



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de la Participación de la Proteína Cinasa C Zeta en la ruta de señalización Wnt”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Luis Bernardo Luna Ulloa.

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Martha Robles Flores. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Jesús Adolfo García Saíenz. Instituto de Fisiología Celular UNAM
Dr. Iván Velasco Velázquez. Instituto de Fisiología Celular UNAM

MÉXICO, D. F. Agosto, 2014



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.

El presente estudio de doctorado se realizó bajo la tutoría de la Dra. Martha Robles Flores en el edificio de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM, apoyado por la UNAM (Proyecto DGAPA-UNAM IN213608) y CONACyT (Proyecto CB2005-24778).

Agradezco al Programa de Apoyo para estudios de Posgrado (PAEP) por su contribución para la presentación de los resultados en Congresos.

A la Dra Martha Robles Flores. Por su apoyo en el diseño y desarrollo del presente proyecto.

A los miembros del comité tutorial

Dr. Jesús Adolfo García Sainz.

Dr. Iván Velasco Velázquez.

y miembros de jurado de exámen:

Dra. Marina Macías Silva

Dr. Alejandro García Carranca

Dra. Martha Menjívar Iraheta

Dr. Fernando López Casillas

Por todos sus comentarios que sin duda enriquecieron de manera significativa el contenido de este trabajo de investigación.

A la Dra. Cristina Castañeda Patlán. Por su excelente apoyo técnico en el desarrollo de los experimentos.

Al Biól. Gabriel Orozco y Miguel Quiroz por su gran ayuda en la adquisición de las imágenes por microscopía confocal.

...Esta Tesis esta dedicada a mis padres por brindarnos su vida para ver cumplidos nuestros sueños...

...A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a ella como profesor y alumno y permitirme conocer y aprender de tantas personas...

A todas aquellas personas que me ayudaron y motivaron durante este importante paso de mi formación académica...

Gracias...

Indice.

I RESUMEN.....	4
II ABSTRACT.....	5
III. Abreviaturas utilizadas en el texto.....	6
1. INTRODUCCION.....	7
1.1 El Epitelio intestinal de mamíferos.....	8
1.2 La vía Wnt y cáncer colorectal.....	9
1.3 La función dual de β -catenina.....	11
1.4 Las vías no canónicas de Wnt.....	12
1.5 La PKC y tumorigénesis.....	16
2. ANTECEDENTES.....	18
3. OBJETIVO GENERAL E HIPOTESIS	19
3.1 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES Y METODOS.....	21
4.1 Material Biológico.....	21
4.2 Plásmidos.....	21
4.3 Transfección y ensayos de Luciferasa.....	22
4.4 Ensayos de activación por Wnt 3a e inhibición de PKC ξ	22
4.5 Ensayos de RNAi y forma dominante negativa de PKC ξ	23
4.6 Ensayos de proliferación celular por reducción de MTT.....	24
4.7 Análisis de InmunoBlot.....	24
4.8 Inmunofluorescencia.....	25
4.9 Cuantificación de β -catenina nuclear por Citometría de Flujo (FACS).....	26
4.10 Xenotrasplantes de células en ratones inmunocomprometidos.....	26
4.11 Análisis estadísticos.....	27

5. RESULTADOS.....	28
5.1 PKC ζ interacciona de manera específica <i>in vivo</i> con β -catenina principalmente e líneas celulares tumorales de colon.....	28
5.2 En condiciones basales las células SW480 poseen una elevada actividad transcripcional Wnt/ β -catenina. Las células RKO tienen una baja actividad basal que es estimulada por ligando Wnt 3a.....	31
5.3 La inhibición farmacológica de PKC ζ bloquea de manera dependiente de la dosis la actividad transcripcional por β -catenina.....	33
5.4 El bloqueo de la expresión de PKC ζ mediante RNAi afecta negativamente la actividad transcripcional de β -catenina de manera dependiente de la dosis.....	35
5.5 La actividad catalítica de PKC ζ es necesaria para modular positivamente la ruta Wnt canónica.....	36
5.6 La inhibición de PKC ζ inhibe la proliferación celular y la expresión del gen <i>c-myc</i>	37
5.7 El Knockdown de PKC ζ disminuye la actividad tumorigénica de células SW480 en ratones inmunocomprometidos.....	39
5.8 La inhibición de PKC ζ no afecta los niveles de proteína de β -catenina.....	40
5.9 La inhibición de PKC ζ promueve la salida de β -catenina del núcleo de células SW480.....	45
6. DISCUSION.....	48
7. Conclusiones.....	55
8. Referencias.....	56
9. Apéndice.....	64

I. RESUMEN

Los tumores colo-rectales, se encuentran entre las neoplasias humanas más frecuentes. Diversos estudios han demostrado que en un alto número de casos de este tipo de cáncer se presentan mutaciones en proteínas que forman parte de la vía de transducción de señales denominada Wnt. La vía de señalización Wnt regula múltiples eventos durante el desarrollo de organismos animales así como la capacidad de autorrenovación de células troncales mediante la regulación de los niveles citoplásmicos de la proteína β -catenina. Por otro lado, en múltiples sistemas se ha descrito la participación de la proteína cinasa C (PKC) en procesos de carcinogénesis, ya que participa en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis. Aunque se han descrito muchos de los componentes de la ruta Wnt, muy poco se conoce acerca de su interacción con otras vías de señalización. En el presente proyecto planteamos una posible interacción de señalización de la ruta Wnt con PKC así como una posible participación compartida en el proceso de carcinogénesis colo-rectal. En una primera etapa del desarrollo del proyecto, encontramos cambios en la expresión de proteínas de la ruta Wnt así como en las distintas isoformas de PKC entre el estado normal (no maligno) y canceroso de líneas celulares de colon humano. Mediante estudios de co-inmunoprecipitación recíproca e inmunofluorescencia, demostramos la interacción *in vivo* de las proteínas clave de la ruta Wnt GSK-3 β y β -catenina con la isoforma ζ de PKC. En la segunda etapa del proyecto, realizada en este trabajo, se analizó el significado fisiológico de la interacción de PKC ζ con β -catenina. El bloqueo de la actividad de PKC ζ mediante métodos farmacológicos, por la expresión de una forma dominante negativa y el bloqueo selectivo de su expresión mediante siRNA, disminuyen de manera dosis-dependiente, la actividad transcripcional mediada por β -catenina, la proliferación celular, la expresión del gen blanco de ruta Wnt *c-myc* y la capacidad tumorigénica de las células cancerosas transplantadas a ratones inmunocomprometidos. Nuestros resultados indican que PKC ζ modula positivamente la ruta Wnt canónica. Encontramos que el mecanismo molecular por el cual lo hace es a través del control rápido de la localización nuclear de β -catenina mediante un proceso de exportación nuclear sensible a leptomicina B; la degradación de β -catenina no parece tener un efecto relevante ya que la inhibición del proteosoma o la expresión de una mutante de β -catenina resistente a

degradación, no afectan el bloqueo de la actividad transcripcional de β -catenina inducida por la inhibición de PKC ζ . En conjunto, nuestros resultados indican que la isoforma atípica PKC ζ participa de manera importante en la regulación positiva de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina.

II. ABSTRACT

The colonic epithelium is a continuously renewing tissue with a dynamic turnover of cells. Wnt pathway is a key regulator of its homeostasis and is altered in a large proportion of colon cancers. Protein kinase C family of serine/threonine kinases are also involved in colon tumor formation and progression; however, the molecular role played by them in the Wnt pathway, is poorly understood. Reciprocal co-immunoprecipitation and immunofluorescence studies revealed that PKC ζ interacts with β -catenin mainly in tumoral colon cells, which overexpressed this PKC isoform. Pharmacological inhibition, siRNA-mediated knockdown of PKC ζ or expression of a dominant negative form of it in tumoral SW480 cells, blocked in a dose-dependent manner the constitutive transcriptional activity mediated by β -catenin, cell proliferation and the expression of the Wnt target gene c-myc. Remarkably, PKC ζ -stably depleted cells exhibited diminished tumorigenic activity in grafted mice. We show that PKC ζ functions in a mechanism that does not involve β -catenin degradation, since the effects produced by PKC ζ inhibition were also obtained in the presence of proteasome inhibitor and in cells expressing a β -catenin degradation resistant mutant. It was found that PKC ζ activity regulates the nuclear localization of β -catenin since PKC ζ inhibition induces a rapid export of β -catenin from the nucleus to the cytoplasm in a leptomycin-B sensitive manner. Taken together, our results indicate that the atypical PKC ζ plays an important role in positive regulation of canonical Wnt pathway.

III. Abreviaturas utilizadas en el texto.

APC Proteína de pólipos adenomatosos de colon

CAMKII Cinasa dependiente de Calcio y calmodulina.

CK-1 Caseína cinasa 1

DAG Diacilglicerol

Dvl Dishevelled.

EGF Factor de Crecimiento epidérmico.

Fz Receptor Frizzled.

GSK-3 Glucógeno Sintetasa Cinasa - 3

IP3 Inositol trifosfato

JNK Cinasa del dominio N terminal de Jun

LEF/TCF Factor Potenciador Linfoide/Factor específico de células T

LRP5/6 Proteínas relacionadas con el receptor de Lipoproteínas de baja densidad.

MAPK Proteínas cinasas activadas por Mitógenos.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Myr.PKC ζ .PS Inhibidor farmacológico de PKC ζ basado en la secuencia pseudosubstrato

NFAT Factor Nuclear de células T Activadas.

NLK Cinasa parecida a Nemo.

PCP Ruta Wnt de la Polaridad Celular Planar

PDK-1 Proteína dependiente de Fosfoinosítidos

PI3K Fosfatidil inositol 3-cinasa

PIP3 Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato

PKC ζ Proteína cinasa C isoforma zeta.

PP2A Proteína Fosfatasa 2A

siRNA RNA de interferencia

Wnt Wingless-Int 1

1. Introducción.

El epitelio intestinal en mamíferos, representa un sistema dinámico de células sujetas a una renovación continua y se originan a partir de células troncales durante toda la vida del organismo. La evidencia actual indica que la vía de señalización Wnt desempeña una función trascendental en el mantenimiento del estado proliferativo de las células troncales y el mantenimiento de la arquitectura intestinal. La relevancia de la ruta Wnt en la fisiología intestinal fue establecida con el hallazgo de que el gen supresor de tumores APC se encuentra mutado en la gran mayoría de casos de cáncer colo-rectal (Bienz y Clevers, 2000; Logan y Nusse, 2004). A partir de este descubrimiento, se ha descrito que en un número abrumador de casos de este tipo de cáncer se presentan mutaciones activadoras de la vía Wnt que convergen en la estabilización y acumulación del co-activador transcripcional β -catenina en el núcleo celular; en el núcleo, la β -catenina interacciona con factores transcripcionales de la familia LEF/TCF lo cual permite la activación transcripcional de genes que participan principalmente en procesos de proliferación celular (Bienz y Clevers, 2000; Hendricks y Reichman, 2002; Giles, et al. 2003; Logan y Nusse, 2004; Pinto y Clevers, 2005; Gregorieff y Clevers, 2008). La progresión de los adenomas colo-rectales requiere la alteración y una compleja interacción entre varias vías de señalización celular que culminan en procesos como vascularización, pérdida de la diferenciación celular e invasión del torrente sanguíneo para formar metástasis (Vogelstein y Kinsler, 2004; Gregorieff y Clevers, 2008). De este modo, la vía Wnt no actúa de forma aislada en el desarrollo de neoplasias colorectales dado que existe evidencia considerable de que la alteración de otras vías de señalización participan junto con la vía Wnt durante la progresión de esta enfermedad. En una variedad de estudios se han demostrado cambios en los niveles de varias isoformas de PKC en distintas etapas del carcinoma de colon, lo cual sugiere una importante participación de la PKC en la progresión de carcinomas colo-rectales (Gokmen-Polar, et al. 2001; Zhang, et al. 2004; Oster y Leitges, 2006; Fields, et al. 2009). Evidencia reciente sugiere una participación de la PKC en la vía de señalización Wnt canónica (Chen, et al. 2000; Gwak, et al. 2006; Ji, et al. 2010). Sin embargo, los sitios de convergencia y su relevancia en el desarrollo de tumores de colon aún quedan por demostrarse. En el presente trabajo, proporcionamos evidencia experimental de una novedosa interacción funcional entre la isoforma atípica de PKC ζ y la ruta de señalización

Wnt lo cual representa un mecanismo interesante de regulación que puede ser utilizado en el diseño de nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento del cáncer colo-rectal.

1.1 El epitelio intestinal de mamíferos

El epitelio intestinal que reviste al intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y al intestino grueso o colon, está formado por una sola capa de células epiteliales organizadas en dos compartimentos distintos en cuanto a su morfología y función: las criptas de Lieberkühn, o compartimento proliferativo, son invaginaciones de la submucosa donde residen las células troncales que dan origen a los distintos tipos de células que forman al intestino; por otro lado las crestas o vellosidades del intestino son protuberancias de la superficie luminal donde se encuentran los distintos tipos de células diferenciadas del intestino. La mucosa del colon no posee las vellosidades y en vez de ellas se encuentra una superficie de epitelio plano. En el epitelio intestinal adulto pueden distinguirse dos tipos principales de linajes celulares: Los enterocitos o linaje de absorción, y los miembros del linaje secretorio; en éste último se encuentran las células caliciformes, las células enteroendócrinas y, en el caso del intestino delgado, las células Paneth (Reya y Clevers, 2005; Radke y Clevers, 2005; Pinto y Clevers, 2005a; Gregorieff y Clevers, 2008). El epitelio intestinal posee la tasa más alta de autorenovación que se conoce debido quizás al constante estrés químico y mecánico al que se encuentra sometido. Así, en el fondo de las criptas proliferativas, las células troncales dan origen a células progenitoras hijas las cuales migran constantemente hacia arriba y después de dos o tres ciclos de división se diferencian en los distintos linajes ya comentados. Al llegar al extremo superior del epitelio estas células mueren por apoptosis y finalmente son removidas al exterior. De esta forma, la homeostasis del intestino se fundamenta en un control estricto de proliferación celular, diferenciación y apoptosis; estas distintas respuestas celulares, son reguladas por un conjunto de vías de transducción celular de las cuales la denominada vía de señalización Wnt resulta de particular relevancia en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. La vía Wnt, homóloga a Wingless en *Drosophila*, participa en virtualmente cada aspecto del desarrollo embrionario; sin embargo la evidencia actual indica que esta ruta es esencial en el mantenimiento del estado proliferativo e indiferenciado de células troncales en tejidos de autorenovación adultos tales como el epitelio intestinal (Pinto

y Clevers, 2005a; Pinto y Clevers, 2005b). En 1993 el grupo de Paul Polakis (Rubinfeld, 1993) y Bert Vogelstein (Su, et al. 1993) de manera independiente, describieron la interacción física entre el supresor tumoral APC, proteína mutada en cerca del 85% de casos de cáncer colorectal, con la β -catenina, un componente elemental de la vía Wnt. Desde este trascendental descubrimiento, se abrió una importante línea de investigación enfocada al estudio de la vía Wnt/ β -catenina en el campo de la fisiología y carcinogénesis colo-rectal.

1.2 La vía Wnt y cáncer colorectal.

La familia de genes *wnt* consiste de 19 miembros que codifican para un grupo altamente conservado de glicoproteínas de señalización ricas en cisteína, que se modifican por palmitoilación en un residuo conservado de cisteína (Logan y Nusse, 2004). Una vez secretados al medio extracelular, los ligandos Wnt participan en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares, que incluyen proliferación, diferenciación, migración y polaridad celular mediante la activación de múltiples cascadas intracelulares de las cuales la denominada ruta Wnt canónica o dependiente de β -catenina es la mejor caracterizada. En ausencia de ligandos Wnt, la β -catenina es degradada por un complejo de proteínas que incluye a axina, al supresor tumoral APC, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y dos cinasas, la glucógeno sintetasa cinasa 3β (GSK3 β) y la caseína cinasa 1α (CK1 α). La fosforilación secuencial de β -catenina dentro de este complejo, primero por CK1 α y posteriormente por GSK3 β , provoca su ubiquitinación y posteriormente su degradación vía proteosoma. La proteína Axina es fundamental en este proceso, ya que incrementa en varios órdenes de magnitud la eficiencia de fosforilación de β -catenina por GSK-3 (Ha, et al. 2004). De este modo, en condiciones basales, los niveles citosólicos de β -catenina se encuentran bajos. Cuando un ligando Wnt canónico, interacciona con su complejo de receptores formado por la proteína de siete dominios transmembranales de la familia Frizzled y el co-receptor LRP5/6, provoca la fosforilación y acumulación membranar de la proteína dishevelled (Dvl) por un mecanismo aún no bien determinado; Dvl promueve la translocación de la axina y GSK-3 β a la membrana plasmática, donde interaccionan con la porción citoplásmica del co-receptor LRP5/6. La GSK-3 β fosforila residuos conservados de Serina y Treonina de dominios PPPSxP en la parte

citoplásmica del co-receptor LRP5/6 los cuales funcionan como sitios de anclaje para la unión de proteínas adicionales de axina, Dvl y otros complejos de LRP5/6 para formar lo que se ha descrito como signalosoma (Bilic, et al. 2007). Los eventos moleculares por los cuales el signalosoma inhibe la actividad catalítica de la GSK-3 β han sido objeto de una intensa investigación a lo largo de una década. Algunos estudios proponen un modelo de inhibición bioquímico por el cual los dominios PPPSxP del co-receptor LRP 5/6 al ser fosforilados, se unen al sitio catalítico de GSK-3 β actuando como un pseudosustrato, lo cual inhibe su actividad hacia β -catenina. Recientemente, un modelo celular distinto propone que la activación por ligandos Wnt provoca la internalización de GSK-3 β en el lumen de cuerpos multivesiculares (MVBs), de esta forma impidiendo que GSK-3 β fosforile la β -catenina recién sintetizada. Esta nueva hipótesis sugiere un nuevo mecanismo celular de inhibición de GSK-3 β mediante el aislamiento de la enzima de sus sustratos por una doble membrana (Taelman, et al. 2010). La inhibición de GSK-3 β es el elemento clave que induce la acumulación citoplásmica de β -catenina para su posterior translocación al núcleo donde interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción lymphoid enhancer factor/T-cell factor (TCF/LEF), para formar un complejo bipartito activo (Behrens, et al. 1996; Clevers, 2006). Este complejo provoca la transcripción de programas de expresión génica involucrados principalmente en proliferación y tumorigénesis tales como el oncogene *c-myc* y la Ciclina D1 (Bienz y Clevers, 2000; Hendricks y Reichmann, 2002; Chiang Shuek Wang y Pignatelli, 2002; Giles y Clevers, 2003; Logan y Nusse, 2004; Clevers, 2006; Gregorieff y Clevers, 2008; Behrens, 2013).

Desde hace tiempo se conoce que en múltiples casos de cáncer colo-rectales esporádicos y hereditarios se encontraban mutaciones en la proteína supresora de tumores APC; con el hallazgo en 1993 de que la proteína APC resulta fundamental en la vía Wnt durante la degradación de la β -catenina se hizo evidente que cualquier mutación que lleve a la estabilización de la β -catenina nuclear, produce la formación de tumores en el epitelio intestinal. Se han descrito tres mecanismos por los cuales se da la acumulación 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. Estos eventos

convergen en la activación transcripcional de genes que participan durante la proliferación celular, como el oncogene *c-myc* (Bienz y Clevers, 2000; Oving y Clevers, 2002; Chiang, et al. 2002). Con esto, resulta evidente la trascendente participación de la vía Wnt durante la carcinogénesis colo-rectal; sin embargo, poco o nada se sabe acerca de la posible participación de las vías no canónicas de Wnt. La activación de la PKC por ciertos ligandos Wnt abre la interesante posibilidad de una participación compartida de estas dos vías de señalización durante el desarrollo y progresión de la carcinogénesis colo-rectal.

1.3 La función dual de la β -catenina

La estructura primaria de la β -catenina comprende un dominio N-terminal de 130 aminoácidos, 12 repeticiones de 42 aminoácidos conocidos como armadillo y un dominio C-terminal de 100 aminoácidos. La región N-terminal contiene los sitios consenso de fosforilación para la GSK3- β mientras que la región carboxilo terminal ejecuta la función transactivadora requerida para la transcripción de los genes blanco. La región central que contiene las repeticiones armadillo interacciona con diferentes proteínas que incluyen a la APC, la axina, Tcf/Lef y con proteínas de unión celular como la cadherina (Figura A). De hecho, la β -catenina fue aislada por primera vez asociada con los dominios intracelulares de la E-cadherina como parte de los complejos que mantienen unidas a las células (Gumbiner, 1986; Shapiro, 2001). Ahora se sabe que β -catenina funciona en la adhesión celular en la membrana plasmática al conectar las cadherinas con α -catenina y con el citoesqueleto (Gumbiner, 1986). De este modo, la β -catenina desempeña una función dual en la célula dado que participa también en la regulación de la expresión génica; lo anterior, implica la necesidad de un control estrecho entre dichas actividades.

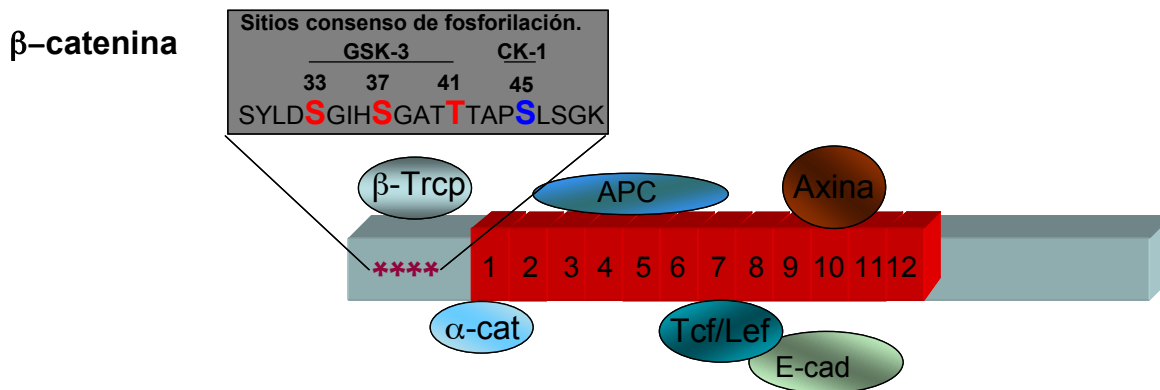


Figura A. Esquema de la β -catenina donde se muestran sus dominios principales y algunas de las proteínas con las que interacciona. La región amino terminal contiene los sitios consenso de fosforilación por GSK-3. La región central numerada del 1-12 representa las repeticiones armadillo.

La célula posee dos mecanismos moleculares que regulan la actividad transcripcional de β -catenina: su estabilidad y su distribución intracelular. El grupo de Birchmeier demostró que este switch está modulado por la fosforilación en la tirosina 142 de β -catenina, lo cual favorece su interacción con el producto del proto-oncogene Bcl9-2 y evita su interacción con α -catenina, lo cual promueve su translocación al núcleo celular (Brembeck, et al. 2004). De acuerdo con esto, se ha reportado que ocurre fosforilación de la β -catenina en residuos de tirosina como resultado del tratamiento de las células con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo cual provoca su disociación de las uniones adherentes y su posterior transferencia al citosol, y posteriormente al núcleo (Hazan y Norton, 1998).

1.4 Las vías no canónicas de Wnt.

Un aspecto menos conocido de la vía Wnt resulta de la observación de que ciertos ligandos Wnt y receptores Frizzled son capaces de activar rutas de señalización independientes de la actividad de β -catenina que en su conjunto, han sido descritas como vías no canónicas de Wnt. La vía no canónica es transducida a través de algunos receptores de la familia Frizzled y/o los receptores con actividad de tirosina cinasa Ror1/2 y Ryk (Lu, et al. 2004a; Behrens, 2013). En mamíferos los ligandos Wnt suelen dividirse en dos categorías definidas por su habilidad de transducir señales dependiendo o no de β -catenina. Los ligandos Wnt 1 y 3 activan por lo general la vía canónica, mientras que los ligandos Wnt 4, 5a y 11 actúan

mediante la activación de vías no canónicas (Veeman, et al. 2003; Khon y Moon, 2005; Jessen, 2009). Las cascadas moleculares de señalización de las rutas no canónicas son diversas e incluyen la vía de la Polaridad Celular Planar (PCP), la vía Wnt/Ca⁺⁺, la vía Wnt/PKC atípicas entre otras (Khul, et al. 2000; Khon y Moon, 2005; Wolf, et al. 2008). El enorme número de posibles interacciones entre ligandos Wnt, receptores y efectores río abajo, ha incrementado la complejidad de esta vía de señalización y se ha descrito que regulan procesos clave durante la embriogénesis como los movimientos de extensión convergentes durante la gastrulación, el reordenamiento del citoesqueleto de actina, el establecimiento de la polaridad celular y recientemente, se han asociado con la regulación de procesos de invasividad y metástasis de procesos tumorales (Lee, et al. 2004; Dissanayake, et al. 2007; Van Amerongen y Nusse, 2009; Kho, et al. 2010) La vía PCP descrita con mayor detalle en *Drosophila* es responsable del establecimiento de la polaridad celular durante el desarrollo embrionario de estos organismos. A diferencia de la ruta canónica, la vía PCP requiere dos complejos multiproteicos presentes en células vecinas. Durante la polarización celular, los complejos PCP se encuentran en lados opuestos de la célula; el complejo distal, está formado por el receptor Frizzled, Dsh (Dvl en mamíferos) y Diego (Diversina en mamíferos), mientras que el complejo Strabismus/Van Gogh (Vang) - prickle (Pk) se encuentra en el lado proximal. Ambos complejos contienen además el receptor parecido a cadherinas flamingo (Celsr en mamíferos) el cual se encarga de unir directamente los complejos distales y proximales de células adyacentes a través de interacciones trans-homofílicas. La interacción entre Frizzled de la célula señalizadora y Vang en la célula receptora desencadena la distribución asimétrica de ambos complejos en la célula receptora. La célula receptora ahora polarizada se convierte en la célula señalizadora e induce la polarización de la célula adyacente. Los ligandos Wnt pueden desencadenar la vía PCP para regular aspectos clave como migración celular, crecimiento axonal, sinaptogénesis entre otros, mediante la regulación de los citoesqueletos de actina y microtúbulos. De esta manera, los ligandos no canónicos activan la ruta PCP mediante el reclutamiento de las proteínas Dvl y Dgo al extremo citoplásmico del receptor Frizzled. Dgo a su vez activa Dvl por la inhibición de la interacción del complejo Pk-Vang con Dishevelled. Daam 1, una proteína de andamiaje, une Dvl con RhoA lo cual ocasiona la formación de fibras de estrés de actina. Se ha descrito que

Dvl también activa Rac1 promoviendo la formación de lamelipodios de actina y activación transcripcional mediada por c-jun. La activación de Rac1, Cdc-42 y JNK también promueve la estabilización de microtúbulos (Lu, et al. 2004b; Simons y Mlodzic, 2008; Kho, et al. 2010; Andre, et al. 2012; Gao, 2012).

Por otra parte, estudios realizados en embriones de pez cebra, demostraron que la inyección de RNAm de Wnt 5a y Wnt 11 o la sobreexpresión de Fz2 provocaban flujos de Ca^{++} intracelular; estudios más detallados han demostrado que la interacción de algunos ligandos Wnt como el 4, 5a y 11, en combinación con el receptor Frizzled y el co-receptor parecido a receptores de tirosina cinasa Ror 2 transducen la señal vía proteínas G heterotriméricas produciendo IP_3 con la subsecuente movilización de calcio intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C (Sheldahl, et al. 1999). El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la producción de diacilglicerol por esta vía denominada Wnt/ Ca^{2+} , lleva a la activación de proteínas dependientes de estos mensajeros como la cinasa dependiente de Calcio y calmodulina II (CAMKII) y miembros de la familia de la PKC; las cinasas de tipo Nemo (NLK) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) son las moléculas efectoras de esta vía de señalización dependientes de Ca^{2+} (Jonsson, et al. 1998; Khul, et al. 2001; Ishitari, et al. 2003; Oishi, et al. 2003). Esta serie de evidencias llevó a la descripción de la vía no canónica denominada Wnt/ Ca^{++} (Khon y Moon, 2005).

La PKC es una familia de cinasas de serina/treonina que regulan una amplia variedad de funciones celulares entre ellas proliferación, apoptosis, sobrevivencia y migración celular entre otras; existe además una importante evidencia experimental que relaciona la desregulación de la actividad de PKC con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Ohno, et al. 2002; Newton, 2003; Griner y Kazanietz, 2007; Fields, et al. 2009).

Se han descrito 9 genes que codifican para 10 isoenzimas de PKC clasificadas de acuerdo a criterios estructurales y de activación. Se han categorizado en tres subclases: Proteínas Cinasas C clásicas (α , βI , βII y γ) las cuales poseen una región de unión a Ca^{2+} (C2) y un dominio doble de dedos Zn (C1A y C1B) responsables de que estas isoformas respondan a diacilglicerol (DAG); las PKC nuevas (δ , ϵ , η y θ) no contienen una región C2 clásica pues

carece de los residuos aspártico necesarios para la unión de Ca^{2+} en su región regulatoria y, por tanto, no responden a Ca^{2+} ; y las PKC atípicas ζ y ι/λ que pueden ser reguladas por 3-fosfoinosítidos, por fosforilación dependiente de PDK1 y a través de interacciones específicas proteína-proteína mediadas por su dominio PB-1 (Newton, 2003; Parker y Murray-Rust, 2004; Griner y Kazanietz, 2007).

El mecanismo de activación de PKC ha sido ampliamente estudiado. El aumento en la cantidad de DAG en la membrana plasmática desencadena la relocalización intracelular y activación de las isoformas nuevas y convencionales de PKC; la aparición de DAG ocurre por la activación de fosfolipasa C vía receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa o por receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El aumento de DAG resulta en la redistribución de las isoformas de PKC hacia la membrana a través de su dominio duplicado de 50 aminoácidos C1 (C1A y C1B). En la membrana, PKC sufre modificaciones conformacionales donde expone los sitios de unión para los distintos sustratos y proteínas de andamiaje. Evidencia reciente ha demostrado que la PKC experimenta una serie de transfosforilaciones y autofosforilaciones, requeridas para su maduración, activación y estabilidad (Newton, 2003). Aunque la unión del DAG con los dominios C1 de PKC se ha tomado como el evento inicial para su activación, esto no explica plenamente las muy diversas localizaciones intracelulares de esta proteína; por ejemplo, ciertas isoformas de PKC pueden relocalizar al núcleo, o a organelos tales como Aparato de Golgi o mitocondria en respuesta a ésteres de forbol (análogos farmacológicos del DAG) o activación de receptores. Además muchas acciones mediadas por PKC no dependen necesariamente de la activación alostérica por DAG. De este modo, aunque es claro que la redistribución de la PKC es clave para su activación y la selección apropiada de los sustratos celulares, el mecanismo exacto de su relocalización y activación aún no es completamente comprendido.

Las isoformas atípicas de PKC (PKC ζ y PKC ι) parecen formar un tema aparte dentro de la familia de estas proteínas. Aunque poseen un dominio catalítico modestamente parecido a las otras isoformas de PKC, su dominio regulatorio es considerablemente distinto, lo cual sugiere que los mecanismos clásicos de activación de otras isoformas de PKC no son utilizados por las isoformas atípicas. Su porción regulatoria carece del dominio C2 y posee un dominio C1 modificado el cual únicamente posee un dedo de Zn por lo que su actividad regulatoria no

depende de DAG o de cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Por el contrario, en su porción N-terminal presenta un dominio PB1 (Phox Bem-1) que reconoce motivos OPCA (OPR/PCD/AID) de otras proteínas tales como PAR-6, ZIP/p62 y MEK-5. Muy poco se conoce acerca de sus mecanismos de activación; recientemente, se ha descrito que las isoformas atípicas de PKC son también activadas por componentes lipídicos, como los 3-fosfatidil inositoles, ácido fosfatídico, ácido araquidónico y ceramidas. (Moscat y Diaz-Meco, 2000; Hirai y Chida, 2003; Moscat, et al. 2006). De estos, el fosfatidil inositol trifosfato (PIP3) parece tener una función relevante durante la activación de PKC atípicas. Efectivamente, se ha reportado que un aumento en los niveles de PIP3 intracelular estimula la autofosforilación de la PKC ζ purificada de riñón de bovino. Estos hallazgos sugieren que las isoformas atípicas están reguladas por la actividad de la PI3K la cual produce PIP3 a partir de PI 4,5 bifosfato. Esto se comprobó en células 3Y1 donde se observó que la sobreexpresión de la subunidad p110 de PI3K aumenta la actividad de las formas atípicas de PKC (Akimoto, et al. 1996). Aunque se conoce muy poco acerca del mecanismo exacto de regulación y acción de estas isoformas, se tiene evidencia de que su participación es fundamental durante la activación de vías de señalización involucradas en proliferación y sobrevivencia celular como las vías de Ras, TNF α , AP-1 y NF- κ B (Akimoto, et al. 1996; Moscat y Diaz-Meco, 2000; Hirai y Chida, 2003; Moscat, et al. 2006; Fields, et al. 2007; Fields y Regala, 2007)

1.5 PKC y Tumorigénesis.

Inicialmente, la PKC fue relacionada con la propensión y desarrollo de carcinogénesis en piel sin embargo, estudios diversos en células normales y de varios tipos de cáncer han confirmado la importante participación de la PKC durante la transformación maligna. Más adelante fue descrita la participación compartida de PKC con diversos oncogenes como Fos y Myc colocando a la PKC en el centro de las vías de señalización relacionadas con cáncer (Griner y Kazanietz, 2007).

Se han reportado cambios específicos y reproducibles en los patrones de expresión de las isozimas de PKC en varios tipos de transformaciones tumorales, entre ellos los carcinomas de colon. Efectivamente, en el cáncer de colon, PKC β II parece estar sobreexpresada en etapas

tempranas, mientras que la expresión de las isoformas α y β I parecen decrecer en etapas tardías del desarrollo tumoral (Gokmen-Polar, et al. 2001) De la misma forma, el producto del gen *wnt 5a* parece estar sobre- expresado por la activación de PKC y disminuido por su inhibición, lo cual sugiere una posible convergencia de la señalización por Wnt y PKC durante el desarrollo de procesos cancerosos (Jonsson, et al. 1998). Sin embargo, la convergencia de señalización de la PKC y la ruta Wnt no está bien establecida. Esta relación fue sugerida originalmente por la observación de que la PKC puede, bajo ciertas circunstancias, fosforilar e inactivar a la GSK-3 β . En un estudio realizado en fibroblastos se demostró que la inactivación de la GSK-3 β por ligandos Wnt es sensible a inhibición por PKC (Cook, et al. 1996). También se ha demostrado que PKC fosforila directamente los residuos Ser33/Ser37/Ser45 de β -catenina y que el abatimiento de PKC α por RNA de interferencia previene la fosforilación de estos residuos en ella y su degradación vía proteosoma, sugiriendo que PKC regula negativamente los niveles de β -catenina (Gwak, et al. 2006).

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 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. La co-expresión de varias isoformas en un mismo tejido, el modo de regulación distinto y la falta de inhibidores específicos para cada isoforma, son probablemente las causas principales de las fallas obtenidas. En el presente 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 colorectales, el discernir los puntos de convergencia en su señalización podrían utilizarse en el diseño de fármacos más efectivos para el tratamiento de este padecimiento.

2. ANTECEDENTES

Utilizando líneas celulares de colon humano, en nuestro laboratorio hemos encontrado, al igual que otros autores, cambios de expresión significativos en las isoformas de PKC en las células tumorales de colon con respecto a las normales (no malignas), ya que mientras las células normales expresan mayoritariamente las isoformas α , β I y δ de PKC, las líneas celulares malignas sobre-expresan las isoformas β II, ϵ , μ y ζ , y las isoformas α , β I y δ disminuyen o dejan de expresarse en relación a las células normales.

De modo interesante, durante el trabajo de tesis de Maestría, demostramos por medio de co-inmunoprecipitación recíproca y microscopia confocal la interacción *in vivo* de la isoforma atípica ζ de PKC con proteínas reguladoras clave de la ruta Wnt canónica GSK-3 y β -catenina. Además, por ensayos de inmunofluorescencia, observamos que esta interacción tiene una localización intracelular distinta en células cancerosas con respecto a las normales. En el presente proyecto de Doctorado nos enfocamos a estudiar la relevancia funcional de estos hallazgos y para ello se planteó el siguiente:

3. OBJETIVO GENERAL:

Investigar cuáles son las consecuencias funcionales de la interacción de PKC ζ con la proteína de la ruta Wnt canónica β -catenina en líneas celulares normales y malignas de colon.

HIPÓTESIS:

El bloqueo de la expresión y/o actividad de PKC ζ afectará la activación de la ruta Wnt canónica y por tanto la actividad transcripcional mediada por β -catenina; este bloqueo producirá cambios en el fenotipo maligno de células epiteliales de colon en cultivo.

3.1 Objetivos específicos

3.1 Examinar los efectos de la inhibición farmacológica de PKC ζ en células normales y malignas de colon mediante inhibidores isozima-específico en cuanto a los siguientes parámetros:

- a) Actividad transcripcional de β -catenina, mediante el sistema reportero TOPFlash.
- b) Proliferación celular, mediante la reducción de MTT.
- c) Expresión de proteínas blanco de la ruta Wnt (c-myc y ciclina D1)
- d) Actividad tumorigénica de células trasplantadas a ratones inmunocomprometidos

En el caso de las células RKO, se examinarán estos efectos en condiciones basales y en condiciones en las que se estimule la ruta Wnt canónica y no-canónica.

3.1.2 Corroborar resultados con experimentos de “knockdown” de PKC ζ mediante siRNA y utilizando una forma dominante negativa de PKC ζ .

3.1.3 Investigar el mecanismo molecular por el cual PKC ζ modula la actividad transcripcional de β -catenina.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material biológico.

Se utilizaron las líneas celulares no tumorales de intestino IEC-18 (rata) y 112CoN (humano) así como las RKO y las SW480 (carcinomas de colon humano), adquiridas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, E.U.). Las células RKO expresan la proteína APC silvestre y tienen la ruta Wnt normal, mientras que las SW480 expresan sólo formas truncadas de APC y tienen constitutivamente activa la ruta Wnt. Las células RKO se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Las células IEC-18 se suplementaron con 4.5 g/L de glucosa y 0.1 unidades/mL de insulina. Las células SW480 se mantuvieron en medio DMEM F-12 suplementado con 5% de suero fetal, antibióticos y glutamina. Todas las células se mantuvieron a una temperatura de 37° en una atmósfera de 95% aire 5% CO₂.

4.2 Plásmidos

Los plásmidos reporteros pTOPFlash y pFOPFlash se obtuvieron de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Los plásmidos que codifican la forma dominante negativa de PKC ζ (Flag.PKCzeta.K/W, Addgene 10800) y para la mutante resistente a degradación de β -catenina (pcDNA3-S33Y beta-catenin, Addgene 19286) se obtuvieron de Addgene, una organización sin afán de lucro dedicada a facilitar el intercambio de plásmidos entre los científicos. El plásmido que codifica para β -catenina humana (CTNNB1) se obtuvo de OriGene (catálogo No. SC107921). Para los experimentos de “knockdown” de PKC ζ usamos el plásmido pSUPER.PKCzeta.RNAi el cual fue donado por el Dr. Alex Toker a Addgene (Addgene plasmid 10803) y cuya construcción y efectividad están reportadas (Storz, et al. 2004).

4.3 Transfecciones y ensayo de Luciferasa.

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Carlsbad, Ca) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se sembraron $3.8, 1.5$ y 3.5×10^5 células RKO, IEC-18 y SW480 respectivamente en placas de 12 pozos. Las células se colocaron en un medio libre de suero y transfectadas con $0.7 \mu\text{g}$ del reportero TOPFlash (plásmido reportero que lleva los sitios de unión para β -catenina-TCF) o FOPFlash (el mismo reportero pero con los sitios de unión a TCF mutados) más $0.075 \mu\text{g}$ de Renilla luciferasa como control de transfección. 6 horas después de la transfección las células se colocaron en medio normal durante 8 horas más. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y lisadas 15 minutos a temperatura ambiente; los lisados se clarificaron por centrifugación a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se utilizaron $10 \mu\text{l}$ de cada lisado para medir la expresión del gen reportero de luciferasa (Luciferasas Assay Kit Promega). La actividad fue normalizada con la actividad de Renilla luciferasa o por la cantidad de proteína presente en el lisado. Todos los experimentos se realizaron por duplicado al menos 3 ocasiones.

4.4 Ensayos de activación por Wnt 3a e inhibición de PKC ζ .

Para los ensayos de inhibición de PKC ζ en células SW480, se sembraron 1.2×10^5 células en placas de 24 pozos toda la noche. Las células se transfectaron con $0.5 \mu\text{g}$ de los plásmidos reporteros TOPFlash y FOPflash durante 6 horas en un medio sin suero; transcurrido el tiempo de incubación, las células se colocaron en medio normal durante 8 horas para su recuperación. Transcurrido este tiempo las células se trataron con $10\text{-}100 \mu\text{M}$ de un péptido inhibidor miristoilado de PKC ζ , que contiene la secuencia pseudosustrato Myr-PKC ζ -PS, Myr-SIYRRGARRWRKL-OH (Calbiochem) durante 1 hora. Las células se lisaron y se midió la actividad de luciferasa. Los resultados se estandarizaron con la cantidad de proteína del lisado.

Para los ensayos de activación de la vía Wnt por ligando Wnt-3a y posterior inhibición de PKC ζ , se sembraron 1.2×10^5 células RKO en cajas de 24 pozos y se dejaron crecer toda la

noche. Posteriormente, las células fueron colocadas en medio reducido en suero (2%) al menos 6 horas y se añadió 100 ng/mL de Wnt 3a purificado (Chemicon) durante 12 horas; los ensayos de inhibición se realizaron en dos grupos: 1) Las células RKO se preincubaron durante tres horas con el inhibidor de PKC ζ antes de añadir el ligando Wnt-3a (15 horas de incubación total) y 2) las células se incubaron con el inhibidor de PKC ζ durante las 3 últimas horas de incubación con el ligando Wnt-3a (3 horas de incubación); las células entonces se lisaron y se cuantificó la actividad del gen reportero. Los resultados se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína del lisado y los resultados se expresaron como aumento en la actividad del reportero.

4.5 Ensayos de RNAi y dominante negativa de PKC ζ .

Se sembraron 1.5 y 1.8×10^5 células SW480 y RKO respectivamente. 24 horas después las células se co-transfectaron con $0.5 \mu\text{g}$ de plásmido TOPFlash o FOPFlash, $0.005 \mu\text{g}$ de renilla y de 0.5 a $2 \mu\text{g}$ del plásmido pSuper.PKCz.RNAi (Addgene); en todos los pozos se mantuvo constante la cantidad total de DNA en $2 \mu\text{g}$ los cuales se complementaban con el plásmido control pSuper que carece de la secuencia de RNAi. Las células se cosecharon 12, 24, 36 y 42 horas posteriores a la transfección y se determinó la actividad de luciferasa. Del mismo extracto se obtuvo una alícuota para la determinación de proteína y elaboración de un Western Blot para verificar la cantidad de PKC ζ presente en el extracto.

A fin de tener un criterio adicional para evaluar la participación de la PKC ζ en la actividad transcripcional de β -catenina, se utilizó un plásmido de expresión de una forma dominante negativa de la proteína donde se sustituye el residuo 281 de Lisina indispensable en el dominio catalítico de la proteína por un residuo de Tiptofano (K281/W), adquirido de Addgene. Las células se co-transfectaron de igual forma que con el plásmido pSuper.PKCz.RNAi y se lisaron los extractos a las 24, 36 y 42 horas post-transfección. Se determinó la actividad del gen reportero de luciferasa y se normalizó por la cantidad de proteína presente en el extracto. Adicionalmente se realizó un Western Blot con un anticuerpo Anti Flag (SIGMA) para determinar la expresión de la proteína K/W en las células.

Para generar transfectantes estables con el RNAi de PKC ζ , las células SW480 se co-transfectaron con 900 nanogramos del plásmido pSuperPKCRNAi y 100 nanogramos del plásmido pSuperPuro o con 1 μ g de plásmido pSuper como control. Las transfectantes estables fueron seleccionadas con 3 μ g/mL de Puomicina por 4 semanas. Las clonas que exhibieron la mejor eficiencia de knockdown (la menor expresión de PKC ζ) fueron seleccionadas por citometría de flujo.

4.6 Ensayo de proliferación celular por reducción de MTT. 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazolio bromide

Este método se basa en la habilidad de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolio (MTT) en su sal de formazan, un compuesto insoluble en agua de color morado, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Se sembraron 1.2×10^5 células SW480 en cajas de 24 pozos en medio completo toda la noche. Posteriormente, se les añadió 20 μ M de inhibidor de PKC ζ durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se les añadió la solución de MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y las células se incubaron a 37 grados durante 3 horas; la reacción se detuvo añadiendo 1 mL de isopropanol ácido en cada pozo y las sales de formazán se disolvieron agitando la placa levemente durante 10 minutos. La solución se cuantificó por espectrofotometría leyendo a una absorbancia a 570 nm.

4.7 Análisis por Inmuno Blot.

Para ensayos de western blot la células se lisaron en buffer de homogenización (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM pH 7.5 Tritón X-100 0.5% e inhibidores de proteasas). Los lisados se clarificaron por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se obtuvo una alícuota para la determinación de proteína; ésta se realizó por el método de Bradford con reactivo comercial adquirido de Bio-Rad. El resto del homogenado se diluyó con buffer de muestra Laemmli y se guardó a 4 °C. La extracción de proteínas nucleares se realizó mediante el kit comercial adquirido de Sigma siguiendo el protocolo

sugerido. Cantidades iguales de proteína (50-75 μg) se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (7.5-10% SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon toda la noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente con leche libre de grasa adquirida de Bio-Rad; la incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C o durante 3 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón o de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Las membranas se lavaron nuevamente y se revelaron por quimioluminiscencia (mediante el kit comercial de Supersignal de Pierce). La intensidad de las señales se analizó por densitometría mediante un programa adquirido de Bio-Rad (Quantity one). Los datos de por lo menos tres experimentos independientes se compararon estadísticamente mediante por una t de student tomando como valores significativos una $p < 0.05$.

4.8 Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia, se sembraron 2.6×10^5 células SW480 en pequeños cubre-objetos colocados en placas de 24 pozos durante 24 horas. Las células fueron incubadas con vehículo o con el inhibidor de PKC ζ (20 μM) en presencia o ausencia de Leptomicina B (10 ng/mL) durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron 3 veces en PBS frío y se fijaron en metanol absoluto a -20 °C por 10 minutos. Las células se lavaron en PBS y se permeabilizaron en una solución de Tritón X-100 al 0.1% durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se bloquearon en una solución de albúmina al 1% durante 1 hora. Posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo primario (β -catenina Sta Cruz Biotechnology) durante toda la noche. Al día siguiente las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a rodamina (Jackson Immunoresearch). Se montaron las monocapas con amplificador de fluorescencia (antifade Vectashield), y se examinó la fluorescencia por microscopía confocal.

4.9 Cuantificación de β -catenina nuclear por citometría de flujo (FACS)

Para la tinción de FACS, células SW480 en suspensión se trataron con 20 μ M del inhibidor de PKC ζ en presencia o ausencia de leptomicina B durante una hora. Se realizó a continuación un fraccionamiento celular para obtener núcleos mediante un kit comercial adquirido de Sigma-Aldrich de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los núcleos obtenidos y una población de células se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS por 20 minutos en frío; a continuación se permeabilizaron en una solución de tritón X-100 al 0.1% en una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Las muestras así obtenidas se bloquearon en una solución de suero fetal bovino al 4% en PBS durante 15 minutos en frío. Finalmente las células se incubaron con el anticuerpo primario (β -catenina Sta Cruz Biotechnology 1:50 en PBS) durante 15 minutos, y con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100) por la misma cantidad de tiempo. Las muestras se analizaron detectando los niveles de FITC en el canal FL1 (BD FACScalibur).

4.10 Xenotransplante de células en ratones inmunocomprometidos.

Para evaluar el efecto de la inhibición de PKC ζ en la formación de tumores *in vivo* (actividad tumorigénica) se utilizaron ratones desnudos CD1 de 8 semanas los cuales fueron inoculados con 7.5×10^5 células SW480 por sitio de inyección, transfectadas de manera estable con el plásmido pSUPER control (expresión normal de PKC ζ) o con el plásmido pSUPERPKC ζ RNAi. Las células inyectadas se resuspendieron en Matrigel (BD Biociencias Sta Barbara California) diluido al 50% en PBS. Cada ratón fue inyectado en el lado izquierdo con células pSUPERPKC ζ RNAi y en el lado derecho con células con el plásmido control. Luego de tres semanas los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron removidos y pesados.

4.11 Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm SEM (error estandar del promedio). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student o en el caso de análisis múltiple se utilizó ANOVA de una vía. Los valores con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS.

5.1 PKC ζ interacciona de manera específica *in vivo* con β -catenina principalmente en líneas celulares tumorales de colon.

En la primera etapa del desarrollo del proyecto realizada durante la Maestría, encontramos que existen cambios de expresión en proteínas de la ruta Wnt así como en las distintas isoformas de PKC entre el estado normal (no maligno) y el estado canceroso de líneas celulares de colon humano. De manera interesante, PKC ζ se sobre-expresa en células malignas con respecto a las normales (Figura 1). Mediante estudios de co-inmunoprecipitación recíproca demostramos la interacción específica de β -catenina con la isoforma ζ de PKC (Figura 2) y corroboramos esta interacción con su co-localización por ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal (Figura 3). Estos resultados fueron los antecedentes experimentales que nos llevaron a investigar cuál era la relevancia funcional de esta interacción.

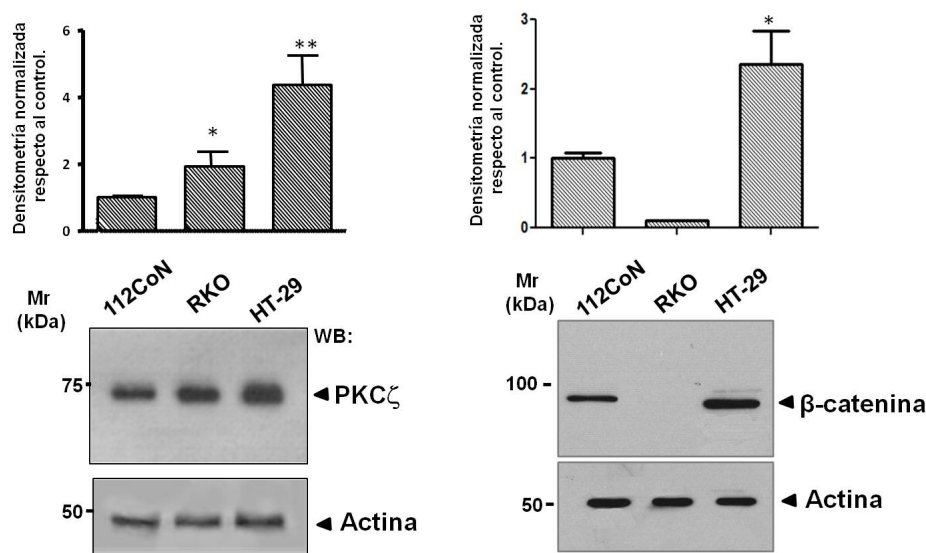


Figura 1. Análisis de la expresión de PKC ζ en las líneas celulares normales y tumorales de colon. Extractos celulares de células control (112CoN) y tumorales (RKO y HT-29) se corrieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (10%) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El ensayo de inmunoblot se realizó con

un anticuerpo contra PKC ζ o β -catenina y revelado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano. Se realizó un análisis de densitometría para evaluar los cambios en la expresión de la PKC ζ y β -catenina con respecto al control de carga (Actina). En la gráfica se muestra la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. La figura muestra la imagen representativa de los geles. * $p < 0.5$ y ** $p < 0.01$.

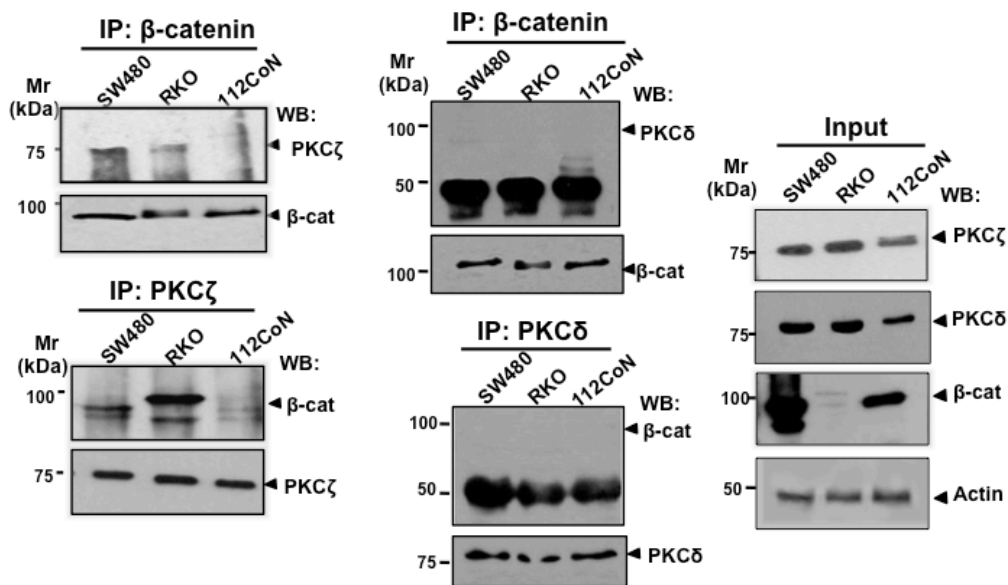


Figura 2. PKC ζ y β -catenina co-inmunoprecipitan de manera recíproca en células tumorales de colon (SW480 y RKO). La PKC ζ o β -catenina fueron inmunoprecipitadas de extractos celulares de líneas tumorales (SW480 y RKO) y normales (112CoN) de colon. Los inmunoprecipitados fueron analizados por Western Blot contra las proteínas indicadas en cada figura. La interacción de PKC ζ y β -catenina es específica dado que no interacciona con otras isoformas de PKC (δ). La figura muestra la imagen representativa de al menos tres experimentos independientes.

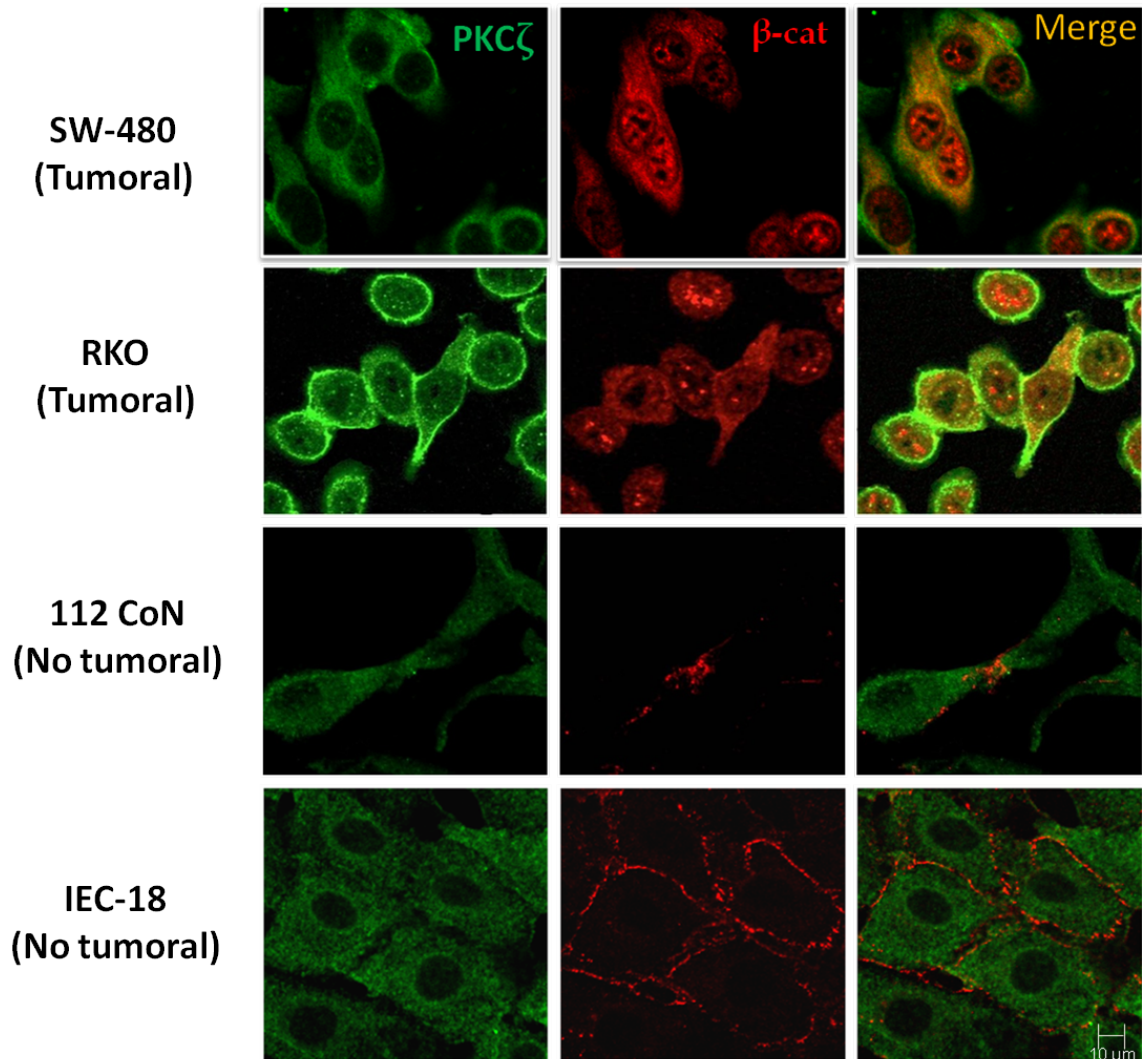


Figura 3. PKC ζ co-localiza con β -catenina solamente en células malignas. Líneas celulares tumorales (SW480 y RKO) y no tumorales de colon (112CoN) y la línea celular no tumoral de íleon de rata (IEC-18) fueron fijadas en metanol, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos anti β -catenina y PKC ζ . Las células se tiñeron con anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína (FITC-PKC ζ) y Rodamina (TRITC- β -catenina) y visualizadas por microscopia confocal laser (Leica). La figura muestra la imagen representativa de al menos tres experimentos independientes.

5.2 En condiciones basales, las células SW480 poseen una elevada actividad transcripcional mediada por β -catenina. Las células RKO poseen una actividad basal baja que es estimulada por ligando Wnt 3a.

Con el fin de analizar la actividad transcripcional basal de la ruta Wnt en nuestras condiciones de laboratorio, se hicieron ensayos de gen reportero con un plásmido que codifica para el gen de luciferasa bajo el control de una secuencia promotora que posee los sitios consenso de unión a los factores TCF/ β -catenina (TOPFlash); como control, se utilizó el mismo plásmido pero con las secuencias de unión mutadas (FOPFlash). Como se observa en la figura 4, la actividad transcripcional basal de las células IEC-18 (no malignas) y RKO (malignas, con APC y ruta Wnt normales) es considerablemente menor a la observada en las células malignas SW480, que expresan sólo formas truncadas de APC.

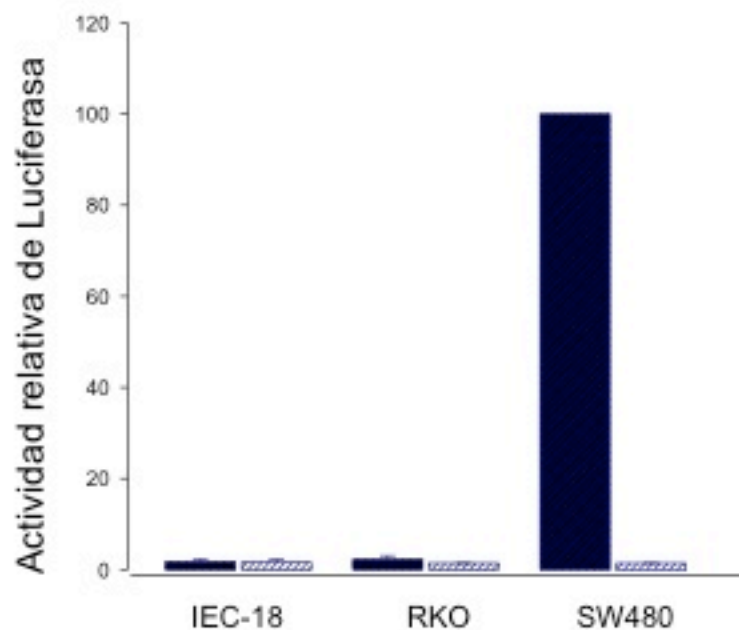




Figura 4. Actividad transcripcional basal de la vía Wnt en líneas celulares SW480, IEC-18 y RKO. Las células fueron co-transfectadas con los plásmidos TOP FLASH  o FOP FLASH  y Renilla lucifererasa. 24 horas después, las células se lisaron y se midió la actividad de luciferasa ajustando los valores con la actividad de Renilla Luciferasa o con la cantidad de proteína de las muestras. Los resultados muestran la Media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes.

La alta actividad transcripcional basal en las células SW480 resulta un modelo idóneo para investigar la posible modulación de la PKC en la vía Wnt. En el caso de las células RKO, dada la poca actividad basal de la ruta Wnt en estas células, decidimos probar si la actividad transcripcional mediada por β -catenina podía ser estimulada con ligando canónico Wnt3a o con ligando no canónico Wnt 5a. Como se observa en la figura 5, las células RKO respondieron al ligando canónico típico Wnt3a incrementando considerablemente su actividad transcripcional con respecto a las células tratadas solamente con el vehículo. El tratamiento con el ligando Wnt5a no afectó la actividad mediada por β -catenina.

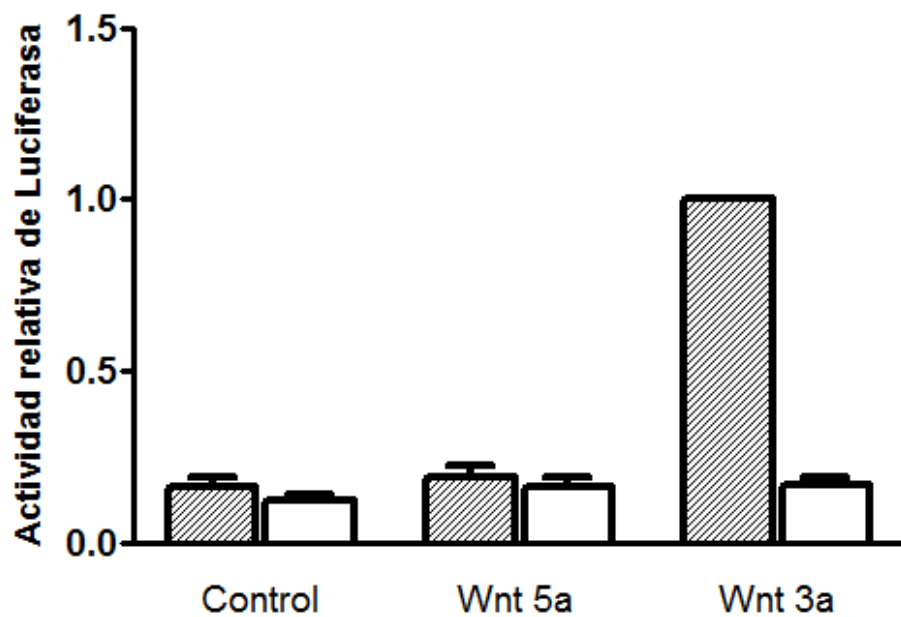




Figura 5. Activación de ruta Wnt por ligandos en células RKO. Las células RKO fueron co-transfectadas con los reporteros TOP FLASH  o FOP FLASH  y con Renilla Luciferasa durante 24 horas. Posteriormente las células permanecieron en ayuno (1% Suero Fetal Bovino) durante 8 horas y se incubaron en presencia o en ausencia de ligandos Wnt3a o Wnt5a (100 ng/ml) durante 8 horas. La actividad de luciferasa fue normalizada con respecto a la actividad de Renilla Luciferasa o por la cantidad de proteína en cada muestra. Se muestra la media \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes.

5.3 La inhibición farmacológica de PKC ζ bloquea de manera dependiente de la dosis la actividad transcripcional mediada por β -catenina.

Para investigar si la isoforma ζ de PKC afecta la vía Wnt, analizamos el efecto de su inhibición en la actividad transcripcional mediada por β -catenina utilizando el reportero de luciferasa. Tratamos a las células SW480 con cantidades crecientes de un inhibidor específico de la PKC ζ y como se observa en la figura 6, la actividad transcripcional de éstas células disminuyó de modo dependiente de la dosis con el inhibidor de PKC ζ , lo cual sugiere que esta isoforma de PKC participa de algún modo en la regulación positiva de la vía Wnt.

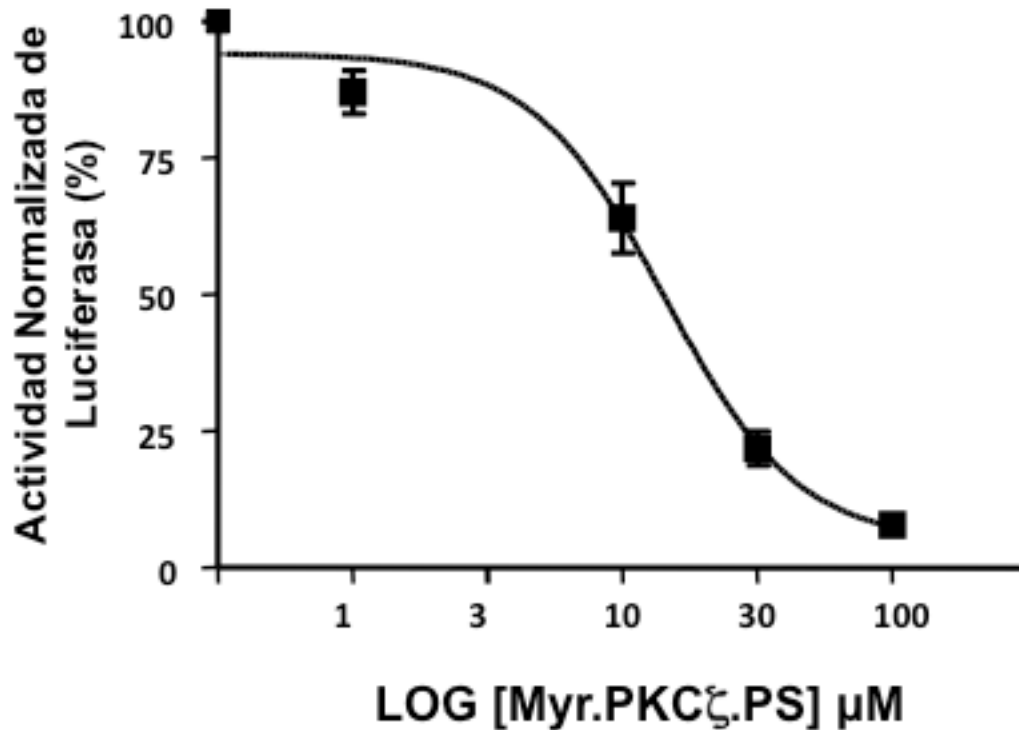


Figura 6. La actividad transcripcional constitutivamente activa de la vía Wnt en células SW480 es inhibida de modo dosis dependiente por un péptido inhibidor miristoilado de PKC ζ (Myr.PKC ζ .PS). Células SW480 fueron transfectadas con los plásmidos TOP FLASH y FOP FLASH. 24 horas después de la transfección las células fueron incubadas en presencia o en ausencia de un inhibidor selectivo de PKC ζ (10-100 μ M) y se realizó el ensayo de actividad de luciferasa. Esta actividad fue normalizada por la cantidad de proteína presente en cada muestra. Se muestra las medias \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes.

Debido a la baja actividad transcripcional de la vía Wnt en células RKO decidimos estimular estas células con ligandos Wnt 3a y después observar el efecto de la inhibición de PKC ζ . En la figura 7 se puede ver que las células respondieron al ligando canónico típico Wnt3a incrementando su actividad transcripcional cerca de 6 veces con respecto a las células tratadas solamente con el vehículo. De modo interesante, el aumento en la actividad transcripcional por el ligando Wnt 3a fue disminuido cerca del 80% al pre-incubar a las células con el inhibidor de PKC ζ . Estos resultados sugieren nuevamente que la PKC atípica modula positivamente la actividad de la vía Wnt canónica.

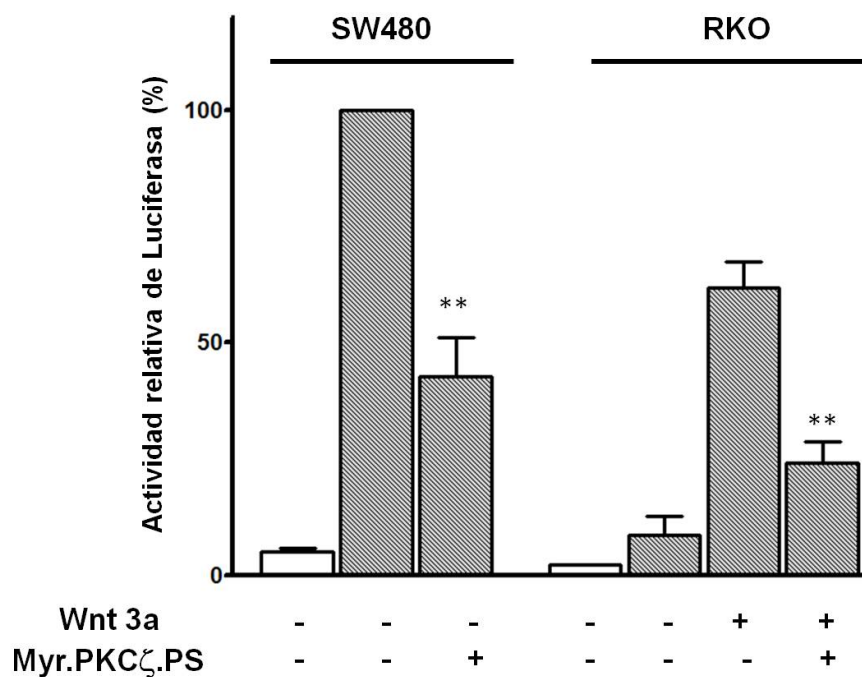




Figura 7. La inhibición de PKC ζ bloquea la actividad transcripcional basal (SW480) y estimulada por ligando Wnt 3a (RKO) de β -catenina. Células RKO y SW480 fueron transfectadas con los plásmidos pTOP

Flash  ó pFOP Flash  y con el plásmido de Renilla Luciferasa. 24 horas después de la transfección las células RKO fueron colocadas en ayuno (SFB 1%) y tratadas con 100 ng/ml del ligando purificado Wnt 3a durante 8 horas. En la última hora las células fueron tratadas con 20 μ g/mL del inhibidor pseudosustrato de PKC (Myr.PKC ζ .PS) o con el vehículo durante una hora. Las células SW480 únicamente se trataron con el inhibidor 24h posterior a la transfección durante una hora. Las células fueron lisadas, clarificadas y se determinó la actividad de los genes reporteros. La actividad fue normalizada con Renilla luciferasa o por la cantidad de proteína presente en cada muestra. Los experimentos muestran la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.5$ ** $p < 0.01$

5.4 El bloqueo de la expresión de PKC ζ mediante shRNAi afecta negativamente la actividad transcripcional de β -catenina de manera dependiente de la dosis.

Para verificar estos resultados, se hicieron experimentos de bloqueo de la expresión de la PKC ζ mediante knockdown transitorio con shRNAi. En la figura 8 se observa que la presencia del plásmido pSuperPKCZ.RNAi redujo la expresión de la PKC ζ en un 75% a las 36 horas post-transfección. La actividad transcripcional de la β -catenina disminuyó de modo dependiente de la concentración del plásmido utilizado pues la actividad del gen reportero disminuyó cerca de 20% cuando se transfectó 1 μ g de pSuper.PKC ζ .RNAi y cerca del 60% cuando se transfectaron 2 μ g del mismo plásmido (Figura 8). Estos resultados muestran con claridad una disminución significativa de la actividad Wnt cuando abatimos la expresión de la PKC ζ lo cual confirma nuestros resultados observados con la inhibición farmacológica de esta isoforma (Figura 6 y 7).

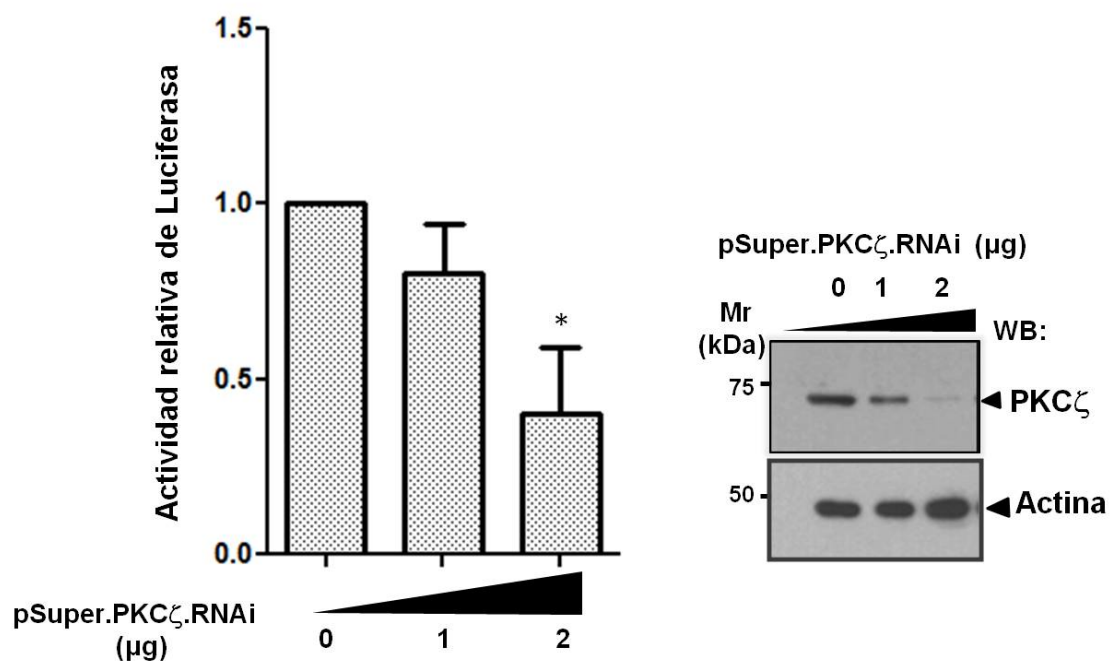


Figura 8. La inhibición de la expresión de la PKC ζ por RNAi disminuye la actividad transcripcional de β -catenina en células SW480. Las células SW480 se co-transfectaron con los plásmidos pTOPFlash o pFOPFlash y con 0, 1 y 2 μ g del plásmido que contiene el RNAi dirigido contra PKC ζ . Luego de 36 horas de transfección, las

células se lisaron y se midió los valores de luciferasa. La actividad fue normalizada con Renilla luciferasa o con la cantidad de proteína en la muestra. A la derecha se muestra un gel representativo de la inhibición de PKC ζ con el plásmido control, y el que contenía la secuencia RNAi específica para PKC ζ . La gráfica representa las medias \pm error estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

5.5 La actividad catalítica de PKC ζ es necesaria para modular positivamente la ruta Wnt canónica.

Para entender el mecanismo por el cual la PKC ζ participa en la ruta Wnt, decidimos examinar si es requerida su actividad catalítica. Para esto, utilizamos la expresión de una forma dominante negativa de PKC ζ , donde un residuo esencial de lisina de su sitio catalítico es mutado por un triptófano (PKC ζ K281/W). La expresión de esta forma dominante negativa, en células SW480, disminuyó la actividad transcripcional de β -catenina cerca del 40% a las 24 horas post-transfección (Figura 9). Este efecto también resultó ser dosis-dependiente dado que la transfección de 2 μ g del plásmido abatió la expresión del gen reportero en casi un 60%. Nuestros datos indican por tanto que la regulación de la ruta Wnt en células SW480 por PKC ζ requiere de su actividad catalítica (Figura 9).

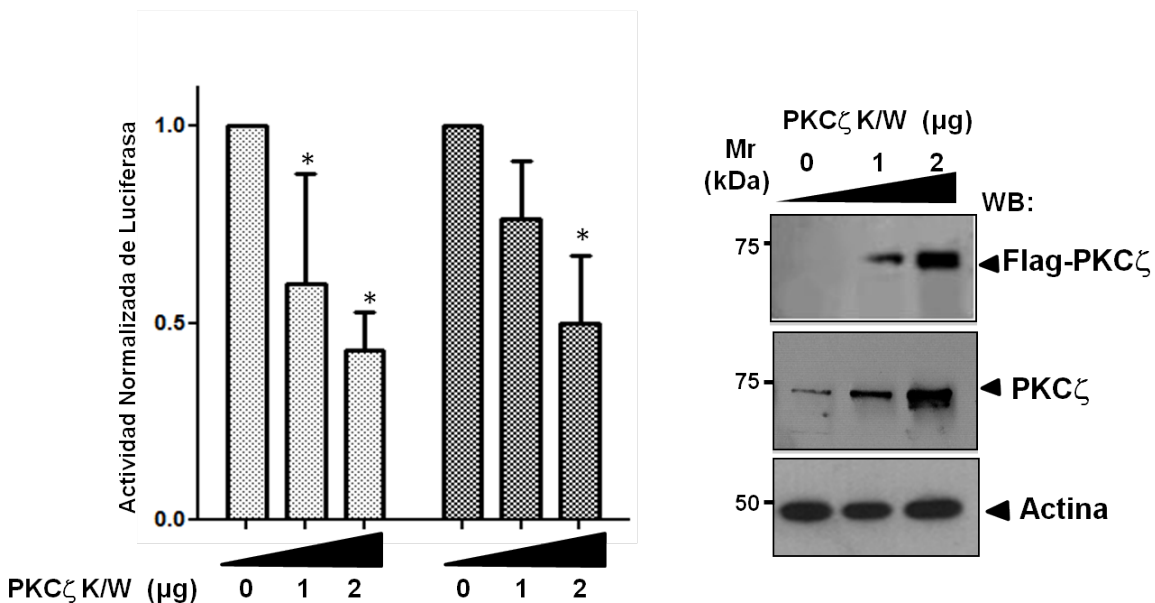


Figura 9. La expresión de una forma dominante negativa de PKC ζ disminuye la actividad transcripcional de β -catenina en la línea celular SW480. Las células SW480 se co-transfectaron con los

plásmidos pTOPFlash o pFOPFlash y con 0, 1 y 2 μg del plásmido que contiene una forma dominante negativa (K281/W) de PKC ζ . Luego de 24 o 36 horas de transfección las células se lisaron y se midieron los valores de luciferasa La actividad fue normalizada con Renilla luciferasa o con la cantidad de proteína en la muestra. A la derecha se muestra un gel representativo del aumento de la expresión de la forma dominante negativa comparada con la proteína endógena. La gráfica representa las medias \pm error estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

5.6 La inhibición de la PKC ζ inhibe la proliferación celular y la expresión del gen *c-myc*.

La vía Wnt participa activamente durante la proliferación celular. La inhibición de la PKC atípica afecta negativamente la ruta Wnt lo cual sugiere que puede afectar la actividad proliferativa de las células tumorales. Para comprobar esto, realizamos ensayos de proliferación (viabilidad celular) mediante la técnica de reducción de sales de tetrazolio en formazán o MTT. Como se muestra en la Figura 10, la adición de 20 μM del inhibidor específico de PKC ζ durante 24 horas disminuyó cerca del 60% la cantidad de células SW480 metabólicamente activas, como medida de índice de proliferación, comparadas con las células incubadas solamente con el vehículo. Estos resultados sugieren que la inhibición de la PKC atípica afecta la proliferación de las células normales a través de la inhibición de la vía Wnt.

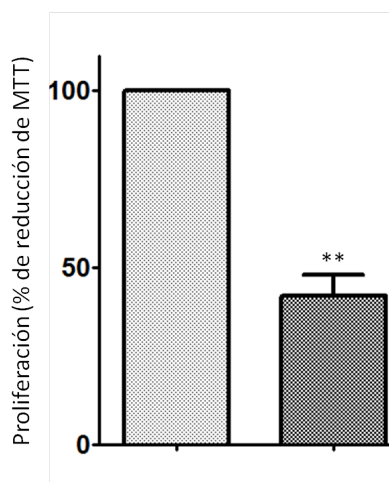




Figura 10. La inhibición de la proteína cinasa C ζ disminuye la capacidad proliferativa en células SW480.

Se crecieron células SW480 durante 24 horas en presencia  o ausencia (vehículo)  de 20 μM del inhibidor de PKC ζ (Myr.PKCz.PS). Posteriormente, las células fueron tratadas con 0.5 mg/ml (concentración final) de una

solución de MTT durante 3 horas a 37°C. La reacción se detuvo con etanol ácido y los extractos celulares se cuantificaron por espectrometría a 570 nm. Se muestra la media ± error estándar de al menos tres experimentos independientes. ** p < 0.01

Como ya se conoce, la vía Wnt estimula la proliferación celular mediante el incremento de la cantidad de proteínas blanco como *c-myc*. A fin de investigar si la inhibición de PKCζ afecta la proliferación celular mediante el abatimiento de este gen blanco de la vía Wnt, verificamos la cantidad de proteína y de RNA mensajero de *c-myc* en presencia o ausencia del inhibidor de PKCζ. Nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica de la PKCζ disminuyen la expresión del oncogen *c-myc* tanto a nivel de RNAm, (Figura 11 Derecha), como a nivel de proteína (Figura 11 Izquierda). No encontramos diferencias significativas con el gen de ciclina D1, lo cual sugiere que la inhibición de la proliferación de las células SW480 principalmente es ocasionado por la disminución de la expresión del oncogene *c-myc*.

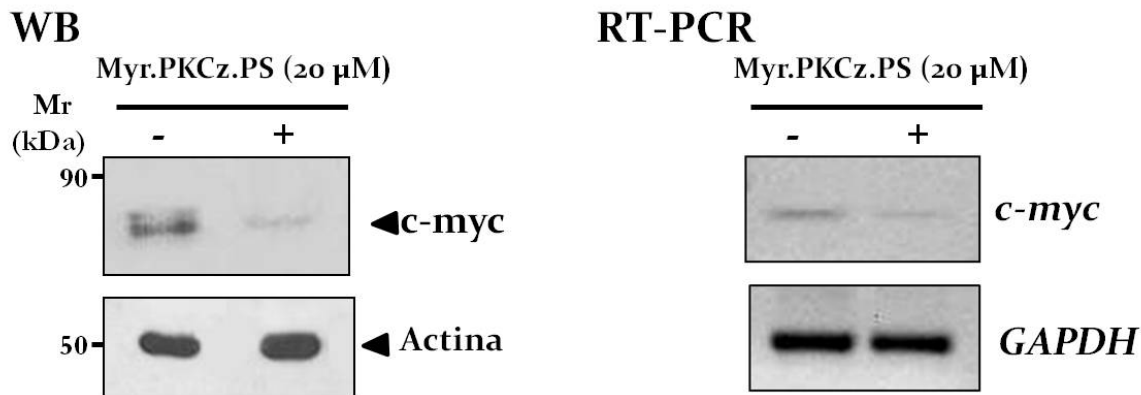


Figura 11. Los niveles de proteína y RNAm del gen blanco de β -catenina *c-myc* disminuyen cuando las células son tratadas con un inhibidor farmacológico específico de PKCζ. Se crecieron células SW480 en placas de 24 pozos en ausencia (vehículo) o presencia de 20 μ M del inhibidor de PKCζ (Myr.PKCz.PS) durante 6 horas. Los extractos celulares se prepararon para realizar la detección de proteína (WB) o RNAm (RT-PCR) del oncogene *c-myc*. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

5.7 El knockdown de PKC ζ disminuye la actividad tumorigénica de células SW480 en ratones inmunocomprometidos.

Para investigar si el bloqueo de la expresión de PKC ζ participa en la formación de tumores *in vivo*, utilizamos el modelo de xenotransplante de células a ratones inmunocomprometidos. Para esto se transfectaron de manera estable células SW480 con plásmido control pSUPER o con plásmido pSUPERPKC ζ -RNAi como se describe en Materiales y Métodos, y las transfectantes estables con una disminución de la expresión de PKC ζ mayor a 80% se seleccionaron y aislaron por citometría de flujo. En la figura 12, se observa una eficiencia de knockdown estable en más del 90% de las células. Estas células aisladas, se inyectaron subcutáneamente en el lado izquierdo de cada ratón (n=5) mientras que en el lado derecho, fueron inoculadas células transfectadas establemente con el plásmido control y por tanto expresaban la PKC ζ . Después de tres semanas, los animales se sacrificaron y los tumores fueron seccionados y pesados. De manera notable, todos los ratones produjeron tumores a partir de las células control inyectadas (figura 12, Lado derecho, con 28 mg de peso promedio) en el momento del sacrificio, mientras que las células carentes de PKC ζ inyectadas en los mismos animales no formaron tumores (figura 12, abajo, Lado izquierdo), con excepción de un solo animal, que produjo tumores en ambos flancos aunque de menor peso. Estos resultados indican que el bloqueo de la expresión de PKC ζ produce una actividad tumorigénica disminuida en los ratones transplantados, lo cual sugiere que esta proteína participa de manera importante en el crecimiento tumoral *in vivo*

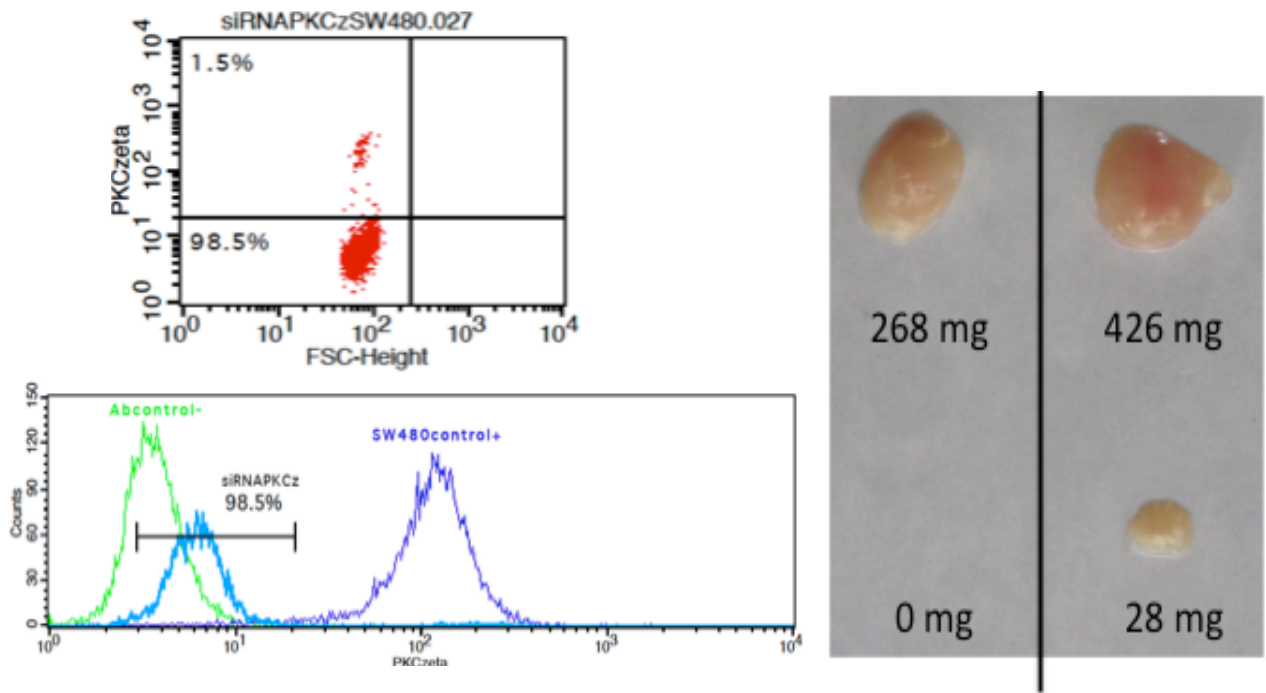


Figura 12. El knockdown de PKC ζ disminuye la capacidad tumorigénica de células SW480 *in vivo*. Células SW480 transfectadas de manera estable con plásmidos control (Expresión normal de PKC ζ) o con el plásmido pSuperPKC ζ RNAi (Knockdown de PKC ζ) fueron seleccionadas por citometría de flujo como se muestra en la parte izquierda de la figura. Las clonas seleccionadas se inocularon en ratones inmunocomprometidos (7.5×10^5 células por inyección). Cada ratón fue inoculado con células control en el lado derecho, y células con Knockdown de PKC ζ en el lado izquierdo. Tres semanas después, los animales fueron sacrificados y se removieron y pesaron los tumores. A la derecha de la figura se muestra imágenes representativas de los tumores formados.

5.8 La inhibición de PKC ζ no afecta los niveles de la proteína β -catenina.

Nuestros resultados indican que la actividad de PKC ζ es necesaria para la estimulación de la ruta Wnt canónica, sin embargo el mecanismo molecular por el cual afecta la ruta Wnt queda aún por demostrarse. Debido a que los elementos clave de regulación de la ruta Wnt canónica residen en modular la estabilidad y la localización intracelular de β -catenina, decidimos investigar los efectos de la inhibición de PKC ζ en estos dos aspectos fundamentales de la regulación Wnt canónica.

Para este fin, se incubaron células SW480 en presencia o en ausencia del inhibidor de PKC ζ (20 μ M) durante 30, 45 o 60 minutos. Después de cada tiempo de incubación se obtuvieron las fracciones citoplásmica y nuclear a partir de los extractos celulares y se analizó la presencia de β -catenina en cada fracción por Western blot. Encontramos que la inhibición de PKC ζ no produjo ninguna disminución en los niveles totales intracelulares de β -catenina en los extractos celulares con respecto a las células control no tratadas, pero de manera notable, indujo un cambio en la localización intracelular de β -catenina, ya que mientras los niveles citoplásmicos de la proteína aumentaron, los niveles de β -catenina nuclear disminuyeron significativamente, como se observa en la figura 13. Además, el curso temporal rápido para promover la salida de β -catenina del núcleo fue compatible con el efecto negativo rápido observado en la actividad transcripcional en los resultados previos (Figuras 6 y 7) después de tan solo 1 hora de tratamiento con el inhibidor de PKC ζ .

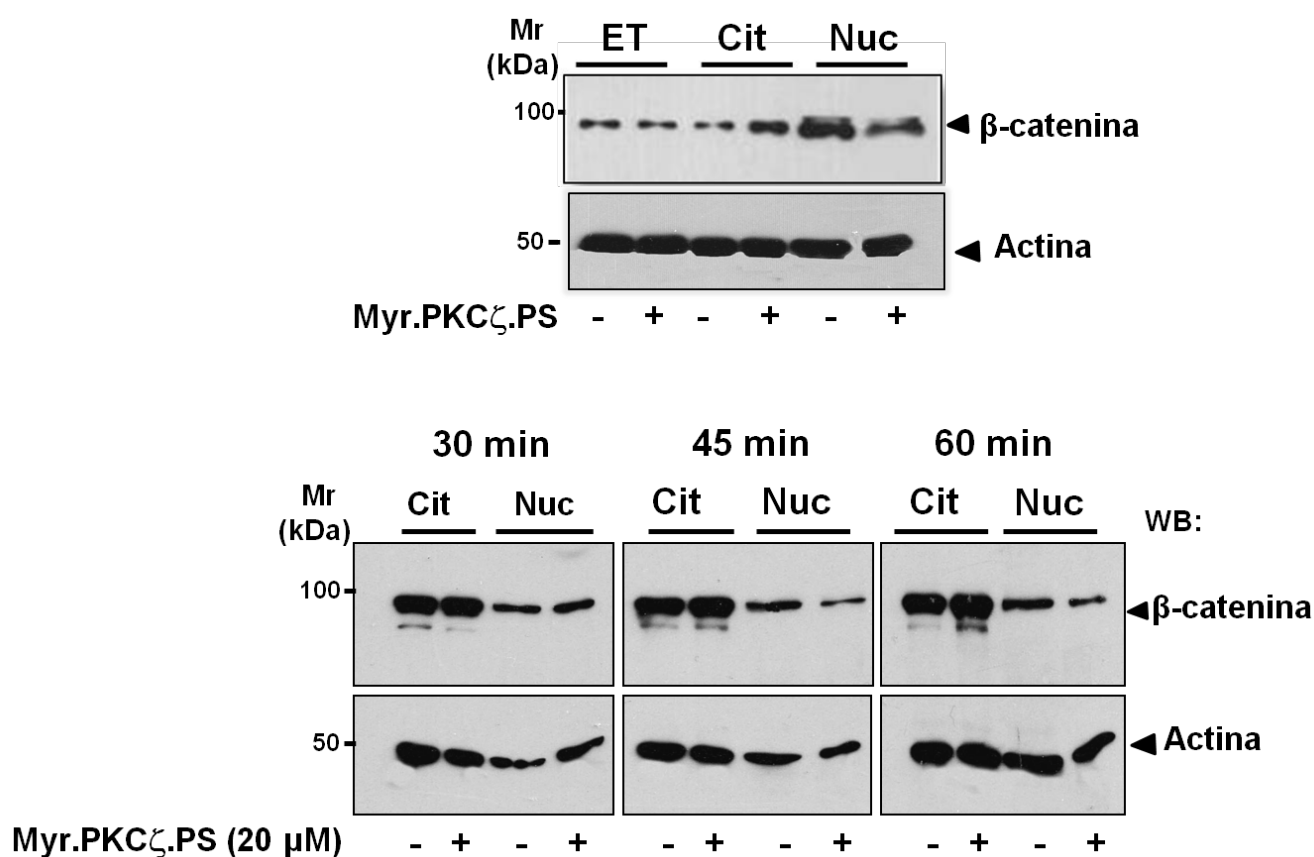


Figura 13. La inhibición de la PKC ζ produce una redistribución de la β -catenina nuclear hacia el citoplasma de las células SW480. Células SW480 se incubaron en presencia (+) o ausencia (-) de 20 μ M

inhibidor de PKC ζ (Myr.PKC ζ .PS) durante distintos periodos de tiempo. Al finalizar cada tiempo de incubación se realizó un fraccionamiento nucleo-citoplasma mediante un kit comercial adquirido de SIGMA, siguiendo las especificaciones del fabricante. Cada fracción sub-celular Citoplasma (Cit) y núcleo (Nuc) así como una parte del extracto total (ET) se separó en un gel de acrilamida 10% y se realizó Western Blot con un anticuerpo específico de β -catenina y se utilizó actina como control de carga.

Para confirmar que la PKC ζ no afecta los niveles de β -catenina, utilizamos una forma mutante de β -catenina (β -cat Ser33/Y) resistente a degradación. Las células RKO poseen un mecanismo normal de degradación de β -catenina por lo que resultó un modelo ideal para el experimento. Como se esperaba, la transfección de β -catenina normal (β -cat WT) y mutante (β -cat S33/Y) aumentó de manera significativa la actividad transcripcional del gen reportero TOPFlash, comparado con la baja actividad transcripcional en condiciones basales y cuando las células se transfectaron con el plásmido vacío pcDNA3 (Figura 14-B).

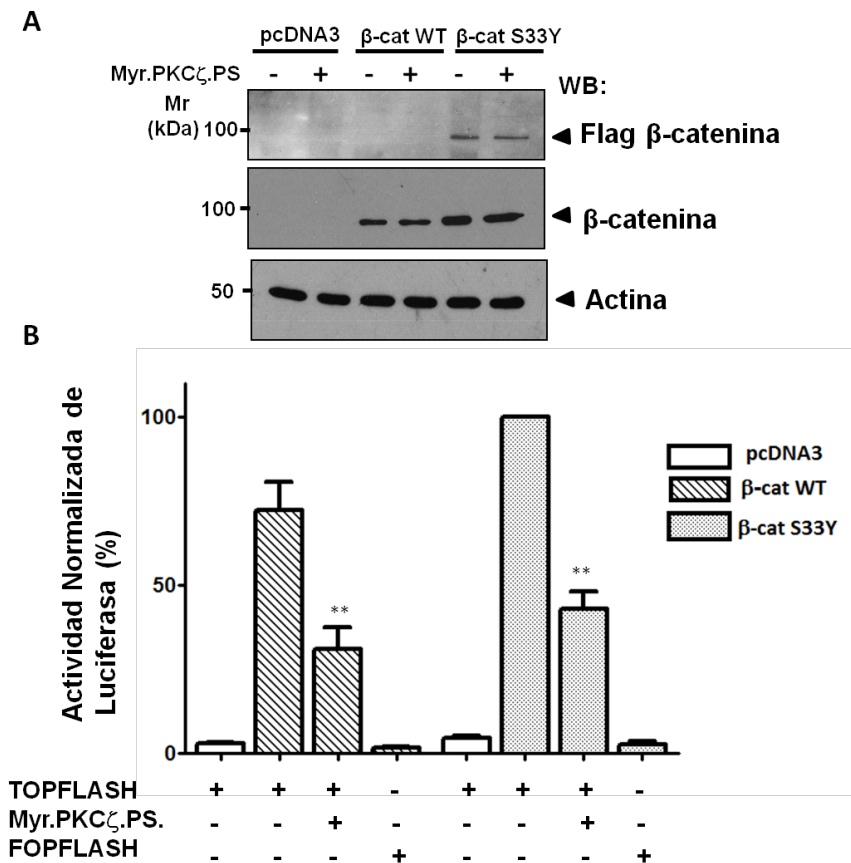


Figura 14. La regulación de la vía Wnt por PKC ζ no depende de la modulación de los niveles de β -catenina. A Se co-transfectaron células RKO con el gen reportero TOPFlash (5 μ g), y con una forma de β -

catenina silvestre (β -cat WT), con una mutante resistente a degradación (β -cat S33/Y) marcada con FLAG ó con el plásmido PCDNA3 vacío como control (2 μ g). Las células se lisaron y analizaron por Western Blot con un anticuerpo anti flag para verificar la eficiencia de transfección de la forma mutante y con un anticuerpo anti β -catenina para verificar la transfección de la forma silvestre. Se utilizó actina como control de carga. **B.** Las células transfectadas se lisaron y se midió la actividad de luciferasa en presencia o ausencia de 20 μ M del inhibidor de PKC ζ (Myr.PKC ζ .PS). Se muestran las medias \pm error estándar de al menos 3 experimentos independientes. ** p < 0.01

La incubación de las células con 20 μ M del inhibidor de PKC disminuyó significativamente la actividad transcripcional tanto en células transfectadas con la forma silvestre de β -catenina (β -cat WT) como en las células que contenían la forma resistente a la degradación de β -catenina (β -cat ser33/Tyr). Estos resultados son consistentes con la idea de que la degradación de β -catenina no parece ser el mecanismo de regulación de la vía Wnt por PKC ζ . Para comprobar esto, utilizamos un inhibidor específico de la actividad proteosomal (MG132), de modo tal que en las células tratadas con este fármaco la β -catenina no sería degradada en el citoplasma. Primero, se determinó la concentración y los tiempos de incubación adecuados de MG132 utilizados para lograr la mayor cantidad de β -catenina celular (Figura 15-A).

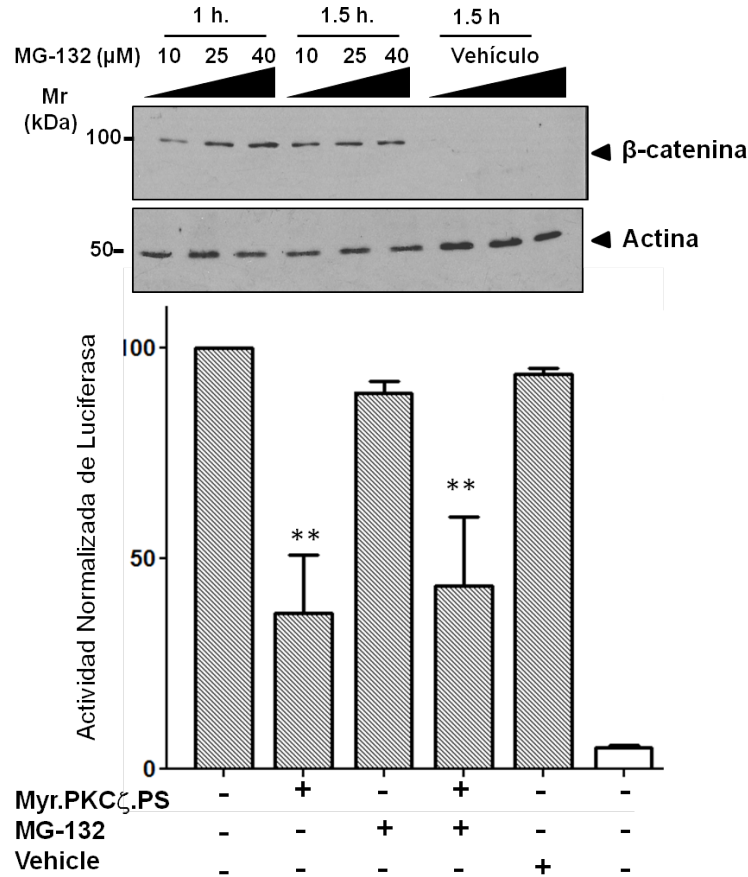




Figura 15. La degradación via proteosoma de β -catenina no participa en la regulación de la vía Wnt por PKC ζ . A. Células RKO fueron tratadas con distintas concentraciones de MG132 durante 60 o 90 minutos o con 0.8% de DMSO como control. Las células se lisaron y analizaron por Western Blot con un anticuerpo dirigido contra β -catenina para determinar la concentración y tiempos adecuados de incubación con el inhibidor. B. Células SW480 se transfectaron con el gen reportero pTOPFlash  o pFOPFlash  y se determinó la actividad de luciferasa en células tratadas con el inhibidor de PKC ζ en presencia o ausencia del inhibidor de proteosoma MG-132 (25 μ M por una hora).

Ya con las condiciones adecuadas, (25 μ M de MG-132 por una hora) se transfectaron células SW480 con el gen reportero TOPFlash y se midió la actividad de luciferasa. Como ya se había observado, la incubación de las células SW480 con el inhibidor de PKC ζ disminuyó la actividad transcripcional basal de β -catenina y como se observa en la figura 15, la

incubación con el MG-132 no impidió este efecto lo cual confirmó nuestra hipótesis de que la regulación de Wnt por PKC ζ no involucra la regulación de los niveles de proteína de la β -catenina.

5.9 La inhibición de PKC ζ promueve la salida de β -catenina del núcleo de células SW480.

Nuestros datos del cambio en la localización intracelular de β -catenina con la inhibición de PKC ζ sugieren que requiere de la actividad catalítica de PKC ζ para regular la localización nuclear de β -catenina. Para corroborar estas observaciones, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para visualizar la localización de β -catenina en las células SW480 incubadas durante 1 hora en ausencia o en presencia del inhibidor de PKC ζ . Los resultados, mostrados en la figura 16, indican que en células SW480 sin tratamiento, la β -catenina tiene una localización predominantemente nuclear; el tratamiento de 1 hora con el inhibidor de PKC ζ produjo una redistribución sustancial de la β -catenina nuclear hacia el citoplasma, confirmando lo observado en los experimentos de Western Blot (Figura 13). Para averiguar si la salida de β -catenina es dependiente del complejo exportina 1 (CRM-1), se incubó también a las células en presencia o en ausencia de leptomicina B, inhibidor de este complejo. Como se puede observar en la figura 16, la salida de β -catenina del núcleo de células tratadas con 20 μ M del inhibidor de PKC ζ , es sensible a Leptomicina B, lo cual sugiere que este mecanismo involucra la participación de exportina 1.

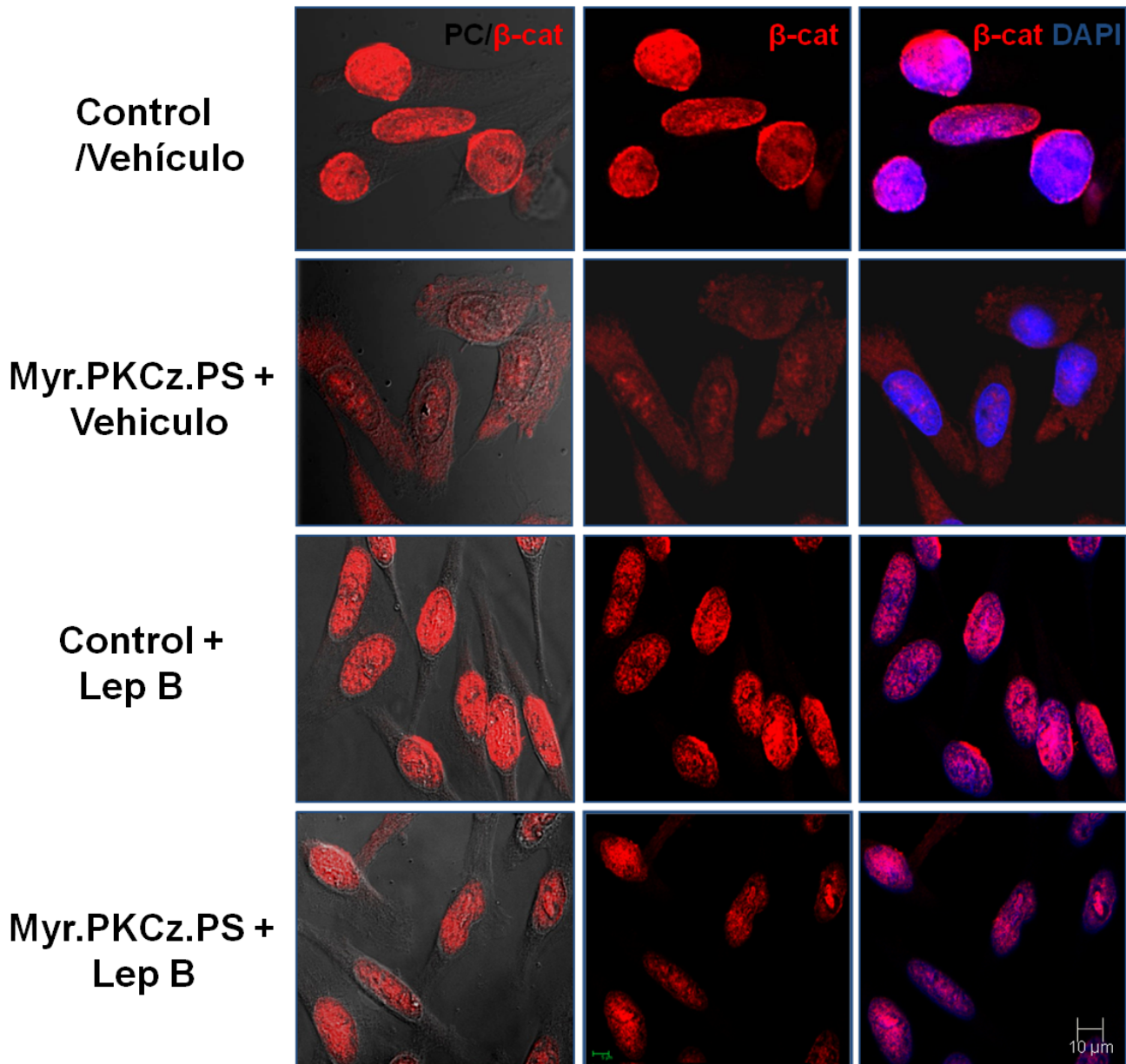


Figura 16. La inhibición de PKC ζ produce una redistribución dependiente de exportina-1 de β -catenina del núcleo al citoplasma de la célula. Células SW480 se trataron con 25 ng/mL de Leptomicina B o con metanol (vehículo) durante 30 minutos. Después de la incubación las células se incubaron durante 1 hora en presencia o en ausencia de 20 μ M de Myr.PKCz.PS; a continuación las células se fijaron y se permeabilizaron para el proceso de tinción con un anticuerpo específico para β -catenina y se visualizaron con un anticuerpo secundario acoplado a Rodamina. Las muestras se montaron con Vecta-Shield acoplado con el colorante DAPI y fueron analizadas por microscopía confocal (Leica). CF Contraste de Fase.

Finalmente, como una forma de corroborar y definir de forma cuantitativa la salida de β -catenina de núcleo de la célula con la inhibición de PKC ζ , decidimos demostrar estos resultados por citometria de flujo (FACS). Las células SW480 se incubaron en presencia o en ausencia del inhibidor de PKC ζ 20 μ M (concentración IC50, según los datos de la Figura 6) durante 1 hora. Posteriormente, realizamos un fraccionamiento celular y los núcleos fueron teñidos con β -catenina-FITC para determinar la cantidad de esta proteína nuclear después de una hora de tratamiento. Los resultados presentados en la Figura 17 indican una disminución de más del 50% de la β -catenina nuclear después de una hora de incubación con el inhibidor de PKC ζ .

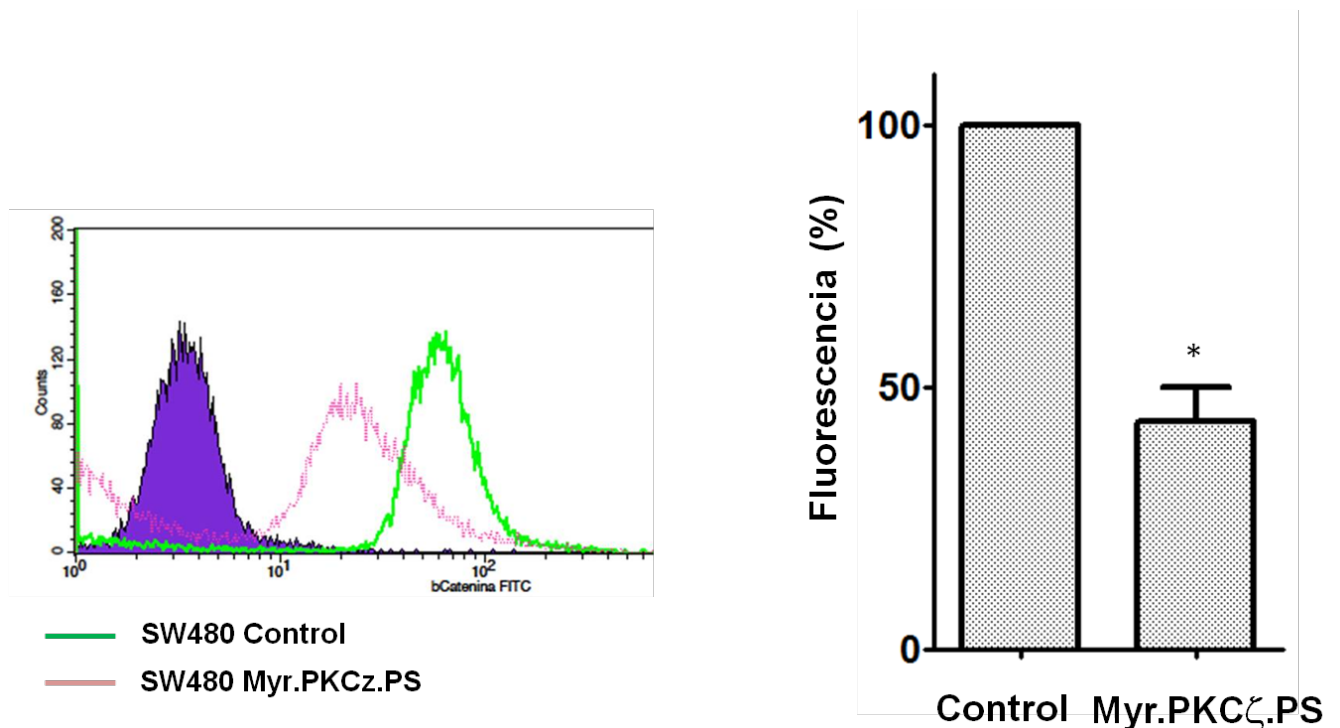


Figura 17. La inhibición de PKC ζ produce la salida de β -catenina del núcleo de la célula. Células SW480 se incubaron en presencia (Myr.PKC ζ .PS) o en ausencia (control) de 20 μ M del inhibidor de PKC ζ durante una hora. Luego de un fraccionamiento celular, los núcleos fueron fijados permeabilizados y teñidos con un anticuerpo específico para β -catenina y con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. La fluorescencia se detectó con un equipo FACScalibur (BD Biosciences) Se presentan las medias \pm error estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Estos resultados coinciden con la disminución de la actividad transcripcional de β -catenina inducida por la inhibición de la PKC ζ y proporcionan un posible mecanismo molecular por el cual ocurre: la inhibición de la actividad de PKC ζ resulta en una disminución de la cantidad de β -catenina nuclear lo cual llevaría a una disminución de su actividad co-activadora principalmente del oncogene *c-myc* (Figura 18).

En conjunto, todos nuestros resultados indican que PKC ζ es un modulador positivo de la ruta Wnt canónica y que el mecanismo molecular por el cual lo hace es a través del control rápido de la localización nuclear de β -catenina mediante un proceso de exportación nuclear sensible a leptomicina B.

6. DISCUSION

El objetivo general de este proyecto fue el de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de convergencia y posible regulación de la ruta Wnt canónica por la PKC. Se ha descrito que ambas vías participan de modo determinante en el desarrollo de neoplasias colorectales, pero los mecanismos moleculares de su interacción o sinergismo en estos procesos no están bien establecidos (Sheldahl, et al. 1999; Kuhl, et al. 2001; Kinoshita, et al. 2003).

La proteína cinasa C es uno de los efectores clave de la ruta de señalización Wnt no canónica, particularmente de la vía Wnt/Ca²⁺. Sin embargo, también existe evidencia experimental que indica que PKC participa en la regulación de la ruta Wnt canónica. A este respecto, mientras que la interacción de PKC ζ con elementos de la ruta Wnt canónica tales como GSK3 β había sido descrita previamente (Goode, et al. 1992; Ohno, et al. 2002), la interacción entre esta isoforma atípica y β -catenina no se había reportado antes. En este trabajo, demostramos que PKC ζ interacciona selectivamente con β -catenina y que PKC ζ modula positivamente la ruta Wnt canónica.

Las isoformas atípicas de PKC difieren de otras isoformas de PKC en que su actividad catalítica no es dependiente de diacilglicerol ni de calcio. Esta divergencia funcional se debe a su dominio regulatorio N-terminal único que carece de motivos de unión para estos

segundos mensajeros: carecen del dominio C2 y solo contienen una estructura de dedo de zinc en su dominio C1. Este grupo contiene adicionalmente un dominio estructural único entre las PKC llamado Phox/Bem 1 (PB1) amino terminal, que le permite interactuar con otras proteínas (Hirai y Chida 2003; Moscat, et al. 2006)

La actividad de este tipo de isoenzima de PKC es regulada en cambio por 3-fosfoinosítidos, por fosforilación por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK1, y por interacciones proteína-proteína (Hirai et al, 2003). En este trabajo, encontramos que el mecanismo por el cual PKC ζ participa en la modulación positiva de la vía Wnt canónica es a través del control de la localización nuclear del co-activador transcripcional β -catenina y no mediante la regulación de su estabilidad intracelular. El control de su localización nuclear proporciona un mecanismo muy rápido y eficiente para bloquear la expresión de genes blanco Wnt. Consistente con esto, encontramos que el tratamiento de las células por tan sólo una hora con un inhibidor específico de PKC ζ , produjo un bloqueo severo de la alta actividad transcripcional mediada por β -catenina que exhiben las células cancerosas SW480.

La presencia en el núcleo de β -catenina se considera un sello característico de la activación de la ruta Wnt canónica. La entrada y salida del núcleo de β -catenina representa un paso crucial para regular los niveles de β -catenina competente para señalizar y constituye un blanco terapéutico atractivo tanto en cáncer como en otras enfermedades asociadas con señalización Wnt alterada.

La conservación del control del tráfico nuclear de β -catenina es determinante en la supervivencia celular y para el crecimiento. β -catenina no posee señales de localización nuclear reconocibles y se ha propuesto que su importación al núcleo puede estar mediada por su interacción con otras proteínas (mecanismo llamado "Piggy back"). Sin embargo, se ha demostrado que la importación de β -catenina al núcleo puede ocurrir en ausencia de proteínas de transporte tales como importinas o la GTPasa Ran (Kulay, et al. 1997). Adicionalmente, se ha encontrado que β -catenina compite con β -importina para unirse a los componentes del poro nuclear. Sin duda, las repeticiones centrales tipo armadillo se requieren para la importación de β -catenina al núcleo y están estructuralmente relacionadas con las repeticiones

HEAT presentes en β -importina que se asocian al complejo del poro nuclear (Henderson, et al. 2002).

Con respecto a la exportación nuclear de β -catenina, aunque el mecanismo preciso se desconoce, hasta ahora se han propuesto varios posibles mecanismos. Por ejemplo, se ha observado que APC y axina, además de participar en el complejo de degradación de β -catenina, viajan regularmente entre el núcleo y el citoplasma y facilitan la exportación nuclear de β -catenina por un mecanismo dependiente del complejo CRM-1 (Cong, et al. 2004; Ki, et al. 2008). Por otro lado, también existe evidencia experimental de que β -catenina puede salir del núcleo uniéndose directamente al complejo CRM-1 a través de su región central de repeticiones de armadillo, de manera independientemente de APC (Ki, et al. 2006). Además, se ha reportado que el tratamiento con leptomicina B, un inhibidor específico de la exportación nuclear mediada por el complejo CRM-1, provoca una dramática retención de la β -catenina nuclear inducida por LEF-1 (Hendriksen, et al. 2005). Consistente con esto, nosotros demostramos que un mecanismo mediado por CRM-1 está involucrado en la exportación de β -catenina inducida por PKC ζ . También se ha reportado que β -catenina puede salir del núcleo de manera independiente del complejo CRM-1 y de RanGTP (Takemaru, et al. 2009; Ki, et al. 2006) y que el factor de exportación RanBP3 aumenta la salida del núcleo de β -catenina activa de un modo independiente de CRM-1 (Takemaru, et al. 2009). Takemaru et al. (2009) reportaron que Chiby (Cby) coopera con proteínas adaptadoras de la familia 14-3-3 para facilitar la exportación nuclear de β -catenina, después de que Cby es fosforilada por la proteína cinasa Akt. La exportación nuclear dirigida por APC y axina puede estar acoplada con degradación vía proteosoma de β -catenina. Sin embargo, las consecuencias de la exportación dependiente de Cby y de RanBP3 actualmente se desconocen. Toda esta evidencia experimental sugiere por tanto, que las células poseen dos o tres mecanismos diferentes de exportación nuclear de β -catenina. El cómo operan coordinada y diferencialmente estas rutas de exportación nuclear para controlar de manera fina y precisa los niveles nucleares de β -catenina, queda aún por demostrarse.

La PKC ζ puede estar en el punto de convergencia de las vías de señalización Wnt y PI3K que regulan la proliferación celular

Es bien conocido que las PKCs atípicas (aPKCs) están implicadas en el establecimiento de la polaridad celular, en la proliferación y en la supervivencia celular (Akimoto, et al. 1996; Lin, et al. 2000). Se ha reportado que la vía de señalización Wnt interacciona con la vía de PKC ζ para promover la polaridad y proliferación celular. Con respecto a su función en la regulación de la polaridad celular, Zhang et al (2007) encontraron que como resultado de la estimulación con Wnt5a, Dvl forma un complejo con PAR3, PAR6 y con PKC ζ que provoca la estabilidad y activación de PKC ζ para promover la diferenciación axonal en cultivos de neuronas de hipocampo. De igual modo, Wolf et al. (2008) demostraron que se requiere de la PKC ζ para la atracción mediada por Wnt de axones comisurales y para el direccionamiento antero-posterior adecuado del axón.

La participación de las aPKCs en proliferación celular es bien conocida. Sin duda, muchas de las proteínas que se han reportado que interaccionan con PKC ζ están involucradas en el mantenimiento del estado proliferativo de las células, incluyendo aquellas que regulan las cascadas de señalización de AP-1, NF- κ B y la de Ras-MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos).

Adicionalmente, se ha reportado que la isoforma atípica iota de PKC, estrechamente relacionada con PKC ζ , es un oncogene humano que participa en múltiples aspectos del fenotipo transformado de células humanas cancerosas (Fields, et al. 2007). Consistente con esto, nosotros demostramos que el estado proliferativo de las células cancerosas SW480 disminuye cuando se inhibe la actividad de PKC ζ (Figura 10).

Dos eventos genéticos clave en el desarrollo del cáncer de colon son la activación constitutiva de las vías de señalización Wnt/B-catenina y la de PI3K/Ras/MAPK. El principal mecanismo de activación de PKC ζ depende de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que es producido como resultado de la activación de PI-3 cinasa inducida por factores de crecimiento. La proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1), que

se une con gran afinidad a PIP3, fosforila y activa no solamente a Akt (PKB), sino a PKC ζ . De hecho, mientras que PKC ζ resulta directamente activada por PDK1, Akt todavía tiene que ser fosforilada por mTORC2 para ser completamente activa. Las PI3 cinasas pueden ser activadas tanto por receptores con actividad de tirosina cinasa, como por receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G tales como los receptores Frizzled. Mientras que las mutaciones activadoras de la vía Wnt se encuentran en la gran mayoría de casos de cáncer de colon, la activación por mutación de la vía del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) también es común en este tipo de cáncer; de igual forma la mutación de K-Ras o de B-Raf ocurren en el 79% de las líneas celulares y en el 59% de los casos de cáncer colorectal humano (Seth et al, 2009). Debido a que GSK3 β es un componente clave de ambas rutas, frecuentemente se asume que la señalización activa de PI3K afecta positivamente a la ruta Wnt a través de la inhibición de GSK3 β mediada por Akt. Sin embargo, el análisis de la interacción entre estas dos rutas de señalización aun es materia de debate. Por un lado, se ha visto que la estimulación con insulina y con factores de crecimiento de líneas celulares de colon en cultivo lleva a la inhibición de GSK3 β por su fosforilación en Ser9 mediada por Akt. Sin embargo, se ha reportado que el efecto de insulina puede ser bloqueado por la inhibición de PI3K, pero solamente atenuado por la inhibición de Akt (Sun, et al. 2008), lo cual indica la existencia de mecanismos dependientes e independientes de Akt.

Recientemente Jeong et al. (2012) demostraron que Ras se estabiliza como resultado de la activación de la ruta Wnt canónica. Describieron un nuevo mecanismo de regulación de la actividad de Ras a través de la inducción de su degradación como resultado de su fosforilación por GSK3 β . De tal modo que cuando se activa la ruta Wnt canónica y se desensambla el complejo de degradación formado por APC, axina, caseína cinasa 1 y GSK3 β , no solamente se promueve la estabilidad de β -catenina sino también la de Ras. En consecuencia, en cáncer de colon, la inhibición de la degradación tanto del co-activador transcripcional de Wnt, β -catenina, como la acumulación de Ras, contribuyen a la transformación maligna en el colon (Jeong, et al. 2012).

La localización nuclear de β -catenina se considera como el evento clave de la activación de la vía Wnt; sin embargo, en muchos sistemas se ha localizado solo incidentalmente en el núcleo celular. A pesar de la evidencia acumulada que apoya el modelo actual, en otros estudios no se ha logrado confirmar la presencia de β -catenina nuclear una vez establecida la mutación de APC. A este respecto, y consistente con la interacción propuesta entre la señalización Wnt y la de PI3K, Phelps et al. en 2009 habían reportado también que existe sinergismo entre estas las vías de señalización Wnt y PI3K/Ras, proponiendo un modelo en el cual la pérdida homóciga de APC por sí sola únicamente estabiliza los niveles citoplásmicos de β -catenina pero es insuficiente para estimular la acumulación de β -catenina en el núcleo y la proliferación celular, y que se requiere para ello además de las actividades de K-Ras, Raf1 y de Rac1 (Phelps, et al. 2009), reforzando la noción de que la señalización mediada por factores de crecimiento está coordinada con la pérdida de APC. Por tanto, la mutación y actividad constitutiva de K-Ras sería un elemento necesario para la localización nuclear de β -catenina, sin embargo aún no es claro qué proteínas participan río abajo a K-Ras y el mecanismo molecular por el cual se promueve la translocación de β -catenina al núcleo.

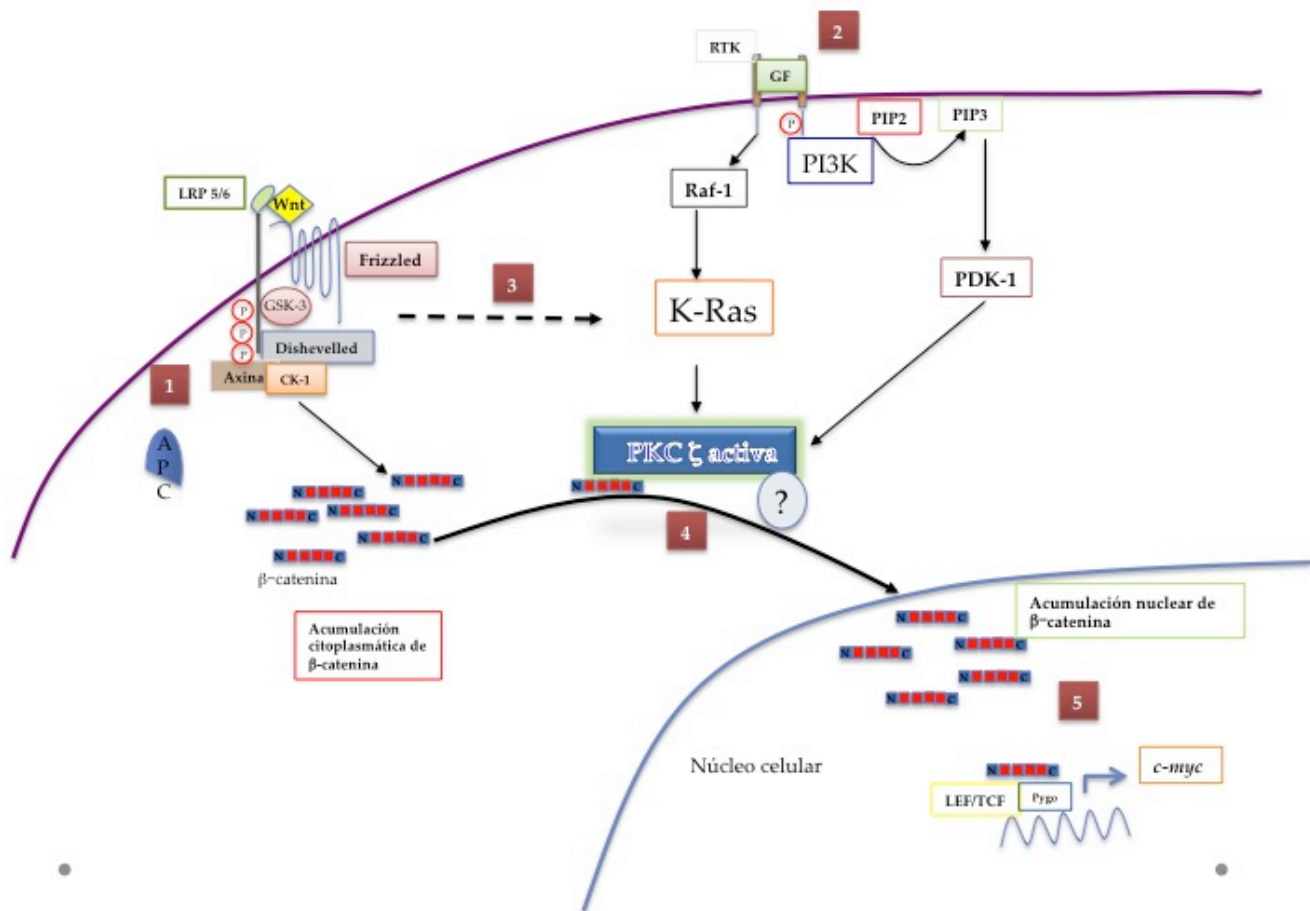


Figura 18. Mecanismo molecular propuesto por el cual la PKC ζ lleva a la activación de la ruta Wnt canónica. 1) La activación por ligando de la ruta Wnt así como la pérdida homóloga de APC, promueven la estabilización y acumulación de β -catenina citoplásmica, sin embargo estos mecanismos no son suficientes para estimular su translocación al núcleo de la célula. (2) La presencia de factores de crecimiento (GF) activan, por medio de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa (RTK) a la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) 3) Adicionalmente, se ha descrito un novedoso mecanismo de regulación de K-Ras por el cual, la activación de la ruta Wnt (1) desensambla el complejo de degradación formado por APC, Axina, Caseína cinasa -1 y GSK-3; este evento promueve la estabilización no solamente de β -catenina sino también de la proteína K-Ras. (4) Se ha descrito que tanto la vía de la PI3K como K-Ras promueven la translocación de β -catenina al núcleo celular sin embargo aún no es claro que proteínas participan río abajo y el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo. Nuestros datos sugieren que la PKC ζ constituye el punto focal de convergencia y comunicación entre las rutas de señalización de Wnt, Ras y PI3-K. De esta forma la activación de PKC ζ por K-Ras o por la vía de la PI3K a través de la presencia de factores de crecimiento, promueven la translocación de β -catenina al núcleo, lo que lleva a la activación de programas genéticos que participan en procesos de proliferación celular (5).

Nuestros datos sugieren un modelo en el cual PKC ζ constituye el punto focal de convergencia y comunicación entre las rutas de señalización Wnt- β -catenina y la de PI3K (Figura 18). En este modelo, se puede especular que los factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo o los agonistas Wnt, activen a PKC ζ , la cual a su vez afecta positivamente a la vía Wnt canónica a través de la fosforilación, ya sea de β -catenina o de otra(s) proteínas que controlan la localización nuclear (retención) de y/o facilitan su interacción con el complejo TCF/co-activadores, resultando en la activación de la transcripción de genes blanco Wnt. Queda aún por demostrarse, cual, cuales son las proteínas reguladas directamente por PKC ζ que a su vez participan en el mantenimiento de los niveles nucleares de β -catenina. La determinación de estas proteínas podrían ser utilizadas como blancos terapéuticos para el tratamiento de los carcinomas de tipo colorectales.

7. Conclusiones:

1. La PKC ζ interacciona con β -catenina principalmente en líneas celulares tumorales de colon humano.
2. La PKC ζ es un modulador positivo de la vía Wnt a través de una rápida translocación de β -catenina citoplásmica al núcleo celular.
3. Este mecanismo de translocación es dependiente de β -importinas.
4. Este mecanismo de acción sugiere que la PKC ζ se encuentra en el sitio de convergencia entre las vías Wnt, Ras y PI3K.

Referencias.

- Akimoto, K., Takahashi, R., Moriya, S., Nishioka, N., Takayanagi, J., Kimura, K., Fukui, Y., Osada, S., Mizuno, K., Hirai, S., Kazlauskas, A., Ohno, S. 1996. EGF o PDGF receptors activate atypical PKC λ through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.* 15: 788-798.
- Akiyama, T. 2000. Wnt/ β -catenin signaling. *Cytokine & Growth Factors Rev.* 11: 273-282.
- Andre, P., Wang, Q., Wang, N., Gao, B., Schilit, A., Halford, MM., Stacker, SA., Zhang, X. Yang, Y. 2012. The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/Planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2. *J. Biol. Chem.* 287: 44518-25.
- Behrens, J. 2013. Everything you would like to know about Wnt signaling. *Sci. Signaling* 6 (275): pef 17.
- Behrens, J., Von Kries, JP., Kuhl, M. Brhn, L. Wedlich, D. Grosschedl, R. Birchmeier, W. 1996. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1 *Nature.* 15: 638-642.
- Bienz, M., Clevers, H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell.* 103: 311-20.
- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G. Zimmermann, T. Cruciat, CM., Bienz, M. Niehrs, C. 2007. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 signalosomes. *Science.* 5831: 1619-1622.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, DI., Mlodzic, M. 1998. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94:109-118.
- Brembeck, F., Schwartz-Romond, Bakkers, J., Wilhem, S., Hammerschmidt, M., Birchmeier, W. 2004. Essential Role of Bcl9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & Dev.* 18: 2225-2230.

- Chen, R.H., Ding, W.V., and McCormick, F. (2000) Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* (2000) **275** (23): 17894-17899.
- Chiang Shuek Wong N., Pignatelli, M. 2002. β -catenin a linchpin in colorectal cancer carcinogenesis? *Am. J. Pathol.* 2: 389-401.
- Clevers, H. 2006. Wnt/ β -catenin Signaling in Development and Disease. *Cell.* 127: 469-480.
- Cong, F., Varmus, H. 2004. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates sub-cellular localization of beta-catenin. *Proc. Natl Acad. Sci.* 101: 2882-2887.
- Cook, D., Fry, M., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodget, J., Dale, T. 1996. Wingless inactivates GSK-3 via an intracellular signaling pathway which involves a protein kinase C. *The EMBO J.* 15: 4526-4536.
- Dissanayake, SK., Wade, M., Johnson, CE. Conell, M., Leotleta, P. 2007. The Wnt5a/Protein Kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of the metastasis suppressor and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 282: 17259-17271.
- Fagotto, F., Glück U. Gumbiner, BM. 1998. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr. Biol.*, 8: 181-190.
- Fields, AP., Calcagno, S., Krishna, M., Rak, S. Leitges, M., Murray, N. 2009. Protein Kinase C β is an effective target for Chemopreventive of colon cancer. *Cancer Res.* 69: 1643-1650.
- Fields, A., Regala RP. 2007. Protein kinase C α : human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol. Res.*, 55: 487-497.
- Gao, B. 2012. Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr. Top. Dev. Biol.* 101: 263-95.
- Giles, RH., Van Es, JH., Clevers, H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653: 1-24

- Gokmen-Polar, Y., Murray, N., Velasco, M., Gatlica, Z., Fields, A. 2001. Elevated protein kinase C β II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 61: 1375-1381.
- Goode, N., Hughes, K., Woodget, JR., Parker, PJ. 1992. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.*, 267: 16878-16882.
- Gregorieff, A., Clevers, H. 2008. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Dev.* 19: 877-890.
- Griner, E., Kazanietz, M. 2007. Protein Kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 7: 281-291.
- Gumbiner, B. 1986. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.
- Gwak, J., Cho, M., Gong, S., Won, J., Kim, D., Oh, S. 2006. Protein kinase C mediated β -catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/ β -catenin pathway. *J. Cell Biol.* 119: 4702-4709.
- Ha, N.C., Tonzuka T., Stamos JL., Choi HJ., Weis WI. 2004. Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell* 15: 511-521.
- Hazan, R., Norton, L. 1998. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273: 9078-9084.
- Henderson, BR., Fagotto, F. 2002. The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* 3: 834-839.
- Hendriks, B., Reichmann, E. 2002. Wnt signaling: a complex issue. *Biol. Res.* 35:277-286.
- Hendriksen, J., Fagotto, F., van der Velde, H. van Schie, M. Noordermeer, J., Fornerod, M. 2005. RanBP3 enhances nuclear export of active β -catenin independently of CRM1. *J. Cell Biol.*, 171: 785-97.

Hirai, T., Chida, K. 2003. Protein Kinase C ζ (PKC ζ): Activation mechanisms and cellular functions. *J. Biochem.* 133: 1-7.

Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, RT., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. 2003. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol. Cell Biol.* 23:131-139.

Jeong, WJ., Yoon J., Park, JC., Lee, SH., Lee S-H., Kaduwal, S., Kim, H., Yoon, JB., and Choi KY. 2012. Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. *Sci. Signal.* 10: 5 (219):ra30.

Jessen, JR. 2009. Noncanonical Wnt signaling in tumor progression and metastasis. *Zebrafish* 6: 21-28.

Ji. ML., Ik, S., Hyunkyung, K., Jason, L., Kieongkyu, K. Hwa, Y. Jiyeong, J., Juang, H., Ji-Young, K., Hanna, L., Sang-Beom, S., Hogeun, K., Rosenfeld, M., Sung Hee, B. 2010. ROR α attenuates Wnt/ β -catenin Signaling by PKC δ -dependent phosphorylation in colon cancer. *Molecular Cell.* 37: 183-195.

Jonsson, M., Smith, K., Harris, A. 1998. Regulation of Wnt5a expression in human mammary cells by protein kinase C activity and the cytoskeleton. *British J. of Cancer.* 78: 430-438.

Kho, DH., Bae, JA., Lee, JH. 2010. KITENIN recruits Dishevelled/PKC δ to form a functional complex and controls the migration and invasiveness of colorectal cancer cells. *Gut* 58: 509-519.

Khon, A., Moon, R. 2005. Wnt and calcium signaling: β -catenin independent pathways. *Cell Calcium.* 38: 439-446.

Khul, M., Sheldhal, L., Park, M., Miller, J., Moon, R. 2000. The Wnt/Ca²⁺ pathway: A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Gen.* 16: 279-283.

Ki, H., Jung, HC., Park, JH., Kim, JS., Lee, KY., Kim, TS., Kim, K. 2006. Overexpressed LEF-1 proteins display different nuclear localization patterns of beta-catenin in normal versus tumor cells. *Cell Biol. Int.* 30: 253–261.

Ki, H., Oh, M., Chung, SW., Kim, K. 2008. β -catenin can bind directly to CRM1 independently of adenomatous polyposis coli, which affects its nuclear localization and LEF-1/ β -catenin-dependent gene expression. *Cell Biol. Int.* 32: 394–400.

Kinoshita, N., Iioka, H., Miyakoshi, A., Ueo, N. 2003. PKC δ is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev.* 17: 1663–1676.

Kuhl, M., Geis, K., Sheldahl, LC., Pukrop, T., Moon, RT., Wedlich, D. 2001. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} signaling. *Mech. Dev.*, 106, 61–76.

Kulay, U., Izaurralde, E., Bischoff, FR., Mattaj, IW., Görlich, D. et al. 1997. Dominant-negative mutants of importin- β block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *EMBO J.* 16: 1153–1163.

Lee, JH., Park, SR., Chay, KO., Seo, YW., Kook, H., Ahn, KY. Kim, YJ., Kim, KK. 2004. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN) a member of the tetraspanin family interacts with Kall1 a tumor metastasis suppressor and enhances metastasis of cancer. *Cancer Res.* 64: 4235-43.

Logan, CY., Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 781-810.

Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., Baltimore, D. 2004a. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell.* 119: 97-108.

Lu, X. Borchers, AG., Jolicoeur, C., Rayburn, H. Baker, JC. Tessier-Lavigne M. 2004b. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature.* 430: 93- 8.

Masuko, K. and Masaru, K. 2007. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clin Cancer Res.* 13(14): 4042-4045.

Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., Nishita, M. 2010. Ror-family receptor tyrosine kinase in noncanonical Wnt signaling: their implications in development morphogenesis and human disease. *Dev. Dyn.* 23: 1-15.

Moscat, J. Rennert, P. Diaz-Meco, MT. 2006. PKC ζ at the crossroad of NF- κ B and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell death and Differentiation.* 13: 702-711.

Moscat, J., Diaz-Meco, MT. 2000. The atypical protein kinase Cs. *EMBO reports* 1: 399-403.

Mustafi, R., Cerda, S., Chumsangri, A., Fichera, A., Bissonnette, M. 2006. Protein Kinase C zeta inhibits collagen I-dependent and anchorage-independent growth and enhances Apoptosis of human Caco-2 cells. *Mol. Cancer Res.* 9: 683-694.

Newton, A.C. 2003. Regulation of ABC kinases by phosphorylation: PKC as a paradigm. *Biochem. J.* 370: 361-371.

Ohno, S., Nishisuka, Y. 2002. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.* 132, 509-511.

Oishi I., Suzuki H., Onishi N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, GC., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., Minami, Y. 2003. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8:645-54.

Oster, H., Leitges, M. 2006. Protein kinase C α but not PKC ζ suppresses intestinal tumor formation in APC^{Min/+} Mice. *Cancer Res.* 66: 6955-6963.

Oving, I., Clevers, H. 2002. Molecular causes of colon cancer. *Eur. J. Clin. Invest.* 32: 448-457.

Parker PJ., Murray-Rust J. 2004. PKC at a glance. *J. Cell Sci.* 117: 131-2

Phelps, RA., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, IT., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, RW., Jones, DA. 2009. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*, 137, 623–634.

Pinto, D., Clevers, H. 2005a. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 306: 357-363.

Pinto, D., Clevers, H. 2005b. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol. Cell.* 97: 185-196.

Radtke, F., Clevers, H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science.* 307: 1904-1909.

Reya, T., Clevers, H. 2005. Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature.* 434: 843-850.

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, SH., Masiarz, FR., Munemitsu, S., Polakis, P. 1993. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science.* 262:1731-4

Seth, R., Crook, S., Ibrahim, S., Fadhil, W., Jackson, D., Ilya, M. 2009. Concomitant mutations and splice variants in KS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signaling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut.* 58: 1234–1241.

Shapiro, L. 2001. β -catenin and its multiple partners: promiscuity explained. *Nature Estr. Biol.* 8: 484-487.

Sheldahl, L.C., Park, M., Malbon, C., Moon, RT. 1999. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.,* 9: 695–698.

Simons, M., Mlodzik M. 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Ann. Rev. Genet.* 42: 517-540.

Storz, P., Döppler, H., and Toker, A. 2004. Protein kinase C delta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* 24 (7): 2614-2626.

- Su, LK, Vogelstein, B, Kinzler, KW. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 262: 1734-7
- Sun, J., Jin, T. 2008. Both Wnt and mTOR signaling pathways are involved in insulin-stimulated proto-oncogene expression in intestinal cells. *Cell Signal*, 20: 219-229.
- Taelman, VF., Dobrowolski, R., Plouhinec, JL., Fuentealba, LC, Vorwald, PP., Gumper, I., Sabatini, DD., De Robertis, EM. 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*. 143: 1136-48.
- Takemaru, K., Fisher, V., Li, FQ. 2009. Fine-tuning of nuclear-catenin by chibby and 14-3-3. *Cell Cycle*, 8: 210-213.
- Tao, W., Pennica, D., Xu, L., Kalejta, RF., Levine, AJ. Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev*. 15: 1796-807.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*. 10: 789-798.
- Van Amerongen R., Nusse, R. 2009. Toward an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 136: 3205-3214.
- Veeman, M., Axelrod, J., Moon, RT. 2003. A second canon: Functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Developmental Cell*. 5: 367-377.
- Wolf, A.M., Liuksytova, AI., Fenstermaker, AG., Shafer, B., Lo, CG., Zou, Y. 2008. Phosphatidylinositol-3-kinase-Atypical protein kinase C signaling is required for Wnt attraction and anterior-posterior axon guidance. *J Neurosci.*, 28: 3456-3467.
- Zhang, J., Anastasiadis, P., Liu, Y., Thompson, A. Fields, A. 2004. Protein Kinase C (PKC) β II induces cell invasion through a Ras/Mek, PKC α /Rac-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 22118-22123.
- Zhang, X., Zhu, J., Yang, GY., Wang, QJ., Qian, L., Chen, F., Tao, Y., Hu, HS., Wang, T., Luo, ZG. 2007. Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat. Cell Biol.*, 9: 743-754.

Apéndice.

Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines

Luis Bernardo Luna-Ulloa, José G. Hernández-Maqueda, Paula Santoyo-Ramos, M. Cristina Castañeda-Patlán and Martha Robles-Flores*

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 3000, Mexico, 04510, Mexico

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 55 5623 2258; Fax: +52 55 5616 2419; Email: rmartha@servidor.unam.mx

The colonic epithelium is a continuously renewing tissue with a dynamic turnover of cells. Wnt pathway is a key regulator of its homeostasis and is altered in a large proportion of colon cancers. Protein kinase C (PKC) family of serine/threonine kinases are also involved in colon tumor formation and progression; however, the molecular role played by them in the Wnt pathway, is poorly understood. Reciprocal coimmunoprecipitation and immunofluorescence studies revealed that PKC ζ interacts with β -catenin mainly in tumoral colon cells, which overexpressed this PKC isoform. The pharmacological inhibition, the small interference RNA-mediated knockdown of PKC ζ or the expression of a dominant-negative form of it in tumoral SW480 cells, blocked in a dose-dependent manner the constitutive transcriptional activity mediated by β -catenin, the cell proliferation and the expression of the Wnt target gene *c-myc*. Remarkably, the PKC ζ stably depleted cells exhibited diminished tumorigenic activity in grafted mice. We show that PKC ζ functions in a mechanism that does not involve β -catenin degradation since the effects produced by PKC ζ inhibition were also obtained in the presence of proteasome inhibitor and in cells expressing a β -catenin degradation-resistant mutant. It was found that PKC ζ activity regulates the nuclear localization of β -catenin since PKC ζ inhibition induces a rapid export of β -catenin from the nucleus to the cytoplasm in a Leptomycin B sensitive manner. Taken together, our results indicate that the atypical PKC ζ plays an important role in the positive regulation of canonical Wnt pathway.

Introduction

The intestinal epithelium follows the paradigms of stem cell biology established for other self-renewing tissues. Its unprecedented self-renewal rate appears reflected in a high susceptibility to malignant transformation. Current evidence indicates that the Wnt cascade is the dominant force in controlling cell fate along the crypt–villus axis and colon cancer is actually considered as a disease of defective Wnt signaling (1).

Canonical Wnt signals are transduced through Frizzled family receptors and LRP5/LRP6 coreceptor to the beta-catenin signaling cascade. Non-canonical Wnt signals are transduced through Frizzled family receptors and ROR2/RYK coreceptors to the Rho family guanine triphosphatases, c-jun-NH₂-terminal kinase or the Ca²⁺-dependent signaling cascades (2). However, it has become clear that Wnt signals are context dependently transduced (3). It has been established that Protein kinase C (PKC) is one of the key targets of non-canonical Wnt signaling, particularly in the Wnt/Ca²⁺ pathway. In this respect, the phosphatidylinositol (PI) pathway and Ca²⁺ levels

are closely related to PKC activation. According to this, it has been reported that Xwnt5a and rat Frizzled2 activate the phosphatidylinositol pathway and increase the intracellular Ca²⁺ levels in zebrafish embryos (4,5). In *Xenopus* embryos, overexpression of Frizzled causes the translocation of epitope-tagged PKC α from the cytoplasm to the plasma membrane (6,7) and Kuhl *et al.* (8) showed that PKC alpha phosphorylated disheveled *in vitro*. In addition, Kinoshita *et al.* (9) demonstrated that PKC delta is essential for Dsh function in a non-canonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements and that PKC delta regulates the function of Dsh in the Wnt/c-jun N-terminal kinase pathway. Nevertheless, there exist also evidence that PKC may be involved in canonical Wnt pathway regulation. *In vitro*, PKC has been shown to phosphorylate and inactivate glycogen synthase kinase (GSK) 3 β (10). An earlier report showed that a PKC inhibitor Ro31-8220 or chronic treatment with 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate resulted in complete block of Wnt-mediated inhibition of GSK3 β in mouse 10T1/2 fibroblasts (11). Others reported that treatment with the PKC inhibitors GF-109203X or Ro31-8220 caused β -catenin accumulation in certain human breast epithelial cell lines (12). However, Hers *et al.* (13) showed that the PKC inhibitors GF-109203X and Ro31-8220 also inhibit GSK3 β , potentially slowing down β -catenin degradation. Thus, although much evidence suggests that PKC is involved in the Wnt signaling pathway, the molecular roles played by PKC isoforms in this pathway are not well understood because most of the evidence has been obtained using PKC inhibitors that are also potent GSK3 β inhibitors.

On the other hand, PKC isozymes have long been implicated in carcinogenesis. Altered PKC activity, localization and/or expression has been observed in virtually all tumor types examined and classification of PKC isozyme-specific functions in transformed cells is emerging (14). The importance of PKCs in colon cancer has been demonstrated and several lines of evidence indicate that colon carcinogenesis is accompanied by changes in PKC isozyme expression, including a dramatic increase in the level of PKC β II expression (15,16).

The PKC family of serine/threonine kinases is subdivided into three subfamilies: the classical, novel and atypical PKCs (cPKC, nPKC and aPKC, respectively) based on differences in sequence homology and cofactor requirements. Classical PKCs are activated by Ca²⁺ and diacylglycerol (DAG); nPKCs are activated by DAG but not by Ca²⁺, and aPKCs are not activated by these molecules (17) but can be regulated by 3-phosphoinositides (18), by phosphorylation mediated by phosphoinositide-dependent kinase PDK1 (19,20) and through specific protein–protein interactions (21,22). Atypical PKCs have been implicated in establishment of cell polarity, cell proliferation and cell survival (22–25). In this work, we demonstrate that the atypical PKC ζ modulates in a positive manner canonical Wnt signaling by controlling nuclear β -catenin localization.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Antibodies against β -catenin domains were from the following sources: rabbit polyclonal antibody directed against β -catenin N-terminus containing GSK3 phosphorylation sites were purchased from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, murine monoclonal antibodies directed against β -catenin Armadillo repeats and exon 3 were from Calbiochem and murine monoclonal antibodies against β -catenin C-terminal domain were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA and GSK3 mouse monoclonal antibodies were from Chemicon, Billerica, MA. Isozyme-specific polyclonal antibodies against PKC isoforms and c-myc were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Goat anti-mouse and anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugates were from Bio-Rad, Hercules, CA. Protein A-sepharose and the pseudosubstrate-specific PKC ζ inhibitor were from Calbiochem, Proteasome inhibitor MG-132 was obtained from Sigma, St. Louis, MO. All other chemicals were reagent grade.

Abbreviations: FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; PKC, protein kinase C; PI, phosphatidylinositol; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase.

Plasmids

The pTOPFlash and pFOPFlash reporter plasmids were obtained from Upstate Biotechnology. Plasmids encoding dominant-negative PKC ζ (Flag.PKCzeta.K/W, Addgene plasmid 10800, Cambridge, MA) (26) and β -catenin degradation-resistant mutant (pcDNA3-S33Y β -catenin, Addgene plasmid 19286) (27) were obtained from Addgene, a non-profit organization dedicated to making it easier for scientists to share plasmids. Plasmid-encoding human β -catenin (CTNNB1) was obtained from OriGene, Rockville, MD (catalog No. SC107921). For knockdown PKC ζ experiments, we used the pSUPER.PKCzeta.RNAi plasmid donated by Dr Alex Toker to Addgene (Addgene plasmid 10803) whose construction and effectiveness are described in (28).

Cell culture

RKO (human colon carcinoma), HT-29 or SW480 (human colorectal adenocarcinoma) malignant cells and non-malignant IEC-18 (rat epithelial intestinal cells) and 112CoN (human colon) cells were all obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). RKO and 112CoN cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (120 mg/ml penicillin and 200 mg/ml streptomycin) and 2 mM L-glutamine. IEC-18 cells were cultured in the same medium but supplemented with 5% FBS, antibiotics, L-glutamine, 4.5 g/l glucose and 0.1 U/ml insulin. HT-29 cells were maintained in McKoy medium supplemented with 10% FBS, antibiotics and 2 mM glutamine. SW480 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium F-12 supplemented with 5% FBS, antibiotics and 2 mM glutamine. All cells were cultured in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C.

Transfection and luciferase reporter gene assay

Transfection was carried out with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 24-well plates at 3.5×10^5 cells per well. Twenty-four hours after seeding, cells were placed in a serum-free medium and transiently transfected with 0.7 μ g of reporter plasmid (pTOPFlash) or control plasmid (pFOPFlash) plus 0.05 μ g of pRL luciferase plasmid (transfection control). Luciferase reporter activity was measured 24 h after transfection in cell lysates using the Dual luciferase assay kit (Promega, Madison, WI). The activity was normalized with respect to the activity of Renilla luciferase or with the protein content in each sample. To express a dominant-negative form of PKC ζ (K/W), cells were transiently transfected with 0.5–2 μ g of plasmid Flag.PKCzeta.K/W obtained from Addgene (ID10800) using Lipofectamine 2000.

Incubation with Wnt3a ligand and pharmacological inhibition of PKC ζ

For the pharmacological PKC ζ inhibition in SW480 cells, 24 h posttransfection with the pTOPFlash or pFOPFlash plasmids, cells were incubated in the absence or presence of the myristoylated PKC ζ -selective inhibitor (10–100 μ M) for 1 h. Then, cells were washed, homogenized and luciferase activity was measured. In the case of RKO cell line, transfected cells were serum starved (2% instead of 10%) for 10 h and treated with Wnt3a (100 ng/ml; Chemicon) for a total 12 h period. During the last hour, cells were also incubated in the absence or presence of myristoylated PKC ζ -selective inhibitor (10–100 μ M). Cells were washed, homogenized and luciferase activity was measured.

PKC ζ knockdown

In the cases of transient silencing of PKC ζ , cells were transfected with pSuperPKCzRNAi plasmid (constructed and probed by Dr Alex Toker, as described in ref. 29) or with control plasmid obtained from Addgene (ID 10803) using Lipofectamine 2000. In some experiments, cells were also transiently cotransfected with the pTOPFlash or pFOPFlash plasmids and with increasing amounts of pSuper.PKCz.RNAi plasmid maintaining constant the total amount of transfected DNA (2 μ g) by adding pSuper plasmid control.

To generate stable transfections, SW480 cells were transfected with either 1 μ g of control pSuper plasmid or cotransfected with 900 ng of pSuperPKCzRNAi plus 100 ng of pSUPERpuro plasmids. Stable transfectants were selected with 3 μ g/ml puromycin (Sigma) for 4 weeks, and clones were picked and screened for PKC ζ silencing by flow cytometry.

Western blotting

Samples of protein (100 μ g) were separated by 10 or 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody. Detection was achieved using the Supersignal kit (Pierce, Rockford, IL) with a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. An actin antibody was used as control for equal loading.

Immunofluorescence analysis

RKO or IEC-18 cells were grown on coverslips. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed in ice-cold acetone for 5 min, washed in PBS and blocked with 1% IgG-free bovine serum albumin for 1 h. The cells

were incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies in blocking solution, washed three times with PBS and incubated for 1 h in darkness at room temperature with secondary antibodies [fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit and TRITC-conjugated goat anti-mouse]. After washing, the coverslips were mounted with the antifade reagent Vectashield. The fluorescence of cells was examined using a confocal microscope (Leica TCS SP5) with a krypton argon laser.

3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide assay

SW480 cells were grown in 24-well plates at 1.2×10^5 cells per well for 24 h. Then, 20 μ M of the PKC ζ -selective inhibitor was added to the medium and the incubation period continued for 24 h. Cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT; 0.5 mg/ml final concentration) for additional 3 h at 37°C. Reaction was stopped adding 1 ml of acid isopropanol to each well. Formazan salts were dissolved and quantified spectrophotometrically at 570 nm.

Reverse transcription–polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from cells 48 h after transfection using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Total RNA was reverse transcribed using SuperScript One-Step reverse transcription–polymerase chain reaction with Platinum Taq (Invitrogen) using the following gene-specific primers: human c-myc forward: 5'-TACCCTCTCAACGACAGCAG-3'; human c-myc reverse: 5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTG-3'. GAPDH was reverse transcribed under the same conditions to be used as control, with the following primers: forward 5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA-3'; reverse 5'-GGATGACCTTGCCCCACAGCCT-3'.

Immunoprecipitation

Confluent cells were washed and homogenized in ice-cold lysis buffer containing 20 mM Tris–HCl pH 7.5, 10 mM ethyleneglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetic acid, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5% Triton X-100 and a mixture of protease inhibitors and protein phosphatase inhibitors. Aliquots of cell extracts (1 mg/ml) were incubated overnight with 1 μ g/ml of primary antibody at 4°C with gentle shaking. Then, 20 μ l protein A-sepharose (30%) were added and incubation continued for 2 h. Immune complexes were then washed three times with buffer A (50 mM Tris–HCl, 0.6 M NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Non-idet P-40, pH 8.3) supplemented with 0.1 mg/ml trypsin inhibitor and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and once with buffer B (20 mM Tris–HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl) containing protease and phosphatase inhibitors.

Quantification of nuclear β -catenin by FACS analysis

Nuclei were purified from 1×10^6 cell samples using a Nuclei Isolation Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) according to manufacturer's instructions. Nuclei were washed with staining buffer and fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS. Then they were permeabilized with ice-cold 0.1% Triton X-100 in PBS during 10 min and centrifuged to remove the supernatant. Nuclei were blocked in staining buffer and then labeled with anti-human β -catenin antibody at 1:50 dilution in staining buffer followed by goat anti-mouse-FITC secondary antibody at 1:100 dilution in staining buffer. As negative control, nuclei maintained in separate tubes were treated in parallel with FITC-labeled mouse IgG1 antibody and with FITC-labeled secondary antibody. After final wash, nuclei were fixed with ice-cold PBS containing 2% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry using a FACScalibur apparatus (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY). To analyze, independent gates were generated for intact cells (R1) or isolated nuclei staining with propidium iodide (R2) before flow cytometry analysis.

Xenograft tumor model

Stably transfected SW480 cells with control pSUPER plasmid (thus expressing endogenous wild-type PKC ζ) or with pSuperPKCzRNAi (PKC ζ knockdown) were collected by trypsinization. Then, 7.5×10^5 cells per injection site were resuspended in high concentration Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NY), diluted in PBS to 50% final concentration and subcutaneously injected into the flanks of 8-week-old CD1 nude mice. Each mouse was injected at two sites at the right flank with control cells and at the left flank with knockdown PKC ζ cells. Three weeks after inoculation, animals were euthanized and tumors were removed and weighted.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of the data was performed by the Student's *t*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

PKC ζ and β -catenin coimmunoprecipitate in a reciprocal manner and colocalize in malignant cells

It has been reported that colon tumoral cell lines exhibit marked changes in PKC isoform expression pattern compared with normal

(non-malignant) cells (14). Whereas some PKC isoforms such as α , δ and β I are downregulated in malignant cells, others, like atypical PKC ζ , are upregulated in these cells in comparison with non-malignant ones as shown in Figure 1A. Since atypical PKC ζ has been involved in establishment of cell polarity, cell proliferation and cell survival in many cellular systems (30), we hypothesized that it may interact with Wnt key canonical proteins. In order to investigate this, β -catenin was immunoprecipitated from normal 112CoN and from malignant RKO or SW480 cell extracts and the immunoprecipitates analyzed by western blot. As it can be observed in Figure 1B, PKC ζ coimmunoprecipitated in a reciprocal manner with β -catenin mainly from malignant cells. The interaction is specific since PKC δ , which is also expressed in these cells, did not coimmunoprecipitate with β -catenin as shown in the Figure 1B. Consistent with these results, immunofluorescence assays followed by confocal microscopy analysis presented in Figure 1C, showed a clear colocalization of β -catenin with PKC ζ in malignant cells at the cytoplasm and in some regions of the nucleus, but not in non-malignant 112CoN or IEC-18 cells in

which β -catenin (red) appeared located at the plasma membrane, whereas PKC ζ (green) localized at the cytoplasm.

PKC ζ -selective inhibitor blocked β -catenin-mediated transcriptional activity in both RKO and SW480 colon carcinoma cell lines

In order to examine the effect of PKC ζ inhibition on canonical Wnt signaling, we employed the β -catenin transcriptional activity reporter system TOPFlash/FOPFlash. We have used RKO human malignant cells that have normal canonical Wnt signaling (express wild-type APC and are responsive to ligand in comparison with SW480 human malignant cells that express a truncated version of APC and have constitutively active Wnt signaling. The specificity of the selective PKC ζ myristoylated pseudosubstrate inhibitor was examined by *in vitro* activity assays and the dose required to effectively inhibit PKC ζ (data not shown). Twenty-four hours posttransfection with the pTOPFlash or pFOPFlash plasmids, RKO malignant cells were incubated in the absence or presence of Wnt3a (100 ng/ml) for 12 h and during the last hour, both SW480 and RKO cells were

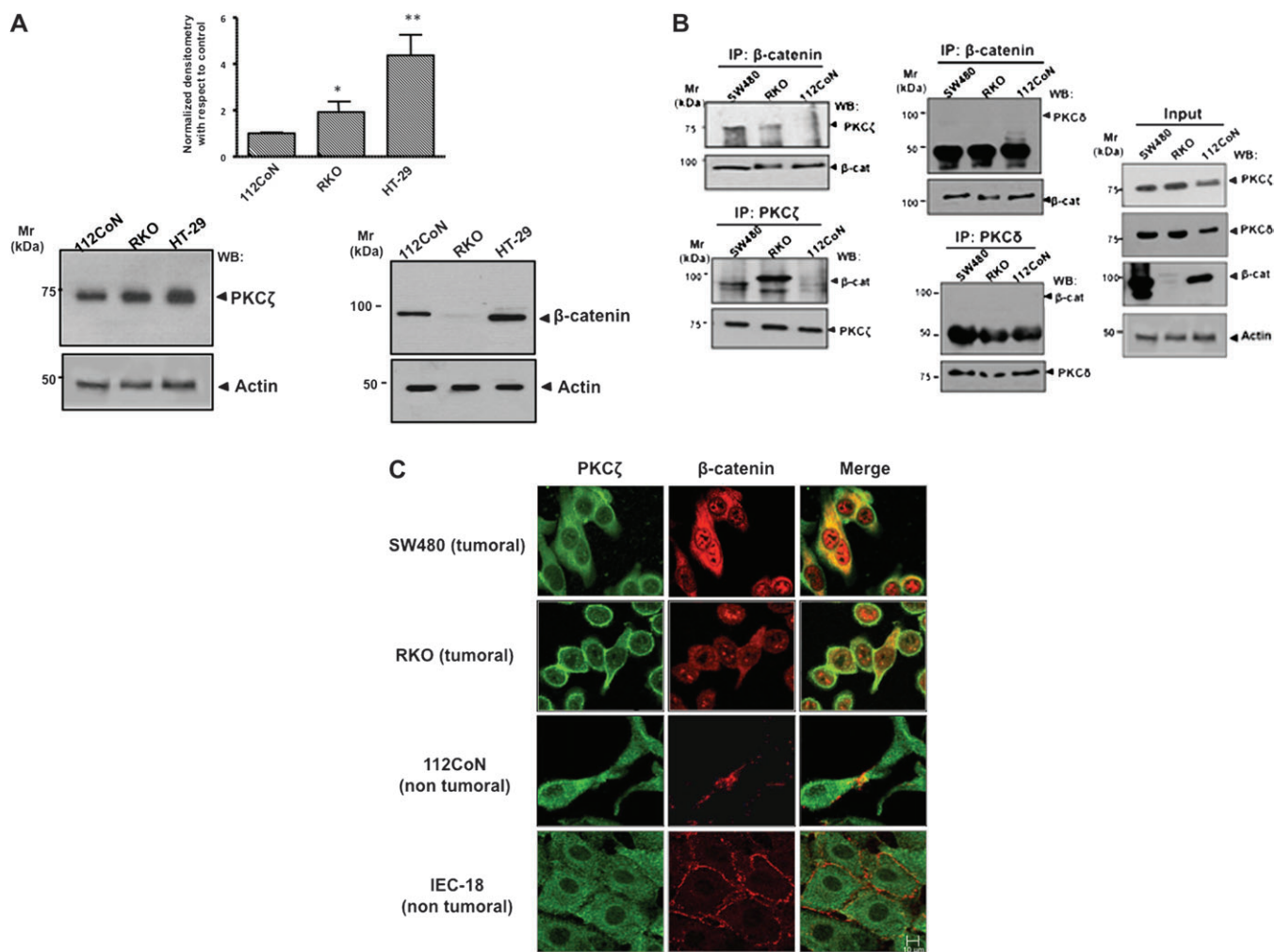


Fig. 1. PKC ζ specifically interacts with β -catenin. (A) Expression analysis of PKC ζ . Samples of cell extracts (50 μ g) obtained from non-malignant 112CoN cells and from malignant RKO and HT-29 cells were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was performed using antibody against PKC ζ or against β -catenin and developed with a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. An actin antibody was used as control for equal loading. Densitometric analysis was performed to estimate the level of PKC ζ expression. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations. (B) PKC ζ and β -catenin coimmunoprecipitate in a reciprocal way. Cells were washed and lysed. PKC ζ or β -catenin were immunoprecipitated from cell lysates obtained from non-malignant 112CoN cells or from malignant human RKO and SW480 cells. Immunoprecipitates were analyzed by western blot for the presence of the protein indicated in the figure. The results are representative of four independent experiments using different cell preparations. (C) β -Catenin colocalizes with PKC ζ in malignant cells. Cells were fixed, permeabilized and coimmunostained with antibodies against PKC ζ and β -catenin. Fluorescence was analyzed by laser confocal microscopy as described under ‘Materials and Methods’. PKC ζ was visualized with FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody and β -catenin with TRITC-conjugated goat anti-mouse antibody. Data are representative of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

also incubated in the absence or presence of the PKC ζ -specific inhibitor (20 μ M). As it can be observed in Figure 2A, PKC ζ inhibition substantially decreased the constitutive β -catenin-mediated transcriptional activity in SW480 cells and also the Wnt3a-induced β -catenin transcriptional activity in RKO cells. When the pTOPFlash or pFOPFlash-transfected SW480 cells were incubated in the absence or presence of increasing amounts of the PKC ζ inhibitor, the transcriptional activity mediated by β -catenin was blocked in a dose-dependent manner, as it can be observed in Figure 2B. Taken together, these results suggest that PKC ζ modulates in a positive way the canonical Wnt pathway.

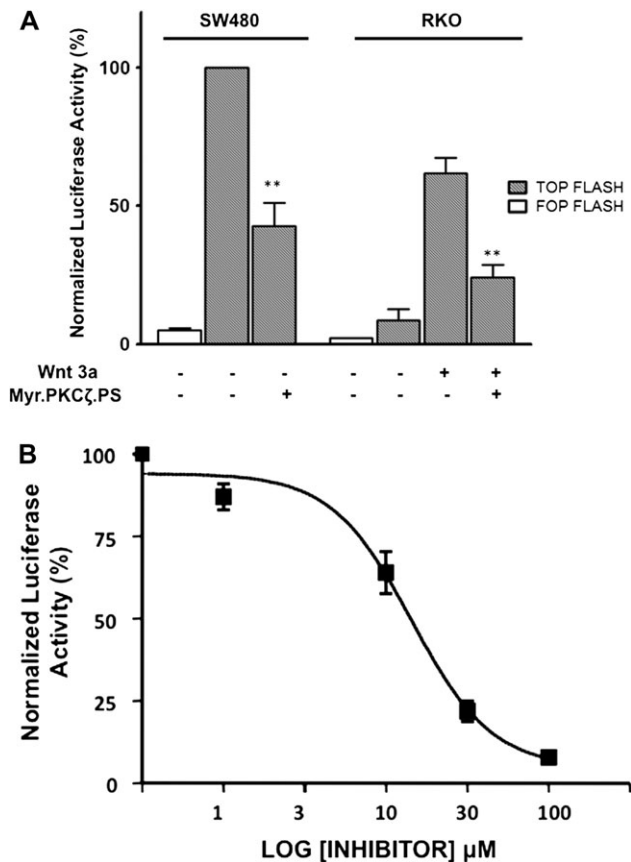


Fig. 2. PKC ζ inhibition blocks β -catenin-mediated transcriptional activity. (A) A myristoylated PKC ζ pseudosubstrate inhibitor blocks both constitutive and Wnt3a-induced β -catenin transcriptional activity. SW480 or RKO cells were cotransfected with pRL and the TOPFlash or FOPFlash reporter plasmids. Twenty-four hours posttransfection, RKO cells were serum starved (2%) for 10 h and then Wnt3a (100 ng/ml) was added to the medium to stimulate cells for 12 h period. During the last hour, cells were also incubated in the absence or presence of 20 μ M myristoylated PKC ζ inhibitor. In the case of SW480 cells, 24 h posttransfection cells were incubated in the absence or presence of the inhibitor for 1 h. After incubation with or without the inhibitor, cells were washed, lysed and luciferase activity was assayed. The activity was normalized with respect the activity of Renilla luciferase or with respect the protein content in each sample. The results represent the means \pm SEM of at least three independent experiments. ** $p < 0.01$. (B) PKC ζ inhibitor blocks in a dose-dependent manner, the transcriptional activity mediated by β -catenin. Twenty-four hours posttransfection of SW480 cells with the pTOPFlash plasmid, cells were incubated in the absence or presence of the myristoylated PKC ζ -selective inhibitor (10–100 μ M) for 1 h. Then, cells were washed, homogenized and luciferase activity was measured and normalized with respect to the total protein content in the cell lysate. The results represent the means \pm SEM of at least three independent experiments.

PKC ζ knockdown or expression of a dominant-negative (kinase dead) PKC ζ decreases dose dependently the β -catenin-mediated transcriptional activity

In order to confirm that the observed effects were mediated by PKC ζ inhibition, we used an RNAi approach to transiently block the PKC ζ expression. It is important to mention that plasmids used have been constructed and successfully probed previously by Dr Alex Tokar (28) who donated the plasmids to Addgene from which we obtained them (see Materials and Methods). As we show in Figure 3A, a great reduction in PKC ζ protein level was observed 36 h after transfection with 2 μ g small interference RNA plasmid in comparison with plasmid control. Maintaining invariable the total amount of DNA transfected, we tested increasing small interference RNA–PKC ζ plasmid concentrations (0, 1 or 2 μ g) to determine whether the effects on β -catenin reporter transcriptional activity in SW480 cells were dose dependent. Results presented in Figure 3A clearly showed that the reporter activity decreased as siRNA–PKC ζ was increased. These results confirmed that the effects observed on canonical Wnt signaling are mediated by the atypical PKC ζ and reinforce the notion about the positive role played by this PKC isozyme in Wnt pathway.

We next asked if the catalytic activity of PKC ζ was needed to mediate the positive effects on β -catenin-mediated actions. To express a dominant-negative form of PKC ζ (K/W), SW480 cells were transiently cotransfected with void plasmid or with 1 or 2 μ g of Flag-PKC ζ K/W plasmid and with the TOPFlash/FOPFlash reporter. After 24 or 36 h posttransfection, the reporter activity was examined, as shown in Figure 3B. The level of expression of endogenous and kinase dead PKC ζ is shown at the right of the Figure 3. It can also be seen that β -catenin reporter transcriptional activity was negative affected in a dose-dependent way in a similar manner at both 24 or 36 h posttransfection, thus indicating that the effects observed are mediated by the catalytic activity of PKC ζ .

PKC ζ inhibition blocks SW480 cell proliferation and diminishes the expression of the Wnt target gene c-myc

Since canonical Wnt signaling activation promotes cell proliferation via the expression of target genes such as c-myc and cyclin D1, we hypothesized that PKC ζ inhibition in SW480 cells might reduce the expression of c-myc and the cell proliferation. To test this, SW480 cells were incubated 24 h in the absence or presence of 20 μ M PKC ζ myristoylated pseudosubstrate inhibitor. After this time, MTT was added to the medium for 3 h and proliferation assayed. As it can be seen in Figure 4 panel A, the PKC ζ inhibitor blocked >50% the cell proliferation in comparison with control (vehicle treated) cells. We also examined the effect of PKC ζ inhibition on the key Wnt target gene c-myc expression. Figure 4B shows that the expression of c-myc both at the level of protein (left) and at the level of messenger RNA (right) were decreased as result of PKC ζ inhibition, in comparison with control (vehicle treated) cells.

PKC ζ silencing affects the tumorigenic activity of engrafted SW480 cells

In order to determine the effect of small interference RNA-mediated knockdown of PKC ζ in tumorigenic activity of SW480 cells, we made use of a xenograft model in immunocompromised mice. Stably transfected SW480 cells with control pSUPER plasmid or with pSuperPKC ζ RNAi were obtained as described under Materials and Methods and selected by FACS analysis. As shown in Figure 4C, stable transfectants exhibiting >90% decreased expression of PKC ζ were obtained. These cells were isolated, grown and subcutaneously injected into the left flanks of immunocompromised nude mice. In the same animals, control cells stably transfected with pSuper control plasmid and thus expressing wild-type PKC ζ were subcutaneously injected into the right flanks of each animal. After 3 weeks, mice were killed by cervical dislocation and tumors were removed and weighted. Notably, all mice produced little tumors from control cells (Figure 4C bottom, right flanks, 28 mg average weight) at the time of killing, whereas knockdown cells injected in the same animals did not form

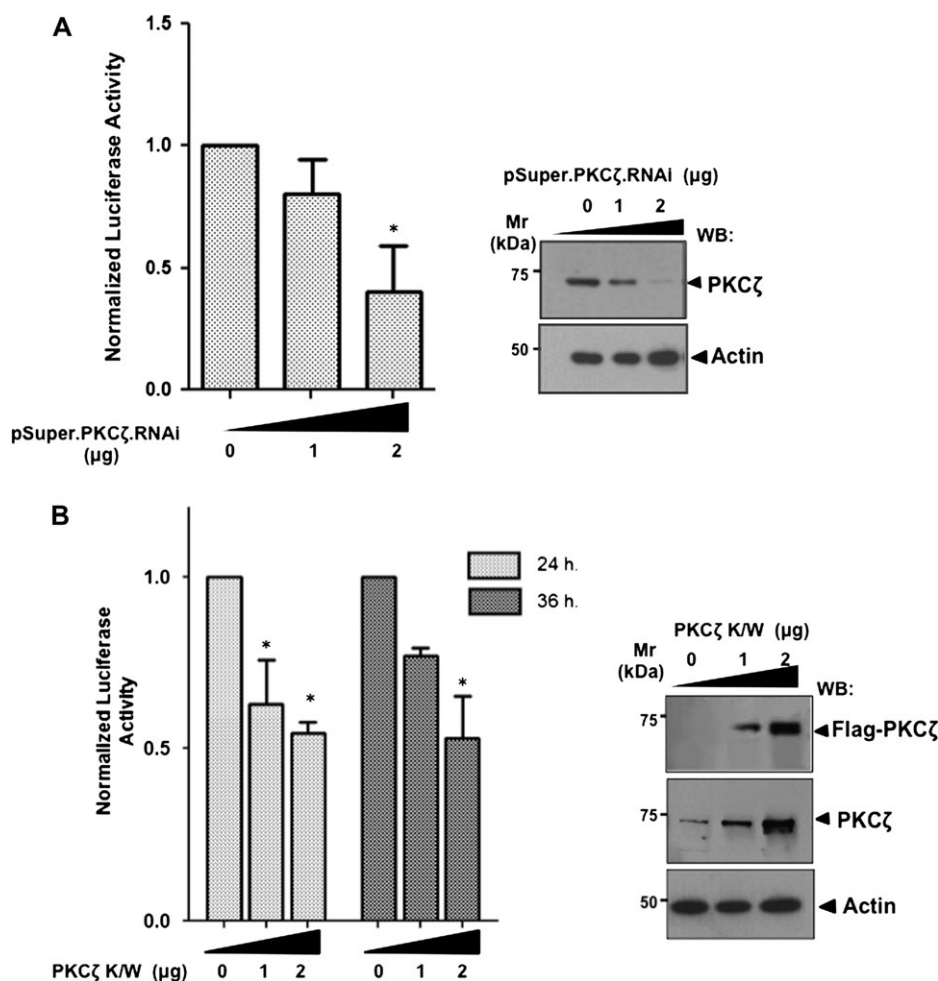


Fig. 3. (A) PKC ζ knockdown dose dependently the β -catenin-mediated transcriptional activity. At the right of the figure, it is shown the efficiency of the knockdown of PKC ζ determined by western blot 24 h posttransfection with increasing amounts of pSuperPKC ζ RNAi. SW480 cells were transiently cotransfected with the pTOPFlash plasmid and with increasing amounts of pSuper.PKC ζ RNAi plasmid as indicated in the figure maintaining constant the total amount of transfected DNA (2 μ g) by adding pSuper plasmid control. Twenty-four hours posttransfection, luciferase activity was assayed and normalized with respect to the total protein content in the cell lysate. The results represent the means \pm SEM of at least three independent experiments. (B) The PKC ζ activity is required to block the β -catenin transcriptional activity. SW480 cells were cotransfected with 1 or 2 μ g of plasmid encoding a Flag-tagged kinase dead form of PKC ζ and with TOPFlash reporter plasmid. Twenty-four or 36 h after transfection, luciferase activity was assayed and normalized with respect to Renilla luciferase activity. The Flag-tagged kinase dead PKC ζ overexpression and endogenous PKC ζ expression were verified in SW480 cells by western blot 24 h after transfection as shown at the right of the figure. The results represent the means \pm SEM of at least three independent experiments. * p < 0.05.

tumors (see Figure 4C left flank, bottom). There was only one animal that produced tumors from both control and knockdown cells (photograph in Figure 4C, top) but even in this case, the weight of the tumor produced by knockdown cells was the half of that produced from control cells. Therefore, these results clearly indicated that PKC ζ -depleted cells exhibit a diminished tumorigenic activity in grafted mice indicating an important role for PKC ζ in tumor growth *in vivo*.

PKC ζ inhibition modulates canonical Wnt activation without altering β -catenin expression levels but regulating β -catenin localization

Because the stability and localization of β -catenin are the main important mechanisms by which its actions are tightly regulated, we investigated the effects of PKC ζ inhibition on these parameters. To this end, SW480 cells were incubated 30, 45 min or 1 h in the absence or presence of 20 μ M PKC ζ myristoylated pseudosubstrate inhibitor. After indicated times, cytoplasmic and nuclear fractions were obtained from the cell extracts and the presence of β -catenin analyzed in each fraction by western blot. Interestingly, we have found that there was no detectable degradation of β -catenin protein levels in cell extracts of SW480 cells obtained from treated cells (1 h) in comparison with control untreated ones as it can be observed in Figure 5A

(top). However, in spite the total amount of β -catenin was unchanged, its localization was changed as result of PKC ζ inhibition: whereas cytoplasmic β -catenin levels increased, nuclear β -catenin levels were simultaneously decreased. Notably, the fast time-course observed to promote exit of β -catenin from the nucleus (Figure 5A down) was compatible with the rapid negative effect seen on transcriptional activity after only 1 h treatment of cells with the PKC ζ inhibitor as shown in Figure 2A.

To confirm that PKC ζ does not affect β -catenin levels, RKO cells were cotransfected with reporter plasmid TOPFlash and with a plasmid-encoding wild-type β -catenin or encoding a β -catenin degradation-resistant mutant (S33Y). As expected, β -catenin transcriptional activity increased as result of overexpression of wild-type or mutant β -catenin in RKO cells (Figure 5B). When the cells were incubated in the absence or presence of PKC ζ inhibitor, a blockade of β -catenin transcriptional activity was induced as result of PKC ζ inhibition in the same proportion both in β -catenin wild-type-expressing cells as in β -catenin degradation-resistant mutant expressing cells (Figure 5B). In addition, the effect of preincubation with the proteasome inhibitor MG-132 was examined. The optimal concentration and incubation time were determined in RKO cells, which do not have constitutively active canonical Wnt pathway. As shown in Figure 5C, treatment of

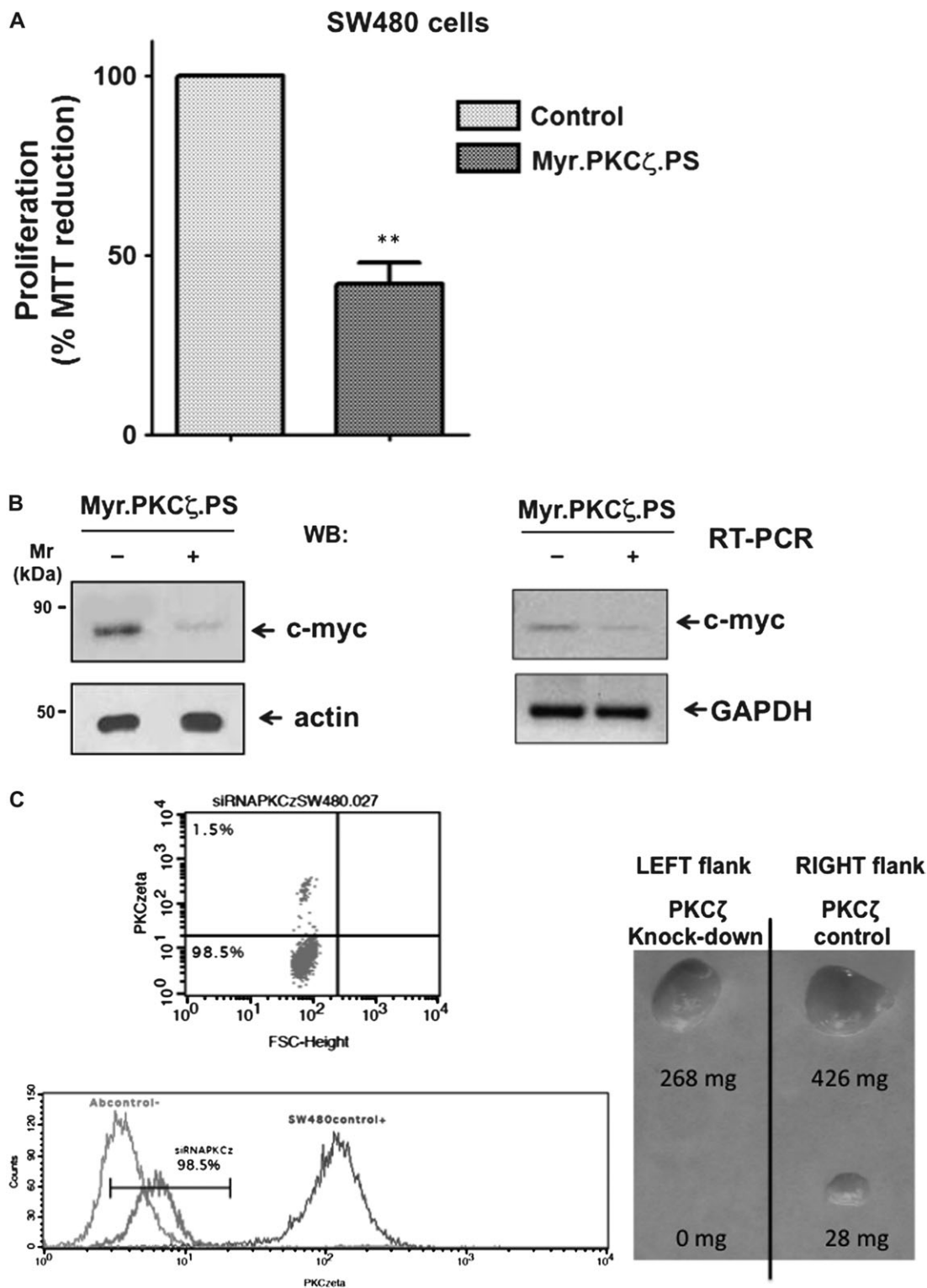


Fig. 4. PKC ζ inhibition decreases SW480 cell proliferation and Wnt target gene expression. (A) Cell proliferation assay. SW480 cells were grown for 24 h in the absence (vehicle) or presence of 20 μ M PKC ζ inhibitor. The cells were then treated with 0.5 mg/ml (final concentration) of MTT solution for 3 h at 37°C. Reaction was stopped and the cell samples quantified spectrophotometrically at 570 nm. $**p < 0.01$. (B) Both RNA and protein expression of the Wnt target gene c-myc were reduced as result of PKC ζ inhibition. SW480 cells were grown in 24-well plates in the absence or presence of 20 μ M PKC ζ pseudosubstrate inhibitor for 6 h. Cell lysates were then prepared to perform western blot analysis for c-myc protein expression (left) or reverse transcription–polymerase chain reaction for c-myc messenger RNA expression (right), respectively. The data are representative of four independent experiments. (C) Knockdown of PKC ζ diminishes tumorigenesis of SW480 cells in nude mice. Stable control or PKC ζ knockdown transfectants were obtained as described under Materials and methods. Selected clones were picked and screened for PKC ζ silencing in comparison with control cells by flow cytometry as shown at the left of the figure. Selected cells were grown and used for engraftment. 7.5×10^5 cells per injection site were subcutaneously injected into the flanks of immunocompromised nude mice. Each mouse was injected at the right flank with control cells, and at the left flank with knockdown PKC ζ cells. Three weeks after inoculation, animals were euthanized and tumors were removed and weighted. A photograph with representative tumors obtained is shown at the right of the Figure.

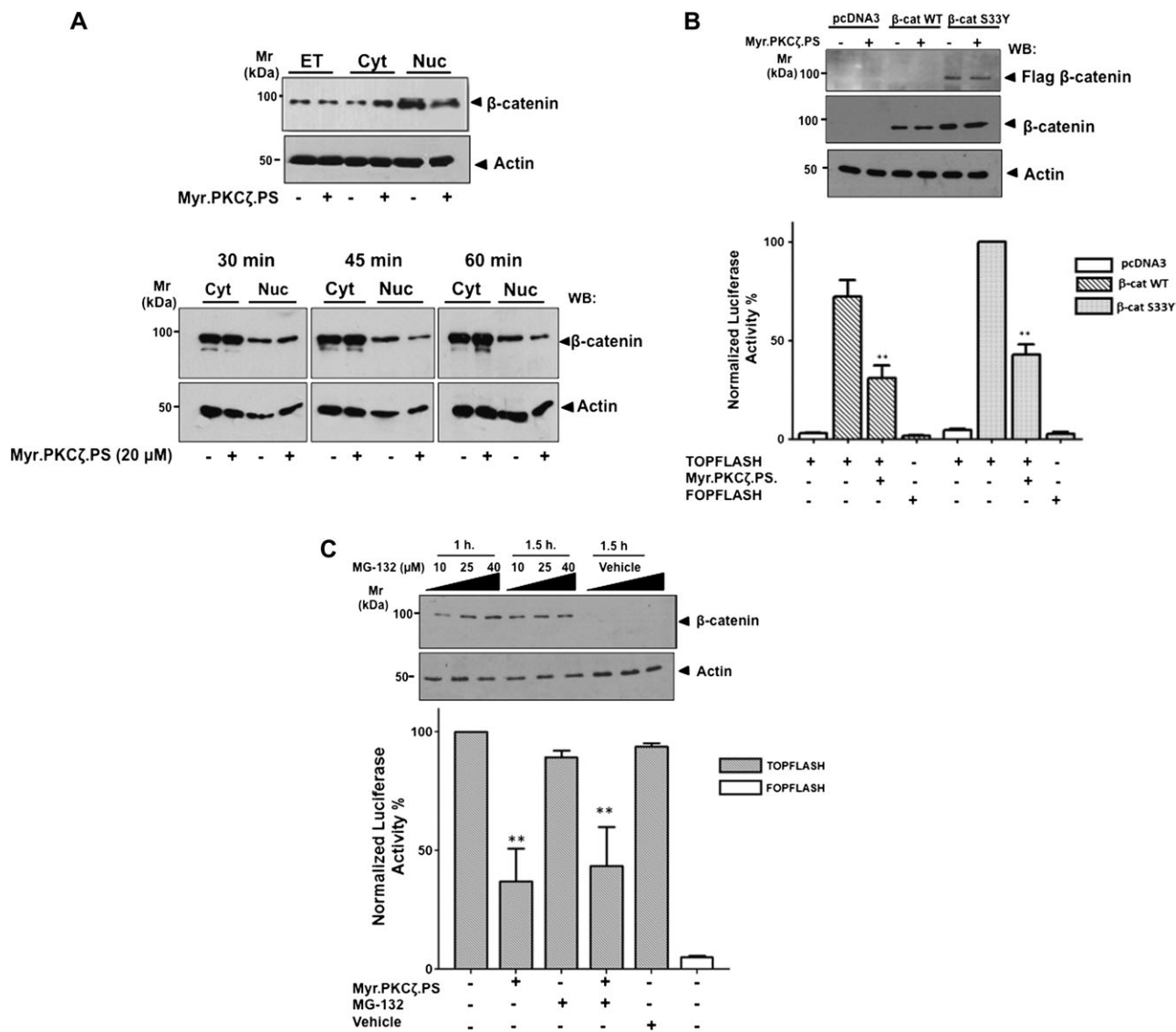


Fig. 5. PKCζ inhibition does not affect β-catenin protein levels. (A) Total amount of β-catenin does not change in SW480 cells as result of PKCζ inhibition, but there is a change in the nuclear/cytoplasmic distribution pattern exhibited by β-catenin. SW480 cells were incubated in the absence or presence of the myristoylated PKCζ inhibitor (20 μM) for the times indicated in the figure. Then, cells were washed, homogenized and nuclear and cytoplasmic fractions were obtained from total cell extracts. β-Catenin localization was analyzed in total cell extracts and in each fraction by western blot. Actin was used as control for equal loading. The results represent the means ± SEM of at least three independent experiments. (B) Inhibition of β-catenin transcriptional activity is also induced in cells expressing β-catenin degradation-resistant mutant. RKO cells were cotransfected with the TOPFlash reporter gene (0.5 μg) or FOPFlash (0.5 μg) and either with wild-type β-catenin, the Flag-tagged β-catenin S33Y degradation-resistant mutant or with empty pcDNA3 plasmid as control (2 μg). At 24 h posttransfection, cells were incubated in presence or absence of 30 μM PKCζ pseudosubstrate inhibitor for 1 h and lysates were harvested for luciferase activity determination. The activity was normalized with respect to protein content (lower panel) and the expression of β-catenin was analyzed by western blot in total cell lysates (upper panel). The results represent the means ± SEM of three independent experiments. ***p* < 0.01. (C) Proteasome inhibition does not affect the blockade of β-catenin transcriptional activity induced by PKCζ inhibition. In order to obtain the optimal MG-132 concentration, RKO cells were treated with increasing concentrations (10–40 μM) of the proteasome inhibitor MG-132 or with the vehicle (0.8% dimethyl sulfoxide) for 1 or 1.5 h. Cell extracts were then analyzed by western blot for β-catenin expression and actin as loading control (upper panel). From this results, we chose 25 μM MG-132 as optimal concentration for subsequent assays. SW480 cells were transfected with the TOPFlash reporter gene or the control FOPFlash (0.5 μg). Twenty-four hours posttransfection cells were pretreated 30 min with 25 μM of MG-132 or vehicle (0.5% dimethyl sulfoxide) and then treated with 20 μM of PKCζ inhibitor for 1 h. Cells were lysed and assayed for luciferase activity normalizing with respect to the extract protein content. The data are representative of three independent experiments. ***p* < 0.01.

RKO cells with increasing concentrations of MG-132 during 1 or 1.5 h resulted in β-catenin stabilization (Figure 5C top) with respect to untreated control cells. When SW480 malignant cells transfected with the pTOPFlash or pFOPFlash plasmids, were preincubated in the absence or presence of MG-132 (25 μM during 1.5 h.) and then treated in the absence or presence of PKCζ inhibitor (20 μM), a decrease in β-catenin-mediated transcriptional activity was observed in

PKCζ inhibited cells in spite the inhibition of the proteasome stabilized β-catenin levels (Figure 5C). These data suggested therefore that PKCζ activity does not affect β-catenin protein levels but instead is needed to regulate β-catenin localization. In order to investigate this, immunofluorescence assays were performed to visualize the localization of β-catenin in SW480 cells incubated during 1 h in the absence or presence of PKCζ inhibitor (20 μM).

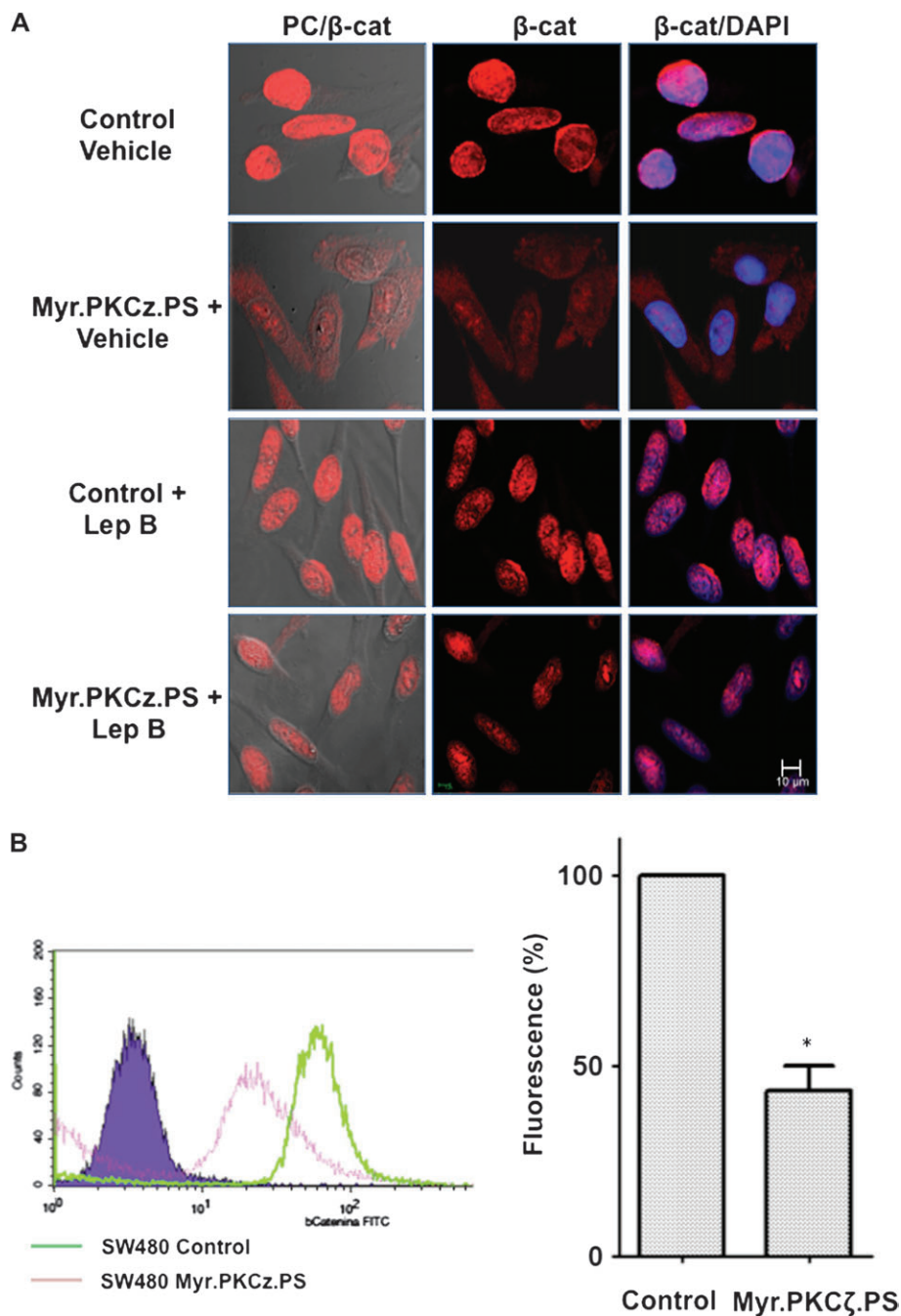


Fig. 6. PKC ζ inhibition promotes β -catenin exit from SW480 cell nuclei. (A) The PKC ζ inhibition results in a CRM-1-dependent export of β -catenin from the nucleus. SW480 cells were pretreated with 2.5 ng/ml of Leptomycin B or vehicle (methanol) for 30 min and then treated with 20 μ M of PKC ζ inhibitor (Myr.PKC ζ .PS) for 1 h. Cells were fixed, permeabilized and immunostained with antibodies against β -catenin and then with a rhodamine-conjugated secondary antibody. Nuclear staining was obtained by incubating the coverslips with 4'-6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Fluorescence was analyzed by laser confocal microscopy (Leica, Wetzlar, Germany). Data are representative of four independent experiments. (B) Quantification of the rate of β -catenin exportation from the nuclei as result of treatment of cells with PKC ζ inhibitor. Sw480 cells were incubated in the absence or presence of 20 μ M myristoylated PKC ζ inhibitor for 1 h. Nuclei were purified from these cells, washed, fixed, permeabilized and blocked. Then, they were subsequently labeled with anti β -catenin and with goat anti-mouse-FITC secondary antibody in staining buffer. As negative control, nuclei maintained in separate tubes were treated in parallel with FITC-labeled mouse IgG1 antibody and with FITC-labeled secondary antibody. After final wash, nuclei were fixed and analyzed by flow cytometry using a FACScalibur apparatus. To analyze, independent gates were generated for intact cells (R1) or isolated nuclei staining with propidium iodide (R2) before flow cytometry analysis. A representative experiment is shown at the left of the figure. Histogram representing the percentage of fluorescence corresponding to percentage of β -catenin present at nuclei is shown at the right. Data represent mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$.

Figure 6A clearly shows that there was a substantial exit of β -catenin from the nucleus as result of PKC ζ inhibition. Quantification by flow cytometry of the β -catenin exportation ratio induced by 20 μ M PKC ζ inhibitor (IC₅₀ concentration, see Figure 2B) indicated that it

was >50%, as shown in Figure 6B. When the cells were preincubated with the exportin 1 (CRM-1) inhibitor Leptomycin B, the β -catenin exit induced by PKC ζ inhibition was completely blocked (Figure 6A). Taken together, data indicated that PKC ζ activity is

needed to maintain β -catenin at the cell nuclei in order to activate canonical Wnt signaling.

Discussion

Although it is well known that Wnt and PKC signaling pathways are both involved in the colon carcinogenesis process and tumor progression, their synergistic contribution to these processes or crosstalk between them has just recently been approached (6,8–10). PKC is one of the key targets of non-canonical Wnt signaling, particularly in the Wnt/Ca²⁺ pathway. However, there also exist evidence that indicates that PKC may be involved in canonical Wnt pathway regulation. In this respect, whereas the interaction of PKC ζ with elements of canonical Wnt signaling such as GSK3 β had been described previously (10,17), the interaction between atypical PKC ζ and β -catenin had not been reported before. Here, we provide evidence that atypical PKC ζ selectively interacts with β -catenin and that PKC ζ modulates in a positive way the canonical Wnt pathway.

The atypical PKCs (aPKC) differ from other PKCs in that their catalytic activity is not dependent upon diacylglycerol, calcium or phosphatidylserine. This functional divergence is due to a unique N-terminal regulatory domain on aPKCs that lacks calcium-, phospholipid- and diacylglycerol-binding motifs. The activity of this type of PKC isozymes can be regulated by 3-phosphoinositides, phosphorylation by the phosphoinositide-dependent kinase PDK1 and through specific protein–protein interactions (22). We have found here that the mechanism by which PKC ζ seems to modulate Wnt pathway is through regulating the nuclear localization of β -catenin instead of regulating its stability (Figures 5 and 6). The nuclear localization control provides a very rapid and efficient mechanism to block Wnt target gene expression. Consistent with this, we have found that the treatment for only 1 h with PKC ζ inhibitor induced a severe blockade of the robust β -catenin-mediated transcriptional activity exhibited by SW480 cancer cells.

Nuclear β -catenin is the hallmark of activated canonical Wnt signaling. Thus, nuclear import/export of β -catenin represents a crucial step in regulating signaling competent β -catenin levels and serves as an attractive target for pharmacological interventions in cancer and other diseases associated with altered Wnt signaling. The conservation of nuclear shuttling activity in cancer may be important for cell survival or growth. β -Catenin contains no recognizable nuclear localization signal, so it has been proposed that it is imported by a Piggyback mechanism. However, it has been demonstrated that β -catenin nuclear import can occur in the absence of transport factors such as importins or the Ran GTPase (31). Moreover, β -catenin was found to compete with importin- β for docking to components of the nuclear pore complex. Indeed, the central arm repeats are required for β -catenin import, and these are structurally related to the importin- β HEAT repeats that bind the nuclear pore complex (32).

With respect to the β -catenin nuclear export, although the precise mechanism is not completely understood, to date, several distinct β -catenin nuclear export pathways have been reported. For example, APC and Axin, besides their function in the destruction complex, have been shown to shuttle between the nucleus and the cytoplasm and facilitate nuclear export of β -catenin by CRM-1-dependent pathway (33,34). On the other hand, there is also experimental evidence that β -catenin can directly bind to CRM-1 through its central armadillo (ARM) repeats region independently of APC to exit the nucleus (35). In addition, it was reported that treatment with Leptomycin B, a specific inhibitor of CRM-1-mediated nuclear export, causes a dramatic retention of nuclear β -catenin induced by leukocyte enhancer factor-1 (36). Consistent with this, we showed here that a CRM-1-mediated pathway is involved in PKC ζ induction export of β -catenin. It has been also reported that β -catenin can exit the nucleus independently of the CRM-1 exporter and RanGTP (35,37) and that the RanBP3 export factor enhances nuclear export of active β -catenin in a CRM-1-independent manner (37). Takemaru *et al.* (38) have reported that Chiby (Cby) co-operates with 14-3-3 adapter proteins to facilitate nuclear export of β -catenin, following phosphorylation of Cby by

Akt kinase. The APC- and Axin-directed nuclear export pathways may be coupled with proteasomal degradation of β -catenin. However, the outcomes of the Cby- and RanBP3-dependent export are currently unknown. All these experimental evidence suggest therefore that cells may have two or three different nuclear export mechanisms for β -catenin. In addition, how these nuclear export routes operate co-ordinately and differentially to fine-tune nuclear β -catenin levels remains largely elusive.

PKC ζ may be at the crossroad of cell proliferation regulation by Wnt and PI3K signaling pathways

It is well known that aPKCs are implicated in establishment of cell polarity, cell proliferation and cell survival (19,22). Interestingly, Wnt signaling has been shown to interact with PKC ζ signaling to promote cell polarization and cell proliferation. With respect to regulation of cell polarization, Zhang *et al.* (39) found that as result of Wnt5a treatment, Dvl forms a complex with PAR3, PAR6 and with PKC ζ resulting in stabilization and activation of PKC ζ to promote axon differentiation in cultured hippocampal neurons. Likewise, Wolf *et al.* (40) demonstrated that aPKC ζ is required for Wnt-mediated attraction of commissural axons and proper anterior–posterior axon guidance.

The role played by aPKCs in cell proliferation is well known. Indeed, many of the proteins reported to interact with PKC ζ have been involved in the maintenance of the proliferative state in the cell, including those that regulate AP-1, nuclear factor-kappaB and the mitogen-activated protein kinase cascades linked to Ras signaling. In addition, it has been reported that the atypical PKC iota, closely related with PKC ζ , is a human oncogene that participates in multiple aspects of the transformed phenotype of human cancer cells (41). Consistent with this, we showed here that the proliferative state of the SW480 colon cancer cells was decreased when we inhibited the activity of PKC ζ (Figure 4A).

The major activation pathway of PKC ζ depends on phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), which is mainly produced as result of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) activation induced by growth factors. 3-PI-dependent protein kinase 1 (PDK1), which binds with high affinity to PIP3, phosphorylates and activates PKC ζ . PI3Ks can be activated by both receptor tyrosine kinases and G-protein-coupled receptors such as Frizzleds. Whereas activating Wnt pathway mutants are found in the majority of colon cancers, mutational activation of the PI3K is also common in colorectal carcinomas: K-Ras or B-Raf mutation occurred in 79% of cell lines and 59% of human colorectal carcinomas (42). Because GSK3 β is a key component of both pathways, it is widely assumed that active PI3K signaling feeds positively into the Wnt pathway by PKB-mediated inhibition of GSK3 β . However, examinations of the crosstalk between these two signaling pathways have led to a great debate. On one hand, stimulation by insulin and growth factors in colon cell lines have been proposed to act by PKB-mediated inhibition of GSK3 β . On the other hand, it was reported that the effect of insulin was blocked by PI3K inhibition, but only partially attenuated by inhibition of PKB (43), indicating the existence of both PKB-dependent and -independent mechanisms.

Another issue to take into account with respect to PI3K and Wnt signaling crosstalk is the recent findings supporting a model wherein APC loss alone stabilizes the levels of cytoplasmic β -catenin but is insufficient for stimulating nuclear accumulation of β -catenin and intestinal cell proliferation (44). Rather, the nuclear accumulation of β -catenin and attendant proliferation require the activities of K-Ras, Raf1 and Rac1, suggesting a previously unappreciated molecular link between growth factor signaling and APC loss.

Our data suggest a model in which PKC ζ would be the focal point of crosstalk between Wnt- β -catenin and PI3K pathways. In this model, it can be speculated that growth factors present in cell culture media or Wnt agonists, activate PKC ζ , which in turn feeds positively into the Wnt pathway by PKC ζ -mediated phosphorylation of either β -catenin or another protein(s) that control β -catenin nuclear localization (retention) and/or facilitates its interaction with T cell factor/coactivators complex, resulting in Wnt gene transcription activation. We are currently addressing this model.

Funding

Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN213608) and CONACYT (CB2005-24778).

Acknowledgements

We thank Enrique Pedernera, PhD, and Silvia Reyes-Maya, MSc from the Embryology Department, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, for their help with the use of the confocal microscope (SDI-PTID.05.01).

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Radtke, F. *et al.* (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, **307**, 1904–1909.
- Logan, C. *et al.* (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 781–810.
- Katoh, M. *et al.* (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.*, **13**, 4042–4045.
- Slusarski, D.C. *et al.* (1997) Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-proteinlinked phosphatidylinositol signalling. *Nature*, **390**, 410–413.
- Slusarski, D.C. *et al.* (1997) Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signalling by Wnt-5A. *Dev. Biol.*, **182**, 114–120.
- Sheldahl, L.C. *et al.* (1999) Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.*, **9**, 695–698.
- Medina, A. *et al.* (2000) Xenopus frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signalling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.*, **92**, 227–237.
- Kuhl, M. *et al.* (2001) Antagonistic regulation of convergent extension movements in Xenopus by Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech. Dev.*, **106**, 61–76.
- Kinoshita, N. *et al.* (2003) PKC δ is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates Xenopus convergent extension movements. *Genes Dev.*, **17**, 1663–1676.
- Goode, N. *et al.* (1992) Differential regulation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16878–16882.
- Cook, D. *et al.* (1996) Wingless inactivates GSK3 via an intracellular signaling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J.*, **15**, 4526–4536.
- Orford, K. *et al.* (1997) Serine Phosphorylation-regulated Ubiquitination and Degradation of β -Catenin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24735–24738.
- Hers, I. *et al.* (1999) The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. *FEBS Lett.*, **460**, 433–436.
- Fields, A.P. *et al.* (2003) Protein kinase C in disease: cancer. *Methods Mol. Biol.*, **233**, 519–537.
- Gokmen-Polar, Y. *et al.* (2001) Elevated protein kinase C β II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **61**, 1375–1381.
- Zhang, J. *et al.* (2004) Protein kinase C (PKC) β II induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC/Rac 1-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**, 22118–22123.
- Ohno, S. *et al.* (2002) Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.*, **132**, 509–511.
- Nakanishi, H. *et al.* (1993) Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13–16.
- Akimoto, K. *et al.* (1996) EGF or PDGF receptors activate atypical PKC ζ through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.*, **15**, 788–798.
- Chou, M.M. *et al.* (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.*, **8**, 1069–1077.
- Diaz-Meco, M.T. *et al.* (1996) The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*, **86**, 777–786.
- Hirai, T. *et al.* (2003) Protein kinase C ζ (PKC ζ): activation mechanisms and cellular functions. *J. Biochem.*, **133**, 1–7.
- Lin, D. *et al.* (2000) A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signaling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 540–547.
- Berra, E. *et al.* (1995) Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C ζ . *EMBO J.*, **14**, 6157–6163.
- Schönwasser, D.C. *et al.* (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 790–798.
- Chou, M.M. *et al.* (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.*, **8**, 1069–1077.
- Kolligs, F.T. *et al.* (1999) Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5696–5706.
- Storz, P. *et al.* (2004) Protein kinase C delta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 2614–2626.
- Reyland, M.E. (2009) Protein kinase C isoforms: multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci.*, **14**, 2386–2399.
- Baluch, D.P. *et al.* (2008) GSK3 β mediates acentromeric spindle stabilization by activated PKC ζ . *Dev. Biol.*, **317**, 46–58.
- Fagotto, F. *et al.* (1998) Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr. Biol.*, **8**, 181–190.
- Kulay, U. *et al.* (1997) Dominant-negative mutants of importin- β block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *EMBO J.*, **16**, 1153–1163.
- Henderson, B.R. *et al.* (2002) The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. *EMBO Rep.*, **3**, 834–839.
- Cong, F. *et al.* (2004) Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **101**, 2882–2887.
- Ki, H. *et al.* (2008) β -catenin can bind directly to CRM1 independently of adenomatous polyposis coli, which affects its nuclear localization and LEF-1/ β -catenin-dependent gene expression. *Cell Biol. Int.*, **32**, 394–400.
- Ki, H. *et al.* (2006) Overexpressed LEF-1 proteins display different nuclear localization patterns of beta-catenin in normal versus tumor cells. *Cell Biol. Int.*, **30**, 253–261.
- Hendriksen, J. *et al.* (2005) RanBP3 enhances nuclear export of active β -catenin independently of CRM1. *J. Cell Biol.*, **171**, 785e97.
- Takemaru, K. *et al.* (2009) Fine-tuning of nuclear-catenin by chibby and 14-3-3. *Cell Cycle*, **8**, 210–213.
- Zhang, X. *et al.* (2007) Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 743–754.
- Wolf, A.M. *et al.* (2008) Phosphatidylinositol-3-kinase-Atypical protein kinase C signaling is required for Wnt attraction and anterior-posterior axon guidance. *J. Neurosci.*, **28**, 3456–3467.
- Fields, A.P. *et al.* (2007) Protein kinase C α : human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol. Res.*, **55**, 487–497.
- Seth, R. *et al.* (2009) Concomitant mutations and splice variants in KS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signaling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut*, **58**, 1234–1241.
- Sun, J. *et al.* (2008) Both Wnt and mTOR signaling pathways are involved in insulin-stimulated proto-oncogene expression in intestinal cells. *Cell. Signal.*, **20**, 219–229.
- Helms, R.A. *et al.* (2009) A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*, **137**, 623–634.

Received March 25, 2011; revised July 23, 2011; accepted August 8, 2011