

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*“ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL SUPRESOR  
TUMORAL APC CON LA PROTEÍNA CINASA C EN LINEAS  
CELULARES DE COLON”*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**P R E S E N T A:**

BIOL. JOSÉ GUADALUPE HERNÁNDEZ MAQUEDA

Directora de tesis: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Martha Robles por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo incondicional durante mi estancia en el mismo, y que gracias a su experiencia y a su asesoría se llevo a buen termino el presente trabajo.

Al comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis, el cual estuvo formado por Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y el Dr. José Pedraza Chaverri.

Especialmente a la Dra. Cristina Castañeda por su asesoría técnica en el trabajo de laboratorio, que con su disposición de ayudar siempre de la mejor manera, fue muy importante para el desarrollo del mismo.

A los miembros del jurado de examen por el tiempo invertido en la revisión de la tesis y por las observaciones realizadas a la misma. El cual estuvo conformado por:

PRESIDENTE	Dr. Jesús Adolfo García Sainz
VOCAL	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
SECRETARIO	Dra. Marina Macias Silva
SUPLENTE	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
SUPLENTE	Dr. José Pedraza Chaverri

## **AGRADECIMIENTOS**

Porque los logros que se obtienen, no se hace de manera individual sino que es la suma de diferentes factores, por esto, quiero agradecer principalmente a mis padres, Soledad y Armando que han sido fundamentales para estar en esta situación, gracias por su apoyo y comprensión durante todos estos años.

A mis hermanos, Sol que aun en la distancia siempre esta presente, Gregori y Beto por estar siempre que se les necesita. A mis sobrinos Eddy y Magali por su cariño.

A los integrantes del laboratorio Hector, Roberto, Bernardo, Erick, que de alguna u otra forma han colaborado en la elaboración de este trabajo y por hacer de la estancia en el laboratorio un lugar agradable.

Sin duda a mis amigos, Fernando, Sandro, Bruno, Vicente, Martin, que forman parte de esto, gracias por escuchar, por los momentos de convivencia y por compartir también sus metas.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por el CONACYT.

INDICE	
Resumen .....	1
1.INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. El epitelio intestinal. ....	2
1.2. La ruta de señalización canónica Wnt.....	3
1.2.1 La ruta de señalización Wnt mantiene los compartimentos de las células troncales y progenitoras en las criptas del intestino.....	6
1.2.2 Ruta Wnt no canónica.....	7
1.3 Proteína supresora tumoral APC.....	8
1.3.1 Mutaciones en el gen de APC asociadas a la formación de tumores.....	10
1.4 La Proteína Cinasa C.....	11
1.4.1 Características de la familia de PKC.....	11
1.4.2 Alteraciones en el patrón de expresión de las isoformas de PKC asociadas a la carcinogénesis de colon.....	14
2. HIPOTESIS.....	17
3. OBJETIVO GENERAL.....	17
3.1 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIALES Y METODOS.....	17
4.1 Anticuerpos.....	17
4.2 Cultivos celulares.....	18
4.3 SDS-PAGE.....	18
4.4 Análisis de Western Blot.....	19
4.5 Inmunoprecipitación de proteínas.....	19
4.6 Inmunofluorescencia.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Expresión de ocho isoformas de PKC en líneas celulares de colon.....	21
5.2 Expresión de la proteína APC en las líneas celulares de colon.....	23
5.3 Inmunoprecipitación de APC demuestra que existe interacción con las isoformas de PKC ( $\alpha$ y $\delta$ ) en líneas celulares de colon.....	24
5.4 Colocalización intracelular de las isoformas de PKC $\alpha$ y $\delta$ con APC en líneas celulares de colon.....	26
5.5 Las proteínas PKC $\beta$ II y $\epsilon$ , no interaccionan con la proteína APC en las líneas celulares de colon estudiadas.....	29
6. DISCUSIÓN.....	31
7. CONCLUSIONES.....	37
8. REFERENCIAS.....	38
9. APENDICE.....	43

## RESUMEN

La señalación Wnt está implicada en una variedad de procesos celulares tales como la proliferación celular, diferenciación, sobrevivencia, apoptosis, y movilidad celular. La cascada de señalización que inicia este proceso, incluye la ampliamente estudiada ruta de señalización canónica Wnt conocida también como Wnt/ $\beta$ -catenina. En ausencia de ligandos Wnt,  $\beta$ -catenina es degradada por un complejo de proteínas que incluye a axina, al supresor tumoral APC, la PP2A y a dos cinasas, la GSK3 $\beta$  y la CK1 $\alpha$ . La fosforilación secuencial de  $\beta$ -catenina dentro de este complejo, primero por CK1 $\alpha$  y posteriormente por GSK3 $\beta$ , provoca que ésta sea ubiquitinada por  $\beta$ -TrCP, y posteriormente degradada vía el proteosoma. Cuando los ligandos Wnt se unen al complejo de receptores Frizzled y LRP respectivamente en la membrana celular, provocan una cascada de señalización, mediante la disociación del complejo axina-APC- $\beta$ -catenina, lo cual resulta en la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma. La acumulación citoplásmica de la  $\beta$ -catenina es importante para su posterior translocación al núcleo donde interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción Tcf/Lef. Este complejo provoca la transcripción de genes, tales como el oncogene *c-myc*, así como la ciclina D1 entre otros. Dentro de este complejo coactivador,  $\beta$ -catenina funciona como puente para unir a LEF-1/TCF con complejos remodeladores de la cromatina, y con los coactivadores Wnt Bcl-9/Lgs y Pygopus.

La disregulación de la ruta canónica Wnt, está relacionada con el desarrollo de procesos de carcinogénesis en varios tejidos, los cuales incluyen al colon. La mayoría de los cánceres colo-rectales presentan mutaciones en el gen de APC los cuales presentan proteínas truncadas de APC éste es el evento inicial y el más frecuente en los tumores de colon, lo que genera una expresión constitutiva de la ruta Wnt canónica, independiente de ligandos Wnt, y que resulta en una expresión sostenida de sus genes blanco. Además de ésta, otras mutaciones son necesarias para el desarrollo de procesos de carcinogénesis colorectal y una sucesión de ellas han sido detectadas durante la tumorigénesis, como en los genes *K-ras*, *p53* y *Smad4*. Además de las mutaciones presentes en diferentes genes, en el desarrollo de la carcinogénesis de colon también se presentan alteraciones en los patrones de expresión de diversas proteínas incluyendo a la familia PKC. Sin embargo, aunque la evidencia experimental muestra que el proceso de carcinogénesis intestinal está asociado con alteraciones en la actividad y expresión de las isoformas de PKC, la contribución de estos cambios en la progresión del tumor en este tejido continúa aún sin definirse en gran parte. En este trabajo encontramos que existen cambios de expresión muy marcados en las isoformas de PKC en las células tumorales de colon con respecto a las normales, ya que mientras las células normales expresan mayoritariamente las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\delta$  de PKC, las líneas celulares malignas sobre-expresan las isoformas  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\mu$  y  $\zeta$ , mientras que las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\delta$  disminuyen o dejan de expresarse en relación a las células normales. Interesantemente, demostramos que APC interacciona de manera específica con dos isoformas de PKC ( $\alpha$  y  $\delta$ ) tanto en células normales como en células tumorales de colon y que la colocalización de estas proteínas se da exclusivamente en el núcleo. Además, la interacción permanece en células que sintetizan proteínas de APC truncadas en su parte carboxilo terminal, lo que sugiere que los sitios de interacción de APC y PKC se localizan en la región amino de APC. El significado fisiológico de esta interacción en el núcleo, probablemente está relacionado con la regulación negativa de genes blanco Wnt a nivel transcripcional ya que se conoce que APC directamente contrarresta la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina. Es posible que mediante su asociación con APC, PKC pueda fosforilar a las proteínas con las que se asocia APC en el núcleo o tal vez que APC sea sustrato de PKC y de esta manera regule su actividad en el núcleo.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 El epitelio intestinal

El epitelio intestinal es un sistema en continua renovación, que lo hace susceptible a la transformación maligna. Presenta los paradigmas de la biología de las células germinales madres establecida para otros tejidos con gran capacidad de autorenovación (Radtke, 2005).

Con una topología única, está formado por una sola capa de células epiteliales organizadas en una estructura bidimensional plegada en valles (criptas) y crestas (vellosidades). En la base de las criptas proliferativas residen las células troncales madres, las cuales dan origen a células progenitoras que van migrando hacia arriba después de experimentar dos o tres ciclos de división, para diferenciarse al alcanzar las crestas en células absorptivas (enterocitos) o en células secretoras de hormonas o de mucus (Figura 1). En estas crestas, finalmente mueren las células a través de apoptosis y son desprendidas al lumen del intestino para su expulsión (Radtke, 2005). La homeostasis del epitelio intestinal se fundamenta en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis, por lo que representa un atractivo modelo experimental para el estudio integrado de la homeostasis de estos procesos celulares clave. La pérdida del estricto control de este balance, conduce al desarrollo de cáncer.

Actualmente, varias líneas de evidencia experimental *in vivo* han demostrado que la ruta de señalización “Wnt” juega un papel esencial en la homeostasis de tejidos de autorenovación como el epitelio intestinal. Su relevancia en la biología del colon se estableció hace más de una década, cuando se encontró que el gen que codifica para la proteína supresora tumoral APC (Adenomatous Polyposis Coli) estaba mutado en un número abrumador de casos de carcinoma de colon hereditarios o esporádicos (Gregorieff, 2005). Actualmente, estudios moleculares han demostrado mutaciones activadoras de la vía Wnt en aproximadamente el 90% de los casos de todos los tipos de cáncer de colon.

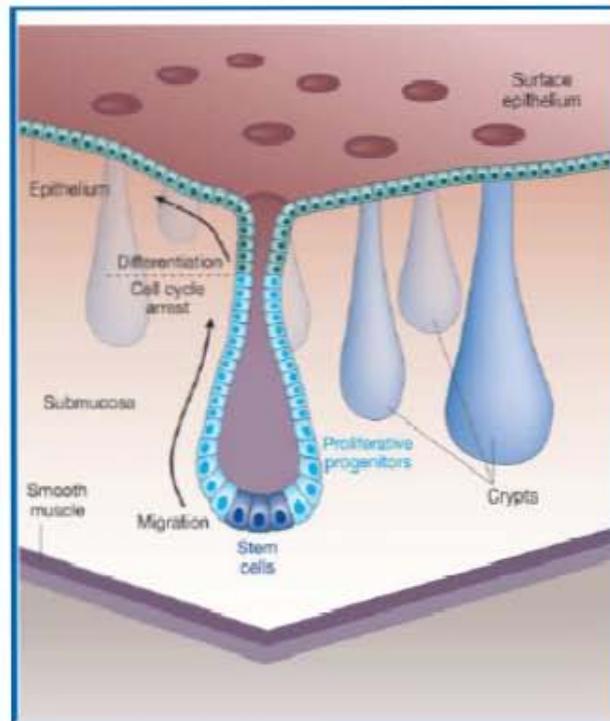


Figura 1. Epitelio intestinal de colon. Donde se aprecian las células troncales en la base de cripta, mientras que las células proliferativas ocupan dos tercios de la cripta y las células diferenciadas ocupan el resto de la cripta y la superficie plana del epitelio.

## 1.2 La ruta de señalización canónica Wnt

La ruta canónica Wnt y sus efectores intracelulares fueron descubiertos originalmente en *Drosophila* y subsecuentemente se encontró que es una ruta conservada en todos los metazoarios y actualmente se han identificado aproximadamente unas 50 proteínas que están involucradas en transducir señales Wnt (Logan, 2004). Los genes Wnt, de los cuales se conocen 19 en el hombre y en el ratón, codifican para glucoproteínas ricas en cisteína. La producción de Wnts biológicamente activos depende de su palmitoilación en residuos de cisteína conservados. Una vez secretados al medio extracelular, los Wnts activan a células blanco interactuando con el complejo de receptores formado por el receptor de siete dominios transmembranales de la familia “Frizzled“ (Fz) y la proteína relacionada con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP/Arrow). Se han descrito dos complejos funcionales que involucran a estas proteínas, dependiendo de su combinación: Los Wnts pueden unirse simultáneamente a Fz y a LRP. Esto representa el paso inicial de la llamada ruta canónica Wnt, que conduce a la formación del complejo nuclear Tcf/ $\beta$ -catenina. Alternativamente, las unión de

Wnts a receptores Fz produce respuestas independientes de Tcf/ $\beta$ -catenina, transduciendo señales vía proteínas G para activar a la fosfolipasa C (PLC), la movilización de calcio y la activación de PKC. Colectivamente, estas respuestas se denominan como ruta Wnt no canónica. Hasta ahora, se ha estudiado extensivamente la ruta canónica en múltiples sistemas, pero la ruta no canónica empieza a ser conocida y aún no se ha estudiado en el intestino (Gregorieff, 2005 Logan, 2004).

El elemento distintivo de la vía canónica de Wnt es la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina citoplásmica, como se aprecia en la Figura 2. La  $\beta$ -catenina es una proteína multifuncional que combina las características de una proteína estructural de las uniones adherentes con aquellas de un factor de transcripción. En ausencia de señalización, la proteína  $\beta$ -catenina es fosforilada por las cinasa de Serina/Treonina, caseína cinasa I $\alpha$  (CKI $\alpha$ ) en el residuo de Ser-45; esto a su vez permite la fosforilación por parte de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) en los residuos Serina 37, Serina 33 y Treonina 41. La interacción entre estas cinasas y la  $\beta$ -catenina es facilitada por las moléculas de andamiaje Axina y APC que en conjunto forman un complejo de degradación de la  $\beta$ -catenina; la  $\beta$ -catenina fosforilada es reconocida por el sistema ubiquitin-proteosoma y subsecuentemente degradada (Logan, 2004). En ausencia del ligando Wnt, este complejo de degradación es muy activo y mantiene los niveles de  $\beta$ -catenina citoplásmicos en un nivel bajo. Cuando los ligandos Wnt se unen a su complejo de receptores formado por el receptor de siete dominios membranales de la familia frizzled, y la proteína relacionada con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP/Arrow) inhiben la actividad de la GSK-3 $\beta$  a través de la fosfoproteína Dishevelled, posiblemente mediante la disociación del complejo axina-APC- $\beta$ -catenina, lo cual resulta en la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma (Korinek, 1998, Dale 1998). En 1996, el grupo de Birchmeier demostró que la acumulación citoplásmica de la  $\beta$ -catenina es un factor clave para su posterior translocación al núcleo donde se observó que interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción Lymphoid Enhancer Factor/T-cell factor (Tcf/ Lef), para formar un complejo bipartito activo (Behrens, 1996). Este complejo bipartito provoca la transcripción de genes, tales como el oncogene *c-myc*, bien conocido por su papel en la proliferación y la oncogénesis, así como de la ciclina D1, entre otros (He, 1998).

La proteína  $\beta$ -catenina participa como coactivador reclutando a dos cofactores transcripcionales, a la acetiltransferasa de histonas CBP/p300 y a la proteína remodeladora de cromatina Brg-1 hacia promotores de genes blanco de TCF (Hurlston, 2002). La activación transcripcional también es aumentada por la interacción de  $\beta$ -catenina con Legless/Bcl 9 y Pygopus, aunque su mecanismo de acción actualmente es poco entendido (Townesley, 2004). Cuando hay ausencia de los ligandos Wnt la proteína  $\beta$ -catenina es exportada del núcleo por APC y posteriormente degradada (Brenn, 2002).

La acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina es por lo tanto una característica de la ruta de señalización canónica Wnt activa. En algunos casos de cáncer de colon en los cuales APC no está mutada, la proteína de andamiaje axina 2 está mutada, o existen mutaciones puntuales que activan a la  $\beta$ -catenina al remover su sitio de fosforilación para su destrucción en la parte N-Terminal (Rubinfeld, 1997, Liu, 2000). Esto indica que cualquier evento mutacional que estabiliza a la  $\beta$ -catenina en el núcleo, tiene el efecto de activar permanentemente la ruta de señalización Wnt, lo que lleva a la iniciación del proceso de carcinogénesis en el intestino.

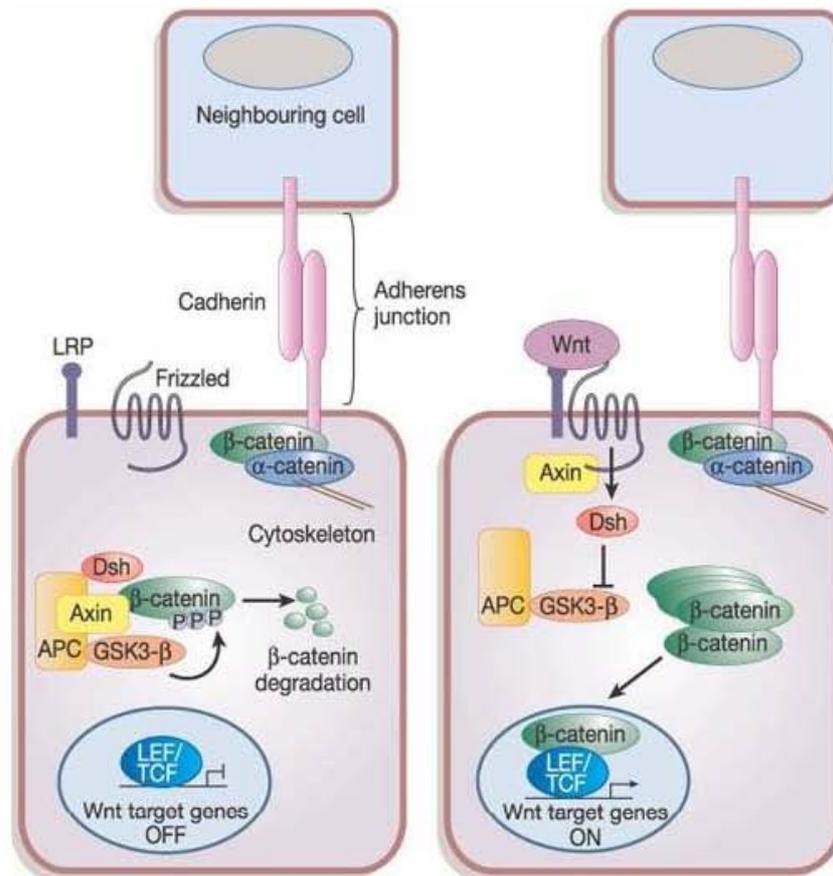


Figura 2. Ruta de señalización Wnt canónica. En la ausencia de señales Wnt, (panel de la izquierda)  $\beta$ -catenina está en complejo con Axina, APC y GSK3- $\beta$ , donde es fosforilada y posteriormente degradada.  $\beta$ -catenina también se encuentra unida a E-caderina donde regula la adhesión celular. En la presencia de señalización Wnt (panel de la derecha)  $\beta$ -catenina, no es degradada y es translocada al núcleo, donde ésta se une a factores de transcripción TCF/LEF y de esta manera activa a genes blanco Wnt.

### 1.2.1 La ruta de señalización Wnt mantiene los compartimentos de las células troncales y progenitoras en las criptas del intestino.

Modelos *in vivo* han demostrado recientemente el papel desempeñado por la ruta Wnt en regular la proliferación en el epitelio intestinal normal a lo largo del desarrollo y en el estado adulto. La expresión transgénica del inhibidor específico Dickkopf-1 (Dkk-1) de la ruta Wnt canónica en el intestino de ratones adultos, resulta en una amplia reducción de la proliferación epitelial coincidente con la pérdida de criptas en ratones adultos (Pinto, 2003). Este fenotipo es en gran parte parecido al de la reducción de compartimentos proliferativos intestinales observados en ratones fetales deficientes del factor *tcf-4*, el miembro intestinal de la familia *tcf/Lef* (Korinek, 1998). Inversamente, la inactivación inducida de *APC* en

el intestino de ratones adultos resulta en pocos días en la repoblación completa de los vellos por células parecidas a las de las criptas, las cuales acumulan  $\beta$ -catenina nuclear (Sansom, 2004). Estas observaciones *in vivo* indican que la ruta de señalización Wnt es absolutamente requerida para mantener los compartimentos de células troncales y progenitoras en las criptas, y de esta forma es esencial para la homeostasis del epitelio intestinal, por lo que una señalización aberrante es la causa primaria de la tumorigénesis intestinal.

La explicación más aceptada de cómo APC ejerce su efecto como supresor tumoral, es la que sostiene que APC actúa como un antagonista de la ruta Wnt al regular los niveles de  $\beta$ -catenina. La pérdida de APC lleva a una inapropiada estabilización citoplásmica de la  $\beta$ -catenina lo que provoca una activación constitutiva de la ruta Wnt canónica. Debido a esto, APC es considerada como un regulador negativo clave de la ruta de señalización Wnt, por lo que su participación en esta vía ha sido extensivamente estudiada (Gregorieff, 2005).

### **1.2.2 Ruta Wnt no canónica.**

Hasta aquí, hemos descrito la vía de señalización Wnt colocando a la  $\beta$ -catenina como un elemento clave. Esta vía se ha descrito ahora como canónica para diferenciarla de al menos 3 vías distintas de señalización mediadas por ligandos Wnt independientes de la acción de la  $\beta$ -catenina. Hace aproximadamente 15 años, fue descrita la activación de los receptores Frizzled principalmente por los ligandos Wnt 4, 5a y 11 sin una actividad transcripcional aparente de la  $\beta$ -catenina. Mediante estudios realizados en *Drosophila*, se describió la vía de polaridad planar celular (PCP) la cual promueve la activación de la proteína cinasa jun-N-terminal (JNK). Por otra parte, se observó que algunos receptores Frizzled, al igual que otros receptores de siete dominios transmembranales, actuaban a través de proteínas G, activando a la PLC y a la fosfodiesterasa. Este hallazgo sugirió que debía producirse un aumento de  $Ca^{++}$  intracelular debido a la formación del mensajero IP3. Esta hipótesis fue corroborada al demostrarse que la inyección de Wnt 5a en embriones de pez zebra aumentaba transitoriamente la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular. El aumento de  $Ca^{++}$  lleva a la activación de proteínas tales como la

proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina II y a las formas convencionales de PKC; además, el diacilglicerol producido por la activación de PLC, también activa a la PKC. Efectivamente, la expresión ectópica de Wnt 5a resulta en la translocación de la PKC a la membrana plasmática y aumenta su actividad de cinasa *in vitro* (Jonsson, M. et al., 1998. Klein, I.K. et al. 2000).

Se ha observado la importancia de la vía de señalización no canónica principalmente en la modulación de los movimientos celulares durante la embriogénesis, sin embargo, se conoce muy poco acerca de los posibles eventos de señalización independientes de la  $\beta$ -catenina en el mantenimiento de tejidos adultos de autorenovación como es el caso del mantenimiento de células troncales y su posible convergencia con otras vías intracelulares de señalización incluyendo la vía Wnt canónica. De este modo, el grado de entrecruzamiento de la ruta de señalización Wnt con otras vías de señalización celular, apenas empieza a considerarse y es sin duda una importante área de investigación dado el potencial de la ruta Wnt de interactuar con la actividad de otros oncogenes.

### **1.3 Proteína adenopoliposis de colon (APC).**

La secuencia de la proteína APC se ha determinado para diferentes especies incluyendo *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, ratón, *Xenopus*, humano, y la secuencia del genoma del pez cebra ha revelado también un homólogo de APC. Una segunda proteína de APC usualmente más corta se ha encontrado también en *Drosophila*, en ratón y en humano. En humanos es conocida como APCL/APC2; ésta carece de algunos de los motivos típicos de APC, por ejemplo algunos de los sitios de unión a  $\beta$ -catenina (Nathke 2004b). El papel de esta segunda proteína de APC se ha estudiado principalmente en *Drosophila*, y su papel en el desarrollo de cáncer no se conoce.

El gen de APC humano está localizado en el cromosoma 5q21 y codifica una proteína de 2843 aminoácidos (ver Figura 3). Las mutaciones que se presentan en el gen casi invariablemente producen una proteína truncada, y muchas de las mutaciones somáticas están localizadas en la región central del gen, llamada la “mutation cluster region” (MCR). Al ser una proteína de gran tamaño (310 Kda), presenta múltiples dominios los cuales tienen la capacidad de

interactuar con un gran número de proteínas por lo que presenta funciones adicionales a la de regular a la ruta Wnt. La región N-terminal de la proteína presenta un dominio de oligomerización, también contiene dos señales de exportación nuclear (NES) que son requeridas para el transporte de APC entre el núcleo y el citoplasma y podrían interactuar directamente con la exportina Crm-1 (Henderson, 2002).

También en la parte N-terminal de APC, se localizan el dominio armadillo (Figura 3). Las proteínas que se unen a esta región incluyen a la subunidad reguladora de la fosfatasa 2A (PP2A), el factor intercambiador de nucleótidos de guanina, estimulado por APC (ASEF) para proteínas de la familia Rho y KAP3, la cual es una proteína conectora para las proteínas Cinesinas No se sabe si todas estas interacciones ocurren de manera simultánea ni como son reguladas, (Nathke, I. 2004, Nathke, I. 2005).

En la mitad de la molécula de APC se encuentran dominios importantes para las interacciones con proteínas de la ruta de señalización Wnt (Figura 3). Esta región incluye tres repeticiones de 15 residuos que se unen constitutivamente a la  $\beta$ -catenina y siete repeticiones de 20 residuos que también se unen a la  $\beta$ -catenina, pero éstos son regulados por fosforilación. Además contiene tres tramos involucrados en su unión a la axina (Su, 1993, Rubinfeld, 1993, Matthew, 1998). La región C-terminal de APC contiene motivos que median la interacción con diferentes proteínas estructurales: un tramo básico enriquecido de residuos cargados positivamente, que es similar al sitio de unión a microtúbulos de la proteína tau y representa el mayor sitio de unión a microtúbulos de APC. Además, los 170 residuos terminales pueden unirse a EB1, una proteína pequeña de unión a la parte final de los microtúbulos. Los últimos 15 aminoácidos de APC constituyen un sitio de unión a dominios PDZ (Nathke 2004b, Fodde, 2001).

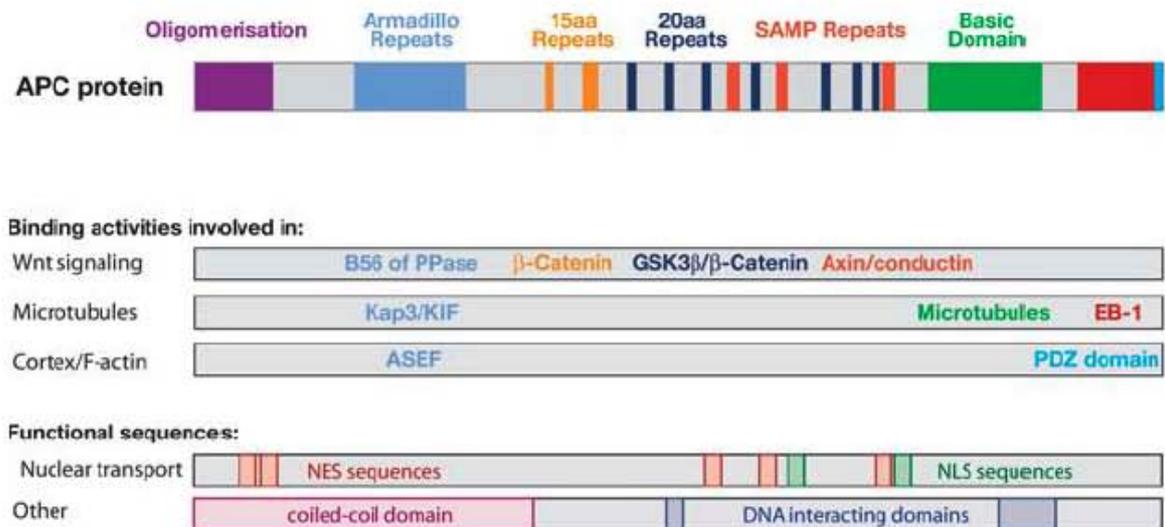


Figura 3 .En la parte superior se muestra el esquema de la secuencia de APC y sus diferentes dominios. En la parte de en medio de la figura se mencionan las proteínas de unión a APC, los colores se relacionan con los dominios mostrados en el esquema de la proteína. En la parte inferior, se muestra la localización de las secuencias NES y NLS, así como los dominios de unión al DNA.

### 1.3.1 Mutaciones en el gen de APC asociadas a la formación de tumores en el colon.

El cáncer colorectal (CRC) puede ser dividido en dos categorías: 15% del CRC es heredado de una forma autosómica dominante, por ejemplo, la poliposis adenomatosa familiar (FAP), mientras que el restante 85% se desarrolla esporádicamente. Los pacientes de FAP desarrollan cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon y en el recto a una edad temprana de la cual, un subgrupo inevitablemente progresa a carcinomas si no son removidos quirúrgicamente (Lynch, 2003). Mutaciones en la línea germinal en el gen de APC se han encontrado que son eventos genéticos esenciales para los pacientes FAP. Subsecuentemente, mutaciones somáticas en el mismo gen se han asociado con la mayoría (arriba del 85%) de los casos de cáncer colorectal. El 95% de estas mutaciones son sin sentido o de cambio en el marco de lectura, lo que resultan en la proteína de APC truncada con una función anormal. Los tumores colorectales de pacientes FAP, presentan mutaciones adicionales somáticas de APC o pérdida de la heterocigosidad en este locus en adición a la mutación germinal original (Fearnhead, 2001).

Por otro lado, las mutaciones somáticas resultan en la pérdida posterior del

alelo normal de APC y son encontradas en la mayoría de los cánceres colorectales esporádicos. Las mutaciones de APC aparecen al inicio de la tumorigénesis colorectal. Cerca del 60% de todas las mutaciones somáticas aparecen entre los codones 1286 y 1513; en la región conocida como la MCR y dentro de esta región existen dos hotspots para las mutaciones somáticas: en los codones 1309 y 1450. Las mutaciones de APC dentro de la región MCR resultan en una proteína truncada que carece de todos los sitios de unión a axina y también carecen de la mayoría de los sitios de 20 repeticiones de aminoácidos de unión a  $\beta$ -catenina. El análisis de las mutaciones en APC presentes en diferentes líneas celulares colorectales indican que existe interdependencia de las dos mutaciones en APC tanto en cánceres colorectales esporádicos como en los tumores asociados a pacientes FAP. Las mutaciones de APC en la región MCR están asociadas con pérdida alélica (LOH), mientras que tumores con mutaciones fuera de la región MCR están asociadas con la producción de proteínas truncadas. La segunda mutación de APC representa el paso limitante para el inicio del proceso de carcinogénesis (Roban, 2000). Estos datos indican que mutaciones en el gen de APC están ligadas al inicio de la formación de tumores en el intestino y que por lo tanto, representan un prerrequisito para la entrada en este proceso. Aunque el inicio del proceso de la carcinogénesis de colon está asociada principalmente con mutaciones en el gen de APC y en porcentaje menor al gen de  $\beta$ -catenina y de axina, la acumulación de una serie de mutaciones más o menos ordenada en oncogenes y genes supresores tumorales, como *K-ras*, *p53* y *Smad4* y de eventos epigenéticos (que confieren inestabilidad genómica) son necesarios para la progresión eventual hacia tumores malignos llamados adenocarcinomas (Fodde, 2001).

#### **1.4 La proteína Cinasa C.**

##### **1.4.1 Características de la familia de PKC.**

La PKC representa una familia de proteínas cinasas de residuos de serina y treonina, que regulan una amplia variedad de eventos biológicos dentro de la célula. Constituye una parte integral de la maquinaria de transducción de señales hormonales acopladas a receptores que inician una cascada de degradación de componentes lipídicos de membrana para controlar importantes procesos

biológicos tales como apoptosis, memoria, diferenciación celular y tumorigénesis (Nishizuka 1995). Desde su descubrimiento en 1977 por Yasutomi Nishizuka, la PKC ha sido el foco de atención de investigadores interesados en estudiar el cáncer, ya que no solamente es el blanco de moléculas promotoras de tumores, sino que está implicada en la activación de oncogenes y en el control de la proliferación celular, de la apoptosis y de la adhesividad celular (Toker 1998 Nishizuka, 1984,).

La familia PKC consiste de 11 miembros que poseen diferencias en su localización, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato y puede ser dividida en tres subfamilias: convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$  [por splicing alternativo  $\beta$ I y  $\beta$ II] y la Isoforma  $\gamma$ ), nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), y atípicas ( $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ) ver figura 4. Estructuralmente, la familia consiste de un dominio regulador N-terminal y de un dominio catalítico C-terminal unidos por una región “bisagra” llamada V3. El núcleo catalítico está altamente conservado entre los miembros de la familia, y contiene un dominio constante C-3 de unión a ATP y otro dominio constante C-4 de unión al sustrato (Newton, 1995). El dominio regulador contiene una secuencia llamada pseudosustrato, y los dominios constantes C-1 y C-2 de unión a la membrana plasmática y a  $\text{Ca}^{++}$ , respectivamente. La actividad de PKCs convencionales es estimulada por diacilglicerol (DAG),  $\text{Ca}^{++}$  y fosfatidilserina (PS); las isoformas nuevas por DAG y PS y las isoformas atípicas por PS (Newton 2001), por lo que cada miembro de la familia de PKC posee diferente modo de activación, pero todos tienen en común el requerir de fosfatidilserina para ésta. Además de DAG, otros lípidos producidos transitoriamente en la membrana después de la estimulación de receptores pueden tomar parte en la activación de PKC. Estos lípidos incluyen ácidos grasos, especialmente el ácido araquidónico, lisofosfolípidos, fosfatidilinositol-polifosfatos y ceramida. (Nishizuka, 2003).

Se sabe que las funciones intrínsecas de las isoenzimas de PKC son reguladas por tres mecanismos: 1) fosforilación, que prepara a la enzima para su actividad catalítica, 2) unión a cofactores, los cuales activan alostéricamente a la enzima, y 3) la interacción con proteínas de anclaje que colocan a las isoenzimas cerca de sus reguladores y sustratos.

La función de PKC depende de una correcta distribución. Su localización es llevada a cabo por proteínas de unión que funcionan como proteínas de anclaje o de andamiaje, como se mencionó anteriormente. Estas proteínas posicionan a

PKC cerca de sus sustratos, de sus reguladores o en compartimentos intracelulares específicos, tales como la membrana plasmática, aparato de Golgi, mitocondria, núcleo, y citoesqueleto. Existen diferentes proteínas de anclaje para PKC, algunas de estas proteínas regulan a diferentes isoformas de PKC, mientras que otras regulan la distribución de isoformas específicas. También hay proteínas de unión para formas no fosforiladas de PKC, para formas fosforiladas pero inactivas y para formas fosforiladas y activas de PKC. Por ejemplo la proteína de anclaje CG-NAP localiza a PKCε recién sintetizada al Aparato de Golgi. Miembros de la familia de proteínas de andamiaje conocidas como RACKs por sus siglas en inglés (Receptor for Activated C Kinase) posicionan a PKC fosforilada y activa en sitios celulares específicos. Otras proteínas conocidas como STICKs por (Substrates That Interact with C kinase) unen a PKC fosforilada pero inactiva, y después liberan a PKC una vez fosforilada (Newton 2001).

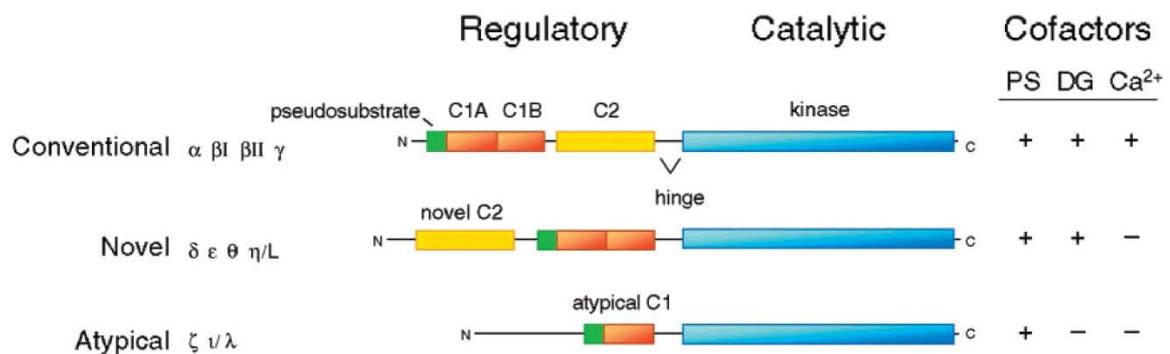


Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de los miembros de la familia de PKC, que muestra los diferentes dominios y activadores. La parte amino terminal, contiene dominios regulatorio: el pseudosustrato (verde); los dominios C1A y C1B, los cuales se unen a fosfatidilserina, diacilglicerol/ésteres de forbol (naranja); el dominio C2 el cual se une a lípidos aniónicos y para las PKCs convencionales, de manera dependiente de Ca<sup>++</sup> (amarillo). La parte carboxilo terminal contiene el dominio catalítico. Los requerimientos de cofactores para las diferentes subclases de PKC se muestran a la derecha: PS, fosfatidilserina; DG, diacilglicerol; Ca<sup>++</sup>.

#### 1.4.2 Alteraciones en el patrón de expresión de las isoformas de PKC asociadas a la carcinogénesis de colon.

La expresión, activación y función de PKC han sido estudiadas extensivamente en el epitelio intestinal. En el epitelio de colon normal, los niveles de expresión más elevados de PKC tales como las isoformas α y δ, se encuentran

en el tercio superior de la cripta, con una disminución gradual de su expresión que se extiende hacia la base de la cripta en la que se presenta una proliferación normal en el epitelio (Black, 2001, Versteve, 1998). Se piensa que PKC puede funcionar como regulador de eventos post-mitóticos, por ejemplo, en la diferenciación e inhibición del crecimiento durante la autorenovación del epitelio intestinal, un concepto apoyado por el hecho de que PKC media un programa coordinado de salida del ciclo celular en células intestinales (Frey 1997, Hizli, 2006, Saxon, 1994, Black, 2000). Varios estudios sobre PKC $\alpha$  han demostrado que participa en la inhibición de la progresión del ciclo celular a través de la fase de transición G1/S en células epiteliales intestinales, por medio de la inducción del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 cip/waf1 y de inhibir el inicio de la traducción de la ciclina D1 (Frey 1997, Hizli, 2006, Black 2000). También se ha demostrado que al aumentar la expresión de PKC $\delta$  en células CaCo-2 (línea celular tumoral de colon), se limita el crecimiento celular al retardar la transición a la fase G1, aumenta la diferenciación celular y acelera la apoptosis, mediante la regulación negativa de la ciclina D1 y la ciclina E y de la inducción de los niveles de expresión del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 (Black, 2001, Cerda et al. 2006). Estos resultados sugieren que la vías de señalización dependientes de PKC pueden controlar el crecimiento celular y provocar diferenciación celular en este epitelio. A este respecto, se ha observado una marcada disminución de los niveles de expresión de PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  (Black, 2001, Versteve, 1998) en adenomas de colon humano, además de que la actividad total de PKC disminuye comparada con el epitelio de colon normal (Guillem, 1987). Sin embargo, aunque los niveles de la mayoría de las isoformas de PKC disminuyen, otras como PKC $\beta$ II, incrementan su expresión en diversos modelos de cáncer de colon (Gokmen-Polar, 2001). Interesantemente, existen datos que sugieren la participación de esta isoforma en la ruta de señalización Wnt, ya que se ha reportado que la sobreexpresión de PKC $\beta$ II promueve el cáncer de colon a través de la supresión de la señalización del TGF $\beta$  y de la activación de la vía de señalización APC/ $\beta$ -catenina, pero se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esto (Yu 2003). Además, se ha observado que después de la exposición de células de cáncer colorectal a ácidos biliares, PKC $\beta$ II fosforila e inactiva a

GSK-3 $\beta$  (Murray, et al, 1999). Asimismo, el producto del gen *wnt5a* parece estar sobre-expresado por la activación de PKC y disminuido por su inhibición, lo cual apoya la hipótesis de una posible convergencia de la señalización por Wnt y PKC durante el desarrollo de procesos cancerosos (Jonsson 1998, Cook 1996, Y Chen 2000.)

Sin embargo, aunque la evidencia experimental muestra que el proceso de carcinogénesis intestinal está asociado con alteraciones en la actividad y expresión de las isoformas de PKC, la contribución de estos cambios en la progresión del tumor en este tejido continúa aún sin definirse en gran parte (Black, 2001). Estos datos sugieren que la regulación negativa de PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  y la sobre expresión de PKC $\beta$ II, pueden provocar un crecimiento anormal en las células epiteliales de colon. Esto resultaría en una hiperproliferación que haría, a estas células más susceptibles a mutágenos y de esta manera contribuir al proceso de carcinogénesis. En la siguiente tabla se resumen las funciones reportadas de 4 isoformas de PKC en el epitelio intestinal de colon.

<b>Isoforma</b>	<b>Tejido o línea celular</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
PKC $\alpha$	Células IEC-18	Inhibición de ciclo celular Inducción de p21 y p27, regulación de ciclina D1.	Frey 1997, Hizli, 2006, Black 2000
PKC $\delta$	Células CaCo2	Inhibición del ciclo celular, inducción de apoptosis, inducción de p21, regulación negativa de Ciclinas D1 y E	Assert, 1999, Black, 2001, Cerda et al. 2006
PKC $\beta$ II	Intestino Humano/ratón	Aumento de los niveles de expresión de $\beta$ -catenina y COX-2	Yu 2003, Murray, et al, 1999
PKC $\epsilon$	Células CLD	Inducción de Ras/Raf	Perletti, 1998

Tabla 1. Participación de isoformas de PKC $\alpha$ , $\beta$ II, $\delta$  y  $\epsilon$  en el epitelio intestinal de colon.

Con estos antecedentes, el interés de este trabajo es el de estudiar la posible interacción entre miembros de la familia PKC con la proteína supresora tumoral APC. Como se sabe, un mecanismo importante para que PKC lleve a cabo sus funciones es su interacción con proteínas de anclaje, ya que estas proteínas posicionan a PKC cerca de sus sustratos, de sus reguladores o en compartimentos intracelulares específicos. Por otro lado, la propiedad que presenta APC para funcionar como proteína de andamiaje para diferentes proteínas, así como la presencia de sitios consenso de fosforilación por PKC en la secuencia de APC (ver apéndice), nos sugieren que puede haber una posible interacción entre estas proteínas en el epitelio intestinal. El conocimiento derivado de este estudio nos permitiría conocer el papel que juega la interacción APC-PKCs en el mantenimiento y crecimiento del epitelio intestinal, y a entender mejor cómo se genera el cáncer de colon.

**2. HIPOTESIS:** Que APC interacte in vivo con isoformas de PKC y que esta interacción no sea igual en las líneas celulares de colon normales que en las cancerosas

**3. OBJETIVO GENERAL:** Es investigar si la proteína de adenopoliposis de colon (APC) interactúa de manera específica con isoformas de PKC en células epiteliales de colon (humano y de rata) y si existen diferencias en esta interacción entre el estado normal y el canceroso.

**3.1 Objetivos específicos:**

- Analizar la expresión de las isoformas de PKC y de APC en células normales y cancerosas de colon por análisis de Western Blot.
- Determinar si existe interacción de APC con isoformas de PKC por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación recíproca.
- Examinar la localización intracelular de las proteínas APC y de PKC por inmunofluorescencia y microscopía confocal tanto en células normales como en cancerosas de colon.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Anticuerpos**

Para los estudios de Western blot, los anticuerpos primarios dirigidos contra las diferentes isoformas de PKC utilizados fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (PKC $\delta$ -sc-213, PKC $\alpha$ -as8393, PKC $\beta$ II sc210 y PKC $\epsilon$  sc-1681) en una dilución 1:1000. Para APC se utilizó el anticuerpo monoclonal, (Ali 12.28 Chemicon), en una dilución de 1:500. Para actina se utilizó un anticuerpo monoclonal en una dilución de 1:200. Para la inmunoprecipitación de APC se utilizó el anticuerpo monoclonal (F-3, Santa Cruz Biotechnology), en una concentración de 2  $\mu$ g/ml. En los estudios de inmunofluorescencia, para la detección de APC se utilizó el anticuerpo monoclonal Ali 12.28 Chemicon, en una dilución 1:50 mientras que para la detección de la isoforma de PKC $\alpha$  se utilizó el anticuerpo policlonal de Cell signaling PKC $\alpha$ -2056 y para PKC $\delta$  se ocupó el anticuerpo policlonal de Santa Cruz Biotechnology PKC $\delta$ -sc-213, ambos en una dilución 1:50.

### **4.2 Cultivos celulares**

Las líneas celulares RKO y HT29 (de carcinomas de colon humano) así como las líneas normales de colon 112 CoN (humano) y las IEC-18 (rata) se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, E.U.). Las células RKO y 112CoN se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Las células IEC-18 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 2mM piruvato de sodio, 10 $\mu$ g/ml insulina, antibióticos y 2 mM L-glutamina. Las células HT-29 se mantuvieron en medio McKoy con 10% de suero fetal bovino, con 1% de antibióticos y glutamina. Todas las células se cultivaron a una temperatura de 37° en una atmósfera de 95% aire 5% CO<sub>2</sub>.

### **4.3 Obtención de extractos celulares y separación de proteínas por SDS-PAGE**

Los extractos celulares se obtuvieron a través del siguiente procedimiento: la monocapa de células se lavó dos veces con PBS (1 ml), después se le agregó 1 ml de buffer de lisis (Tris 50mM, NaCl 150mM, a pH 7.5 adicionado con 0.5% Triton X-100, leupeptina 1 $\mu$ M, PMSF 1mM inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml) y se

incubaron en agitación por 30 min a 4°C. Después se colectaron los lisados en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm a 4°C por 10 min. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se tomó una alícuota para la cuantificación de proteína por el método de Bradford (BioRad). Al sobrenadante se le agregó buffer de muestra de electroforesis (Leammli 2x). Para las isoformas de PKC, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 90 min a 160 mA. Para APC, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en gradiente (5% a 12%) y transferidas a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) por 90 min a 300 mA.

#### **4.4 Análisis de Western Blot.**

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se hizo el bloqueo de la membrana con 5% de leche en TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente (blots de PKC y actina ), o se dejaron toda la noche a 4°C (blots de APC). Posteriormente se lavaron las membranas con TBS-Tween dos veces por 5 min. Después fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-Tween. Los blots de PKC con el anticuerpo primario se dejaron toda la noche a 4°C, mientras que para APC la incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente. Como control de carga, se utilizó actina, la incubación con el anticuerpo primario se dejó toda la noche a 4°C. Posteriormente se hicieron tres lavados con TBS-Tween, para retirar el exceso de anticuerpo, para después incubar los blots a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados a la peroxidasa de rábano diluidos 1:1000 para PKC por 2 horas, 1:1000 por 30 min para APC, y anti-IgG de ratón 1:1000 por dos horas para la actina. Los blots se revelaron por quimioluminiscencia (Pierce Supersignal) y se visualizaron las bandas por exposición en placas de autorradiografía.

#### **4.5 Inmunoprecipitación de proteínas.**

Para la obtención de extractos totales de proteína utilizadas para inmunoprecipitar APC, la monocapa de células se lavó dos veces con PBS (1 ml) y se lisaron las células con buffer de inmunoprecipitación (Tris 50mM, NaCl 150 mM a pH 7.5 adicionado con leupeptina 10µg/ml, PMSF 1mM e inhibidor de tripsina 0.1 mM) además de inhibidores de fosfatasas. Después se colectaron los

lisados en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm a 4°C por 10 min. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo, se tomó una alícuota para la cuantificación de proteínas (por el método de Bradford, BioRad) y se ajustaron los sobrenadantes a la misma concentración de proteína.

Los lisados celulares fueron preclareados, en presencia de 10 µl por tubo de suero pre-inmune de ratón y de 10 µl de proteína A-sepharosa en agitación por 1 hora a 4°C. Después, las muestras se centrifugaron a 9000 rpm a 4°C por 1 min y el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo, para inmunoprecipitar las muestras con el anticuerpo específico (APC). Se incubaron en agitación a 4°C toda la noche y al día siguiente se les adicionó 25 µl de la Proteína A-sepharosa a cada tubo por otras dos horas, seguido de centrifugación de las muestras a 9000 rpm a 4°C por 1 min con la posterior eliminación del sobrenadante. Los complejos precipitados fueron lavados dos veces con el buffer Tris 50mM, NaCl 0.6 M a pH 8.3 adicionado de 0.1 mg/ml inhibidor de tripsina e inhibidores de fosfatasas. Finalmente se hizo un lavado con buffer Tris 50mM, NaCl 150 mM a pH 7.5 adicionado de inhibidor de tripsina e inhibidores de fosfatasas, y se centrifugaron las muestras a 9000 rpm a 4°C por 1 min. Se retiró el sobrenadante y los complejos fueron resuspendidos en buffer de carga de electroforesis Laemli 2X. El análisis del inmunoprecipitado por Western blot se hizo para APC, PKC $\delta$ , PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ <sub>II</sub> y PKC $\epsilon$ . La presencia de las proteínas se detectó por quimioluminiscencia.

#### **4.6 Inmunofluorescencia.**

Las células (IEC-18 y HT-29) se sembraron en cubre-objetos y se incubaron en cajas multipozos a 37°C en una atmósfera de 95% aire 5% CO<sub>2</sub> hasta confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con metanol a –20°C durante 10 minutos. Después de retirar el metanol, se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron por 10 minutos con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Después se lavaron las células 3 veces con PBS y se bloquearon con BSA (libre de IgG, Research Organics) al 1% durante 30 minutos. Se incubaron las monocapas toda la noche a 4°C en cámara húmeda con los anticuerpos primarios policlonal y monoclonal diluidos en PBS (dirigidos contra la isoforma de PKC y contra APC respectivamente). Las monocapas que sirvieron de control se incubaron sólo con PBS. Después de lavar 3 veces con PBS, se incubaron las monocapas 1 h a 4°C en

obscuridad con los anticuerpos secundarios (IgG anti-conejo acoplado a FITC, e IgG anti-ratón acoplado a TRITC) y las monocapas control también se incubaron con estos anticuerpos. Se montaron las monocapas con amplificador de fluorescencia (antifade Vectashield), y se examinó la fluorescencia por microscopía confocal.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expresión de ocho isoformas de PKC en líneas celulares de colon.

Con el propósito de conocer la expresión de las isoformas de PKC presentes en colon humano, y si había diferencias en el patrón de expresión de las isoformas de PKC entre el estado normal y el maligno, se realizaron ensayos de Western blot en las líneas celulares normales 112-CoN y en las malignas RKO y HT-29. En la Tabla 2 se presenta la cuantificación densitométrica (normalizada con respecto al control) de los resultados obtenidos para cada isoforma de por lo menos 3 experimentos independientes. Como puede observarse en ella, el análisis de la expresión de ocho isoformas de PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\eta$  y  $\zeta$ ) por Western blot, mostró que en el colon normal se expresan todas las isoformas convencionales, nuevas y atípicas probadas, excepto la isoforma PKC $\eta$ , que sólo se expresa en las células malignas. Interesantemente, y en concordancia con los reportes para algunas isoformas, encontramos también que existen cambios de expresión muy marcados en las isoformas de PKC en las células tumorales con respecto a las normales. En la tabla se indican con color rojo las isoformas que bajan su expresión con respecto a las normales, y en azul las que aumentan su expresión. Como puede verse, los colonocitos humanos normales expresan mayoritariamente las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\delta$  de PKC. Las líneas celulares malignas sobre-expresan las isoformas  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\mu$ , y  $\zeta$ , mientras que las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\delta$  disminuyen o dejan de expresarse en relación a las células normales. Adicionalmente, solamente las líneas RKO y HT-29 expresan la isoforma  $\eta$ .

A partir de estos resultados, decidimos trabajar con dos isoformas que disminuyen su expresión en las células tumorales con respecto a las normales ( $\alpha$  y  $\delta$ ) y con dos isoformas que se sobre-expresan en las líneas celulares tumorales ( $\epsilon$  y  $\beta$ II) en relación a las células normales y determinar si existe interacción con la proteína supresora tumoral APC. Los western blot de estas isoformas se muestran en las figuras 5 y 6.

Expresión comparativa de isoformas de PKC en las líneas celulares de colon

PKC	112 CoN	HT-29	RKO
$\alpha$	1	0.2 $\pm$ 0.05	0
$\beta I$	1	0.05	0
$\delta$	1	0.1 $\pm$ 0.06	0.1 $\pm$ 0.02
$\beta II$	1	3 $\pm$ 0.07	4 $\pm$ 0.05
$\epsilon$	1	2 $\pm$ 0.03	5 $\pm$ 0.09
$\eta$	0	4 $\pm$ 1	0.2 $\pm$ 0.02
$\zeta$	1	4 $\pm$ 0.07	2 $\pm$ 0.01
$\mu$	1	4 $\pm$ 0.1	6 $\pm$ 0.2

■ DISMINUCIÓN DE EXPRESIÓN    ■ AUMENTO DE EXPRESIÓN

Tabla 2. Expresión de 8 isoformas de PKC en células tumorales de colon de humano (RKO y HT-29) y en células normales de colon de humano 112-CoN. Los resultados se obtuvieron normalizando el análisis densitométrico correspondiente a la expresión en células normales a 1, y representan los datos del promedio  $\pm$  S.E.M de por lo menos tres experimentos con diferentes preparaciones celulares.

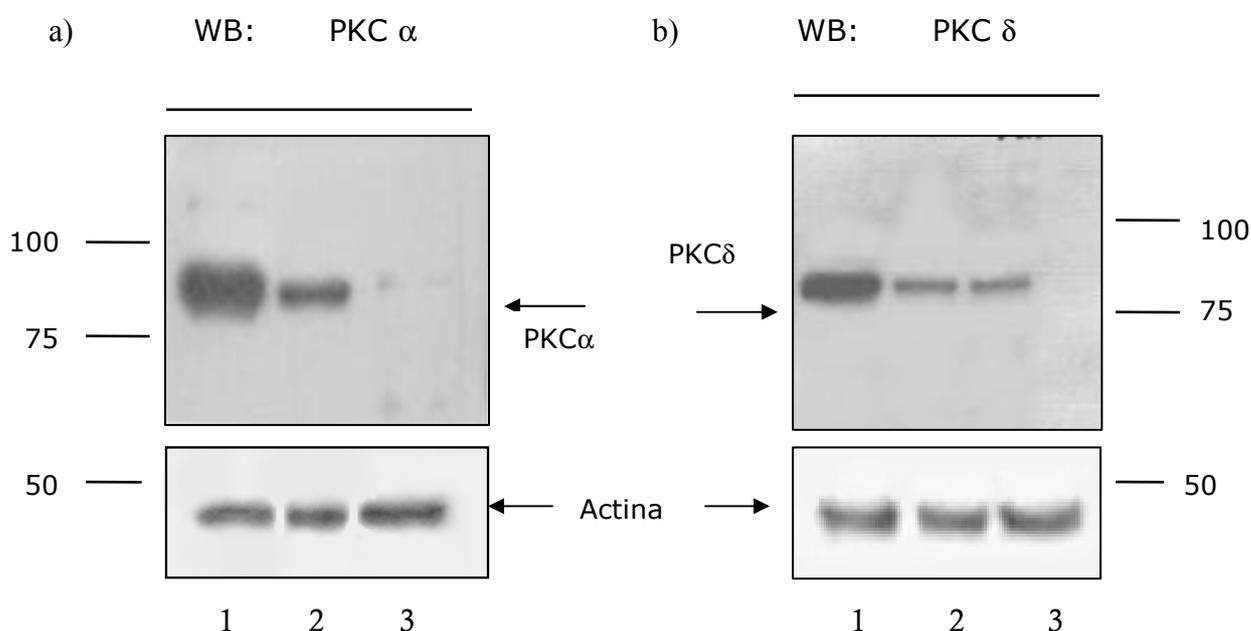


Figura 5. Western blot de lisados totales de líneas celulares de colon normales 112-CoN (1), y de líneas celulares malignas, HT-29 (2) y RKO (3), a) anticuerpo específico para detectar la presencia de PKC $\alpha$  y b) anticuerpo específico para detectar la presencia de PKC $\delta$  en células 112-CoN (1), RKO (2) y HT-29 (3). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares.

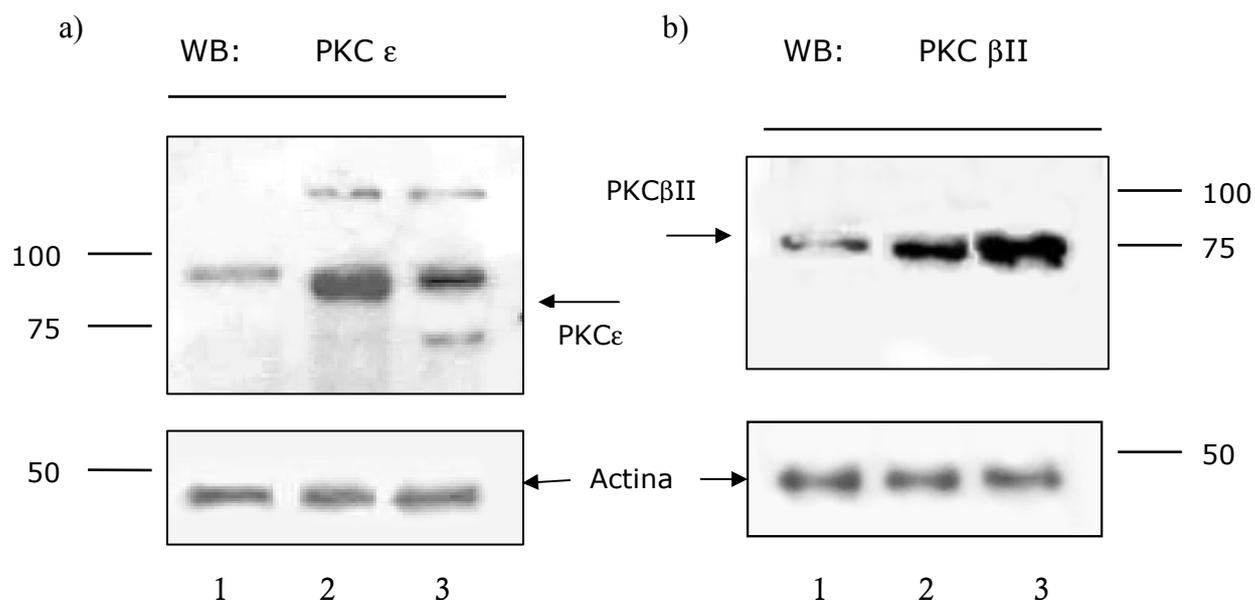


Figura 6. Western blot de lisados totales de líneas celulares de colon normales 112-CoN (1), y de líneas celulares malignas, RKO (2) y HT-29 (3), a) anticuerpo específico para detectar la presencia de PKCε y panel b) anticuerpo específico para detectar la presencia de PKCβII, en células 112-CoN (1), HT-29 (2) y RKO (3). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares. Los números indican el peso molecular.

## 5.2 Expresión de la proteína APC en las líneas celulares de colon.

El siguiente paso fue analizar la expresión de la proteína APC por Western Blot en las mismas líneas celulares, utilizando un anticuerpo dirigido hacia la parte amino de la proteína de tal manera que reconozca tanto a las formas completas como a las formas truncadas. Los resultados mostraron la presencia de APC en su forma completa en las células normales 112CoN, aunque también trazas de ella en las células malignas RKO, que como se observa en la figura 7. En las células HT-29, sólo se observa la presencia de proteínas truncadas, en concordancia con lo reportado en la literatura de que estas células sintetizan proteínas de APC que carecen de la parte carboxilo terminal (Figura 7).

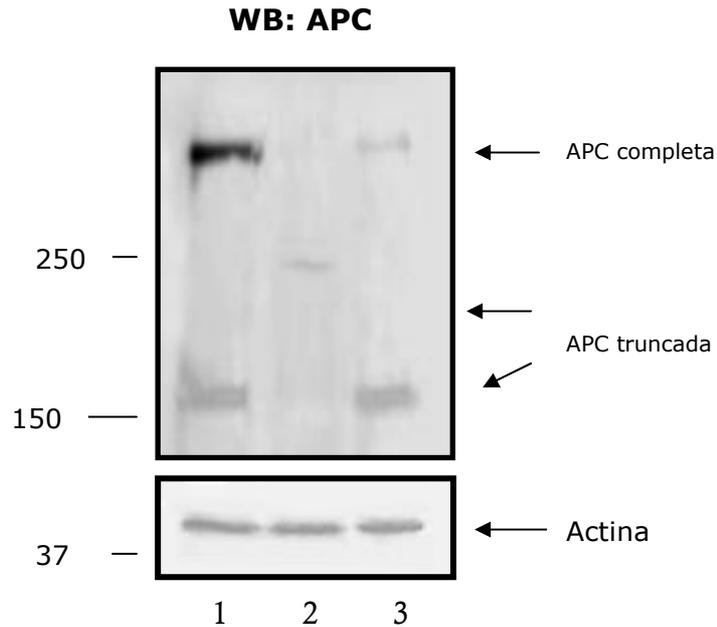


Figura 7. Inmunoblot de APC en células normales 112-CoN (1) y en células tumorales de colon, HT-29 (2) y RKO (3). Los números indican el peso molecular en kDa. Se utilizó como control de carga actina. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares.

### 5.3 Inmunoprecipitación de APC demuestra que interacciona *in vivo* con las isoformas de PKC $\alpha$ y $\delta$ en líneas celulares de colon.

Una vez analizada la expresión de APC y de las isoformas de PKC en las líneas celulares de colon, se procedió a investigar la posible interacción de APC con PKC. La estrategia experimental que se utilizó fue la de inmunoprecipitar a la proteína APC a partir de extractos de células normales o de células malignas, y a buscar en estos inmunoprecipitados por Western Blot, la posible co-inmunoprecipitación de la isoforma de PKC de interés. Se decidió utilizar como control adicional una línea de íleon de rata (IEC-18), que crece con el fenotipo de células epiteliales, a diferencia de la línea normal 112 CoN humana, que crece como fibroblastos. Este análisis se hizo primero buscando a PKC $\alpha$  y a PKC $\delta$ , que son las isoformas que disminuyen su expresión en las células malignas. Los resultados del análisis de los inmunoprecipitados por Western Blot mostraron claramente que tanto PKC $\alpha$  (Figura 8) como PKC $\delta$  (Figura 9) interaccionan con APC en las células normales 112CoN y en las IEC-18. Sorprendentemente, a pesar de que la expresión de PKC $\alpha$  y de PKC $\delta$  está disminuida en las células malignas,

encontramos que ambas isoformas de PKC co-precipitaron también con la forma truncada de APC, que es la única que se expresa en las células HT-29, como se puede observar en las figuras 8 y 9, respectivamente.

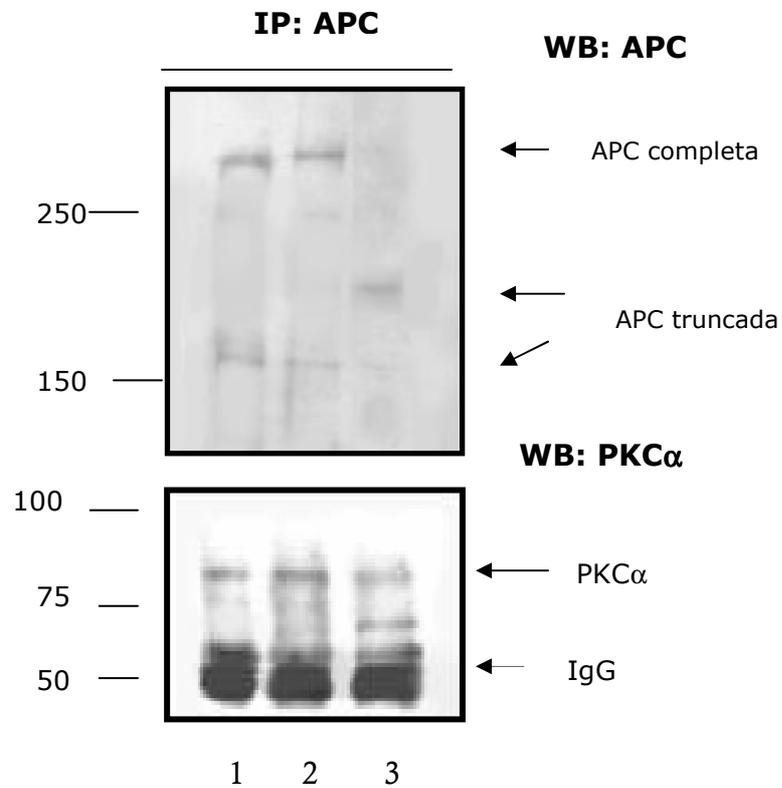


Figura 8. Inmunoprecipitado de APC, que muestra la interacción con PKC $\alpha$ , en células normales 112-CoN (1), IEC-18 (2) y en células tumorales de colon HT-29 (3). En la parte superior se muestra el western blot para APC y en la parte inferior para PKC $\alpha$  de la misma membrana de nitrocelulosa. Los números indican el peso molecular. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares.

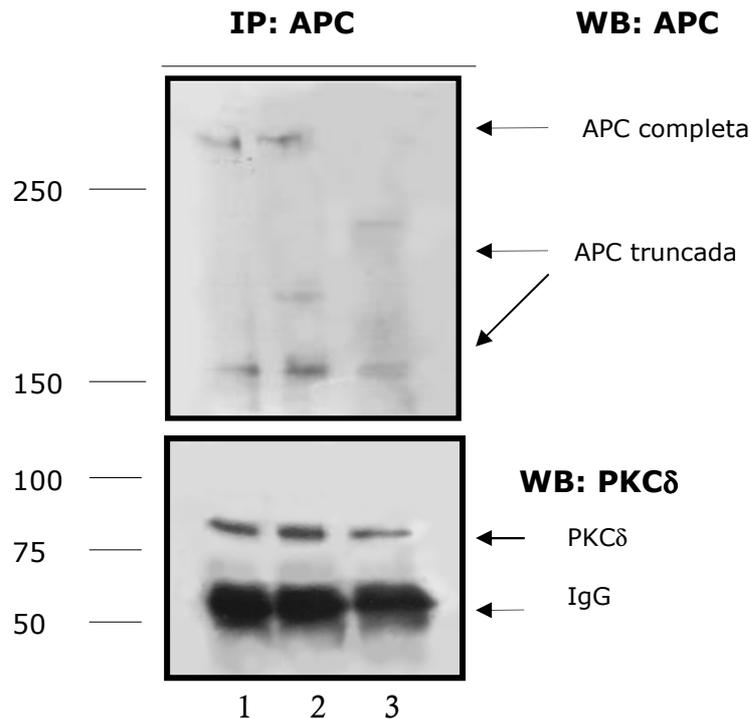


Fig. 9. Inmunoprecipitado de APC, que muestra la interacción con PKC $\delta$ , en células normales 112-CoN (1), IEC-18 (2) y en células tumorales de colon HT-29 (3). En la parte superior se muestra el western blot para APC y en la parte inferior para PKC $\delta$ , utilizando la misma membrana de PVDF. Los números indican el peso molecular. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares.

#### 5.4 Colocalización intracelular de las isoformas de PKC $\alpha$ y $\delta$ con APC en líneas celulares de colon

Debido a que la inmunoprecipitación recíproca de PKC $\alpha$  o PKC $\delta$  para buscar ahora a la proteína APC co-precipitada, resultó en una deficiente detección de APC, se decidió determinar la colocalización de estas proteínas, mediante ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. La localización intracelular de APC y PKC $\alpha$  se aprecia en la siguiente figura.

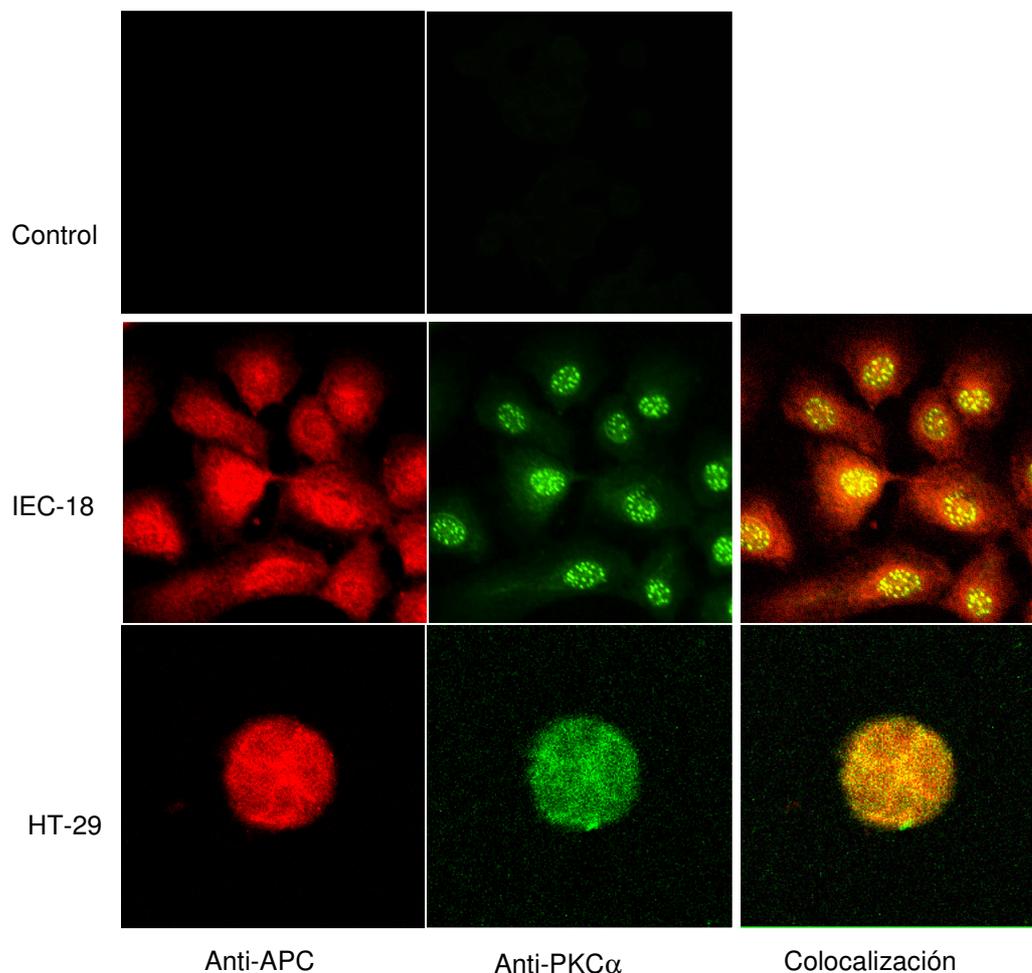


Fig.10. Inmunofluorescencia en células IEC-18 normales y malignas de colon HT-29, para analizar la co-localización intracelular de APC y PKC $\alpha$ . Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares. Imágenes tomadas a 40X.

Como se puede ver en la figura 10, la localización de APC, que se detectó con anticuerpo secundario acoplado a rodamina (color rojo), se aprecia en las células IEC-18 (normales) principalmente en el núcleo y en la membrana nuclear, aunque también se detecta su presencia en el citoplasma. En estas células normales, se observa que PKC $\alpha$ , que se detectó con un anticuerpo acoplado a fluoresceína (color verde), está restringida a una región nuclear, enmarcada en la figura con un círculo, donde se ven puntos específicos de localización. En la imagen que muestra el empalme de ambas imágenes (amarillo), se observa que el sitio de interacción entre estas proteínas es solamente la zona nuclear, donde las regiones amarillas que indican la colocalización de ambas proteínas coinciden con la localización de la proteína de PKC $\alpha$  sola. En las células HT-29, a pesar de que el tipo de crecimiento en pequeños grupos de estas células no permite observar con precisión la distribución de APC y de PKC $\alpha$ , es evidente que la localización de ambas

proteínas, a diferencia de las células normales, es fundamentalmente citoplásmica y que ambas proteínas co-localizan en estas células, como puede apreciarse en la imagen de empalme, demostrando con claridad su interacción in vivo.

De la misma forma, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para determinar la localización intracelular y la co-localización entre APC y PKC $\delta$ , que se muestran en la siguiente figura.

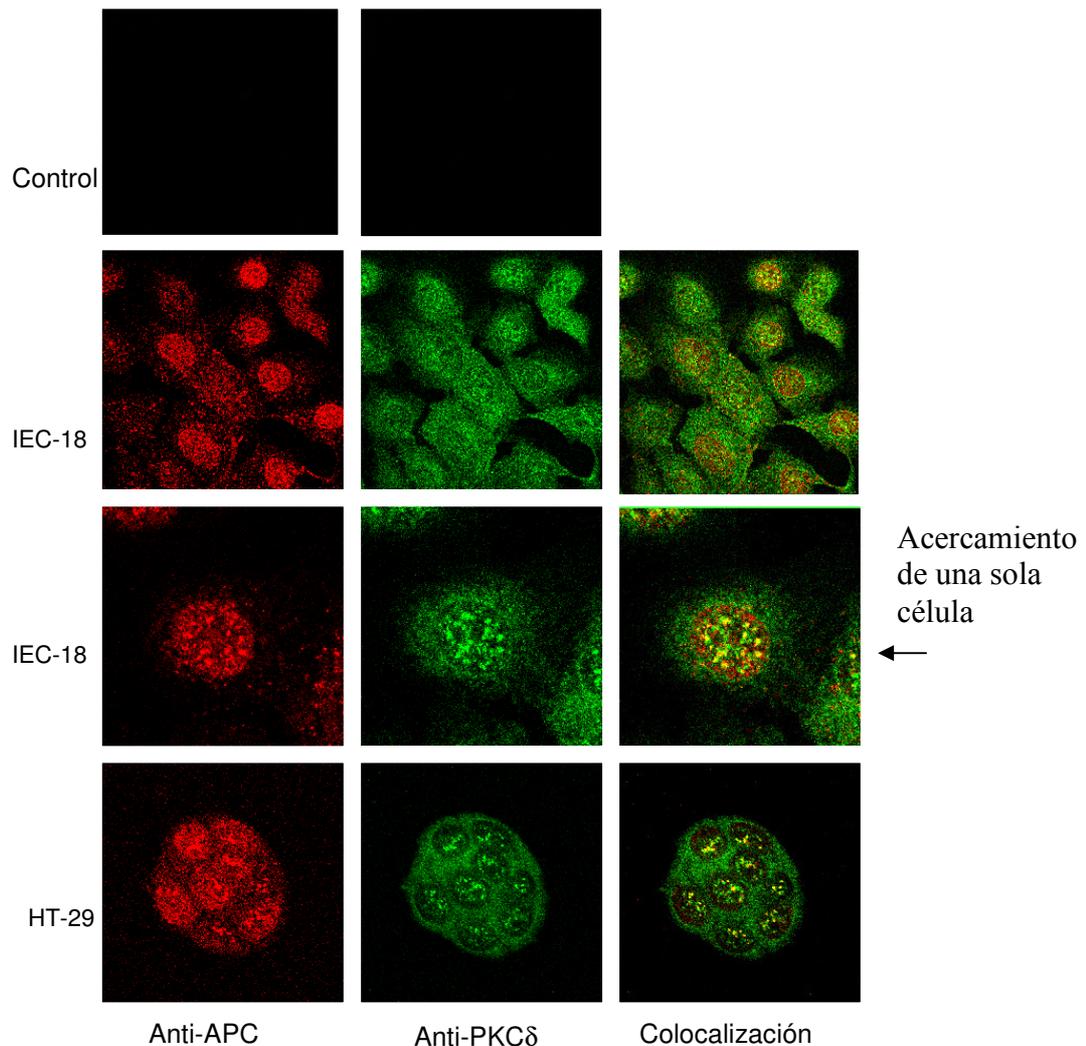


Figura 11. Inmunofluorescencia en células IEC-18 normales y malignas de colon HT-29, para determinar la co-localización intracelular de APC y PKC $\delta$ . Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares. Imágenes tomadas a 40X. En las células IEC-18 se hizo un acercamiento de la imagen.

Como se aprecia en la figura 11, la localización de APC se aprecia en el núcleo pero también se observa en el citoplasma, como ya se había observado en los experimentos anteriores. Con respecto a la localización de PKC $\delta$ , se aprecia también en el citoplasma a diferencia de PKC $\alpha$ , pero con puntos de localización

evidentes en el núcleo. En la imagen que muestra el empalme de la fluorescencia de ambas proteínas, se observa una colocalización solamente nuclear, que se aprecia mejor en la imagen donde se realizó un zoom para observar una sola célula. Las inmunofluorescencias en células HT-29, mostraron también que APC se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo, pero que la colocalización de estas proteínas se da solamente en la región del núcleo donde se aprecia el color amarillo. Estos datos además indican que las formas truncadas de APC no alteran sus patrones de distribución y sugieren que la función de la asociación entre APC y PKC $\alpha$  y  $\delta$  está relacionada con procesos nucleares.

### **5.5 Las proteínas PKC $\beta$ II y $\epsilon$ , no interaccionan con la proteína APC en las líneas celulares de colon estudiadas.**

Se analizó también la posibilidad de interacción de isoformas de PKC que se sobre-expresan en el estado canceroso, con la proteína APC, utilizando la misma estrategia experimental utilizada para las isoformas de PKC  $\alpha$  y  $\delta$ . Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de APC, y se buscó en el inmunoprecipitado la posible co-precipitación de las isoformas de PKC de interés. Los resultados representativos de por lo menos tres experimentos realizados con diferentes preparaciones celulares se muestran en las Figuras 12 (PKC $\beta$ II) y Figura 13 (PKC $\epsilon$ ) respectivamente. Como puede observarse, aunque se detectó la presencia de estas dos isoformas en los extractos celulares utilizados para la inmunoprecipitación, los análisis del inmunoprecipitado de APC por Western blot mostraron que ninguna de estas dos isoformas de PKC probadas co-precipitan con APC, indicando que no existe interacción entre ellas.

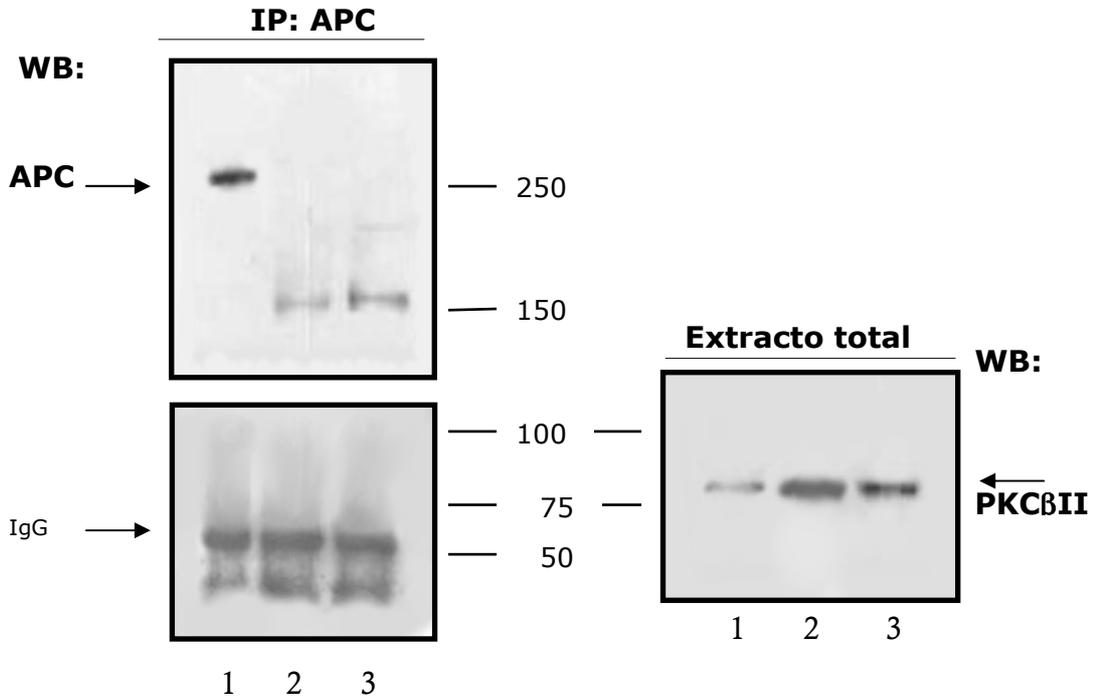


Figura 12. Inmunoprecipitado de APC, donde se demuestra que PKC $\beta$ II no co-precipita con APC, pero que esta isoforma sí se encuentra en el extracto total de células normales IEC18 (1) y de células tumorales de colon RKO (2) y HT-29 (3). Los números indican el peso molecular. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares.

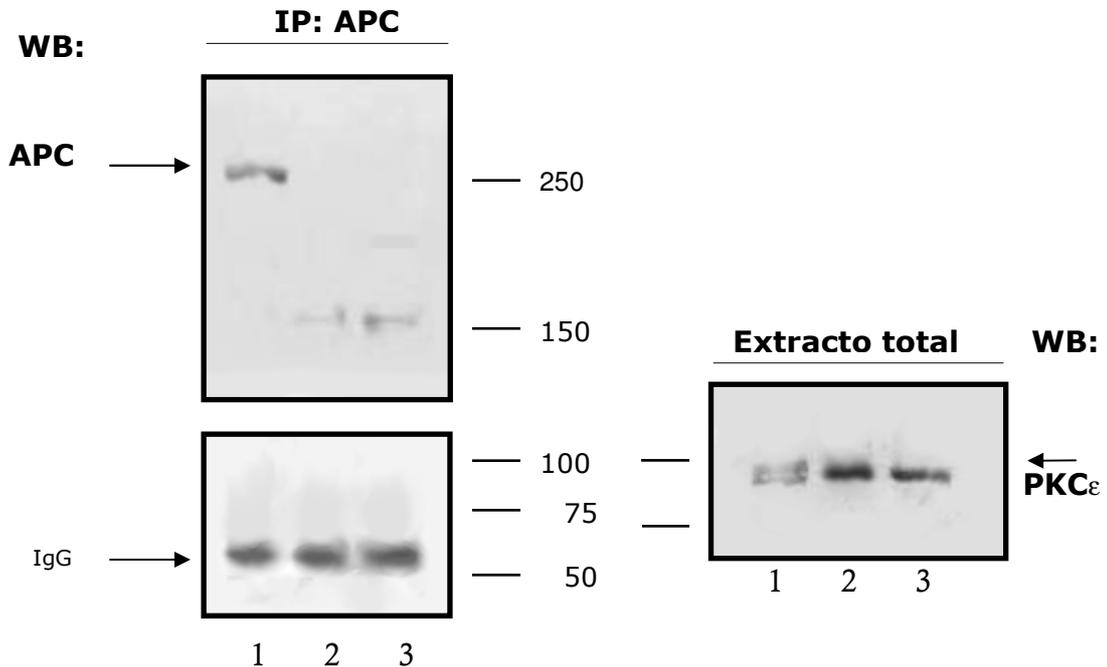


Figura 13. Inmunoprecipitado de APC, donde se demuestra que no hay interacción con PKC $\epsilon$ , pero esta isoforma sí se encuentra en el extracto total de células normales IEC-18 (1) y de células tumorales de colon RKO (2) y HT-29 (3). Los números indican el peso molecular. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares.

## DISCUSIÓN

En este estudio demostramos que existen cambios en los patrones de expresión de distintas isoformas de PKC en células malignas de colon, con respecto a las normales, que interesantemente coinciden con resultados reportados para el colon y para otros sistemas biológicos en cuanto a función y expresión. Antes se pensaba que las PKCs eran pro-mitogénicas, pero estudios recientes revelan que esto es dependiente de las isoformas expresadas en cada tipo celular y del contexto de la célula, por lo que pueden conferir distintos y contrastantes efectos en proliferación, y que varias isoformas tienen un efecto antiproliferativo o pro-apoptótico, tales como  $\alpha$ ,  $\beta I$ , y  $\delta$ , las cuales en este estudio encontramos disminuida su expresión en las células malignas. Esta disminución de la expresión de las isoformas de PKC  $\alpha$  y  $\delta$  que encontramos en las células tumorales en relación con las normales, es consistente con el papel de posibles “supresoras tumorales” que se ha sugerido para ambas en células normales de colon, ya que la evidencia experimental reportada sugiere que limitan el crecimiento y sobrevivencia de las células intestinales, y que la pérdida de una o ambas isoformas confiere propiedades a estas células que permiten el desarrollo de neoplasias intestinales (Frey 1997, Hizli, 2006, Black 2000). Hay estudios en los que al abatir la expresión de PKC $\alpha$  y  $\beta I$  con oligonucleótidos antisentido en células humanas de cáncer gástrico, se reduce el crecimiento celular en agar blando y la formación de tumores en ratones implantados (Jiang, X, et al., 2004). Adicionalmente, se cree que PKC $\alpha$  es importante para inducir el progreso del ciclo celular normal de las células intestinales cuando migran fuera de las criptas intestinales (Frey et al, 2000), y se ha visto que tiene efectos antiproliferativos en varios tipos celulares, incluyendo el intestinal, el pancreático y las células mamarias. En un estudio hecho con ratones knockout de PKC $\alpha$ , se reporta un incremento en las neoplasias intestinales espontáneas sin mutación en APC, revelándose como supresor tumoral en el intestino (Oster, 2006).

En cuanto a la PKC $\delta$ , se ha demostrado que transduce señales anti-proliferativas y apoptóticas en varios tipos celulares y se ha encontrado una disminución en su expresión en células transformadas. El abatimiento de PKC $\delta$  por tratamiento con ésteres de forbol confiere un fenotipo maligno, indicando no sólo el papel de supresor tumoral, sino que también la generación de tumores inducida por

los ésteres de forbol puede estar involucrada en la modulación negativa de esta PKC (Griner, M., and Kazanietz, G. 2007).

Con respecto a las demás isoformas de PKC, nuestros datos también son consistentes con lo reportado para la isoforma  $\beta$ II. A este respecto, numerosos artículos han reportado la sobreexpresión de la isoforma  $\beta$ II en casos de carcinoma colorectal, al igual que lo que nosotros encontramos en este estudio, por lo que parece haber cierto acuerdo en su sobreexpresión en células cancerosas (Gokmen-Polar, et al., 2001, Davidson, L. et al., 1998). Sin embargo, para el resto de las isoformas de PKC probadas, no existe un consenso sobre los patrones de su expresión en el colon. Tal es el caso para PKC $\zeta$ , que se ha visto que interacciona directamente con el oncogene Ras, involucrándosele en procesos de proliferación. Diversos estudios demuestran la sobreexpresión de PKC $\zeta$  en líneas celulares transformadas, y esto también se ha reportado en ratones *Apc*<sup>min/+</sup> (Leclerc, et al., 2004). No obstante, Oster y Leitges, 2006 encontraron una disminución de la expresión de PKC $\zeta$  en este mismo modelo animal. Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la primera evidencia, pues se encontró una sobreexpresión de 1:4 en células HT-29 y de 1:2 en células RKO con relación a los parámetros normales.

Por otra parte estudios previos han sugerido una participación de PKC en la ruta de señalización Wnt canónica. Por ejemplo, se ha demostrado que isoformas de PKC sensibles a TPA están involucradas en la inactivación de GSK3- $\beta$ , inducida por ligandos Wnt. También se ha comprobado que PKC fosforila e inactiva a GSK3- $\beta$  *in vitro* (Chen, 2000). Estudios recientes también han mostrado que PKC fosforila directamente los residuos Ser33/Ser37/Ser45 de  $\beta$ -catenina y que el abatimiento de PKC $\alpha$  por RNA de interferencia previene la fosforilación de estos residuos (Gwak, J. 2006) en ella y su degradación vía proteosoma, sugiriendo que PKC regula negativamente los niveles de  $\beta$ -catenina. Esto, aunado a que miembros de la familia de PKC presentan alteraciones en sus patrones de expresión en líneas celulares de colon tumorales, donde por lo general la ruta Wnt canónica se encuentra alterada, dio la pauta para encontrar una posible intercomunicación entre la ruta Wnt canónica y miembros de la familia de PKC.

En este trabajo demostramos que la proteína APC, la cual es un regulador negativo de la vía de señalización canónica Wnt, interacciona con las isoformas

PKC $\alpha$  y PKC  $\delta$  lo cual no había sido reportado con anterioridad en la literatura. Esto se demostró a través de la técnica de co-inmunoprecipitación, y se corroboró por microscopia confocal, donde se aprecia que esta interacción es primordialmente nuclear, tanto en células normales (IEC-18) como en la tumorales (HT-29). Estos datos resultan interesantes, debido a que se ha reportado que estas dos isoformas ejercen una función de supresores tumorales en este tejido, al participar en eventos de señalización que resultan en arresto del ciclo celular en la fase de G1, lo que provoca diferenciación celular y aumento de la apoptosis (Black, 2001, Cerda, 2006). De la misma manera APC es capaz de bloquear la progresión del ciclo celular de G1-S (Baeg, et al., 1995, Ishidate, et al., 2000), y este bloqueo puede estar asociado con la inhibición de la activación transcripcional de genes blanco Wnt tales como *c-myc* y *cilina D1*. Estos datos sugieren que la función de la interacción APC-PKC $\alpha/\delta$ , sea la de inhibir procesos de proliferación en el epitelio intestinal normal.

Es bien conocido que la activación de PKC, resulta en su asociación con membranas, tales como plasmática y nuclear. También se ha reportado la localización nuclear de isoformas de PKC, donde pueden desempeñar funciones clave en la regulación de eventos nucleares (Martelli, 1999). De hecho, la translocación de PKCs activadas desde el citoplasma al núcleo se ha observado para todas las isoformas de PKC. Las isoformas de PKC contienen una señal de localización nuclear, la cual podría permitirles transportarse a través de los poros nucleares (John, F. 2005). Además, PKC también reside en el núcleo en su conformación inactiva, sugiriendo que las isoformas de PKC se encuentran en el núcleo esperando señales de activación (Martelli, 2003). Esto muestra que las isoformas de PKC no sólo participan en la transducción de señales en el citoplasma sino también en el núcleo, donde parecen estar involucradas en la fosforilación de proteínas nucleares.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, la proteína APC participa en el citoplasma en la formación de un complejo que fosforila a  $\beta$ -catenina para que posteriormente sea degradada vía el proteosoma. Además, APC es un regulador del citoesqueleto, ya que interacciona con proteínas de unión a microtúbulos, y puede contribuir a la migración celular (Nathke et al, 1996). Debido a que APC presenta señales de localización nuclear así como señales de

exportación nuclear, esta proteína puede transportarse entre el citoplasma y el núcleo.

Con respecto a la localización intracelular de APC, se ha reportado que tanto las formas endógenas completas presentes en células normales, como las formas truncadas presentes en células malignas, se encuentran principalmente en el citoplasma y en menor grado en el núcleo (Brocardo, 2005). Nuestros resultados concuerdan con esto en el caso de células malignas, pero muestran que en células normales, la localización de APC es prominentemente nuclear. Por otro lado, aunque no se tenía evidencia de la función nuclear de APC, recientemente se demostró que APC contrarresta directamente la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina de genes blanco Wnt in vivo. En ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, utilizando células HT-29, se ha reportado que  $\beta$ -catenina ensambla un complejo activador que contiene Bcl-9/Lgs, Pygopus y complejos específicos remodeladores de la cromatina que se unen al enhancer de c-Myc, mediante su asociación a LEF-1 el cual permanece constitutivamente unido al enhancer. La expresión de la proteína completa de APC en estas células, lleva a una rápida represión del gen c-Myc activo, la cual se une transitoriamente al enhancer de c-myc, junto con  $\beta$ -TrCP, el correpresor CtBP y la proteína represora YY1, los cuales son subsecuentemente desplazados por los correpresores Gro/TLE1 y HDAC1 (Sierra et al. 2006).

De estos estudios surge la pregunta de cómo APC es reclutada a los enhancers de los genes blanco Wnt. Debido a que APC y LEF1 compiten por los sitios de unión a  $\beta$ -catenina, se conoce que cuando  $\beta$ -catenina está unida a LEF-1 en el DNA, no puede unirse a APC. Para poder entender entonces cómo podría APC promover el desensamble del complejo activador del enhancer, una posibilidad es que la afinidad de APC por varias proteínas en el complejo del enhancer podría estar controlada por modificaciones post-traduccionales. Se sabe que APC es fosforilada in vitro por Ck1, lo cual podría inducir a que se uniera con mayor afinidad a  $\beta$ -catenina y de esta forma prevenir su interacción con LEF-1. Además se sabe que Ck1 puede fosforilar a LEF-1 y disminuir su afinidad por  $\beta$ -catenina (Hammerlein, 2005).

Los datos obtenidos aquí sugieren como modelo de estudio para explicar el papel que juega la interacción APC-PKC $\alpha/\delta$ , que la interacción de APC-PKC en el

núcleo podría estar afectando el ensamble del complejo activador de genes blanco Wnt en las células IEC-18. Esto podría ocurrir mediante la fosforilación (vía PKC $\alpha/\delta$ ) de APC o de las proteínas asociadas a ella. El análisis de la secuencia primaria de APC muestra que tiene varios sitios consenso de fosforilación por PKC, lo que provocaría que la afinidad de APC por  $\beta$ -catenina aumentara, lo que permitiría que APC pudiera exportarla al citoplasma donde puede ser degradada.

Además, estudios adicionales de inmunoprecipitación de la cromatina, realizados en células HT-29 a los que no se les indujo la expresión de APC completa, revelaron que el complejo coactivador del enhancer c-Myc, se encuentra constitutivamente unido a éste. A pesar de que la forma de APC presente en estas células está truncada, también es reclutada al complejo activador, mientras que  $\beta$ -TrCP no es reclutado (Sierra, et al., 2006), lo que sugiere la posibilidad de que la ubiquitinación de  $\beta$ -catenina sea requerida para desensamblar el complejo activador. Si esto fuera requerido, las cinasas involucradas tendrían que ser diferentes de GSK-3 $\beta$ , debido a que ésta se encuentra unida al complejo represor y no con  $\beta$ -catenina en el complejo activador. Por lo que probablemente, tanto PKC $\alpha$  como  $\delta$  podrían también participar en la fosforilación de  $\beta$ -catenina en las células IEC-18, ya que como se mencionó anteriormente, PKC es capaz de fosforilar a  $\beta$ -catenina en el citoplasma, (pero a diferencia de GSK-3 $\beta$ , no requiere de la fosforilación inicial de Ck1 $\alpha$ ), y de esta manera marcarla para su posterior ubiquitinación. De esta forma, APC funcionaría como proteína de andamiaje para PKC, para que ésta pudiera llevar a cabo sus funciones de cinasa en el núcleo

Por otro lado, nuestros datos indican que los sitios de unión a PKC deben localizarse en la parte amino de APC, ya que en las células HT-29, las cuales sintetizan solamente APC truncada en su extremo carboxilo, esta interacción permanece, por lo que la ausencia de  $\beta$ -TrCP, puede deberse a sitios de APC que no están presentes en las proteína sintetizadas en estas células y que sean necesarias para mediar el reclutamiento de  $\beta$ -TrCPa a los enhancers de los genes blanco Wnt.

En relación a las isoformas de PKC  $\epsilon$  y  $\beta$ II, que no presentan asociación con APC tanto en las células IEC como en las RKO y las HT-29, los resultados nos sugieren que la vías de señalización inducidas por esta isoformas, que se sobre-expresan en el estado maligno, caracterizado por proliferación continua, no contribuyen a las funciones de supresor tumoral que presenta APC, y que por el

contrario, pueden ser importantes para mantener el estado maligno en el epitelio intestinal. En este sentido, es interesante hacer notar que sólo las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$ , para las que se ha reportado un papel de supresores tumorales en el colon, sean las que encontramos que se asocian específicamente con el supresor tumoral APC.

## CONCLUSIONES

1. Los patrones de expresión de PKC se ven alterados en las células tumorales con respecto a las normales.
2. Las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\delta$  disminuyen su expresión en las células cancerosas de colon analizadas.
3. Las isoformas de PKC  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\mu$  se sobre-expresan en células malignas de colon.
4. La isoforma  $\eta$  de PKC sólo se expresa en el estado maligno de las células de colon.
5. Existe interacción específica in vivo entre el supresor tumoral APC y las isoformas de PKC  $\alpha$  y  $\delta$ .
6. La co-localización de APC con PKC $\alpha$  y  $\delta$  se presenta en el núcleo, tanto en las células IEC-18, como en las células HT-29.
7. La región de APC que está involucrada en la interacción con las isoformas de PKC se localiza fuera del extremo carboxilo de la proteína.
8. La proteína APC, no interacciona con las isoformas de PKC  $\epsilon$  y  $\beta$ II, tanto en las células normales como en las tumorales de colon en cultivo.

## REFERENCIAS

- Asset, et al. 1999. anti-proliferative activity of protein kinase C in apical compartments of human colonic crypts : evidence for a less activated protein kinase C in small adenomas. *Int. J. cancer.* 80, 47-53.
- Baeg, G.H., et al.,1995. The tumor suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBO J.* 14, 5618-5625.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 15, 638-642.
- Bienz, M. 2002. The subcellular destinations of APC proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 328-338.
- Black, J.D. 2000. Protein kinase c-mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* 5, D406-D423.
- Black, J.D. 2001. Protein kinase C isozymes in colon carcinogenesis: Guilt by omission. *Gastroenterology.* 1868-1872.
- Brocardo, M., Nathke, I.S. & Henderson, B. 2005. Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Reports* 6, 2, 184-190.
- Cerda, S. R. et al. 2006. Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene ;25(22):3123-3138.*
- Chen, R.H., Ding, W.V., and McCormick, F. 2000. Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 275 (23), 17894-17899
- Cook, D., Fry, M.J., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodgett, J.R. and Dale, T.C. 1996. Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J.* 15, 4526-4536.
- Dale, T.C. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329, 209-223.
- Davidson, L. Aymoud, Jiang, N. Turner, N. Lupton, J. Chapkin, R. 1998. Non-invasive detection of fecal protein kinase C  $\beta$ II and  $\zeta$  messenger RNA: possible biomarkers for colon cancer. *Carcinogenesis.* 19, 253-257.
- Ferndhead, N. et al. 2001. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics,* (10),7, 721-733.

- Fields A. and Gustafson W. 2004. Protein kinase C in disease chapter 40 in: protein kinase C protocols by Alexander Newton. Humana press. USA. Pp. 519-537.
- Fodde, R. and Clevers, H. 2001. APC signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 1, 55-67.
- Frey, M.R. 1997. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21<sup>waf1/cip1</sup> y p27<sup>kip1</sup> and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 14, 9424-9435.
- Frey , M. R.*et al.* 2000. Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 151, 763-777.
- Gokmen-Polar, Y., Murray, N., Velasco, M., Gatalica, Z., Fields, A. 2001. Elevated protein kinase C  $\beta$ II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 61, 1375-1381.
- Gregorieff, A., and Clevers, H. 2005. “Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer”. *Genes & Development*, 19, 877-890.
- Griner, M., and Marcelo G. Kazanietz. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer* 7, 281-294.
- Guillem, J.G. et al., 1987. Altered levels of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinases in human colon carcinomas. *Cancer Res*, 47, 2036-2039.
- Gwak, J. et al. 2006. Protein kinase C mediated  $\beta$ -catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/  $\beta$ -catenin pathway. *J. Cell Sci*, 119, 4702-4709.
- Hammerlein, et al. 2005. A second protein kinase C CK1-mediated step negatively regulates Wnt signalling by disrupting the LEF-1/ $\beta$ -catenin complex. *Cell Mol. Life Sci*, 62, 606-618.
- He, T.C et al. 1998. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* 1998, 1509-1512.
- Henderson, B.R. and Fagotto, F. 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO report.* 3, 834-39.
- Hizli A. and Black, A. 2006. Protein Kinase C $\alpha$  Signaling Inhibits Cyclin D1 Translation in Intestinal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 281 (21), 14496-14603.
- Hurlstone, A. and Clevers H. 2002. T-cell factors: turns-ons and turns-off. *EMBO J.* 21, 2303-2311.

- Ishidate, T. et al., 2000. The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *Oncogene*, 19, 3653-372.
- Jiang, X. H. et al. 2004. Antisense targeting protein kinase C $\alpha$  and  $\beta$ [1] inhibits gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 64, 5787-5794.
- John, F. et al., 2005. The role of protein kinase C in gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 128, 2131-2146.
- Jonsson, M., Smith, K., Harris, A. 1998. Regulation of Wnt5a expression in human mammary cells by protein kinase C activity and the cytoskeleton. *British J. of Cancer.* 78, 430-438.
- Khul, M. Sheldhal, L. Park, M. Miller, J. Moon, R. 2000. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Gen.* 16, 279-283.
- Khon, A. Moon, R. 2005. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -catenin independent pathways. *Cell Calcium.* 38, 439-446.
- Korinek, V. et al. 1998. Depletion of the epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genetics* 19, 379-383.
- Leclerc, D., et al., 2004. ApcMin/+ mouse model of colon cancer: gene expression profiling in tumors. 93(6), 1242-54.
- Liu W. et al. 2000. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating  $\beta$ -catenin/TCF signaling. *Nat. gen.* 26, 146-147.
- Logan, C.Y and Nusse, R. 2004. "The Wnt signaling pathway in development and disease". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- Lynch, H.T. and de la Chapelle, A. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919-932.
- Martelli, A. et al. 1999. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* 74, 499-521.
- Martelli, A. et al. 2003. Nuclear protein kinase C isoforms; key players in multiple cell functions? *Histol. Histopathol.* 18, 1301-1312.
- Matthew J. Hart, Rico de los Santos, Iris N. Albert, Bonnee Rubinfeld and Paul Polakis. 1998. Downregulation of  $\beta$ -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$ . *Current Biology*, 8, 573-581.
- Murray, N.R. et al. 1999. Overexpression of protein kinase C  $\beta$ II induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *J Cell Biol*; 145: 699-711.

- Nathke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ. 1996. The adenomatous polyposis coli tumour suppressor localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol.* 134, 165-179.
- Nathke, I. S. 2005. Relationship between the role of the adenomatous polyposis coli protein in colon cancer and its contribution to cytoskeletal regulation. *Biochem Soc Trans.* 2005, 33, 694-697.
- Nathke, I. S. 2004a. APC at glance. *J. Cell. Sci.* 117, 4873-4875.
- Nathke, I. S. 2004b. The adenomatous polyposis coli protein: the achilles hell of the gut epithelium. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20. 337-366.
- Newton, A.C. 1995. Protein kinase C: structure, function and regulation *J Biol Chem*, 270, 28495-28498.
- Newton, A.C. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353-2364.
- Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.
- Nishizuka, Y. 1994 o 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308, 693-698.
- Nishizuka, Y. 2003. Discovery and prospecto of protein kinase C research: epilogue. *J. Biochem.* 133, 155-158.
- Oster, H. Leitges, M. 2006. Protein kinase C $\alpha$  but not PKC $\zeta$  suppresses intestinal tumor formation in Apc<sup>Min/+</sup> mice. *Cancer Res.* 66, 6955-6963.
- Perletti, G.P. et al. 1998. Protein kinase C epsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene.* 16, 3345-3348.
- Pinto, D. Gregorieff, A., Begthel, H. and Clevers, H. 2003. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709-1713.
- Radtke, F. and Clevers, H. 2005. "Self-Renewal and cancer of the gut: two sides of a coin". *Science* 307 (5717), 1904-1909.
- Rowan, A. J. et al. 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors; a mutational hotspot and interdependence of the two hits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 3352-3357.
- Rubinfeld, B. et al. 1993. Association of the APC gene product with  $\beta$ -catenin. *Science*; 262 (5140), 1731-1734.

- Rubinfeld, B. et al. 1997. Stabilization of  $\beta$ -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines. *Science* 275 (5307), 1790-1792.
- Sansom, J. et al. 2004. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*, 18, 1385-1390.
- Saxon et al. 1994. Activation of protein kinase C isozymes is associated with post-mitotic events in intestinal epithelial cells in situ. *J. Cell Biol.* 126, 747-763.
- Sierra et al. 2006. The APC tumor suppressor counteracts  $\beta$ -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes and Dev*, 20, 586-600.
- Su, L. K., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262 (5140), 1734–1737.
- Tetsu. O and McCormick, F. 1999.  $\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 422-426.
- Toser, A. 1998. Signaling through protein Kinase C. *frontiers in bioscience*. 3, 1134-1147.
- Townsley. F. et al. 2004. Pygopus and Legless target Armadillo/catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell. Biol.* 6, 626-633.
- Verstovsek, G. et al. 1998. Colonocyte differentiation is associated with increased expression and altered distribution of protein kinase C isozymes. *Gastroenterology*, 115, 75-85.
- Yu, W. et al., 2003. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C $\beta$ II-mediated colon carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 278 (13), 11167-11174.

## Apéndice

Tabla 1. Posibles sitios de fosforilación en APC por PKC.

Residuo	Score	Secuencia
S-92	0.85	KLRSKMSLRSYGS
S-784	0.87	NLSPKASHRSKQR
S-1587	0.90	SAMPTKSSRKAKK
S-1588	0.94	AMPTKSSRKAKKP
T-2178	0.90	EKSTLETKKIESE
T-2200	0.89	VYKSLITGKVRSN
S-2295	0.89	TSQIGGSSKAPSR
S-2355	0.90	SSPSTASTKSSGS
S-2421	0.88	ELSRMSSTKSSGS
T-2546	0.88	PINRSGTWKREHS
T-2563	0.89	SLPRVSTWRRTGS
S-2581	0.86	SASSESEKAKSE
T-2611	0.94	QVSAKGTWRKIKE

La secuencia muestra el contexto del residuo aceptor  $\pm 6$  residuos