tampón de lisis RIPA (SDS 0,1%; deoxicolato sódico 0,5%; NP-40 1%; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa s (PMSF 2mM; leupeptina 2 µg/ml; aprotinina 20 ng/ml; ortovanadato 1 mM). 15-30 µg de los diferentes extractos se resolvieron en geles desnaturizantes PAGE-SDS conteniendo 7,5-15% de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore). Las membranas se incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con solución de bloqueo (BSA 5% ó leche 5%; ó BSA 2,5% y leche 2,5%; en Tampón Tris Salino (TBS) 1X, conteniendo Tween-20 0,1%). Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados de 5 min con

TBS 1X / Tween-20 0,1%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 45 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS 1X / Tween-20 0,1%. Todos los anticuerpos utilizados, así como las diluciones empleadas preparadas en solución de bloqueo al 50% en TBS 1X quedan recogidos en la [Tabla 4](#). El revelado se realizó por luminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de, al menos, dos realizados.

8.2 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células se crecieron sobre cristales de 12 mm de diámetro depositados en placas de 60 mm (Falcon) hasta alcanzar un 80% de confluencia, y se fijaron con metanol a -20°C durante 1 min. Alternativamente, para la tinción de actina-F y algunos anticuerpos determinados ([ver Tabla 4](#)), las células se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% (Sigma Aldrich), en PBS 1X durante 15 min. Los cristales se incubaron con los anticuerpos diluidos en PBS 1X durante 1 h. a 37°C en atmósfera húmeda. Tras la incubación con el anticuerpo primario, los cristales se lavaron con PBS 1X tres veces durante 10 min. a temperatura ambiente y en agitación suave. La incubación con los anticuerpos secundarios diluidos en PBS 1X se realizó durante 45 min. a 37°C en atmósfera húmeda. Tras la incubación del anticuerpo secundario, los cristales se lavaron con PBS 1X / Triton X-100 0,1% cuatro veces durante 5 min. a temperatura ambiente y en agitación suave. Todos los anticuerpos utilizados, así como las diluciones empleadas quedan recogidos en la [Tabla 4](#). Para la visualización del citoesqueleto de actina-F, los cristales fueron incubados con faloidina conjugada con el fluorocromo Alexa 594 (Molecular Probes) a una dilución 1:100 en PBS 1X durante 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con PBS 1X / Triton X-100 0,1% cuatro veces durante 5 min. a temperatura ambiente y en agitación. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 1 µg/ml (Sigma) durante 5 min. a temperatura ambiente. Las preparaciones se montaron en mowiol (Sigma) y se visualizaron usando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital Olympus DP70. Para el análisis mediante microscopía confocal se utilizó un microscopio Leica TCS-SP2 y las imágenes se procesaron con el programa Leica Confocal Software 2.0 y LCS Lite.

9. Ensayos de motilidad celular

La motilidad de diferentes clones de los diferentes tipos celulares de MDCK-E2-2A, MDCK-E2-2B y de sus respectivos controles, se analizó en ensayos de “reparación de herida en placa”. Este procedimiento consiste en abrir mecánicamente una brecha en una monocapa de células crecidas a confluencia y observar la capacidad de las células que permanecen en sus bordes, de migrar ocupando la zona carente de células. Para ello, con la punta de una pipeta Gilson, se practicó una incisión en la

monocapa de los distintos cultivos crecidos a confluencia y las células desprendidas se eliminaron por lavado. Los cultivos se observaron a los intervalos de tiempo indicados y se realizaron micrografías con una cámara digital Nikon DS-L1 acoplada a un microscopio invertido Nikon TS-100.

10. Estudios de invasión

10.1 Ensayos de invasión en *transwells*

Se utilizaron cámaras de Boyden modificadas, *transwells* (Costar), con filtros de 8 μm de tamaño de poro sobre los cuales se depositó colágeno tipo IV de rata (Becton Dickinson), según se describió previamente (Cano et al., 2000). Se sembraron 4×10^5 células de cada tipo sobre la capa de colágeno en la cámara superior, la cual se depositó sobre las cámaras inferiores, que contenían medio condicionado de fibroblastos NIH3T3, como quimiotrayente. Al cabo de 16 h. se contó la cantidad de células presentes en la cara inferior del filtro y en la parte inferior de las cámaras de cultivo.

10.2 Cultivos organotípicos

Los ensayos de invasión en cultivos organotípicos tridimensionales de geles de colágeno tipo I, se llevaron a cabo según se describió previamente (Peinado et al., 2004c). Brevemente, se sembraron 1×10^6 células sobre un gel de colágeno tipo I, depositado sobre filtros de policarbonato (tamaño de poro 3.0 mm, BD Biosciences). Los cultivos se crecieron en medio DMEM / 10% suero fetal bovino, durante dos semanas. El medio se cambió cada 3 días. Al finalizar el período de cultivo, y tras su separación de las cámaras, los geles se embebieron inmediatamente en Tissue Tek OCT Compound (Medim) y se congelaron a -70°C . Posteriormente, se obtuvieron secciones de 8 μm de espesor mediante corte con criostato para su análisis por inmunofluorescencia.

11. Ensayos de proliferación

La proliferación celular se determinó por incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), con el kit comercial Cell proliferation BrdU ELISA (Roche). Se sembraron $2,5 \times 10^3$ células por pocillo (por triplicado) en una placa de 96 pocillos (Falcon). Al día siguiente, el medio se cambió por medio normal o por medio sin suero, que se mantuvo durante 4 h. Posteriormente, se incubó con anticuerpo anti BrdU durante 1 h., siguiendo las instrucciones del fabricante.

12. Ensayos de tumorigenicidad

La capacidad tumorigénica de las líneas celulares MDCK-E2-2A (clones 1 y 8), MDCK-E2-2B (clones 1 y 2) y sus respectivos controles se analizó mediante inyección subcutánea en ratones inmunodeprimidos nu/nu (Harlan). Se inyectaron 1×10^6 células en 100 μ l de PBS 1X, por sitio de inyección, realizándose una inyección en cada uno de los flancos de cada ratón, en un total de 4 ratones por tipo celular. Los ratones se inspeccionaron 2 veces/semana, midiendo el tamaño de los tumores con un calibre. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1-1,5 cm de diámetro exterior, o tras tres meses después de la inyección, los ratones fueron sacrificados. Los tumores se extirparon y se embecieron en OCT para su posterior análisis por inmunofluorescencia. Estos estudios se realizaron siguiendo las directrices del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (*Institutional Animal Care and Use Committee*, IACUC).

13. Hibridación *in situ* de embriones de ratón

Los estudios de hibridación *in situ* de embriones enteros y secciones de vibrátomo, se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. M. Angela Nieto (Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH-CSIC), como se describe en Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001. Para la detección de los productos del gen *E2-2* de ratón, se utilizó una sonda que corresponde a un fragmento de aproximadamente 1.1 Kb de la secuencia del cDNA de *E2-2B* (de 1610 a 2712 nt) que reconoce tanto al transcrito de *E2-2B* como de *E2-2A*. Para la detección de los productos del gen *E2A*, se utilizó una sonda correspondiente a la secuencia completa del cDNA de *E47* de ratón, como se describió anteriormente (Perez-Moreno et al., 2001). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Leica DMR con óptica Normarski.

14. Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de células MDCK-E2-2 y MDCK-E47

El análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de células MDCK-E2-2 y MDCK-E47 frente a la línea control MDCK-CMV, se llevó a cabo mediante la tecnología de *microarrays* de cDNA, en colaboración con la Dra. G. Moreno-Bueno (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols").

14.1 Microarrays de cDNA (OncoChip CNIO)

Se utilizó la plataforma Oncochip CNIO v1.1c, que contiene 11.768 clones, impresos por duplicado, que representan aproximadamente 9.300 genes humanos y ESTs. Los genes incluidos fueron previamente seleccionados por su posible implicación en carcinogénesis y/o diferenciación tisular y

corresponden a una variedad de funciones biológicas (proliferación, diferenciación, señalización, etc) (Moreno-Bueno et al., 2003). La preparación de las muestras y su análisis se llevó a cabo como se describió previamente (Moreno-Bueno et al., 2003; Moreno-Bueno et al., 2006). A continuación se indican los diferentes pasos llevados a cabo.

14.2 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total, de células crecidas a un 70% de confluencia, se realizó con Trizol (Gibco, BRL) y a continuación se procedió a su purificación utilizando Rneasy Kit (Quiagen) según las indicaciones del fabricante. La calidad del RNA obtenido se evaluó mediante geles de agarosa/formaldehído, y su cuantificación se realizó espectrofotométricamente, utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc).

14.3 Amplificación lineal del RNAm

Obtención del cDNA de doble cadena. Se realizó una amplificación lineal del RNAm mediante transcripción *in vitro*, con el que se obtiene un RNA amplificado (RNAa). Para ello, a partir de 3 µg RNA total, se realizó una reacción de retrotranscripción para obtener un cDNA de cadena sencilla, utilizando el kit Superscript II (Invitrogen) y un oligo-dT que contiene la secuencia del promotor del fago T7 (Ambion). Posteriormente, se realizó la síntesis de la segunda cadena del cDNA, utilizando DNA polimerasa I, DNA ligasa de *E. coli*, RNasa H y dNTPs.

Tras su síntesis, el cDNA de doble cadena se purificó mediante extracción con fenol:cloroformo (Roti Ambion), se precipitó y resuspendió en agua libre de RNAsas. Utilizando el cDNA como sustrato, se generó RNAm mediante una reacción de transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa del fago T7, como se describe a continuación.

Amplificación del RNAm. La reacción de amplificación de RNA se llevó a cabo a partir del cDNA obtenido, en presencia de RNA polimerasa de T7 (Kit Megascript T7, AMBION). Tras la degradación con DNasa I del cDNA restante, el nuevo RNAm generado (RNA amplificado o “RNAa”) se purificó mediante extracción con Trizol y cloroformo. Tras su precipitación, lavado y posterior centrifugación, el sedimento (el RNAa) se resuspendió en agua libre de RNAsas. La concentración del RNAa se midió con el espectrofotómetro NanoDrop.

14.4 Marcaje fluorescente del RNAm amplificado

Partiendo de 3 µg de RNAa de cada tipo celular, se llevó a cabo la síntesis de cDNA marcado fluorescentemente, mediante una reacción de retrotranscripción, usando la enzima SuperScript II (Life Technologies, Inc.) y los nucleótidos dUTP-Cy3 ó dUTP-Cy5 (Amersham). Los cDNA marcados se

purificaron mediante el *CyScribe GFX Purification Kit* (Amersham) y fueron precipitados en etanol a -70°C.

14.5 Hibridación

Una mezcla conteniendo la misma cantidad de las dos muestras, problema (MDCK-E2-2 ó MDCK-E47) y control (MDCK-CMV) marcadas fluorescentemente, se hibridó sobre los portas que contienen los *microarrays*, siguiendo el protocolo descrito previamente (Moreno-Bueno et al., 2003). Se realizaron dos extracciones distintas de RNA de cada tipo celular, y para evitar resultados erróneos por diferencias en la incorporación de cada fluoróforo, de cada extracción de RNA se realizaron dos marcajes, uno con dUTP-Cy5 y otro con dUTP-Cy3, por lo que se realizaron 4 hibridaciones por línea celular analizada.

La detección de la señal fluorescente de los *microarrays* se realizó usando un escáner confocal con láser Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics). Los resultados de fluorescencia se almacenaron como imágenes de 10 µm de resolución (TIFF de 16 bits) para cada uno de los canales de emisión.

14.6 Cuantificación de la señal, normalización y pre-procesamiento de datos

La cuantificación de la intensidad de la señal fluorescente en ambos canales se realizó mediante el programa GenePix Pro 6.0 (Axon). Mediante este programa también se eliminaron los puntos cuya mediana de intensidad de fluorescencia era menor que la intensidad del “ruido de fondo” del *microarray*, así como aquellos puntos cuyo diámetro no superaba los 25 µm. La fluorescencia relativa en cada uno de los canales (relación Cy5/Cy3) detectados en cada uno de los puntos (clones) del *microarray* se obtuvo para calcular los niveles de expresión relativa en cada uno de los genes hibridados. Si un gen está sobreexpresado en la muestra marcada con Cy5 aparecerá como un punto rojo, si está disminuido, aparecerá en color verde, y si presenta un valor de expresión similar al de la muestra-Cy3, tendrá un color amarillo.

Los datos obtenidos de cada experimento se exportaron a tablas de MS Excel. Posteriormente se llevó a cabo una normalización de los niveles de expresión relativa a lo largo del *microarray*, utilizando el programa DN MAD (*Diagnosis and Normalization for Microarray Data*; www.bioinfo/DNMAD/cnio.es). A continuación, para la identificación de genes con expresión diferencial, los datos fueron pre-procesados mediante “preP” (<http://prep.bioinfo.cnio.es>) para filtrar aquellos genes de expresión inconsistente entre los replicados, o que tienen valores válidos en menos de la mitad de los experimentos. De los genes válidos, se extrajeron finalmente sólo aquellos cuya expresión difería al menos dos veces con respecto a la muestra de referencia.

14.7 Anál isis estadístico

Para visualizar los perfiles de expresión génica se utilizó un método de agrupamiento (*clustering*) jerárquico, no supervisado, que permite estructurar los diferentes genes y experimentos en función de su similitud, atendiendo a los niveles de expresión génica. El agrupamiento de las muestras se visualizó usando los programas SOTAarray y TreeView (<http://bioinfo.cnio.es/cgi-bin/tools/clustering/sotarray>), asumiendo distancias euclidianas entre los genes. Los genes con cambios estadísticamente significativos en la expresión entre las diferentes condiciones experimentales se identificaron mediante el programa POMELO (<http://pomelo.bioinfo.cnio.es/>). Con este método, se pone a prueba la hipótesis nula de igualdad de medias entre los diferentes grupos, mediante un método estadístico de Test-t, y se computan los valores p usando un test con permutaciones. Para seleccionar genes diferencialmente expresados, se ajustó para múltiples test usando el método de “La tasa de falsos descubrimientos” (*False Discovery Rate*, FDR). Se consideraron genes diferencialmente expresados aquellos con un valor $FDR < 0,1$.

Resultados

1. Caracterización de los factores E2-2 como represores de cadherina-E y su papel en la transición epitelio-mesénquima

Estudios previos de nuestro laboratorio, basados en la técnica de *microarrays* de cDNA, revelaron el aumento en la expresión de *E2-2* en las líneas celulares derivadas de MDCK que expresan establemente los represores de cadherina-E e inductores de TEM Snail1, Snail2 ó E47, con respecto a las células control, lo cual sugería que *E2-2* podría ser una diana de estos factores. Por otra parte, estudios de híbrido sencillo que utilizaban como cebo al elemento E-pal, identificaron varios clones (10% del total) que codificaban para los factores E2-2A y E2-2B, con capacidad de interacción con dicho elemento del promotor de *cadherina-E* (Cano et al., 2000; Pérez-Moreno et al., 2001). Si bien se sabe que los factores E2-2 pueden actuar como represores transcripcionales y hay estudios que los relacionan con el proceso tumoral, se desconoce su función biológica específica y si podrían jugar algún papel concreto en dicho proceso. Es por ello, que nos planteamos como primer objetivo de esta Tesis, estudiar la función de los factores E2-2 en la regulación de la expresión de *cadherina-E* y la TEM.

1.1 Análisis de la expresión de E2-2A/B en líneas celulares

Primero, nos planteamos validar el resultado del análisis por *microarrays* mediante RT-PCR. Como se muestra en la [Figura 7A](#), los niveles de RNAm tanto de la isoforma E2-2A, como de la E2-2B, se encuentran incrementados en las células MDCK-Snail1, MDCK-Snail2 y MDCK-E47 con respecto a las células control MDCK-CMV, donde los niveles son prácticamente indetectables. Estos resultados sugieren que *E2-2* es, efectivamente, una diana directa o indirecta de los factores Snail1, Snail2 y E47.

También se analizó la expresión de E2-2A/B en líneas celulares derivadas de queratinocitos, que representan diferentes estadios de la carcinogénesis de piel de ratón (Navarro et al., 1991; Cano et al., 2000). La [Figura 7B](#) muestra que los niveles del RNAm de E2-2B se encuentran incrementados en las líneas celulares HaCa4 y CarB, invasivas y que no expresan *cadherina-E*, en relación a los niveles detectados en las células MCA3D y PDV, no invasivas y con expresión de *cadherina-E*. En cuanto a E2-2A, esta isoforma se detectó sólo en la línea CarB. Es interesante destacar, que las líneas HaCa4 y CarB expresan niveles endógenos elevados de los factores Snail1, Snail2 y E47 (Cano et al., 2000; Pérez-Moreno et al., 2001), lo cual apoya la relación entre E2-2 y los otros represores de cadherina-E.

El análisis se extendió a líneas celulares humanas derivadas de diferentes tipos de carcinomas. Como se ve en la [Figura 7C](#), la expresión de E2-2B se encuentra aumentada en las líneas derivadas de carcinomas escamosos de cervix SiHa y SW576 (con baja o nula expresión de *cadherina-E*), en comparación con las líneas A431 (carcinoma epidermoide de vulva) y Hela (adenocarcinoma de cervix), que expresan niveles altos de *cadherina-E*. También se analizaron los niveles de expresión de *E2-2* en células derivadas de otros tipos de carcinomas. En el caso de las líneas de mama analizadas, no se observó correlación entre la expresión de *E2-2* y la ausencia de cadherina-E /fenotipo invasivo (datos no

mostrados). En el caso de líneas celulares de ovario y endometrio, *E2-2* se expresa en algunas líneas indiferenciadas y carentes de cadherina-E, como TOV112 y AN3CA (Tabla 5).

Estas observaciones sugieren que los factores *E2-2*, en particular *E2-2B*, podrían actuar como represores adicionales de cadherina-E, al menos en ciertos tipos de carcinomas, lo que estaría de acuerdo con los resultados del híbrido sencillo.

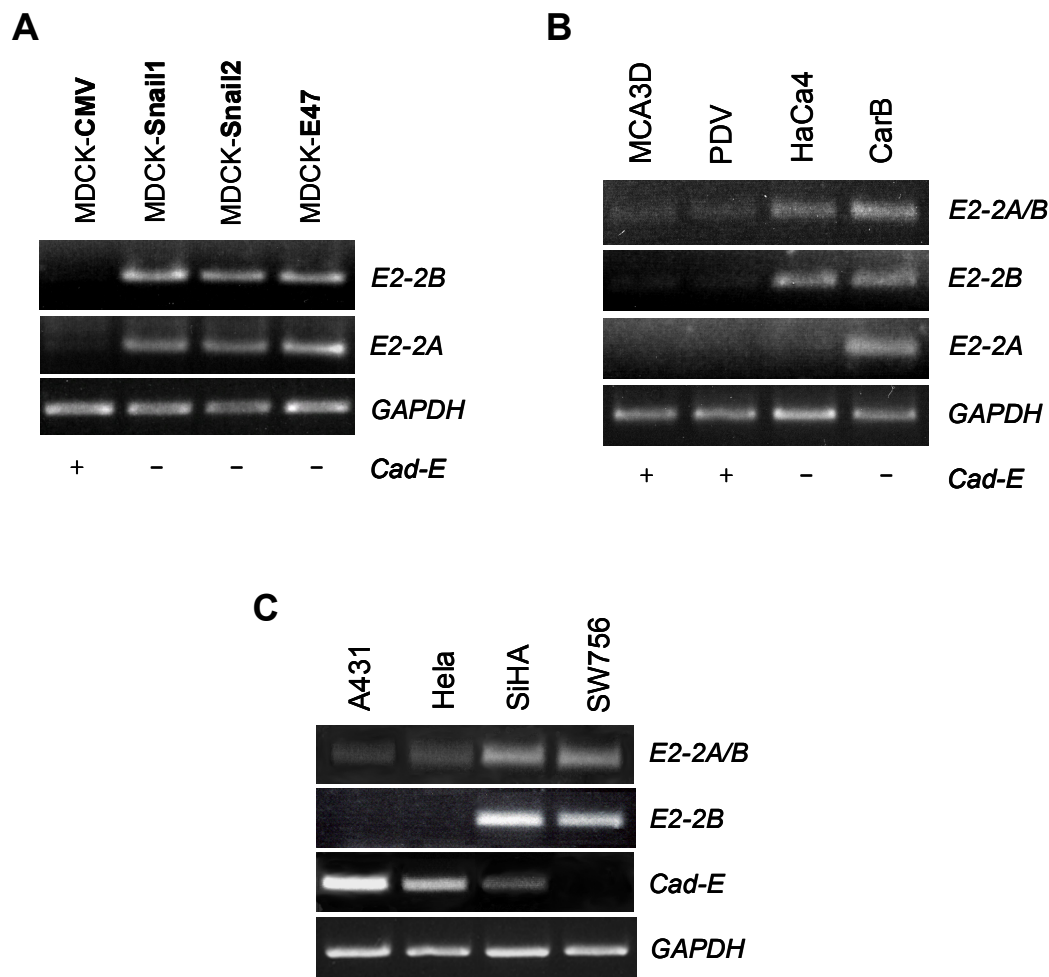


Figura 7. Expresión de *E2-2* en líneas celulares derivadas de MDCK, del modelo de carcinogénesis de piel de ratón y de carcinomas escamosos humanos. **A.** La expresión de RNAm de *E2-2A* y/o *E2-2B* se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa. **A.** Células MDCK que expresan establemente los factores Snail1, Snail2 o E47, según se indica. MDCK-CMV: células control transfectadas con pcDNA3 vacío, **B.** Líneas celulares derivadas de modelo de carcinogénesis de piel de ratón. MCA3D y PDV: epiteliales, HaCa4: epitelioideas, CarB: fibroblásticas, **C.** Líneas celulares humanas derivadas de carcinoma epidermoide de vulva (A431), adenocarcinoma de cérvix (HeLa) y carcinomas escamosos de cérvix (SiHA and SW756). La expresión de *cadherina-E* (*cad-E*) se analizó mediante RT-PCR en (**C**), y la expresión endógena de *cadherina-E* a nivel de RNAm está indicada con signos +/-, como se reportó anteriormente (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001; Moreno-Bueno et al., 2006) en (**A**) y (**B**). Los niveles de *GAPDH* se analizaron en todos los casos como control de la cantidad de cDNA presente en cada muestra.

Tabla 5. Niveles de expresión de E2-2 por RT-PCR en líneas celulares humanas derivadas de carcinomas de ovario y endometrio

Línea celular	Origen / fenotipo	Expresión de E2-2 ¹	Expresión de cadherina-E ¹
MDAH2774	adenocarcinoma de ovario / epitelioide	-	++
TOV21G	adenocarcinoma de ovario / epitelioide	-	-
TOV112	adenocarcinoma de ovario / epitelioide	++	-
HEC1B	adenocarcinoma de endometrio / epitelial	-	-
SKUT1	carcinosarcoma de endometrio / epitelioide	-	-
AN3CA	adenocarcinoma de endometrio / epitelioide	++	-

¹ Se indica la expresión de RNAm de E2-2A/B y de cadherina-E, detectado por RT-PCR..

1.2 Análisis de la acción de E2-2A/B sobre el promotor proximal de cadherina-E

Con el propósito de verificar la implicación de los factores E2-2 como represores transcripcionales de cadherina-E, decidimos clonar los cDNAs murinos de E2-2A y E2-2B en vectores de expresión y probar su acción sobre el promotor proximal del gen de *cadherina-E* de ratón en células epiteliales. Como se muestra en la [Figura 8](#), los ensayos de transfección transitoria indicaron que E2-2B reprime la actividad del promotor de cadherina-E hasta un 70% en todas las líneas celulares analizadas, MDCK ([Figura 8A](#)), MCA3D ([Figura 8B](#)) y NMuMG ([Figura 8C](#)), de manera dependiente de la dosis. Se obtuvieron resultados similares para la isoforma E2-2A en células MDCK ([Figura 9A](#)). Sin embargo, E2-2A fue inactiva (tras 24 h. post-transfección) en las otras líneas celulares analizadas ([Figura 9B](#)), si bien, mostró represión parcial en células MCA3D a tiempos más largos (datos no mostrados).

1.3 Efecto de la expresión estable de E2-2A y E2-2B en células MDCK

A continuación, analizamos el efecto de la expresión exógena de E2-2A y E2-2B sobre la expresión de cadherina-E y la plasticidad celular, transfectándolos establemente en la línea celular MDCK. Se aislaron varios clones independientes. Los resultados aquí mostrados corresponden a tres clones representativos de cada transfección.

La primera observación fue la drástica conversión a un fenotipo fibroblástico/ mesenquimático de las células MDCK transfectadas con E2-2A o E2-2B (a las que llamaremos de aquí en adelante MDCK-E2-2A y MDCK-E2-2B, respectivamente), en comparación con aquellas transfectadas con los vectores control (MDCK-CMV) ([Figuras 10A y 11A, paneles a,b](#)).

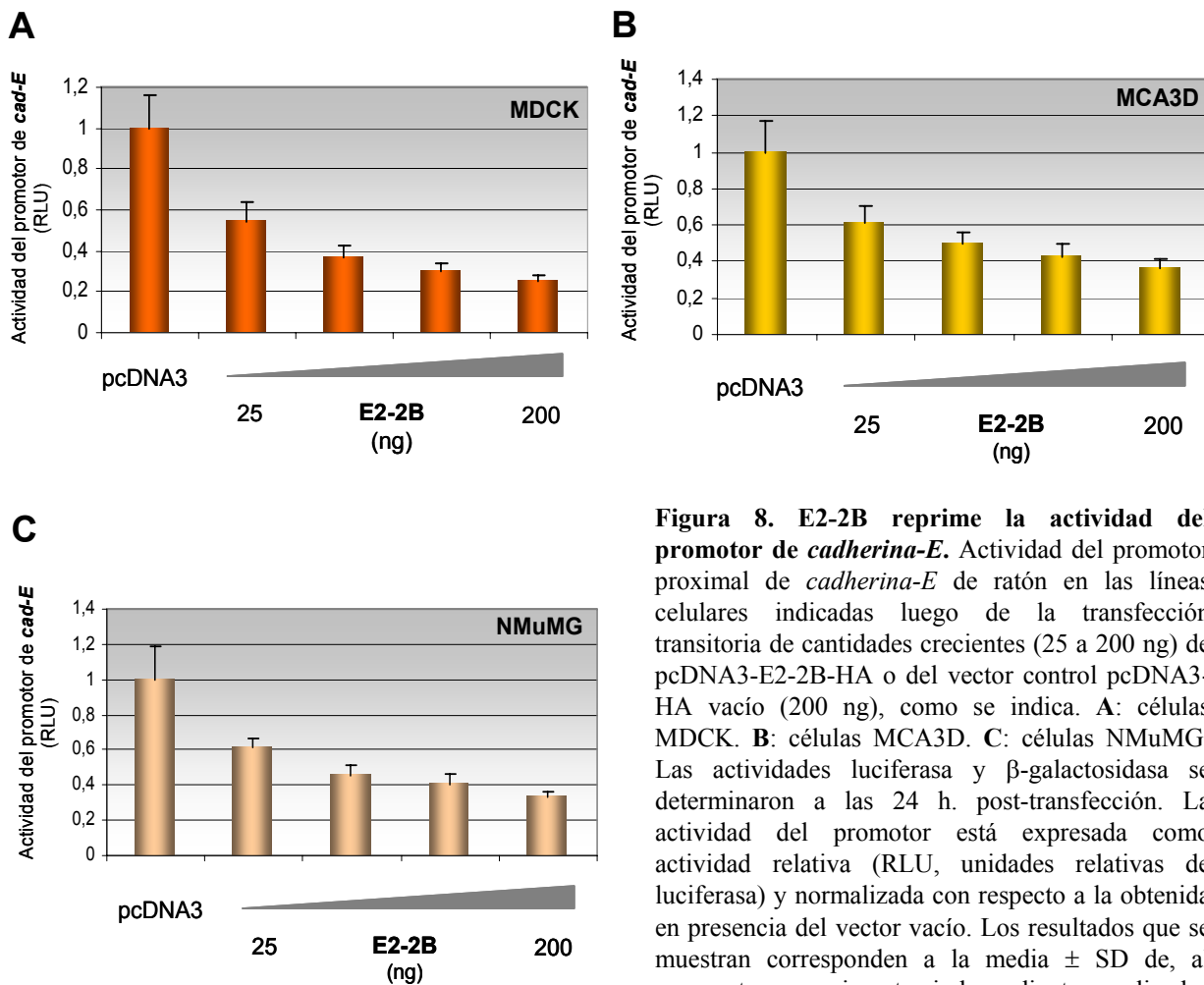


Figura 8. E2-2B reprime la actividad del promotor de *cadherina-E*. Actividad del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón en las líneas celulares indicadas luego de la transfección transitoria de cantidades crecientes (25 a 200 ng) de pcDNA3-E2-2B-HA o del vector control pcDNA3-HA vacío (200 ng), como se indica. **A:** células MDCK. **B:** células MCA3D. **C:** células NMuMG. Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 24 h. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida en presencia del vector vacío. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes, realizados en muestras por triplicado para cada una de las condiciones experimentales.

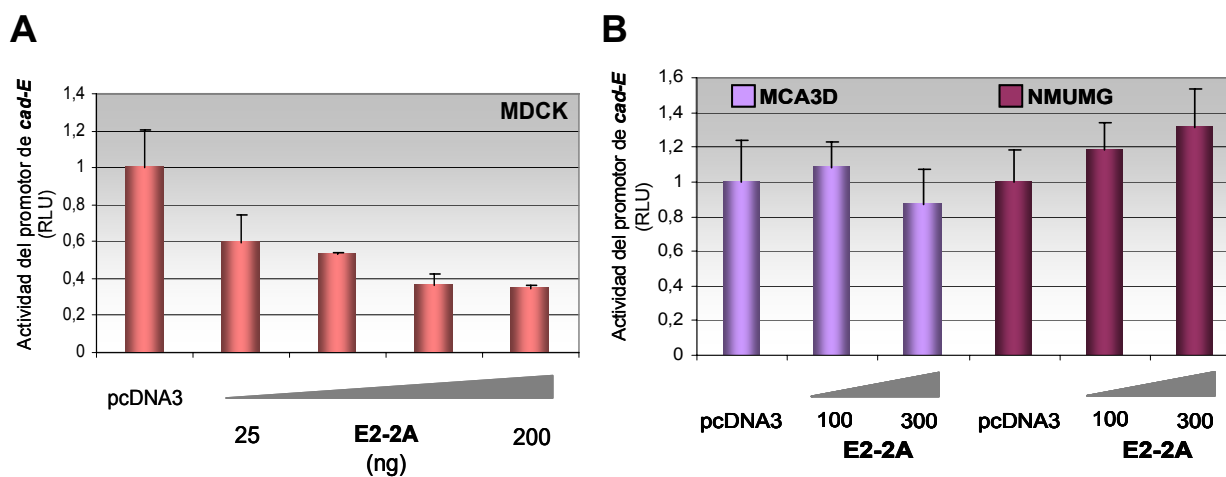


Figura 9. E2-2A reprime la actividad del promotor de *cadherina-E* en células MDCK. Actividad del promotor proximal de *cadherina-E* de ratón en las líneas celulares indicadas luego de la transfección transitoria de cantidades crecientes (25 a 200 ng) de pcDNA3-E2-2A o del vector control pcDNA3 vacío (200 ng), como se indica. **A:** MDCK, **B:** MCA3D (morado), NMuMG (granate). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 24 h. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida en presencia del vector vacío. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes, realizados en muestras por triplicado, para cada una de las condiciones experimentales.

Para caracterizar molecularmente el cambio fenotípico observado en los clones que sobreexpresan E2-2A o E2-2B, analizamos la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimáticos mediante inmunofluorescencia y Western blot. Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron una

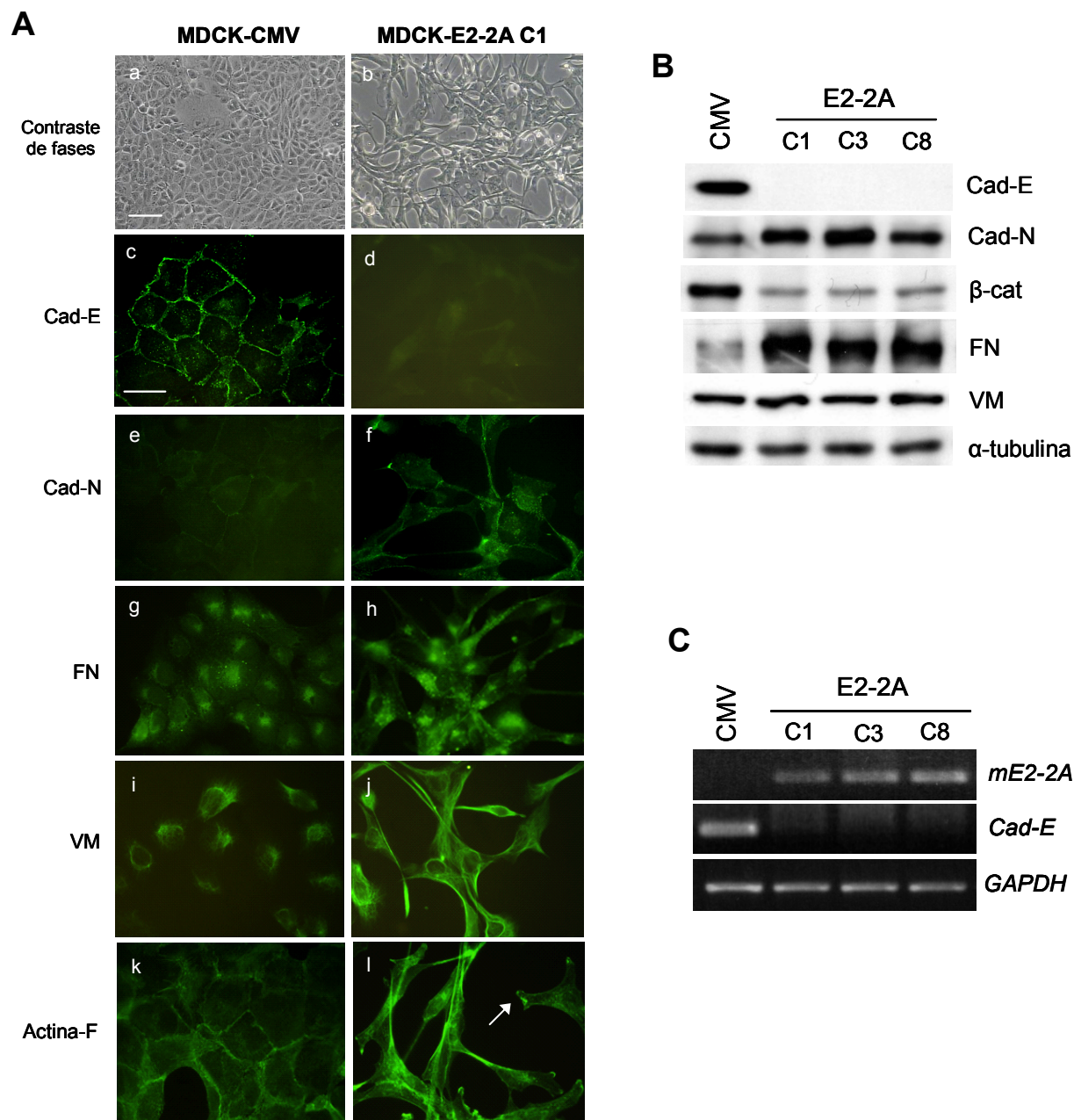


Figura 10. E2-2A induce una TEM completa cuando se sobreexpresa en células MDCK. **A.** Caracterización morfológica e inmunofenotípica de las células MDCK-E2-2A (clon C1), (a-b). Imágenes de contraste de fases de células control MDCK-CMV (a) y un clon representativo de MDCK-E2-2A, C1 (b). (c-l) Imágenes de inmunofluorescencia de marcadores de TEM, en células MDCK-CMV (c, e, g, i, k) y MDCK-E2-2A, C1 (d, f, h, j, l): c, d, cadherina-E (Cad-E); e, f, cadherina-N (Cad-N); g, h, fibronectina (FN); i, j, vimentina (VM); k, l, detección de la organización del citoesqueleto de actina-F; se indica con una flecha un lamelipodio. Barra, 100 μ m (a, b), y 50 μ m (resto de paneles). Resultados similares se obtuvieron para los otros clones. **B.** Análisis mediante Western blot de los marcadores epiteliales y mesenquimáticos que se indican en células MDCK-CMV y tres clones independientes de MDCK-E2-2A (C1, C3 y C8). Los niveles de α -tubulina se muestran como control de carga. **C.** Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los transcritos exógenos de *E2-2A* (panel superior) y endógenos, de *cadherina-E* (*Cad-E*) (panel central) en las líneas indicadas. *GAPDH*: control de la cantidad de cDNA presente en cada muestra.

reducción drástica de cadherina-E, una disminución de β -catenina, un aumento y reorganización de los marcadores mesenquimáticos vimentina y fibronectina, así como también un incremento en la expresión de cadherina-N (Figuras 10A y 11A, paneles c-j; y datos no mostrados).

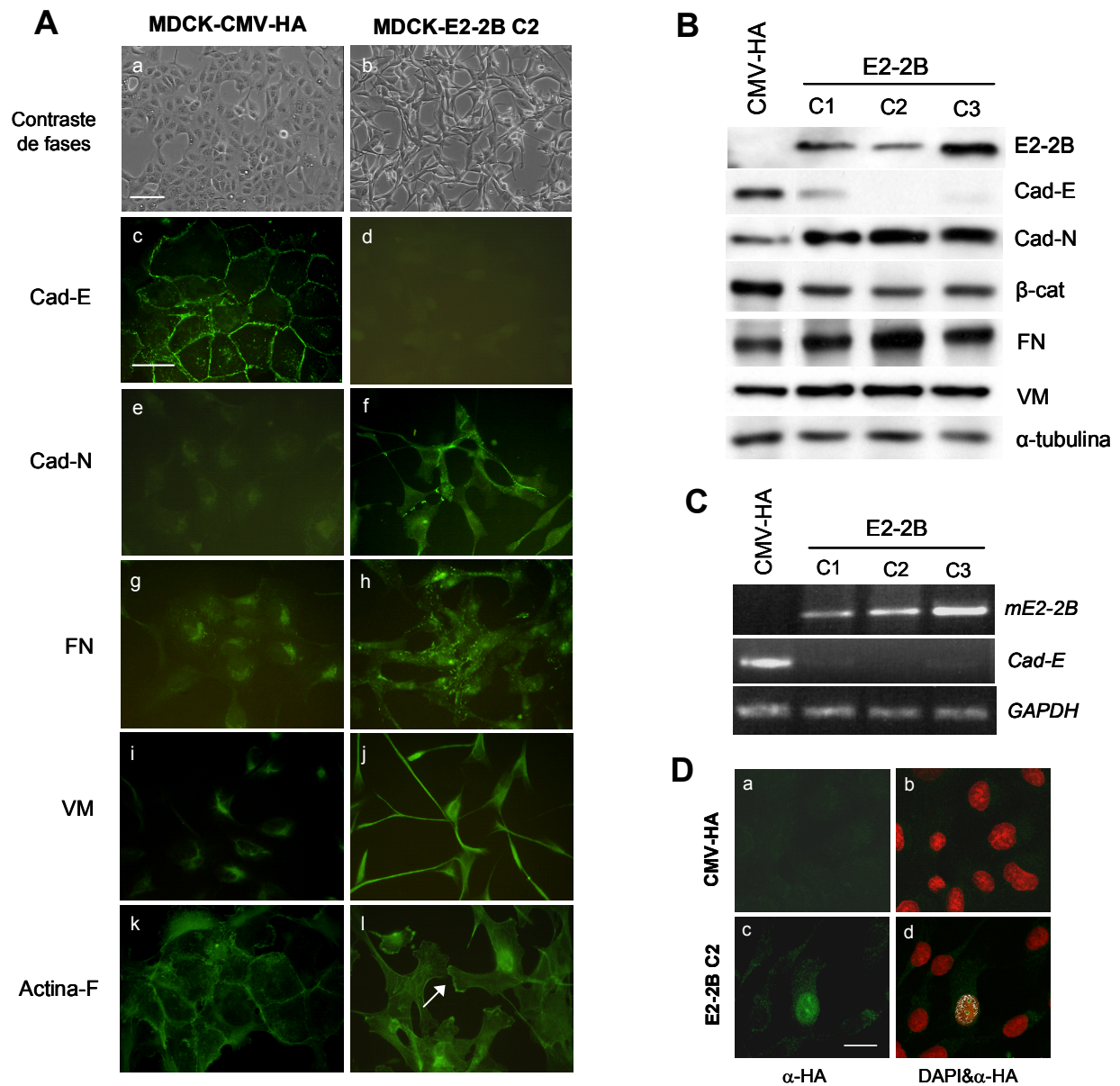


Figura 11. E2-2B induce una TEM completa cuando se sobreexpresa en células MDCK. **A.** Caracterización morfológica e inmunofenotípica de las células MDCK-E2-2B, clon C2. **(a-b)** Imágenes de contraste de fases de células MDCK-CMV-HA **(a)** y un clon representativo de MDCK-E2-2B, C2 **(b)**. **(c-l)** Imágenes de inmunofluorescencia de marcadores de TEM, en células MDCK-CMV-HA **(c, e, g, i, k)** y MDCK-E2-2B, C2 **(d, f, h, j, l)**. **c, d**, cadherina-E (Cad-E); **e, f**, cadherina-N (Cad-N); **g, h**, fibronectina (FN); **i, j**, vimentina (VM); **k, l**, actina-F; la flecha blanca indica un lamelipodio. Barra, 100 μ m **(a, b)**, y 50 μ m (resto de paneles). Resultados similares se obtuvieron para los otros clones. **B.** Análisis por Western blot de los niveles de expresión de E2-2B exógeno (detectado con anti-HA) y los marcadores epiteliales y mesenquimáticos que se indican en células MDCK-CMV-HA y tres clones independientes de MDCK-E2-2B (C1, C2 and C3). Los niveles de α -tubulina se muestran como control de carga. **C.** Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los transcritos exógenos de *E2-2B* (panel superior) y endógenos de *cadherina-E* (*Cad-E*) (panel central) en las líneas indicadas. *GAPDH*, control de la cantidad de cDNA presente en cada muestra. **D.** Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización nuclear de la proteína E2-2B-HA. **a, b**: células control MDCK-CMV-HA; **c, d**: MDCK-E2-2B, C2. **a, c**: tinción con anticuerpo anti-HA (α -HA, verde); **b, d**: imágenes de colocalización que muestran la tinción nuclear con DAPI (rojo) y α -HA (blanco-amarillo). Barra, 18 μ m.

Más aun, en concordancia con el fenotipo fibroblástico de los clones que sobreexpresan E2-2A/B, el citoesqueleto de actina-F se organiza en fibras de estrés y estructuras móviles similares a lamelipodios, en contraste con las células control, en las que se organiza en filamentos corticales (Figura 10A y 11A, paneles k-l). El análisis por Western blot reveló que los cambios observados en los diferentes marcadores epiteliales y mesenquimáticos mediante inmunofluorescencia, correlacionan con los niveles de proteína detectados en los extractos proteicos totales de MDCK-E2-2A/B con respecto a las células control, con la excepción de vimentina, para la cual no se observaron diferencias sustanciales (Figuras 10B y 11B). La expresión exógena de los factores E2-2A y E2-2B se comprobó en los diferentes clones mediante RT-PCR (Figuras 10C y 11C). La expresión de la proteína E2-2B exógena se pudo visualizar en los diferentes clones mediante tinción con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA, en Western blots (Figura 11B, panel superior) y por microscopía confocal, que mostró la localización nuclear de E2-2B (Figura 11D). Con respecto a la cadherina-E, su regulación negativa también se confirmó a nivel de RNAm, siendo prácticamente indetectable, mediante RT-PCR, en todos los clones de E2-2A/B analizados (Figuras 10C y 11C).

Estos resultados indican claramente que los factores E2-2 inducen una TEM completa, con pérdida de la morfología epitelial y de marcadores epiteliales distintivos, y asociado a la ganancia/reorganización de marcadores mesenquimáticos.

1.4 Caracterización de la represión mediada por E2-2A/B sobre el promotor de *cadherina-E*

Para determinar si la marcada disminución de cadherina-E detectada en los clones de MDCK que sobreexpresan E2-2A/B se debía a represión transcripcional, como sugerían los ensayos de transfección transitoria (Figuras 8 y 9) y los resultados del híbrido sencillo, determinamos la actividad del promotor de *cadherina-E* en los clones estables derivados de MDCK-E2-2A/B. Como cabía esperar, el promotor proximal de *cadherina-E* está reprimido en un 70-90% en los clones que expresan los factores E2-2A/B, en comparación a las células control. Es importante destacar, que la delección del elemento E-pal del promotor resultó en una desrepresión de la actividad promotora en las células MDCK-E2-2A/B, alcanzándose en estas células una actividad similar a la de las células control MDCK-CMV para el promotor delecionado (Figura 12A).

Estos resultados, junto con los datos del ensayo de híbrido sencillo, en el que la interacción de E2-2 es eliminada si se mutan los dos nucleótidos centrales del elemento E-pal (Figura 12B), apoyan la participación de las cajas E del elemento E-pal en la represión de *cadherina-E* mediada por los factores E2-2A/B.

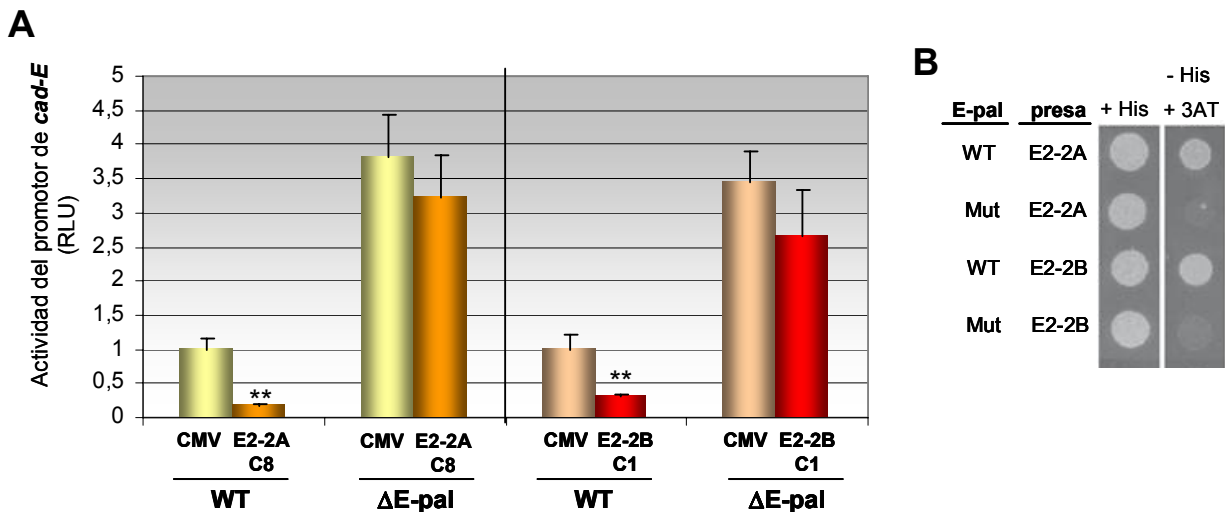


Figura 12. E2-2A y E2-2B regulan negativamente el promotor de *cadherina-E* requiriendo la integridad de elemento Epal. **A.** Análisis de la actividad del promotor de *cadherina-E* en un clon representativo de MDCK-E2-2A (C8) y células control MDCK-CMV (paneles de la izquierda), y un clon representativo de MDCK-E2-2B (C1) y en células control MDCK-CMV-HA (paneles de la derecha). En ambos casos, se comparó la actividad del promotor de *cadherina-E* silvestre (WT) con la de aquél en el cual el elemento Epal está delecionado (Δ E-pal). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 24 h. post-transfección. La actividad está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a las células control, en cada caso. Los resultados corresponden a la media \pm SD de dos experimentos independientes, realizados en muestras por triplicado. ****** $p < 0.01$ (prueba *t* de Student). **B.** Ensayo de híbrido sencillo. Imagen que muestra colonias representativas de clones conteniendo cDNAs de los factores E2-2A y E2-2B por su capacidad de crecer en medio con histidina (+His) (izquierda), o en su ausencia y en presencia de 3-aminotriazol (-His/+3AT) (derecha), en la cepa de levaduras conteniendo el plásmido testigo dirigido por el elemento E-pal silvestre (WT) o el elemento E-pal mutado (Mut). Un 10 % del total de clones con crecimiento en medio (-His/+3AT) exclusivamente en la cepa WT contenía cDNAs codificantes para los factores E2-2A y E2-2B.

Estudios previos han revelado que las proteínas E pueden unirse a complejos co-represores que contienen actividades deacetilasas de histonas (HDAC), lo cual resulta en represión transcripcional (Zhang et al., 2004; Murayama et al., 2004). Asimismo, otros represores de *cadherina-E*, como los factores Snail1/2, pueden reclutar complejos proteicos que contienen actividad HDAC (Hemavathy et al., 2000; Peinado et al., 2004b). Por lo tanto, con el objeto de determinar si la actividad HDAC es requerida por los factores E2-2 para reprimir la transcripción de *cadherina-E*, analizamos el efecto de tricostatina A (TSA), un inhibidor específico de HDACs (Yoshida et al., 1995), en la represión ejercida por E2-2A y E2-2B sobre el promotor de *cadherina-E*. Como muestra la [Figura 13](#), la presencia de TSA elimina totalmente la represión ejercida por los factores E2-2A/B en ensayos de transfección transitoria ([Figura 13A,B](#) paneles de la izquierda). Asimismo, la adición de TSA desreprime la actividad del promotor de *cadherina-E* en clones estables MDCK-E2-2A/B hasta niveles próximos a los detectados en células control MDCK-CMV ([Figura 13A,B](#), paneles de la derecha).

En conjunto, estos resultados indican que los factores E2-2 reprimen la transcripción del gen de *cadherina-E* dependiendo de la integridad del elemento E-pal y del reclutamiento de actividades HDAC.

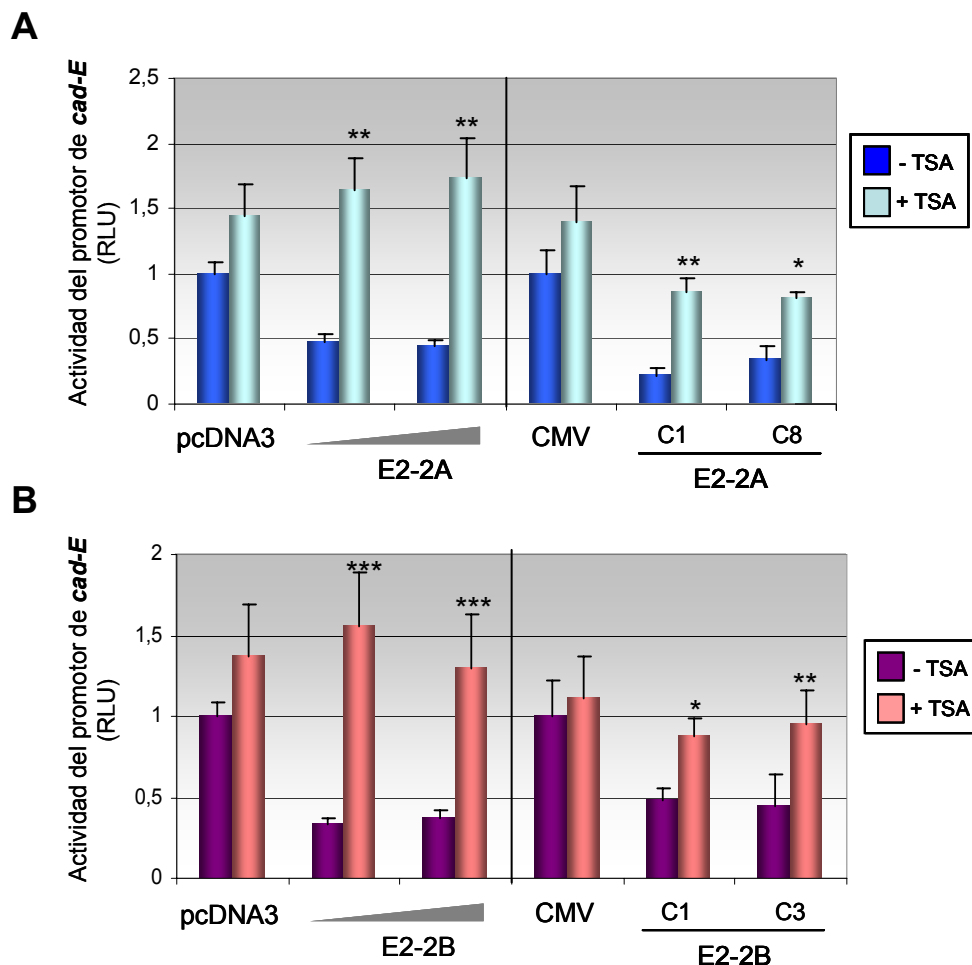


Figura 13. La represión del promotor de *cadherina-E* mediada por los factores E2-2A/B depende de actividad HDAC. **A.** Actividad del promotor de *cadherina-E* en células MDCK tras la transfección transitoria de los factores E2-2A (**A**) o E2-2B (**B**), en presencia o ausencia de TSA o vehículo, tal como se indica (paneles de la izquierda). La actividad del promotor de *cadherina-E* se determinó, asimismo, en células MDCK-E2-2A, clones C1 y C8 (**A**) y MDCK-E2-2B, clones C1 y C3 (**B**) y sus respectivas células control, en presencia o ausencia de TSA, según se indica (paneles de la derecha). En todos los casos, las células se trataron con TSA (100 nM) o vehículo durante 7 h. después de la transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la actividad de las células transfectadas con pcDNA3 (**A**) ó pcDNA3-HA (**B**) vacío o a células control MDCK-CMV (**A**) ó MDCK-CMV-HA (**B**). Los resultados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes, realizados en muestras por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA), con respecto a la misma condición en ausencia de TSA.

1.5 Estudio de la relevancia biológica de los factores E2-2

La TEM completa que observamos en los clones que expresan establemente los factores E2-2A/B, nos llevó a investigar si estas células también habían adquirido propiedades mótils o invasivas. Para ello se realizaron, en primer lugar, ensayos de reparación de herida en placa, los cuales mostraron que, a diferencia de las células control, que siguen un movimiento uniforme y unidireccional, las células MDCK-E2-2A/B se mueven al azar y como células individuales (Figura 14A,B). Este hallazgo

concuera con la morfología fibroblástica de los clones que expresan estos factores y la organización de su citoesqueleto de actina observado por inmunofluorescencia (Figuras 10 y 11).

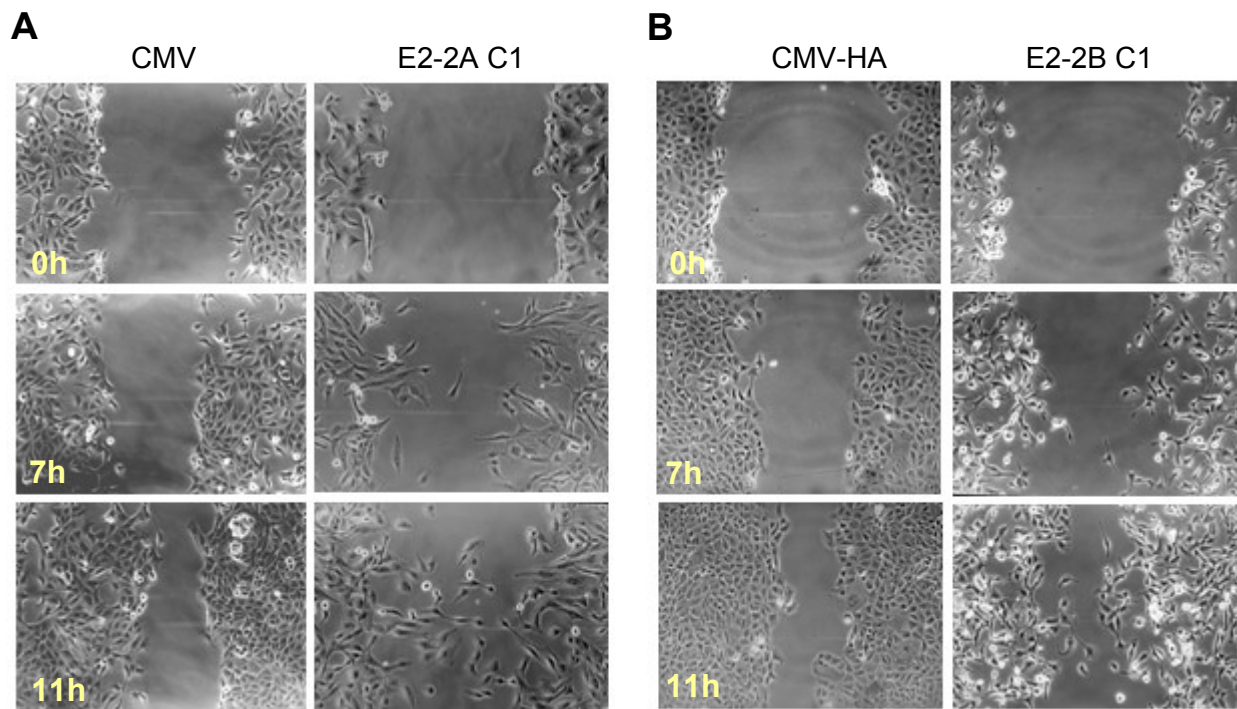


Figura 14. La sobreexpresión de E2-2A/B modifica el tipo de migración celular. La capacidad mótil de los distintos clones indicados se analizó mediante ensayos de reparación de herida en placa. Las imágenes fueron tomadas en el mismo lugar de la incisión inmediatamente después de la misma (0h), y a las 7 y 11 h. **A**, se muestra un clon representativo de MDCK-E2-2A (C1) y sus respectivas células control MDCK-CMV. **B**, clon representativo de MDCK-E2-2B (C1) y sus respectivas células control MDCK-CMV-HA.

La capacidad migratoria se analizó adicionalmente en ensayos de *transwell* sobre matrices de colágeno de tipo IV. Como se observa en la Figura 15, las células MDCK-E2-2A/B mostraron una capacidad migratoria superior a la de las células control, en este tipo de ensayos, destacando diferentes clones MDCK-E2-2A que muestran una alta capacidad migratoria, similar a la de células MDCK-Snail1 (Figura 15).

Finalmente, se analizó la capacidad invasiva de células MDCK-E2-2A/B en cultivos organotípicos crecidos sobre geles tridimensionales de colágeno tipo I (Peinado et al., 2004c). Tras dos semanas en cultivo, tanto las células MDCK-E2-2A como MDCK-E2-2B invadieron el gel de colágeno de manera eficiente, mayormente como células individuales, manteniendo la ausencia de cadherina-E y una intensa tinción para vimentina (Figura 16A,B, paneles e-h). Por el contrario, las células control MDCK-CMV/MDCK-CMV-HA fueron incapaces de invadir el gel de colágeno, permanecieron en la parte superior del mismo organizadas en una capa epitelial (Figura 16A,B, paneles a-d), de acuerdo a observaciones previas (Peinado et al., 2004c), con expresión de cadherina-E en la membrana basolateral, y una débil tinción de vimentina.

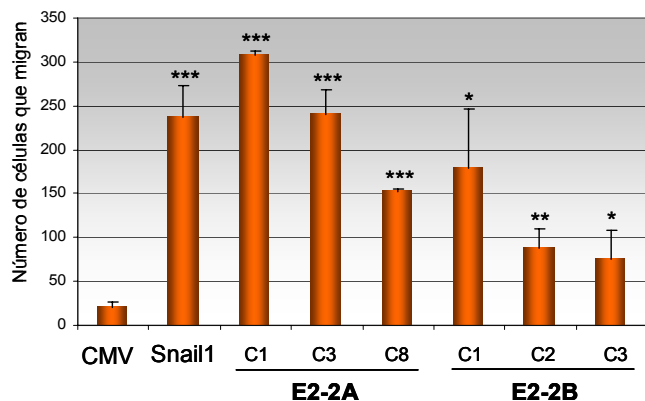


Figura 15. E2-2A y E2-2B inducen propiedades invasivas. Las propiedades invasivas de los clones estables indicados fueron analizadas en ensayos de invasión *in vitro* sobre colágeno IV (cámaras de Boyden modificadas). Los valores del eje Y corresponden a la cantidad de células que han migrado a través del filtro poroso, tras 24 h. en cultivo. CMV: células MDCK transfectadas con pcDNA3 vacío; Snail1: células MDCK-Snail1; se muestran tres clones independientes de células MDCK-E2-2A (C1, C3 y C8) y tres clones independientes de células MDCK-E2-2B (C1, C2 y C3). Los resultados corresponden a la media \pm SD de un total de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (prueba *t* de Student, respecto a células control CMV).

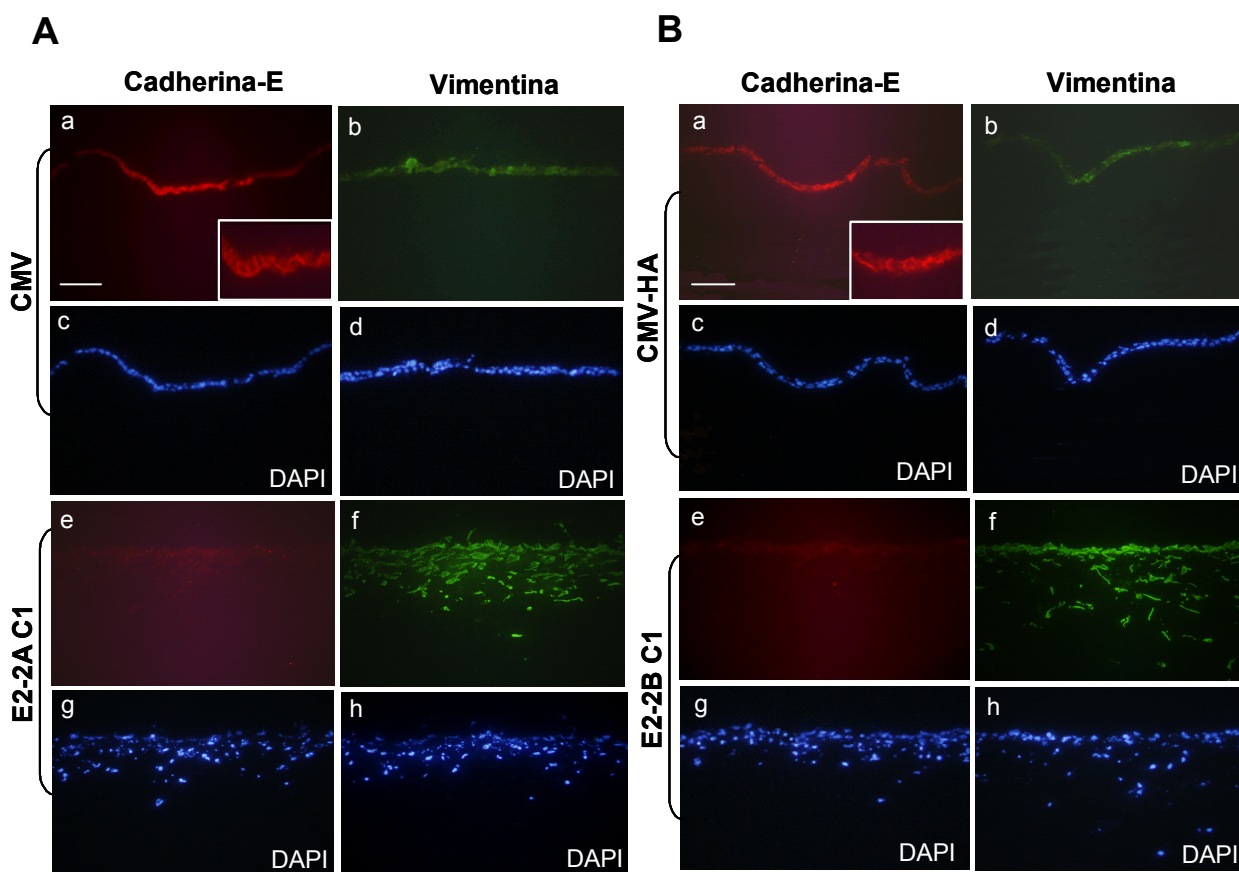


Figura 16. La sobreexpresión de los factores E2-2A/B en células MDCK induce un comportamiento invasivo en cultivos tridimensionales. El comportamiento invasivo de células MDCK-E2-2A, C1 (A, e-h) y MDCK-E2-2B, C2 (B, e-h) y sus respectivos controles MDCK-CMV/MDCK-CMV-HA (a-d) se analizó en cultivos organotípicos tridimensionales sobre geles de colágeno tipo I. Los cultivos se crecieron durante dos semanas, tras lo cual se embebieron en OCT y se obtuvieron secciones con criostato (10 μ m) sobre las que se realizó un análisis de inmunofluorescencia para cadherina-E (rojo) y vimentina (verde). Imágenes de inmunofluorescencia (20X) de cadherina-E (a, e) y vimentina (b, f). En paralelo se muestran imágenes de tinción nuclear con DAPI (azul) de los mismos campos para cultivos de células MDCK-CMV/MDCK-CMV-HA (c, d) y MDCK-E2-2A/E2-2B (g, h). Barra, 100 μ m. En la parte inferior de los paneles a, se recoge un sector ampliado (40X), que muestra la tinción de cadherina-E en la membrana basolateral de la monocapa celular.

Para descartar que las diferencias observadas en las propiedades de motilidad e invasión fueran debidas a un aumento en la proliferación de las células MDCK que sobreexpresan los factores E2-2 en relación a las células control MDCK-CMV, determinamos la capacidad proliferativa de estas células por incorporación del análogo de timina BrdU. Todos los clones MDCK-E2-2A/B analizados mostraron una menor capacidad de proliferación (~50%) que las células control, tanto en presencia como en ausencia de suero (Figura 17). Por lo tanto, podemos afirmar que las diferencias mostradas por las células MDCK-E2-2A/B en sus propiedades invasivas, no se deben a una mayor proliferación sino a la acción de los factores E2-2 sobre el fenotipo celular.

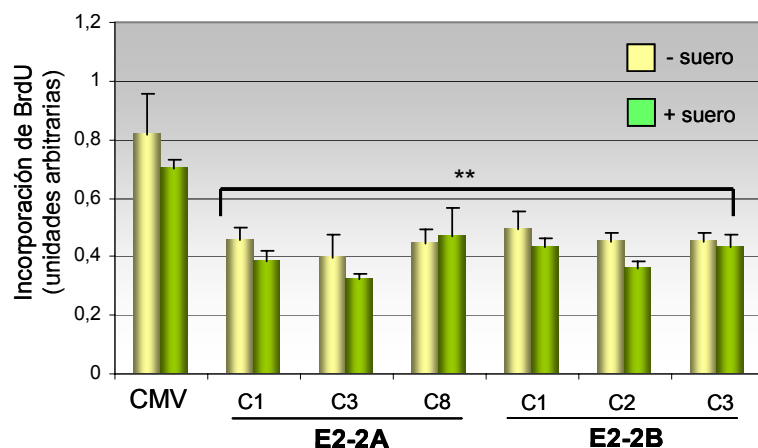


Figura 17. Análisis del efecto de la expresión estable de los factores E2-2A/B sobre la proliferación celular. Se determinó la incorporación de BrdU tanto en presencia (verde) como en ausencia (amarillo) de suero, en los clones indicados de células MDCK-E2-2A y MDCK-E2-2B y en células control MDCK-CMV. Los resultados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes, realizados por triplicado. ** $p < 0.01$, (prueba *t* de Student, respecto a células control MDCK-CMV).

El hecho de que los factores E2-2 induzcan un proceso de TEM completa en las células MDCK, llevó a plantearnos si también eran capaces de conferir propiedades tumorigénicas a dichas células. Es por ello, que analizamos la capacidad de formar tumores de las células MDCK-E2-2A/B en ratones inmunodeprimidos (nu/nu). Inesperadamente, las células MDCK-E2-2A no fueron capaces de inducir tumores (hasta los tres meses después de la inyección), mientras que las células MDCK-E2-2B mostraron una capacidad tumorigénica muy limitada (25% de incidencia), en sólo uno de los clones analizados (Tabla 6). Esta pobre capacidad tumorigénica se contrapone a la de las células MDCK-Snail1, altamente tumorigénicas, y a las células MDCK-E47, que expresan establemente el factor bHLH de clase I E47, altamente tumorigénicas y que inducen una potente respuesta angiogénica en el huésped (Pérez-Moreno et al., 2001; Peinado et al., 2004c). Es interesante mencionar que estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que las células MDCK-E47 poseen una pobre capacidad invasiva en cultivos organotípicos sobre geles de colágeno I, y no presentan diferencias significativas en cuanto a la capacidad proliferativa, en cultivos bidimensionales, con respecto a las células control MDCK-CMV (Peinado et al., 2004c).

Todas estas diferencias sugieren la existencia de diferencias importantes en los efectos biológicos conferidos por la expresión de las diferentes proteínas E, E2-2 ó E47, más allá de la inducción de un proceso de TEM en células epiteliales.

Tabla 6. Capacidad tumorigénica de células MDCK-E2-2A/B

Tipo celular	Número de tumores por sitio de inyección
MDCK-CMV	0/8
MDCK-E2-2A C1	0/8
MDCK-E2-2A C8	0/8
MDCK-CMV-HA	0/8
MDCK-E2-2B C1	2/8
MDCK-E2-2B C2	0/8

Se inyectaron 1×10^6 células por sitio de inyección (flancos de cada ratón). Los ratones que no desarrollaron tumores se observaron por un período de tres meses y luego fueron sacrificados. En los casos donde se desarrollaron tumores, los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1 cm^3 (un mes post-inyección).

1.6 Análisis de la expresión de *E2-2* en embriones de ratón. Comparación con la expresión de *E2A*.

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de la función biológica de los factores *E2-2*, nos propusimos explorar la distribución *in vivo* de los transcritos de *E2-2* y su relación con la expresión de *cadherina-E* en embriones de ratón de estadios tempranos (8,5 a 10 días *post coitum* (d.p.c.)). Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. M. Angela Nieto. Se realizaron experimentos de hibridación *in situ* en embriones enteros y en secciones obtenidas por corte con vibrátomo, utilizando una sonda que reconoce a los dos productos del gen *E2-2*. Este análisis reveló la expresión de *E2-2* en el mesodermo, el neuroepitelio y en los arcos branquiales, y su ausencia en el corazón y membranas extraembrionarias con excepción de la alantoide (Figura 18A,C; y datos no mostrados). Se detectaron niveles más elevados del RNAm de *E2-2* en las células de la cresta neural que se encuentran poblando los arcos branquiales y en los primordios de las futuras extremidades (*limb buds*) (Figura 18C). No se detectó expresión en ningún epitelio embrionario, independientemente de su origen, ecto o endodérmico (Figura 18C,E,G). Estos resultados indican que el gen *E2-2* sigue un patrón de expresión similar al descrito previamente para el gen *E2A* (Pérez-Moreno et al., 2001; Figura 18B,D, F,H). No obstante, una observación minuciosa de los patrones de expresión de ambos genes indicó un nivel de expresión mucho menor de los productos de *E2-2* en el tubo neural y un patrón más restringido en el mesodermo, respecto a los niveles de expresión de *E2A* en esas mismas regiones (Figura 18, comparar los paneles E,G con F,H, respectivamente).

Vale la pena destacar que la expresión más restringida de los transcritos de *E2-2* en algunas poblaciones mesodérmicas (como las células migratorias de la cresta neural, *mcn*), en comparación al

patrón de expresión de *E2A* (Figura 18,E-H), sugiere que los productos de los genes *E2-2* y *E2A* tendrían un papel complementario, en lugar de redundante, en la inducción/mantenimiento de distintas poblaciones mesenquimáticas *in vivo*.

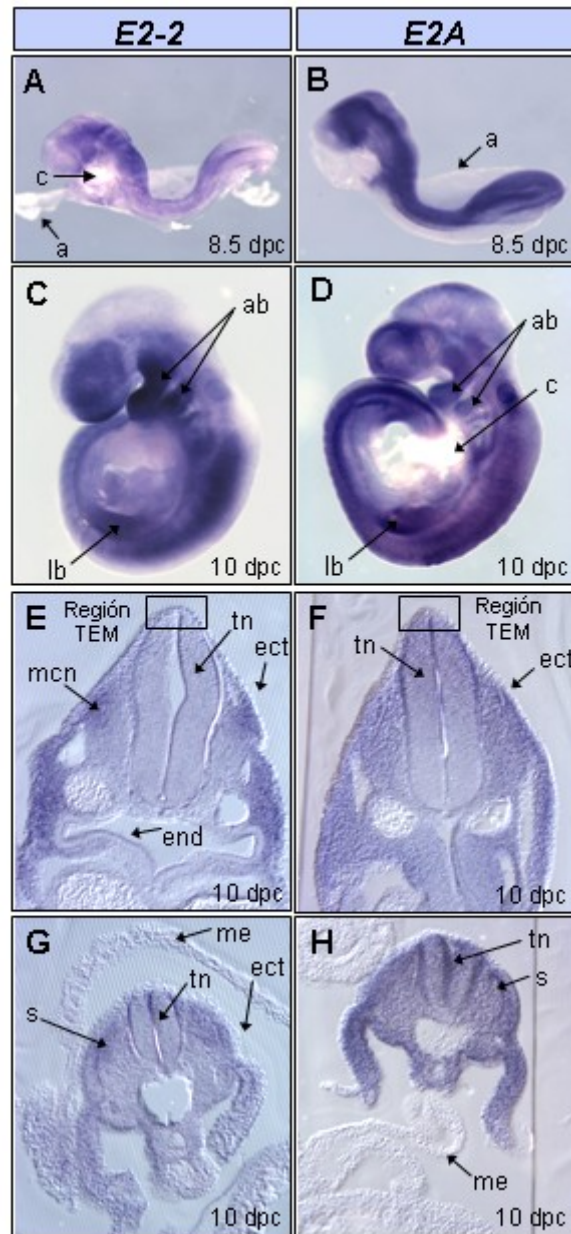


Figura 18. Expresión de los genes *E2-2* y *E2A* durante el desarrollo embrionario temprano. Hibridación *in situ* de embriones enteros de 8,5 (A-B) y 10 d.p.c. (C-D) y de secciones de vibrátomo de embriones de 10 d.p.c. tomadas a nivel del tronco anterior (E-F) y posterior (G-H). Los productos del gen *E2-2* se detectan en tejidos muy diferentes en todo el embrión, incluyendo el mesodermo, primordios de las extremidades (*limb buds*) y tejidos neurales, pero están ausentes en epitelios no neurales (E, G), el primordio del corazón (A) y las membranas extraembrionarias (A, G). Los transcritos del gen *E2A* muestran un patrón de expresión similar, pero con una distribución más amplia en el mesodermo y con niveles más elevados en el tubo neural (F, H), en comparación a los niveles de *E2-2* (E, G). Nótese que la región del tubo neural que está sufriendo TEM (región TEM) expresa niveles muy bajos de *E2-2* y *E2A* (E, F). **a**, amnion; **ab**, arcos branquiales; **c**, corazón; **ect**, ectodermo; **end**, endodermo; **lb**, *limb bud* (primordios de las extremidades); **mncn**, células migratorias de la cresta neural; **me**, membranas extraembrionarias; **s**, somitos; **tn**, tubo neural.

2. Comparación de la acción de los factores E2-2 y E47: Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica inducidos por ambos tipos de factores bHLH

Los estudios comentados anteriormente indicaban que, aunque los factores bHLH de clase I E2-2A/B y E47 actúan como represores de cadherina-E e inductores de TEM, presentan diferencias biológicas significativas. Para entender mejor las similitudes y diferencias biológicas de los factores E2-2 y E47, decidimos realizar un análisis comparativo de los perfiles de expresión génica inducida por ambos tipos de factores, mediante *microarrays* de cDNA. Con este propósito, utilizamos una plataforma (Oncochip CNIO v1.1c) que contiene cDNAs humanos y ESTs, seleccionados por su posible implicación en cáncer y/o diferenciación celular, y que codifican para diversas funciones como apoptosis, ciclo celular, angiogénesis y diferenciación, entre otras. Esta plataforma había sido validada previamente para células MDCK y derivadas tras la expresión estable de factores Snail y E47 (Moreno-Bueno et al., 2006), debido a la alta homología entre los genomas de perro y humano, particularmente en las regiones codificantes y secuencias reguladoras (Kirkness et al., 2003; Lindblad-Toh et al., 2005; Cannarossi et al., 2007).

2.1 Perfiles de expresión génica de las células MDCK-E2-2 y MDCK-E47

En primer lugar, se compararon los perfiles de expresión génica de células MDCK-E2-2A (clon C1) y MDCK-E2-2B (clon C2) en relación a células control MDCK-CMV. Este estudio determinó que no existen diferencias significativas entre los perfiles de expresión de ambos tipos celulares (sólo 5 genes de un total de 183 se encontraron expresados diferencialmente entre células MDCK-E2-2A y MDCK-E2-2B respecto a MDCK-CMV). Por lo tanto, procedimos a comparar el perfil de expresión de las células MDCK-E2-2A/B como un *pool* y células MDCK-E47, con respecto a las células control MDCK-CMV.

Tras el procesamiento de los datos, se detectaron 220 clones (177 genes y 43 ESTs, *expressed sequence tags*) cuya expresión estaba modificada, al menos dos veces, en células MDCK-E2-2 ó en células MDCK-E47, con respecto a las células control MDCK-CMV. El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado mostró un perfil de expresión específico para las células que sobreexpresan E2-2 y para las que sobreexpresan E47 (Figura 19A). Un 31% (n=55) de los genes modificados se encontró regulado de manera similar (positiva o negativamente) en ambos tipos celulares (MDCK-E2-2 y MDCK-E47) (Figura 19B). Además, 12% (n=21) y 53% (n=94) de los genes mostraron su expresión modificada sólo en un tipo celular, MDCK-E2-2 y MDCK-E47, respectivamente (Figura 19B, Tabla 7). Tras el análisis *t-test* (FDR<0,1), sólomente 3,6% de los clones (n=8), se encontró expresado diferencialmente (regulación positiva vs. negativa, y viceversa) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47 (Tabla 7).

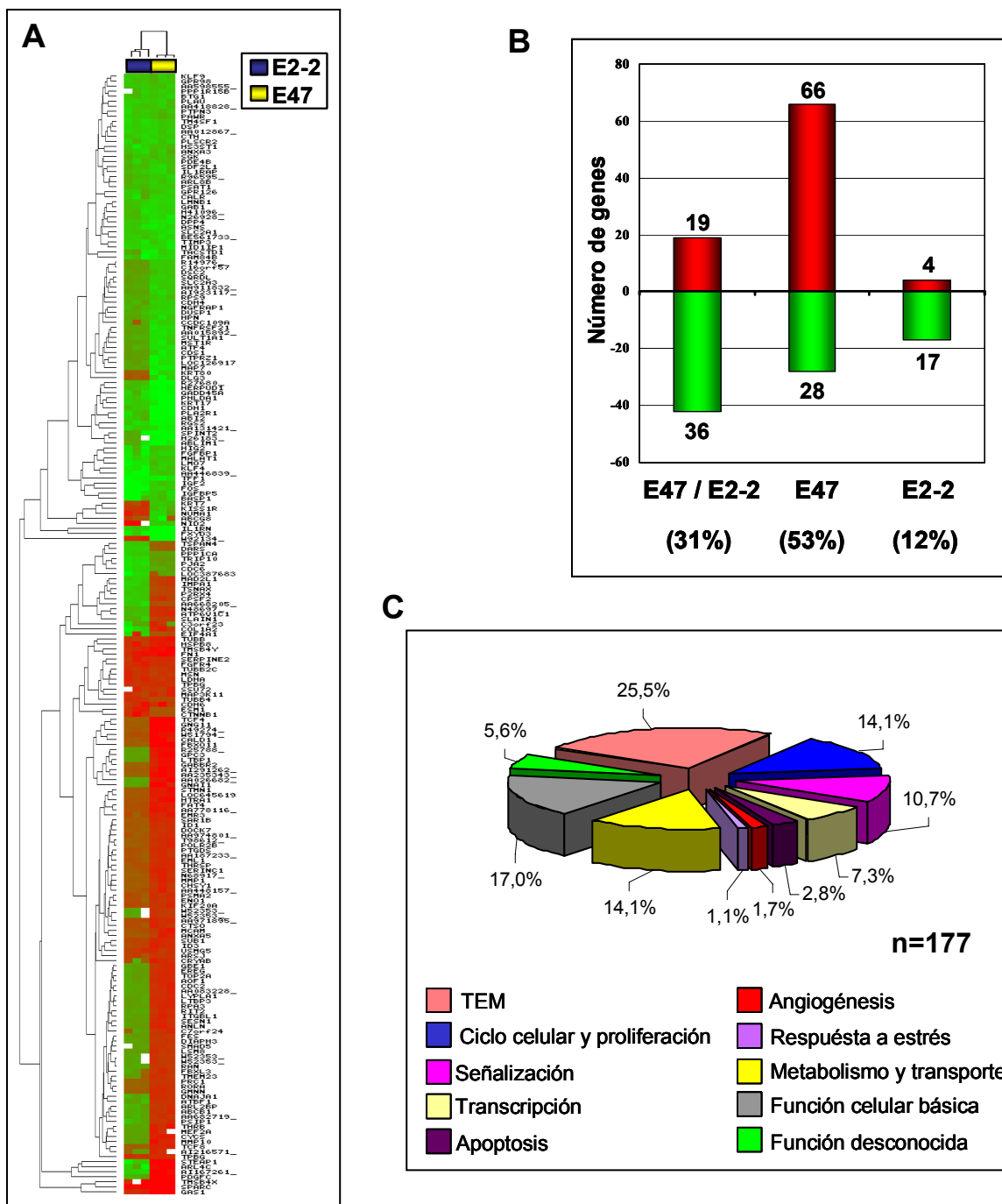


Figura 19. Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.
A. Análisis de *cluster* jerárquico no supervisado de genes cuya expresión está modificada en células MDCK que expresan establemente los factores E2-2 (azul) o E47 (amarillo) respecto a las células control MDCK-CMV. Sólo se consideraron los genes con expresión modificada al menos dos veces en alguno de los dos tipos celulares. El código de colores indica regulación positiva (rojo) o negativa (verde). **B.** Representación gráfica del número de genes anotados regulados de manera común o específica en las células MDCK que expresan E2-2 o E47. Se detectó un total de 177 genes diferencialmente expresados ≥ 2 -veces en alguno de los dos tipos celulares respecto a las células control. El código de colores indica genes genes regulados positivamente (rojo) o negativamente (verde). El número de genes regulados en cada caso se indica en cada barra. El porcentaje de genes respecto al total de genes diferencialmente expresados (n=177), regulados de forma común o independiente, se indica debajo de cada barra **C.** Agrupamiento funcional de los genes con expresión modificada. Las diferentes categorías funcionales están indicadas por un código de colores; los números indican el porcentaje de representación con respecto a todos los genes candidatos. Se han excluido de la representación en **(B)** y **(C)** los clones recogidos en la categoría de misceláneos.

Los genes se agruparon en distintas categorías, en base a sus funciones establecidas/propuestas en bases de datos (*GeneCards*, *Gene Ontology*): genes implicados en TEM (25,5%), regulación transcripcional (7,9%), ciclo celular y proliferación (14,1%), entre otras funciones (Figura 19C).

2.2 Genes implicados en TEM

Un 25,5% de los genes identificados (45/177) está relacionado, directa o indirectamente, con TEM y, como cabía esperar, un 50% de ellos son comunes a MDCK-E2-2 y a MDCK-E47 (Tabla 7). Entre estos genes regulados de manera similar, encontramos expresión disminuída de *cadherina-E*, de acuerdo a los resultados previos mostrados para E2-2A/B (Figuras 8 y 9, sección 1.3) y para células MDCK-E47 (Pérez-Moreno et al., 2001), confirmando la fiabilidad del análisis. Por su parte, *CDH6* (*cadherina-K*, típica de riñón embrionario) se encontró regulada positivamente en ambos tipos celulares. Genes que codifican para moléculas de adhesión y citoesqueleto epitelial, como *desmoplakina*, *desmocolina* y *citoqueratina 17*, presentan también expresión disminuída. Entre los genes inducidos de manera común, se encuentran genes que codifican para moléculas de matriz extracelular (*SPARC*, *fibronectina*), así como para proteínas asociadas al citoesqueleto (*caldesmon*, *moesina*, *timosina β 4*, *tubulina β*). El incremento en la expresión de fibronectina concuerda con los datos mostrados en las Figuras 10 y 11 (sección 1.3) y con datos previos del laboratorio para células MDCK-E47 (Pérez-Moreno et al., 2001). Otros genes regulados comúnmente son *PLAU*, *TIMP3* (reprimidos), y *SERPINE2/PAII*, *MMP-1* (inducidos) (codifican para actividades relacionadas con proteasas y remodelación de la matriz extracelular).

Por otra parte, detectamos una fracción considerable de los genes relacionados con TEM, cuya expresión está modificada específicamente en un tipo celular (9%, 4/45, en MDCK-E2-2; y 36%, 16/45, en MDCK-E47). Entre estos genes podemos destacar a *EREG*, *GPC3*, *MCAM* y *MMP-10*, cuya expresión se encuentra incrementada específicamente en células MDCK-E47, o a *β -catenina* y *tetraspanina 4*, con expresión incrementada y disminuída, respectivamente, en células MDCK-E2-2.

Algunos de los genes detectados se validaron por RT-PCR y/o Western blot, como fue el caso de *SPARC* e *ID1* (Figura 20A,B paneles superiores). La validación de *TCF8/ZEB-1*, otro represor de *cadherina-E* e inductor de TEM (Grooteclaes and Frisch, 2001; Eger et al., 2005), mostró su expresión tanto en células MDCK-E47 como en células MDCK-E2-2 (Figura 20, paneles de la izquierda), indicando que el gen *TCF8* podría ser una diana común de los factores E2-2 y E47, al menos en el modelo celular de MDCK.

2.3 Genes implicados en ciclo celular, proliferación y señalización

El análisis de los genes relacionados con ciclo celular, proliferación o señalización (24,8% de los genes, 44/177), mostró que sólo un tercio de ellos está regulado de manera similar en células MDCK-E2-

2 y MDCK-E47, mientras que el resto son específicos de las células que sobreexpresan E2-2 (9,1%, 4/44) ó E47 (61,4%, 27/44) (Tabla 7). Entre los genes con expresión común, encontramos varios cuyos productos participan en vías de regulación de la TEM (Thiery, 2002; Huber et al., 2005; Thiery y Sleeman, 2006), como las del factor de crecimiento similar a la insulina IGF (*IGF2* e *IGFBP5*) y el factor de crecimiento de fibroblastos FGF (*FGFR4* y *FGFBP1*).

De los genes con expresión específica, podemos destacar a *CDC2*, *RAN*, el oncogén *FES*, los genes *SMAD5* y *LTBP1/3* (de la vía de TGF- β) y *PDGFC* (factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma C), cuya expresión está regulada positivamente sólo en las células MDCK-E47. El incremento en la expresión de *PDGFC* en estas células fue validado por RT-PCR (Figura 20). Es tentativo especular que los distintos niveles de expresión de algunos genes de vías específicas de señalización podrían ser responsables del diferente comportamiento tumorigénico observado en las células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

2.4 Genes implicados en transcripción

Otro grupo de genes, que representa el 7,3% (13/177), corresponde a genes relacionados con el proceso de transcripción. Entre los genes regulados de manera diferencial en las células MDCK-E2-2 y MDCK-E47, se encuentra el factor FBXO11, cuya expresión está incrementada en células MDCK-E47. A su vez, los datos del análisis de *microarrays* indicaron que los genes *ID1* e *ID3* están regulados positivamente en los dos tipos celulares, aunque de forma no significativa en las células MDCK-E2-2. El incremento en los niveles de ID1 se confirmó e nivel de proteína tanto en células MDCK-E47 como en MDCK-E2-2 (Figura 20, paneles de la derecha) y lo mismo ocurre con los niveles de ID3 (datos no mostrados). Adicionalmente, se pudo confirmar mediante inmunofluorescencia que ID1, y en menor medida ID3, se localizan en el núcleo de las células MDCK-E2-2A/B (Figura 21), como se había observado previamente en el caso de las células MDCK-E47 para ID1 (Jordà et al., 2007).

2.5 Genes implicados en otras funciones

También se detectaron diferencias entre ambos tipos celulares en la expresión de genes implicados en otras funciones, como metabolismo y transporte (n=25, 14,1%), función celular básica (n=30, 16,9%), función desconocida (n=10, 5,6%), apoptosis (n=5, 2,8%), angiogénesis (n=3, 1,7%) y respuesta a estrés (n=2, 1,1%), y misceláneos (n=43). (Tabla 7 y Tabla suplementaria, Anexo).

En conjunto, estos resultados indican que los factores E2-2 y E47 regulan la expresión de rutas comunes y específicas que pueden contribuir a aspectos generales y particulares de la TEM, como se describió previamente para Snail1, Snail2 y E47 (Moreno-Bueno et al., 2006). Más aun, regulan la expresión de grupos de genes potencialmente implicados en la diferente capacidad de invasión y proliferación que presentan las células epiteliales que expresan cada uno de estos factores bHLH.

Tabla 7. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Tabla 7a.		Genes implicados en TEM (n = 45)	
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_024582	FAT4 , supresor de tumores FAT, homólogo 4 (Drosophila)	1,94	3,33
NM_033138	CALD1 , caldesmon 1	2,24	4,47
NM_004360	CDH1 , cadherina 1, tipo 1, cadherina-E (epitelial)	-5,99	-7,80
AL834206	CDH4 , cadherina 4, tipo 1, cadherina-R (retina)	-1,37	-2,41
NM_004932	CDH6 , cadherina 6, tipo 2, cadherina-K (riñón fetal)	2,75	3,28
J03464 *	COL1A2 , colágeno, tipo I α 2	-4,19	2,68
NM_001904	CTNNB1 , β -catenina 1 (proteína asociada a cadherina), 88kDa	3,24	1,35
NM_004949	DSC2 , desmocolina, 2	-2,15	-1,97
NM_004415	DSP , desmoplaquina	-2,51	-2,26
NM_001432	EREG , epiregulina	-1,15	2,54
NM_212482	FN1 , fibronectina, 1	3,43	4,72
NM_004484	GPC3 , glipicano, 3	-1,11	4,30
AK125670	HPN , hepsina (proteasa transmembrana, serina 1)	-1,32	-2,48
BC036788	ITGBL1 , integrina, beta-like 1 (con dominios repetidos EGF-like)	-1,16	2,61
BG680394	KRT17 , queratina, 17	-2,31	-5,65
AK128505	KRT7 , queratina, 7	1,84	-2,04
BC065180	KRT80 , queratina, 80	1,13	-3,24
AF330045	LMO7 , LIM domain, 7	-3,98	-2,10
AK126303	MCAM , molécula de adhesión celular de melanoma	1,36	2,82
NM_021242	MID1IP1 , <i>MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12 homolog (zebrafish))</i>	-2,74	-3,13
BC013875	MMP1 , metaloproteínasa de matriz, 1 (colagenasa intersticial)	1,22	2,63
AK222601	MMP10 , metaloproteínasa de matriz, 10 (estromelina 2)	-1,08	3,21
NM_002444	MSN , moesina	2,54	2,04
NM_007361 *	NID2 , nidógeno 2 (osteonidógeno)	4,89	-2,21
NM_002658	PLAU , activador del plasminógeno, uroquinasa	-2,45	-2,11
BX647459	SERPINE2 , inhibidor de serina-peptidasas, <i>clade E</i> , 2 (inhibidor del activador del plasminógeno tipo I) / PAI1.	2,68	2,60
AK126525	SPARC , proteína secretada ácida rica en cisteína (osteonectina)	15,58	16,00
NM_001083962	TCF4 / E2-2 , factor de transcripción 4	3,12	6,63
NM_030751	TCF8 / ZEB-1 , factor de transcripción 8 (reprime la expresión de interleuquina 2)	1,11	3,00

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

Continuación Tabla 7. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Continuación Tabla 7a. Genes implicados en TEM (n = 45)			
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
BM923753	TFF1 , <i>Trefoil factor 1</i> (secuencia inducible por estrógenos expresada en cancer de mama)	-5,03	-4,11
CR590317	TIMP3 , inhibidor tisular de metaloproteasa 3	-2,74	-2,76
BF680512	TMSB4X , timosina, beta 4, ligada al cromosoma X	4,03	7,55
NM_004202	TMSB4Y , timosina, beta 4, ligada al cromosoma Y	2,66	4,59
AK126635	TSPAN4 , tetraspanina, 4	-2,17	1,13
AK096823	HS3ST1 , heparan sulfato (glucosamina) 3-O-sulfotransferasa, 1	-2,70	-1,85
NM_001003408	ABLIM1 , proteína LIM de unión a actina 1	-1,81	-4,74
NM_001008707	EML1 , <i>Echinoderm microtubule associated protein like 1</i>	1,30	2,57
NM_003980	MAP7 , proteína asociada a microtúbulos, 7	-2,23	-3,91
Z11584 *	NUMA1 , proteína nuclear del aparato mitótico, 1	2,73	-2,07
NM_007350	PHLDA1 , <i>Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1</i>	-2,40	-5,89
NM_003981	PRC1 , proteína reguladora de citoquinas, 1	1,05	2,14
BX647885	STMN1 , <i>stathmin 1</i> / oncoproteína, 18	1,20	3,79
AK098772	TUBB , tubulina β	2,03	3,76
BX648521	TUBB2C , tubulina β, 2C	2,42	2,14
NM_006087	TUBB4 , tubulina β, 4	2,46	1,60

Tabla 7b. Genes implicados en ciclo celular y proliferación (n = 25)			
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_005759	AB12 , <i>Abl interactor 2</i>	-1,94	-5,51
NM_018685	ANLN , anillina, proteína de unión a actina	-1,07	2,84
NM_001731	BTG1 , <i>B-cell translocation gene 1</i> , anti-proliferativo	-1,91	-2,30
CR933728	CDC2 , ciclo de división celular 2, transición de G1 a S, y de G2 a M	-1,19	2,65
NM_001254	CDC6 , homólogo de ciclo de división celular 6 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,82	-1,28
NM_021120	DLG3 , <i>Discs, large homolog 3</i> (<i>Drosophila</i>)	1,27	-3,10
NM_033407	DOCK7 , <i>Dedicator of cytokinesis 7</i>	1,17	2,32
AL832663	EMR3 , <i>Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3</i>	1,44	3,15
NM_005130	FGFBP1 , proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos, 1	-3,16	-2,57
AB209631	FGFR4 , receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), 4	2,81	2,46
BC064848	GAB1 , proteína de unión asociada a GRB2, 1	-2,10	-2,64
NM_000612	IGF2 , factor de crecimiento similar a la insulina, 2 (somatomedina A)	-7,36	-2,17
NM_000599	IGFBP5 , proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 5	-4,77	-2,41
AK025790	KIF20A , miembro de la familia de las quinesinas, 20A	1,54	2,49

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

Continuación Tabla 7. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Continuación Tabla 7b. Genes implicados en ciclo celular y proliferación (n = 25)			
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_206943	LTBP1 , proteína de unión a TGF-β latente, 1	-1,08	3,74
AK024477	LTBP3 , proteína de unión a TGF-β latente, 3	-1,12	2,70
U65410	MAD2L1 , <i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1</i> (levadura)	-2,27	2,01
CR593909	NGFRAP1 , proteína asociada al receptor del factor de crecimiento neuronal 16, 1	-1,45	-2,34
AF091434	PDGFC , factor de crecimiento derivado de plaquetas, C	-1,42	11,41
BC042755	RGS2 , regulador de la señalización por proteínas-G, 2, 24 kDa	-2,59	-4,62
NM_001001419	SMAD5 , miembro de la familia SMAD, 5	-1,14	2,20
NM_003251	THRSP , <i>Thyroid hormone responsive</i> (homólogo de SPOT14, rata)	1,36	2,65
AF502289	TRIP10 , <i>Thyroid hormone receptor interactor 10</i>	-2,87	-1,02
BE889962	USMG5 , homólogo de <i>Upregulated during skeletal muscle growth 5</i> (ratón)	2,06	2,36
NM_002048	GAS1 , <i>Growth arrest-specific 1</i>	2,65	9,45

Tabla 7c. Genes implicados en señalización (n = 19)			
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_006317	BASP1 , <i>Brain abundant, membrane attached signal protein 1</i>	-4,60	-2,21
M84739	CALR , calreticulina	-2,08	-2,50
AK128016	CCDC109A , <i>Coiled-coil domain containing 109A</i>	-1,12	-2,53
BC035357	FES , oncogén del sarcoma felino	-1,08	2,10
AF056085	GABBR2 , receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) B, 2	1,04	3,67
NM_020455	GPR126 , receptor acoplado a proteína-G, 126	-1,93	-2,21
AF435925	GPR98 , receptor acoplado a proteína-G, 98	-2,02	-1,92
BC141812	KISS1R , receptor de <i>KISS1</i>	2,18	-1,87
AB209655	MAP3K11 , proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos, 11	2,05	2,64
NM_002447	MST1R , receptor estimulador de macrófagos, 1 (<i>c-met-related tyrosine kinase</i>)	-1,17	-3,05
NM_002851	PTPRZ1 , <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1</i>	-1,07	-3,83
NM_006325	RAN , miembro de la familia onogénica RAS	-1,23	2,10
U78166	RIT2 , <i>Ras-like without CAAX 2</i>	-1,24	2,45
AK056821	SAR1B , <i>SAR1 gene homolog B (S. cerevisiae)</i>	1,18	2,65
AK026585	TACSTD1 , <i>Tumor-associated calcium signal transducer 1</i>	-1,81	-2,87
NM_000461	THRB , receptor de hormona tiroidea, β (homólogo del oncogén de leucemia eritroblástica viral (v-erb-a), 2 (aviar)	-1,21	3,14
AL832780	TM4SF1 , <i>Transmembrane 4 L six family member 1</i>	-2,74	-2,29
NM_181386	TMEM23 , proteína transmembrana 23	1,02	2,27
AB209394	TNFRSF21 , superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 21	-1,22	-3,14

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

Continuación Tabla 8. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Tabla 7d.		Genes implicados en transcripción (n = 13)	
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
D26046	ATBF1 , AT-binding transcription factor 1	-1,34	2,33
NM_001675	ATF4 , factor activador de transcripción, 4 (<i>tax-responsive enhancer element B67</i>)	-1,29	-3,27
NM_017437 *	CPSF2 , factor específico de corte y poliadenilación, 2, 100 kDa	-2,23	2,10
AL833187	FBXL3 , <i>F-box and leucine-rich repeat protein 3</i>	-1,12	2,27
BC043258	FBXO11 , proteína F-box, 11	1,12	8,25
BX647104	FOS , homólogo del oncogén viral V-fos del osteosarcoma murino FBJ	-7,70	-2,46
BF676327	FXYP3 , regulador de transporte de iones que contiene dominio FXYP, 3	-4,52	-11,91
BG165657	ID1 , inhibidor de diferenciación o de unión a DNA, 1	1,22	2,47
AK225965	ID3 , inhibidor de diferenciación o de unión a DNA, 3	1,65	2,84
NM_004235	KLF4 , factor similar a <i>Kruppel</i> , 4 (intestino)	-4,57	-2,11
NM_001206	KLF9 , factor similar a <i>Kruppel</i> , 9	-2,00	-1,82
AL831995	MEF2A , <i>MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A)</i>	-1,16	2,75
BX649155	PSIP1 , proteína de interacción con PC4 y SFRS1, 1	-1,58	2,31

Tabla 7e.		Genes implicados en metabolismo (n = 22)	
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_153042	AOX1 , amino-oxidasa (que contiene flavina), dominio 1	-1,14	2,72
NM_024590	ARSJ , familia aril-sulfatasa, miembro J	1,70	2,15
NM_133436	ASNS , asparagina sintetasa	-2,51	-3,31
NM_001263	CDS1 , CDP-diacilglicerol sintasa (fosfatidato citidililtransferasa), 1	-2,06	-3,00
BC046247	CHSY1 , carbohidrato (condroitín) sintasa, 1	1,14	2,33
NM_001902	CTH , Cistationasa (cistationina gamma-liasa)	-2,36	-2,19
NM_001349	DARS , aspartil-tRNA sintetasa	-2,61	1,12
NM_001935	DPP4 , dipeptidil-proteasa, 4 (CD26, <i>adenosine deaminase complexing protein 2</i>)	-2,23	-3,49
AK127679	DUSP1 , fosfatasa con especificidad dual, 1	-1,48	-2,75
AL833741	ENO1 , enolase 1, (α)	1,34	2,39
NM_002775	HTRA1 , HtrA serina peptidasa, 1	1,34	4,10
BC008381	MPA1 , Inositol(mio)-1(o 4)-monofosfatasa, 1	-2,44	1,93
BM457440	LDHA , lactato deshidrogenasa, A	2,70	2,26
NM_006330	LYPLA1 , lisofosfolipasa I	-1,17	2,60
U17033	PLA2R1 , fosfolipasa A2 receptor 1, 180 kDa	-2,10	-5,43

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

Continuación Tabla 7. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Tabla 7e.		Genes implicados en metabolismo (n = 22)	
No. de acceso.	Descripción	E2-2	E47
NM_020359	<i>PLSCR2</i> , escramblasa de fosfolípidos, 2	-2,22	-2,50
NM_058179	<i>PSAT1</i> , fosfoserina aminotransferasa, 1	-1,65	-2,25
BM805807	<i>PTGDS</i> , prostaglandina D2 sintasa, 21 kDa (cerebro)	1,34	2,53
BX649005	<i>SGK</i> , quinasa regulada por suero/glucocorticoides	-2,07	-2,09
AK127479	<i>SPINT2</i> , inhibidor de serina proteasa, tipo Kunitz, 2	-2,00	-5,28
AK130140	<i>SQRDL</i> , similar a sulfuro quinona reductasa (levadura)	-1,22	-2,30
AB209149	<i>SULT1A1</i> , miembro de la familia sulfotransferasa, citosólica, 1A, que prefiere fenol, 1	-1,38	-2,87

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

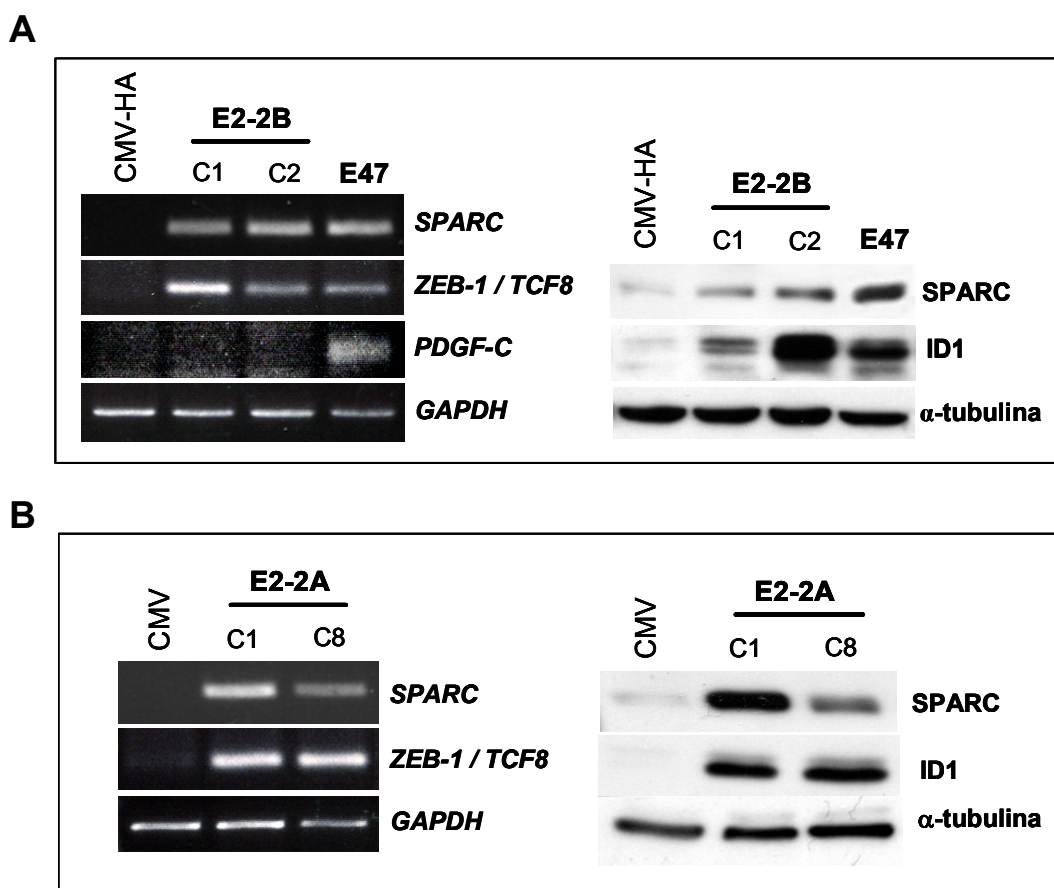


Figura 20. Validación de genes seleccionados. A. Los niveles de expresión de los genes indicados se analizaron a nivel de RNAm (RT-PCR semicuantitativa) (paneles de la izquierda) y proteína (Western blot) (paneles de la derecha) en (A), células MDCK-E2-2B (C1, C2) y MDCK-E47, y (B), en los clones indicados de células MDCK-E2-2A (C1, C8), y sus respectivos controles.

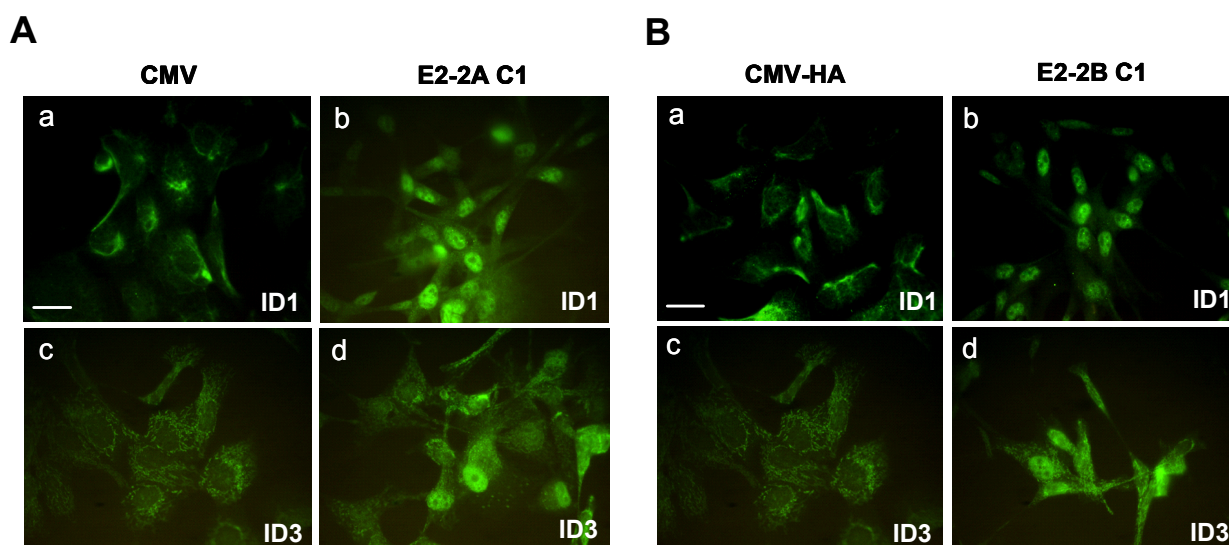


Figura 21. Análisis de la localización de las proteínas ID1 e ID3 en células MDCK-E2-2A/B. Imágenes de inmunofluorescencia de células MDCK-E2-2A, C1 (A), y células MDCK-E2-2B (B), y sus respectivos controles, para las proteínas ID1 (a, b) e ID3 (c, d), según se indica. Obsérvese la práctica ausencia o localización citoplasmática de las proteínas ID1/ID3 en las células control y su localización nuclear en células MDCK-E2-2A/B. Barra: 50 μ m.

3. Estudio de la relación funcional entre los factores Snail1/Snail2/E2A y E2-2

El hecho de que el RNAm de E2-2 esté incrementado en las células MDCK que expresan establemente los factores Snail1, Snail2 ó E47, indica que, o bien estos factores están regulando positivamente (de manera directa o indirecta) su transcripción, o bien, que están inhibiendo (directa o indirectamente) su degradación. Dado que la regulación de la expresión a nivel transcripcional es un fenómeno celular muy difundido y que los factores Snail1/2 y E47 son moduladores transcripcionales, nos propusimos analizar la primera posibilidad, es decir, si estos factores están mediando la inducción del gen *E2-2*. Para ello, decidimos aislar putativas regiones reguladoras en dicho gen, con el fin de determinar si efectivamente pueden responder a estos factores. Además, nos planteamos estudiar si los factores E2-2, a su vez, pueden modular la expresión de los factores Snail1, Snail2 y/o E47 a nivel transcripcional, analizando la acción de E2-2A/B sobre sus correspondientes promotores. Con estos estudios pretendemos indagar sobre la interrelación funcional de estos factores y discernir posibles bucles reguladores entre ellos.

3.1 Caracterización del promotor de E2-2A

El gen *E2-2* humano se encuentra en el cromosoma 18 (18q21.2), y se extiende a lo largo de 400.000 pares de bases. Los diferentes niveles de expresión que suelen detectarse entre la isoforma E2-2A y la E2-2B (Chen et al., 1997; Furumura et al., 2001; Kolligs et al., 2002), sumado al hecho de que

los extremos 5' de sus respectivos cDNAs corresponden a regiones muy distantes en la secuencia génica (unas 300.000 pares de bases), ha llevado a pensar que la expresión de cada isoforma está dirigida por regiones reguladoras (promotores) diferentes. Nos propusimos entonces, aislar ambos promotores. El artículo publicado por el grupo del Dr. E. Fearon en 2002 (Kolligs et al., 2002), muestra la caracterización de una región reguladora que se ubica río arriba del inicio de transcripción de E2-2B, y que dirige la expresión de dicha isoforma. Nos planteamos aislar esa región, mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico, pero tras varios intentos, la amplificación ha sido infructuosa.

Con el objeto de aislar el promotor de la isoforma E2-2A, analizamos la secuencia génica de E2-2 humano, que está contenida en el contig NT-025028.13, poniendo énfasis en la región río arriba del ATG de esta isoforma. En la Figura 22A, se muestra un esquema de dicha zona del gen, donde se puede apreciar la existencia de 6 cajas E distribuidas a lo largo de aproximadamente 2 Kb, y una región rica en GC. Tras el diseño de cebadores específicos, se amplificó por PCR la región que se extiende desde -2800 a +90 (al que nos referiremos de aquí en adelante como promotor de E2-2A) que incluye las 6 cajas E y la zona que corresponde al inicio del cDNA de E2-2A, con sus posibles sitios reguladores, hasta el ATG.

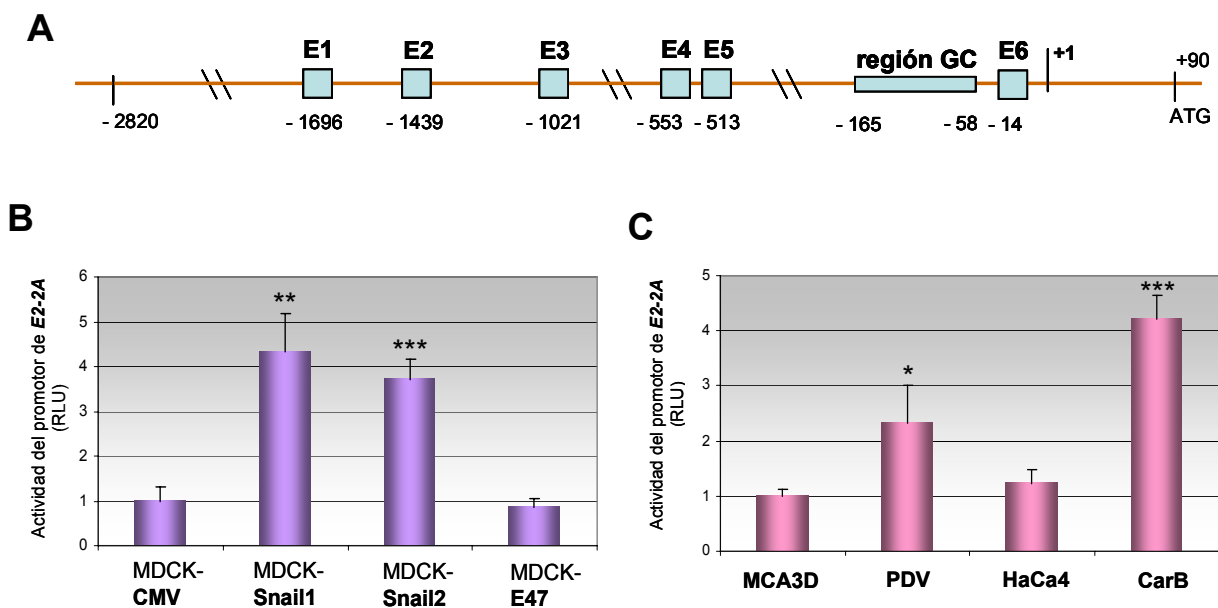


Figura 22. Análisis de la actividad del promotor de E2-2A en líneas derivadas de MDCK y del modelo de carcinogénesis de piel de ratón. **A.** Esquema del promotor de E2-2A humano (-2820/+90), con indicación de potenciales regiones reguladoras: cajas E (E1-E6) y región rica en GC. +1 representa el primer nucleótido correspondiente al cDNA de la isoforma E2-2A de ratón (GeneBank: U16321). **B** y **C**, actividad del promotor de E2-2A (2,9 kb) humano en (**B**), líneas celulares derivadas de MDCK, MDCK-CMV, MDCK-Snail1, MDCK-Snail2 y MDCK-E47, y en (**C**), líneas derivadas del modelo de carcinogénesis de piel de ratón MCA3D, PDV, HaCa4 y CarB. Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 48 h. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida en las células control MDCK-CMV (**B**) o MCA3D (**C**), respectivamente. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes, realizados en muestras por triplicado, para cada una de las condiciones experimentales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba t de Student, respecto a células control CMV (**B**) o MCA3D (**C**).

Para analizar la regulación transcripcional de *E2-2A*, se clonó la región promotora indicada, en el vector pGL2, río arriba del gen testigo *luciferasa*. Como se muestra en la [Figura 22B](#), el promotor de *E2-2A* tiene mayor actividad en las células MDCK-Snail1 y MDCK-Snail2 que en las células control MDCK-CMV, mientras que no se detectan cambios en las células MDCK-E47. El análisis de la actividad del promotor de *E2-2A* en diferentes tipos celulares del modelo de carcinogénesis de piel de ratón, mostró una alta actividad en las células CarB (que como se comentó anteriormente, tienen niveles elevados de Snail1/2 y E47) ([Figura 22C](#)). El hecho de que la actividad del promotor de *E2-2A* sea más alta en las células que expresan establemente Snail1/2, y en CarB, concuerda con los mayores niveles de RNAm de esta isoforma presentes en dichas células ([Figura 7A,B de la sección 1.1](#)), pero no en el caso de PDV. También se observa una activación del promotor de *E2-2A* al transfectar Snail1/2 de manera transitoria en células MDCK ([Figura 23](#)). Con respecto a E47, no se pudo confirmar/descartar un efecto regulador, ya que su transfección en células MDCK produjo una activación del promotor de *E2-2A*, aunque también originó un aumento similar en la actividad del vector control pGL2 vacío (datos no mostrados). Conjuntamente, estos resultados indican que Snail1 y Snail2 activan la transcripción de *E2-2A* (al menos del promotor específico *E2-2A*), ya sea de manera directa o indirecta. En el caso de E47, el aumento observado en los niveles del RNAm de *E2-2A* en células MDCK-E47 podría ser independiente de activación transcripcional.

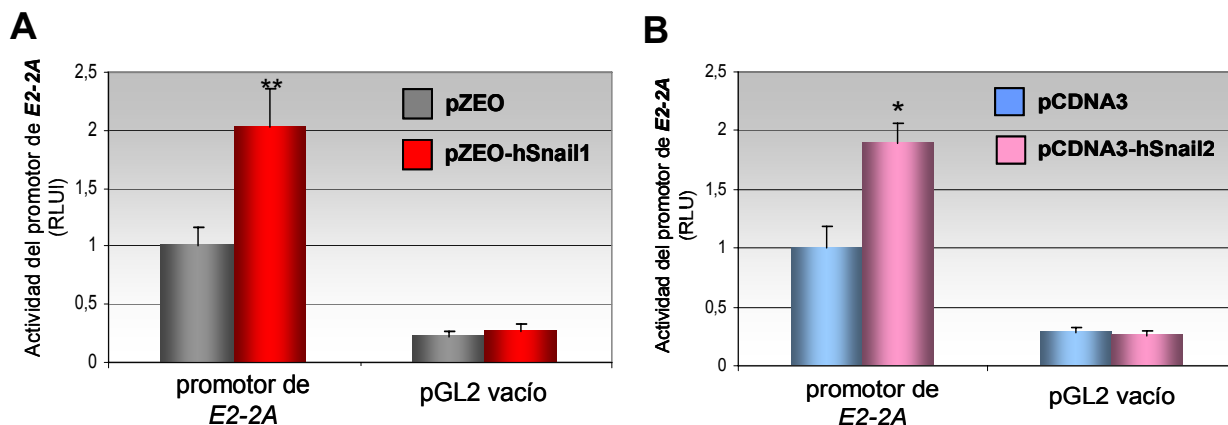


Figura 23. La expresión transitoria de Snail1 y Snail2 conlleva la activación del promotor de *E2-2A*. Actividad del promotor de *E2-2A* (2,9 kb) humano luego de la transfección transitoria de (A), pZEO-hSnail1 o (B) pcDNA3-hSnail2, y sus respectivos controles pZEO y pcDNA3, respectivamente, en células MDCK. Como control adicional, se muestra la actividad del plásmido testigo vacío, pGL2 (barras de la derecha). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 48 h. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida para el promotor de *E2-2A* en presencia de pZEO (A) o pcDNA3 (B). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, dos experimentos independientes, realizados en muestras por triplicado, para cada una de las condiciones experimentales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, prueba *t* de Student.

Con el objeto de profundizar en la caracterización del promotor de *E2-2A*, y determinar, si las cajas E proximales (o alguna de ellas) son responsables de la activación mediada por Snail1, se diseñaron distintas construcciones en las que se eliminó la región más distal (construcción B) y cada una de las cajas E progresivamente ([Figura 24A](#)).

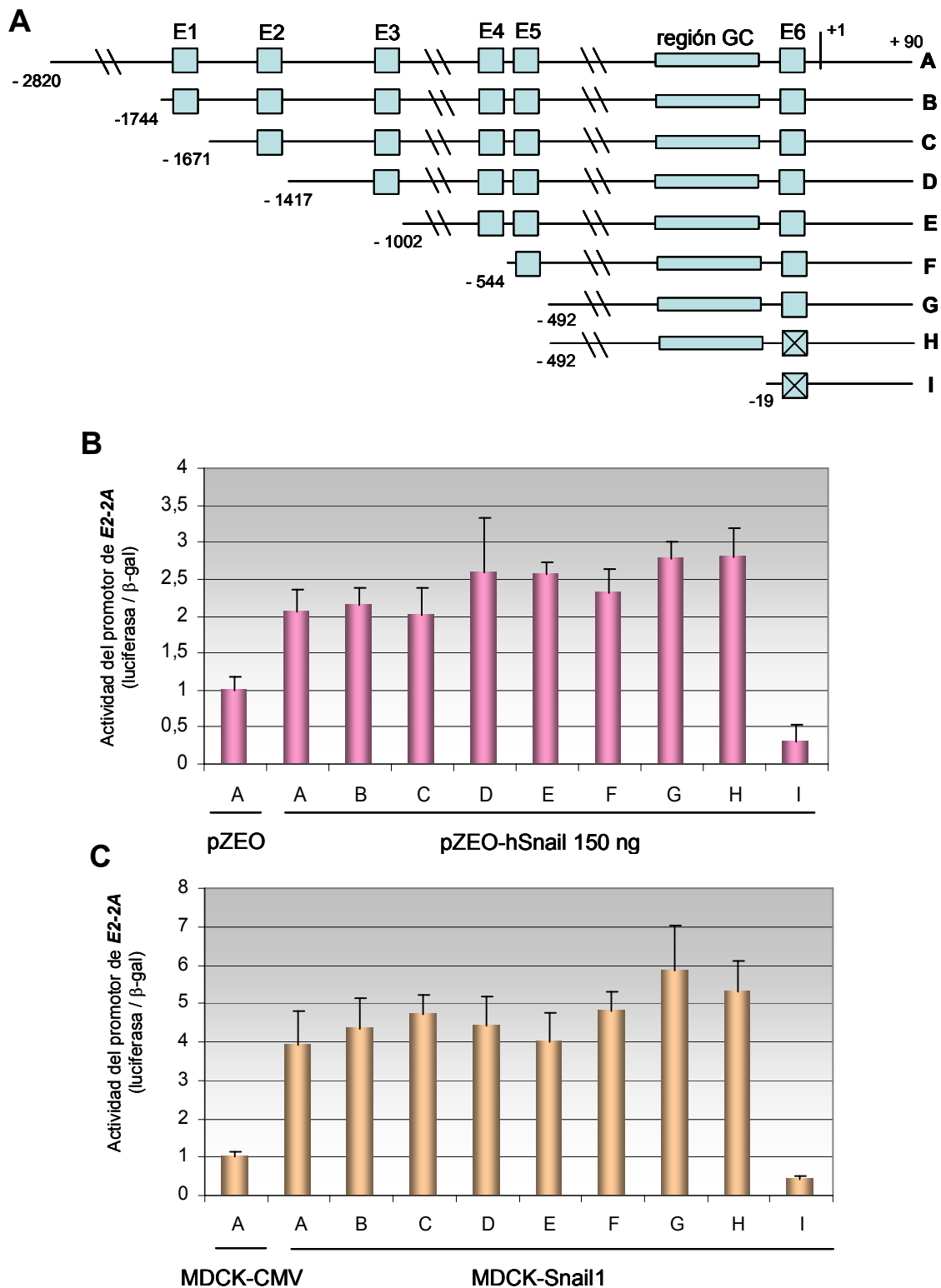


Figura 24. Las cajas E no participan en la activación del promotor de *E2-2A* mediada por Snail1. **A.** Representación esquemática de las diferentes construcciones utilizadas (A-I) en los ensayos de actividad promotora. En las construcciones H e I, la caja E6 está eliminada por mutación puntual. **B** y **C**, actividad de las diferentes construcciones del promotor de *E2-2A* descritas en **A**, tras la transfección transitoria de hSnail1 (**B**), o en células MDCK-Snail1 (**C**), y en sus respectivos controles, células MDCK en presencia de pZEO (**B**), y células MDCK-CMV (**C**). Las actividades luciferasa y β-galactosidasa se determinaron a las 48 h. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida para el promotor de *E2-2A* en presencia de pZEO (**B**) o células MDCK-CMV (**C**).

Como se muestra en la Figura 24, la eliminación de las cajas E1 a E5 (construcciones C a G) no influye en la actividad transcripcional del promotor de *E2-2A* en células MDCK transfectadas con el factor Snail1 transitoriamente (Figura 24B), ni en células MDCK-Snail1 (Figura 24C). Tampoco afecta a la actividad del promotor de *E2-2A* la mutación de la caja E6 proximal en presencia de la región rica en GC intacta (construcción H). Por el contrario, la eliminación de la región comprendida entre -492/-19, que contiene la región rica en GC (construcción I), disminuye drásticamente la actividad del promotor de *E2-2A*. Estos resultados indican que el mecanismo de activación del promotor de *E2-2A* por Snail1 es independiente de las cajas E analizadas, mientras que la región comprendida entre -492/-19 sería necesaria para la actividad de dicho promotor. No obstante, no se puede descartar que la eliminación de la región -492/-19 impida el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción, al inicio de transcripción.

3.2 Regulación de los promotores de *Snail1*, *Snail2* y *E2A* por E2-2

Con el propósito de estudiar si los factores E2-2 tienen algún efecto sobre la actividad de los promotores de *Snail1*, *Snail2* y/o *E2A*, analizamos la actividad de dichos promotores en presencia de E2-2A/B. Como muestra la Figura 25, E2-2A y E2-2B reprimen el promotor de *Snail1* tanto en células MDCK (que poseen bajos niveles endógenos de todos los factores) como en células CarB (que tienen niveles endógenos elevados). Ambas isoformas se comportan de manera similar en células MDCK (Figura 25A), mientras que E2-2B muestra una mayor acción represora que E2-2A, sobre el promotor de *Snail1* en células CarB (Figura 25B), coincidiendo con la acción de ambas isoformas sobre el promotor de *cadherina-E* (Figuras 8 y 9).

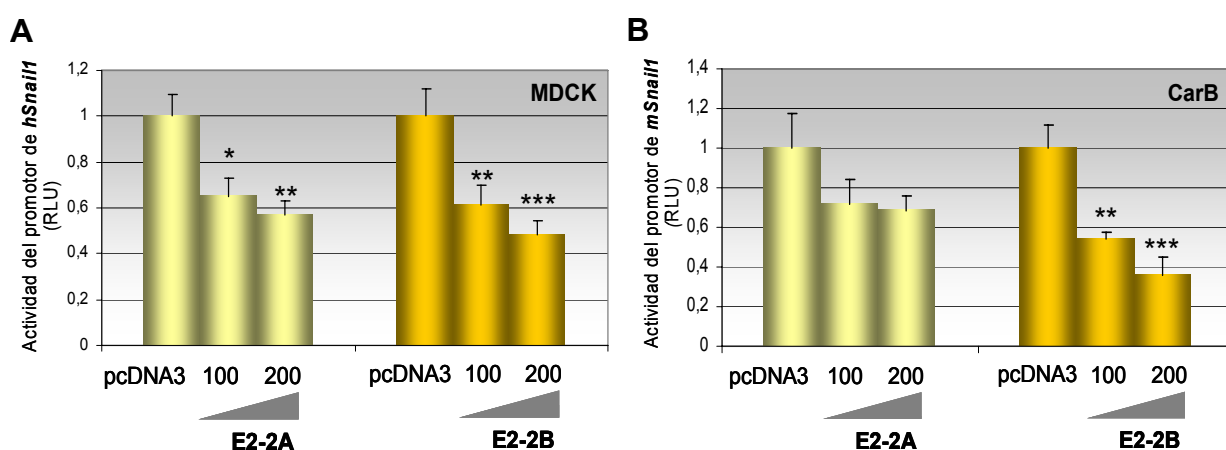


Figura 25. Efecto de la expresión transitoria de los factores E2-2A/B sobre el promotor de *Snail1*. Actividad del promotor de *Snail1* humano en células MDCK (A) o del promotor de *Snail1* murino en células CarB (B), luego de la transfección transitoria de cantidades crecientes (100 y 200 ng) de pcDNA3-E2-2A o vector vacío (200 ng) (paneles de la izquierda, barras amarillas), o de pcDNA3-E2-2B y su correspondiente vector vacío (paneles de la derecha, barras naranjas). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 24 h. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida en presencia de pcDNA3. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes, realizados por triplicado, para cada una de las condiciones experimentales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba *t* de Student, con respecto a la actividad en presencia de vector vacío.

Con respecto a la acción de E2-2A/B sobre el promotor de *Snail2*, se analizó su actividad en ambos tipos celulares. Si bien en presencia de la isoforma E2-2A se observa una disminución en la actividad del promotor de *Snail2* en células MDCK, este cambio no es estadísticamente significativo (Figura 26A, izquierda). Por su parte, la isoforma E2-2B sí es capaz de reprimir la actividad de este promotor de manera significativa en este sistema celular (Figura 26A, derecha). En el caso de las células CarB, E2-2A no modifica la actividad del promotor de *Snail2*, mientras que E2-2B produce una disminución moderada (~ 40%), que no resultó ser estadísticamente significativa (Figura 26B). Estos resultados sugieren que los factores E2-2 regulan diferencialmente los promotores de *Snail1* y *Snail2*, dependiendo del contexto celular.

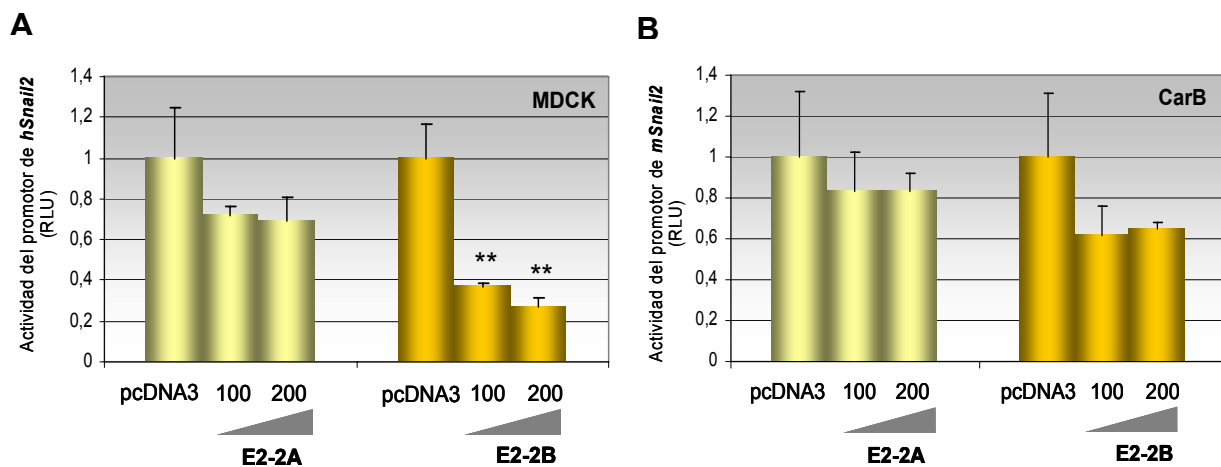


Figura 26. Efecto de la expresión transitoria de los factores E2-2A/B sobre el promotor de *Snail2*. Actividad del promotor proximal de *Snail2* humano en células MDCK (A) o murino en células CarB (B), luego de la transfección transitoria de cantidades crecientes (100 y 200 ng) de pcDNA3-E2-2A o vector vacío (200 ng) (amarillos), o de pcDNA3-E2-2B y su correspondiente vector vacío (naranja). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 24 hs. post-transfección. La actividad del promotor está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida en presencia de pcDNA3. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes, realizados por triplicado, para cada una de las condiciones experimentales. ** $p < 0.01$, prueba t de Student, con respecto a la actividad en presencia de vector vacío.

Resultados preliminares sugieren que la acción reguladora de E2-2A/B sobre el promotor de *Snail2* en células MDCK está de acuerdo con una disminución en los niveles de RNAm de *Snail2* en células MDCK-E2-2A/B (datos no mostrados).

Además, analizamos la acción de los factores E2-2A/B sobre el promotor del gen *E2A*, en células MDCK. Como muestra la Figura 27A, los factores E2-2 no producen ningún efecto significativo sobre este promotor, al menos en este tipo celular.

Finalmente, nos preguntamos si los factores E2-2 tienen algún efecto sobre su propio promotor. Como se ve en la Figura 27B, ambos productos del gen *E2-2* son también capaces de reprimir el

promotor de *E2-2A*. Estos resultados concuerdan con los descritos para Snail1, que es capaz de reprimir su transcripción a través de la unión a cajas E de su promotor (Peiró, et al., 2006).

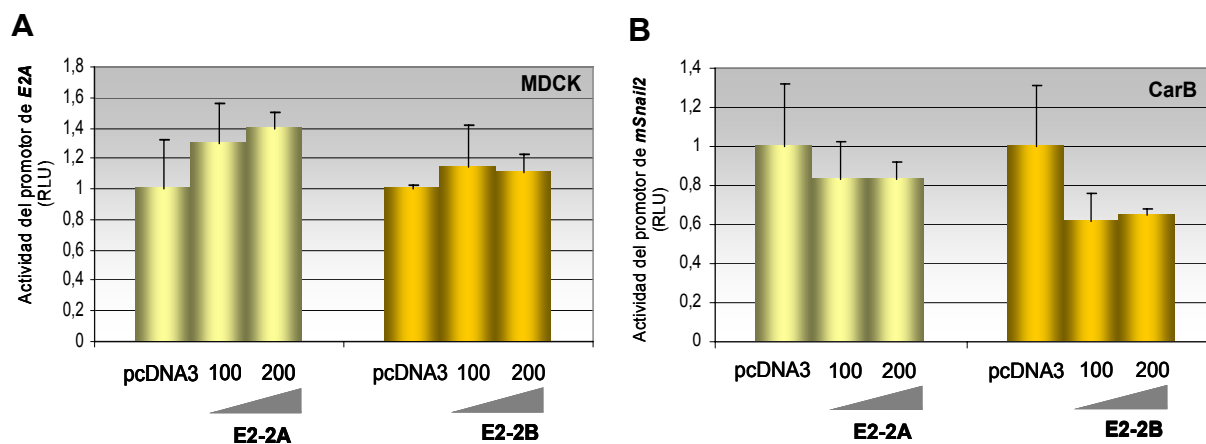


Figura 27. Efecto de la expresión transitoria de los factores E2-2A/B sobre los promotores de *E2A* y de *E2-2A*. Actividad del promotor proximal *E2A* (A) o *E2-2A* (B), en células MDCK, tras la transfección transitoria de cantidades crecientes (100 y 200 ng) de pcDNA3-E2-2A o vector vacío (200 ng) (paneles de la izquierda, barras amarillas), o de pcDNA3-E2-2B y su correspondiente vector vacío (paneles de la derecha, barras naranjas). Las actividades luciferasa y β -galactosidasa se determinaron a las 24 h. post-transfección. En ambos casos, la actividad del promotor correspondiente está expresada como actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) y normalizada con respecto a la obtenida en presencia del vector vacío control. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SD de, al menos, dos experimentos independientes, realizados por triplicado, para cada una de las condiciones experimentales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, prueba *t* de Student, con respecto a la actividad en presencia de vector vacío.

En conjunto, estos resultados indican la existencia de mecanismos de regulación cruzada entre los factores Snail y E2-2A/B.

Discusión

1. **Los factores E2-2 como represores de cadherina-E e inductores de TEM**

1.1 **Implicación de E2-2 en la TEM y la progresión tumoral**

El análisis de los perfiles de expresión de células MDCK con expresión estable de Snail1, Snail2 o E47 habían indicado que *E2-2* es una diana de estos factores (Moreno-Bueno et al., 2006). Además, y de forma interesante, otros estudios de nuestro laboratorio, habían identificado a ambas isoformas del gen *E2-2* como capaces de interactuar con el elemento E-pal del promotor de *cadherina-E* de ratón en un ensayo de híbrido sencillo (Cano et al., 2000). Estos hallazgos nos llevaron a estudiar la posible implicación de *E2-2* en la regulación de *cadherina-E* y la TEM. Efectivamente, tanto E2-2A como E2-2B reprimen el promotor de *cadherina-E* (Figuras 8 y 9) e inducen una TEM completa cuando se expresan establemente en células MDCK (Figuras 10 y 11). En concordancia con su actividad represora, la ausencia o los niveles extremadamente bajos de los transcritos de *E2-2* en los epitelios embrionarios y extraembrionarios, y su expresión en tejidos mesodérmicos (Figura 18), sigue un patrón inverso con respecto a la expresión de *cadherina-E* (Cano et al., 2000). No obstante, su aparente ausencia en regiones activas de TEM (Figura 18E) sugiere que los productos del gen *E2-2* cumplirían una función en el mantenimiento de poblaciones celulares con fenotipo mesenquimático *in vivo*. De este modo, estos resultados revelan en conjunto, una nueva función biológica para los factores E2-2A/B, en la generación y/o mantenimiento del fenotipo mesenquimático. Adicionalmente, los elevados niveles de expresión, sobre todo de E2-2B, detectados en líneas invasivas de ratón y derivadas de carcinomas escamosos humanos que carecen de expresión de *cadherina-E* (Figura 7), apoyan la participación de *E2-2* en la TEM y la progresión tumoral. En este sentido, es interesante mencionar que hemos observado que TGF- β 1 regula positivamente los niveles de dicha isoforma en células MDCK y A431 (datos no mostrados). Asimismo, es relevante mencionar que otros trabajos habían relacionado a *E2-2* con la carcinogénesis. Estudios previos habían detectado su incremento en tumores de próstata y en carcinomas de ovario con desregulación de la vía de β -catenina (Liu et al., 1997; Zhai et al., 2002) y que es capaz de inducir transformación neoplásica en células RK3E (Kolligs et al., 2002). Es importante aclarar que tanto la vía de TGF- β como la de Wnt- β -catenina son dos de las vías más importantes en los procesos de TEM que ocurren tanto en el desarrollo embrionario como en la progresión tumoral (Hay, 2005; Huber et al., 2005; Moustakas and Heldin, 2007; Thierry and Sleeman, 2006).

En relación a la vía de Wnt, el gen *E2-2* es una diana directa del complejo β -catenina/TCF, debido a la presencia de sitios de unión específicos en el promotor de E2-2B (Kolligs et al., 2002) y también en el promotor de E2-2A (Figura 28). La señalización desregulada por β -catenina ha sido implicada en TEM en el frente invasivo de tumores de colon (Brabletz et al., 2005; Fodde and Brabletz, 2007) y también, recientemente, en fibrosis renal (Ivanova et al., 2008), por lo cual sería relevante establecer la posible contribución de los factores E2-2A/B en dichos contextos. Por otra parte, es interesante mencionar que la citoquina fibrogénica CTGF (*connective tissue growth factor*), que es

inducida por TGF- β y por hipoxia (otro potente inductor de TEM, (Higgins et al., 2007; Luo et al., 2006)) en tejidos fibróticos, activa la transcripción mediada por β -catenina/TCF (Deng et al., 2007; Hong et al., 2006). CTGF ha sido implicada en procesos de fibrosis en diferentes órganos, en angiogénesis y en progresión tumoral (Deng et al., 2007; Kang et al., 2003), por lo que resultaría interesante determinar si E2-2B está mediando alguno o algunos de los efectos biológicos inducidos por CTGF. En este contexto, es interesante comentar que la expresión de CTGF se ha visto incrementada en células MDCK con expresión estable de Snail1 (Moreno-Bueno et al., 2006). Por otra parte, otro estudio publicado en 2007 indica que la activación de la vía de Wnt- β -catenina en las células estrelladas (*stellate cells*) hepáticas, tendría un papel fundamental en la fibrosis de este órgano (Cheng et al., 2007). Al producirse un daño tisular, estas células experimentan una transdiferenciación (o "activación") caracterizada por la producción de matriz extracelular y la inducción de α -actina de músculo liso (α -SMA). Precisamente, se ha descrito que el promotor de este gen puede ser activado por las diferentes proteínas E (Kumar et al., 2003), con lo cual sería importante establecer la posible contribución de E2-2B en dicho contexto.

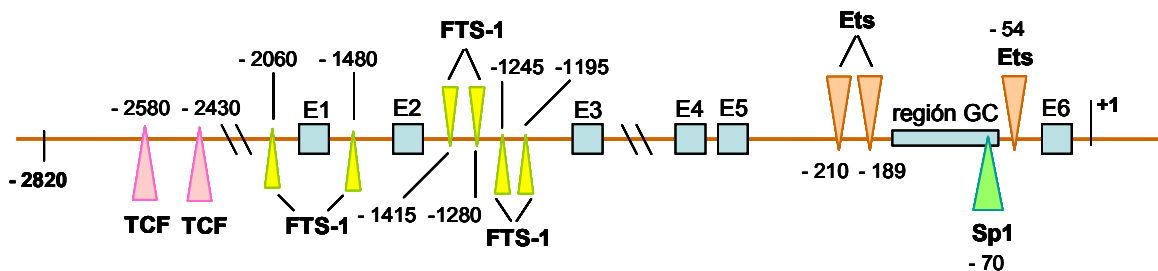


Figura 28. Representación esquemática de posibles sitios reguladores identificados en el promotor de E2-2A mediante análisis *in silico*. Se indican las cajas E analizadas (E1-E6) (celeste), y sitios putativos de regulación (con sus respectivas posiciones) por los siguientes factores: TCF/ β -catenina (rosa), Ets (naranja), Sp1 (verde), y sitios FTS-1 (amarillo).

Otro factor regulado por la vía de Wnt- β -catenina es el factor bHLH de clase II Twist1, de función muy relevante en los procesos de TEM, no sólo durante la progresión tumoral, sino también durante el desarrollo embrionario (Baylies and Bates, 1996; Yang et al., 2004). El promotor de Twist1 también posee sitios de unión para TCF/ β -catenina (Howe et al., 2003). Se ha descrito que esta vía de señalización inhibe la diferenciación de células de mama y condrocitos, a través de Twist1 (Howe et al., 2003; Reinhold et al., 2006). En este último caso, Twist1 reprime la expresión de genes específicos como *agrecano*, mediante un mecanismo aún desconocido (Reinhold et al., 2006). Por otra parte, se ha determinado que la actividad transcripcional, y por ende, el efecto biológico final, de Twist depende de su *partner* de dimerización (Connerney et al., 2006). De hecho, se ha observado que durante el desarrollo del cráneo, la inhibición de la osteogénesis por Twist y el mantenimiento de un fenotipo mesenquimático en determinadas áreas, depende de su interacción con proteínas E (Connerney et al., 2006). Por lo tanto, sería interesante indagar si heterodímeros Twist-E2-2 son funcionalmente importantes en procesos de

TEM relacionados con la progresión tumoral, en un contexto de activación de la vía de Wnt- β -catenina, o de forma independiente.

1.2 Represión del promotor de *cadherina-E* mediada por los factores E2-2A/B

Los ensayos de transfección transitoria mostraron que tanto E2-2A como E2-2B reprimen el promotor de *cadherina-E* en células MDCK. No obstante, mientras E2-2B también reprime este promotor en otros tipos celulares analizados, MCA3D y NMuMG (Figura 8), la isoforma E2-2A carece de actividad en ellos o es mucho menos potente (Figura 9 y datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con el hecho de que, a diferencia de E2-2B, que posee los dos dominios de transactivación, AD1 y AD2, E2-2A sólo posee este último (Figura 5). En este sentido, los primeros estudios de caracterización de estos dominios indicaron que el dominio AD1 es activo en un amplio espectro de tipos celulares, mientras que el AD2 tendría una actividad más restringida (Aronheim et al., 1993), lo cual ha sido confirmado en trabajos posteriores (Petropoulos et al., 2000; Bayly, et al., 2004). Asimismo, la isoforma E2-2B, a diferencia de la isoforma E2-2A, posee un dominio CE (*conserved element*) identificado recientemente (Herbs and Colligs, 2008), que podría conferirle (mayor) actividad represora en diversos tipos celulares. Por su parte, la expresión estable de E2-2A/B en células MDCK induce una TEM completa, asociada a la pérdida de expresión de *cadherina-E* y a la inducción de marcadores mesenquimáticos. Los análisis por RT-PCR y de actividad promotora, indicaron que la regulación negativa sobre los niveles de *cadherina-E* mediada por E2-2A/B en este contexto se debe también a represión transcripcional.

En cuanto al mecanismo de acción de los factores E2-2 sobre la actividad del promotor de *cadherina-E*, hemos determinado que es necesaria la integridad del elemento E-pal del promotor de ratón y la presencia de actividad HDAC (Figura 13 y datos no mostrados). El reclutamiento de complejos proteicos con actividad HDAC se ha observado para otros represores de *cadherina-E*, como Snail1 (Peinado et al., 2004b). En el caso de las proteínas E, se ha visto que uno de los mecanismos de represión transcripcional consiste en su interacción con proteínas de la familia ETO (Zhang et al., 2004), o de VDR (receptor de vitamina D) unido a ligando (en el caso de E47, en la represión de genes que codifican para las enzimas 25(OH)D3 1 α -hidroxilasa y hormona paratiroidea) (Murayama et al., 2004; Kim et al., 2007), lo que a su vez permite el reclutamiento de actividad HDAC. Por otra parte, las proteínas E actúan como dímeros, por lo cual sería interesante determinar si los factores E2-2A/B están actuando como homodímeros o heterodímeros, y en tal caso, con qué factor estarían interaccionando. Serán necesarios más estudios para determinar con mayor precisión el mecanismo de represión de *cadherina-E* mediada por los factores E2-2A/B.

2. **E2-2 y E47: proteínas E con papeles no redundantes**

Hasta hace poco tiempo, ha resultado difícil pensar en un papel específico para las proteínas bHLH de clase I, debido fundamentalmente al hecho de que presentan en muchos casos, redundancia funcional, lo que además se suma a la complejidad de sus múltiples posibles interacciones (Ik Tsen Heng and Tan, 2003). No obstante, las investigaciones de diferentes grupos están revelando que estos importantes reguladores tendrían funciones específicas, al menos en determinados contextos. Recientemente, el grupo de Flora y colaboradores, ha demostrado por primera vez, en un estudio exhaustivo, que un heterodímero proteínaE /bHLH (E2-2/Math1) tiene un papel específico en el desarrollo del sistema nervioso, resultando la falta o la disminución en los niveles de una de ellas (E2-2) en una alteración sustancial en el desarrollo de diversas estructuras neurológicas (como se observa en el síndrome de Pitt-Hopkins) (Flora et al., 2007). A nivel molecular, ese trabajo revela que en ciertas poblaciones progenitoras, la falta de E2-2 no es compensada por la presencia de las otras proteínas E (E12, E47, HEB), a pesar de su co-expresión en condiciones normales y de poseer las mismas propiedades bioquímicas. Los autores comentan que la especificidad en la regulación de determinados genes podría estar dada por la interacción del heterodímero formado con otros factores presentes en un determinado tipo celular (Flora et al., 2007).

Los resultados presentados en esta Tesis también indican una acción específica para los factores E2-2 y E47. Hemos visto que E2-2A/B inducen una TEM completa en MDCK, con pérdida de marcadores epiteliales, ganancia/reorganización de marcadores mesenquimáticos y adquisición de capacidad mótil e invasiva, fenotípicamente similar a la inducida por E47 (Pérez-Moreno et al., 2001; Kondo et al., 2004; Slattery et al., 2006). Sin embargo, hemos detectado importantes diferencias biológicas en las células MDCK que sobreexpresan cada uno de estos factores. En efecto, las células MDCK-E47 son altamente tumorogénicas y generan tumores indiferenciados con gran capacidad angiogénica (Pérez-Moreno et al., 2001; Peinado et al., 2004c; Moreno-Bueno et al., 2006), mientras que las células MDCK-E2-2 son poco o no tumorogénicas (Tabla 6). No obstante, este último tipo celular es altamente invasivo en cultivos organotípicos (Figura 16), contrariamente a las células MDCK-E47, que poseen una baja capacidad infiltrativa en este mismo tipo de ensayos (Peinado et al., 2004c).

En concordancia con estas diferencias biológicas, el análisis comparativo de los perfiles de expresión génica entre células MDCK-E2-2A/B y MDCK-E47, reveló que E2-2A/B y E47 inducen programas genéticos comunes y específicos; de hecho sólo un tercio de los genes analizados mostró una regulación similar por ambos factores (Figura 19B). La expresión constitutiva de E47 induce la expresión de genes como *RAN*, *LTBP1/3*, *PDGFC*, *STEAP1*, *EREG*, *Fes* y *FBXO11*, los cuales no están modificados (o están incluso regulados negativamente) en células que sobreexpresan E2-2A/B (Tabla 7). Estos genes codifican para proteínas con funciones relevantes en el proceso tumoral, que vale la pena destacar. Por su parte, la GTPasa pequeña Ran, implicada inicialmente en transporte núcleo-citoplasma

(Weis, 2003) ha sido identificada recientemente como una diana terapéutica prometedora, clave en la supervivencia de diversas líneas tumorales humanas (Morgan-Lappe et al., 2007). LTBP1/3 podrían promover el ensamblaje, la acumulación y/o activación de TGF- β , regulando su biodisponibilidad (Oklu and Hesketh, 2000); recientemente se ha determinado que la falta de expresión de LTBP-1 afecta negativamente la fibrogénesis hepática (Drews et al., 2008). Por otro lado, tanto PDGF α como PDGF β están implicados en proliferación, migración celular y remodelación de la MEC en el desarrollo embrionario y la progresión tumoral (Xu et al., 2005; Tejada et al., 2006). EREG ha sido recientemente implicada en el desarrollo de tumores fibrosos de piel y en procesos inflamatorios y neoplásicos del colon (Li et al., 2008; Nishimura et al., 2008), y STEAP1, en el crecimiento de tumores de próstata (Challita-Eid et al., 2007). Asimismo, es interesante mencionar que la proteína quinasa Fes, que induce respuestas angiogénicas en células endoteliales (Mochizuki et al., 2002; Kanda et al., 2003), se ha identificado recientemente en la vía de señalización de Kit (receptor con actividad tirosina-quinasa, activado frecuentemente en tumores e involucrado en proliferación) (Voisset et al., 2007), y en procesos de TEM o *scattering* celular inducidos por HGF (Naba et al., 2008). Por último, es pertinente comentar que FBXO11 interacciona con la proteína p53 e inhibe su actividad transcripcional (Abida et al., 2007). Por lo tanto, la regulación diferencial de estos genes, o de algunos de ellos, podría explicar las diferencias en tumorigenicidad y proliferación mostradas por las células MDCK-E2-2A/B y MDCK-E47. No obstante, es posible que ocurra, de forma no excluyente, una regulación diferencial a nivel post-transcripcional, de otros productos génicos que pudieran conferir diferentes propiedades biológicas a ambos tipos celulares.

Con respecto a la función de los productos de los genes *E2-2* y *E2A* en el desarrollo embrionario, sus patrones de expresión en embriones tempranos de ratón se solapan en el mesodermo temprano y en estructuras derivadas de éste, pero no son idénticos. De hecho, la expresión de *E2-2* es más restringida que la de *E2A* (Figura 18), lo que sugiere un papel específico, complementario, para estos factores bHLH en la regulación de *cadherina-E* y el mantenimiento del fenotipo mesenquimático, tal como había sido sugerido previamente en el desarrollo neural (Ik Tsen Heng and Tan, 2003).

3. Relación funcional entre diferentes inductores de TEM

Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos años, sugieren la existencia de una regulación cruzada entre diferentes represores de *cadherina-E*/inductores de TEM, que podría indicar una jerarquía en su acción. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario de ratón, *Snail1* se expresa en las áreas activas de TEM del mesodermo y la cresta neural del embrión de ratón, mientras que *Snail2*, *E2A* y *E2-2* se expresan en células mesenquimáticas ya migratorias (Cano et al., 2000, Pérez-Moreno et al., 2001; Nieto 2002) (Figura 18). Por su parte, la expresión de ZEB-2 (*ZFHX1B*) está restringida a una subpoblación de células de la cresta neural (van de Putte et al., 2003; Bassez et al., 2004). En células en

cultivo, la expresión de Snail1 promueve la expresión de otros factores como ZEB-1, ZEB-2 (Guaita et al., 2002; Taki et al., 2005), y también de Snail2 y E2-2 (Moreno-Bueno et al., 2006; Cubillo, 2007, Tesis doctoral) (Figura 7). Estas observaciones junto con estudios funcionales de interferencia de Snail1 en líneas celulares derivadas de carcinomas (Olmeda et al., 2007a, 2007b), indican que Snail1 tendría un papel preponderante en la inducción de TEM tanto durante el desarrollo embrionario como en la progresión tumoral, mientras que factores como Snail2, E47, E2-2, y/o ZEB-1/2 jugarían un papel en el mantenimiento del fenotipo mesenquimático. No obstante, también podría ocurrir que alguno/s de estos factores tuviera una función predominante dependiendo del tipo celular/tumoral en cuestión. Un estudio reciente puso de manifiesto que tanto ZEB-1, como ZEB-2 y E47 reprimen el promotor de *cadherina-E* e inducen TEM en células normales de epitelio mamario NMuMG, mientras que Snail1 no modifica ni la expresión de *cadherina-E* ni el fenotipo en dichas células (Shirakihara et al., 2007). Estas observaciones apoyan la idea de una acción de los diferentes factores, dependiente del contexto celular, al menos en ciertos casos. Asimismo, la expresión de ZEB-1 se ha detectado asociado a represión de *cadherina-E* en algunos subtipos de carcinomas colorectales que no muestran inducción de Snail1/2 (Peña et al., 2006).

3.1 Regulación cruzada entre factores Snail y bHLH de clase I a nivel transcripcional

Las interacciones observadas entre factores Snail y E47 (Cubillo, 2007, Tesis doctoral) nos llevaron a plantear el estudio adicional de E2-2. Los ensayos de actividad del promotor proximal de E2-2A indicaron que tanto Snail1 como Snail2 promueven su activación en células MDCK (Figuras 22 y 23). La activación mediada por Snail1 parece depender de secuencias localizadas entre las posiciones -492 y -19 del promotor de *E2-2A* siendo independiente de la presencia de cajas E (Figura 24). El análisis *in silico* del promotor de *E2-2A* reveló la existencia de posibles sitios de unión para factores Ets y Sp1, en las posiciones -209, -189 y -54 (Ets), y -70 (Sp1) (Figura 28), detectados con el programa informático *TF search* (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html). Los factores Ets-1 y/o Sp1 han sido implicados en mecanismos indirectos de activación de genes por Snail1, como en el caso de los promotores de MMP-2, MMP-9 e ID1 (Taki et al., 2006; Jordá et al., 2005; Jordá 2007), y por E47, en la activación del promotor de ID1 (Jordá 2007), por lo cual sería interesante determinar si en el caso de E2-2A se trata de un mecanismo similar.

Otro sitio regulador implicado en expresión de genes relacionados con el proceso de TEM es FTS-1 (*fibroblast transcription site 1*). La presencia de dicho sitio (de la forma TTGAT) fue identificada en el promotor de FSP1 (proteína específica de fibroblastos 1, también conocida como S100A4), la cual está implicada en TEM, fibrosis tisular, invasividad y metástasis (Venkov et al., 2007). A los sitios FTS-1 se unen los factores CBF-A y KAP-1. Se ha visto que TGF- β induce CBF-A, lo que resulta en la formación de un complejo CBF-A/KAP-1, que lleva a la activación del gen de *FSP1*. A su vez, la sobreexpresión de CBF-A en células epiteliales induce TEM. Los sitios reguladores FTS-1 están presentes en un elevado número de genes, además de *FSP1*, como en los promotores de los factores

Snail1 y *Twist*, y también en los de *cadherina-E*, *cadherina-N*, *ZO-1*, α -SMA y *vimentina*, entre otros (Venkov et al., 2007). De este modo, CBF-A podría ser un regulador temprano de TEM, modulando la expresión, de forma directa y/o indirecta, de diversos genes involucrados en este proceso (Venkov et al., 2007) (Figura 29). De forma interesante, el promotor de E2-2A, así como el de E2-2B (Kolligs et al., 2002; datos no mostrados) también poseen sitios FTS-1 (Figura 28). No obstante, la presencia de dichos sitios en el promotor de E2-2A *upstream* de la posición -492, sugiere que su participación sería independiente de la regulación mediada por *Snail1*.

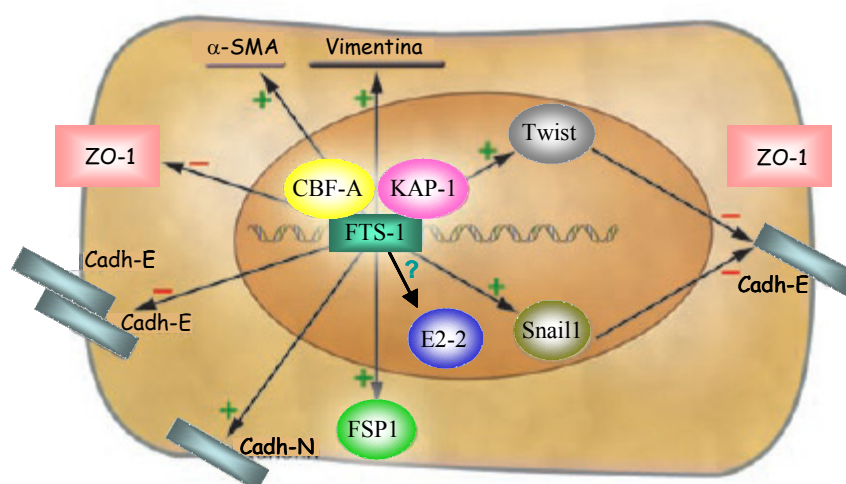


Figura 29. Modelo de acción del complejo CBF-A/KAP-1/FTS-1. En células epiteliales que están en un proceso de TEM, las proteínas CBF-A y KAP-1 se unen a sitios FTS-1 distribuidos a lo largo del genoma. De este modo, se regula la expresión de diferentes genes posiblemente debido a la presencia de sitios FTS-1 en sus promotores. Los signos + y - indican si los niveles de determinada proteína aumentan o disminuyen, respectivamente, por la acción del complejo CBF-A/KAP-1/FTS-1. Cadh-E: cadherina-E; Cadh-N: cadherina-N; ZO-1: zona ocludens 1. Se indica con una flecha y un signo de interrogación la posible regulación de E2-2. Adaptado de Teng et al., 2007.

Por otra parte, si bien en células MDCK-E47 los niveles de RNAm de E2-2A y E2-2B se encuentran incrementados (Figura 7), la actividad del promotor de E2-2A no se encuentra aumentada en células MDCK-E47 con respecto a células MDCK-CMV (Figura 22). En este sentido, se ha observado que E47 promueve la expresión de *Snail2* (Cubillo, 2007, Tesis doctoral), lo que podría sugerir que E47 podría regular positivamente la actividad del promotor de E2-2A de manera indirecta, a través de *Snail2*. Otro mecanismo posible, y no excluyente, dependería de la activación del receptor de PDGF (PDGFR). Recientemente, se ha determinado que la activación de dicho receptor promueve la formación de complejos β -catenina/TCF en el núcleo celular independientemente de Wnt (Yang et al., 2006), lo que podría activar el promotor de E2-2A, debido a la presencia de sitios de unión específicos para este complejo (Figura 28). La inducción de PDGFa (Moreno-Bueno et al., 2006) y de PDGFc (Tabla 7, Figura 20), observada en células MDCK-E47, apoya este posible mecanismo de regulación, si bien son necesarios estudios funcionales para confirmarlo.

Como se comentó anteriormente, Snail1 activa la transcripción de *E2-2*. A su vez, los productos del gen *E2-2* son capaces de regular negativamente la expresión de Snail1 a nivel transcripcional (Figura 25). Estos resultados coinciden con la expresión de ambos factores en embriones tempranos de ratón, ya que Snail1 se expresa en regiones activas de TEM, mientras que *E2-2* lo hace en células ya migratorias, donde la expresión de Snail1 es baja o prácticamente inexistente. Por otra parte, Snail1 es capaz de inducir la expresión de Snail2 (Cubillo, 2007, Tesis doctoral; Aybar et al., 2003), el cual posee un perfil de expresión solapado con *E2-2*. Este hecho indicaría que los factores Snail2 y *E2-2A/B* podrían co-expresarse en determinados tipos celulares, lo que coincide con la baja capacidad mostrada por los factores *E2-2A/B* de modular la actividad del promotor de *Snail2* en células con fenotipo fibroblástico, como CarB (Figura 26B). Con respecto al gen *E2A*, los factores *E2-2A/B* no parecen modular negativamente la actividad de su promotor (Figura 27), lo que también coincide con la co-expresión de las proteínas E en numerosos tejidos. En conjunto, estos datos apoyan la idea de una red de interacciones entre los factores de la familia Snail y los factores bHLH de clase I (Figura 30).

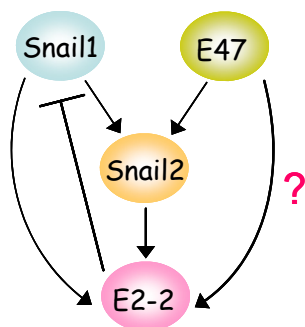


Figura 30. Modelo de regulación cruzada a nivel transcripcional entre factores de la familia Snail y bHLH de clase I en células MDCK. Los factores Snail1 y Snail2 activan la transcripción de *E2-2A*. A su vez, los factores *E2-2A/B* reprimen la expresión de Snail1. Por su parte, el factor E47 podría activar la expresión de *E2-2A/B* de manera indirecta, a través de Snail2 o a través de otros mecanismos (indicado con un signo de interrogación).

3.2 ZEB-1 e IDs como dianas de los factores *E2-2A/B*, E47 y otros inductores de TEM

Un estudio reciente llevado a cabo en células NMuMG reveló que E47 modula positivamente la expresión de ZEB-1/TCF8, posiblemente a través de cajas E presentes en su promotor (Shirakihara et al., 2007). La expresión de ZEB-1 se ve incrementada en células MDCK con expresión estable de E47 y de los factores *E2-2A/B* (Figura 20), así como de Snail1/2 (Moreno-Bueno et al., 2006). Asimismo, la expresión de ZEB-1 también puede ser incrementada por el factor Ets-1 (Shirakihara et al., 2007) y de forma indirecta por Snail1 (Guaita et al., 2002). De este modo, ZEB-1, recientemente identificado como un promotor de metástasis en cáncer colorectal (Spaderna et al., 2008), es una diana común de diferentes inductores de TEM. Entre las señales que pueden modular la expresión de ZEB-1 de forma coordinada con los otros reguladores de TEM, se encuentra TGF- β 1. Es interesante destacar que TGF- β 1 regula positivamente la expresión de Snail1 (Peinado et al., 2003), Snail2 (Choi et al., 2007; Takano et al.,

2007), Ets-1 (Shirakihara et al., 2007; Taki et al., 2006) y E2-2B (datos no mostrados), y modula positivamente la actividad de proteínas bHLH a través de la disminución de los niveles de ID2 (Kondo et al., 2004; Shirakihara et al., 2007). En la **Figura 31** se muestra un esquema que representa diferentes relaciones funcionales que convergen en la regulación positiva de ZEB-1, a partir de la señalización por TGF- β 1.

Otros factores modulados positivamente por E47 y E2-2A/B son ID1 e ID3 (**Figura 20 y datos no mostrados**), lo cual parece ser común a otros represores de cadherina-E e inductores de TEM, como Snail1 y Snail2 (Moreno-Bueno et al., 2006). En el caso de ID1, se ha determinado que su activación en células MDCK-Snail1 y MDCK-E47 depende de la acción del factor Sp1 sobre el promotor, mientras que las cajas E presentes no parecen ser necesarias (Jordá et al., 2007). No obstante, la complejidad de las acciones biológicas de los factores ID hace difícil asociar (en ausencia de datos funcionales), la expresión de algunos miembros con las propiedades biológicas de las células MDCK-E2-2A/B.

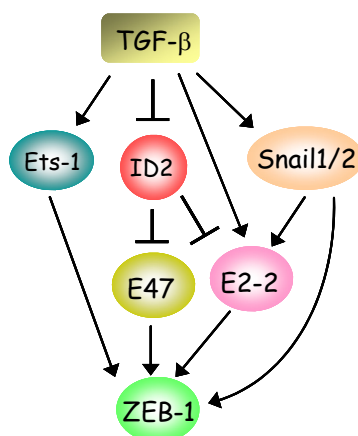


Figura 31. Diferentes factores de transcripción implicados en TEM convergen en la regulación positiva de ZEB-1. TGF- β induce la expresión de los factores Ets-1, Snail1/2 y E2-2, y regula negativamente los niveles de ID2. El factor Ets-1 puede modular positivamente la expresión de ZEB-1 debido a la presencia de sitios de unión para aquel factor en el promotor de ZEB-1. ID2 inhibe la función de los factores bHLH E47 y E2-2. A su vez, los factores Snail pueden incrementar la expresión de E2-2 y de ZEB-1. Tanto E47 como E2-2 pueden modular positivamente la expresión de ZEB-1 presuntamente a través de cajas E presentes en el promotor de ZEB-1.

3.4 E2-2 y ZEB-2 están implicados en patologías similares en el ser humano

En 2007, diferentes grupos determinaron independientemente que la causa del síndrome de Pitt-Hopkins está dada por la haploinsuficiencia de E2-2 (Amiel et al., 2007; Brockschmidt et al., 2007; Zweier et al., 2007). Este síndrome es similar al de Mowat-Wilson (MIM 235730) (Mowat et al., 1998; Zweier et al. 2002), cuyos pacientes padecen retraso mental severo debido a anomalías en el desarrollo de ciertas regiones del sistema nervioso (SN), deficiencias en la innervación de tracto gastro-intestinal, dismorfología cranio-facial y en ocasiones, defectos cardíacos. Casualmente, estudios mutacionales en pacientes indican que la etiología del síndrome de Mowat-Wilson es la falta de un alelo funcional de

ZEB-2, lo que apoya que ambos factores están implicados en patologías similares, además de la progresión tumoral.

Estudios llevados a cabo con el objeto de determinar las bases moleculares y celulares del síndrome de Mowat-Wilson, revelaron que los embriones de ratones *ZEB-2* *-/-* (que mueren en el estadio 9.5 d.p.c.) poseen deficiencias en la migración de células de la cresta neural y en la regulación negativa de cadherina-E en ciertas poblaciones celulares, coherente con el papel de *ZEB-2* como represor de cadherina-E e inductor de TEM (van de Putte et al., 2003). Esto podría explicar no sólo las anomalías en el desarrollo del SN en los pacientes con el síndrome de Mowat-Wilson, sino también otras alteraciones (van de Putte et al., 2003). De hecho, estudios posteriores determinaron que la falta de *ZEB-2* en la cresta neural inhibe la migración de determinados grupos de células a diferentes sitios como el intestino y el corazón, mientras que no afectaría a la migración de los progenitores de las estructuras craneofaciales (van de Putte et al., 2007).

En el caso del síndrome de Pitt-Hopkins, se ha especulado acerca de su etiología, relacionándose la insuficiencia en los niveles de *E2-2* con una diferenciación anómala de grupos neuronales en diversas regiones del SN e incluso de células de la cresta neural (Amiel et al., 2007; Flora et al., 2007). No obstante, de acuerdo a la implicación de *E2-2* en la represión de cadherina-E y la TEM, es posible que su falta de expresión adecuada afecte también la migración de estos grupos celulares o de algunos de ellos. Si bien se han generado ratones *knock out* de *E2-2* que revelaron la acumulación anómala de determinados precursores en el SN (Flora et al., 2007), no se han publicado hasta el momento estudios similares a los llevados a cabo para *ZEB-2*.

El hecho de que la falta de *ZEB-2* en homocigosis resulte en la muerte prematura de los embriones de ratón mientras que una deficiencia análoga de *E2-2* les permita llegar a término, sumado a que ambos genes tienen expresión solapada en diversas regiones (Bassez et al., 2004) (Figura 18), sugiere que *ZEB-2* podría desempeñar su función río arriba de *E2-2*. Sin embargo, el hecho de que los pacientes de ambos síndromes posean también características particulares, podría significar que cada factor sea preponderante en determinadas poblaciones celulares. Sería interesante estudiar la posible relación funcional entre ambos factores con el objeto de profundizar en el conocimiento de las alteraciones causadas por su desregulación. El conocimiento de las bases moleculares de estas patologías podría no sólo servir para mejorar el manejo de los pacientes, sino también para dar consejo genético a los futuros padres e incluso permitir una posible terapia génica.

Conclusiones

1. La expresión de E2-2A y E2-2B se encuentra incrementada en células MDCK con expresión estable de Snail1, Snail2 o E47 con respecto a células control CMV, y en otras líneas de carcinomas con expresión endógena de estos factores, lo que indica que el gen *E2-2* es una diana directa o indirecta de estos factores.
2. E2-2A y E2-2B actúan como represores transcripcionales de *cadherina-E*. La isoforma E2-2B presenta mayor capacidad represora en ciertas líneas celulares epiteliales, como MCA3D y NMuMG. La acción de los factores E2-2A y E2-2B sobre el promotor de *cadherina-E* de ratón depende de la integridad del elemento Epal y de actividad de acetilasa de histonas.
3. La expresión estable de E2-2A o E2-2B en MDCK induce un proceso de transición epitelio-mesénquima completo, asociado a la pérdida de expresión de *cadherina-E*, a un aumento en la expresión y organización de marcadores mesenquimáticos, y a la adquisición de capacidad migratoria e invasiva *in vitro*.
4. El gen *E2-2* sigue un patrón de expresión inverso al gen de *cadherina-E* en el desarrollo embrionario temprano de ratón, estando presente en el mesodermo y ausente en los epitelios embrionarios. El patrón de expresión de *E2-2* es similar al del gen *E2A*, aunque algo más restringido.
5. El análisis comparativo de los perfiles de expresión de células MDCK-E2-2 y MDCK-E47 reveló que ambos tipos de factores bHLH inducen programas genéticos comunes y específicos, lo cual puede explicar propiedades biológicas similares (ej. transición epitelio-mesénquima) y diferentes (ej. tumorigenicidad, invasividad) conferidas por estos factores.
6. El estudio del promotor proximal de *E2-2A* mostró que puede ser activado por los factores Snail1 y Snail2 (de manera directa o indirecta). En el caso de Snail1, el mecanismo es independiente de la presencia de las cajas E situadas en la región de -2000/+90, mientras que la zona comprendida entre -500/-20 parece ser la responsable de tal activación.

Bibliografía

- Abida, W. M.,** Nikolaev, A., Zhao, W., Zhang, W. and Gu, W. (2007). FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 1797-804.
- Aigner, K.,** Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., Sommergruber, W., Schweifer, N., Wernitznig, A., Beug, H., Foisner, R. and Eger, A. (2007). The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*. **26**, 6979-6988.
- Alani, R. M.,** Young, A. Z. and Shifflett, C. B. (1999). Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* **98**, 7812-7816.
- Alani, R. M.,** Hasskarl, J., Grace, M., Hernandez, M. C., Israel, M. A. and Münger, K. (1999). Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proc. Nat. Acad. Sci U S A.* **96**, 9637-9641.
- Amiel, J.,** Rio, M., de Pontual, L., Redon, R., Malan, V., Boddaert, N., Plouin, P., Carter, N. P., Lyonnet, S., Munnich, A. and Colleaux, L. (2007). Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 988-993.
- Aronheim, A.,** Shiran, R., Rosen, A. and Walker, M. D. (1993). The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* **90**, 8063-8067.
- Aybar, M. J.,** Nieto, M. A. and Mayor, R. (2003). Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development.* **130**, 483-494.
- Barrallo-Gimeno, A.** and Nieto, M. A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* **132**, 3151-3161.
- Bassez, G.,** Camand, O. J., Cacheux, V., Kobetz, A., Dastot-Le Moal, F., Marchant, D., Catala, M., Abitbol, M. and Goossens, M. (2004). Pleiotropic and diverse expression of ZFHX1B gene transcripts during mouse and human development supports the various clinical manifestations of the "Mowat-Wilson" syndrome. *Neurobiol. Dis.* **15**, 240-250.
- Battle, E.,** Sancho, E., Franci, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 84-89.
- Baylies, M. K.** and Bate, M. (1996). Twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science.* **272**, 1481-1484.
- Bayly, R.,** Chuen, L., Currie, R. A., Hyndman, B. D., Casselman, R., Blobel, G. A. and LeBrun D. P. (2004). E2A-PBX1 interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 55362-55371.
- Becker, K. F.,** Atkinson, M. J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J. R. and Höfler, H. (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.Rev.* **54**, 3845-3852.
- Beck, G. R. Jr,** Zerler, B. and Moran, E. (2001). Gene array analysis of osteoblast differentiation. *Cell Growth Differ.* **12**, 61-83.

- Begley, C. G.,** Aplan, P. D., Denning, S. M., Haynes, B. F., Waldmann, T. A. and Kirsch, I. R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Natl. Acad. USA.* **86**, 10128-10132.
- Behrens, J.,** Lowrick, O., Klein-Hitpass, L. and Birchmeier. (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **98**, 130-135.
- Behrens, J.,** Frixen, U., Schipper, J., Weidner, M. and Birchmeier, W. (1992). Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin. Cell Biol.* **3**, 169-178.
- Behrens, J.** (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 15-30.
- Benezra, R.,** Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell.* **61**, 49-59.
- Bergvist, I.,** Eriksson, M., Saarikettu, J., Eriksson, B., Corneliussen, B., Grundstrom, T. and Holmberg, D. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2857-2863.
- Berx, G.,** Becker, K. F., Höfler, H. and van Roy, F. (1998). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum. Mutat.* **12**, 226-237.
- Berx, G.,** Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. (2007). Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin. Exp. Metastasis.* **24**, 587-597.
- Biggs, J.,** Murphy, E. V. and Israel, M. A. (1992). A human ID-like helix-loop-helix protein expressed during early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 1512-1516.
- Birchmeier, W.** and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta.* **1198**, 11-26.
- Bolós, V.,** Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M. and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47. *J. Cell Sci.* **116**, 499-511.
- Brabletz, T.,** Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A. and Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs.* **179**, 56-65.
- Bradney, C.,** Hjelmeland, M., Komatsu, Y., Yoshida, M., Yao, T. P. and Zhuang, Y. (2003). Regulation of E2A activities by histone acetyltransferases in B lymphocyte development. *J. Biol. Chem.* **278**, 2370-2376.
- Brockschmidt, A.,** Todt, U., Ryu, S., Hoischen, A., Landwehr, C., Birnbaum, S., Frenck, W., Radlwimmer, B., Lichter, P., Engels, H., Driever, W., Kubisch, C. and Weber, R. G. (2007). Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor TCF4. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1488-1294.

Cannarozzi, G., Schneider, A. and Gonnet, G. (2007). A Phylogenomic Study of Human, Dog and Mouse. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e2. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030002.

Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76-83.

Challita-Eid, P. M., Morrison, K., Eteessami, S., An, Z., Morrison, K. J., Perez-Villar, J. J., Raitano, A. B., Jia, X. C., Gudas, J. M., Kanner, S. B. and Jakobovits, A. (2007). Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vitro and growth of human tumor xenografts in vivo. *Cancer Res.* **67**, 5798-5805.

Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L. D., Kay, C. M. and Gumbiner, B. M. (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J. Cell Biol.* **154**, 231-243.

Chen, B. and Lim, R. W. (1997). Physical and functional interactions between the transcriptional inhibitors Id3 and ITF-2b. Evidence toward a novel mechanism regulating muscle-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 2459-2463.

Cheng, J. H., She, H., Han, Y. P., Wang, J., Xiong, S., Asahina, K. and Tsukamoto, H. (2007). Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G39-49.

Choi, J., Park, S. Y. and Joo, C. K. (2007). Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 2708-2718.

Christiansen, J. J. and Rajasekaran A. K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* **66**, 8319-8326.

Christofori, G. and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 73-76.

Christy, B. A., Sanders, L. K., Lau, L. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nathans, D. (1991). An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. USA.* **88**, 1815-1819.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroek, D. and van Roy F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell.* **7**, 1267-1278.

Condeelis, J. and Pollard, J. W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis. *Cell.* **124**, 263-266.

Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Muentener, C., Mercado, M. A. and Spicer, D. B. (2006). Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev. Dyn.* **235**, 1345-1457.

Coppe, J. P., Itahana, Y., Moore, D. H., Bennington, J. L. and Desprez, P. Y. (2004). Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. *Clinical Cancer Res.* **10**, 2044-2051.

Corneliussen, B., Thornell, A., Hallberg, B. and Grundstrom, T. (1991). Helix-Loop-Helix transcriptional activators bind to a sequence in Glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J. Virol.* **11**, 6084-6093.

Cummings, S. D., Ryu, B., Samuels, M. A., Yu, X., Meeker, A. K., Healey, M. A. and Alani, R. M. (2008). Id1 delays senescence of primary human melanocytes. *Mol. Carcinog.* doi: 10.1002/mc.20422.

Davis, R. L., Cheng, P. F., Lassar, A. B. and Weintraub, H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell.* **60**, 733-746.

Day, M. L., Zhao, X., Vallorosi, C. J., Putzi, M., Powell, C.T., Lin, C. and Day, K. C. (1999). E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 9656-9664.

De Craene, B., Gilbert, B., Stove, C., Bruyneel, E., van Roy, F. and Berx, G. (2005). The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* **65**, 6237-6244.

Deng, Y. Z., Chen, P. P., Wang, Y., Yin, D., Koeffler, H. P., Li, B., Tong, X. J. and Xie, D. (2007). Connective tissue growth factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenicity through beta-catenin-T-cell factor/Lef signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 36571-36581.

Desprez, P. Y., Hara, E., Bissell, M. J. and Campisi, J. (1995). Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3398-3404.

Desprez, P. Y., Lin, C. Q., Thomasset, N., Sympson, C. J., Bissell, M. J. and Campisi, J. (1998). A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4577-4588.

Dhulipala, P. D., Lianos, E. A. and Kotlikoff, M. I. (2001). Regulation of human P2X1 promoter activity by beta helix-loop-helix factors in smooth muscle cells. *Gene.* **269**, 167-175.

Drews, F., Knöbel, S., Moser, M., Muhlack, K. G., Mohren, S., Stoll, C., Bosio, A., Gressner, A. M. and Weiskirchen, R. (2008). Disruption of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 gene causes alteration in facial structure and influences TGF-beta bioavailability. *Biochim Biophys Acta.* **1783**, 34-48.

Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H. and Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene.* **24**, 2375-2385.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M. and Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* **8**, 970-980.

Ephrussi, A., Church, G. M., Tonegawa, S. and Gilbert, W. (1985). B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science.* **227**, 134-140.

Fagotto, F., Funayama, N., Gluck, U. and Gumbiner, B.M. (1996). Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J. Cell Biol.* **132**, 1105-1114.

- Faraldo, M. L. M.,** Rodrigo, I., Behrens, J., Birchneier, W. and Cano, A. (1997). Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in mouse keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **20**, 33-47.
- Flora, A.,** Garcia, J. J., Thaller, C. and Zoghbi H., Y. (2007). The E protein Tcf4 interacts with Math1 to regulate differentiation of a specific subset of neuronal progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **104**, 15382-15387.
- Fodde, R.** and Brabletz, T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 150-158.
- Fong, S.,** Itahana, Y., Sumida, T., Singh, J., Coppe, J. P., Liu, Y., Richards, P. C., Bennington, J. L., Lee, N. M., Debs, R. J. and Desprez, P. Y. (2003). Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **100**, 13543-13548.
- Fraga, M. F.,** Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J-H., Balmain, A., Cano, A. and Esteller, M. (2004). A mouse skin carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation pattern of human tumors. *Cancer Res.* **64**, 5527-5534.
- Furumura, M.,** Potterf, S. B., Toyofuku, K., Matsunaga, J., Muller, J. and Hearing, V. J. (2001). Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *J. Biol. Chem.* **276**, 28147-28154.
- Gan, T. I.,** Rowen, L., Nesbitt, R., Roe, B. A., Wu, H., Hu, P., Yao, Z., Kim, U. J., O'Sickey, T. and Bina, M. (2002). Genomic organization of human TCF12 gene and spliced mRNA variants producing isoforms of transcription factor HTF4. *Cytogenet. Genome Res.* **98**, 245-248.
- Goardon, N.,** Lambert, J. A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H. and Hoang, T. (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* **25**, 357-366.
- Goldfarb, A.N.,** Lewandowska, K. and Pennell, C. A. (1998). Identification of a highly conserved module in E proteins required for in vivo helix-loop-helix dimerization. *J. Bio. Chem.* **273**, 2866-2873.
- Grimes, H. L.,** Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B. and Tschlis, P. N. (1996). Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6263-6272.
- Grooteclaes, M. L.** and Frisch, S. M. (2000). Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene.* **19**, 3823-3828.
- Guaita, S.,** Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A. G. and Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 39209-39216.
- Guillemot, F.,** Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. and Joyner, A. L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell.* **75**, 463-476.

Gupta, G. P. and Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. **127**, 679-695.

Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)*. **154**, 8-20.

Hay, E. D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* **233**, 706-720.

Hajra, K. M. and Fearon, E. R. (2002). Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. **34**, 255-268.

Hajra, K. M., Chen, D. Y. and Fearon, E. R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*. **62**, 1613-1618.

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N. and Klein, W. H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. **364**, 501-506.

Hemavathy, K., Ashraf, S. I. and Ip, Y. T. (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*. **20**, 1-12.

Hemavathy, K., Guru, S. C., Harris, J., Chen, J. D. and Ip, Y. T. (2000). Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol. Cell Biol*. **20**, 5087-5095.

Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. and Behrens, J. (1996). Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem*. **271**, 595-602.

Henthorn, P., Kiledjian, M. and Kadesch, T. (1990). Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer microE5/kappa 2 motif. *Science*. **247**, 467-470.

Herbst, A. and Kolligs, F. T. (2008). A conserved domain in the transcription factor ITF-2B attenuates its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.081.

Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., Eckardt, K. U., Iwano, M. and Haase, V. H. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*. **117**, 3810-3820.

Hochberg, Y. and Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat. Med*. **9**, 811-818.

Howe, L. R., Watanabe, O., Leonard, J. and Brown, A. M. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res*. **63**, 1906-1913.

Huang, X. and Saint-Jeannet, J-P. (2004). Induction of neural crest and the opportunities of life on the edge. *Devt.Biol*. **275**, 1-11.

Huber, M. A., Kraut, N. and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol*. **17**, 548-558.

- Ik Tsen Heng, J.** and Tan, S. S. (2003). The role of class I HLH genes in neural development – have they been overlooked? *BioEssays*. **25**, 709-716.
- Ivanova, L.**, Butt, M. J. and Matsell, D. G. (2008). Mesenchymal Transition in Kidney Collecting Duct Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* doi:10.1152/ajprenal.00326.2007.
- Iwano,M.**, Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H. and Neilson, E. G. (2002). Evidence that fibroblast derive from epithelium durin tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110**, 341–350.
- Jen, Y.**, Manova, K. and Benezra, R. (1996). Expression patterns of *Id1*, *Id2*, and *Id3* are highly related but distinct from that of *Id4* during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* **207**, 235-252.
- Jones, S.** (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* **5**, 226.
- Jordà, M.**, Vinyals, A., Marazuela, A., Cubillo, E., Olmeda, D., Valero, E., Cano, A. and Fabra, A. (2007). Id-1 is induced in MDCK epithelial cells by activated Erk/MAPK pathway in response to expression of Snail and E47 transcription factors. *Exp. Cell Res.* **313**, 2389-2403.
- Jordà, M.**, Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A. and Fabra, A. (2005). Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J. Cell Sci.* **118**, 3371-3385.
- Kanda, S.**, Mochizuki, Y., Miyata, Y. and Kanetake. H. (2003). The role of c-Fes in vascular endothelial growth factor-A-mediated signaling by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 1056-1063.
- Kang, Y.**, Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Córdón-Cardo, C., Guise, T. A. and Massagué, J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone (2003). *Cancer Cell* **3**, 537-549.
- Kemler, R.** (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* **9**, 317-321.
- Kim, K. K.**, Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. C., Brumwell, A. N., Sheppard, D. and Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **103**, 13180-13185.
- Kim, M. S.**, Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamaoka, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K. and Kato, S. (2007). 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.* **21**, 334-342.
- Kirkness, E. F.**, Bafna, V., Halpern, A. L., Levy, D., Remington, K., Rusch, D. B., Delcher, A. L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C. M. and Venter, J. C. (2003). The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* **301**, 1898-1903.
- Kolligs, F. T.**, Nieman, M. T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I. M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K. R. and Fearon ER. (2002). ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with β -catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell.* **1**, 145-155.

- Kondo, M.,** Cubillo, E., Tobiume, K., Shirakihara, T., Fukuda, N., Suzuki, H., Shimizu, K., Takehara, K., Cano, A., Saitoh, M. and Miyazono, K. (2004). A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* **11**, 1092-1101.
- Kumar, M. S.,** Hendrix, J. A., Johnson, A. D. and Owens, G. K. (2003). Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ. Res.* **92**, 840-847.
- Larue, L.,** Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M. and Kemler, R. (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development.* **122**, 3185-3194.
- Lassar, A. B.,** Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D. and Weintraub, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell.* **58**, 823-831.
- Lemercier, C.,** To, R. Q., Carrasco, R. A. and Konieczny, S. F. (1998). The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *EMBO J.* **17**, 1412-1422.
- Li, S.,** Takeuchi, F., Wang, J. A., Fan, Q., Komurasaki, T., Billings, E. M., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J. and Darling, T. N. (2008). Mesenchymal-epithelial interactions involving epiregulin in tuberous sclerosis complex hamartomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**, 3539-3544.
- Lindblad-Toh, K.,** Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J. 3rd, Zody, M. C. *et al.* (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **22**, 4498-4508.
- Ling, M. T.,** Wang, X., Ouyang, X. S., Xu, K., Tsao, S. W. and Wong, Y. C. (2003). Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene.* **22**, 4498-4508.
- Ling, M. T.,** Lau, T. C., Zhou, C., Chua, C. W., Kwok, W. K., Wang, Q., Wang, X. and Wong, Y. C. (2005). Overexpression of Id-1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Carcinogenesis.* **26**, 1668-1676.
- Ling, M. T.,** Wang, X., Zhang, X. and Wong, Y. C. (2006). The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation.* **74**, 481-487.
- Lin, C. Q.,** Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., Parrinello, S., Liang, S. H., Gillett, C. E., Campisi, J. and Desprez, P. Y. (2000). A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 1332-1340.
- Liu, A. Y.,** Corey, E., Vessella, R. L., Lange, P. H., True, L. D., Huang, G. M., Nelson, P. S. and Hood, L. (1997). Identification of differentially expressed prostate genes: increased expression of transcription factor ETS-2 in prostate cancer. *Prostate* **30**, 145-153.
- Longo, A.,** Guanga, G. P. and Rose, R. B. (2008). Crystal structure of E47-NeuroD1/beta2 bHLH domain-DNA complex: heterodimer selectivity and DNA recognition. *Biochemistry.* **47**, 218-229.
- Lozano, E.** and Cano, A. (1998). Cadherin/catenin complexes in murine epidermal keratinocytes: E-cadherin complexes containing either beta-catenin or plakoglobin contribute to stable cell-cell contacts. *Cell Adhes. Commun.* **6**, 51-67.

- Luo, Y.,** He, D. L., Ning, L., Shen, S. L., Li, L. and Li, X. (2006). Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer cells. *Chin. Med. J. (Engl)*. **119**, 713-718.
- Lyden, D.,** Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K. and Benezra, R. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*. **401**, 670-677.
- Lyden, D.,** Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Moore, M. A., Hajjar, K. A., Manova, K., Benezra, R. and Rafii, S. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* **7**, 1194-1201.
- Ma, Q.,** Kintner, C. and Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**, 43-52.
- Martin, P.** (1997). Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.
- Massari, M. E.** and Murre C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* **20**, 429-440.
- Mauhin, V.,** Lutz, Y., Dennefeld, C. and Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3951-3957.
- Minn, A. J.,** Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. and Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. **436**, 518-524.
- Mochizuki, Y.,** Nakamura, T., Kanetake, H. and Kanda, S. (2002). Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J. Cell Sci.* **115**, 175-183.
- Moreno-Bueno G,** Sánchez-Estévez C, Cassia R, Rodríguez-Perales S, Díaz-Uriarte R, Domínguez O, Hardisson D, Andujar M, Prat J, Matias-Guiu X, Cigudosa JC, Palacios J. (2003). Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res.* **63**, 5697-5702.
- Moreno-Bueno, G.,** Cubillo, E., Sarrio, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S. M., Villa, S., Bolos, V., Jordà, M., Fabra, A., Portillo, F., Palacios, J. and Cano A. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **66**, 9543-9556.
- Morgan-Lappe, S. E.,** Tucker, L. A., Huang, X., Zhang, Q., Sarthy, A. V., Zakula, D., Verneti, L., Schurdak, M., Wang, J. and Fesik, S. W. (2007). Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearoyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res.* **67**, 4390-4398.
- Moustakas, A.** and Heldin, C-H. (2007). Signalling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* **98**, 1512-1520.

Mowat, D. R., Croaker, G. D. H., Cass, D. T., Kerr, B. A., Chaitow, J., Adès, L. C., Chia, N. L., Wilson, M. J. (1998). Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J. Med. Genet.* **35**, 617-623.

Muir, T., Sadler-Riggelman, I., Stevens, J. D. and Skinner, M. K. (2006). Role of the basic helix-loop-helix protein ITF2 in the hormonal regulation of Sertoli cell differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 491-500.

Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., *et al.* (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* **58**, 537-544.

Murre, C. (2005). Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat. Immunol.* **6**, 1079-1086.

Murayama, A., Kim, M-S, Yanagisawa, J., Takeyama, K-I. and Kato, S. (2004). Transrepression by liganded nuclear receptor via bHLH activator co-regulator switching. *EMBO J.* **23**, 1598-1608.

Naba, A., Reverdy, C., Louvard, D. and Arpin, M. (2008). Spatial recruitment and activation of the Fes kinase by ezrin promotes HGF-induced cell scattering. *EMBO J.* **27**, 38-50.

Navarro, P., Gomez, M., Pizarro, A., Gamillo, C., Quintanilla, M. and Cano, A. (1991). A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumour progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* **115**: 517-533.

Nelson, W. J. and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* **303**, 1483-1487.

Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 155-166.

Nishimura, T., Andoh, A., Inatomi, O., Shioya, M., Yagi, Y., Tsujikawa, T. and Fujiyama, Y. (2008). Amphiregulin and epiregulin expression in neoplastic and inflammatory lesions in the colon. *Oncol. Rep.* **19**, 105-110.

Nollet, F., Kools, P. and Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* **299**: 551-572.

Norton, J. D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* **113**, 3897-3905.

Oklü, R. and Hesketh, R. (2000). The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem. J.* **3**, 601-610.

Uowerkerk, P. B. F. and Meijer, A. H. (2001). Yeast One-Hybrid screening for DNA-protein interactions. *In: Current Protocols in Molecular Biology.* Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (eds). John Wiley and Sons, Inc. Chichester, UK. 12.12.1-12.12.22.

- Ozawa, M.,** Baribault, H. and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* **8**, 1711-1717.
- Olmeda, D.,** Jordá, M., Peinado, H., Fabra, A. and Cano, A. (2007a). Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.* **26**, 1862-1874.
- Olmeda, D.,** Moreno-Bueno, G., Flores, J. M., Fabra, A., Portillo, F. and Cano, A. (2007b). SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* **67**, 11721-11731.
- Parrinello, S.,** Lin, C. Q., Murata, K., Itahana, Y., Singh, J., Krtolica, A., Campisi, J. and Desprez, P. Y. (2001). Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 39213-39219.
- Peinado, H.,** Quintanilla, M. and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* **278**, 21113-21123.
- Peinado, H.,** Portillo, P. and Cano, A. (2004a). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365-375.
- Peinado, H.,** Ballestar, E., Esteller, M. and Cano, A. (2004b). Snail mediates E-cadherin repression by recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1) / HDAC2. *Mol. Cell Biol.* **24**, 306-319.
- Peinado, H.,** Marin, F., Cubillo, E., Stara, H-J., Fusenig, N., Nieto, M. A. and Cano, A. (2004c). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J. Cell Sci.* **117**, 2827-2839.
- Peinado, H.,** Marin, F., Cubillo, E., Stara, H-J., Fusenig, N., Nieto, M. A. and Cano, A. (2004c). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J. Cell Sci.* **117**, 2827-2839.
- Peinado, H.,** Olmeda, D. and Cano, A. (2007). Snail, ZEB, and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 415-428.
- Peippo, M. M.,** Simola, K. O., Valanne, L. K., Larsen, A. T., Kähkönen, M., Auranen, M. P. and Ignatius, J. (2006). Pitt-Hopkins syndrome in two patients and further definition of the phenotype. *Clin. Dysmorphol.* **15**, 47-54.
- Peiró, S.,** Escrivà, M., Puig, I., Barberà, M. J., Dave, N., Herranz, N., Larriba, M. J., Takkunen, M., Francí, C., Muñoz, A., Virtanen, I., Baulida, J. and García de Herreros, A. (2006). Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2077-2084.
- Peña, C.,** García, J. M., García, V., Silva, J., Domínguez, G., Rodríguez, R., Maximiano, C., García, de Herreros, A., Muñoz, A. and Bonilla, F. (2006). The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAI1, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int. J. Cancer.* **119**, 2098-2104.

Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A. and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* **276**, 27424-27431.

Perez-Moreno, M. and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev. Cell.* **11**, 601-612.

Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* **392**, 190-193.

Perk, J., Iavarone, A. and Benezra, R. (2005). Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **5**, 603-614.

Persson, P., Jögi, A., Grynfeld, A., Pählman, S. and Axelson, H. (2000). HASH-1 and E2-2 are expressed in human neuroblastoma cells and form a functional complex. *Biochem. Biophys Res Commun.* **274**, 22-31.

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* **18**, 1738-1747.

Petropoulos, H. and Skerjanc, I. (2000). Analysis of the inhibition of MyoD activity by ITF-2B and full-length E12/E47. *J. Biol. Chem.* **275**, 25095-25101.

Pitt, D. and Hopkins, I. (1978). A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing. *Aust. Paediatr. J.* **14**, 182-184.

Postigo, A. A., Depp, J. L., Taylor, J. J. and Kroll, K. L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* **22**, 2453-2462.

Pscherer, A., Dörflinger, U., Kirfel, J., Gawlas, K., Rüschoff, J., Buettner, R. and Schüle, R. (1996). The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene. *EMBO J.* **15**, 6680-6690.

Qiu, Y., Sharma, A. and Stein, R. (1998). p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2957-2964.

Quong, M. W., Massari, M. E., Zwart, R. and Murre, C. (1993). A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **13**, 792-800.

Reinhold, M. I., Kapadia, R. M., Liao, Z. and Naski, M. C. (2006). The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 1381-1388.

Riechmann, V., van Cruchten, I. and Sablitzky, F. (1994). The expression pattern of *Id4*, a novel dominant negative helix-loop-helix protein is distinct from *Id1*, *Id2* and *Id3*. *Nucleic. Acids Res.* **22**, 749-755.

- Rimm, D. L.,** Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. and Morrow, J. S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 8813-8817.
- Rodrigo, I.,** Cato, A. C. and Cano, A. (1999). Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* **248**, 358-371.
- Saito, T.,** Oda, Y., Sugimachi, K., Kawaguchi, K., Tamiya, S., Tanaka, K., Matsuda, S., Sakamoto, A., Iwamoto, Y. and Tsuneyoshi, M. (2001). E-cadherin gene mutations frequently occur in synovial sarcoma as a determinant of histological features. *Am. J. Pathol.* **159**, 2117-2124.
- Sakai, D.,** Suzuki, T., Osumi, N. and Wakamatsu, Y. (2006). Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signalling in early neural crest development. *Development*, 133, 1323-1333.
- Sakurai, D.,** Tsuchiya, N., Yamaguchi, A., Okaji, Y., Tsuno, N. H., Kobata, T., Takahashi, K. and Tokunaga, K. (2004). Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J. Immunol.* **173**, 5801-5809.
- Sarrió, D.,** Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Sánchez-Estévez, C., Guo, M., Herman, J. G., Gamallo, C., Esteller, M. and Palacios, J. (2003). Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int. J. Cancer.* **106**, 208-215.
- Sarrió, D.,** Rodríguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* **68**, 989-997.
- Savagner, P.,** Kussewit, D. F., Carver, E. A., Magnino, F., Choi, C. Gridley, T. and Hudson, L. (2005). Developmental transcription factor Slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol.* **202**, 858-866.
- Scheel, C.,** Onder, T., Karnoub, A. and Weinberg, R. A. (2007). The origin of metastatic behavior. *Cancer Res.* **67**, 11476-11479; discussion 11479-11480.
- Scott, I. C.,** Anson-Cartwright, L., Riley, P., Reda, D. and Cross, J. C. (2000). The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **20**, 530-541.
- Shirakata, M.,** Friedman, F. K., Wei, Q. and Paterson, B. M. (1993). Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues. *Genes Dev.* **7**, 2456-2170.
- Shirakihara, T.,** Saitoh, M. and Miyazono, K. (2007). Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 3533-3544.
- Sikder, H. A.,** Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B. and Alani, R. M. (2003). Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell.* **7**, 525-530.

Slattery, C., McMorro, T. and Ryan, M. P. (2006). Overexpression of E2A proteins induces epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells suggesting a potential role in renal fibrosis. *FEBS Lett.* **580**, 4021-4030.

Slattery, C., Ryan, M. P. and McMorro, T. (2007). E2A proteins: Regulators of cell phenotype in normal physiology and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* doi:10.1016/j.biocel.2007.05.014.

Skerjanc, I. S., Truong, J., Filion, P. and McBurney, M. W. (1996). A splice variant of the ITF-2 transcript encodes a transcription factor that inhibits MyoD activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 3555-3561.

Song, S., Cooperman, J., Letting, D. L. and Blobel, G. A., Choi, J. K. (2004). Identification of cyclin D3 as a direct target of E2A using DamID. *Mol. Cell Biol.* **24**, 8790-8802.

Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., Kirchner, T., Behrens, J. and Brabletz, T. (2008). The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res.* **68**, 537-544.

Stappert, J. and Kemler, R. (1994). A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adhes. Commun.* **2**, 319-327.

St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J. W., Flørenes, V. A., Slingerland, J. M. and Kerbel, R. S. (1998). E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J. Cell Biol.* **142**, 557-571.

Stemmler, M. P., Hecht, A., Kinzel, B. and Kemler, R. (2003). Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos. *Dev. Dyn.* **12**, 238-245.

Strathdee, G. (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 373-379.

Stighall, M., Manetopoulos, C., Axelson, H. and Landberg, G. (2005). High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* **115**, 403-411.

Sun, X-H., Copeland, N. G., Jenkins, N. and Baltimore, D. (1991). ID proteins, ID1 and ID2 selectively inhibit DNA binding by one class of helixloop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5603-5611.

Takahashi, K. and Suzuki, K. (1996). Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp. Cell Res.* **226**, 214-222.

Takano, S., Kanai, F., Jazag, A., Ijichi, H., Yao, J., Ogawa, H., Enomoto, N., Omata, M. and Nakao, A. (2007). Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1. *J. Biochem.* **141**, 345-351.

Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.* **102**, 639-655.

Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 806-811.

- Takeichi, M.** (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 619-627.
- Taki, M.,** Verschuere, K., Yokoyama, K., Nagayama, M. and Kamata, N. (2006). Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **28**, 487-496.
- Talmadge, J. E.** (2007). Is metastasis due to selection or adaptation? Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res.* **67**, 11471-11475.
- Tarin, D.,** Thomson, E. W. and Newgreen, D. F. (2005). The fallacy of epithelial-mesenchymal transitions in neoplasia. *Cancer Res.* **65**, 5996-6000; discussion 6000-6001.
- Tejada, M. L.,** Yu, L., Dong, J., Kenneth, J., Meng, G., Peale, F. V., Frantz, G. D., Hall, L., Liang, X., Gerber, H. P. and Ferrara, N. (2006). Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2676-2688.
- Teng, Y.,** Zeisberg, M. and Kalluri, R. (2007). Transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **117**, 304-306.
- Thiery, J. P.** (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev. Cancer.* **2**, 442-454.
- Thiery, J. P.** and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal Transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131-142.
- Trimboli, A. J.,** Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S. M., Creasap, N., Rosol, T. J., Robinson, M. L., Eng, C., Ostrowski, M. C. and Leone G. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 937-945.
- Van de Putte, T.,** Maruhashi, M., Francis, A., Nelles, L., Kondoh, H., Huylebroeck, D. and Higashi, Y. (2003). Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 465-470.
- Van de Putte, T.,** Francis, A., Nelles, L., van Grunsven, L. A. and Huylebroeck, D. (2007). Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1423-1436.
- Vandewalle, C.,** Comijn, J., De Craene, B. Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F. and Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6566-6578.
- Venkov, C. D.,** Link, A. J., Jennings, J. L., Plieth, D., Inoue, T., Nagai, K., Xu, C., Dimitrova, Y. N., Rauscher, F. J. and Neilson, E. G. (2007). A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **117**, 482-491.
- Vleminckx, K.,** Vakaet, L. Jr., Mareel, M., Fiers, W., van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* **66**, 107-119.

- Voisset, E.,** Lopez, S., Dubreuil, P. and De Sepulveda, P. (2007). The tyrosine kinase FES is an essential effector of KITD816V proliferation signal. *Blood*. **110**, 2593-2599.
- Voronova, A.** and Baltimore, D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 4722-4726.
- Watada, H.,** Kajimoto, Y., Umayahara, Y., Matsuoka, T., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kawamori, R. and Kamada, T. (1995). Ubiquitous, but variable, expression of two alternatively spliced mRNAs encoding mouse homologues of transcription factors E47 and E12. *Gene*. **153**, 255-259.
- Weintraub, H.,** Dwarki, V. J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., Lassar, A. and Tapscott, S. J. (1991). Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev*. **5**, 1377-1386.
- Weis, K.** (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*. **112**, 441-4451.
- Wikstrom, I.,** Forssell, J., Goncalves, M., Colucci, F. and Holmberg, D. (2006). E2-2 Regulates the expansion of Pro-B Cells and Follicular versus Marginal Zone decisions. *J. Immunol*. **177**, 6723-6729.
- Wong, A. S.** and Gumbiner, B. M. (2003). Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J. Cell Biol*. **161**, 1191-1203.
- Xu, X.,** Bringas, P., Soriano, P. and Chai, Y. (2005). PDGFR- α signaling is critical for tooth cusp and palate morphogenesis. *Dev. Dyn*. **232**, 75-84.
- Yang, J.,** Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. **117**, 927-939.
- Yang, L.,** Lin, C., Liu, Z. R. (2006). P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* **127**, 139-155.
- Yang, M. H.,** Wu, M. Z., Chiou, S. H., Chen, P. M., Chang, S. Y., Liu, C. J., Teng, S. C. and Wu, K. J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat. Cell Biol*. **10**, 295-305.
- Yoon, S. O.** and Chikaraishi, D. M. (1994). Isolation of two E-box binding factors that interact with the rat tyrosine hydroxylase enhancer. *J. Biol. Chem*. **269**, 18453-18462.
- Yoshida, M.,** Horinouchi, S. and Beppu, T. (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* **17**, 423-430.
- Yuen, H. F.,** Chua, C. W., Chan, Y. P., Wong, Y. C., Wang, X. and Chan, K. W. (2007). Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology*. **50**, 648-658.
- Zeisberg, M.,** Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H. and Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem*. **282**, 23337-23347.

- Zhai, Y.,** Wu, R., Schwartz, D. R., Darrah, D., Reed, H., Kolligs, F. T., Nieman, M. T., Fearon, E. R. and Cho, K. R. (2002). Role of β -catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* **160**, 1229-1238.
- Zhang, J.,** Kalkum, M., Yamamura S., Chait, B. T. and Roeder, R. G. (2004). E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* **305**, 1286-1289.
- Zhang, Y.,** Babin, J., Feldhaus, A. L., Singh, H., Sharp, P. A. and Bina, M. (1991). HTF4: a new human helix-loop-helix protein. *Nucleic Acids Res.* **319**, 4555.
- Zhao, F.,** Vilaridi, A., Neely, R. J. and Choi, J. K. (2001). Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6346-6357.
- Zhuang, Y.,** Soriano, P. and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell.* **79**, 875-884.
- Zweier, C.,** Albrecht, B., Mitulla, B., Behrens, R., Beese, M., Gillessen-Kaesbach, G., Rott, H. D., and Rauch, A. (2002). "Mowat-Wilson" syndrome with and without Hirschsprung disease is a distinct, recognizable multiple congenital anomalies-mental retardation syndrome caused by mutations in the zinc finger homeo box 1B gene. *Am. J. Med. Genet.* **108**, 177-181.
- Zweier, C.,** Peippo, M. M., Hoyer, J., Sousa, S., Bottani, A., Clayton-Smith, J., Reardon, W., Saraiva, J., Cabral, A., Gohring, I., Devriendt, K., de Ravel, T., Bijlsma, E. K., Hennekam, R. C., Orrico, A., Cohen, M., Dreweke, A., Reis, A., Nurnberg, P. and Rauch, A. (2007). Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 994-1001.

Anexo

Tabla Suplementaria. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Tabla Suplementaria a. Genes implicados en función celular básica (n = 30)			
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_000927	ABCB1 , <i>ATP-binding cassette</i> , sub-familia B (MDR/TAP), miembro 1	-1,34	2,42
NM_022437	ABCG8 , <i>ATP-binding cassette</i> , sub-familia G (WHITE), miembro 8 (esterolina 2)	1,46	-2,25
NM_012106	ARL2BP , proteína de unión al factor similar de ADP-ribosilación 2	-1,35	2,21
AJ579850 *	ARL4C , factor similar al de ADP-ribosilación, 4C	-2,60	8,43
BC063125	ARL8B , factor similar al de ADP-ribosilación, 8B	-1,76	-2,24
NM_001695	ATP6V1C1 , ATPasa, transportador de H ⁺ lisosomal, 42 kDa, V1 subunidad C1	-1,80	2,63
NM_001334	CTSO , catepsina O	1,39	2,50
NM_018947	CYCS , citocromo c, somático	-1,13	3,24
AK095541	DNAJA1 , homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia A, miembro 1	-1,38	2,46
AK125918	GBE1 , enzima ramificadora del 1,4- α glucano, 1 (enfermedad de Anderson)	-1,12	2,45
BQ165657	GMNN , geminina, inhibidor de la replicación de DNA	1,09	2,55
BC026326	GNAI1 , proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), polipéptido de la actividad inhibidora α , 1	-1,12	4,30
BF971151	GNG11 , proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gama 11	1,18	6,06
AF217990	HERPUD1 , <i>homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1</i>	-1,97	-4,68
BC052951	LMNB1 , lamina B1	-2,07	-2,84
BX537999	LSM8 , homólogo de LSM8, <i>U6 small nuclear RNA associated</i> (S. cerevisiae)	-1,05	2,27
U83993	P2RX4 , receptor purinérgico P2X, <i>ligand-gated ion channel</i> , 4	-2,15	1,69
NM_001037341	PDE4B , fosfodiesterasa 4B, específica de cAMP (E4 homólogo <i>dunce</i> de Drosophila)	-1,98	-2,04
NM_014819	PJA2 , <i>praja 2, RING-H2 motif containing</i>	-3,16	-1,10
BC023503	POLR2B , RNA polimerasa II (dirigida por DNA), polipéptido B, 140 kDa	1,15	2,69
AK098311	PPP1CA , proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma α	-2,25	-1,16
BC065280	PPP1R15B , proteína fosfatasa 1, subunidad regulatoria 15B	-1,96	-2,16
BX641097	PSMA2 , subunidad del proteasoma, tipo α , 2	1,39	2,46
BX648253	PTPN3 , proteína tirosina-fosfatasa, no-receptor, tipo 3	-2,33	-1,92
NM_002947	RPA3 , proteína de replicación A3, 14 kDa	-1,09	2,69
BM916819	RPS9 , proteína ribosomal S9	-1,39	-2,01
BU588938	SDF2L1 , similar al factor <i>stromal cell-derived 2</i> , 1	-1,59	-2,52
AF305818	SSU72 , <i>SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog</i> (S. cerevisiae)	2,47	2,32
NM_001067	TOP2A , topoisomerasa (DNA) II α , 170 kDa	-1,09	2,59
NM_006670	TPBG , glicoproteína trofoblástica	2,41	2,43

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.

Continuación de Tabla Suplementaria. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Tabla Suplementaria b. Genes implicados en transporte (n = 3)

No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_006516	SLC2A1 , transportador de solutos, familia 2 (transportador de glucosa de difusión facilitada), miembro 1	-2,04	-2,92
AB209607	SLC2A3 , transportador de solutos, familia 2 (transportador de glucosa de difusión facilitada), miembro 3	-3,92	-2,30
BF673939 *	STEAP1 , six transmembrane epithelial antigen of the prostate, 1	-2,80	11,38

Tabla Suplementaria c. Genes implicados en apoptosis (n = 5)

No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
AB209868	ANXA3 , anexina A3	-2,34	-1,75
NM_001154	ANXA5 , anexina A5	1,22	2,64
CR612719	GADD45A , growth arrest and DNA-damage-inducible, α	-2,32	-5,22
EF177381	MALAT1 , metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (RNA no codificante)	-3,16	-2,06
AK095165	PAWR , PRKC, apoptosis, WT1, regulator	-2,28	-1,58

Tabla Suplementaria d. Genes implicados en angiogénesis (n = 3)

No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
X89426	ESM1 , molécula específica de célula endotelial, 1	3,02	1,23
NM_002182	IL1RAP , proteína accesoria del receptor de interleuquina 1	-1,93	-2,43
BC068441	IL1RN , antagonista del receptor de interleuquina 1	-2,41	-12,29

Tabla Suplementaria e. Genes implicados en respuesta a estrés (n = 2)

No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
NM_018396	HIG2 , proteína inducible por hipoxia, 2	-2,95	-1,91
NM_014365	HSPB8 , proteína de choque térmico, 22 kDa, 8	2,66	3,26

Tabla Suplementaria f. Genes de función desconocida (n = 10) y misceláneos (n = 43)

No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
AB209677	SEPT7 , septina 7 (f. desconocida)	-1,31	3,50
BC107897	CRYAB , crystallin, α B (f. desconocida)	1,10	2,84
NM_001042517	DIAPH3 , homólogo de <i>Diaphanous</i> , 3 (Drosophila) (f. desconocida)	-1,13	2,17
NM_174911	FAM84B , familia con similitud de secuencia 84, miembro B (f. desconocida)	-2,75	-3,04
AB209916	RORA , receptor huérfano relacionado a RAR, A (f. desconocida)	1,02	2,41
AF087902	SERINC1 , incorporador de serinas, 1 (f. desconocida)	1,28	2,86

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.
f. desconocida: función desconocida.

Continuación de Tabla Suplementaria. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Cont. Tabla Suplementaria f. Genes de función desconocida (n = 10) y misceláneos (n = 43)			
No. de acceso	Descripción	E2-2	E47
AF033122	SESN1 , sestrina, 1 (f. desconocida)	-1,08	2,53
NM_001040153	SLAIN1 , familia del motivo <i>SLAIN</i> , miembro 1 (f. desconocida)	-1,79	2,04
BX537584	SUB1 , homólogo de SUB1 (S. cerevisiae) (f. desconocida)	1,74	2,64
BX537610	TSNAX , <i>Translin-associated factor X</i> (f. desconocida)	-2,17	1,63
AA012867	-, locus transcrito	-2,49	-2,42
AA015892	-, locus transcrito	-1,19	-3,02
AA026682	-, locus transcrito	-1,25	4,17
AA083228	-, locus transcrito	-1,18	2,62
AA131421	-, Homo sapiens, clone IMAGE:5547644, mRNA	-2,59	-3,72
AA187233	-, locus transcrito	1,23	2,44
AA235343	-, locus transcrito	1,04	4,53
AA418828	-, locus transcrito	-2,11	-2,03
AA446839	-, locus transcrito	-4,94	-2,04
AA448157	-, locus transcrito	1,28	2,54
AA598555	-, locus transcrito	-2,07	-1,97
AA668205	-, locus transcrito	-2,48	1,40
AA682719	-, locus transcrito	-1,34	2,21
AA778116	-, locus transcrito	1,41	3,52
AA911832	-, clon de cDNA IMAGE:6025865	-1,30	-2,39
AA971895	-, locus transcrito, levemente similar a XP_534331.2 similar a ORF2 (Canis familiaris)	1,52	2,72
AA974801	-, locus transcrito, moderadamente similar a XP_001134686.1 proteína hipotética (Pan troglodytes)	1,25	2,38
AI167261 *	-, RNAi; cDNA DKFZp667B0924 (del clon DKFZp667B0924)	-2,60	6,59
AI216571	-, locus transcrito	-1,00	2,67
AI291262	-, locus transcrito	1,15	4,32
AI923117	-, cDNA: FLJ23228 fis, clon CAE06654	-1,16	-2,53
BE561733	-, locus transcrito	-2,20	-2,77
AK124443	C16orf57 , pauta abierta de lectura 57, del cromosoma 16	-1,05	-2,20
NM_173826	C3orf23 , pauta abierta de lectura 23, del cromosoma 3	-1,74	2,09
AK021779	C7orf24 , pauta abierta de lectura 24, del cromosoma 7	-1,09	2,51
H26183	-, locus transcrito	-1,28	-4,98
H41096	-, locus transcrito	-2,15	-2,65

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.
f. desconocida: función desconocida.

Continuación de Tabla Suplementaria. Genes con expresión modificada en células MDCK-E2-2 ó MDCK-E47 con respecto a células control MDCK-CMV

Cont. Tabla Suplementaria f. Genes de función desconocida y misceláneos (n = 53)

<i>No. de acceso</i>	<i>Descripción</i>	E2-2	E47
AK024480	LOC126917 , proteína hipotética LOC126917	-1,20	-3,42
LOC387683	-, proteína hipotética LOC387683	-3,59	-1,04
XM_928632	LOC645619 , similar a adenilato quinasa, isoenzima 4, mitocondrial (ATP-AMP transfosforilasa)	1,23	3,52
N26928	-, locus transcrito	-1,90	-3,15
N48697	-, locus transcrito	-1,66	2,45
N68917	-, locus transcrito	1,13	2,62
R14976	-, locus transcrito	-1,03	-2,17
R25788	-, locus transcrito	-1,09	3,97
R27680	-, locus transcrito	-1,73	-5,62
R49274	-, locus transcrito	1,18	5,19
R96595	-, clon de cDNA IMAGE:4801326	-1,56	-2,39
T98612	-, locus transcrito	1,18	2,57
W51794	-, locus transcrito	1,41	4,68
W52353	-, locus transcrito	-1,23	2,15
W52353	-, locus transcrito	1,47	2,39
W92134 *	-, locus transcrito	2,99	-9,52

* Clones expresados diferencialmente de manera significativa (FDR<0.1) entre células MDCK-E2-2 y MDCK-E47.