
Regulación de la adhesión intercelular y de la movilidad de células intestinales

Antonio García de Herreros

Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular. Institut Municipal d'Investigació Mèdica. Barcelona.

La diferenciación de las células intestinales se encuentra acoplada a la migración en las criptas intestinales

La cripta intestinal, la unidad proliferativa del intestino, es un sistema dinámico perfectamente regulado, en el que la diferenciación, proliferación y migración celular se hallan estrechamente acopladas¹. Los cuatro tipos celulares maduros presentes en este epitelio (enterocitos, células mucosecretoras, células enteroendocrinas y células de Paneth) se originan a partir de una célula multipotencial, situada hacia la base de la cripta. Excepto en el caso de las células de Paneth, que migran en dirección opuesta, la génesis de estos tipos celulares se produce mediante un proceso de diferenciación continuo, durante el cual las células migran formando bandas verticales desde la base de la cripta hacia la parte superior de ésta y, posteriormente, a lo largo del villus hasta ser exfoliadas¹. La proliferación se encuentra restringida a los dos tercios inferiores de la misma; una vez llegado a ese nivel, las células se encuentran terminalmente diferenciadas y son plenamente funcionales. En este proceso de migración y diferenciación, la capacidad de las células de establecer contactos con las células vecinas o con la matriz basal desempeña un papel crucial; por ejemplo, varios experimentos han demostrado alteraciones en la formación de las criptas cuando se incrementa o se disminuye de modo artificial la adhesión intercelular² (fig. 1).

Es evidente que la comprensión de una manera precisa de cómo se regulan estos procesos tiene especial importancia. Basta para ello recordar que las alteraciones en estos procesos son necesarias para la génesis de los tumores de colon, una de las principales causas de mortalidad ligada al cáncer en el mundo occidental⁴. El tratamiento de esta enferme-

dad no ha experimentado avance alguno en los últimos 30 años, ya que por el momento no ha sido posible hallar ningún fármaco que presente una eficiente actividad contra los tumores de este origen *in vivo*⁵.

El estudio de los procesos de diferenciación y proliferación se ha visto tradicionalmente perjudicado por la falta de métodos reproducibles para el cultivo de células del epitelio intestinal y por el fenotipo muy indiferenciado que presentaban las líneas celulares colorrectales^{6,7}. Sin embargo, durante los últimos años se han descrito varias líneas, obtenidas a partir de tumores que, en cultivo, tras alcanzar la confluencia experimentan un proceso de diferenciación semejante al que se produce en la cripta y adquieren un fenotipo semejante al de células mucosecretoras o enterocíticas maduras. Entre estas células cabe destacar las subpoblaciones M6 y M3 obtenidas a partir de la línea celular HT-29, por selección en condiciones de estrés⁸. Las células así seleccionadas son capaces de formar complejos de adhesión intercelular (uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas) y originar una monocapa de células polarizadas, con un borde en cepillo bastante bien estructurado. Por esta razón, estas células han sido utilizadas como modelo para estudiar *in vitro* la regulación de la diferenciación intestinal.

La diferenciación de líneas celulares intestinales se bloquea por la activación de PK-C α

Utilizando las HT-29 M6 como modelo de trabajo se han identificado varios factores que afectan a su diferenciación. En primer lugar, se ha determinado que la adición de ésteres de forbol como el PMA impide que estas células formen contactos adecuados y bloquea la aparición del fenotipo diferenciado⁹. La adi-

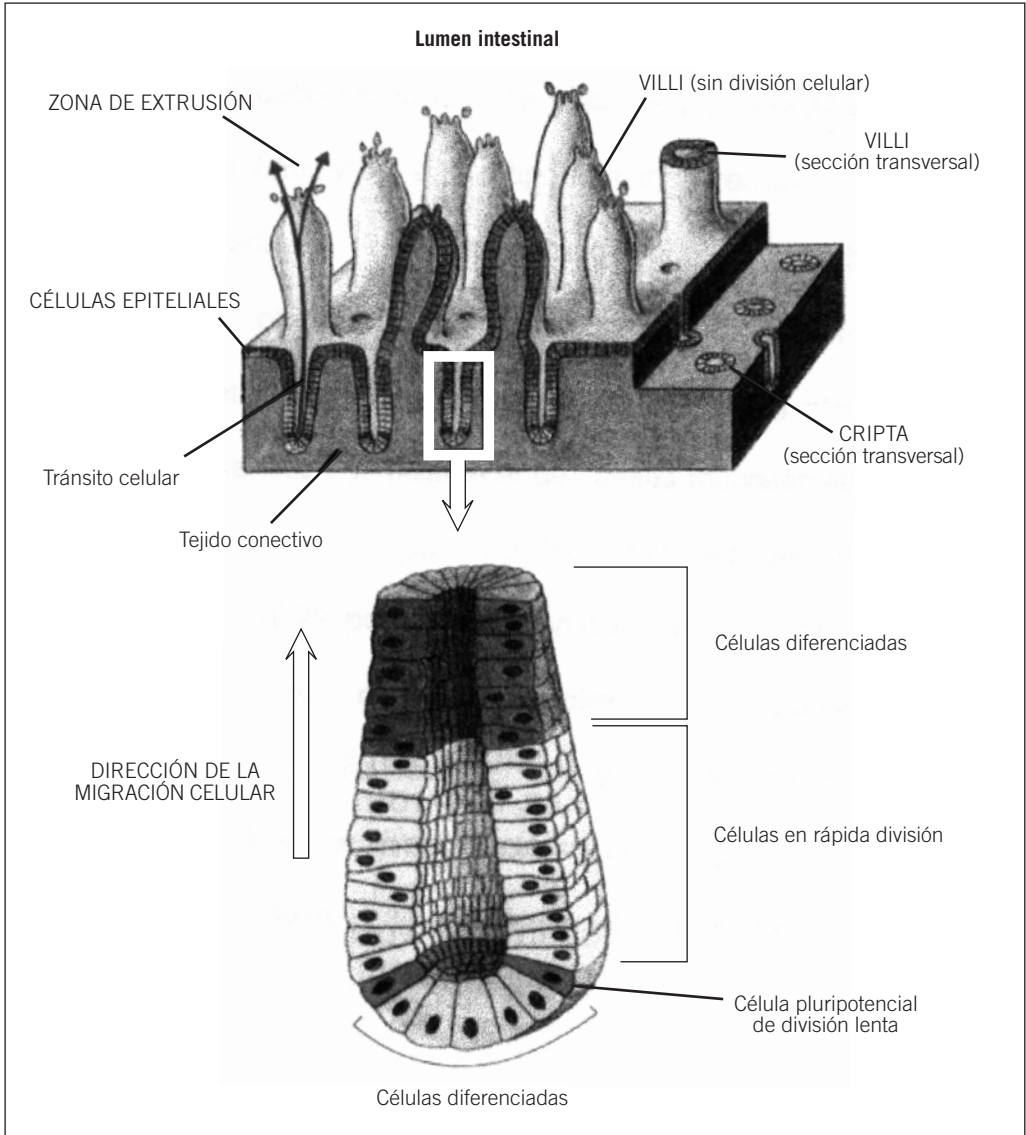


Fig. 1. Esquema del epitelio intestinal en el que se observa el tránsito cripta-villus (Tomada de Alberts et al³.)

ción de este compuesto induce cambios celulares que han sido denominados *scattering* o dispersión; estos cambios consisten en pérdida de los contactos intercelulares, incremento de la adhesión a la matriz, incremento de la movilidad celular y, en general, adquisición de una morfología más fibroblastoide¹⁰. El efecto de *scattering* no es algo específico de células

intestinales sino que el PMA lo induce también en otros tipos celulares epiteliales¹¹. Otros factores, entre los que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es el de efecto más general, causan también el *scattering* de las células epiteliales¹¹.

El PMA es un activador específico de una familia de proteincinasas colectivamente deno-

minadas proteincinasa C (PK-C)¹². Esta familia está compuesta por, al menos, 10 miembros agrupados en tres subfamilias: PK-C convencionales (cPK-C), nuevas (nPK-C) o atípicas (aPK-C); de éstos, los ocho miembros de las subfamilias c y nPK-C pueden ser activados por el PMA¹³. Se ha podido demostrar que la activación de la isoforma cPK-C α es suficiente para inducir el proceso de *scattering*; la introducción de un mutante activado de esta isoforma causa la adquisición de un fenotipo fibroblastoide semejante al obtenido tras tratamiento con PMA¹⁴. Sin embargo, no se puede descartar que alguna de las otras isoformas de PK-C sensibles a PMA y presentes en estas células (nPK-C ϵ y η) pueda contribuir a este efecto, ya que se ha detectado la transactivación de otras formas de PK-C en las células transfectadas con el mutante activado de cPK-C α (Llosas et al, resultados no publicados).

Además de inducir el *scattering* de las células HT-29 M6, el PMA, como la transfección del mutante de cPK-C α , ejerce otro efecto aparentemente no relacionado: disminuye la velocidad de proliferación^{10,14-16}. A diferencia del *scattering*, que ocurre en más tipos celulares epiteliales, este efecto es específico de las líneas celulares intestinales y parece estar relacionado con la inducción de p21cip1 y p27kip1, inhibidores de la proteincinasa dependiente de ciclinas¹⁷. Experimentos de tumorigénesis realizados en ratones atímicos refieren que los dos efectos observados (*scattering* e inhibición del crecimiento) se reproducen también en los tumores, y requieren un diferente grado de activación de esta enzima. Así, los clones que poseen una elevada actividad cPK-C α son incapaces de formar tumores, mientras que los que contienen valores moderados de esta enzima originan tumores de menor tamaño y con características anatómopatológicas más invasivas¹⁴.

¿Cómo encajan nuestros resultados dentro de un papel de la PK-C en la carcinogénesis colónica? Ciertos datos epidemiológicos habían sugerido que alguno de los miembros de esta familia podían desempeñar un papel relevante en el proceso de carcinogénesis colónica¹⁸. Existían, además, resultados que sugerían que alteraciones en la actividad de esta familia de enzimas podían estar relacionadas con el proceso de transformación maligna en humanos, actuando de manera diferente en los estadios tempranos y tardíos de este proceso. Así, en modelos experimentales de carcinogénesis se han detectado cambios que

sugieren que una activación de la PK-C en los adenomas causa una depleción posterior de esta actividad^{19,20}. Nuestros resultados indican que una activación moderada de la PK-C puede desempeñar un papel en la modulación de los contactos celulares. En condiciones normales esta modulación sería necesaria para que las células pudiesen modificar sus contactos con las células vecinas y migrar a lo largo de la cripta; una activación no regulada impediría iniciar el proceso de tumorigénesis. En células en la parte superior de la cripta la activación de la PK-C α sería necesaria para bloquear el crecimiento celular; es en esta zona en la que se ha encontrado una asociación mayoritaria de esta isoforma con la membrana plásmática, indicativa de su activación¹⁶. En tumores avanzados, la depleción de esta enzima induciría el crecimiento incontrolado de células en compartimientos donde no lo haría normalmente (fig. 2).

Proteínas tirosincinasas regulan la función de la E-cadherina

La aparición del fenotipo de *scattering* es consecuencia de cambios coordinados en varias propiedades celulares como son una mayor afinidad hacia la matriz extracelular, una adhesión intercelular disminuida y una movilidad incrementada. A su vez, las modificaciones en estas propiedades de las células son consecuencia de alteraciones aparecidas en las moléculas que ejercen un papel importante en su regulación; así, por ejemplo, la pérdida de adhesión intercelular se asocia, y probablemente se debe, a una disminución en la funcionalidad de la E-cadherina¹⁰. Ésta es una proteína transmembrana responsable, a través de interacciones homotípicas, del establecimiento de las uniones adherentes, los complejos de unión que se establecen con más rapidez en células epiteliales²¹. Al tratar las células HT-29 M6 con PMA se produce la pérdida de funcionalidad de la E-cadherina que deja de ser capaz de interaccionar con el citoesqueleto de actina²². En este proceso influyen proteínas tirosincinasas, puesto que inhibidores de estas enzimas (como la herbimicina), incrementan la asociación de E-cadherina con el citoesqueleto y, por tanto, su funcionalidad, mientras que los inhibidores de las fosfoproteína-fosfatasa (como el ortovanadato) la disminuyen²².

Varias proteínas tirosincinasas se han relacionado con la regulación de la E-cadherina.

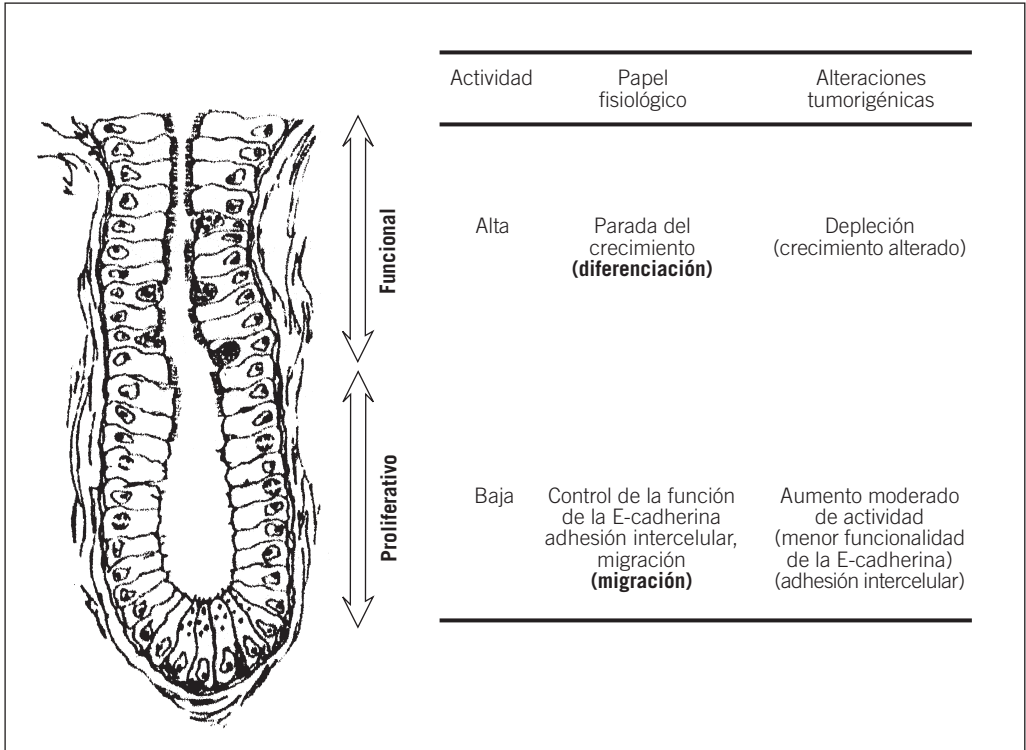


Fig. 2. Papel fisiológico de la cPK-Cα en la diferenciación y migración de las células intestinales y de sus alteraciones en procesos carcinogénicos.

Los datos más consistentes se refieren al producto del gen *v-src*; así, la transformación producida por este gen incrementa la fosforilación tanto de la beta como de la p120-catenina^{23,24}. En las células HT-29 M6, la pérdida de los contactos celulares inducida por PMA se ve precedida por un incremento en la actividad del análogo celular de *v-src*, p60c-src, concomitantemente a la fosforilación de p120-catenina²⁰. No se detectan cambios en el contenido en fosfotirosina de betacatenina, probablemente a causa de la elevada presencia de esta modificación en células HT-29 M6. En paralelo a la fosforilación se detectó un cambio en la asociación de E-cadherina por estas proteínas; en condiciones de control esta proteína se encuentra asociada en gran medida a betacatenina e inapreciablemente a p120-catenina; tras la fosforilación, estas proporciones se invierten²². Estos resultados, unidos a otros datos obtenidos en células transformadas con *v-ras*²⁵, han sugerido un modelo según el cual la funcionalidad de la E-cadherina, que de-

pende de su interacción con alfacatenina y, a través de ésta, con el citosqueleto, está controlada por la fosforilación²⁶. En ausencia de estímulos, la E-cadherina estaría unida a la beta-catenina que actuaría de puente para su interacción con la alfacatenina; tras la fosforilación, en residuos de tirosina (indicada como PY en el esquema expuesto en la fig. 3), la afinidad de la E-cadherina hacia la p120-catenina se incrementaría y ésta desplazaría a la betacatenina del complejo, provocando la pérdida de la asociación de la E-cadherina con el citosqueleto²⁶. Este modelo, basado en un cambio en afinidades relativas, dista de estar probado; una posibilidad que no lo alteraría demasiado consistiría en que la entrada de la p120-catenina en el complejo causase, no el desplazamiento de la betacatenina, sino sólo la pérdida de la interacción con la alfacatenina. En cualquier caso, la validación de este modelo requerirá la determinación de las constantes de asociación de la E-cadherina por las cateninas, tanto cuando éstas se en-

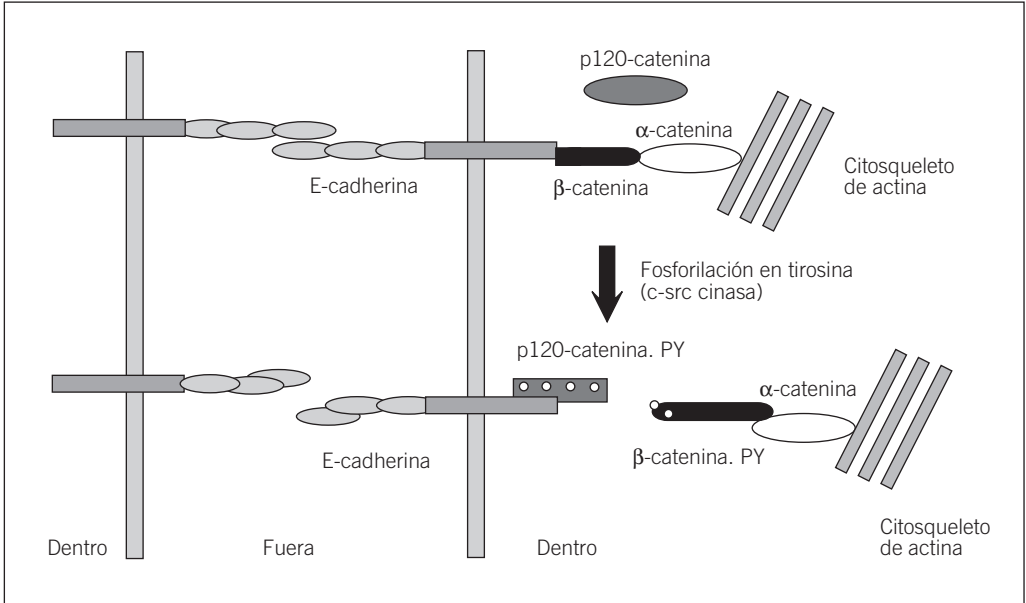


Fig. 3. Regulación de la asociación de la E-cadherina con el citoesqueleto de actina mediante fosforilación en tirosina de cateninas.

cuentren fosforiladas en tirosina como en estado basal. Estudios de este tipo se encuentran ya en marcha en nuestro laboratorio utilizando proteínas recombinantes; mediante este sistema ya se ha podido determinar que la afinidad del fragmento citosólico de la E-cadherina hacia la β-catenina es mucho mayor que hacia la p120-catenina (Piedra y Duñach, resultados no publicados) (fig. 3).

La β-catenina actúa como factor transcripcional

Recientemente se ha podido demostrar que, además de ejercer un papel crucial en la formación y regulación de los contactos adherentes, la β-catenina también actúa como activador transcripcional. Diversos estudios, realizados inicialmente en *X. laevis* y *D. melanogaster* y completados en células humanas, indican que la β-catenina puede translocarse al núcleo, unirse a un factor transcripcional de la familia LEF-1 (en el intestino, hTCF-4) y activar la transcripción de una serie de genes aún desconocidos²⁷⁻²⁹. La capacidad de la β-catenina de trasladarse al núcleo se encuentra en función de las concentraciones de esta proteína que se encuentran en el citosol no asociadas a E-cadherina, valo-

res que dependen principalmente de la velocidad de degradación de esta proteína. La estabilidad de la β-catenina está controlada por fosforilación en residuos de serina y treonina, modificación que realiza la proteínasa GSK-3²⁷⁻²⁹. La capacidad de esta enzima para fosforilar residuos específicos de la β-catenina está muy delicadamente regulada; se ha demostrado que puede ser bloqueada por una cadena de reacciones iniciada por un factor extracelular (wnt en células eucariotas) y que requiere la acción acopladora de una proteína denominada APC²⁷⁻²⁹.

La importancia de este nuevo papel de la β-catenina como coactivador transcripcional viene resaltada por el hecho de que esta actividad parece ser esencial para el desarrollo de los tumores de colon, cualquiera que sea su estadio. Así, mutaciones de APC que impiden que la β-catenina se degrade son un acontecimiento muy habitual en los tumores de colon (más del 85%); esta lesión parece ser la iniciadora del proceso de carcinogénesis colónico³⁰. En un amplio porcentaje del 15% de los tumores restantes, en los que no se ha detectado lesión en APC, aparecen mutaciones en la β-catenina, que impiden que la proteína sea fosforilada en Ser/Thr y degradada³¹. Esto hace que, comparados con los tejidos

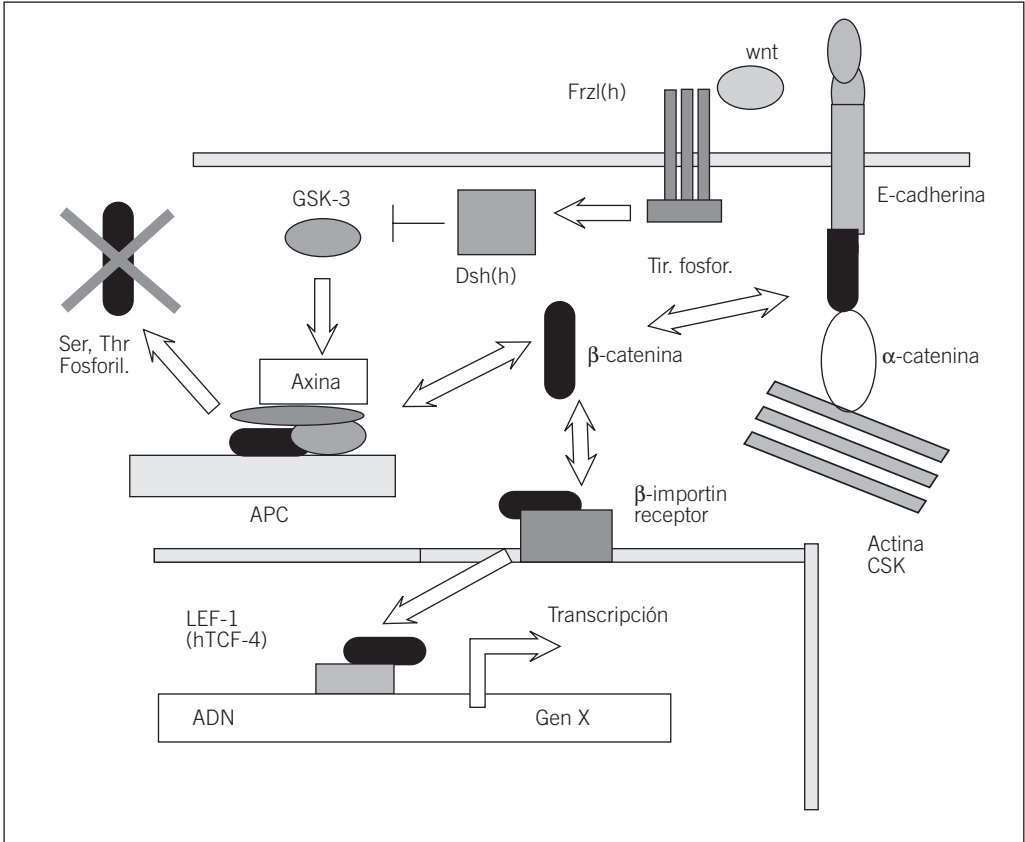


Fig. 4. Efectores del papel de la betacatenina como activador transcripcional.

normales, una gran mayoría de los tumores de colon (líneas celulares derivadas de ellos) posean concentraciones elevadas de betacatenina y una mayor presencia de esta proteína en el núcleo (Fabre et al, resultados no publicados).

Es también interesante destacar que la entrada de la betacatenina en el núcleo se realiza de una forma atípica, ya que se efectúa de manera independiente de las proteínas transportadoras clásicas (importinas)³². Los datos más recientes sugieren que la betacatenina interacciona con el mismo receptor que las importinas presentes en los poros nucleares³² (fig. 4).

En las células HT-29 M6, la activación prolongada de la cPK-C α induce la translocación al núcleo de la betacatenina. Este efecto no se debe a un incremento en las concentraciones de esta proteína puesto que estas células no

son capaces de degradar la betacatenina ya que la proteína APC que expresan está mutada. La translocación al núcleo de la betacatenina se acompaña de un incremento de la actividad transcripcional mediada por betacatenina, determinada mediante ensayos de transfección transitoria de un gen *reporter* bajo la expresión de un promotor con secuencias de unión para hTCF-4. El mismo efecto se ha encontrado en otras líneas celulares intestinales con valores bajos de E-cadherina, como SW-480 (Baulida et al, resultados no publicados). Estos datos indican que la actividad transcripcional mediada por betacatenina está sujeta a regulación aun en ausencia de APC e introducen un elemento más de control en el esquema anteriormente descrito; es posible que la unión de la betacatenina al receptor nuclear también esté modulada de una manera directa. Otra posibilidad a ser considerada es

que el PMA incremente la accesibilidad de la betacatenina a los receptores debido a su menor interacción con otras proteínas.

El gran interrogante de este modelo continúa consistiendo en identificar a los genes cuya transcripción está siendo modulada in vivo por el complejo betacatenina-hTCF-4. En nuestro laboratorio se está procediendo a este estudio utilizando como sistema células SW-480, que poseen alta actividad transcripcional del complejo betacatenina-hTCF-4 y células SW-480 en las que esta actividad ha sido bloqueada mediante la introducción ectópica de una forma truncada de este factor transcripcional (Δ hTCF-4), que carece del dominio de unión para la betacatenina. La introducción de este mutante es capaz de disminuir entre seis y ocho veces la actividad basal del complejo en estas células en ensayos de expresión transitoria; en transfecciones estables las disminuciones son más modestas (tres-cuatro veces), lo que puede ser interpretado como que es necesario un cierto nivel de transcripción mediada por este complejo para que las células puedan sobrevivir en cultivo (Baulida et al, resultados no publicados). En consonancia con estos datos, la sobreexpresión de APC en células HT-29 y en otras líneas intestinales induce apoptosis³³.

Un gen candidato a ser regulado por betacatenina-hTCF-4 es la E-cadherina. Se ha propuesto que el incremento en transcripción mediada por betacatenina estaría relacionado con la transición epitelio-mesénquima y la desaparición de esta proteína que aparece frecuentemente en los tumores^{34,35}. Sin embargo, varios datos indican que si la betacatenina está regulando negativamente la transcripción de la E-cadherina, no lo hace directamente. En primer lugar, la desaparición de la E-cadherina no es un acontecimiento temprano en el desarrollo de los tumores, a diferencia de la mutación de APC y el incremento en transcripción³⁶. Tampoco se ha encontrado en la zona del promotor de la E-cadherina murina responsable de la especificidad de linaje epitelial la presencia de secuencias claras de unión de hTCF-4³⁷. Por último, en los clones caracterizados en nuestro laboratorio en los que se ha disminuido la actividad transcripcional mediada por betacatenina tras la expresión de Δ hTCF-4 no se observa un aumento concomitante en E-cadherina, aunque la funcionalidad de esta proteína parece menor. Sin embargo, no puede descartarse que la betacatenina esté actuando en consonancia con otros estímulos, por ejemplo, factores de crecimiento, para estimular la expresión

de un gen que actúe como represor de la transcripción de la E-cadherina.

Agradecimiento

Agradezco a mis colaboradores Eduard Batlle, Santiago Roura, Javier Verdú, David Domínguez, María del Mont Llosas, Silvia Gómez, Josep Baulida, Francesc Alameda, José A. Piedra y Mireia Duñach sus ideas y consejos, así como la realización de los experimentos presentados en este artículo. El trabajo de laboratorio ha sido financiado por la Fundación Ramón Areces, la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF94-1008 y SAF97-0080) y la Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia (ayuda GRQ 93-9301 concedida a la Unitat de Biologia Cel.lular i Molecular).

BIBLIOGRAFÍA

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties: lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1.001-1.020.
2. Gordon JI, Hermiston ML. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 795-803.
3. Alberts BA, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. Nueva York: Garland, 1983; 911.
4. Parker S, Tong T, Bolden S, Wingo P. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1996; 46: 5-27.
5. Bailar JC, Gornik HL. Cancer undefeated. *N Engl J Med* 1997; 336: 1.569-1.574.
6. Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. En: Field M, Frizel RA, editores. *Handbook of physiology. The gastrointestinal system. Intestinal absorption and secretion*. Am Physiol Soc 1991; 4: 223-255.
7. Neutra M, Louvard D. Differentiation of intestinal cells in vitro. En: Matlin KS, Valentich J, editores. *Functional epithelial cells in culture*. Nueva York: Alan Liss, 1991; 363-398.
8. Lesuffleur T, Barbat A, Luccioni C, Beaumatin J, Clair M, Kornowski A et al. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted cells. *J Cell Biol* 1991; 115: 1.409-1.418.
9. García de Herreros A, Fabre M, Batlle E, Balaqué C, Real FX. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate blocks differentiation of Ht-29 human colon cancer cells. *J Cell Sci* 1993; 105: 1.165-1.172.
10. Fabre M, García de Herreros A. Phorbol-ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cells is associated to downmodulation of E-cadherin. *J Cell Sci* 1993; 106: 513-522.

11. Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J Cell Biol* 1994; 127: 1.783-1.787.
12. Dekker LV, Palmer RH, Parker PJ. The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 5: 396-402.
13. Newton A. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 161-167.
14. Batlle E, Verdú J, Domínguez D, Llosas MM, Díaz V, Loukili N et al. Protein kinase C- α activity inversely modulates invasion and growth of intestinal cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 15.091-15.098.
15. Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C in HT-29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4.650-4.657.
16. Saxon ML, Zhao X, Black JD. Activation of protein kinase c isozymes is associated with post-mitotic events in intestinal epithelial cells in situ. *J Cell Biol* 1994; 126: 747-763.
17. Frey MR, Saxon ML, Zhao X, Rollins A, Evans SS, Black JD. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21waf/cip1 and p27kip1 and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 9.424-9.435.
18. Weinstein IB. Cancer prevention: recent progress and future opportunities. *Cancer Res* 1990; 51 (Supl): 5.080-5.085.
19. Baum CL, Wali RK, Stirin MD, Bolt MJG, Brasitus TA. 1,2-dimethylhydrazine-induced alterations in protein kinase C activity in the rat preneoplastic colon. *Cancer Res* 1990; 50: 3.915-3.920.
20. Wali RK, Frawley BP, Hatmann S, Roy HK, Khare S, Scaglione-Sewell B et al. Mechanism of action of chemoprotective ursodeoxycholate in the azoxymethane model of rat colonic carcinogenesis: potential roles of protein kinase C α , β II and ζ . *Cancer Res* 1995; 55: 5.257-5.264.
21. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 806-811.
22. Skoudy A, Llosas MM, García de Herreros A. Intestinal HT-29 cells with dysfunction of E-cadherin show increased pp60src activity and tyrosine phosphorylation of p120-catenin. *Biochem J* 1996; 317: 279-284.
23. Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 629-638.
24. Behrens J, Vakate L, Winterhague E, VanRoy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/ β -catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-src gene. *J Cell Biol* 1993; 120: 757-766.
25. Kinch MS, Clark GJ, Der CJ, Burrridge K. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesion of ras-transformed breast epithelia. *J Cell Biol* 1995; 130: 461-471.
26. Daniel JM, Reynolds AB. Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* 1997; 19: 883-891.
27. Cavallo R, Rubenstein D, Peifer M. Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 459-466.
28. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1.332: F127-F147.
29. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signalling: a common theme in animal development. *Genes & Dev* 1997; 11: 3.286-3.305.
30. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
31. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B et al. Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1.787-1.790.
32. Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr Biol* 1998; 8: 181-190.
33. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7.950-7.954.
34. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrman BG, Kemler R. Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 1996; 59: 3-10.
35. Dale TC. Signal transduction by the wnt family of ligands. *Biochem J* 1998; 329: 209-223.
36. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S et al. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23.
37. Faraldo ML, Rodrigo I, Behrens J, Birchmeier W, Cano A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocytes cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1997; 20: 33-47.

DISCUSIÓN

A.M. PLANAS: Esta entrada de la betacatenina al núcleo, ¿está siempre asociada a una situación patológica, es decir, no ocurre en condiciones fisiológicas?

A. GARCÍA DE HERREROS: En las criptas normales sólo observamos presencia de betacatenina nuclear en una célula situada cerca de la base de la cripta, que podría ser la célula ma-

dre. De hecho, APC sólo se expresa en los dos tercios superiores de la cripta y no se expresa en la parte inferior. También se puede apreciar la presencia de betacatenina nuclear en algunos casos de alteraciones preneoplásicas.

J. MOSCAT: En primer lugar, los experimentos realizados expresando PK-C α , ¿habéis intentado realizarlos también con la expresión de un mutante que carezca de actividad enzimática? Lo pregunto porque la expresión de PK-C α muchas veces produce efectos independientes de su actividad enzimática como, por ejemplo, la activación de la fosfolipasa D. En segundo lugar, en los experimentos con PMA y dado que se trata de una molécula bastante artificial, ¿cuál es el estímulo fisiológico real que estáis estudiando?

A. GARCÍA DE HERREROS: Con PK-C α negativo no obtuvimos clones estables, los clones morían enseguida. Probablemente esto se deba a que las células requieran un cierto nivel de PK-C α para adherirse y ser capaces de sobrevivir. Con otras PK-C hemos observado efectos parciales. Por ejemplo, si sobreexpresamos PK-C ϵ se obtiene un fenotipo ligeramente parecido al de *scattering*, pero no se detiene el crecimiento. Si sobreexpresamos PK-C η ocurre lo contrario, el fenotipo es igual pero las células proliferan más despacio. Por tanto, no podemos descartar que el efecto pudiera deberse a una transactivación. En cuanto a tu segunda pregunta, nuestra idea al utilizar PMA en estas células se basa en una serie de experimentos descritos hace tiempo, en los que Harry Weinstein, epidemiólogo molecular, y otros autores posteriormente, trataron de involucrar a la PK-C α en la carcinogénesis. Se fundamenta en que, en pacientes con cáncer de colon, la dieta rica en grasas podría constituir un factor de ries-

go tumoral, ya que la presencia de diacilglicerol en estas dietas parece actuar como activador fisiológico. De hecho, parte de este efecto puede también observarse en estas células con PMA cuando se añade diacilglicerol en cantidades muy altas.

A. MUÑOZ: ¿Consigues reproducir los efectos de TPA o de PMA con algún factor de crecimiento, por ejemplo? En segundo lugar, y dada la importancia de las mutaciones en el p53 o en la vía de RAS en el cáncer de colon, ¿existe alguna interacción con este sistema?

A. GARCÍA DE HERREROS: Mi respuesta a la primera pregunta es: no en estas células. No hemos podido conseguir a la vez *scattering* y parada del crecimiento. Sólo hemos observado uno u otro efecto, pero no los dos a la vez. Sobre la segunda cuestión, cabría mencionar que nuestra idea se fundamenta en que la activación del APC es un efecto inicial. Se sabe que la expresión de p53 bajo el control de un promotor en el intestino de animales transgénicos no induce el desarrollo de ningún tipo de proliferación celular. Creemos que el APC y la betacatenina generan más células madre o generan células que están fijadas en un compartimiento determinado y que son capaces de proliferar sin migrar. Es decir, una mutación en RAS en una célula normal no fijada hace proliferar más deprisa células que ya proliferan rápido, y conducirá a la migración y el desprendimiento celular sin producir ningún tipo de alteración. Pero si se incrementa el número de células que son capaces de proliferar sin migrar se crea un nuevo foco de cripta y se generan más células madre, lo que favorece que mutaciones posteriores que afecten a su velocidad de proliferación sean capaces de incidir sobre su capacidad carcinogénica.