



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA
PKC- β II EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN
WNT EN LÍNEAS 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 :

BIÓL. ERIC FLORES HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA ROBLES FLORES



MÉXICO, D. F.

2010



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.

Agradecimientos:

A la UNAM por ser un lugar de ciencia y esperanza en estos tiempos difíciles.

A la Dra. Martha Robles Flores, por su apoyo, su paciencia y las facilidades que me otorgó para la realización de este trabajo.

A los investigadores:

Dr. Jesús Chimal Monroy y Dra. Norma Alicia Bobadilla Sandoval por su asesoramiento a lo largo del proyecto.

Dra. María Cristina Castañeda Patlán por su fundamental guía en la realización de todos los experimentos y por su amistad.

Dr. Jesús Chimal Monroy, Dr. Iván Velasco Velázquez, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Clorinda Arias Álvarez y Dra. Marina Macías Silva por la revisión crítica y detallada de este escrito.

A mis padres Abel y Juanita por su amor y su apoyo incondicional.

Este proyecto fue apoyado por CONACyT y por PAPIIT.

Esta tesis está dedicada con mucho amor a Graciela.

Índice

Introducción	1
Cáncer	2
Cáncer colo-rectal	5
El epitelio intestinal	6
La ruta de señalización Wnt	8
<i>La ruta canónica Wnt</i>	8
<i>La ruta Wnt no canónica</i>	10
La proteína Cinasa C (PKC)	11
<i>Estructura de la PKC</i>	12
<i>Alteraciones en el patrón de expresión de las isoformas de PKC asociadas a la carcinogénesis de colon</i>	15
Resumen	17
Planteamiento del problema	18
Objetivo general	19
Hipótesis	19
Objetivos específicos	19
Materiales y métodos	20
Líneas celulares utilizadas	20
Cultivo celular	20
Obtención de extractos celulares totales	21
Cuantificación de proteína	21
Electroforesis y Western blot	22
Inmunoprecipitación	22
Transfección	23
Ensayo de luciferasa	24

Ensayos de inmunofluorescencia y DAPI seguida de microscopía confocal	25
Ensayos de expresión de una forma dominante negativa de PKC β II	25
Resultados	26
β -catenina y PKC β II se expresan en las células de colon independientemente de si la célula es cancerosa o normal	26
Existe una PKC β II de alto peso molecular en las células de colon	27
PKC β II y β -catenina coinmunoprecipitan recíprocamente	29
β -catenina se localizan en la periferia de las células normales y en el núcleo de las células SW	30
PKC β II se localiza en el núcleo de todas las células analizadas y en la membrana de las 112	31
β -catenina y PKC β II co-localizan en el núcleo de las células SW y en la membrana de las 112	31
La expresión de una isoforma dominante negativa de PKC β II tiene efectos negativos en la actividad transcripcional de la ruta Wnt canónica	32
Discusión	34
Conclusiones	41
Perspectivas	41
Lista de abreviaturas y nombres	42
Referencias	44

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento en 1977 por Yasutomi Nishizuka [1], 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, en el control de la proliferación celular y de la apoptosis, y por tanto es un enzima clave en el proceso de carcinogénesis. La evidencia experimental ha mostrado que el proceso de carcinogénesis intestinal está también asociado con cambios en la actividad y expresión de isoformas de PKC. Alteraciones en la actividad, localización y/o expresión de isoformas de PKC se han observado prácticamente en todos los tipos de tumores de cáncer colo-rectal examinados, pero la contribución de estos cambios en la progresión del tumor en este tejido continúa sin definirse en gran parte. Las células del epitelio intestinal expresan al menos 9 isoformas de PKC (PKC α , β I, β II, δ , ϵ , θ , η , ι/λ y ζ). La evidencia experimental indica que mientras que unas isoformas de PKC como PKC β II actúan como oncogenes promoviendo la proliferación, invasividad y metástasis de células malignas de colon, otras isoformas, como PKC α y PKC δ actúan de manera opuesta, como supresores tumorales, promoviendo arresto celular y apoptosis [2].

De modo interesante, existen datos que sugieren la participación de PKC en la ruta de señalización Wnt, ya que se ha reportado que la sobreexpresión de PKC β II promueve el cáncer de colon a través de la supresión de la señalización del TGF β y de la activación de la vía de señalización APC/ β -catenina (Wnt canónica), pero se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esto [3].

La familia de PKC representa actualmente un reto interesante para el desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos contra el cáncer. A pesar de que algunos inhibidores farmacológicos y oligonucleótidos dirigidos contra isoformas de PKC se han utilizado desde hace tiempo en la práctica clínica (fase II), los resultados no han sido muy alentadores [4]. La co-expresión de varias isoformas en el mismo tejido, con modos de regulación diferentes, que pueden actuar de modo antagónico, así como el uso de inhibidores poco específicos de isoforma, son probablemente las causas principales de las fallas obtenidas. Con este proyecto se pretende profundizar en el conocimiento de los

mecanismos de convergencia y posible regulación de la ruta Wnt por la PKC. Dado que se ha descrito que ambas vías participan de modo determinante en el desarrollo de neoplasias colo-rectales, el discernir los puntos de convergencia en su señalización llevaría al diseño de fármacos específicos para el tratamiento efectivo de este padecimiento.

Cáncer

En 2007, de 60 millones de defunciones registradas en todos los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 7.9 millones (13 %) se debieron al cáncer. Se prevé un aumento de las muertes por cáncer hasta de aproximadamente 9 millones en 2015 y 11.4 millones en 2030 [5]. En México, los tumores se ubicaron como tercera causa de muerte en 2008, correspondieron al 13.2 % de las defunciones totales [6].

Existe un equilibrio particular en cada órgano en lo concerniente a la proliferación y la muerte celular. Esta homeostasis fisiológica se regula en cada tejido según su función. La ruptura de este equilibrio a favor de la acumulación de células, ya sea por mecanismos genéticos o epigenéticos llevan a la aparición de fenotipos alterados que son sujetos a selección; ésta es la esencia del origen de las neoplasias [7]. La carcinogénesis es el proceso durante el cual mutaciones sucesivas convierten una célula normal en un conjunto de células neoplásicas y su progenie sobrepasa los controles normales de proliferación y territorio [8]. En la visión de la carcinogénesis como un proceso multifactorial, cada paso mutacional conduce a la expansión clonal de células que llevan una nueva mutación; de este modo, la probabilidad de que mutaciones múltiples ocurran en una misma célula se incrementa. Sin esta expansión clonal de células mutantes, las probabilidades de acumulación de varios eventos poco frecuentes en la misma célula serían muy bajas [9].

El ritmo normal de mutaciones y sus mecanismos de reparación, así como las vías hacia la apoptosis, se ven afectados en el cáncer, ya que de forma habitual las células son capaces de reparar la gran mayoría de sus mutaciones [10]. Las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones anormales en

genes asociados con funciones de proliferación celular, apoptosis, reparación del DNA y envejecimiento celular. Después, las divisiones celulares sucesivas de esta población tumoral inicial producen nuevas mutaciones que alteran otras funciones celulares y otorgan nuevos atributos biológicos como son la motilidad celular, la adhesividad celular, protección inmunológica y metástasis. Estas alteraciones varían con el tipo de tumor. Por lo anterior, las características del fenotipo canceroso son, por un lado, ignorar las señales antiproliferativas y de diferenciación para mantener la capacidad de proliferación sostenida, y por otro, la evasión de la apoptosis y la promoción de invasión y angiogénesis [11,12].

Las células cancerosas poseen todo tipo de mutaciones incluyendo las puntuales, las deleciones o pérdida de un segmento grande del cromosoma, la amplificación, la translocación y las aneuploidías, que afectan el número de cromosomas. La exposición continua a agentes carcinogénicos provoca variaciones genéticas progresivas en las células susceptibles. La mayoría de los carcinógenos no son activos en su forma inicial, pues requieren de una transformación metabólica en el organismo mediada por los citocromos P450, cuya expresión varía en cada individuo. Algunas personas no poseen las enzimas que metabolizan los pro-carcinógenos y esto los protege frente a su efecto mutagénico. Esto explica, en parte, la diferente frecuencia de tumores en individuos con el mismo grado de exposición a agentes químicos [13].

Muchas alteraciones, ya sea de tipo genético o epigenético, pueden causar la excesiva proliferación celular característica del cáncer. Entre las genéticas tenemos la de ganancia de función o adquisición de una función genética, que es un mecanismo en donde los genes que tienen funciones en el control normal de crecimiento celular o la diferenciación tienen una expresión inapropiada y debido a esto, por una variedad de mecanismos, pueden conducir a cáncer. Cuando un gen mutado tiene una ganancia de función que produce cáncer se denomina oncogen, su contraparte no mutada recibe el nombre de proto-oncogen. La pérdida de funciones es otro mecanismo involucrado en la carcinogénesis, en donde la pérdida de un gen supresor de tumores es requerida para la tumorigénesis. Las mutaciones de pérdida de función son

mucho más comunes que las mutaciones de ganancia de función en el caso de cáncer hereditario (que se da por alteraciones heredadas en la secuencia de DNA de la célula progenitora) [10,11] debido a que la pérdida es enmascarada durante el desarrollo por el alelo normal restante. Existen dos clases de genes supresores de tumor; en la primera, los genes están directamente involucrados en el desarrollo de cáncer y su pérdida de función perjudica directamente alguna vía crucial para la proliferación celular. La segunda clase agrupa a los genes cuya pérdida de función acelera la adquisición de alteraciones en las vías cruciales para la proliferación, apoptosis o senescencia celular, pero su pérdida está asociada indirectamente al cáncer y su acción recae fuera de la vía decisiva; son genes involucrados en la reparación del DNA y la integridad del genoma[11].

La pérdida de heterocigosis (LOH; loss of heterozygosity) involucra la pérdida de la función normal de un alelo de un gen cuando el otro alelo ya está inactivo. Existe evidencia de que el silenciamiento epigenético, más que la mutación, es el mecanismo más común para suprimir la función génica. A este respecto se ha observado que los eventos de remodelación de la cromatina, como por ejemplo la metilación de las regiones ricas en dobletes de citosina-guanina (“islas CpG”) en la región promotora de genes de las células somáticas es un mecanismo común de silenciamiento epigenético de uno o de los dos alelos de los genes supresores de tumores [10]

Eventos exógenos en los alrededores de la célula cancerosa también pueden determinar su destino; tal es el caso de heridas e inflamación crónica que se asocian con cáncer. Sus efectos pueden estar mediados a través de proliferación incrementada, lo que se asocia con un aumento en la probabilidad de mutaciones, o a través de efectos parácrinos como el de las células inflamatorias, que incrementan la producción de metaloproteasas de matriz extracelular. Otro factor importante son las variaciones en el nivel hormonal o de factores de crecimiento circulantes, que muestran asociaciones significativas con el riesgo de cáncer [10].

Aunque el concepto de “célula troncal cancerosa” se propuso por primera vez hace más de 100 años, en los últimos tiempos, los avances en el conocimiento de la biología de células troncales y la acumulación de gran cantidad de evidencias experimentales han llevado a un nuevo paradigma de oncogénesis. Estudios recientes han permitido elucidar la presencia de células troncales cancerosas que tienen la habilidad de regenerar tumores. Estas células troncales de cáncer comparten muchas características de las células troncales normales, incluyendo la capacidad de auto-renovación y de originar células que se diferencien a células especializadas [14]. Presumiblemente, todos los cánceres surgen de células troncales alteradas que conservan estas dos capacidades. Las células troncales de cáncer se han identificado recientemente en una gran cantidad de tumores humanos. A principios del 2007 dos grupos de investigación reportaron por primera vez la identificación de las células iniciadoras de cáncer de colon [15,16]. Ambos grupos demostraron que el cáncer colorrectal es creado y propagado por un pequeño número de células no diferenciadas tumorigénicas que expresan el marcador CD133. Este antígeno es una glucoproteína de 120 kDa de 5 dominios transmembranales, de función y ligando desconocidos, que se expresa tanto en células troncales normales (células troncales hematopoyéticas, neurales, endoteliales y epiteliales embrionarias) como en células cancerosas de retinoblastoma, teratocarcinomas, leucemias y en tumores cerebrales, hepáticos y de colon.

Cáncer colo-rectal.

A nivel internacional el cáncer de colon se ubica como la tercera causa de mortalidad por cáncer con 677, 000 muertes en la población total [5]. En México, el cáncer colorrectal ocupó el séptimo lugar como causa de muerte en 2008 [6] y según reportes del ISSSTE su incidencia se ha triplicado de 2002 a 2008 [17]. Médicos investigadores del ISSSTE y del Instituto Nacional de Salud Pública han realizado un estudio que revela que el cáncer de colon afecta en igual proporción a hombres y mujeres, con un promedio de edad de los afectados de 63 años. En mayores de 45 años la incidencia ha aumentado 100% por ingesta de poca fibra y alto consumo de calorías y poca fibra [18]. Por estas razones, es importante continuar con el estudio de esta enfermedad,

aportando datos que ayuden a esclarecer sus causas y establecer terapias efectivas.

El epitelio intestinal.

El intestino forma parte del aparato digestivo, el cual absorbe y después suministra al organismo un aporte continuo de agua, electrolitos y nutrientes. Las funciones del intestino comprenden el tránsito de los alimentos a lo largo de todo el tubo digestivo; la secreción de los jugos digestivos y la digestión de los alimentos; la absorción de los productos digeridos, el agua y los distintos electrolitos. Estas funciones, así como la circulación de la sangre a través de los órganos gastrointestinales para transportar las sustancias absorbidas son controladas, en parte por los sistemas nervioso y hormonal [19].

El epitelio intestinal se caracteriza por su alta tasa de autorrenovación, lo que lo hace muy susceptible a la transformación maligna y además presenta los paradigmas de la biología de las células troncales, establecida para otros tejidos con gran capacidad de autorrenovación [20]. Debido a que la homeostasis del epitelio intestinal se fundamenta en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis, representa un atractivo modelo experimental para el estudio integrado de la homeostasis de estos procesos celulares. Este epitelio, como la epidermis, constituye una barrera entre el cuerpo y el exterior. A nivel microestructural, mientras la epidermis está constituida de múltiples capas celulares, el epitelio intestinal consiste de una sola capa de células epiteliales. Estas células absorben el líquido y electrolitos resultantes de los alimentos aprovechados mientras mantienen el quimo indigerible y la microflora asociada dentro del lumen [20].

La capa epitelial posee una topología única; está formada por una estructura bidimensional plegada en valles (criptas) y crestas (vellosidades). En la base de las criptas proliferativas residen las células troncales, las cuales por división asimétrica dan origen a células hijas, una de las cuales permanece como troncal y la otra, progenitora, que después de experimentar dos o tres ciclos de división, su progenie va migrando hacia arriba para diferenciarse al alcanzar las

crestas en células absortivas (enterocitos) o en células secretoras de hormonas o de *mucus*. En estas crestas, finalmente, degeneran las células a través de apoptosis y son desprendidas al lumen del intestino para su expulsión (Fig. 1) [20].

Dos linajes principales de células diferenciadas se observan dentro del epitelio intestinal: el linaje absortivo o enterocitos y el linaje secretor. Éste último comprende a las células caliciformes, al linaje enteroendócrino, y en el intestino delgado también a las células Paneth. Los enterocitos son las células más abundantes en el intestino, secretan hidrolasas y absorben nutrientes. Las células caliciformes secretan mucosas protectoras e incrementan en número del duodeno al colon. Las células del linaje enteroendócrino secretan hormonas (serotonina, sustancia P, secretina) y las células Paneth, que sólo se encuentran en el intestino delgado, secretan agentes antimicrobianos como criptidinas, defensinas y lisozima para controlar el contenido microbiano en el intestino delgado (Fig. 1) [20,21].

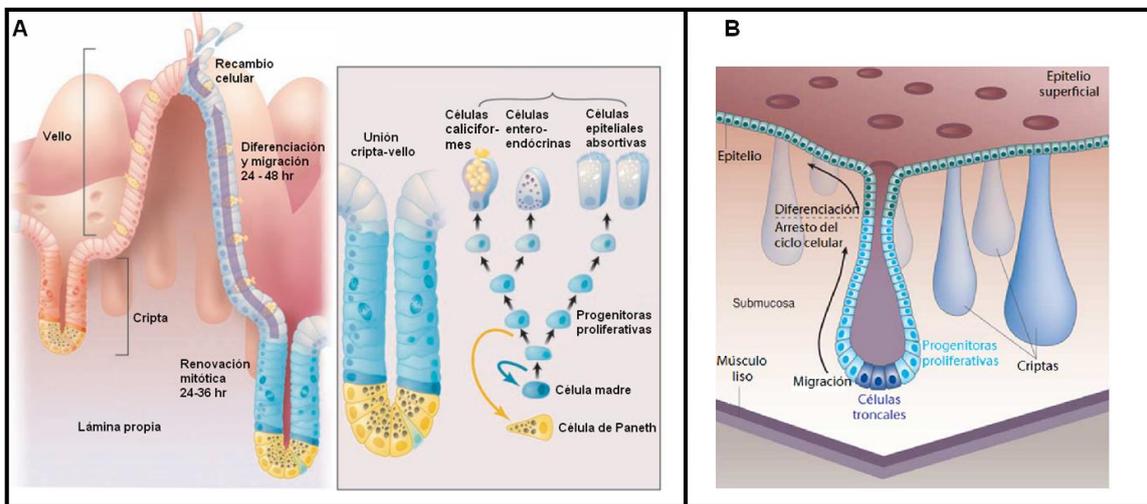


Figura. 1. Anatomía del intestino. A) El epitelio del intestino delgado está formado por criptas y vellosidades. B) En el colon no hay células de Paneth, ni crestas prominentes, la superficie es lisa, con criptas mucho más profundas que en el intestino delgado. Se aprecian las células troncales en la 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. Modificado de [20] y [21].

La ruta de señalización Wnt

En cuanto a las moléculas que regulan la homeostasis del epitelio intestinal, la evidencia experimental *in vivo* ha demostrado que la ruta de señalización “Wingless” o “Wnt”, juega un papel esencial en la homeostasis de tejidos de autorrenovación, 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 Adenomatous Polyposis Coli (APC), está mutada en un gran número de casos de carcinoma de colon hereditarios o esporádicos. Estudios moleculares han demostrado la existencia de mutaciones que promueven la activación vía Wnt en aproximadamente el 90% de los casos [22].

La ruta canónica Wnt

El elemento distintivo de la vía canónica Wnt es la regulación de los niveles de β -catenina citoplásmicos (Fig. 2, panel A). La β -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 ligando Wnt (familia de glucoproteínas palmitoiladas), la proteína β -catenina es fosforilada por la cinasa de serina/treonina caseína cinasa 1α (CKI α), lo que a su vez permite la fosforilación por parte de la cinasa de la glucógeno sintetasa 3β (GSK- 3β). La interacción entre estas cinasas y la β -catenina es facilitada por las moléculas de andamiaje Axina y APC, que en conjunto forman el complejo de degradación de la β -catenina. Así, la β -catenina fosforilada es reconocida por el sistema ubiquitina-proteosoma y subsecuentemente degradada. En ausencia del ligando Wnt (Fig. 2, panel A, célula a), este complejo de degradación es muy activo y mantiene a β -catenina citoplásmica en un nivel de expresión bajo. Cuando los ligandos Wnt se unen a su complejo de receptores (Fig. 2, panel A, célula b), formado por el receptor de siete dominios membranales de la familia frizzled y el co-receptor LRP/Arrow, inhiben la actividad de la GSK- 3β a través de la fosfoproteína Dishevelled (Dvl), lo cual resulta en la estabilización y acumulación de β -

catenina en el citoplasma. La acumulación citoplásmica de la β -catenina es un factor clave para su posterior translocación al núcleo, donde interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción LEF/TCF, funcionando como activador transcripcional de genes relacionados a la proliferación celular como c-myc y ciclina D1 [23,24].

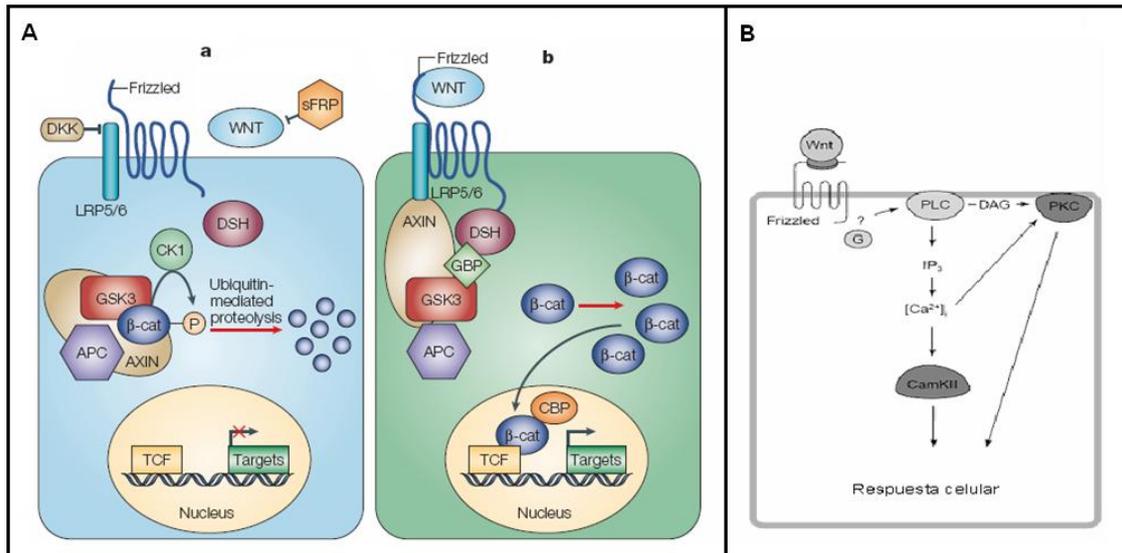


Figura 2. Vías de señalización Wnt. **A)** La ruta canónica. **a)** En ausencia de ligando, el complejo de degradación está activo y fosforila a β -catenina a través de CK1 y GSK3 β . La β -catenina fosforilada se ubiquitina y se degrada vía proteosoma. Como consecuencia, los genes blanco de la vía Wnt permanecen desactivados. **b)** Cuando el ligando Wnt se une al complejo Frizzled-LRP Axina es reclutada a la membrana y el complejo de degradación de β -catenina se inactiva provocando que β -catenina se acumule en el citoplasma y se vaya al núcleo donde ejerce su actividad de activador de la transcripción de genes como c-Myc y ciclina D. **B)** La vía Wnt no canónica es activada por ligandos Wnt, pero es independiente de β -catenina. Modificada de [26].

Se han descrito tres mecanismos por los cuales se da la acumulación nuclear de β -catenina en células cancerosas: 1) inactivación del gen supresor APC; 2) mutaciones supresoras de la axina y 3) mutaciones en el extremo amino terminal de la β -catenina. Aproximadamente en el 85% de los casos de cáncer de colon se ha demostrado pérdida de función de la proteína APC; este evento lleva a la acumulación de β -catenina en citoplasma, lo cual resulta en su posterior translocación al núcleo para estimular la transcripción de genes involucrados en la proliferación [22,25].

La ruta Wnt no canónica

La vía de señalización mediada por Wnt- β -catenina descrita hasta aquí, se denomina canónica para diferenciarla de, al menos, tres vías distintas de señalización mediadas por ligandos Wnt, pero independientes de la acción de la β -catenina. Hace aproximadamente 15 años fue descrita la activación de los receptores Frizzled principalmente por los ligandos Wnt4, Wnt5a y Wnt11, sin actividad transcripcional aparente de β -catenina [26]. Mediante estudios realizados en *Drosophila*, se describió la vía de polaridad planar celular (PCP), la cual promueve la activación de la proteína cinasa JNK [27]. Por otra parte, se observó que algunos receptores Frizzled, al igual que otros receptores de siete pasos transmembranales, actuaban a través de proteínas G, activando a la fosfolipasa C (PLC) y la fosfodiesterasa. Este hallazgo sugirió que debía producirse un aumento de Ca^{2+} intracelular debido a la formación del mensajero IP3. Esta hipótesis fue corroborada al demostrarse que la inyección de Wnt5a, en embriones de pez cebra, aumentó transitoriamente la concentración de Ca^{2+} intracelular. El aumento de Ca^{2+} lleva a la modulación de proteínas tales como la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina II (CamKII) y de las PKC dependientes de calcio; además, el diacilglicerol producido también por la activación de PLC, puede activar a todas las PKC excepto las isoformas atípicas (Fig. 2, panel B). En concordancia con esto, se ha demostrado que la expresión ectópica de Wnt5a resulta en la translocación de PKC a la membrana plasmática y aumenta su actividad de cinasa *in vitro* [26-29]. Se ha observado la importancia de la vía de señalización no canónica, principalmente en la modulación de los movimientos celulares durante la embriogénesis [29]; sin embargo, se conoce poco acerca de los posibles eventos de señalización independientes de β -catenina en el mantenimiento de tejidos adultos de autorrenovación, 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 y la pérdida de supresores tumorales.

La proteína cinasa C (PKC)

La PKC forma parte de una familia de cinasas de serina/treonina que juegan un papel clave en los procesos de transducción de señales que controlan importantes procesos biológicos tales como desensibilización de receptores, procesos metabólicos, neurotransmisión, regulación de la transcripción, mediación de la respuesta inmune, memoria, diferenciación celular y tumorigénesis.

Estudios de clonación molecular, así como análisis bioquímicos, han revelado que la PKC es una familia de 10 isoformas de cinasas de serina/treonina con estrecha homología estructural en mamíferos y con enzimas homólogas en levaduras, nemátodos y en la mosca de la fruta. Estas isoformas poseen diferencias en su localización, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato. Las PKC pueden subdividirse en tres grupos: las clásicas o convencionales (cPKC: α , β I, β II, y γ) activadas por calcio, fosfolípidos (como la fosfatidilserina o PS), y diacilglicerol (DAG); las nuevas (nPKC: δ , ϵ , η y θ) activadas por DAG y fosfolípidos, aunque independientes de calcio; las atípicas (aPKC: ζ y ι , de la cual su homólogo en ratón se ha llamado PKC λ) que no responden ni a calcio ni a DAG, y además PKC μ o PKD, que tiene múltiples características que la hacen una pariente diferente de las isoformas de PKC [30]. Cada miembro de la familia de PKC posee diferente modo de activación, pero todos tienen en común el requerir de fosfatidilserina [31-33].

Los activadores endógenos de la PKC generalmente son de naturaleza lipídica. El más importante para las PKC convencionales y nuevas, es el 1,2-diacilglicerol (DAG), producto de la degradación del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). Otros son el ácido lisofosfatídico, la lisofosfatidilcolina y algunos ácidos grasos cis-insaturados como el araquidónico y el oleico, los cuales activan a la PKC en presencia de DAG. Se ha considerado a otros lípidos como la ceramida y el fosfatidil inositol 3,4,5-trisfosfato (PIP₃) como activadores específicos de las PKC atípicas no dependientes de DAG [31].

Los ésteres de forbol son los compuestos exógenos más comunes para activar a la PKC de modo farmacológico. De este grupo de diterpenos, el más utilizado es el TPA o llamado también PMA (forbol miristato-acetato), el cual se aisló del árbol *Croton tiglium*. El TPA, cuya actividad es tres órdenes de magnitud más potente que el DAG, se intercala rápidamente en la membrana y activa a la PKC al unírsele directamente. Un activador con una potencia igual o mayor al del TPA es la briostatina, sustancia derivada de briozoarios marinos.

Estructura de las PKC

Cada isoforma de PKC es el producto de un gen separado, con excepción de PKC β I y β II, que son variantes del mismo gen por procesamiento alternativo. Cada isoforma de PKC consiste de una sola cadena polipeptídica con dos dominios bien definidos: el dominio regulador en el extremo amino y el dominio catalítico en el extremo carboxilo (Fig. 3). La región reguladora posee los motivos involucrados en la unión de los cofactores fosfolipídicos y el Ca²⁺ y participa en las interacciones proteína–proteína que regulan la actividad y localización de PKC. La región C-terminal es el dominio de cinasa e incluye motivos involucrados en la unión a ATP y unión de sustrato. Los dominios reguladores y catalíticos están conectados por una región “bisagra” que es altamente sensible a rompimiento proteolítico por proteasas celulares [30].

Las PKC poseen cuatro regiones que están altamente conservadas entre las diferentes isoformas (regiones C1 a C4) y cinco regiones variables (V1 a V5) que no están conservadas en todas las isoformas. Una característica distintiva de la región C1 (fig. 3) es la presencia de dominios ricos en cisteína, que participan en la unión del segundo mensajero DAG y los ésteres de forbol en las PKCs clásicas y nuevas [35,36]. Mientras las PKCs clásicas y nuevas tienen dos copias de estos motivos en tandem, sólo una se halla en las PKCs atípicas. Junto a la región C1 está presente en todas las isoformas de PKC un dominio de autoinhibición o pseudosustrato, que se une al sitio de unión del sustrato en el dominio catalítico y mantiene la enzima en un estado inactivo en ausencia de cofactores y activadores. La secuencia de aminoácidos del

pseudosustrato se asemeja al motivo de fosforilación en los sustratos de PKC, pero posee un aminoácido no fosforilable en vez de serina o treonina [34].

Los dominios ricos en cisteína de la región C1 unen con gran afinidad DAG y ésteres de forbol en presencia de fosfatidilserina como cofactor, uniéndose los primeros en el mismo sitio, y teniendo un alto grado de conservación en los sitios de unión entre las diferentes isoformas [38]. Se ha demostrado que estos dominios no tienen la misma afinidad por DAG y que no son funcionalmente equivalentes entre sí, por lo que se les ha denominado C1a y C1b. Cada uno de estos dominios ricos en cisteína requieren de un mínimo de 43 aminoácidos en el dominio para la unión de los ésteres de forbol, y poseen un motivo $HX^{12}CX^2CX^{13/14}CX^2CX^4HX^2CX^7C$, donde H es histidina, C es cisteína, y X es otro aminoácido. Cada dominio une fuertemente a dos átomos de Zn^{2+} , resultando en una estequiometría de 4 Zn^{2+} por molécula de cPKC o nPKC [30]. Cada dominio rico en cisteína de PKC tiene una conformación de estructura globular, y los ésteres de forbol se unen a un surco formado por dos láminas β . El ligando no induce cambios significativos en la conformación del dominio rico en cisteína, pero cubre surco polar neutro al principio de la estructura formando una región hidrofóbica contigua que promueve la inserción del dominio en la bicapa lipídica de las membranas [39].

El dominio C2 en las cPKCs se encuentra inmediatamente después del extremo carboxilo del dominio rico en cisteína y es un sitio de unión a Ca^{2+} . A pesar de la variación en las secuencias primarias, análisis estructurales revelan que se pliega en una estructura que consiste de dos láminas β antiparalelas conectadas por asas con el sitio de unión a Ca^{2+} localizado en una de las orillas del dominio, y tiene cinco residuos de Asp conservados involucrados en la coordinación de dos iones de Ca^{2+} . El dominio C2 actúa como un módulo de membrana, donde los iones de Ca^{2+} y los residuos básicos contribuyen a la unión electrostática de la membrana. En las nPKC, un dominio tipo C2 está presente cerca de su extremo amino (ver figura 3), aunque este dominio es incapaz de unir Ca^{2+} ya que los residuos de Asp que se requieren para la unión de Ca^{2+} no están presentes, y es por eso que no cumple con esta función [37].

El dominio catalítico de las isoformas de PKC incluye los dominios C3 y C4; el C3 posee el sitio de unión para ATP, el donador de fosfatos para la actividad de fosfotransferasa; el C4 posee el sitio de unión para los sustratos. Cuando la PKC se mantiene en un estado inactivo, el pseudosustrato ocupa el sitio C4, bloqueando la unión de los sustratos [30].

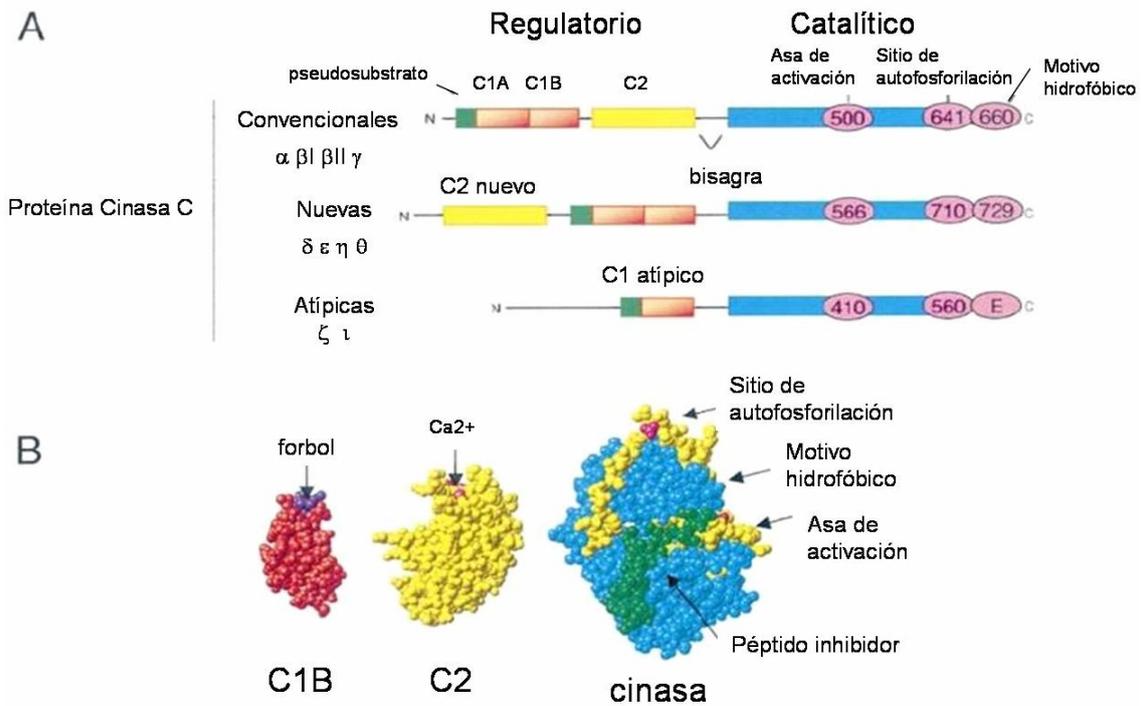


Figura 3. Estructura esquemática de las isoformas de PKC. **A)** Todas tienen un dominio de cinasa (en color azul) y una extensión C-terminal que contiene dos sitios conservados de fosforilación: un sitio de autofosforilación y un motivo hidrofóbico. En las PKC atípicas un residuo de glutamato (E) ocupa la posición del fosfoceptor, Todas las isoformas tienen una secuencia de pseudosustrato (en verde) que es el extremo amino del dominio C1 (en naranja). El dominio C1, constituido por dos repeticiones en tandem, está presente en las PKC nuevas y convencionales y funciona como sensor de diacilglicerol. Las PKC atípicas tienen un dominio C1 alterado que no responde a los ésteres de forbol ni al DAG. Las PKC convencionales tienen un dominio C2 (amarillo) que funciona como módulo de unión a fosfolípidos regulado por Ca²⁺, y en las nuevas PKC no se une ni a fosfolípidos de membrana ni a Ca²⁺. El asa de activación es una región que debe fosforilarse para que la PKC esté catalíticamente activa **B)** Modelo espacial de algunos de los dominios descritos en A. El péptido inhibidor mostrado en el esquema corresponde al pseudosustrato (en verde). Modificado de [33].

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 celular. Su

localización es llevada a cabo por proteínas de unión que funcionan como proteínas de anclaje o de andamiaje. 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 varias 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 PKC ϵ recién sintetizada al aparato de Golgi [40]. 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 (Substrates That Interact with C kinase) unen a PKC fosforilada pero inactiva, y después liberan a PKC una vez fosforilada [30,41]. El descubrimiento de que las isoenzimas de PKC son activadas por ésteres de forbol, promotores de tumores, de una forma similar al activador endógeno DAG, dio la primera relación entre las rutas de señalización mediadas por PKC y los procesos de carcinogénesis [42].

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 de las isoformas α y δ se encuentran elevadas en el tercio superior de la cripta y disminuyendo gradualmente su expresión hacia la base de la cripta en la que se presenta una proliferación normal en el epitelio [43,44]. Se piensa que PKC puede funcionar como regulador de eventos post-mitóticos, por ejemplo, en la diferenciación e inhibición del crecimiento durante la autorrenovación del epitelio intestinal, un concepto apoyado por el hecho de que PKC media un programa coordinado de salida del ciclo celular en células intestinales [45-48]. Varios estudios han demostrado que PKC α participa en la inhibición de la progresión del ciclo celular en la transición G1/S en células

epiteliales intestinales por medio de la activación del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27, y de inhibir el inicio de la traducción de la ciclina D1 [46-48]. También se ha demostrado que al aumentar la expresión de PKC δ en células CaCo-2 (línea celular tumoral de colon), se limita el crecimiento celular al retardar la transición a la fase G1, se aumenta la diferenciación celular y se 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 [45,49]. Estos resultados sugieren que las 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 α , δ , ϵ , ζ y η [43,44] en adenomas de colon humano, y que la actividad total de PKC disminuye comparada con el epitelio de colon normal [50]. Sin embargo, aunque los niveles de la mayoría de las isoformas de PKC disminuyen, otras como PKC β II, incrementan su expresión en diversos modelos de cáncer de colon [3,51-54]. De modo interesante, 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 β II promueve el cáncer de colon a través de la supresión de la señalización del TGF β [55,56] y de la activación de la vía de señalización APC/ β -catenina, pero se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esto [3,57]. 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 [58].

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 a la progresión del tumor en este tejido continúa aún sin definirse. Estos datos sugieren que la regulación negativa de PKC α y PKC δ y la sobre expresión de PKC β 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.

RESUMEN

La cinasa PKC es un elemento clave en las rutas de transducción de señales que controlan un amplio rango de procesos celulares tales como proliferación, apoptosis, diferenciación y migración celular. Además, es el blanco de moléculas promotoras de tumores como el PMA y está implicada en la activación de oncogenes, por lo que es de gran interés para el estudio del cáncer. Los tumores de tipo colorrectal se encuentran entre las formas de cáncer más frecuentes en el ser humano. El epitelio intestinal es susceptible a experimentar un descontrol de la proliferación celular que lo puede llevar a la transformación maligna debido a que está en continua renovación y expuesto tanto a estrés químico como mecánico. Para el mantenimiento adecuado de la homeostasis de este epitelio intervienen varias vías de señalización, de las cuales, la ruta Wnt está alterada en más del 90% de los casos de carcinoma y adenocarcinoma de colon. La vía de señalización Wnt regula procesos celulares tales como polaridad, diferenciación, proliferación y migración. Existen numerosos trabajos que han demostrado la participación de PKC en el proceso de carcinogénesis del colon y, de manera interesante, se ha involucrado a PKC en la regulación de la ruta de señalización Wnt, aunque su participación precisa aún se desconoce.

En este trabajo, utilizando líneas celulares de colon humano y de intestino de rata en cultivo, encontramos que:

1. La isoforma β II de PKC se sobre-expresa en células malignas de colon en comparación con las células normales no malignas.
2. La PKC β II coprecipita con la proteína β -catenina, elemento clave de la vía canónica Wnt, tanto en células normales como en malignas, lo que indica que pueden interaccionar in vivo.
3. La interacción de PKC β II con β -catenina en células malignas ocurre en el núcleo celular.
4. PKC β II modula positivamente las acciones mediadas por β -catenina, ya que la expresión de una forma dominante negativa de PKC β II disminuye la actividad transcripcional de β -catenina.

Planteamiento del problema

Tanto la actividad de la PKC β II como la de la ruta Wnt canónica se han relacionado con el establecimiento de la malignidad en el epitelio colónico. Se ha sugerido que la PKC β II promueve la activación de la ruta Wnt al inducir la acumulación de β -catenina en el núcleo. Sin embargo, no se ha establecido el efecto de la actividad de la PKC β II en la actividad transcripcional de la ruta Wnt canónica. Tampoco se ha demostrado una interacción entre la β -catenina y la PKC β II. Además la relevancia de la localización de estas proteínas en las células sanas y en las cancerosas se ignora por completo. Así, el estudio de la interacción entre la PKC β II y la ruta Wnt canónica está en sus comienzos y permanece bastante incompleta.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si la proteína clave de la vía Wnt canónica, β -catenina, interacciona con PKC β II en líneas celulares de colon en cultivo, tanto normales como cancerosas.

HIPÓTESIS

La isoforma PKC β II interacciona con β -catenina y esta interacción es relevante para la actividad transcripcional de la ruta Wnt canónica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión de la isoforma PKC β II y de la proteína β -catenina en células normales y cancerosas por la técnica de Western Blot.
- Determinar por medio de co-inmunoprecipitación recíproca si existe interacción entre β -catenina y PKC β II.
- Analizar mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal la localización subcelular de la interacción de PKC β II con β -catenina.
- Examinar los efectos de la inhibición farmacológica de PKC β II y/o de la expresión de una forma dominante negativa de PKC β II en la actividad transcripcional de β -catenina, mediante el sistema reportero TOPFlash.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares utilizadas

La tabla siguiente resume las principales características de las células utilizadas.

Tabla 1. Líneas utilizadas y sus características. Información tomada del American Type Culture Collection (ATCC)

Línea	Organismo	Morfología	Órgano	Crecimiento	Estado	Otro
CCD-112 CoN	<i>Homo sapiens</i>	fibroblasto	colon	adherente	normal	Características del organismo: 22 semanas de gestación; femenino
IEC-18	<i>Rattus norvegicus</i>	epitelio	íleon	adherente	normal	Presentan inhibición por contacto, no crecen en agar blando y no son tumorigénicas en ratones desnudos
RKO	<i>Homo sapiens</i>	epitelio	colon	adherente	carcinoma	Pobremente diferenciada. p53 silvestre. Tumorigenicidad en ratones desnudos y en agar blando
SW-480	<i>Homo sapiens</i>	epitelio	colon	adherente	Adeno-carcinoma	Tumorigenicidad en ratones desnudos y en agar blando

Cultivo celular

En cajas de Petri se cultivaron células normales de íleon de rata (IEC-18), normales de colon de embrión humano (CCD-112CoN) y células cancerosas de colon humano (RKO y SW-480), adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Tabla 1).

Las células no cancerosas IEC-18 (IEC) se cultivaron en *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM), 5% de suero fetal bovino (FBS), NaHCO_3 20 mM, antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 $\mu\text{g/mL}$), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM e insulina 0.1 U/ml. Las células RKO y las CCD-112 CoN (112) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS, piruvato de sodio 100 mM, antibióticos y L-glutamina 2 mM. Las células SW-480 (SW) se cultivaron en medio DMEM-F12 con 5% de FBS, antibióticos, L-glutamina 2 mM. Todas las células se mantuvieron a una temperatura de 37° C, en una atmósfera de 95% aire y 5% CO_2 .

Obtención de extractos celulares totales

Las células con un 90-100 % de confluencia se lavaron dos veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) frío. Para ensayos de *western blot* las células de interés se incubaron con *buffer* de lisis (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM pH 7.5, Tritón X-100 0.5 %, inhibidor de tripsina 0.1 mg/mL, Leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 1 mM, pirofosfato de sodio 0.1 M, NaF 0.1 M, β -glicerofosfato 0.25 M, p-Serina 0.01 M y NaVO_4 0.01 M) durante 30 min a 4°C con agitación. Los lisados se clarificaron por centrifugación a 13,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante (parte soluble) y se desechó el precipitado (parte insoluble). Del extracto se obtuvo una alícuota (30 μl) para la determinación de proteína y el resto se diluyó en proporción 1:1 con *buffer* de muestra Laemmli (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, glicerol 2.5% y azul de bromofenol) 2X y se guardó a 4° C para su uso posterior.

Cuantificación de proteína

De los extractos totales a analizar se extrajeron alícuotas para la determinación de proteína total. La cuantificación se realizó mediante el método de Bradford con reactivo comercial (Bio-Rad). Las preparaciones se analizaron por triplicado mediante espectrofotometría a una densidad óptica de 595 nm.

Electroforesis y Western blot

Cantidades equivalentes de proteína (75 µg) de los extractos obtenidos se separaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) y se bloquearon toda la noche a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave, en una solución de leche libre de grasa (BioRad) al 5 % en amortiguador salino con Tris (TBS; Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5). Las membranas se lavaron con TTBS (TBS + Tween al 0.2 %) dos veces por 5 minutos cada vez. Después se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario a 4°C toda la noche. Los anticuerpos se diluyeron en TTBS para su uso de la siguiente manera: *rabbit* policlonal anti PKCβII (SC-210), 1:1,000; y *mouse* monoclonal anti β-catenina (sc-7963) 1:1000 o *goat* policlonal anti β-catenina (sc-1496) 1:1,000. Después de ser incubadas con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces durante cinco minutos con TTBS. Las membranas se incubaron en agitación durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo *goat* anti-*rabbit* HRP (PIERCE) con una dilución 1: 5,000 en TTBS, *goat* anti-*mouse* HRP (PIERCE) 1:1,000 en TTBS o HRP-*rabbit* anti-*goat* (Zymed) 1:50,000 en TTBS. Después se lavaron las membranas 3 veces con 10 ml de TTBS, una vez con 10 ml de TBS y se incubaron con la solución para quimioluminiscencia Supersignal (PIERCE) durante 5 minutos. Las bandas se detectaron por exposición de placas de autorradiografía con las membranas. Como control de carga se detectó la cantidad de proteína actina en las mismas membranas. Las membranas se sometieron a un proceso de “borrado” incubando con solución de borrado (2-mercaptoetanol 0.7 %, SDS 2 % y Tris 0.1 M) a 50°C durante media hora con agitación ocasional, después se bloquearon con leche al 5 % en TBS, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo de ratón monoclonal anti-actina, revelándose también por quimioluminiscencia.

Inmunoprecipitación

Las células con un 90-100 % de confluencia se lavaron dos veces con PBS frío. Se agregó a la monocapa buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1

mM, Tritón X-100 0.5 %, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, NaF 11 mM, Na_3VO_4 , 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina 1 mM, inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml). Para evitar inmunoprecipitación inespecífica, las muestras se incubaron con 10 μl de proteína A-sefarosa y 10 μl de suero pre-inmune durante una hora a 4° C. La muestra se precipitó con el anticuerpo indicado durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, al inmunoprecipitado obtenido se le añadió 25 μl de proteína A-sefarosa y se incubó por dos horas más. Las muestras se lavaron dos veces con buffer de lavado A para inmunoprecipitación (Tris 50 mM, NaCl 600 mM, Tritón X-100 1 %, igepal 0.5 %, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, NaF 11 mM, Na_3VO_4 , 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina 1 mM, inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml, pH 7.5) y una vez con buffer de lavado B para inmunoprecipitación (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, igepal 0.5 %, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, NaF 11 mM, Na_3VO_4 , 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina 1 mM, inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml, pH 7.5). Finalmente, se centrifugaron las muestras, se desechó el sobrenadante y al resto se le agregó 50 μl de Laemmli 2X. Posteriormente se siguió el protocolo de Western blot y se reveló con el anticuerpo adecuado.

Transfección

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se sembraron 1.8×10^5 células SW en placas de 24 pozos. Los siguientes plásmidos fueron usados: reportero de luciferasa TOP flash (plásmido reportero de la actividad transcripcional mediada por β -catenina-TCF que lleva en el promotor varios sitios de unión para β -catenina/TCF), plásmido control FOP flash (el mismo reportero pero con los sitios de unión a TCF mutados) y como control de transfección el reportero de luciferasa renilla. Las células fueron colocadas en un medio libre de suero y transfectadas con 1 μg de plásmido TOP flash o FOP flash, y con 50 ng de plásmido reportero luciferasa renilla (como control de transfección), los cuales fueron diluidos en Opti-MEM. 8 horas después de la transfección, las células fueron colocadas en medio normal durante 24 horas para su recuperación. En caso de incubarse con el inhibidor específico de $\text{PKC}\beta\text{II}$ hispidina (Sigma), se agregó al medio de las células 1.3 μl de hispidina 8.12 mM para una

concentración final del inhibidor de 20 μM o, para los controles, se agregaron 1.3 μl de DMSO 100 %; los cultivos se incubaron por tres horas antes de lisarse. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y lisadas 15 minutos a temperatura ambiente; los lisados fueron clarificados por centrifugación 12,000 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente y se utilizaron 10 μl de cada lisado para medir la expresión del gen reportero de luciferasa (Promega). La actividad se normalizó con la actividad de luciferasa renilla o con la cantidad de proteína presente en el lisado. Todos los experimentos se realizaron por duplicado al menos 3 ocasiones.

RKO - Se crecieron células hasta alcanzar la subconfluencia (70%) y se co-transfectaron como las SW con los plásmidos TOP/FOP y renilla durante seis horas. Luego se crecieron en medio DMEM con suero 10% y antibióticos durante por lo menos 12 horas. Después se cambiaron las células a medio con 0.1% SFB y se mantuvieron así durante 8 horas. Se adicionó (o no) 50 ng/ml de Wnt-3a y se incubaron por 10 horas, en las que en las tres últimas horas se incubaron en ausencia o en presencia de 20 μM de hispidina. Se lavaron las células con PBS frío, se lisaron con *Passive Buffer* y se guardaron a -80°C .

Ensayo de luciferasa

Los extractos de las células obtenidos después de la transfección se descongelaron en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se colectó el extracto de cada pozo en un tubo Eppendorf de 0.6 ml y se centrifugó a 11,000 rpm a temperatura ambiente por tres minutos. Se recuperó el sobrenadante y se separó una alícuota para cuantificación de proteína. Se hizo la mezcla de reacción para actividad de luciferasa en una placa lectora de 96 pozos de la siguiente manera: 15 μl de muestra más 25 μl de reactivo luciferasa. Se midió la actividad de luciferasa en un luminómetro. A cada pozo se le agregaron 25 μl de reactivo StopGlo para medir la actividad de luciferasa de *renilla* en el luminómetro.

Ensayos de inmunofluorescencia y tinción con DAPI seguida de microscopía confocal

Las células se crecieron en cubreobjetos previamente tratados con Histogrip (Zymed), a un 90-100 % de confluencia. Luego de tres lavados con PBS se fijaron con metanol absoluto durante 10 minutos a -20° C. Las células se volvieron a lavar tres veces con PBS y se procedió a su permeabilización con Tritón X-100, 0.4% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente; se hicieron otros tres lavados de la misma forma. El bloqueo de las células se hizo con BSA libre de IgG al 0.5 % en PBS por 30 minutos a 4° C. Posteriormente la monocapa de células se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. Las muestras se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron con una dilución 1:100 de anticuerpos secundarios acoplados a FITC anti-conejo (Jackson) durante 1 hora a 4° C en oscuridad y las muestras control (sin anticuerpo primario) también se incubaron con estos anticuerpos. Las células se lavaron tres veces con PBS y una vez al final con H₂O desionizada antes de montarse en portaobjetos con Anti-fade (Bio Rad). En el caso de las muestras que se procesaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) se realizó una dilución 1:1000, se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le agregó el Vectashield (Vector Labs) para ser montadas. El DAPI es un colorante fluorescente que se une fuertemente al DNA. Se examinó la fluorescencia de las células por microscopía confocal.

Ensayos de expresión de una forma dominante negativa de PKCβII

Se utilizó un plásmido de expresión de una forma dominante negativa de la proteína donde se sustituye un residuo de lisina indispensable en el dominio catalítico de la proteína por un residuo de triptofano (K/W) adquirido de Addgene. Se sembraron 1.5×10^5 células SW. 24 horas después las células se co-transfectaron con 0.5 µg de plásmido TOP o FOP, 0.005 µg de plásmido de renilla y 1 µg del plásmido PKCβII K/W. 24 h postransfección, se lisaron las células y se determinó la actividad del gen reportero de luciferasa. Se estandarizó por la cantidad de proteína presente en el extracto celular. Adicionalmente se realizó un Western Blot con un anticuerpo anti PKCβII para determinar la expresión de la proteína K/W en las células.

Resultados

β -catenina y PKC β II se expresa en las células de colon independientemente de si la célula es cancerosa o normal

Dado que en el cáncer de colon es común que la ruta Wnt canónica esté constitutivamente activa, se puede esperar que la expresión de la β -catenina en las células cancerosas sea elevada. Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de la PKC β II es uno de los eventos tempranos necesarios para la hiperproliferación de las células colónicas y su susceptibilidad a agentes carcinógenos. Para ver si está alterada la regulación de la expresión de β -catenina o de PKC β II en las células 112, IEC, SW o RKO se hicieron ensayos de PAGE y western blot.

Respecto a los patrones de expresión de β -catenina, ésta se expresa más en SW (maligna), seguida de IEC (normal), 112 (normal) en tercer lugar y, por último, RKO (maligna) (Fig 4). Por otro lado, encontramos que PKC β II se expresa en mayor cantidad en las líneas malignas RKO y SW que en la línea no maligna 112 (Fig. 4), lo que concuerda, con datos previos obtenidos por nuestro equipo de trabajo y con reportes de otros autores que han encontrado que la sobreexpresión de PKC β II está asociada con la promoción de tumores [3,51-56]. De modo interesante, en IEC la PKC β II está sobreexpresada. El peso molecular normal de la PKC β II es de 77 kDa. En nuestros blots, la PKC β II humana aparece como un doblete de bandas en las células cancerosas RKO (Fig. 4, 5 y 7).

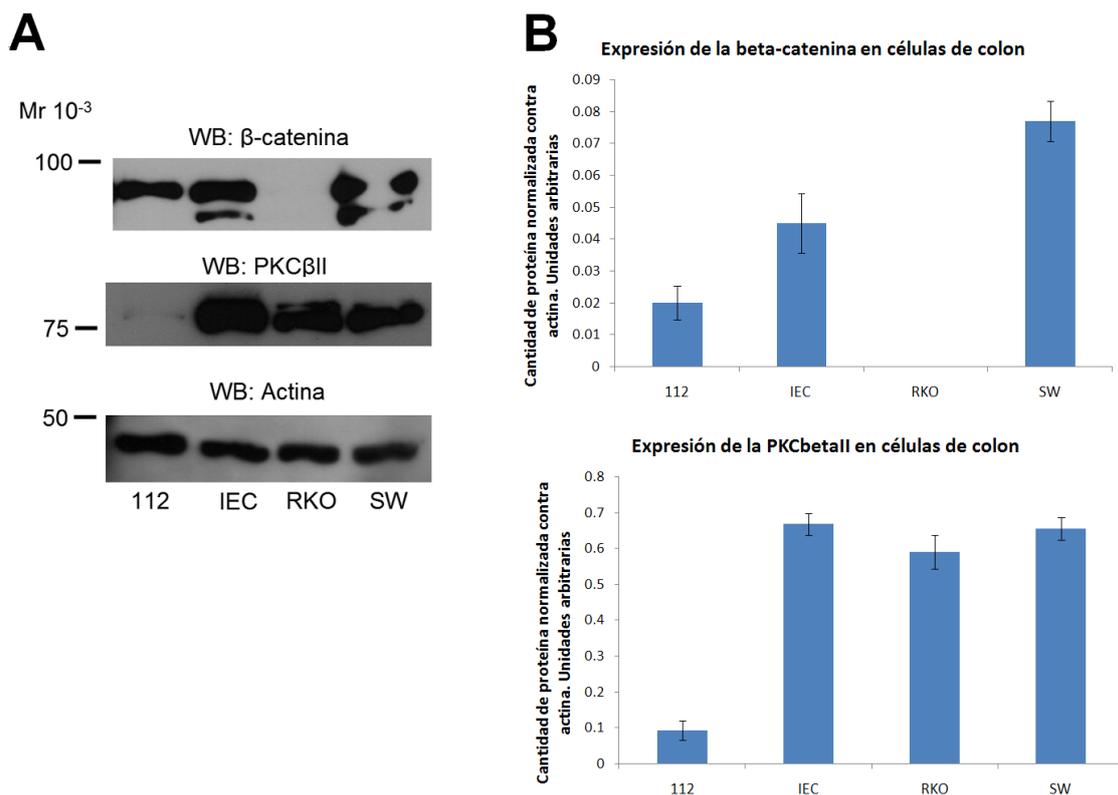


Figura 4. Expresión de las proteínas PKC β II y β -catenina en líneas celulares de colon. A) Blot representativo de tres experimentos independientes. B) Densitometrías para cada proteína normalizadas contra actina. Las barras de error corresponden al S.E.M.

Existe una PKC β II de alto peso molecular en las células de colon.

Además de las bandas correspondientes al tamaño de la PKC β II, encontramos reiteradamente una banda abundante y bien definida de poco más de 100 kDa que, además, coprecipitaba con β -catenina (ver más adelante). Para saber si la presencia de esta banda en el blot era causado por uniones específicas o inespecíficas de nuestro anticuerpo anti-PKC β II hicimos el ensayo de western blot en presencia cantidades saturantes del péptido bloqueador. El péptido bloqueador es el epítipo contra el que está diseñado el anticuerpo. La presencia del péptido bloqueador en cantidades saturantes impide que se formen las uniones específicas anticuerpo-proteína mediadas por la región de unión al antígeno, por lo tanto, todas las uniones específicas deben desaparecer del blot sólo quedando las uniones inespecíficas por las que no compete el péptido bloqueador. Mediante el ensayo de bloqueo con el péptido bloqueador se descubrió que en células epiteliales de colon, tanto normales como malignas, se expresa una proteína con una masa molecular superior a

los 100 kDa que es reconocido específicamente por el anticuerpo anti-PKC β II y que podría ser una forma modificada de PKC β II (Fig. 5).

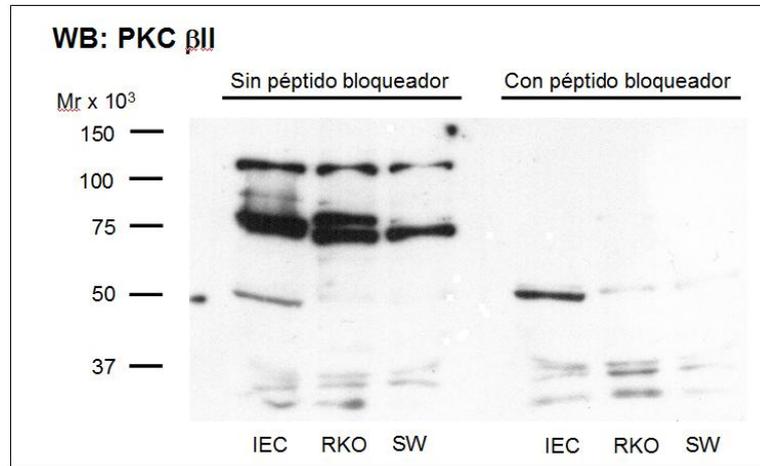


Figura 5. PKC β II de alto peso molecular en células de colon. A partir de extractos celulares totales se detectó la PKC β II mediante western blot. La membrana se incubó con el anticuerpo primario en presencia o ausencia del péptido bloqueador. En presencia del péptido bloqueador las bandas que son específicamente reconocidas por el anticuerpo desaparecen, mientras que las inespecíficas se conservan.

El anticuerpo C18 (sc-210) de Santa Cruz, utilizado en nuestros ensayos, está dirigido contra la región carboxilo-terminal de la PKC β II. Aunque no sabemos la parte exacta a la que se une el anticuerpo, es muy probable que la unión sea mediada por los últimos 52 aminoácidos de la proteína dado que estos son los que la diferencian de la isoforma β I y que el anticuerpo C-18 no se une a la PKC β I [58]. Para descartar proteínas que compartieran esta secuencia de 52 aminoácidos y que pudieran estar siendo reconocidos específicamente por el C18 se hizo un análisis bioinformático mediante el algoritmo BLAST. Entre los péptidos que tuvieron cierto apareamiento con la secuencia buscada predominan las isoformas de PKC. Sin embargo, la homología entre las secuencias es baja (menor a 80 bits) y sólo dos isoformas (α y γ) presentan este segmento C-terminal más parecido a la β II que la β I (Fig. 6). Además, el anticuerpo C-18 no reconoce específicamente a ninguna otra PKC [58], por lo tanto, es probable que la banda específica de la proteína de 100 kDa corresponda a una isoforma modificada de la PKC β II.

Homología con PKC α					
Score = 79.7 bits (195), Expect = 2e-21, Method: Compositional matrix adjust.					
Identities = 36/52 (69%), Positives = 44/52 (84%), Gaps = 0/52 (0%)					
PKC β II	621	CGRNAENFDRFFTRHPPVLTTPPDQEVIRNIDQSEFEGFSFVNSEFLKPEVKS			673
		CG+ AENFD+FFTR PVLTPPDQ VI NIDQS+FEGFS+VN +F+ P ++S			
PKC α	619	CGKGAENFDKFFTRGQPVLTTPPDQLVIANIDQSDFEFEGFSYVNPQFVHPILQS			671
Homología con PKC γ					
Score = 73.2 bits (178), Expect = 2e-18, Method: Compositional matrix adjust.					
Identities = 29/52 (55%), Positives = 43/52 (82%), Gaps = 0/52 (0%)					
PKC β II	621	CGRNAENFDRFFTRHPPVLTTPPDQEVIRNIDQSEFEGFSFVNSEFLKPEVKS			673
		CGR+ ENFD+FFTR P LTPPD+ V+ +IDQ++F+GF++VN +F+ P+ +S			
PKC γ	475	CGRSGENFDKFFTRAAPALTPPDRLVLASIDQADFQGFYVNPDFVHPDARS			526
Homología con PKC β I					
Score = 52.8 bits (125), Expect = 3e-12, Method: Compositional matrix adjust.					
Identities = 24/44 (54%), Positives = 31/44 (70%), Gaps = 0/44 (0%)					
PKC β II	624	RNAENFDRFFTRHPPVLTTPPDQEVIRNIDQSEFEGFSFVNSEFL			667
		R+ NFD+ FTR P LTP D+ I N+DQ+EF GFS+ N EF+			
PKC β I	625	RDTSNFDKEFTRQPVLTPTDKLFIMNLDQNEFAGFSYTNPEFV			668

Fig 6. Proteínas con homología a la porción carboxilo-terminal de PKC β II. Las proteínas con mayor homología son PKCs que no son reconocidas por el anticuerpo y no tienen el peso molecular superior a los 100 kDa.

PKC β II y β -catenina coimmunoprecipitan recíprocamente.

Dado que teníamos información que sugería que la PKC podía estar interaccionando con algunas proteínas de la ruta Wnt canónica decidimos revisar con más detalle e hicimos ensayos de inmunoprecipitación para identificar complejos PKC β II- β -catenina. Mediante la inmunoprecipitación averiguamos que PKC β II co-precipita con β -catenina tanto en la línea normal IEC como en las líneas tumorigénicas RKO y SW0 (Fig 6). De modo interesante, en los blots se observa que la PKC β II de alto peso molecular también co-precipita con la β -catenina y no sólo eso, si no que está presente en los inmunoprecipitados en mayor cantidad que la PKC β II de peso normal, aunque es menos abundante en el extracto total (Flecha en panel A, Fig. 6). En el experimento recíproco de co-inmunoprecipitación se demostró que β -

catenina co-precipita con PKC β II, lo que indica que estas dos proteínas interactúan *in vivo* y que podrían estar formando un complejo entre sí o con la mediación de otra u otras proteínas.

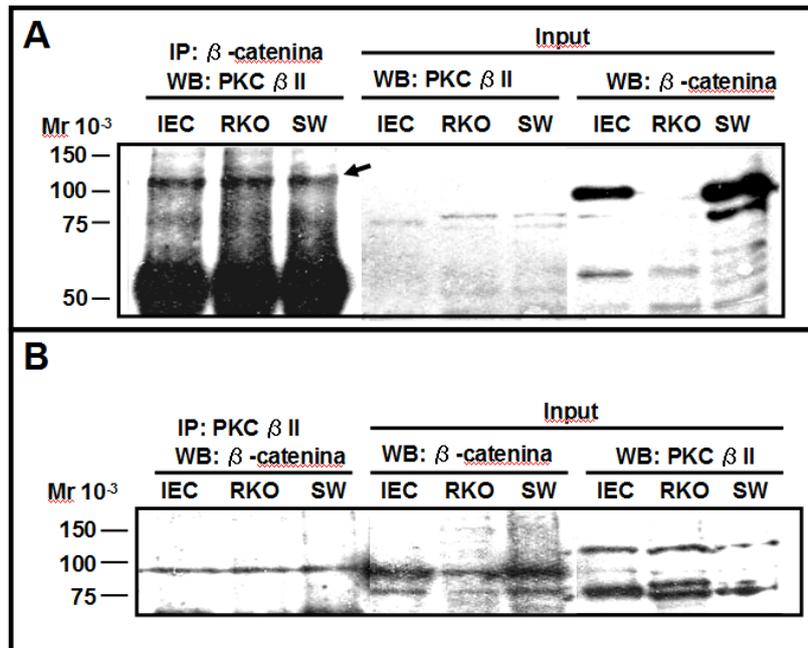


Figura 7. Co-inmuprecipitación recíproca entre PKC β II y β -catenina en células malignas de colon (SW y RKO) y células normales (IEC). A) Se inmunoprecipitó β -catenina y se buscó a PKC β II en el inmunoprecipitado. B) Se inmunoprecipitó a PKC β II y se buscó a β -catenina. Los blots presentados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a un solo gel en A y un solo gel en B. Se utilizaron los extractos totales como control de la presencia de las dos proteínas.

β -catenina se localiza en la periferia de las células normales y en el núcleo de las células SW

Hicimos ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal para conocer la ubicación subcelular de las proteínas PKC β II y β -catenina y averiguar así su posible co-localización. En las líneas normales, tanto 112 (Fig.8, primera fila-primer columna) como IEC (segunda fila-primer columna, Fig.8), la β -catenina tuvo una localización mayormente periférica, el resto estuvo distribuido en todo el citoplasma y el núcleo. En una célula IEC en división (centro en segunda fila-primer columna, Fig.8) la β -catenina baja su expresión

y casi desaparece de la membrana. En las células RKO, la β -catenina fue detectada con dificultad y se localizó principalmente en el citoplasma (tercera fila-primera columna, Fig.8). Por último, la β -catenina de las SW fue muy abundante en el núcleo y se localizó en menor medida en el citoplasma (cuarta fila-primera columna, Fig.8).

PKC β II se localiza en el núcleo de todas las células analizadas y en la membrana de las 112.

Como se puede ver en la figura 8, la PKC β II varía su localización según la línea celular. En las células 112 encontramos tanto células con PKC β II predominantemente nuclear como células con PKC β II distribuída en citoplasma y núcleo por igual (Fig. 8, primera fila-segunda columna). En las IEC la PKC β II se encontró predominantemente nuclear, aunque también se encontró un poco en citoplasma (Fig. 8, segunda fila-segunda columna); una célula en mitosis presenta PKC β II en todas partes (Fig. 8, centro en segunda fila-segunda columna). En las RKO la PKC β II es evidentemente nuclear en todas las células del campo. Por último, en la línea cancerosa SW la PKC β II se localizó mayormente en el núcleo que en citoplasma.

β -catenina y PKC β II co-localizan en el núcleo de las células SW y en la membrana de las 112.

La β -catenina colocaliza claramente con la PKC β II en el núcleo de las células de carcinoma de colon SW. Por otro lado, en las células 112 existe colocalización en la membrana plasmática. En IEC y RKO co-localizaron principalmente en el citoplasma (Fig. 8, tercera columna).

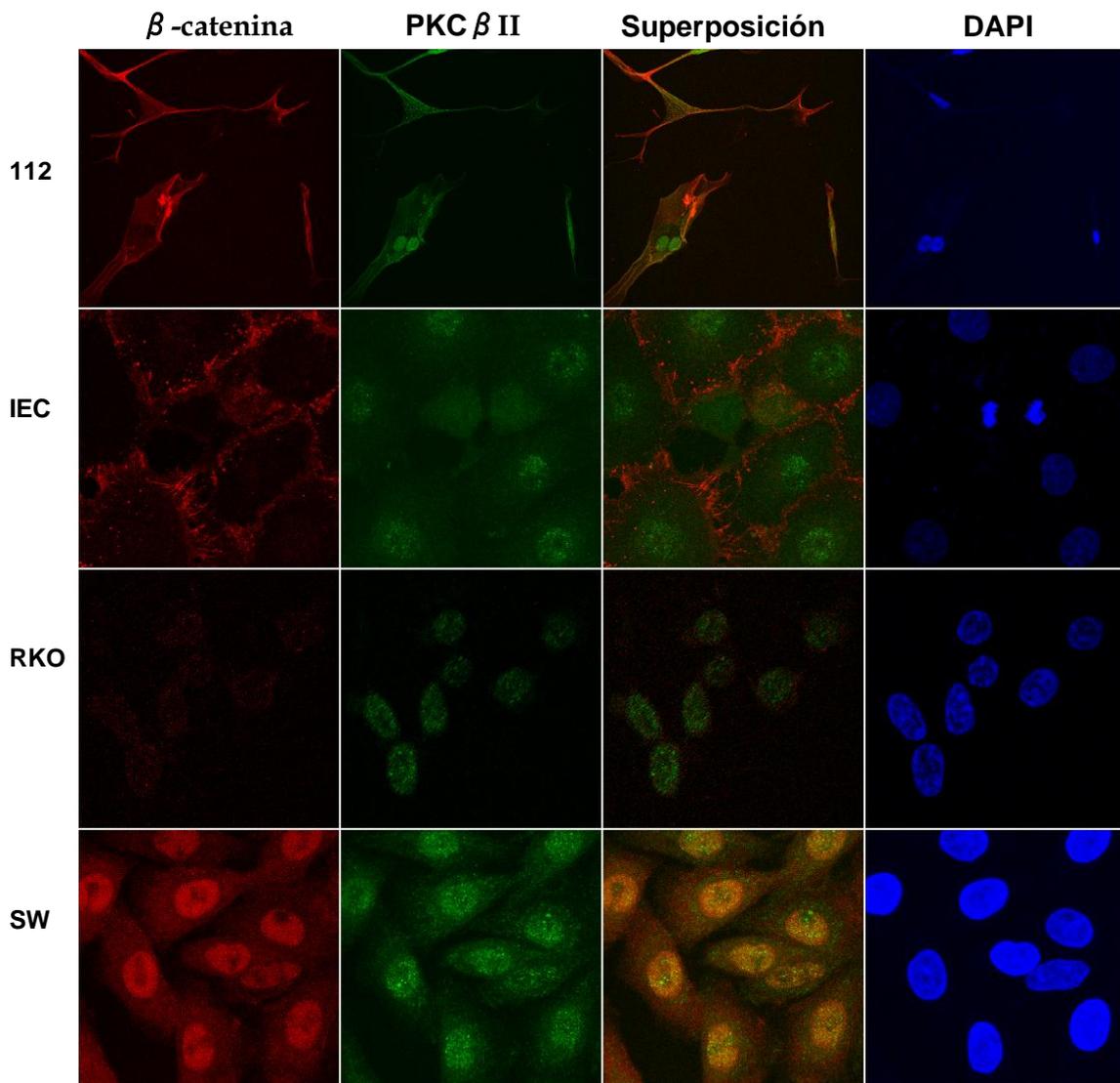


Figura 8. Localización de PKC β II y β -catenina en líneas celulares de colon.

La expresión de una isoforma dominante negativa de PKC β II tiene efectos negativos en la actividad transcripcional de la ruta Wnt canónica.

Puesto que, tanto la actividad constitutiva de PKC β II como la de la ruta Wnt favorecen la malignidad y que encontramos que la PKC β II está formando un complejo con β -catenina, es posible que la PKC β II regule la actividad transcripcional de β -catenina y por lo tanto la expresión de genes blanco de la ruta Wnt canónica. Para probar que la PKC β II regula la actividad de la ruta Wnt canónica se analizó mediante el sistema de gen reportero TOP-Flash el efecto de la expresión de una isoforma dominante negativa de PKC β II (dnPKC β II) en

la actividad transcripcional de la ruta Wnt mediada por β -catenina. Para nuestros experimentos usamos la línea celular SW, cuya ruta Wnt está constitutivamente activa debido a que solamente expresa formas truncadas de la proteína APC. Las células fueron co-transfectadas con el plásmido reportero TOPFlash y con el plásmido dnPKC β II o con el plásmido control. Como se muestra en la figura 9, 24 horas después de la transfección, la actividad transcripcional mediada por la β -catenina es disminuida significativamente ($p < 0.01$) cuando se expresa la forma dnPKC β II respecto a cuando se transfecta sólo el plásmido vacío (control).

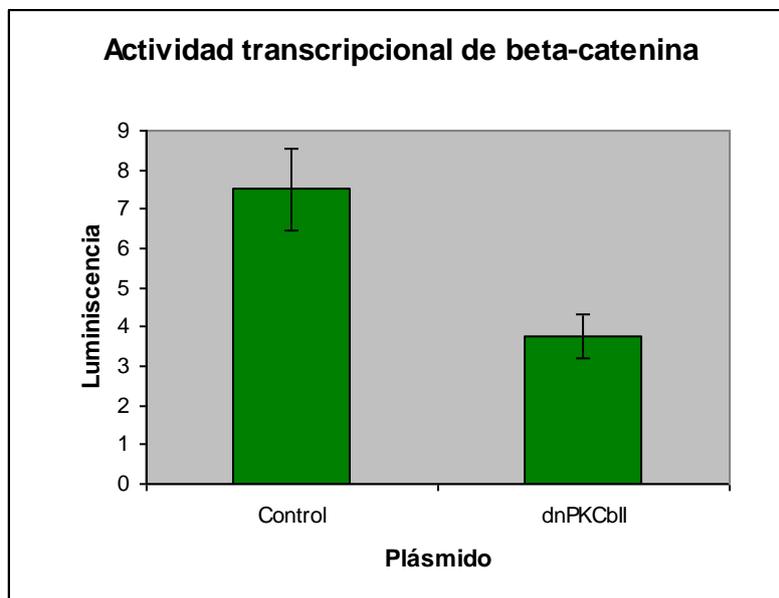


Figura 9. Efectos de la expresión de la dnPKC β II en la actividad transcripcional mediada por β -catenina. El control representa la expresión del gen reportero en las células SW-480 cuya señalización Wnt está constitutivamente activada. Se presenta la luminiscencia en unidades arbitrarias \pm el S.E.M. de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Discusión

Los tumores de tipo colo-rectal se encuentran entre las formas de neoplasias más frecuentes. Estudios experimentales han demostrado que en aproximadamente el 90% de casos de carcinoma colorectal se presentan mutaciones activadoras en la ruta de señalización denominada Wnt que convergen en la estabilización y acumulación de la β -catenina en el núcleo de la célula [22].

Al medir por western blot los niveles de β -catenina en las células, encontramos que, como se esperaba, en las células normales 112 los niveles de expresión de esta proteína son bajos. En contraste, en las células malignas SW que expresan sólo formas truncadas de APC, se encontró la presencia de abundante β -catenina nuclear, el marcador clásico de la ruta Wnt activa, en concordancia con el hecho de que tienen constitutivamente activa la ruta Wnt. En el caso de células RKO, que expresan APC normal y tienen ruta Wnt normal, el panorama no fue tan claro ya que no encontramos la presencia de β -catenina cuando utilizamos anticuerpos monoclonales contra regiones amino terminales de la proteína. De igual forma, Yin *et al.* [60] utilizando un anticuerpo monoclonal, no observaron la presencia de β -catenina en células RKO a menos que las células fueran pre-tratadas con LiCl (inhibidor de la GSK3); ellos concluyen que en condiciones basales no está presente la β -catenina en estas células. No obstante, en nuestro estudio observamos la presencia de β -catenina en células RKO con el uso de un anticuerpo dirigido contra la porción carboxilo terminal de la proteína (Fig. 7). Esto podría sugerir que de algún modo la β -catenina se encuentra alterada en este tipo celular en su porción amino terminal y por tanto no sea reconocida por los anticuerpos dirigidos contra esa región. Sin embargo, ya se ha reportado que en células RKO no se encuentran alteraciones en proteínas de la ruta Wnt (APC y β -catenina) [61]. De modo interesante, en los ensayos de inmunofluorescencia de células RKO observamos claramente la presencia de β -catenina utilizando un anticuerpo monoclonal (Figura 8). Esto sugiere que, a diferencia de lo descrito por Yin *et al.* [60], la proteína sí está presente en este tipo celular pero que al parecer el

anticuerpo utilizado reconoce un segmento presente únicamente en su conformación nativa que se pierde con el tratamiento desnaturalizante del Western blot. Otra probable explicación es la presencia de modificaciones post-traduccionales y los cambios de conformación que pudiera sufrir la proteína en los distintos contextos celulares. Esto último fue demostrado de modo elegante por Gottardi y Gumbiner [62] donde describen formas moleculares distintas de β -catenina con distintas capacidades de unirse ya sea a los factores transcripcionales LEF/TCF o a las cadherinas en las uniones adherentes. Respecto a IEC, nos sorprendió el hecho de que esta línea, cuya ruta Wnt es completamente normal, tuviera niveles de β -catenina similares a los de la SW, cuya ruta Wnt está constitutivamente activa. Esta aparente inconsistencia se aclaró con los ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal que revelaron que la β -catenina de las IEC estaba localizada en la membrana plasmática y totalmente ausente del núcleo, mientras que la de las RKO está tanto en el núcleo como en el citoplasma. Esta diferencia en la localización podría ser determinante del fenotipo canceroso.

De acuerdo con lo ya reportado en la literatura, en este estudio demostramos que existen cambios en la expresión de las distintas isoformas de PKC, en este caso, de PKC β II, en células malignas de colon lo cual sugiere que participan de modo importante en el desarrollo de esta neoplasia. Numerosos artículos han reportado un aumento en la cantidad de la isoforma β II en casos de carcinoma colorectal por lo que parece haber consenso en cuanto a su sobre-expresión en este tipo de cáncer [3,51-54].

La PKC β II se expresó a niveles similares en las células IEC, SW y RKO, mientras que la 112 expresó menor cantidad de esta proteína. El hecho de que la IEC exprese niveles de PKC β II similares a los de las líneas cancerosas no concuerda con lo que se tiene por común: que las líneas normales de colon tienen niveles bajos de PKC β II. No hay que perder de vista que las líneas celulares en cultivo son células "inmortalizadas", es decir que han sido manipuladas para evitar procesos naturales como la senescencia y muerte celular que lleva a la extinción a los cultivos primarios después de unos cuantos

pasajes. Es posible que las células IEC compartan con las líneas tumorales la característica de sobreexpresar la PKC β II. Esto tendría consecuencias muy importantes: las IEC serían células que no se encuentran en un estado normal en cuanto a esta cinasa y esto las colocaría en una etapa "pre maligna", pero sin presentar características fenotípicas de una malignidad franca como crecimiento en agar suave o tumorigenicidad en ratones desnudos. En nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que las IEC expresan otras proteínas, tales como Dvl 2 e HIF 1 α (Velázquez D, Santoyo P, datos no publicados), así como APC truncada [63] que son sello característico de células cancerosas. Por lo anterior, sugerimos que la línea IEC debe ser tomada con reservas y que es mejor no usarlas como referencia de normalidad en estudios de cáncer de colon. También sugerimos que su utilización como células modelo de etapas tempranas de la transformación maligna podría ser factible y provechosa.

Por otra parte, en nuestros blots, la PKC β II humana aparece como un doblete de bandas con una ligera separación entre ellas en las células cancerosas. Esta diferencia en la migración durante la electroforesis es debida, probablemente, a los diferentes estados de fosforilación de la proteína o alguna otra modificación postraducciona. Además de estas bandas con movimiento relativo muy semejante, en este trabajo se reporta por primera vez la existencia de una banda superior a los 100 kDa que es reconocida específicamente por el anticuerpo policlonal utilizado (SC-210 de Santa Cruz Biotechnology). Es posible que esta proteína de 100 kDa corresponda a una forma modificada de la PKC β II dado que: 1) los anticuerpos policlonales reconocen varias regiones de un antígeno, lo que reduce la probabilidad de que todos reconozcan a una proteína que no posea ese mismo antígeno; 2) es muy probable que el antígeno usado para la fabricación del anticuerpo haya sido la parte correspondiente a los últimos 52 aminoácidos de la PKC β II, ya que esta región es única de esta isoforma y el péptido utilizado tendría poca homología con otras proteínas, siendo las más cercanas otras PKCs que no corresponden al peso de la banda; 3) el fabricante asegura que el anticuerpo discrimina específicamente a la PKC β II entre las otras isoformas y no reporta bandas inespecíficas de ese tamaño; y 4) la banda desaparece al incubarse con el péptido bloqueador del experimento, mientras que las bandas inespecíficas

permanecen. La PKC β II y la PKC β I son codificadas por el mismo gen y cada una deriva de éste por splicing alternativo [64]. La diferencia que existe entre ambas isoformas es un exón que codifica para 50 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína PKC β II. Una variación en el mecanismo de corte y empalme podría provocar la traducción de una proteína más grande. Una fuente alternativa de aminoácidos adicionales es el último exón del mRNA de la PKC β II, del cual sólo se traducen 150 pb de las más de 8000 que tiene. No se descarta tampoco que el peso adicional se deba a alguna modificación postraduccional. Es necesario aislar, purificar y secuenciar esta proteína para despejar toda duda. Sin embargo, el hallazgo de una posible forma nueva de PKC β II es relevante porque la PKC β II modificada podría tener funciones celulares diferentes a las de la PKC β II de peso molecular normal y éstas podrían ser fundamentales en la fisiología del colon y del cáncer colo-rectal.

Nuestros ensayos de inmunoprecipitación nos permitieron observar que la PKC β II interacciona con la β -catenina. Esto nos sugirió que la cinasa PKC β II puede participar en el mecanismo de señalización Wnt mediado por β -catenina. Algo muy interesante es que la PKC β II de alto peso molecular también co-precipita con la β -catenina y no sólo eso, sino que está presente en los inmunoprecipitados en mayor cantidad que la PKC β II de peso normal, aunque es menos abundante en el extracto total (Flecha en panel A, Fig. 6) esto hace pensar que esta interacción posiblemente está relacionada con la modificación de la PKC β II que le confiere mayor peso molecular.

Nuestros ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal indican que tanto la PKC β II como la β -catenina tienen diferentes ubicaciones en las líneas celulares analizadas. Un determinante clave de la activación celular de la PKC reside en su habilidad para translocarse a la membrana plasmática en respuesta a moduladores positivos tales como el diacilglicerol o sus análogos farmacológicos, ésteres de forbol, como el TPA. En la membrana plasmática la PKC se vuelve completamente activa y obtiene acceso a sus sustratos específicos [65]. Aunque este modelo canónico de activación aguda (segundos a minutos) de la PKC permanece como paradigma para el estudio de la

transducción de señales dependiente de lípidos, desde hace mucho tiempo existen indicios bioquímicos e inmunocitoquímicos de que la PKC se puede translocar a otros sitios distintos a la membrana plasmática [66]. Se ha reportado que la PKC β II se localiza en diversas regiones celulares dependiendo del tipo de célula y del contexto en que se encuentre. Se le ha encontrado, por ejemplo, difusa en el citoplasma en estado basal de células HeLa [67], en la membrana plasmática [65], en el citoplasma de células cancerosas PC3 asociada a filamentos intermedios y de estrés [68], en la región pericentriolar de varias líneas celulares bajo el estímulo sostenido del TPA [64] y en el núcleo de las células HASM bajo estímulo del TNF- α [69]. En nuestro estudio, encontramos una parte menor de la PKC β II total localizada de forma difusa en el citoplasma de las cuatro líneas celulares analizadas. La mayor parte de la PKC β II total se localizó en el núcleo tanto en las líneas celulares normales como en las malignas. Hasta aquí no existen diferencias en la localización de esta cinasa en función del estado tumoral de la célula. Sin embargo, la línea celular normal 112 fue la única que presentó PKC β II asociada a la membrana. Se sabe que la translocación de la PKC β II a la membrana depende de un estímulo transitorio del orden de segundos a minutos, sin embargo, un estímulo sostenido (> 1 hora) puede provocar su desplazamiento a otras regiones subcelulares, su degradación o no tener efectos sobre su emplazamiento membranal [68]. Como la PKC β II juega un papel fundamental en la carcinogénesis de colon, probablemente su ausencia en la membrana no significa que toda la PKC β II está inactiva, sino que la PKC β II membranal no es relevante o es perjudicial al fenotipo canceroso mientras que es en el núcleo donde se promueve su activación y donde probablemente ejerce, por lo menos en parte, su actividad oncogénica. La importancia de la actividad enzimática y del aumento en el nivel de expresión de la PKC β II para la carcinogénesis de colon ha sido reportado en varios trabajos [3,51-57], sin embargo la relevancia de la ubicación sub-celular de esta cinasa no se ha estudiado. Nuestro hallazgo de que la PKC β II está presente en la membrana plasmática de las células normales pero ausente de la de las cancerosas sugiere que la localización de PKC β II podría ser un fenómeno relevante en su papel tumorigénico.

La β -catenina se encontró principalmente en las membranas de las líneas celulares normales 112 e IEC, mientras que en la línea celular SW, cuya ruta Wnt canónica está constitutivamente activa, se encontró principalmente en el núcleo, lo que concuerda con lo reportado en la literatura. En las células RKO la β -catenina se encontró en pocas cantidades difusa por toda la célula, sin preferencia por la membrana ni el núcleo. Es común que en las líneas cancerosas las uniones intercelulares desaparezcan [70], por lo tanto, era de esperarse que la β -catenina estuviera ausente de la membrana de estas células, confirmando así una ventaja proliferativa. También era de esperarse que la β -catenina estuviera ausente del núcleo en las células RKO porque el estado de la ruta Wnt en éstas es semejante al de las células no cancerosas y la maquinaria que degrada a la β -catenina citoplasmática funciona normalmente. Además, aquí demostramos que las células RKO mantienen una vía Wnt/ β -catenina funcional dado que responden al estímulo con el ligando canónico Wnt-3a con un aumento de tres a cinco veces en la transcripción del gen reportero comparado con las células RKO sin estimular.

La PKC β II y la β -catenina colocalizaron en la membrana de las células normales y en el núcleo de las células malignas. Es en el núcleo de las células de carcinoma SW, cuya actividad transcripcional de la ruta Wnt canónica es intensa, donde la PKC β II colocaliza más claramente con β -catenina. Esto significa que la PKC se coloca en un lugar propicio para interactuar con elementos reguladores del mantenimiento del DNA o de la expresión génica tales como factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, histonas, RNA polimerasas, etc. Esto sugiere que la PKC β II podría estar fosforilando a la β -catenina o a otra proteína co-activadora o co-represora para regular así su actividad transcripcional dado que, además, la β -catenina es una proteína que se regula principalmente por fosforilación [71] y que la PKC es una cinasa involucrada en la regulación de varias vías de transducción. Por otro lado, en la línea celular 112 la β -catenina y la PKC β II colocalizaron en la membrana y no en el núcleo, lo que concuerda con lo reportado por Chattopadhyay *et al.* [72] y sugiere que existen dos complejos entre β -catenina y PKC β II que se diferencian, por lo menos, en que uno se ubica en la membrana y otro en el núcleo. Esto explica por qué la β -catenina coprecipita con PKC β II tanto en las

líneas cancerosas como en las normales; las mismas proteínas están juntas, pero en partes diferentes, lo que definiría el papel que desempeña cada complejo en el fenotipo normal o en el canceroso.

En este trabajo se demuestra por primera vez la modulación de la ruta Wnt por parte de la PKC β II. Ya se ha visto que otras isoformas de PKC modulan a la ruta Wnt de forma negativa a varios niveles [73,74]. El caso de la PKC β II es extraordinario porque la regula de forma positiva. En nuestro grupo de trabajo (Luna B, datos no publicados) se ha descubierto recientemente que también la PKC ζ regula positivamente a ruta Wnt canónica. De este modo empieza a revelarse que el papel de la PKC en la ruta Wnt es más complejo de lo que se suponía y abre nuevos caminos para investigaciones futuras.

Conclusiones

1. PKC β II como β -catenina se expresan o localizan diferencialmente entre el estado normal y maligno de células de colon.
2. PKC β II interacciona *in vivo* con β -catenina en células normales y cancerosas de colon.
3. Existe una PKC β II de alto peso molecular en las células de colon que se une mayormente a la β -catenina que la PKC β II de peso normal.
4. PKC β II modula positivamente la actividad transcripcional de β -catenina y por tanto a la ruta Wnt canónica.

Perspectivas

Dado que la PKC β II co-precipita con β -catenina y que colocalizan en el núcleo, lo que podría estar pasando es que PKC β II esté fosforilando a la β -catenina o a algún otro componente del complejo β -catenina/TCF y promoviendo la activación de genes Wnt. El hecho de que la expresión de la dominante negativa disminuya a la mitad, pero no abata por completo la expresión del gen reportero sugiere que la actividad enzimática de PKC β II es regulador importante de la ruta Wnt canónica en las células SW pero no el único. Por lo tanto es importante saber si la ausencia de la proteína PKC β II tiene efectos adicionales en la expresión de los genes Wnt o no. Esto se podría hacer mediante ensayo de RNA de interferencia. También es necesario que se investigue si la unión entre PKC β II y β -catenina es directa y si PKC β II fosforila a β -catenina o hay otras proteínas involucradas. Hasta ahora no se ha reportado que la ruta Wnt no canónica module positivamente a la vía canónica. Dado que la PKC es una proteína clave en la actividad de la ruta Wnt no canónica, debe investigarse si los efectos de la PKC β II en la ruta Wnt canónica tienen que ver con la activación de la ruta no canónica Wnt/Ca⁺⁺. El otro gran asunto que queda planteado para estudiarse es el de examinar los efectos fenotípicos en las líneas cancerosas de la regulación de la PKC β II en la ruta Wnt canónica.

Lista de abreviaturas y nombres

APC – Poliposis adenomatosa de colon

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Trifosfato de adenosina

CamKII – Cinasa dependiente de calcio-calmodulina 2

CG-NAP – Proteína asociada a PKN localizada en centrosoma y Golgi

CKI α – Cinasa de caseína 1 alfa

DAG – Diacilglicerol

DMEM – Medio de Dubelco modificado de Eagle

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Dvl – Dishevelled

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA – Ácido etilenglicoltetraacético

FBS – Suero fetal bovino

GSK-3 β – Cinasa de la glicógeno sintetasa 3 beta

HASM – Músculo liso de la vía respiratoria humana

HIF-1 α – Factor inductor de hipoxia 1 alfa

HRP – Peroxidasa de rábano

IP3 – Trifosfato de inositol

ISSSTE – Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

JNK – c-Jun cinasa

kDa – Kilodaltones

LEF/TCF – Factor potenciador de linfocitos / Factor de células T

LOH – Pérdida de heterocigocidad

LRP – Proteína relacionada a lipoproteína de baja densidad

mRNA – Ácido ribonucleico mensajero

PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS – Amortiguador salino de fosfatos

PCP – Polaridad celular planar

PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PIP3 – Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato

PKC – Proteína cinasa C

PKD – Proteína cinasa D

PLC – Fosfolipasa C

PMA – Forbol miristato acetato

PMSF – Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PS – Fosfatidilserina

RACK – Receptor para proteína C activada

SDS – Dodecilsulfato sódico

siRNA – RNA de interferencia

STICK – Sustrato que interacciona con la cinasa C

TBS – Amortiguador salino con Tris

TGF β – Factor de crecimiento transformante beta

TGF β RII – Receptor tipo 2 del factor de crecimiento transformante beta

TNF α – Factor de necrosis tumoral alfa

TPA – Tetradecanoilforbol acetato

TTBS – Amortiguador salino con Tris y Tween

Wnt – Este nombre proviene de la combinación de Wg (Wingless) e Int

Referencias

1. Takai Y, Yamamoto M, Inoue M, Kishimoto A, Nishizuka Y. A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977 Jul 25;77(2):542-50.
2. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):281-94.
3. Murray NR, Davidson LA, Chapkin RS, Clay Gustafson W, Schattenberg DG, Fields AP. Overexpression of protein kinase C beta11 induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *J Cell Biol*. 1999 May 17;145(4):699-711.
4. Gould CM, Newton AC. The life and death of protein kinase C. *Curr Drug Targets*. 2008 Aug;9(8):614-25.
5. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Revisado el 17 de agosto de 2010, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas de mortalidad. Revisado el 17 de agosto de 2010, de: http://www.inegi.org.mx/lib/olap/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11144
7. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5a Ed. Worth Publishers. Nueva York. 2008. pp 473-478
8. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
9. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*. 1999 Dec;9(12):M53-6.
10. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):336-41.
11. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of*

the Cell. 4a Ed. Academic Press. 2002. pp 1313-1361

12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
13. Ferbeyre L, Salinas JC. Bases genéticas y moleculares del cáncer/1ª parte. *GAMO* 2005. Mar-Abr. 4(2):42-7.
14. Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J*. 2007 Dec;21(14):3777-85.
15. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5.
16. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10.
17. e-Mexico. Alertan ISSSTE sobre aumento de cáncer en el colon. Revisado el 17 de agosto de 2010, de:
http://www.emexico.gob.mx/wb2/eMex/eMex_2a02d_not14_alertan_expert
18. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. Boletines 2006. Revisado el 17 de agosto de 2010, de:
http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/diciembre/b006_2006.html
19. Geneser, F. (2000). *Histología*. 3a ed. Ed. Panamericana. Madrid. 2000
20. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1904-9.
21. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998 Jun 29;353(1370):821-30.
22. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*. 2005 Apr 15;19(8):877-90.

23. van Amerongen R, Berns A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet.* 2006 Dec;22(12):678-89.
24. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destrée O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology.* 2005 Aug;129(2):626-38.
25. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Apr;19(2):150-8.
26. Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 2000 Jul;16(7):279-83.
27. Bejsovec A. Wnt pathway activation: new relations and locations. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):11-4.
28. Montcouquiol M, Crenshaw EB 3rd, Kelley MW. Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:363-86.
29. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* 2003 Sep;5(3):367-77.
30. Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 1999 Oct;13(13):1658-76.
31. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):281-94.
32. Farhadi A, Keshavarzian A, Ranjbaran Z, Fields JZ, Banan A. The role of protein kinase C isoforms in modulating injury and repair of the intestinal barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jan;316(1):1-7.
33. Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.* 2003 Mar 1;370(Pt 2):361-71.
34. House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science.* 1987 Dec 18;238(4834):1726-8.

35. Ono Y, Fujii T, Igarashi K, Kuno T, Tanaka C, Kikkawa U, Nishizuka Y. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):4868-71.
36. Burns DJ, Bell RM. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem*. 1991 Sep 25;266(27):18330-8.
37. Sossin WS, Schwartz JH. Ca(2+)-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem Sci*. 1993 Jun;18(6):207-8.
38. Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF, Blumberg PM. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol Pharmacol*. 1993 Aug;44(2):298-307.
39. Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell*. 1995 Jun 16;81(6):917-24.
40. Takahashi M, Mukai H, Oishi K, Isagawa T, Ono Y. Association of immature hypophosphorylated protein kinase epsilon with an anchoring protein CG-NAP. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34592-6.
41. Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J*. 1998 Jan;12(1):35-42..
42. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 1982 Jul 10;257(13):7847-51.
43. McGarrity TJ, Peiffer LP, Neely EB, Palavarapu RG, Koltun WA, Parker P, Howett MK. Localization of protein kinase C alpha isoform expression in the human gastrointestinal tract. *Cell Growth Differ*. 1996 Jul;7(7):953-9.
44. Jiang YH, Aukema HM, Davidson LA, Lupton JR, Chapkin RS. Localization of protein kinase C isozymes in rat colon. *Cell Growth Differ*. 1995 Nov;6(11):1381-6.

45. Cerda SR, Mustafi R, Little H, Cohen G, Khare S, Moore C, Majumder P, Bissonnette M. Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene*. 2006 May 25;25(22):3123-38.
46. Frey MR, Clark JA, Leontieva O, Uronis JM, Black AR, Black JD. Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*. 2000 Nov 13;151(4):763-78.
47. Hizli AA, Black AR, Pysz MA, Black JD. Protein kinase C alpha signaling inhibits cyclin D1 translation in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2006 May 26;281(21):14596-603.
48. Black JD. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci*. 2000 Apr 1;5:D406-23.
49. Harrington EO, Löffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, Ware JA. Enhancement of migration by protein kinase C alpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase C delta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997 Mar 14;272(11):7390-7.
50. Martiny-Baron G, Fabbro D. Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res*. 2007 Jun;55(6):477-86.
51. Sauma S, Yan Z, Ohno S, Friedman E. Protein kinase C beta 1 and protein kinase C beta 2 activate p57 mitogen-activated protein kinase and block differentiation in colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 1996 May;7(5):587-94.
52. Davidson LA, Brown RE, Chang WC, Morris JS, Wang N, Carroll RJ, Turner ND, Lupton JR, Chapkin RS. Morphodensitometric analysis of protein kinase C beta(II) expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis*. 2000 Aug;21(8):1513-9..
53. Gökmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP. Elevated protein kinase C beta1 is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1375-81.
54. Davidson LA, Aymond CM, Jiang YH, Turner ND, Lupton JR, Chapkin RS. Non-invasive detection of fecal protein kinase C beta1 and zeta messenger RNA: putative biomarkers for colon cancer. *Carcinogenesis*. 1998 Feb;19(2):253-7.

55. Murray NR, Weems C, Chen L, Leon J, Yu W, Davidson LA, Jamieson L, Chapkin RS, Thompson EA, Fields AP. Protein kinase C betaII and TGFbetaRII in omega-3 fatty acid-mediated inhibition of colon carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2002 Jun 10;157(6):915-20.
56. Yu W, Murray NR, Weems C, Chen L, Guo H, Ethridge R, Ceci JD, Evers BM, Thompson EA, Fields AP. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C beta II-mediated colon carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2003 Mar 28;278(13):11167-74.
57. Fields AP, Calcagno SR, Krishna M, Rak S, Leitges M, Murray NR. Protein kinase Cbeta is an effective target for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* 2009 Feb 15;69(4):1643-50.
58. Jönsson M, Smith K, Harris AL. Regulation of Wnt5a expression in human mammary cells by protein kinase C activity and the cytoskeleton. *Br J Cancer.* 1998 Aug;78(4):430-8.
59. Santa Cruz Biotechnology. PKCβII antibody Datasheet. Revisado el 18 de agosto de 2010, de: <http://www.scbt.com/datasheet-210-pkc-betaII-c-18-antibody.html>
60. Yin YJ, Katz V, Salah Z, Maoz M, Cohen I, Uziely B, Turm H, Grisaru-Granovsky S, Suzuki H, Bar-Shavit R. Mammary gland tissue targeted overexpression of human protease-activated receptor 1 reveals a novel link to beta-catenin stabilization. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5224-33.
61. da Costa LT, He TC, Yu J, Sparks AB, Morin PJ, Polyak K, Laken S, Vogelstein B, Kinzler KW. CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. *Oncogene.* 1999 Sep 2;18(35):5010-4.
62. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol.* 2004 Oct 25;167(2):339-49.
63. Gordon PV, Paxton JB, Fox NS. A methodology for distinguishing divergent cell fates within a common progenitor population: adenoma- and neuroendocrine-like cells are confounders of rat ileal epithelial cell (IEC-18) culture. *BMC Cell Biol.* 2005 Jan 18;6(1):2.
64. Blobe GC, Khan WA, Halpern AE, Obeid LM, Hannun YA. Selective regulation of expression of protein kinase C beta isoenzymes occurs via alternative splicing. *J*

Biol Chem. 1993 May 15;268(14):10627-35.

65. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995 Apr;9(7):484-96.
66. Mochly-Rosen D, Kauvar LM. Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv Pharmacol.* 1998;44:91-145.
67. Becker KP, Hannun YA. cPKC-dependent sequestration of membrane-recycling components in a subset of recycling endosomes. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):52747-54.
68. Kim J, Choi YL, Vallentin A, Hunrichs BS, Hellerstein MK, Peehl DM, Mochly-Rosen D. Centrosomal PKC β 1 and pericentrin are critical for human prostate cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2008 Aug 15;68(16):6831-9.
69. Clarke DL, Sutcliffe A, Deacon K, Bradbury D, Corbett L, Knox AJ. PKC β 1 augments NF- κ B-dependent transcription at the CCL11 promoter via p300/CBP-associated factor recruitment and histone H4 acetylation. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3503-14.
70. Gloushankova NA. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Jul;73(7):742-50
71. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda).* 2007 Oct;22:303-9.
72. Chattopadhyay N, Wang Z, Ashman LK, Brady-Kalnay SM, Kreidberg JA. α 3 β 1 integrin-CD151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 2003 Dec 22;163(6):1351-62.
73. Gwak J, Jung SJ, Kang DI, Kim EY, Kim DE, Chung YH, Shin JG, Oh S. Stimulation of protein kinase C- α suppresses colon cancer cell proliferation by down-regulation of beta-catenin. *J Cell Mol Med.* 2009 Aug;13(8B):2171-80.
74. MacLeod RJ, Hayes M, Pacheco I. Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jul;293(1):G403-11.