



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL PAPEL QUE JUEGA LA PROTEÍNA CINASA C EN LA
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GSK-3B EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN
WNT.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

(BIOMÉDICAS)

PRESENTA:

L.B. NYDIA TEJEDA MUÑOZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. LORENZA GONZÁLEZ MARISCAL
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS, CINVESTAV

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El presente trabajo de doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. Martha Robles Flores en el edificio de investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM, apoyado por CONACYT (260991).

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a ella.

Se agradece a los miembros del comité tutorial, por su participación activa en el desarrollo y culminación de esta tesis:

Dra. Lorenza González Mariscal Muriel	FISIOLOGÍA CINVESTAV
Dr. Enrique Ortega Soto	IIB, UNAM

Agradezco también a los miembros del jurado de examen por la revisión crítica y detallada, de este trabajo:

Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz	IFC, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	FM, UNAM
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez	IIB, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	FM, UNAM
Dra. Marcela Lizano Soberón	INCAN, UNAM

A la Dra. Cristina Castañeda Patlan, por su excelente apoyo técnico en el desarrollo de los experimentos.

Al Dr. Cruz Meneses-Fabián por su asesoría técnica, motivación y cariño.

Al Dr. Guillermo Tejeda Muñoz por su apoyo en mi preparación profesional.

A mis padres, Elvia y Javier por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, por su asesoría académica y amistad.

INDICE

1 Abreviaturas	4
2 Resumen	4
3 Abstract.....	5
4 Introducción	6
5 Glucógeno sintetasa cinasa 3.....	7
5.1 Isoformas.....	9
5.2 Estructura	10
5.3 Regulación de GSK-3	11
6 GSK-3β y la vía de señalización Wnt.....	13
7 El cáncer de colon y mutaciones en elementos de la vía Wnt	16
8 La Proteína Cinasa C	18
8.1 Estructura de PKC.....	19
8.2 Regulación de la actividad de PKC.....	20
9 Antecedentes experimentales	20
10 Objetivo general	21
11 Hipótesis	21
12 Objetivos específicos	21
13 Materiales y Métodos	22
14 Resultados.....	28
15 Discusión	49
16 Conclusiones.....	54
17 Referencias.....	54

18 Anexos62**1 Abreviaturas**

Akt/PKB	Proteína Cinasa B
APC	Poliposis adenomatosa de colon
CK1 α	Caseína Cinasa I α
Dvl	Disheveled
Fzd	Frizzled
GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa 3
LRP	Proteína relacionada a la lipoproteína de baja densidad
LEF/TCF	Factor potenciador de linfocitos / Factor de células T
CK-1	Cinasa de caseína 1
LRP	Proteína relacionada a la lipoproteína de baja densidad
MVBs	Cuerpos multivesiculares
Myr.PKC ζ .PS	Inhibidor farmacológico de PKC ζ
PI3K	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
PKC	Proteína Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
siRNA	RNA pequeño de interferencia
Wnt	Wingless-Int

2 Resumen

La ruta de señalización Wnt juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal. Los eventos moleculares que llevan a la regulación de la actividad de GSK-3 β por ligandos Wnt no se conocen con claridad. En este trabajo, se encontró que PKC ζ y GSK-3 β se asocian, principalmente en células tumorales de colon humano. La estimulación con ligandos Wnt inducen una rápida redistribución de GSK-3 β desde el citoplasma al núcleo en las células malignas, y una transitoria fosforilación mediada por PKC en GSK-3 β ocurre en un sitio distinto al de serina 9. Además, mientras que el tratamiento con ligandos Wnt induce una disminución en la fosforilación mediada por PKC en GSK-3 β en las células no malignas, en las malignas aumentó esta fosforilación. La inhibición farmacológica y el silenciamiento mediante un siRNA de PKC ζ bloquea estos efectos, pero también evita la actividad basal constitutiva de GSK-3 β . Mediante ensayos de actividad *in vitro* se demostró que la fosforilación mediada por PKC ζ en GSK-3 β mejorado la actividad, y esto se confirmó al pre-incubar las células con un inhibidor de PKC ζ donde se abolió la actividad basal.

Mapeamos la serina (Ser) 147 de GSK-3 β como el sitio fosforilado por PKC ζ ; su mutación en alanina inhibe la actividad de GSK-3 β , que resulta en la estabilización de β -catenina y un aumento en la actividad transcripcional, mientras que la sustitución fosfo-mimética de Ser 147 por ácido glutámico (E), mantiene la actividad basal de GSK-3 β . Por lo tanto, nuestros resultados indican que, PKC ζ fosforila a la GSK-3 β en la Ser 147 para mantener la actividad constitutiva de GSK-3 β en las células en reposo, y que la estimulación con ligandos Wnt modifica la actividad de GSK-3 β en una manera opuesta en células epiteliales de colon normales y malignas.

3 Abstract

Canonical Wnt signaling plays a key role in maintaining colonic epithelium homeostasis. The molecular events that drive Wnt-induced regulation of GSK-3 β activity are poorly defined. In this study we found that PKC ζ and GSK-3 β interact *in vivo* mainly in colon cancer cells. Wnt stimulation induced a rapid GSK-3 β redistribution from the cytoplasm to the nuclei in malignant cells, and a transient PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β at a different site from that of serine 9. In addition, while Wnt treatment induced a decrease in PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β in non-malignant cells, in malignant ones this phosphorylation was increased. Pharmacological inhibition and siRNA-mediated silencing of PKC ζ abolished all of these effects, but unexpectedly, also abolished the constitutive basal activity of GSK-3 β .

In vitro activity assays demonstrated that GSK-3 β phosphorylation mediated by PKC ζ enhanced GSK-3 β activity and confirmed that cell pre-incubation with a PKC ζ inhibitor abolished basal activity. We mapped Ser 147 of GSK-3 β as the site phosphorylated by PKC ζ , i.e., its mutation into alanine abolished GSK-3 β activity resulting in β -catenin stabilization and increased transcriptional activity, whereas phosphomimetic substitution of Ser 147 by glutamic acid maintained GSK-3 β basal activity. Thus, our results indicate that PKC ζ phosphorylates GSK-3 β at Ser 147 to maintain the constitutive activity of GSK-3 β in resting cells, and that Wnt stimulation modifies the GSK-3 β activity in an opposite manner in normal and malignant colon epithelial cells.

4 Introducción

La carcinogénesis colorrectal (CCR) es una de las enfermedades más frecuentes que ocupa el 3er lugar en incidencia y el 4to en mortalidad a nivel mundial. En México el GLOBOCAN (1) 2012 reporta una incidencia de 3,995 casos (4.8%) y una mortalidad (5 años) de 2,166 casos (5.4%) (Figura 1).

La región inferior del tracto gastrointestinal (colon y recto) tiene como principal función la reabsorción de iones y agua, pues la absorción de la mayor parte de los nutrientes ocurre primero en el intestino delgado. La pared del colon está compuesta por diferentes capas: mucosa, submucosa, muscular, subserosa y serosa. El epitelio que cubre el tubo intestinal es de tipo columnar simple, y forma un gran número de profundas invaginaciones hacia el interior de la lámina propia (formada por tejido conectivo laxo) denominadas criptas de Lieberkühn. El epitelio intestinal se caracteriza además por estar sujeto a una continua renovación a expensas de células troncales durante toda la vida del organismo, renovándose en promedio en 3 a 4 días. Esta tasa de renovación, la más rápida de los epitelios del organismo humano, lo hace susceptible a la transformación maligna (2).

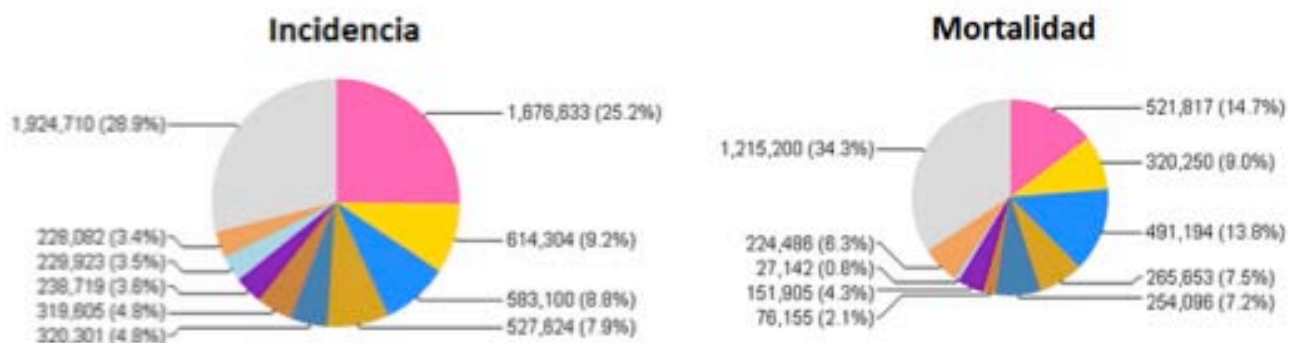
Las células absortivas o enterocíticas junto con las células caliciformes que son las más abundantes en el epitelio colónico, están polarizadas y se caracterizan por la presencia en la membrana apical de microvellosidades que forman un borde en cepillo donde se localizan hidrolasas como la sucrasa-isomaltasa (SI), la lactasa, la aminopeptidasa N (APN), la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) y la fosfatasa alcalina (AP) que se utilizan como marcadores moleculares.

Las células mucosecretoras o células caliciformes al igual que las absortivas son células polarizadas que tienen un núcleo basal caracterizado por la secreción de moco lubricante y sirve para dar protección al epitelio compuesto fundamentalmente por mucinas, siendo MUC2 la predominante en el colon.

Una de las características que diferencia el epitelio colónico del intestino delgado es la ausencia de células de Paneth (a excepción del colon ascendente), la poca representación de células enteroendocrinas y su abundancia en células mucosecretoras.

La homeostasis celular del epitelio intestinal se mantiene por un balance dinámico entre la división celular continua, la diferenciación celular y la apoptosis, con el desprendimiento de células en la superficie de las criptas colónicas: las células precursoras que resultan de la división asimétrica de células troncales proliferan en la parte baja de la cripta y migran de manera continua hacia las zonas más apicales en donde se diferencian en los linajes absortivos y secretorios, y al final del trayecto culmina con la muerte celular por apoptosis y el desprendimiento de las células hacia el lumen.

Mundo



México



■ Mama ■ Colorectal ■ Pulmón ■ Cervicouterino ■ Estómago ■ Útero ■ Ovario ■ Tiroides ■ Hígado ■ Otros

Figura 1. Cáncer en el mundo 2012 (Imagen tomada y modificada de (1)).

La evidencia experimental actual indica que la ruta de señalización “Wnt” es la fuerza dominante en el control de esta homeostasis, y que cuando está alterada se produce cáncer (3). La GSK-3 β , identificada originalmente como reguladora del metabolismo del glucógeno, es un elemento clave de la vía de señalización Wnt que participa como un regulador de la homeostasis en el colon (Figura 2).

5 Glucógeno sintasa cinasa 3

La GSK-3 se descubrió y purificó en 1980 a partir del músculo esquelético de conejo, forma parte de la familia de proteínas cinasas activada por mitógenos (MAP) y es fundamental en varias vías de señalización (4). Se identificaron tres formas de glucógeno sintasa cinasa; la glucógeno sintasa cinasa 3, glucógeno sintasa cinasa 4

y la glucógeno sintasa cinasa 5, que regulan la glucógeno sintasa mediante la producción de diferentes niveles de fosforilación (5). La Glucógeno Sintasa Cinasa 5 se refiere como caseína quinasa-2 (CK2) y es un cebador de la glucógeno sintasa que se fosforila por GSK-3 (6, 7).

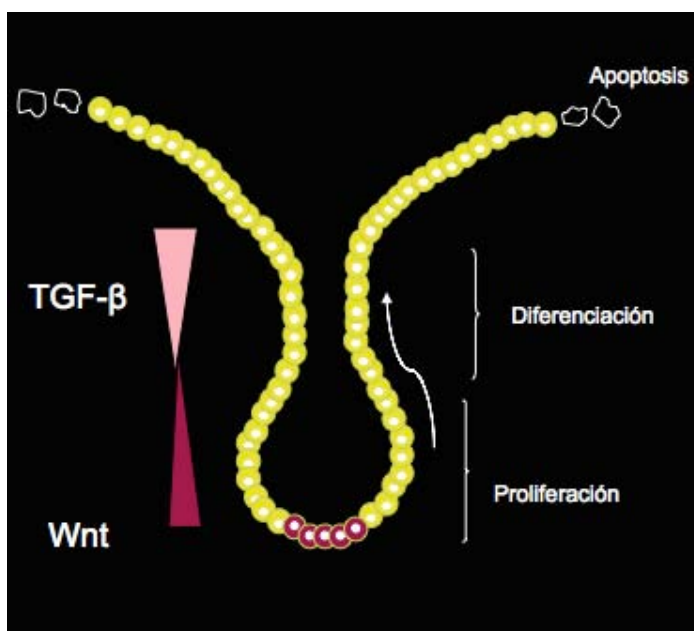


Figura 2. Estructura del epitelio intestinal del colon en adultos.

GSK-3 es una cinasa de residuos de serina y treonina. Regula importantes procesos celulares como los sistemas de señalización acoplados a factores de crecimiento (como la insulina) y la vía de señalización Wnt, además en la síntesis proteica, la proliferación, diferenciación, metabolismo, ciclo celular, desarrollo embrionario y apoptosis. Todas estas funciones se basan en el gran número de sustratos que es capaz de regular. Se han propuesto más de 100 proteínas como sustrato de GSK-3, tales como los factores de iniciación, componentes del ciclo celular, factores de transcripción, proteínas implicadas en la dinámica de los microtúbulos, adhesión celular, proteínas que participan en la regulación del metabolismo entre otros. Sus funciones están asociadas a enfermedades como Alzheimer, diabetes, trastornos bipolares y cáncer (8, 9 y 10), que son mortales y de alta frecuencia en la población, por lo que es importante conocer el mecanismo de regulación de esta proteína cinasa ya que en la vía de señalización Wnt no es claro, y porque el conocimiento generado se podría utilizar en el desarrollo de una nueva generación de fármacos con potencial acción sobre la progresión de diversas enfermedades en las que está asociada (Figura 3).

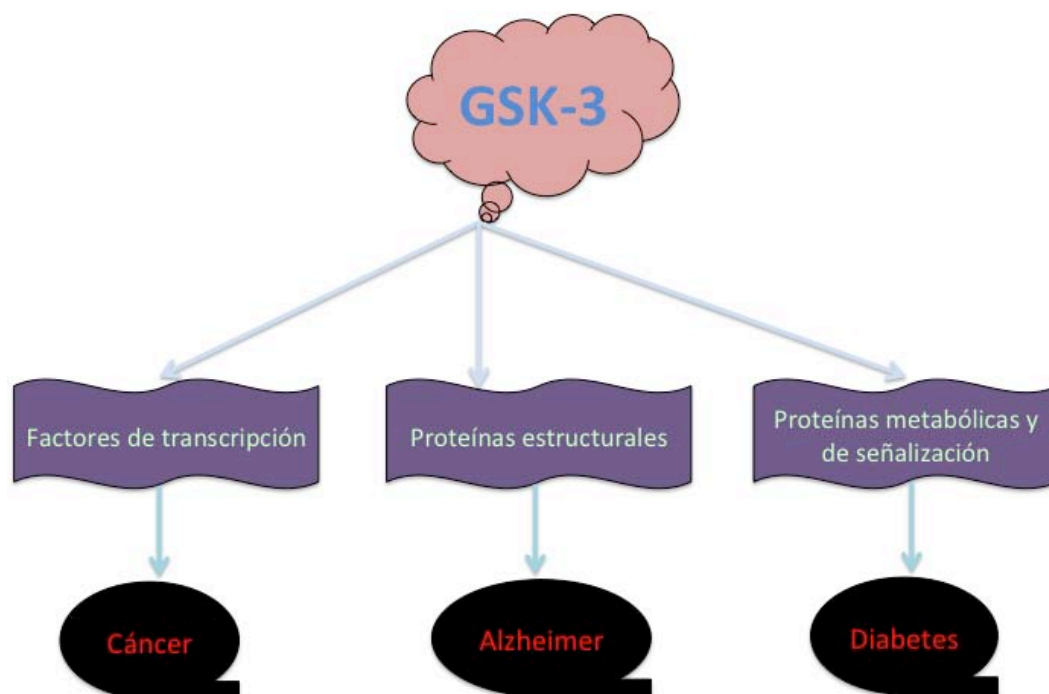


Figura 2. Funciones en las que participa GSK-3.

5.1 Isoformas

La GSK-3 de mamíferos se clonó de cerebro de rata y se identificaron dos isoformas como productos de genes distintos (GSK-3 α y GSK-3 β). En humanos GSK-3 α y GSK-3 β se asignaron a los cromosomas 19q13.2 y 3q13.3, respectivamente (11,12). El hecho de que el fenotipo de los knockout de cada una de las isoformas sea diferente, indica que no existe redundancia funcional entre ambas, sino que cada una cumple funciones específicas. A nivel de proteína, GSK-3 α y GSK-3 β son altamente homólogas (98%) en su dominio de cinasa; sin embargo, difieren en los últimos 76 residuos de la región C-terminal. En el extremo amino, GSK-3 α contiene una extensión rica en glicina, razón por la que posee un mayor tamaño que corresponde a 51 kD. Esta región está ausente en GSK-3 β que resulta en un tamaño más pequeño de 47 kD. En el extremo carboxilo terminal, las isoformas de GSK-3 β comparten una identidad de 36% en su secuencia de aminoácidos (Figura 4). Se identificó una variante de GSK-3 por splicing alternativo, GSK-3 β 2 y GSK-3 β 1; su dominio catalítico está altamente conservado, sin embargo, GSK-3 β 2 tiene una inserción de 13 de aminoácidos. Aunque originalmente fue aislada a partir del músculo esquelético de conejo, la GSK-3 se ha identificado en varios tejidos y ambas isoformas se cree que presentan una expresión ubicua (9, 13, 14). A nivel celular se localiza predominantemente en el citosol (15) pero también se ha identificado en la mitocondria y núcleo (15, 16), donde presenta mayor actividad en comparación con el compartimiento del citoplasma (17). Se demostró una secuencia de localización nuclear dinámica de GSK-3 β en respuesta a la progresión del ciclo

celular (18), estímulos apoptóticos (19,20), y mediante la interacción de GSK-3 con la proteína de unión FRAT (21). La localización subcelular de GSK-3 α se ha estudiado menos. En cerebro de rata se observa en el citoplasma y el núcleo pero está excluida de la mitocondria (22). También exhibe un comportamiento nuclear dinámico a través de la interacción con FRAT (21) pero las respuestas a otros estímulos no se han reportado. GSK-3 α y GSK-3 β muestran una detección nuclear homóloga dentro del dominio catalítico que influye en la distribución de GSK-3 β (23); para esto son importantes los primeros nueve aminoácidos de GSK-3 β (23) y podrían tener una función similar en GSK-3 α ya que estos residuos se conservan en gran medida.

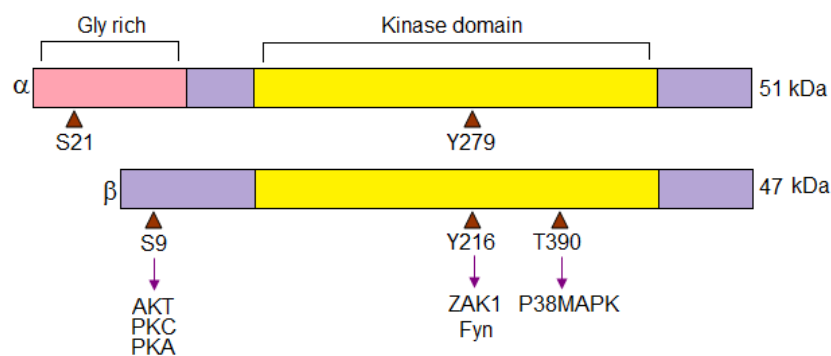


Figura 4. Las isoformas de GSK-3 (GSK-3 α y GSK-3 β) y sus características.

5.2 Estructura

La estructura cristalina de GSK-3 va de 1.8 Å -2.9 Å por reemplazo molecular utilizando datos de difracción de rayos X (24). El análisis estructural demuestra que GSK-3 adopta una estructura en pliegues que consiste en dos dominios, un N-terminal y una cadena B que forman un dominio en forma de barril β y un α -hélice en el dominio C-terminal. El sitio de unión del ATP se localiza en la interfaz del dominio α hélice y de la cadena β y está bordeado por bucles ricos en glicina. El asa de activación (residuos 139 a 343) corre a lo largo de la superficie del sitio de unión del sustrato. Los residuos localizados en los extremos C-terminal (residuos 344-382) están fuera del núcleo de la enzima y forman un pequeño dominio que se compacta contra el dominio α -hélice. El dominio de cadena β consta de siete hebras antiparalelas, formando un barril β interrumpido por una corta hélice de 2-6 cadenas (residuos 96-102). La hélice se conserva en todas las cinasas y dos de sus residuos desempeñan un papel clave en la actividad catalítica de la enzima: la Arg 96 participa en el alineamiento de los dos dominios, y Glu 97 se coloca en el sitio activo y forma un puente salino con la Lys 85, un residuo clave en la catálisis (25).

5.3 Regulación de GSK-3

Dado que GSK-3 β participa en múltiples funciones, la regulación de su actividad es crítica para asegurar la especificidad de las rutas de señalización en las que participa. Aunque los mecanismos que regulan la GSK-3 no se conocen completamente, su control preciso parece estar sujeto a múltiples niveles de regulación mediados por fosforilación y otras modificaciones postraduccionales, por regulación de su localización subcelular y por interacciones proteína-proteína. El mecanismo de regulación más estudiado de GSK-3 es la fosforilación, llevado a cabo por otras cinasas, y más recientemente, a través de su autofosforilación.

A diferencia de otras proteínas cinasas, GSK-3 es única por varias razones: 1^o) es una cinasa constitutivamente activa que es inactivada en respuesta a estímulos celulares 2^o) la fosforilación de sus sustratos generalmente conduce a su inactivación o degradación 3^o) muchos de sus sustratos necesitan la presencia de un fosfato “cebador” localizado cuatro aminoácidos C terminal respecto al sitio de fosforilación (26).

La regulación por fosforilación parece darse en todas las isoformas de GSK-3. La actividad de la GSK-3 es inhibida significativamente por la fosforilación en Ser 9 del extremo N-terminal de GSK-3 β o de la Ser 21 de GSK-3 α . Varias cinasas pueden fosforilar dicho residuo como las proteínas Akt/PKB, PKA, PKC, y p90 rsk entre otras. Se sabe que esta fosforilación inhibitoria de GSK-3 juega un papel importante en la señalización inducida por insulina y por factores de crecimiento, pero exactamente cómo los ligandos Wnt suprimen la actividad de GSK-3 β ha continuado siendo un misterio sin aclararse, a pesar de que un paso esencial en la ruta Wnt canónica es la inhibición de GSK-3 β , evidenciado por el uso de fármacos inhibidores de la enzima, que mimetizan la activación Wnt. La inhibición en el extremo amino de GSK-3 ocurre principalmente por fosforilación que actúa a modo de pseudo-sustrato intramolecular, bloqueando el acceso al sitio catalítico de los sustratos prefosforilados (27) ocasionando que la cinasa se pliegue sobre su propia secuencia N-terminal.

GSK-3 es una de las 500 proteínas cinasas de mamíferos que tienen una fuerte preferencia por los sustratos que ya están fosforilados. La mayor parte de los sustratos requieren una pre-fosforilación en un residuo de 4 o 5 aminoácidos localizados en la región C-terminal, la secuencia consenso general del sustrato es Ser/ThrXXX (Phospho Ser/Thr), donde X es cualquier residuo (26). Sin embargo, los sustratos propuestos pueden estar o no pre-fosforilados; no está claro cómo los

reconoce, en casi todos los ejemplos de sustrato pre-fosforilados, la falta de esto reduce la fosforilación por GSK-3 en un >90 %, lo que demuestra la importancia del residuo fosforilado en el sitio C-terminal.

Se ha estudiado el efecto de numerosos factores de crecimiento capaces de inactivar la GSK-3 a través de la vía de señalización dependiente de la PI3K/Akt, como es el caso del IGF-I (factor de crecimiento de la insulina), BDNF, y FGF-1 (factor de crecimiento de Fibroblastos) en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, neuronas corticales, células HT22 (28) y en hepatocitos (29); el NGF (factor de crecimiento nervioso) en células PC12, y el EGF (factor de crecimiento endotelial) en células musculares. La vía PI3K/Akt también regula la actividad de la GSK-3 como respuesta al estrés celular y las proteínas de choque térmico inducen la inactivación. Todos estos casos convierten, en conjunto, a la vía de la PI3K/Akt en la principal vía de inhibición de la actividad catalítica de la GSK-3 a través de la fosforilación en los residuos de serina de su extremo amino. La cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y algunas isoformas de la proteína cinasa C (PKC) (α , β II, γ , ϵ) también son capaces de aumentar los niveles de fosforilación de GSK-3 (30). PKA es responsable de la inhibición de GSK-3 en la señalización activada por endotelina 1 en la hipertrofia de las células musculares vasculares lisas. PKC participa en la inhibición de GSK-3 a través de la vía de señalización Wnt/Wingless (31) (Figura 5).

La fosforilación de GSK-3 en sus residuos de tirosina 279/216, para las isoformas α y β incrementan su actividad enzimática (32). Esta fosforilación permite la relocalización del residuo en la estructura de la GSK-3 interaccionando con una arginina próxima e incrementando el acceso de los sustratos y la actividad de la cinasa. La defosforilación de estos residuos reduce la actividad de la enzima como se observa cuando se produce la activación directa de la PKC en determinados tipos celulares. Se ha descrito que los factores de crecimiento no varían la fosforilación en los residuos de tirosina, aunque existen evidencias de reducción de los niveles de esta fosforilación en tratamientos con insulina, EGF, frente a estímulos proapoptóticos como daño celular, privación de NGF o tratamiento con estaurosporina (inhibidor de PKC). Al igual que en el caso de los residuos de serina, la fosforilación de los residuos de tirosina está ampliamente regulada por las vías de señalización. En este sentido, el ácido lisofosfatídico induce, a través de las proteínas G α 12/13, la activación de la GSK-3 por fosforilación en sus residuos de tirosina en células N2A (33). Se conocen diferentes cinasas capaces de fosforilar estos residuos, como es el caso de la tirosina cinasa ZAK-1 en Dictiostelium, o la cinasa Fyn de la familia de las Src tirosina cinasas. De igual modo se ha descrito

que los incrementos transitorios de la concentración intracelular de calcio incrementan los niveles de fosforilación en tirosina de la GSK-3 (34).

GSK-3 se fosforila en serina 389 y treonina 390 por p38MAPK inhibiendo su actividad y resultando en una acumulación de β -catenina y aumento en la expresión de genes blanco Wnt. Este evento de fosforilación no es una consecuencia directa de la señalización Wnt, sino debido a la activación de p38MAPK. La inhibición de la fosforilación en Thr390 puede implicar la adquisición de una conformación pseudosustrato, similar al mecanismo inhibitorio en serina 21/9. También se ha descrito que la treonina 43, presente sólo en la isoforma β , que es fosforilado por Erk (35) inhibe a GSK-3, sin embargo, hay pocos estudios acerca de este mecanismo de regulación.

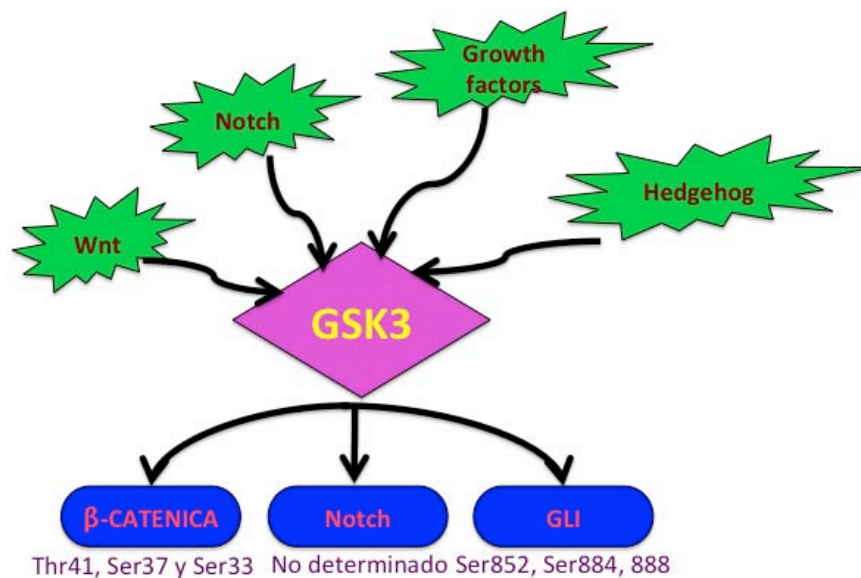


Figura 5. Ejemplos de vías de señalización que regulan a GSK-3.

6 GSK-3 β y la vía de señalización Wnt

Otro mecanismo de regulación de la GSK-3 β es por interacción directa con otras proteínas a través de la formación de complejos proteicos como la vía de señalización Wnt, donde la GSK-3 β interviene tanto en la vía canónica como en la no canónica. El término Wnt fue acuñado por la combinación de *wg* (*wingless*) y del oncogen *int*. El gen *wingless* había sido identificado originalmente como un gen que controlaba la polaridad de los segmentos en *Drosophila melanogaster*, que se expresa durante la embriogénesis y también en el adulto en la metamorfosis. Los genes *int* se identificaron inicialmente como genes relacionados con los sitios de

inserción de virus generadores de tumores en vertebrados y ambos genes son homólogos que comparten un origen evolutivo.

Los ligandos Wnt son glicoproteínas palmitoiladas ricas en cisteína secretados al medio extracelular que participan en una variedad de procesos celulares entre los que podemos mencionar la proliferación, diferenciación, migración y polaridad celular mediante la activación de múltiples cascadas intracelulares donde la vía de señalización Wnt canónica es la más estudiada.

El elemento distintivo de la vía Wnt canónica es la regulación de los niveles de β -catenina citoplásmicos de β -cateninas. La β -catenina es una proteína de localización dual: está localizada tanto en la membrana plasmática, asociada a componentes del citoesqueleto como las cadherinas, como en el citoplasma. En ausencia de señalización Wnt, la proteína β -catenina es fosforilada por las cinasas de serina/treonina, caseína cinasa α en su grupo serina 45; esto a su vez permite la fosforilación por parte de la glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK- 3β) de los residuos serina/treonina 41, 37 y 33. La interacción entre estas cinasas y la β -catenina es facilitada por las moléculas de andamiaje Axina y APC (Adenomatosis poliposis coli), que en conjunto forman un complejo de degradación de la β -catenina y que también son fosforiladas por GSK- 3β estabilizando de esta forma a la Axina y propiciando la interacción de APC con la β -catenina. La β -catenina fosforilada es reconocida por el sistema ubiquitin-proteosoma y subsecuentemente degradada (3). En ausencia del ligando Wnt, este complejo de degradación es muy activo y mantiene los niveles de β -catenina citoplásmicos en un nivel bajo.

En presencia de ligandos Wnt, la señal es reconocida por el complejo formado por un receptor de 7 dominios transmembrana Frizzled y por el co-receptor LRP5/6 (Low density lipoprotein receptor related proteins 5/6). La activación de Frizzled lleva a la fosforilación y acumulación de la proteína dishevelled (Dvl) que se sugiere es mediada por ciertas subunidades de las proteínas G. Dvl promueve la translocación de la axina y de GSK- 3β a la membrana plasmática donde interaccionan con la porción citoplásmica del co-receptor LRP5/6. La GSK- 3β fosforila residuos conservados de serina y treonina de dominios PPPSxP en la parte citoplásmica del co-receptor LRP5/6 que funcionan como sitios de anclaje para la unión de proteínas adicionales de axina, Dvl y otros complejos de LRP5/6 para formar el signalosoma (36) inhibiendo finalmente la actividad de GSK- 3β y favoreciendo la estabilización y acumulación de la β -catenina en el citosol, lo que lleva a su translocación al núcleo donde actúa como cofactor transcripcional de miembros de la familia de factores de transcripción lymphoid enhancer factor/T-cell factor (TCF/LEF), para formar un

complejo bipartito activo (37). 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 (Figura 6).

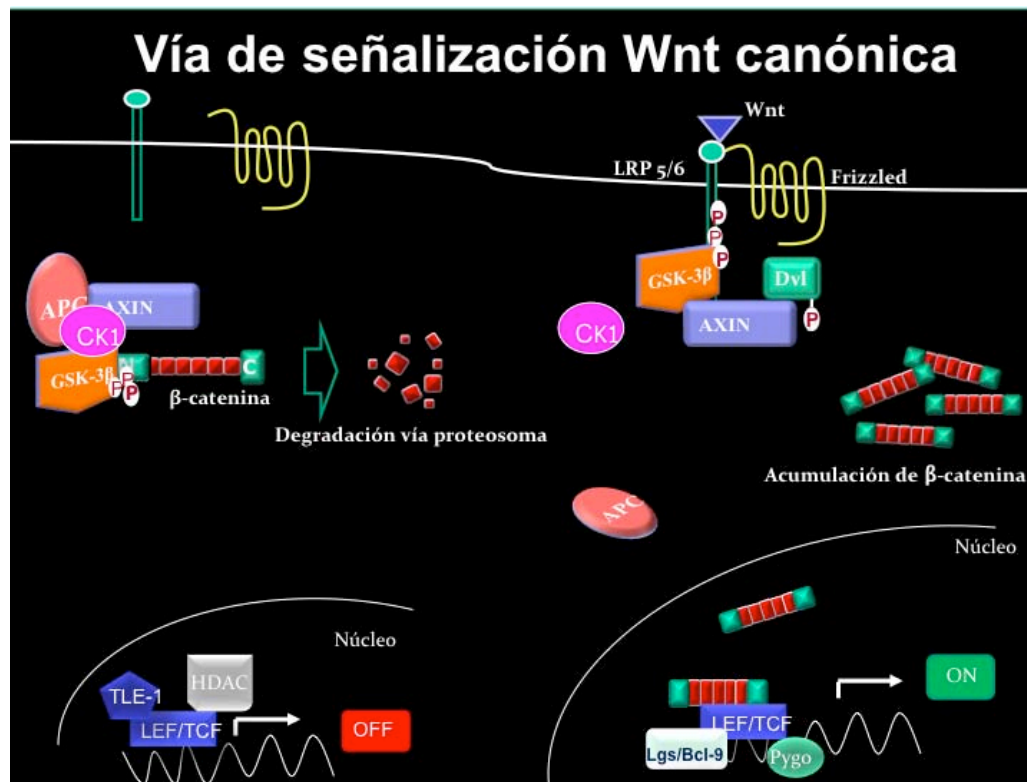


Figura 6. Esquema de la vía de señalización de Wnt canónica (Imagen tomada de (38)).

Los eventos moleculares por los cuales el signalosoma inhibe la actividad catalítica de la GSK-3β han sido objeto de una intensa investigación a lo largo de una década. Varios grupos de investigación han reportado que los Wnts no inducen una fosforilación en Ser 9 sino que, provocan el reclutamiento de GSK-3β y de axina a la fracción citosólica del co-receptor Lrp5 para que GSK-3β lo fosforile, y que los sitios ya fosforilados, inhiben a la GSK-3β actuando como inhibidores competitivos, aunque con baja afinidad (K_i de $1.3 \times 10^{-5}M$). Sin embargo, esta inhibición es transitoria y no explica cómo se mantiene por más de una hora. Recientemente, un modelo celular distinto propone que la activación por ligandos Wnt provoca la internalización de GSK-3β en el lumen de cuerpos multivesiculares (MVBs), impidiendo que GSK-3β fosforile la β-catenina recién sintetizada. Con respecto a esto, Taelman et al. (39) y Bilic et al. (36) han reportado que los ligandos Wnt, a partir de 15 min. post-tratamiento, provocan que GSK-3β permanezca en cuerpos multivesiculares “aislando” a la cinasa y previniendo que pueda fosforilar a sus

sustratos. De este modo, GSK-3 β se acumula en signalosomas de LRP5, y por tanto, que la endocitosis es requerida para la señalización Wnt.

Efectivamente, gran cantidad de evidencia experimental apoya que aunque tanto los ligandos Wnt como la insulina disminuyen la actividad de GSK-3 β , lo hacen de manera diferente y los efectos río abajo son específicos para cada una de las rutas estimuladas (8, 10). Esto ha llevado a proponer que existen diferentes pozas de GSK-3 β que tienen diferentes funciones, y que probablemente las modificaciones postraduccionales juegan un papel clave en esta regulación.

7 El cáncer de colon y mutaciones en elementos de la vía Wnt

Desde mediados de los años 80 se conocía que en múltiples casos de cáncer colorectales esporádicos y hereditarios se encontraban mutaciones en la proteína supresora de tumores APC (85% de los casos) y 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, eventos que convergen en la activación transcripcional de genes que participan durante la proliferación celular (40, 41 y 42). El hecho de que β -catenina se sobreexpresa en el cáncer de colon sugiere que sus niveles ya no están regulados, debido a una mutación en APC. En efecto, la reintroducción de APC silvestre disminuye los niveles de β -catenina. Es importante destacar que, otros experimentos muestran que transfectando APC en líneas celulares de cáncer de colon se reduce la actividad del reportero β -catenina/TCF (43). Esta actividad pareciera estar mediado a través de TCF4, ya que es el único elemento que se expresa en todas las líneas celulares examinadas, así como en el epitelio del colon normal. Sorprendentemente, se encontraron líneas celulares sin mutaciones en APC que muestran elevada actividad TCF/ β -catenina, actividad que fue medida en un ensayo de gen reportero (44). La actividad no podía ser regulada por APC silvestre, lo que demuestra que estas células eran de alguna manera resistentes a la función de APC. La secuenciación del gen de β -catenina (CTNNB1) en dos líneas celulares con APC y TCF/ β -catenina activadas, reveló mutaciones en el sitio consenso de fosforilación de GSK-3 β en β -catenina: una delección de la Ser 45 en la línea HCT116 y en Ser 33 por la sustitución de Thr en líneas celulares SW48. Ambos cambios se generaron en sitios putativos de fosforilación por GSK-3 β que se habían

demostrado que son importantes para la estabilidad de β -catenina en otros sistemas (45). Además, la expresión de β -catenina mutada induce un efecto dominante sobre la actividad transcripcional de TCF/ β -catenina (46). Estos resultados muestran que, en las pocas líneas en las que no se han identificado mutaciones en APC, la regulación de β -catenina es una función crucial para APC. Además, las mutaciones en APC y mutaciones oncogénicas en β -catenina se excluyen mutuamente en el cáncer de colon (47). Se han identificado mutaciones en la región reguladora de β -catenina en aproximadamente el 50% de los tumores de colon que expresan APC silvestre (44). A excepción de las sustituciones de Gly34 a Val y de Gly50 por Ser, estas mutaciones afectan a uno de los residuos putativos de fosforilación en el dominio regulador. Puede ser que la mutación en el residuo de Gly34 ocasione un aumento de la estabilidad de β -catenina debido a los cambios en la estructura de la región que afecta la fosforilación o a una disminución en la degradación a nivel del proteosoma, ya que este residuo se ha demostrado que es parte de un sitio clave de reconocimiento dependiente de ubiquitina (45). La mutación en Gly50 se identificó en un tumor que expresa también APC mutado, sin embargo, su significado no está claro (46). En un estudio diferente, en 58 tumores de colon no se detectaron mutaciones de APC ni en CTNNB1, pero se encontró una deleción intersticial del exón 3, que codifica la región reguladora (48). Este cambio conduce a la acumulación de β -catenina y sugiere que tiene un efecto oncogénico, como es el caso de las mutaciones sin sentido. Esto es consistente con el hallazgo de que al suprimir el extremo N-terminal de β -catenina transforma las células NIH3T3 (49). Estos resultados enfatizan que, en el cáncer de colon, la actividad β -catenina es crucial y de los diferentes mecanismos que pueden conducir a su desregulación. Además de las mutaciones en el dominio regulador de β -catenina, mutaciones en otros sitios han sido reportados (50). El significado de estas mutaciones no está claro, pero es intrigante y puede estar relacionado con la actividad de la adhesión celular de β -catenina. Varios tumores de colon que expresan β -catenina y APC, lo que sugiere que otros miembros de la vía también pueden estar implicados (47). GSK-3 β también está relacionado con la formación de tumores debido a su participación en la vía de señalización Wnt, por lo que es un buen candidato como supresor tumoral, ya que no se han detectado mutaciones inactivadoras en la proteína cinasa en tumores humanos; sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo de regulación de esta proteína en la vía Wnt posiblemente debido a que GSK-3 β tiene funciones adicionales que son esenciales en otras vías (46).

Aunque muchos estudios han sugerido que la GSK-3 β es un blanco prometedor para el desarrollo de fármacos, por ejemplo el litio, que ha sido usado con eficacia para el tratamiento del trastorno bipolar, ninguno de los inhibidores disponibles ha

encontrado un uso clínico para el tratamiento de enfermedades tales como la diabetes mellitus, la enfermedad de Alzheimer, inflamación y cáncer. Esto es debido a sospechas de riesgos para la tumorigénesis a través de la activación de la señalización de Wnt como consecuencia de la inhibición de GSK-3 β y las múltiples funciones en el metabolismo celular y la señalización (51).

Aunque se han descrito muchos de los componentes de la ruta Wnt, muy poco se conoce acerca de su posible interacción con otras vías de señalización. Existen datos que sugieren la participación de PKC en la ruta de señalización Wnt, ya que se ha reportado que la sobreexpresión de PKC β 2 promueve el cáncer de colon a través de la supresión de la señalización del TGF β y de la activación de la vía de señalización APC/ β -catenina (Wnt canónica), pero se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esto. Además, se ha observado que después de la exposición de células de cáncer colo-rectal a ácidos biliares, PKC β 2 fosforila e inactiva a GSK-3 β . Asimismo, el producto del gen *wnt5a* parece estar sobre- expresado por la activación de PKC y disminuido por su inhibición, lo cual apoya la hipótesis de una posible convergencia de la señalización por Wnt y PKC durante el desarrollo de procesos cancerosos. En nuestro laboratorio, mediante estudios de co-inmunoprecipitación recíproca e inmunofluorescencia, demostramos la interacción específica de las proteínas clave de la ruta Wnt GSK-3 β y β -catenina con la isoforma ζ de PKC. Hemos demostrado que PKC ζ modula positivamente la actividad transcripcional mediada por β -catenina regulando su localización nuclear (52), y en este trabajo se exploró el significado fisiológico de la interacción entre GSK-3 β y PKC ζ .

8 La Proteína Cinasa C

La proteína cinasa C (PKC) es en realidad una familia de cinasas de serina-treonina, importante en los mecanismos de señalización intracelular que regulan una amplia variedad de funciones celulares como son proliferación, apoptosis, sobrevivencia y migración celular; existe además una importante evidencia experimental que relaciona la desregulación de la actividad de PKC con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (53).

Se han descrito 9 genes que codifican para 10 isoenzimas de PKC clasificadas de acuerdo a criterios estructurales y de activación.

- PKC clásicas; PKC α , β I, β II y γ , poseen una región de unión a Ca²⁺ (C2) y un dominio doble de dedos Zn (C1A y C1B) que se regulan por calcio, diacilgliceroles

(DAG) y PS.

- PKC nuevas; PKC δ I-III, ϵ , η y θ , que se regulan por DAG y fosfatidilserina.
- PKC atípicas como PKC ζ y λ , que pueden ser reguladas por 3-fosfoinosítidos, fosforilación dependiente de PDK1 y a través de interacciones específicas proteína-proteína mediadas por su dominio PB-1 (53, 54).

8.1 Estructura de la PKC

Las isoformas de PKC están formadas por una cadena polipeptídica que consiste en un dominio regulador y un dominio catalítico. El dominio regulador tiene sitios de unión para cofactores lipídicos y calcio que participa en las interacciones proteína-proteína y median la regulación y la localización de PKC. El dominio catalítico incluye sitios de unión al ATP y al sustrato. La enzima posee regiones conservadas (C1 a C4) y regiones variables (V1 a V5). La región estable C1 está presente en todas las isoformas de PKC y contiene un dominio auto-inhibidor o pseudosustrato que mantiene a la enzima en forma inactiva en ausencia de cofactores o activadores. Este dominio C1 es rico en residuos de cisteína implicados en la unión a segundos mensajeros como los diacilgliceroles (DAG) y a otros activadores como los ésteres de forbol. Cada dominio rico en cisteína puede tener una contribución diferente a la activación de la enzima. Las isoformas clásicas poseen una región en el dominio C2 para unión a calcio que tiene un doble papel en la regulación de la actividad de PKC clásicas, mediando la unión a calcio y las interacciones entre proteínas. El dominio catalítico de PKC comprende las regiones C3 y C4: en la región C3 está el sitio de unión al ATP y en la región C4 se encuentra el sitio de unión al sustrato de PKC, lugar ocupado por el pseudosustrato cuando PKC está en forma inactiva (Figura 7).

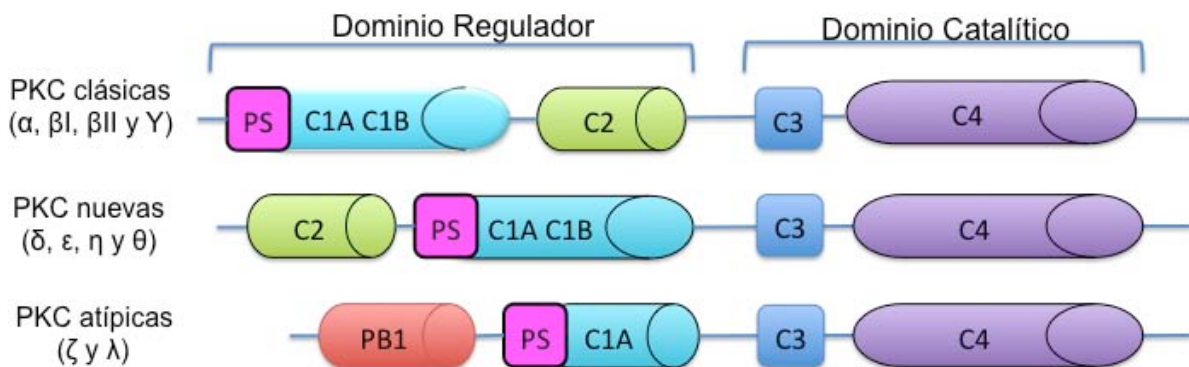


Figura 7. Estructura primaria de las isoformas de la PKC.

8.2 Regulación de la actividad de PKC

La expresión de las distintas isoformas de PKC varía de un tejido a otro, de una línea celular a otra. Una misma isoforma en líneas celulares distintas puede tener funciones y rutas de activación diferentes. La activación de las isoformas de PKC ocasiona cambios en su localización subcelular; el efecto de los activadores aumenta la afinidad de la PKC por los compartimentos membranales ocasionando la translocación de la PKC del citosol a las membranas. El fosfolípido DAG tiene una función relevante en la activación de las PKC al incrementar la afinidad de las PKC por la membrana celular y una vez activas, fosforilan una amplia gama de sustratos, lo que dificulta la determinación de las vías intracelulares funcionales de cada isoforma de PKC (54 y 55).

Se han reportado cambios específicos y reproducibles en los patrones de expresión de las isoformas de PKC en varios tipos de transformaciones tumorales como en los carcinomas de colon. En el cáncer de colon la PKC β II parece estar sobreexpresada en etapas tempranas pero la expresión de las isoformas α y β I parecen decrecer en etapas tardías del desarrollo tumoral (56). El producto del gen *wnt5a* parece estar sobre-expresado por la activación de PKC y disminuido por su inhibición que sugiere una posible convergencia de la señalización por Wnt y PKC durante el desarrollo de procesos cancerosos. 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 fibroblastos se demostró que la inactivación de la GSK-3 β por ligandos Wnt es sensible a inhibición por PKC (57). Se ha mostrado 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 (58).

9 Antecedentes experimentales

En el laboratorio se encontró que existe interacción entre las rutas de señalización Wnt y las de PKC así como una participación compartida en la carcinogénesis colorectal. Observamos 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 maligno de líneas celulares de colon humano en cultivo. Mediante estudios de co-inmunoprecipitación recíproca e inmunofluorescencia, demostramos la

interacción específica de las proteínas clave de la ruta Wnt, β -catenina y GSK-3 β , con PKC ζ , y de la proteína APC con PKC δ . Demostramos que mientras que la PKC δ regula negativamente la ruta Wnt canónica por un mecanismo que involucra la regulación de la degradación de β -catenina a través de la fosforilación de APC (59), la PKC ζ modula positivamente la ruta Wnt por un mecanismo que no involucra la degradación de β -catenina sino la regulación de su localización nuclear (52), pero aún desconocíamos el significado de la interacción entre GSK-3 β y PKC ζ , que constituyó el objetivo de investigación de esta tesis.

10 Objetivo general

Investigar el significado de la interacción específica entre PKC ζ y GSK-3 β en la vía de señalización Wnt.

11 Hipótesis

La activación de la vía de señalización Wnt activa a PKC ζ la cual fosforila a GSK-3 β .

12 Objetivos específicos

1. Investigar qué isoforma de PKC se asocia GSK-3 β en líneas celulares normales y tumorales de colon humano.

Estrategia experimental:

Co-inmunoprecipitación recíproca en los siguientes contextos celulares:

Línea	Normal/Tumoral	APC	Wnt B-catenina
		(normal/mutado)	(basal/activa)
112CoN	N	N	B
RKO	T	N	B
SW480	T	M	A

2. Investigar si GSK-3 β y PKC cambian de localización intracelular debido a la estimulación con ligandos Wnt.

Estrategia experimental:

Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

3. Determinar si al activar la vía Wnt GSK-3 β se convierte en sustrato de fosforilación de PKC.

Estrategia experimental:

Tratamiento *in vivo* con ligandos Wnt por 5 min. seguido de inmunoprecipitación y análisis por WB (con anti-PKC sustrato).

4. Investigar si al activarse la vía Wnt la PKC ζ fosforila a la GSK-3 β .

Estrategia experimental:

Inhibición farmacológica y “knockdown” de PKC ζ .

5. Estudiar si la fosforilación de PKC ζ en GSK-3 β la activa o inactiva.

Estrategia experimental:

Inmunoprecipitación de GSK-3 β y determinación de su actividad *in vitro*.

6. Mapear el sitio que fosforila PKC ζ en GSK-3 β .

Estrategia experimental

Análisis *in silico* de la secuencia de GSK-3 β para obtener sitio (s) candidato (s) y creación de mutante inactivadora y fosfo-mimética del sitio.

13 Materiales y Métodos**Cultivo celular**

Se utilizaron las líneas celulares no tumorales de colon 112CoN (colon humano embrionarias) y las células cancerosas RKO y SW480 (de carcinoma de colon humano), adquiridas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, E.U.). Las células 112CoN son una línea no cancerosa obtenida a partir de colon embrionario humano. Las células cancerosas 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 112CoN y RKO se cultivan en Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Las células SW480 se

mantienen en medio DMEM F-12 suplementado con 5% de suero fetal, antibióticos y glutamina. Las células se mantuvieron a una temperatura de 37° en una atmósfera de 95% aire 5% CO₂.

Anticuerpos

Los anticuerpos contra GSK-3 β (anticuerpo policlonal de conejo y anticuerpo monoclonal de ratón) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology y Millipore.

La Proteína A-Sepharosa y el inhibidor específico pseudosustrato-PKC ζ se obtuvieron de Calbiochem.

El péptido sustrato de GSK-3 (GSM) se obtuvo de Millipore.

Anti-PKC sustrato se obtuvo de Cell Signaling Technology.

Plásmidos

El plásmido que codifica para la GSK-3 β humana (HA-GSK-3 β wt pcDNA3, Addgene plasmid 14753) fue obtenido de Addgene.

El plásmido pSUPER.PKC ζ .RNAi (donado por el Dr. Alex Toker a Addgene (Addgene plásmido 10803) se utilizó para los experimentos de knockdown de PKC ζ cuya construcción y eficacia están reportadas en (60) y como control se usó el plásmido vacío pSUPER.

Los plásmidos reporteros de la actividad transcripcional de β -catenina pTOPFlash y pFOPFlash se obtuvieron de Upstate Biotechnology .

Ensayos de activación por ligandos Wnt e inhibición de PKC ζ

Para la inhibición farmacológica de PKC ζ las células RKO y SW480 se incubaron en ausencia o en presencia del inhibidor selectivo Myr-PKC ζ -PS (20 μ M) durante una hora. Las células se estimularon con ligando Wnt3a o con Wnt5a (100 ng/ml) durante 5 minutos, posteriormente se lavaron y se lisaron.

Inmunoprecipitación

Las células con un 90% de confluencia se lavaron tres veces en PBS frío. Se agregó buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0.5% e inhibidores de proteasas y fosfatasas) y se resuspendieron 20 minutos en agitación en frío. Los lisados se clarificaron por centrifugación y la cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (BioRad). Los extractos totales se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml de proteína, se clarificaron durante 1 hora a 4°C con suero preimmune y proteína A sepharosa luego se añadió el anticuerpo adecuado y se incubaron toda la noche a 4°C. A cada muestra se le agregaron 25 μ l de proteína A-sepharosa y se incubó por 2 horas en frío; el inmunoprecipitado se lavó dos veces

con un buffer de alta concentración de sal (Tris 50 mM, NaCl 600 mM adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasa) y una vez con buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasa). Las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron por Western blot.

Western blot

Las proteínas se separaron (50-75 mg por electroforesis en un gel de poliacrilamida (10-12% 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. 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).

Inmunofluorescencia

Las células se crecieron en cubreobjetos previamente tratados con Poly-d-lysine hasta confluencia. Las células se fijaron con acetona por 5 minutos y se permeabilizaron con 0.1% de tritón X-100 durante 7 minutos. Se bloquearon con 1% de BSA (libre de IgG) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente e incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios (1 µg/mL GSK-3β y dilución 1:50 de PKCζ en solución bloqueadora). Las células se lavaron 3 veces con PBS e incubaron con una dilución 1:100 de anticuerpos secundarios acoplados a FITC o rodamina (anti-conejo y anti-ratón (Jackson)). Las células se lavaron 3 veces antes de montarse en portaobjetos previamente tratados con Vectashield (Biorad) y fueron analizadas por microscopía confocal (Leica TCS SP5) con un láser de argón y krypton a un aumento de 60X.

Análisis por citometría de flujo

Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% en buffer FACS (PBS con 4% suero fetal bovino) e incubadas 10 minutos a 37°C. Se centrifugaron a 3000 rpm por 2 min. y se incubaron con metanol absoluto frío por 30 minutos a 4°C. Después de eliminar el metanol y lavar con buffer FACS se agregó una dilución 1:50 del anticuerpo primario anti-GSK-3β, anti-GSK-3β p-serina 9, anti-AKT 1/2/3 y anti-AKT

p-treonina 308 durante 15 minutos a 4°C. Se lavaron las células con buffer FACS y se incubaron en una dilución 1:100 de anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a FITC o bien anti-conejo acoplado a FITC por 15 min. a 4°C y luego se lavaron con buffer FACS. Las células se mantuvieron en el buffer para su posterior análisis por FACS (FACScalibur, BD).

Ensayos de RNAi

Las células se transfectaron con 2 µg del plásmido vacío pSuper (control) o con pSUPER-RNAi-PKCζ (Addgene) usando lipofectamina 2000. La eficiencia de knockdown se analizó 36 hrs. post-transfección, tanto por Western blot como por citometría de flujo.

Ensayo de actividad de GSK-3β *in vitro*

Se inmunoprecipitó a GSK-3β a partir de células que fueron incubadas en ausencia o presencia de ligandos Wnt (100ng/ml). Los complejos inmunes se lavaron dos veces con buffer A (Tris 50 mM, NaCl 0.6M, Tritón X-100 0.5% (pH8.3), inhibidores de proteasas, fosfatasas e Igepal 0.5%) y un lavado con el buffer B (50mM Tris, 0.15 M NaCl (pH 7.5) 2-mercaptoetanol 50mM). La actividad de la cinasa se inició resuspendiendo el inmunoprecipitado en un buffer de cinasa (Tris 40mM, MgCl₂ 20 mM (pH 7.5), [³²P] ATP 10µM [6000 Ci/mmol], en presencia o ausencia de sustrato de GSK-3β GSM (4mg) y en presencia o ausencia del inhibidor de GSK-3β BIO(2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime (5µM). Se Incubó a 30 °C por 20 minutos y se paró la reacción con buffer de muestra de electroforesis. Las muestras se hirvieron 5 min. y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (18% SDS-PAGE). El gel se tiñó con azul de Coomassie por 30 minutos, se destiñó con solución desteñidora y se analizó por autorradiografía.

Mutaciones del gen GSK-3β

Mutación de Ser 147 del gen GSK-3β por Alanina

Se diseñaron oligos para generar una mutación de la Ser 147 por una alanina en el gen de GSK-3β (Tabla 1) que está contenido en el plásmido pcDNA3 de 6775 bp, bajo el promotor T7 y es resistente a ampicilina. Al hacer el cambio en ese sitio, se pierde el sitio de corte de DrdI y se generan dos más *XhoI* y *ScI* (Figura 8). Se utilizó el sitio de corte *XhoI* para determinar si se realizó el cambio en la secuencia y se confirmó por secuenciación.

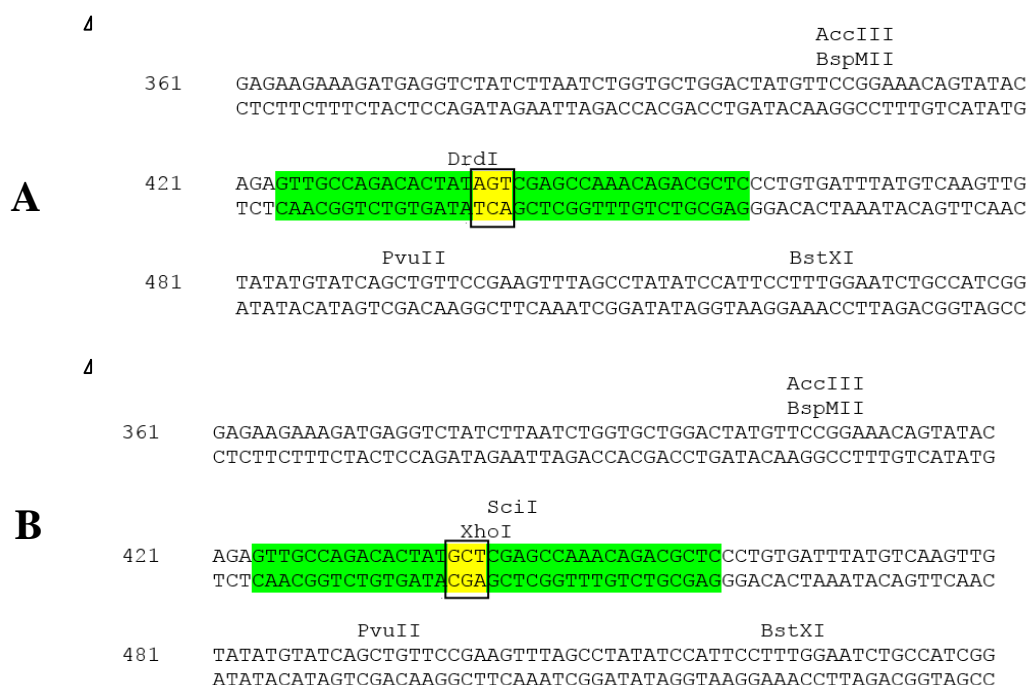


Figura 8. Mutación de la Ser 147 por alanina en el gen de GSK-3 β . A. Parte de la secuencia del gen de GSK-3 β en la región que se quiere mutar, se observa un sitio de corte para *DrdI*. B. Parte de la secuencia del gen de GSK-3 β en donde al hacer teóricamente la mutación al cambiar la Ser 147 por Alanina se pierde el sitio de corte para *DrdI* y se generarán dos sitios de corte nuevos *XhoI* y *SciI*.

Oligo	Secuencia 5' – 3'	Tamaño	TM
GSK-3 β IsoIFor	GTTGCCAGACACTATGCTCGAGCCAAACA GACGCTC	36 bases	80°C
GSK-3 β IsoIRev	GAGCGTCTGTTTGGCTCGAGCATAGTGTC TGGCAAC	36 bases	80°C

Tabla 1. Oligos para la mutación de la Ser 147 por Alanina en GSK-3 β .

Mutación de Ser 147 por ácido glutámico

Se diseñaron oligos para generar una mutación de la Ser 147 por ácido glutámico (el cual mimetiza al aminoácido fosforilado) en el gen de GSK-3 β (Tabla 2). La mutación se confirmó por secuenciación.

Ambas mutaciones se realizaron utilizando el QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene. Se utilizó la DNA polimesara *Pfu* Turbo que presenta alta fidelidad y procesividad por lo que extiende e incorpora los

oligonucleótidos con la mutación deseada generando cadenas circulares del oligo con un “gap”.

Tabla 2. Oligos para la mutación de la Ser 147 por ácido glutámico en GSK-3 β .

Oligo	Secuencia 5' – 3'	Tamaño	TM
GSK-3 β IsolFor	GTTGCCAGACACTATGAACGAGCCAAACA GACGCTC	36 bases	80°C
GSK-3 β IsolRev	GAGCGTCTGTTTGGCTCGTTCATAGTGTC TGGCAAC	36 bases	80°C

Con la enzima DpnI se digirió el DNA parental metilado y finalmente el producto de PCR se transformó en la cepa XL1-Blue de *E. coli* que recirculariza el plásmido al ligar los extremos del mismo (Figura 9). La transformación se realizó utilizando células competentes de la cepa *E. coli*, XL1-Blue que integran al vector deseado al someterlas a un choque térmico (30 segundos a 42°C); las células se recuperaron en medio LB por una hora y se inocularon en placas con medio sólido de LB más ampicilina para seleccionar a las transformantes y se incubaron a 37°C durante toda la noche. De las colonias transformantes se pusieron a crecer las bacterias en 5ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina con agitación constante a 37°C durante la noche. Se prosiguió a extraer el plásmido mediante extracción fenol-cloroformo, se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% para checar su integridad, se cuantificaron y se secuenciaron.

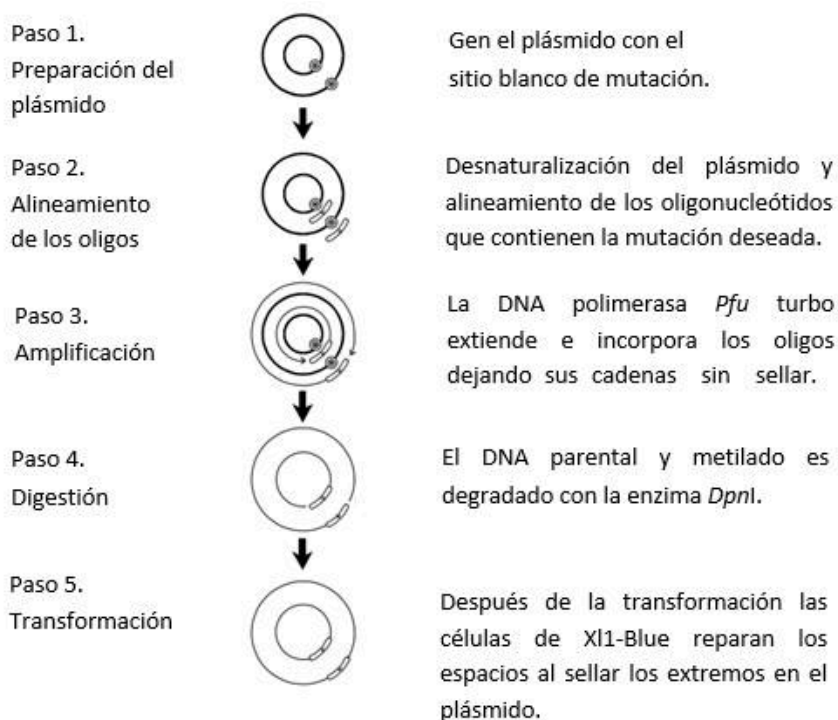


Figura 9. Pasos para realizar la mutación utilizando QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit.

Las condiciones de las reacciones de PCR fueron las siguientes:

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 segundos
2	12-18	95°C	30 segundos
		55°C	1 minuto
		68°C	2 minutos

Ensayo de gen reportero acoplado a luciferasa (reportero de la actividad transcripcional de β -catenina).

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Carlsbad, Ca) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se sembraron células RKO y se co-transfectaron con 1 μ g del reportero TOPFlash (plásmido reportero que lleva los sitios de unión para β -catenina-TCF) o FOPFlash (plásmido reportero pero con los sitios de unión a TCF mutados), con 0.05 μ g de Renilla luciferasa como control de transfección, y con 1 μ g de plásmido GSK-3WT o GSK-3S147A. 6 horas después de la transfección las células se colocaron en medio normal por 24 horas. Las células se lavaron con PBS y se lisaron a temperatura ambiente; se clarificaron por centrifugación a 12000 rpm durante 5 min. y se utilizaron 15 μ l de cada lisado para medir la expresión del gen reportero de luciferasa (Luciferasas Assay Kit Promega). La actividad se normalizó 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 con diferentes preparaciones celulares.

14 Resultados

14.1 La PKC ζ y GSK-3 β co-inmunoprecipitan de manera recíproca y co-localizan tanto en células no malignas como en malignas

En nuestro laboratorio hemos reportado que la isoforma ζ de PKC se sobre-expresa en las células tumorales con respecto a las que expresan células normales del colon (52). También se ha reportado que algunas isoformas de PKC inducen la inactivación de GSK-3 β fosforilando a la enzima en Ser 9 (27). En estudios *in vitro* se demostró que GSK-3 β , pero no GSK-3 α , se inactiva de este modo por algunas isoformas de PKC pero no por otras tales como PKC ϵ y PKC ζ (61, 62, 63). Debido a los antecedentes experimentales mencionados previamente, que PKC ζ y GSK-3 β interactúan de manera específica en células cancerosas de colon, para investigar

el significado de esta interacción, decidimos primero comprobar esto en ensayos de co-inmunoprecipitación recíproca. Como se puede observar en la figura 10, el análisis por Western blot de los inmunoprecipitados mostró la presencia de PKC ζ en el inmunoprecipitado de GSK-3 β y la presencia de GSK-3 β en los inmunoprecipitados de PKC ζ , en las células normales 112CoN y en las células malignas RKO y SW480, mostrando que la interacción entre estas dos proteínas es recíproca y es específica.

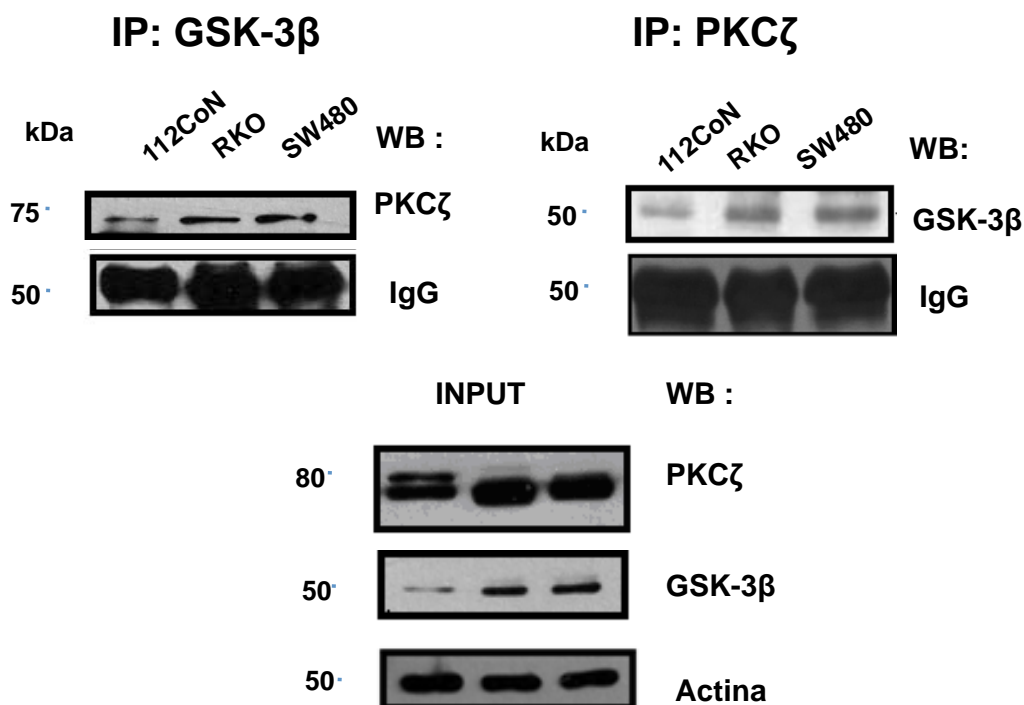


Figura 10. PKC ζ interacciona con GSK-3 β . PKC ζ y GSK-3 β se inmunoprecipitaron a partir de lisados obtenidos de células humanas no malignas 112CoN o de células malignas RKO y SW480

Con el fin de analizar la localización intracelular que presentan las proteínas GSK-3 β y PKC ζ en condiciones basales, y de investigar si ocurren cambios en su localización en respuesta al tratamiento con ligandos Wnt, se realizó un curso temporal de tratamiento con ligandos Wnt por 5, 15 y 30 minutos, y se analizó la localización intracelular de GSK-3 β y de PKC ζ en ensayos de inmunofluorescencia seguidos de su análisis por microscopía confocal. Los resultados obtenidos después de 5 minutos de tratamiento se muestran en la Figura 11 A, B y C, y los obtenidos a mayor tiempo de tratamiento se muestran en el apéndice de esta tesis. Los resultados de estos experimentos corroboraron los datos de inmunoprecipitación, en el sentido de que encontramos que existe co-localización de estas dos proteínas en las 3 líneas celulares estudiadas lo que confirma que existe interacción entre ellas. En condiciones basales, se observa una distribución de

GSK-3 β y de PKC ζ principalmente en el citosol tanto en células no malignas 112 CoN (Figura 11A) como en las células malignas RKO (Figura 11B) y SW480 (Figura 11C). Cuando las células se estimularon con ligandos Wnt por 5 minutos, se observó que ambos ligandos indujeron una translocación de GSK-3 β al núcleo tanto en las células normales 112CoN, como en las malignas, colocándose GSK-3 β con PKC ζ en el citoplasma y en algunas regiones del núcleo. Sin embargo, con respecto a PKC ζ , solamente se observaron cambios en su localización intracelular como consecuencia del estímulo con ligandos Wnt en las células malignas, en las que es muy evidente que el tratamiento con ligandos Wnt produjo una redistribución de PKC ζ del núcleo al citoplasma (Figuras 11B y 11C).

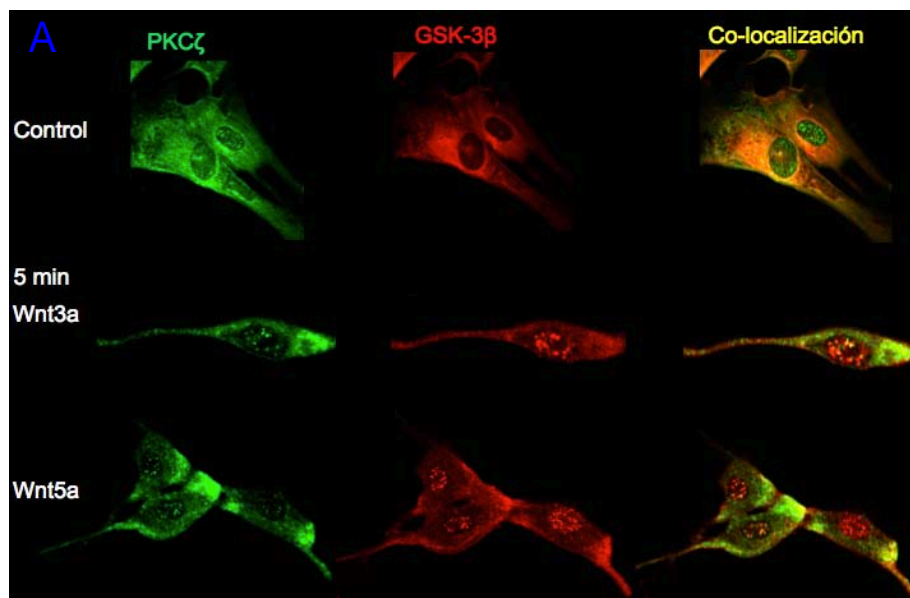


Figura 11A) Localización intracelular de las proteínas GSK-3 β y PKC ζ en células no malignas de colon humano 112CoN en condiciones basales (A) y con tratamiento de ligandos Wnt por 5 min que inducen que GSK-3 β se transloque del citoplasma al núcleo.

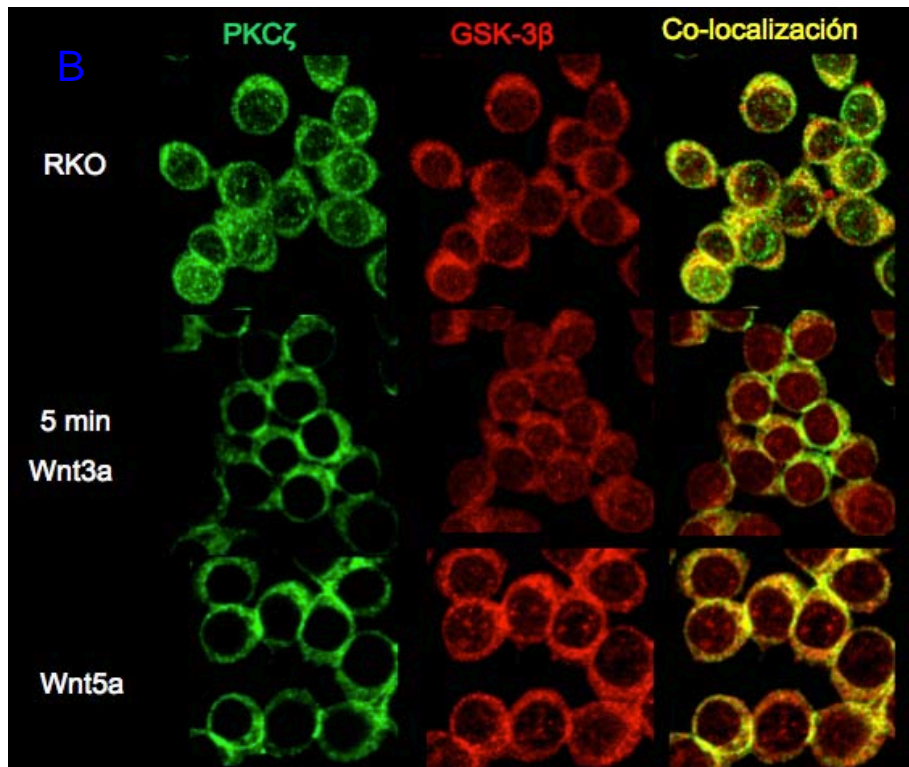


Figura 11B. Localización de las proteínas GSK-3 β y PKC ζ en células malignas RKO en condiciones basales y con tratamiento de ligandos Wnt, que inducen una relocalización intracelular de PKC ζ desde el núcleo al citoplasma y una redistribución de GSK-3 β desde el citoplasma al núcleo.

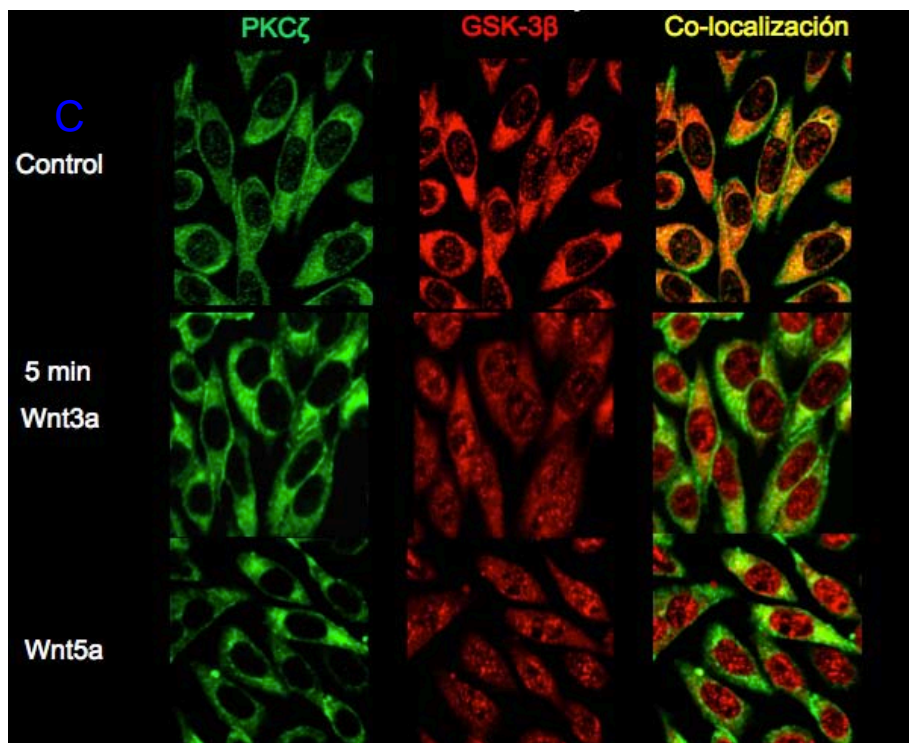


Figura 11C. Localización de las proteínas GSK-3 β y PKC ζ en células malignas SW480 en condiciones basales y con tratamiento de ligandos Wnt, que inducen una relocalización intracelular de PKC ζ desde el núcleo al citoplasma y una redistribución de GSK-3 β desde el citoplasma al núcleo.

14.2 Los ligandos wnt3a y wnt5a aumentan la fosforilación mediada por PKC de GSK-3 β en células cancerosas e inducen el efecto opuesto en las células no malignas

Para investigar el significado bioquímico de la interacción entre GSK-3 β y PKC, se examinó primero si GSK-3 β es sustrato de PKC como resultado de la activación con ligandos Wnt. Se utilizó un anticuerpo específico que reconoce los sitios consenso de PKC fosforilados en serina. Se incubaron células no malignas 112CoN o células malignas (ayunadas de suero fetal bovino por 6 horas) en ausencia o presencia de 100 ng/ml de ligandos Wnt durante 5 minutos y se procedió a analizar la GSK-3 β aislada por inmunoprecipitación. Observamos que en las líneas celulares normales 112CoN (Figura 12A), los niveles basales de fosforilación de GSK-3 β mediada por PKC son mayores en comparación con los encontrados en las líneas celulares tumorales donde sus niveles son bajos (Figura 12B). El tratamiento con ligandos Wnt (3a y 5a) en células normales 112CoN, ocasiona una disminución en la fosforilación de GSK-3 β a los 5 minutos mientras que en las líneas celulares tumorales SW480 y RKO (Figura 12B), se observa un aumento en la fosforilación por PKC. El resultado sugiere que la PKC regula a la GSK-3 β y el tratamiento con los ligandos Wnt ocasionan efectos opuestos en células normales y malignas.

IP: GSK-3 β

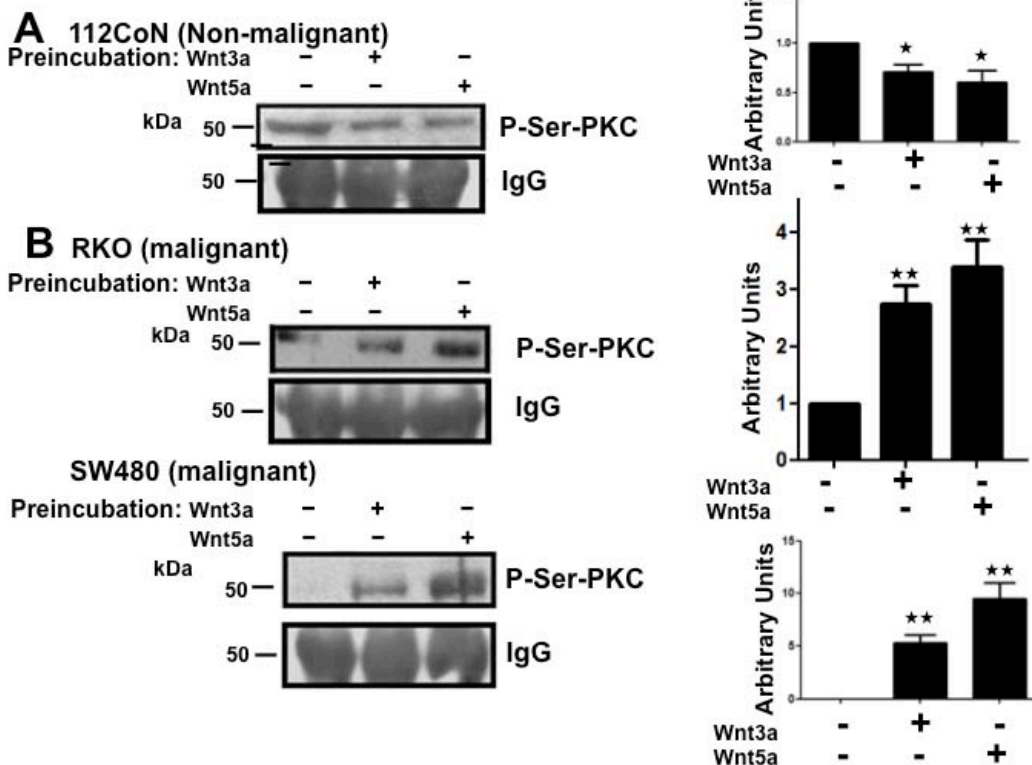


Figura 12. GSK-3 β es un sustrato de PKC *in vivo*. Las células no malignas (A) y malignas (B) se incubaron en ausencia o presencia de ligandos Wnt3a o 5a por 5 min. GSK-3 β se inmunoprecipitó a partir de lisados celulares y los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-sustrato de P-Ser-PKC.

La fosforilación de GSK-3 β por PKC ocurre rápidamente y de manera transitoria, como se puede observar en el curso temporal mostrado en la Figura 13, ya que después de 5 minutos de tratamiento con ligando Wnt5a, la fosforilación de GSK-3 β mediada por PKC empieza a regresar al estado basal, en concordancia con el curso temporal obtenido en los ensayos de inmunofluorescencia. Para los siguientes experimentos se eligió, por tanto, el tiempo de 5 minutos de estimulación con ligandos Wnt, con el fin de obtener los niveles más altos de fosforilación sobre la GSK-3 β .

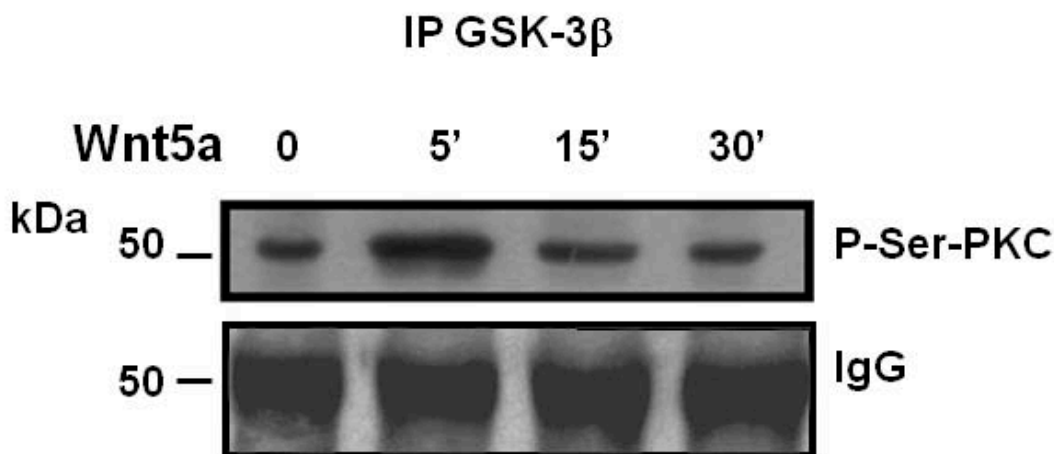


Figura 13. Curso temporal de estimulación de células malignas RKO con ligando Wnt5a .

14.3 La estimulación de células malignas con ligandos Wnt induce la fosforilación de GSK-3 β por PKC en un sitio distinto a serina 9.

La actividad de la GSK-3 β es inhibida significativamente por la fosforilación en Ser 9 de su extremo N-terminal; varias cinasas pueden fosforilar dicho residuo como las proteínas Akt/PKB, PKA, PKC, y p90 RSK entre otras. Se sabe que esta fosforilación inhibitoria de GSK-3 juega un papel importante en la señalización inducida por insulina y por factores de crecimiento, pero exactamente cómo los ligandos Wnt suprimen la actividad de GSK-3 β continúa siendo un misterio sin aclararse, a pesar de que un paso esencial en la ruta Wnt canónica es la inhibición de la actividad de GSK-3, evidenciado por el uso de fármacos inhibidores de la enzima que mimetizan la activación de la vía Wnt (27). Como varios grupos han reportado, los Wnts no inducen una fosforilación en Ser 9 y para verificar si el estado de fosforilación de GSK-3 mediado por PKC se modifica con el tratamiento por ligandos Wnt o por insulina, se analizó por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 14A el curso temporal de la fosforilación de GSK-3 β en Ser 9 se obtuvo al estimular a las células con ligandos Wnt (3a o 5a) en comparación con la insulina y como control de activación de la vía de la insulina analizamos la fosforilación en Thr308 de la cinasa AKT. Se confirmó que el ligando Wnt3a no induce la

fosforilación de GSK-3 β en la serina 9 ni tampoco inducen la fosforilación de Akt en Thr308 mientras que el ligando Wnt5a produce sólo la fosforilación transitoria de Akt en Thr308 pero no la fosforilación de GSK-3 β en Ser 9 (Figuras 14A y Figura 14B).

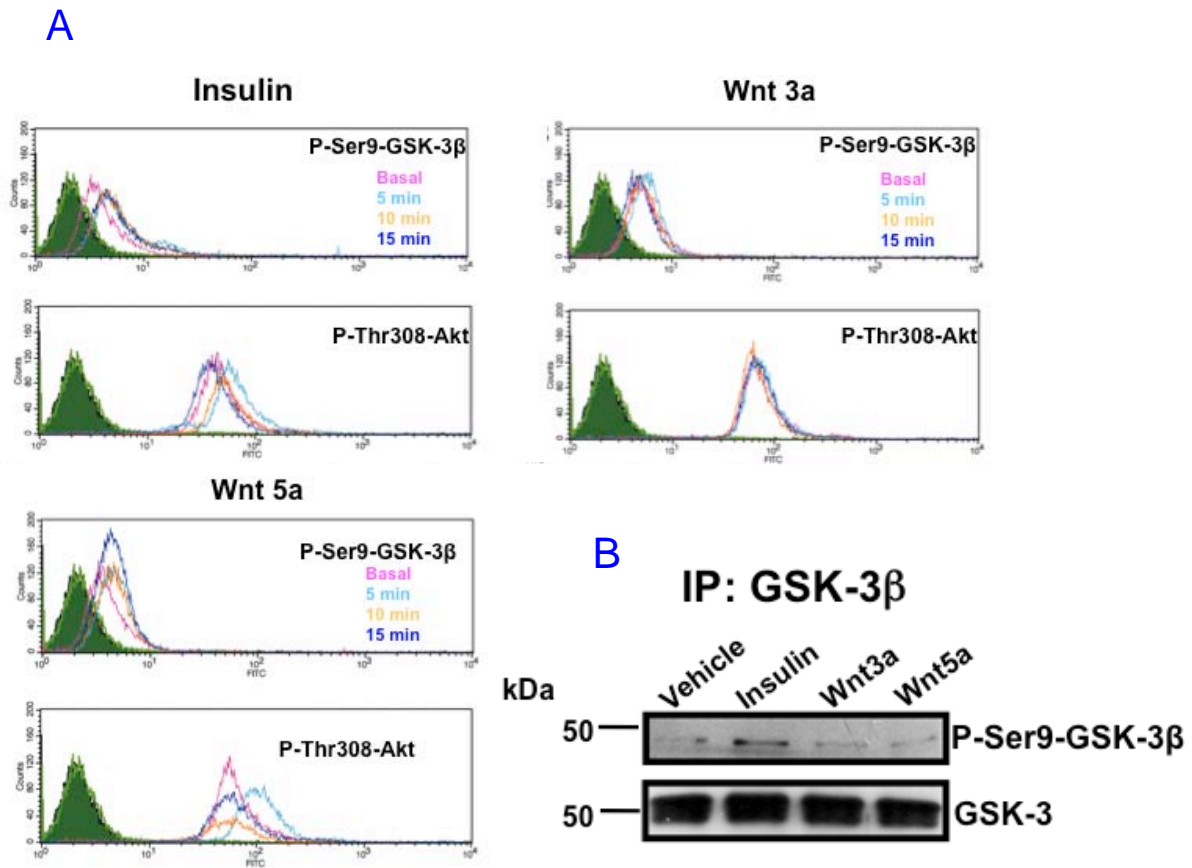


Figura 14A. Análisis por citometría de flujo del curso temporal de fosforilación inducida en GSK-3 y en Akt por estimulación de células RKO con insulina en comparación con ligandos Wnt. A) Fosforilación de GSK-3 β en células RKO estimuladas con insulina, ligando Wnt 3a y 5a. B) Análisis por Western blot de GSK-3 β inmunoprecipitada de las células RKO estimuladas por 5 min con insulina en comparación con ligandos Wnt, utilizando el anticuerpo anti P-Ser 9.

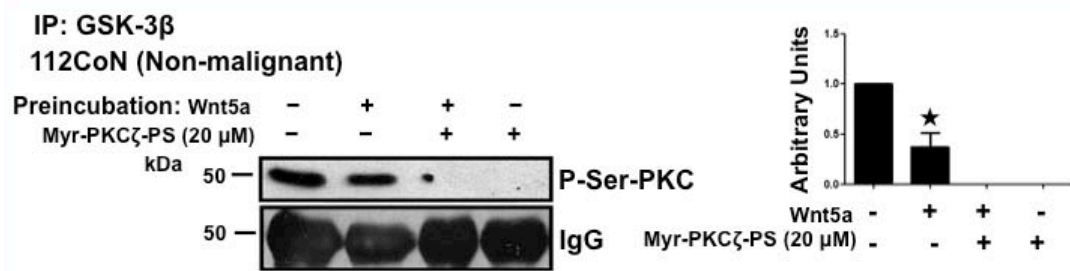
14.4 PKC ζ fosforila a GSK-3 β *in vivo*.

Se demostró mediante la técnica de co-inmunoprecipitación recíproca y microscopía confocal la interacción *in vivo* de la isoforma atípica ζ de PKC con proteínas reguladoras clave de la vía Wnt canónica GSK-3 β y que la localización intracelular cambia cuando se estimulan con ligandos Wnt. Los experimentos por citometría de flujo corroboraron que GSK-3 β no se fosforila en ser 9. Estos resultados sugieren que la isoforma atípica ζ de PKC podría participar en el mecanismo de regulación de GSK-3 β y para corroborarlo definitivamente se examinó el efecto de la inhibición de PKC ζ en la fosforilación de GSK-3 β .

Para realizar estos experimentos las células no malignas (112CoN) y malignas (RKO y SW480) se incubaron durante 1h en la ausencia o presencia de un péptido inhibidor miristoilado de PKC ζ que contiene la secuencia pseudosustrato MYR-PKC ζ -PS, Myr-SIYRRGARRWRKL-OH (Calbiochem) (20 μ M) y en ausencia o presencia de 100 ng/ml de Wnt5a durante 5 min. GSK-3 β se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-sustrato de P-Ser-PKC. Como se observa en la figura 15A, en las células normales 112CoN, la inhibición de PKC ζ elimina la fosforilación basal de GSK-3 β mediada por PKC y reduce la fosforilación inducida por Wnt5a. Consistente con el resultado mostrado en esta figura, en las células malignas RKO y SW480 (Figura 15B), se puede notar que hay menos y ninguna fosforilación basal en comparación con las células normales (112CoN). Sin embargo, al estimular a las células malignas con el ligando Wnt5a, la fosforilación de GSK-3 β mediada por PKC es inhibida por PKC ζ (Figura 15B). Estos resultados sugirieron nuevamente que la PKC atípica participa en la regulación de GSK-3 β .

Para confirmar los resultados farmacológicos, se hicieron experimentos de bloqueo de la expresión de la PKC ζ mediante knockdown transitorio con siRNA. En la figura 16A se observa la eficiencia del knockdown en ambos tipos celulares RKO y SW480, en la que se puede apreciar que la presencia del plásmido siRNAPKC ζ redujo la expresión de la PKC ζ en un 90% a las 36 horas post-transfección en ambas líneas celulares tumorales. Las células silenciadas en la expresión de PKC ζ se incubaron en ausencia de suero por 6 horas y luego se estimularon con o sin ligando Wnt5a. Se inmunoprecipitó a la GSK-3 β y se analizó por Western blot con anticuerpo anti-sustrato de P-Ser-PKC. Como se puede ver en la Figura 16B, los resultados mostraron con claridad una disminución significativa de la fosforilación de GSK-3 β inducida por Wnt5a cuando abatimos la expresión de la PKC ζ , confirmando los resultados obtenidos con la inhibición farmacológica de PKC ζ .

A



B

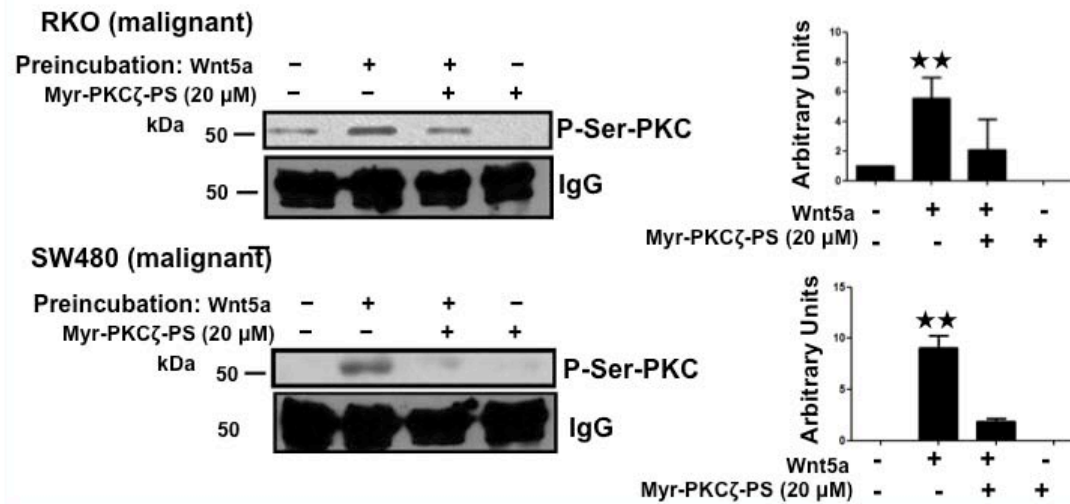
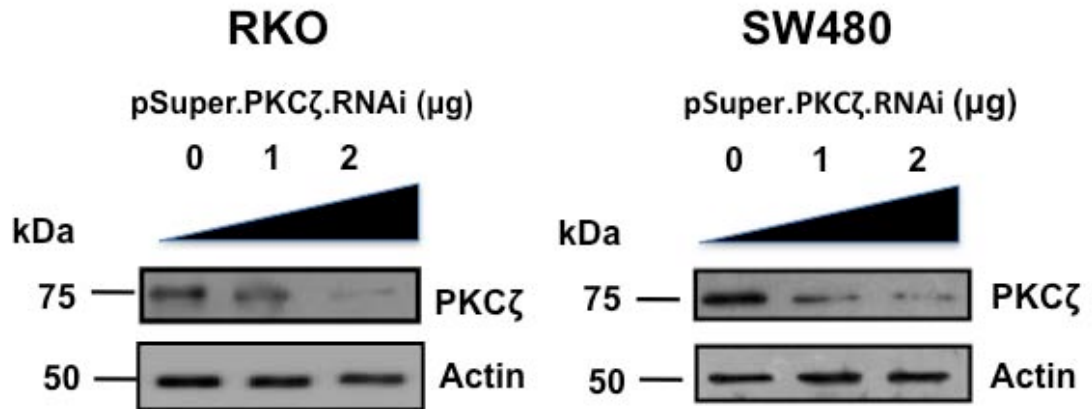


Figura 15. La inhibición farmacológica de PKC ζ bloquea la fosforilación de GSK-3 β . Las células no malignas 112CoN (A) y células malignas RKO o SW480 (B) se colocaron en medio reducido en suero, se incubaron en ausencia o presencia del inhibidor selectivo de PKC ζ (20 mM) durante 1 hora. Las células se incubaron en ausencia o presencia de Wnt5a durante 5 minutos. GSK-3 β se inmunoprecipitó a partir de lisados celulares y se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-sustrato P-Ser-PKC.

A



B

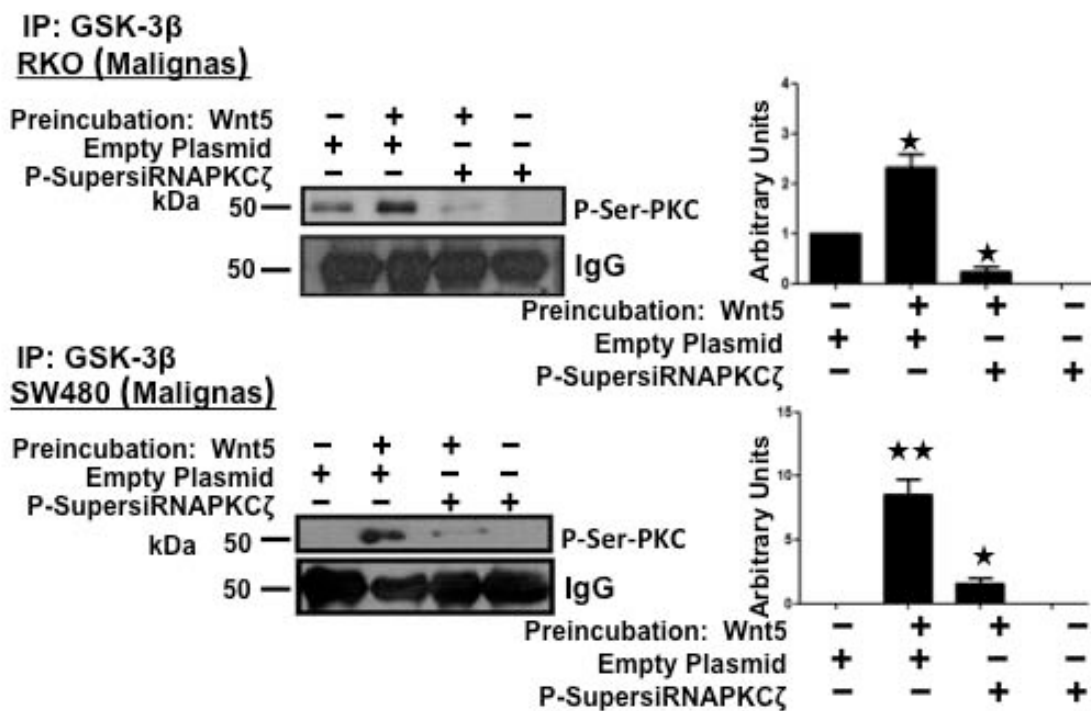


Figura 16. El bloqueo de la expresión de PKCζ mediante siRNA disminuye la fosforilación de GSK-3β. A) Eficiencia de knockdown de PKCζ. B) La estimulación por el ligando Wnt5a induce la fosforilación de GSK-3β por PKCζ pero el siRNA la disminuye.

14.5 La fosforilación de GSK-3β por PKCζ estimula su actividad

Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran que los ligandos Wnt producen un incremento en la fosforilación de GSK-3β, pero no sabíamos cuál es el efecto de esta fosforilación en la actividad de la enzima, si la activan o la inhiben. Para investigar esto, se incubaron las células tanto malignas como no malignas en ausencia o presencia de ligandos Wnt por 5 minutos, y se procedió a

inmunoprecipitar a la GSK-3 β para analizar el efecto de cada tratamiento en su actividad *in vitro*. Para esto se utilizó un sustrato comercial diseñado específicamente para GSK-3 (GSM), el cual es un péptido sintético (RRRPASVPPSPSLS RHS(pS)HQRR) basado en la glucógeno sintasa muscular, donde (pS) corresponde a la serina fosforilada.

La actividad de GSK-3 β se midió a partir de los inmunoprecipitados obtenidos de extractos celulares en ausencia o presencia del sustrato comercial GSM y en ausencia o presencia de un inhibidor selectivo de GSK-3 β , BIO con la finalidad de validar la especificidad del ensayo. La figura 17A ilustra cómo la GSK-3 β obtenida a partir de células no malignas (112CoN) disminuye su actividad al ser estimulada con ligandos Wnt3a y 5a comparada con el control. En contraste, la actividad de GSK-3 β obtenida a partir de células malignas RKO o SW480 (Figura 17B y 17C) se incrementó en comparación con el control. Como era de esperar, la fosforilación del sustrato GSM se inhibe en cada condición cuando el inhibidor de GSK-3 β BIO se añadió al ensayo. Por lo tanto, estos resultados indican que en las células malignas, la fosforilación inducida en GSK-3 β por PKC ζ es estimulatoria.

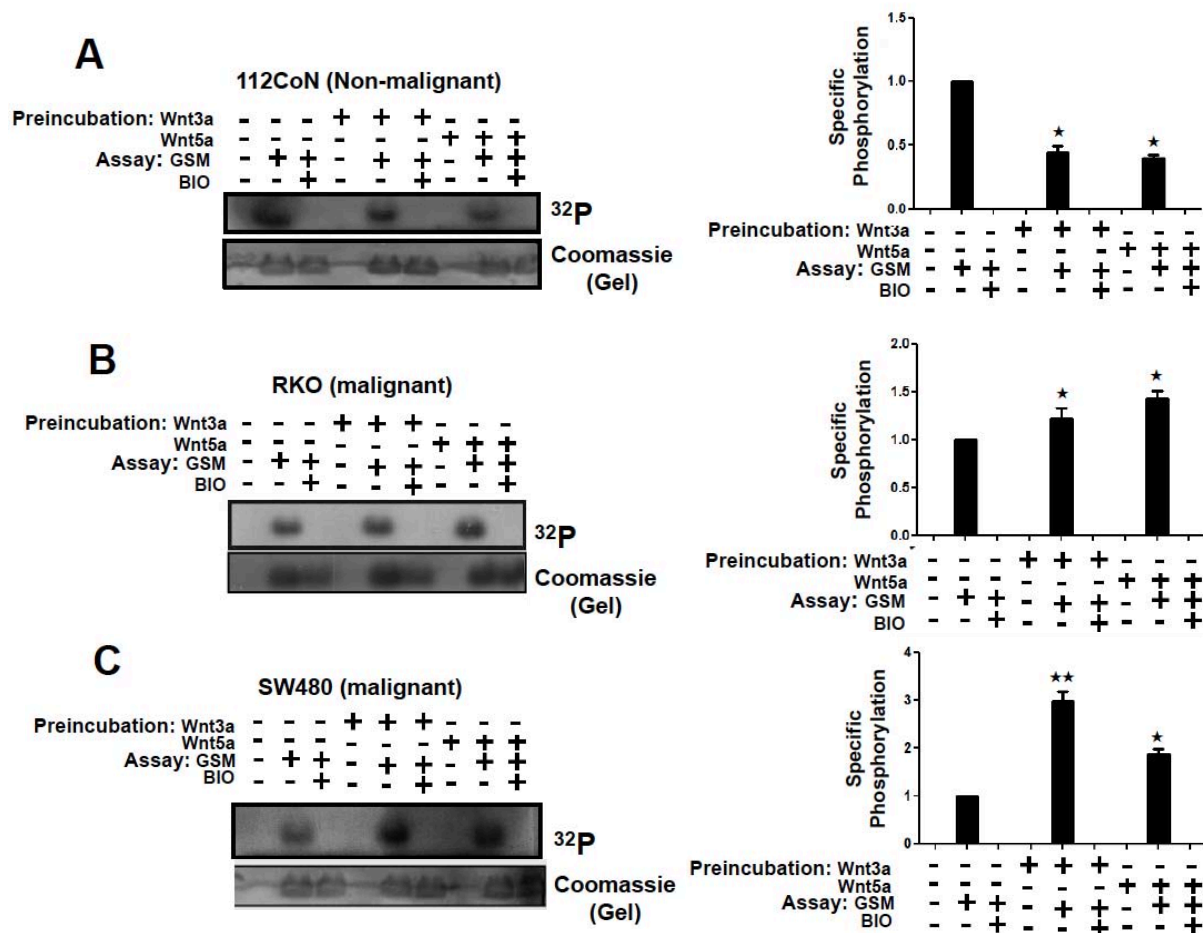


Figura 17. La fosforilación de GSK-3 β inducida por PKC ζ la activa. Ensayo de cinasa en las células no malignas 112CoN (A) y malignas (B) analizado por autorradiografía utilizando el inhibidor de GSK-3 β , BIO.

14.6 La fosforilación de GSK-3 β por PKC se requiere para mantener su actividad constitutiva basal

Para corroborar que el efecto de la fosforilación de GSK-3 β por PKC ζ es activatoria, se utilizó un RNAi para bloquear la expresión PKC ζ en células malignas (RKO). Se transfectaron de manera transitoria las células con el plásmido control o con el plásmido pSuper-siRNA-PKC ζ como se describe en Materiales y Métodos, y posteriormente se incubaron en ausencia (vehículo) o presencia de Wnt3a o 5a por 5 min (previo ayuno de suero fetal bovino por 6 horas). Las células se lavaron y GSK-3 β se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares para examinar su actividad *in vitro*. Como se observa en la Figura 18 el RNAi bloqueó el incremento en la actividad de GSK-3 β inducido por Wnt3a o 5a, pero de manera sorprendente, abolió también la actividad basal de GSK-3 β .

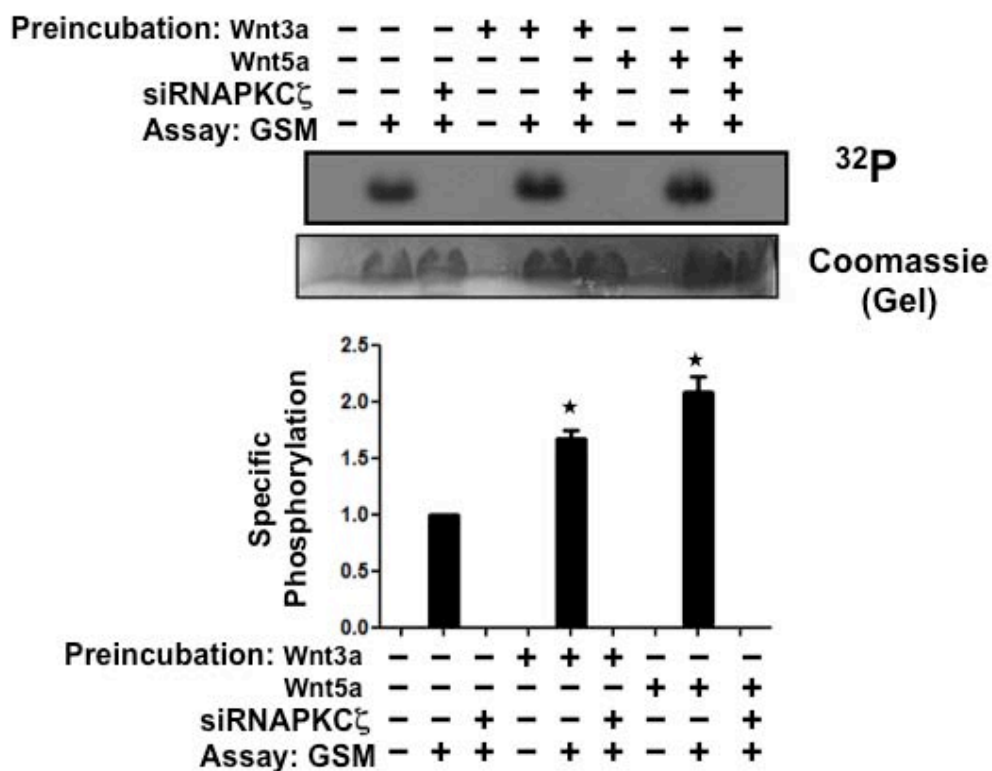


Figura 18. El bloqueo de la expresión de PKC ζ no solamente inhibe el incremento en la actividad de GSK-3 β inducido por ligandos Wnt sino que abate la actividad basal constitutiva de GSK-3 β . Las células fueron transfectadas con el plásmido control o con pSuperPKC ζ -RNAi. 30hrs. después de la transfección se colocaron en ayuno por 6 hrs., se incubaron en ausencia (vehículo) o presencia de Wnt3a o 5a durante 5 minutos y se inmunoprecipitó a GSK-3 β para analizar su actividad de cinasa *in vitro*.

Estos resultados por tanto indican que se requiere de la actividad de PKC ζ para mantener la actividad basal constitutiva de GSK-3 β en las células tanto no malignas

como malignas, pero que la estimulación con ligandos Wnt inducen un rápido (5-min) y transitorio cambio en el estado de fosforilación de GSK-3 β mediada por PKC ζ que es opuesto dependiendo del tipo celular: en células no malignas disminuye la actividad de GSK-3 β tras la estimulación con ligandos Wnt, mientras que en las células malignas incrementa la actividad de forma transitoria.

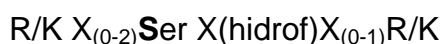
Los datos demuestran de manera contundente que la fosforilación de GSK-3 β por PKC ζ es activatoria y que es crucial para mantener la actividad constitutiva de GSK-3 β (Figura 18). A continuación se resumen los resultados obtenidos hasta el momento con cada línea celular (Tabla 3).

Línea	Normales/ Tumoral	GSK-3 β se asocia con PKC ζ	Los ligandos Wnt3a y 5a causan:		Ligando Wnt5a causa:	Los ligandos Wnt3a y 5a causan:
			\leftrightarrow GSK-3 β al núcleo	\leftrightarrow PKC ζ al citoplasma	Fosforilación de GSK-3 β por PKC ζ	Activación de GSK-3 β
112CoN	N	si	+++	no	no	si
RKO	T	si	+	si	si	si
SW480	T	si	+	si	si	si

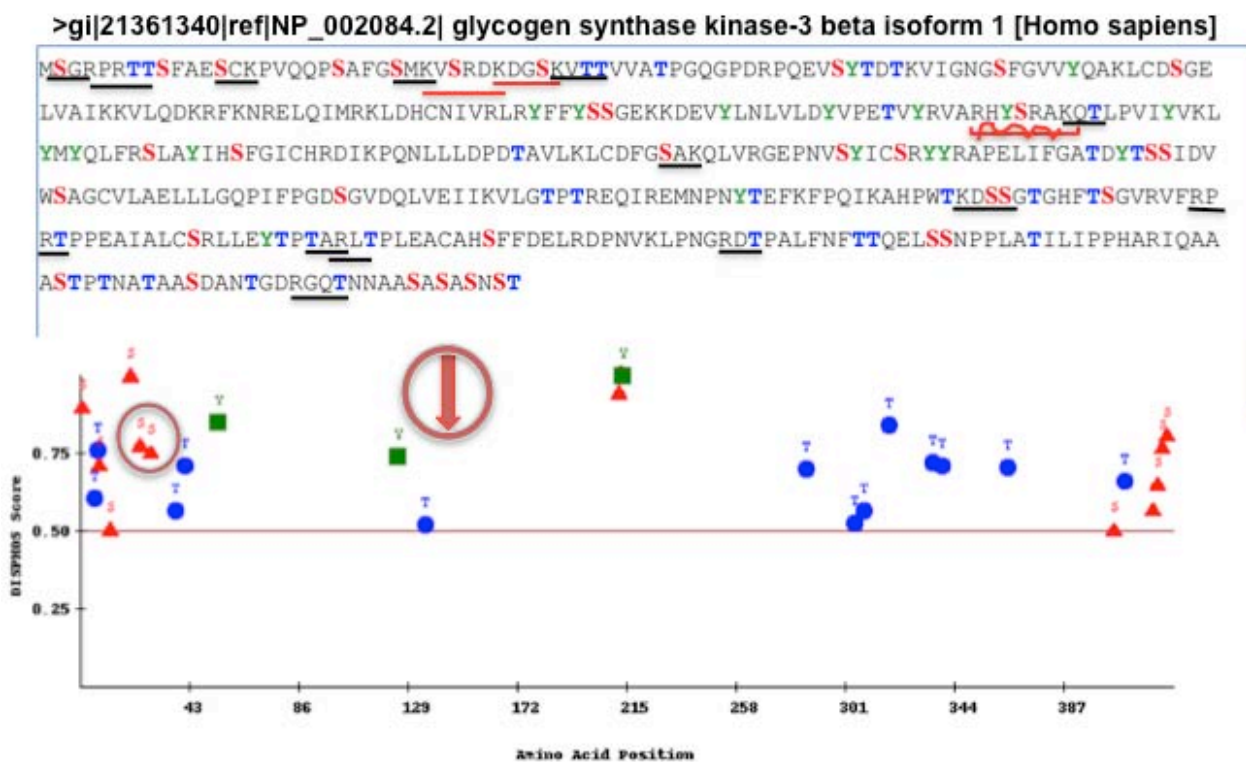
Tabla 3. Resumen general de resultados obtenidos.

14.7 El sitio de fosforilación en GSK-3 β por PKC ζ es la Ser 147.

Como varios grupos han reportado, que los ligandos Wnt no inducen la fosforilación de GSK-3 β en serina 9, lo siguiente que nos planteamos fue identificar el sitio que fosforila PKC ζ en GSK-3 β . Utilizando el programa NetPhosK 2,0 (<http://expasy.com/>) (Figura 19), que es una herramienta informática predictiva de sitios potenciales de fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina. Se realizó el análisis *in silico* de la secuencia primaria de GSK-3 β , buscando especialmente entre los sitios putativos, las serinas correspondientes al sitio reconocido por el anticuerpo utilizado previamente para reconocer serinas fosforiladas por PKC (anticuerpo PKC substrate de Cell Signaling) que es el siguiente:



El análisis *in silico* de la secuencia primaria de GSK-3 β mostró que entre los sitios putativos de fosforilación por PKC, la Ser 147 era el único sitio putativo que cumplía totalmente con los requisitos para ser reconocida por el anticuerpo anti-PKC substrate. Por tal motivo, y para investigar la importancia de este residuo, se decidió hacer dos construcciones mutantes de GSK-3 β : la primera fue el cambio de este residuo de Ser 147 por alanina que evitaría que fuera fosforilada por PKC ζ impidiendo la activación de GSK-3 β . La segunda mutación fue la de cambiar la Ser 147 por el ácido glutámico que mimetizaría el residuo fosforilado y permitiría la activación de GSK-3 β aún en el caso de que esté presente el inhibidor de PKC ζ .



<http://www.dabi.temple.edu/disphos/pred/predict>

Figura 19. Análisis *in silico* de la secuencia primaria de GSK-3 β (NetPhosK 2.0) que muestra los sitios putativos de fosforilación de GSK-3 β por PKC. Los sitios obtenidos aparecen subrayados en negro. Los tres sitios que muestran la secuencia consenso clásica con más alta probabilidad de ser fosforilados por PKC aparecen subrayados en rojo, y la Ser 147, que coincide perfectamente con la secuencia consenso reconocida por el anticuerpo anti P-Ser-PKC substrate usado en los experimentos, aparece subrayada en rojo con una línea curva.

Ambas mutantes se realizaron utilizando el kit de Quickchange, y se analizaron y confirmaron por secuenciación como se muestra a continuación:

Digestión con la enzima *Xho* I en la mutación de Ser 147 del gen GSK-3 β por Alanina.

Teóricamente, al realizarse la mutación se generarían dos sitios nuevos de corte *Xho*I y *Sci*I que no están presentes en el plásmido. Por tal motivo, después de extraer los plásmidos a partir de minipreps, algunas clonas se digirieron con la enzima *Xho*I lo que linearizaría el vector y que sugiere fuertemente que se realizó correctamente la mutación deseada (Figura 20). Para la mutación de Ser 147 por ácido glutámico en GSK-3 β se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito (Figura 21).

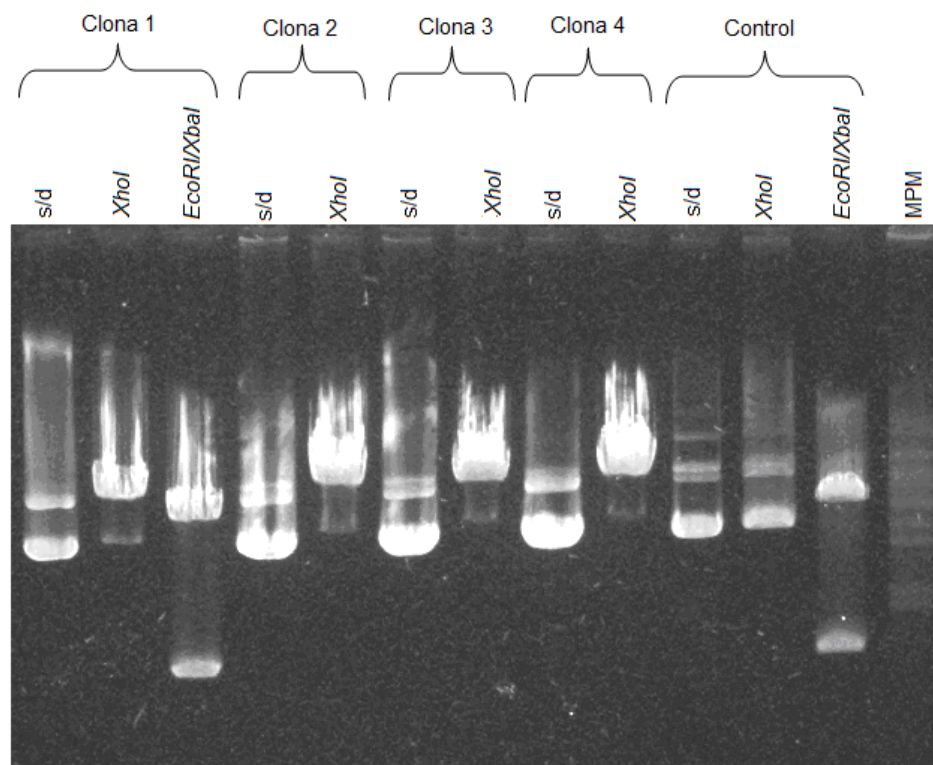


Figura 20. Digestiones con la enzima *Xho*I de 4 clonas mutadas del gen de GSK-3 β (Ser 147 por Ala) y su control (GSK-3 β sin mutar). s/d: sin digerir.

Para validar los experimentos, se secuenciaron las muestras de DNA y se verificó que el proceso fuera correcto (Figura 22 y 23).

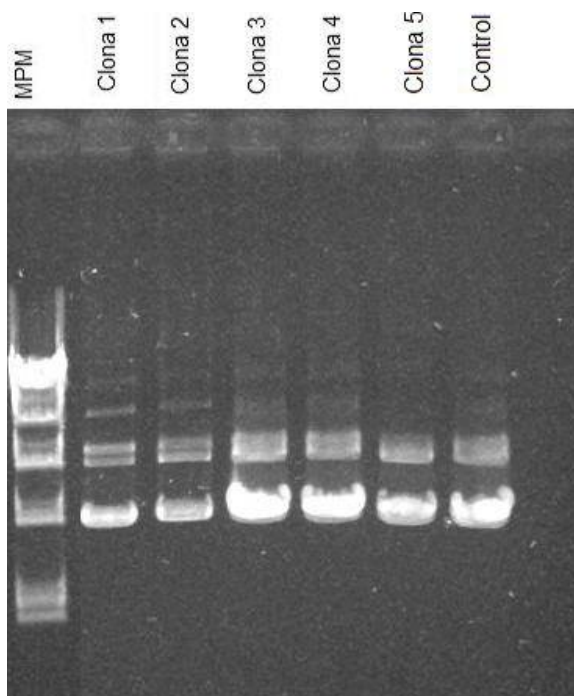


Figura 21. Miniprep de cinco clonas mutadas en el gen de GSK-3 β del vector pcDNA3 y el vector (pcDNA3) sin mutar.

Una vez obtenidas las mutantes, se transfectaron en las células RKO y se analizó el nivel de expresión de cada construcción. Como se observa en la figura 24A, se obtuvo un buen nivel de expresión de las mutantes y de la GSK-3 β silvestre con respecto a la expresión endógena, y en un nivel similar de expresión para cada una. Se procedió entonces a examinar la actividad de las GSK-3 β mutadas en comparación con la silvestre, siguiendo la misma estrategia utilizada previamente para los ensayos de actividad *in vitro*. Las células tumorales RKO que expresaban las GSK-3 β mutante o silvestre se incubaron en presencia o en ausencia del inhibidor de PKC ζ (20 μ M) durante una hora y en los últimos 5 minutos se estimularon con ligandos Wnt3a o Wnt5a (100ng/ml). Se inmunoprecipitó a GSK-3 β y se analizó su actividad *in vitro* incubándola en presencia o en ausencia de sustrato comercial GSM y se analizó mediante autorradiografía. Para nuestra sorpresa, los resultados mostrados en la Figura 24 revelaron que el reemplazo de Ser 147 por Alanina fue suficiente para abolir no solamente el incremento en la actividad de GSK-3 β inducido por los ligandos Wnt sino también para abolir la actividad basal de GSK-3 β . Los experimentos análogos que se realizaron con la mutante fosfomimética en este sitio (Ser 147 por ácido glutámico) mostraron que la actividad basal se mantenía y que no era significativamente modificada ni por tratamiento con ligandos Wnt ni por la inhibición de PKC ζ . Estos resultados por tanto, mostraron con claridad que la Ser 147 es el sitio que fosforila PKC ζ para regular la actividad de GSK-3 β (Figura 25).

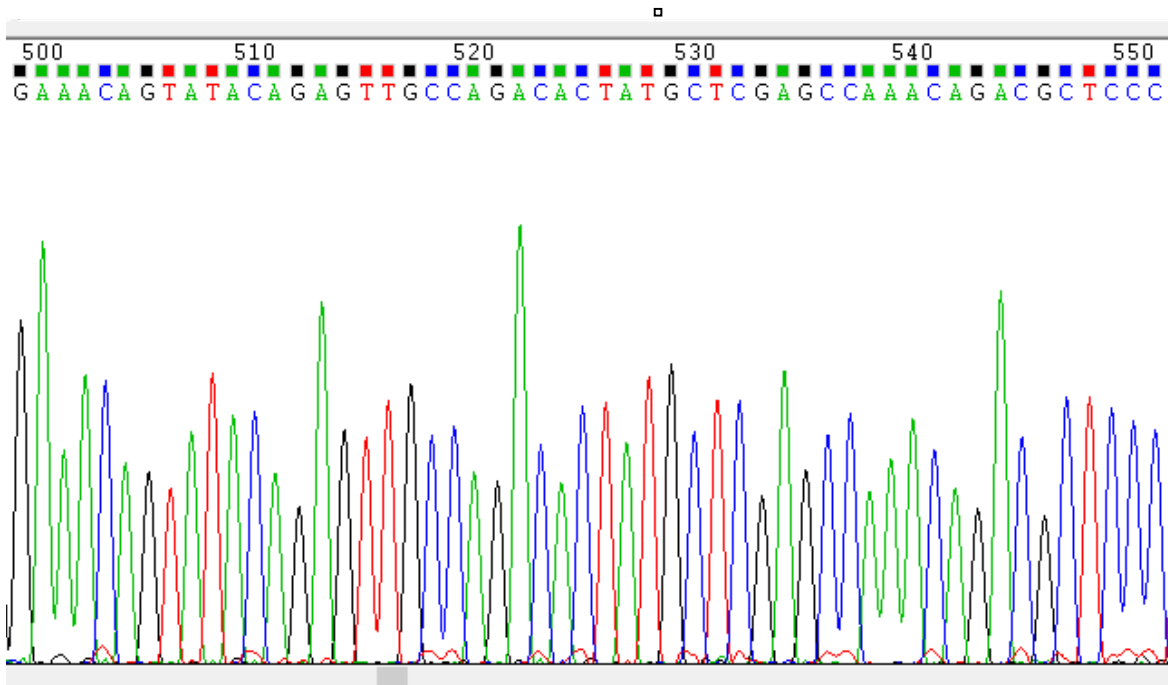


Figura 22. Confirmación por secuenciación de la mutación en el gen de GSK-3 β al cambiar el codón que codifica para serina (AGT) por el codón que codifica para alanina (GCT).

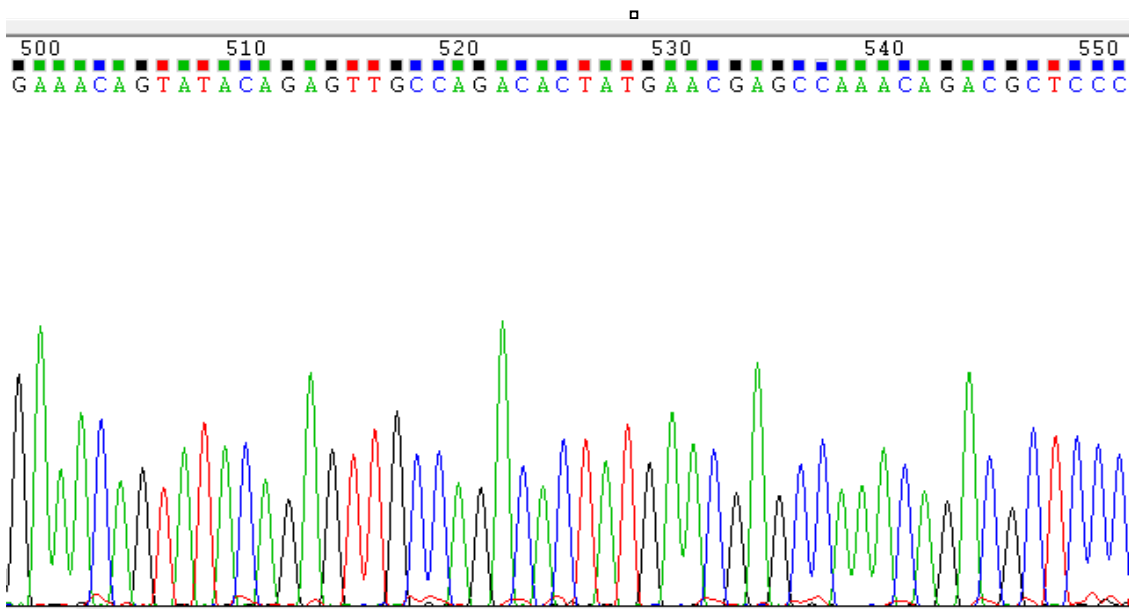
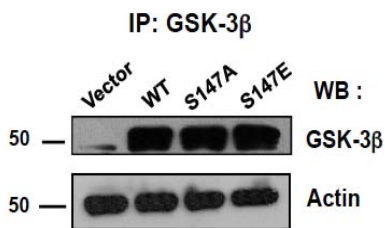


Figura 23. Confirmación por secuenciación de la mutación en el gen de GSK-3 β al cambiar el codón que codifica para serina (AGT) por el codón que codifica para ácido glutámico (GAA).

A



B

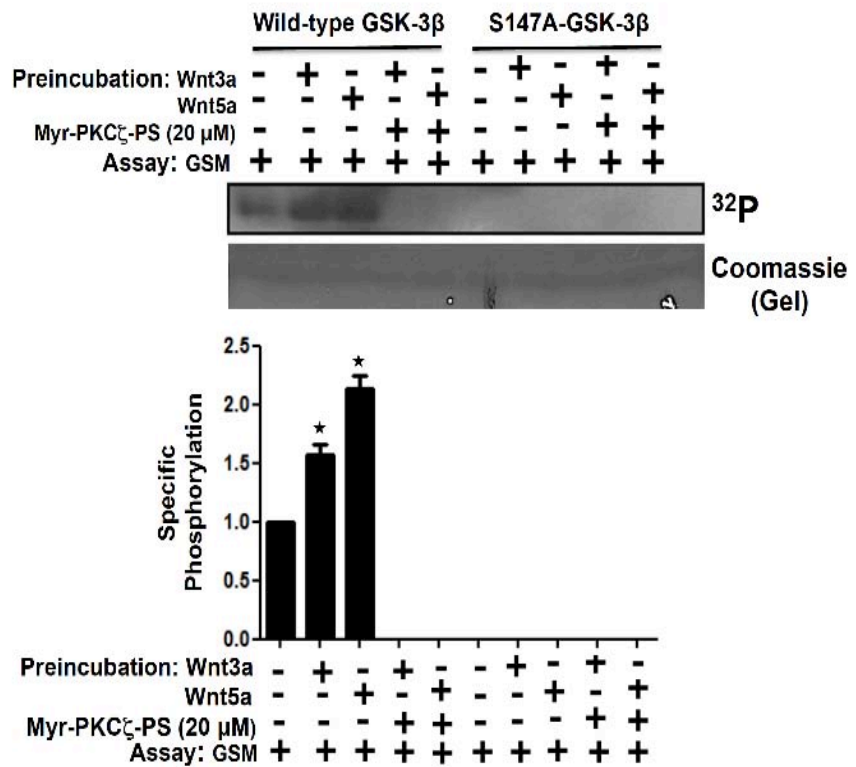


Figura 24. La mutación en Ser 147 por Alanina inactiva a GSK-3 β . A) Eficiencia de transfección de células RKO con GSK-3 β silvestre (wt), las mutantes GSK-3 β /S147A y GSK-3 β /S147E. B) La mutación de Ser 147 por Alanina inactiva totalmente a GSK-3 β .

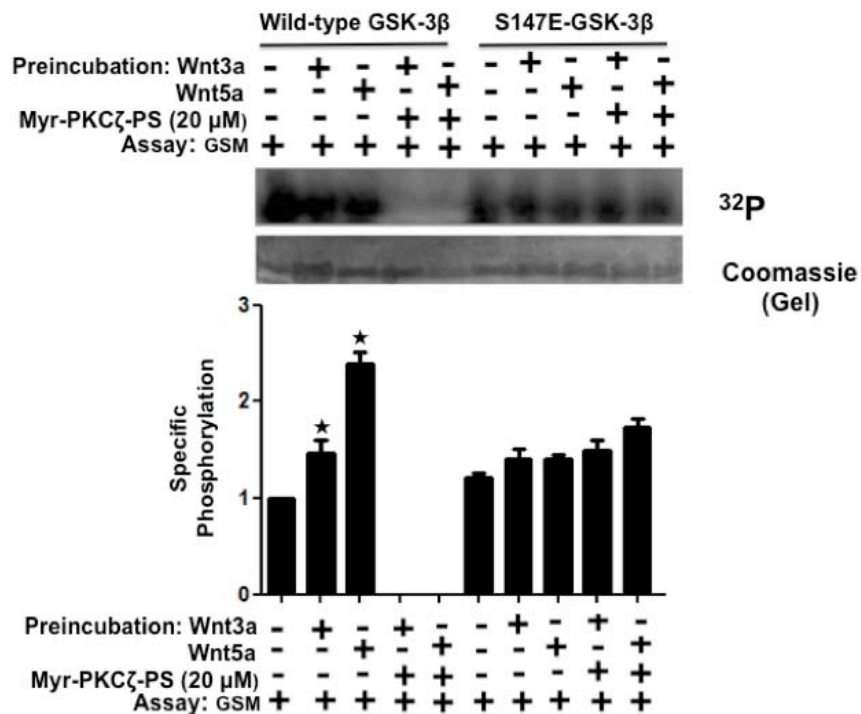


Figura 25. La mutación en Ser 147 por ácido glutámico mantiene la actividad basal constitutiva de GSK-3 β .

14.8 La mutante de GSK-3 β /S147A incrementa los niveles de β -catenina

La enzima GSK-3 β participa en la vía de señalización Wnt regulando los niveles citoplasmáticos de β -catenina al fosforilarla y señalizarla para su degradación vía proteosoma. De este modo, en condiciones basales, cuando GSK-3 β está activa, los niveles de β -catenina se encuentran bajos, lo que nos hizo suponer que la mutante GSK-3 β /S147A, que mostramos que abate la actividad de GSK-3 β , ocasionaría entonces un incremento en los niveles de β -catenina. Para confirmar esto, las células RKO se co-tranfectaron con plásmido GSK-3 β /S147A y con plásmido reportero de la actividad transcripcional de β -catenina, el cual codifica para luciferasa bajo el control de una secuencia promotora que posee los sitios consenso de unión a los factores TCF/ β -catenina (TOPFlash). Se utilizó como control el mismo plásmido pero con las secuencias de unión mutadas (FOPFlash). Las células fueron co-tranfectadas y 24 hrs. después de la transfección se procedió a examinar tanto los niveles de β -catenina por Western blot, como su actividad transcripcional. Como se observa en la Figura 26, se encontró que tanto los niveles intracelulares de β -catenina, como su actividad transcripcional estaban aumentados significativamente respecto al control que expresaba GSK-3 β silvestre, confirmando la importancia de la fosforilación en Ser 147 para regular la actividad basal de GSK-3 β y los niveles de β -catenina .

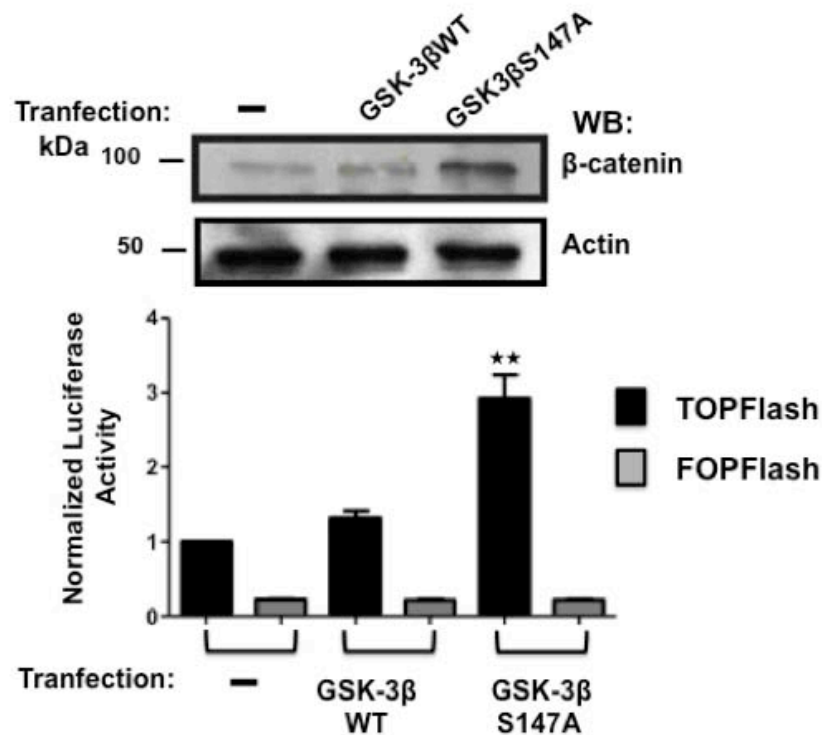


Figura 26. El nivel de expresión de β -catenina y su actividad transcripcional se incrementan como resultado de la expresión de la mutante GSK-3 β /S147A en células RKO.

14.9 La regulación de la actividad de GSK-3 β ejercida por PKC ζ es un mecanismo general de regulación que ocurre en otros sistemas celulares.

Finalmente, dada la importancia de los hallazgos encontrados, quisimos investigar si el mecanismo de regulación de la actividad de GSK-3 β por PKC ζ es un fenómeno general que se da en otros tipos celulares. Para ello se utilizaron células HEK-293 (células no malignas de riñón de embrión humano) en las que se expresó GSK-3 β silvestre o la mutante Ser 147 por Alanina fusionadas a una marca de hemaglutinina (GSK-3 β -HA or GSK-3 β /S147A-HA). Las células transfectadas se incubaron una hora en presencia o en ausencia del inhibidor selectivo de PKC ζ y en los últimos 5 minutos se incubaron en presencia o ausencia de ligando Wnt5a. Se inmunoprecipitó entonces a la GSK-3 β silvestre o mutante (con anti-HA) y se procedió a analizarlas por Western blot utilizando el anticuerpo anti-fosfo- Ser-PKC substrate. Los resultados mostrados en la Figura 27A confirmaron que GSK-3 β se regula por el ligando Wnt5a de la misma manera que ocurre en las células de colon no malignas; ocasiona una disminución en la fosforilación de GSK-3 β y la inhibición de PKC ζ bloquea la fosforilación basal de GSK-3 β . Se pudo comprobar asimismo la especificidad del anticuerpo usado, pues como se observa en la Figura 27B reconoció sólo a la Ser 147 fosforilada en GSK-3 β , que es la única que falta en la mutante, y no a otros sitios putativos de fosforilación de PKC que permanecen en GSK-3 β . Además, se midió la actividad transcripcional mediada por β -catenina y sus niveles intracelulares en células HEK-293 que expresaban la mutante GSK-3 β /S147A, encontrándose lo mismo que se había encontrado en las células del colon: que los niveles tanto de la proteína β -catenina como su actividad transcripcional, aumentan al expresar una forma inactiva de GSK-3 β .

En conjunto, nuestros resultados indican que i) PKC ζ fosforila a GSK-3 β *in vivo* en la Ser 147 para mantener la actividad basal constitutiva de la enzima, ii) que la estimulación de las células con ligandos Wnt por tiempos cortos (5 minutos) modula transitoriamente esta actividad basal de GSK-3 β de manera opuesta en células no malignas o cancerosas, y iii) que es éste un mecanismo general empleado por células normales o malignas de regulación de la actividad de GSK-3 β por PKC ζ y por Wnts.

A

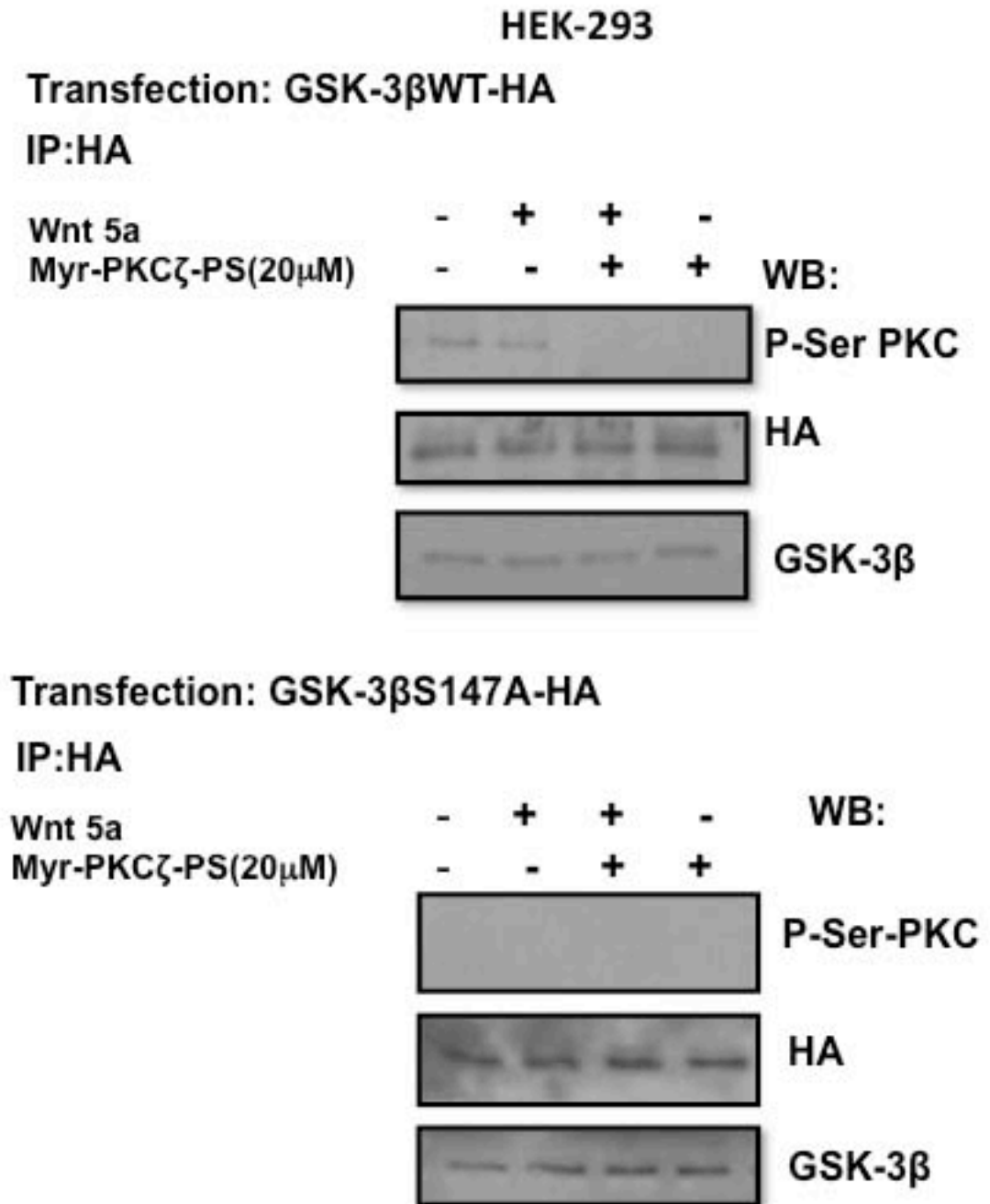


Figura 27 A. GSK-3 β se regula en células HEK-293 por ligando Wnt5a de la misma manera que en células malignas del colon. Se transfectaron células HEK-293 con GSK-3 β -HA o con la mutante GSK-3 β /S147A-HA. Se ayunaron las células por 6 horas y entonces se incubaron con inhibidor selectivo de PKC ζ por una hora y luego con ligando Wnt5a por 5 minutos. Se inmunoprecipitó a GSK-3 β y analizó por Western blot con los anticuerpos indicados en la figura.

B

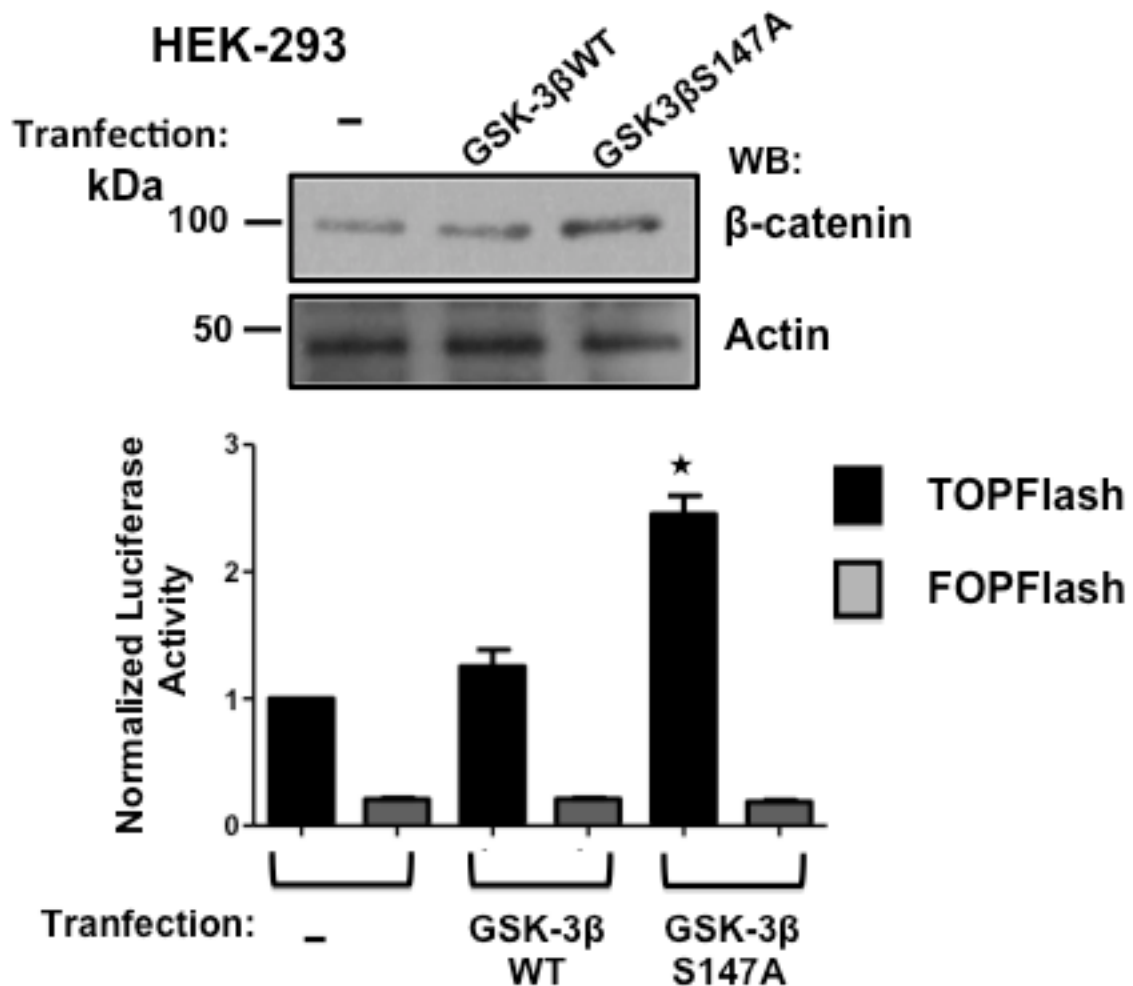


Figura 27 B. La expresión de la mutante GSK-3 β /S147A-HA en células HEK-293 también produce un incremento en los niveles de β -catenina y en su actividad transcripcional.

15 Discusión

En la presente tesis se describe un nuevo mecanismo de regulación de GSK-3 β a través de PKC ζ utilizando como modelo el cáncer de colon, que ocupa el tercer lugar de causas de muerte en México y en países industrializados como los de América del Norte (1). Las células epiteliales del colon están sujetas a una continua renovación y se originan a partir de células troncales madre durante toda la vida del organismo. La homeostasis en este epitelio está basada en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La evidencia experimental actual indica que la vía de señalización "Wnt" es la fuerza dominante en el control de esta homeostasis, y cuando está alterada se produce cáncer (3). Consistente con esto, estudios moleculares han demostrado mutaciones activadoras de la vía Wnt en un

número abrumador de casos de cáncer colo-rectal, aproximadamente el 90% (39,40).

El elemento distintivo de la vía Wnt canónica es la regulación de los niveles intracelulares y la localización de β -catenina, donde GSK-3 β es uno de los elementos clave que participa en este proceso celular. Sin embargo, 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. Es importante mencionar que la regulación de la localización de GSK-3 β también puede contribuir al desarrollo de tumores; el secuestro de la fracción citosólica de GSK-3 β contribuye a la activación de la β -catenina y a la expresión de oncogenes. La actividad de la GSK-3 β no solo se encuentra asociada a la formación del tumor en sí, sino también a su capacidad de proliferación, invasividad o metástasis, ya que la GSK-3 β fosforila y marca para su degradación a numerosos factores de transcripción, este es el caso de c-Myc, β -catenina, Snail y Bcl3 (64). Actualmente GSK-3 β constituye una importante diana terapéutica en muchas patologías del ser humano por lo que indicaría la posible utilización de la GSK-3 β como supresor tumoral que se refuerza con el hecho de que no se han encontrado mutaciones inactivadoras para la GSK-3 β en tumores humanos (8). Se ha reportado que los niveles de expresión de GSK-3 β se ven disminuidos en varios tipos de tumores (10) o aumentados como es el caso del cáncer de colon por lo que el estudio de esta enzima se ha incrementado y podría ser útil para el control de enfermedades a las que está asociada como cáncer, alzheimer y diabetes que son de carácter mundial.

Algunos estudios proponen un modelo de inhibición bioquímico en el que 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 que inhibe su actividad hacia β -catenina. Otro modelo propone que la activación por ligandos Wnt provoca la internalización de GSK-3 β en el lumen de cuerpos multivesiculares (MVBs), impidiendo que GSK-3 β fosforile la β -catenina recién sintetizada; es un mecanismo de inhibición por aislamiento de la enzima a sus sustratos a través de una doble membrana. 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 bipartita activo (37). Este complejo provoca la transcripción de programas de expresión génica involucrados principalmente en proliferación y tumorigénesis.

El aspecto más relevante del presente trabajo es que se identificó un nuevo mecanismo de regulación de GSK-3 β a través de PKC ζ . Esta interacción está claramente demostrada en otros modelos de estudio pero en líneas celulares de colon normal y canceroso no había sido descrita hasta ahora, y nuestros hallazgos son por tanto muy importantes. En astrocitos de rata se vio que esta interacción es importante en la migración celular (65); en las células epidérmicas de embriones de *Drosophila* se demostró que PKC ζ fosforila a GSK-3 β e induce la polarización apico-basal. En astrocitos de rata el efecto de la interacción entre esas dos proteínas es importante en procesos de migración celular (66 y 67). Etienne-Manneville et al. (68) reportaron que la GSK-3 β se asocia con la PKC ζ y forma un complejo con Par6. Los estudios de inmunofluorescencia y FRET (fluorescence resonance energy transfer) confirmaron la asociación de estas proteínas con PKC ζ en el huso meiótico. Resulta interesante mencionar que así como la GSK-3 β , las PKCs representan actualmente un reto también interesante para el desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos contra el cáncer. Se ha reportado que existen cambios específicos y reproducibles en los patrones de expresión de las isozimas de PKC en varios tipos de transformaciones tumorales. En el cáncer de colon la PKC β II se sobreexpresa en etapas tempranas, mientras que la expresión de las isoformas α y β I disminuye en etapas tardías del desarrollo tumoral (56). De la misma forma, el producto del gen *wnt5a* 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 (69). 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 (31). Estudios recientes también han mostrado 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 (58). Otro antecedente es que en el laboratorio se demostró un novedoso modelo de regulación de la localización nuclear de β -catenina mediado por la isoforma ζ de PKC. Mediante experimentos con inmunofluorescencia y microscopía confocal se demostró que existe una redistribución de PKC ζ y GSK-3 β ; el efecto de la estimulación con ligandos reveló una rápida redistribución de GSK-3 β desde el citoplasma a los núcleos en las células malignas, y una salida transitoria de PKC ζ desde el núcleo hasta el citoplasma en las células no malignas, y esta correlación entre GSK-3 β nuclear y señalización de Wnt no se había demostrado antes pero aún falta por

estudiar, así como las funciones que ejerce en este organelo. Es importante destacar que en otros procesos celulares, existen numerosos ejemplos que demuestran una acumulación parcial o transitoria de GSK-3 β en el núcleo, como en la apoptosis (70 y 71), la senescencia replicativa (72) y la fase S del ciclo celular (73). En tumores pancreáticos humanos existe una redistribución de GSK-3 β donde se sobreexpresa y se acumula en el núcleo de líneas celulares tumorales y en la mayoría de los adenocarcinomas pobremente diferenciados (74). Una vez en el núcleo y en función del tipo celular, GSK-3 β puede fosforilar sustratos tales como la ciclina D, NFAT, y c-myc. El mecanismo de importación de GSK-3 β parece ser dependiente de una señal de localización nuclear bipartita (NLS) (75), mientras que las exportaciones bajo algunas circunstancias requiere FRAT (76). Sólo un informe (77) ha descrito un shuttling-nuclear citoplásmico de GSK-3 β .

El efecto final que ejercen los ligandos Wnt en GSK-3 β es que induce una modificación rápida y transitoria en el estado de fosforilación de la Ser 147 de GSK-3 β mediada por PKC ζ que resulta en las células no malignas en una reducción de la actividad basal de GSK-3 β , mientras que en un incremento de la actividad de GSK-3 β en células malignas de colon. La primera evidencia reportada acerca de que un ligando incrementa la actividad de GSK-3 β fue en 1999 por Plyte et al. (78). Los autores demostraron que en *Dictyostelium* el cAMP extracelular actúa a través del receptor en serpiente Car3 ocasionando un aumento de la actividad de la cinasa GSK-A, que regulan los patrones del tipo celular durante las etapas iniciales de pluricelularidad. Este aumento se correlaciona con el requerimiento para el homólogo de *Dictyostelium* de GSK-3, GSK-A, para especificar el destino celular (78). Posteriormente, Kim et al. (79) identificaron una nueva proteína tirosina cinasa, zak1 activada por cAMP, que está implicada en la activación de GSK-3 mediada por cAR3. En referencia a esto, el ácido lisofosfatídico induce a través de las proteínas G $\alpha_{12/13}$ la activación de la GSK-3 por fosforilación en sus residuos de tirosina en células N2A (80). Se conocen diferentes cinasas capaces de fosforilar estos residuos, como es el caso de la tirosina cinasa Fyn de la familia de las Src tirosina cinasas (81). De igual modo se ha descrito que los incrementos transitorios de la concentración intracelular de calcio aumentan los niveles de fosforilación en tirosina de la GSK-3 (34).

Nuestros resultados indican que el mecanismo de regulación inducida por Wnt de GSK-3 β es distinto entre las células no malignas y malignas. Estas diferencias pueden deberse por ejemplo a la interacción de Wnt3a con diferentes receptores Frizzled expresados en células normales y malignas (manuscrito en preparación), sin embargo, el resultado final, después de 15 minutos tras el tratamiento sería el

mismo en ambos tipos de células: la inactivación de la actividad de GSK-3 β . Además, las consecuencias de los ligandos Wnt3a y Wnt5a que median la activación de GSK-3 β podrían ser diferentes para cada ligando en las células tumorales: Wnt3a promueve una sobre-regulación transitoria de GSK-3 β para participar en la formación del signalosoma y en la fosforilación del co-receptor LRP5/6, mientras que Wnt5a promueve la fosforilación del co-receptor ROR2 en Ser 864 (77 y 82) que induce la migración celular. A este respecto, Yamamoto et al. fueron los primeros en demostrar que ROR2 se fosforila en residuos de serina/treonina al estimular células que expresan endógenamente ROR2, con Wnt5a, pero no con Wnt3a, y que la inhibición o el bloqueo de GSK-3 β impide esta fosforilación y la migración celular (77).

Consistentemente, Grumolato et al. demostraron que los ligandos prototipo canónico Wnt3a y el no canónico Wnt5a activan respectivamente dos co-receptores endógenos diferentes, LRP5/6 y Ror1/2, mediante un mecanismo común que involucra su dependencia a Wnt y al complejo co-receptor/Frizzled(Fzd) y el reclutamiento de componentes compartidos, incluyendo Dvl, axina y GSK-3 β . Identificaron que la Ser 864 en Ror2 es un residuo crítico fosforilado por GSK-3 β y que es requerido por Wnt5a para la activación del receptor no canónico, de manera análoga a la fosforilación primaria de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP6) en respuesta a Wnt3a (82). Tomando en cuenta toda la evidencia experimental y nuestros hallazgos expuestos aquí, se revelan roles multifacéticos de la GSK-3 en la vía de señalización Wnt y de este modo establece un rol central para el control estricto en la actividad de GSK-3 β , que es diferente en células normales y malignas.

Dada la compleja regulación de GSK-3 β y su participación en diferentes procesos celulares, ha resultado difícil el estudio de esta proteína. El mecanismo de regulación en la señalización Wnt ha sido una cuestión abierta, evidentemente existen contradicciones. El identificar la Ser 147 como sitio clave contribuye a entender el mecanismo de regulación hasta ahora desconocido de la actividad, que opera de manera opuesta en células no malignas y células malignas del colon.

El papel de GSK3 como objetivo potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas se debe al gran número de enfermedades a las que se asocia por lo que el mecanismo que se describió en este trabajo podría contribuir también a considerar nuevos enfoques terapéuticos.

16 Conclusiones

1. La PKC ζ modula positivamente la actividad de GSK-3 β *in vitro*, fosforilándola en la Ser 147, mecanismo de regulación que es esencial para la actividad basal de GSK-3 β en células normales y cancerosas del epitelio del colon.
2. La estimulación con ligandos Wnt inducen un cambio rápido y transitorio en el estado de fosforilación de la Ser 147 de GSK-3 β ; disminuyendo la fosforilación y la actividad de la enzima en células normales, pero aumentándola en células cancerosas.

17 Referencias

1 <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

2 Gregorieff A, Clevers H (2005) "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer". *Genes & Development* 19: 877-890.

3 Radtke F, Clevers H (2005) "Self-Renewal and cancer of the gut: two sides of a coin". *Science* 307 (5717): 1904-1909.

4 Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107: 519 – 527.

5 Cohen P, Yellowlees D, Aitken A, Donella-Deana A, Hemmings BA (1982) Separation and Characterisation of Glycogen Synthase Kinase 3, Glycogen Synthase Kinase 4 and Glycogen Synthase Kinase 5 from Rabbit Skeletal Muscle. *Eur J Biochem* 124: 21–35.

6 Picton C, Aitken A, Bilham T, Cohen P (1982) Multisite Phosphorylation of Glycogen Synthase from Rabbit Skeletal Muscle. *Eur J Biochem* 124: 37–45.

7 Woodgett JR, Cohen P (1984) Multisite phosphorylation of glycogen synthase: Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 788: 339–347.

- 8 Polakis P (1999) The oncogenic activation of beta- catenin. *Current opinion in genetics & development* 9: 15-21.
- 9 Lustig B, Behrens J (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of cancer research and clinical oncology* 129: 199-221.
- 10 Goto H, Kawano K, Kobayashi I, Sakai H, Yanagisawa S (2002) Expression of cyclin D1 and GSK-3beta and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. *Oral oncology* 38: 549-556.
- 11 Hansen, Arden KC, Rasmussen SB, Viars CS, Vestergaard H, Hansen T, Møller AM, Woodgett JR, Pedersen O (1997) Chromosomal mapping and mutational analysis of the coding region of the glycogen synthase kinase-3alpha and beta isoforms in patients with NIDDM. *Diabetologia* 40(8): 940-6.
- 12 Shaw PC, Davies AF, Lau KF, Garcia-Barcelo M, Waye MM, Lovestone S, Miller CC, Anderton BH (1998) Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 alpha and -3 beta encoding genes. *Genome* 41(5): 720-7.
- 13 Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC (1999) Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J Pept Res* 54(1): 85-91.
- 14 Yao HB, Shaw PC, Wong CC, Wan DC (2002) Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. *J Chem Neuroanat* 23(4): 291-7.
- 15 Boyle WJ, Boyle W J, Smeal T, Defize LHK, Angel P, Woodgett R, Karin M, Hunter T (1991) Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64(3): 573-84.
- 16 Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2719-23.
- 17 Bijur GN, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14(18): 2415-9.
18. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12(22):

3499-511.

19 Bijur, G.N. and R.S. Jope (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276(40): 37436-42.

20 Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11074-9.

21 Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC (2002) The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J Biol Chem* 277(46): 43844-8.

22 Hoshi M, Sato M, Kondo S, Takashima A, Noguchi K, Takahashi M, Ishiguro K, Imahori K (1995) Different localization of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta from glycogen synthase kinase-3 alpha in cerebellum mitochondria. *J Biochem* 118(4): 683-5.

23 Meares, G.P. and R.S. Jope (2007) Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem* 282(23): 16989-7001.

24 Ter H, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J (2001) Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol* 8(7): 593-6

25 Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH. (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105(6): 721-32.

26 Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11211-11216.

27 Doble B W, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116(Pt 7): 1175–1186.

- 28 Quevedo C, Alcazar A, Salinas M (2000) Two different signal transduction pathways are implicated in the regulation of initiation factor 2B activity in insulin-like growth factor-1-stimulated neuronal cells. *J Biol Chem* 275: 19192-19197.
- 29 Park BC, Kido Y, Accili D (1999) Differential signaling of insulin and IGF-1 receptors to glycogen synthesis in murine hepatocytes. *Biochem* 38: 7517-7523.
- 30 Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr, Woodgett JR, Mills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11960-11965.
- 31 Cook D, Fry MJ, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett JR, Dale TC (1996) Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *The EMBO j* 15: 4526-4536.
- 32 Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO J* 12: 803-808.
- 33 Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320(5876): 667-70.
- 34 Hartigan JA, Johnson GV (1999) Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 274: 21395-21401.
- 35 Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC (2005) Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 19: 159-170
- 36 Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316: 1619-1622.

- 37 Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996) "Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1". *Nature* 382(6592): 638–42.
- 38 Tejeda-Muñoz N, Robles-Flores M (2015) Glycogen synthase kinase 3 in Wnt signaling pathway and cáncer. *IUBMB Life* 67(12): 914-22.
- 39 Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM (2010) Wnt signalling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143: 1136–1148.
- 40 Bienz M, Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320.
- 41 Oving I, Clevers H (2002) Molecular causes of colon cancer *Eur J Clin Invest* 32: 448-457.
- 42 Chiang SW, N. And Pignatelli M (2002) β -catenin a Linchpin in colorectal cancer carcinogenesis. *Am J of Pathol* 2: 389-401.
- 43 Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997) Constitutive transcriptional activation by a b-catenin-Tcf complex in APC $-/-$ colon carcinoma. *Science* 275: 1784–1787.
- 44 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of b-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in b-catenin or APC. *Science* 275: 1787–1790.
- 45 Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996) The axis-inducing activity stability and subcellular distribution of b-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10: 1443–1454.
- 46 Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F (2002) Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* 22(4): 1172–1183.
- 47 Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Mutational Analysis of the APC/b-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 1130–1134.

48 Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y (1998) Activation of the b-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res* 58: 1021–1026.

49 Whitehead I, Kirk H, Kay R (1995) Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. *Mol Cell Biol* 15: 704–710.

50 Ilyas M, Tomlinson IPM, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF (1997) B -catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10330–10334.

51 O'Brien WT, Klein PS (2009) Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem Soc Trans* 37: 1133-1138.

52 Luna B, Hernández J, Santoyo P, Castañeda MC, Robles M (2011) Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* 32: 1615–1624.

53 Griner E, Kazanietz M (2007) Protein Kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 281-291.

54 Parker P, Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117: 131-132.

55 Newton AC (2003) Regulation of ABC kinases by phosphorylation: PKC as a paradigm. *Biochem J* 370: 361-371.

56 Gokmen-Polar Y, Murray N, Velasco M, Gatlica Z, Fields A (2001) Elevated protein cinasa C β II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 61: 1375-1381.

57 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.

58 Gwak J, Cho M, Gong S, Won J, Kim D, Oh S (2006) Protein kinase C mediated β -catenin phosphorilation negatively regulates the Wnt/ β -catenin pathway. *J. Cell Biol* 119: 4702-4709.

59 Maqueda J, Luna B, Santoyo P, Castañeda C, Robles M (2013) "Protein kinase C delta negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines". *PLoS ONE* 8(3): e58540.

60 Storz P, Döppler H, 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.

61 Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ (1992) Differential regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β by Protein Kinase C isotypes. *J Biol Chem* 267 (24): 16678-16882.

62 Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB (2002) Convergence of multiple signaling cascades at Glycogen Synthase Kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a Protein Kinase C-dependent intracellular pathway. *Mol Cell Biol* 22(7): 2099-110.

63 McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J* 24(8): 1571–1583.

64 Viatour P., Dejardin E., Warnier M., Lair F., Claudio E., Bureau F., Marine J. C., Merville M. P., Maurer U., Green D., Piette J., Siebenlist U., Bours V. and Chariot A. (2004) GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Molecular cell* 16: 35-45

65 Kinoshita 62 Adrian H, Vania MMB (2003) Cdc42 & GSK-3: signals at the crossroads. *Nature Cell Biology* 5: 275–277.

66 Colosimo PF, Liu X, Kaplan NA, Tolwinski NS (2010) GSK3beta affects apical-basal polarity and cell-cell adhesion by regulating aPKC levels. *Dev. Dyn* 239(1): 115-125.

67 Colosimo PF, Liu X, Tolwinski NS (2011) Complex Interactions between GSK3 and aPKC in Drosophila Embryonic Epithelial Morphogenesis. *PLoS ONE* 6(4): e18616-e18618

68 Zhang X, Zhu J, Yang GY, Wang QJ, Qian L, Chen YM, Chen F, Tao Y, Hu HS, Wang T, Luo ZG (2007) Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nature Cell Biol* 9 (7): 743-754.

69 Jonsson M, Smith K, Harris AL (1998) Regulation of Wnt5a expression in human mammary cells by protein kinase C activity and the cytoskeleton. *Br J Cancer* 78: 430–438.

70 Bijur GN, Jope RS (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276(40): 37436-42.

71 Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11074-9

72 Zmijewski JW and Jope RS (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts. *Aging Cell* 3: 309–317.

73 Diehl, JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998. 12(22): 3499-511.

74 Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC, Chari ST, Billadeau DD (2006) Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin Cancer Res* 12: 5074-5081.

75 Meares GP, Jope RS (2007) Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem* 282(23): 16989-7001.

76 Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC (2002) The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J Biol Chem* 277(46): 43844-8.

77 Yamamoto H, Yoo SK, Nishita M, Kikuchi A, Minami Y (2007) Wnt5a modulates glucogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells* 12(11): 1215-1223.

78 Plyte SE, O'Donovan E, Woodgett JR and Hardwood AJ (1999). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during Dictyostelium development via the serpentine receptor cAR3. *Development* 126(2): 325-333.

79 Kim L, Liu J, Kimmel AR (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99 (4): 399-408.

80 Sayas CL, Avila J, Wandosell F (2002) Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci* 22: 6863-6875.

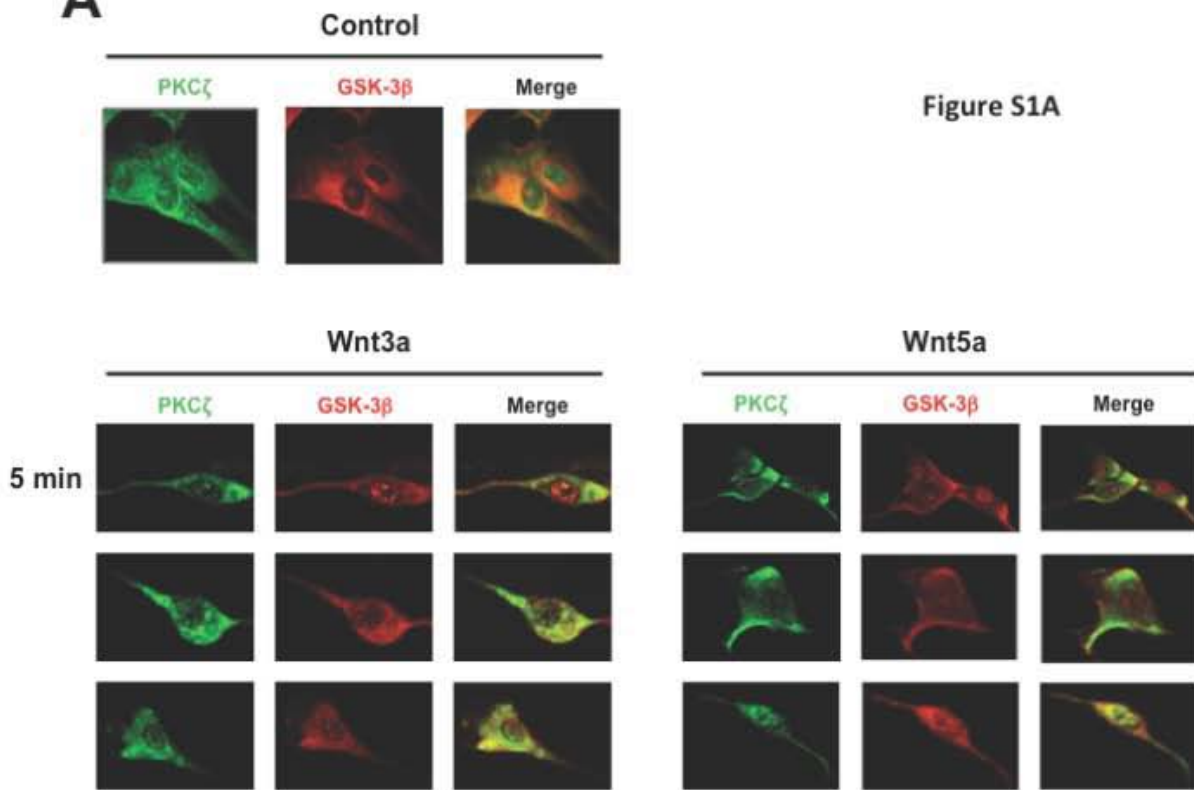
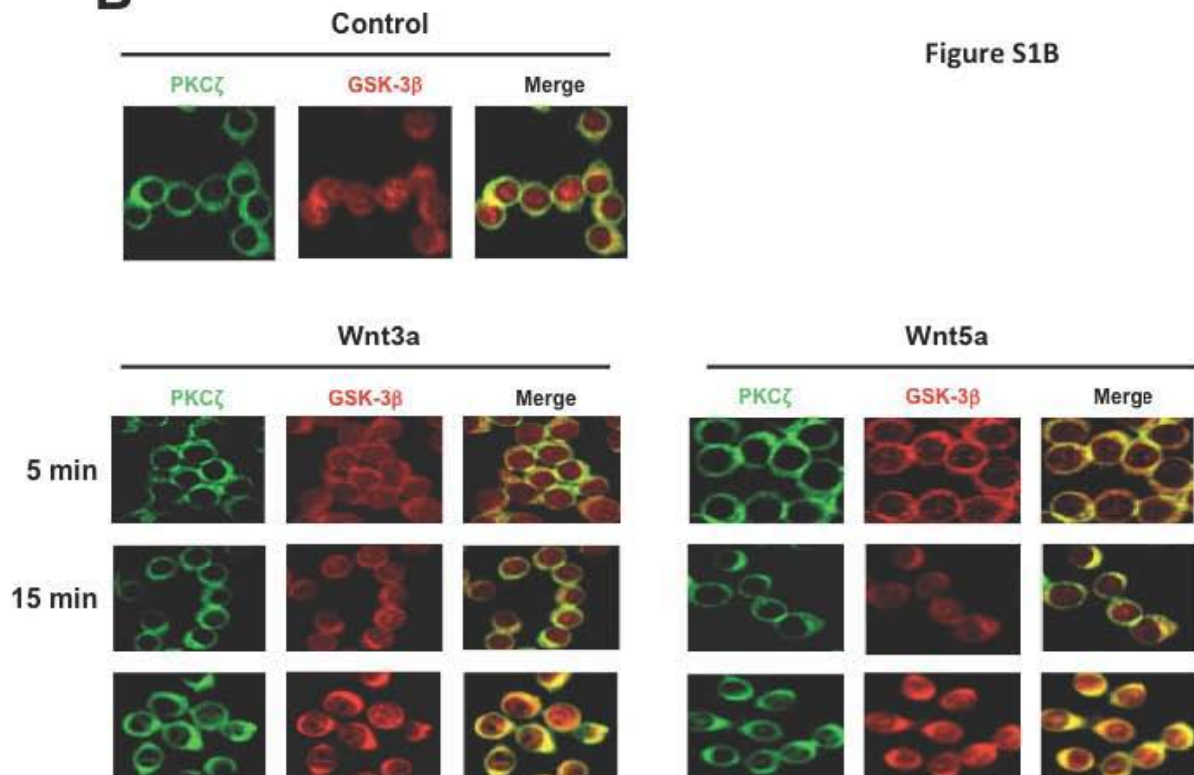
81 Lesort M, Jope RS, Johnson GV (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *Journal of neurochemistry* 72: 576-584.

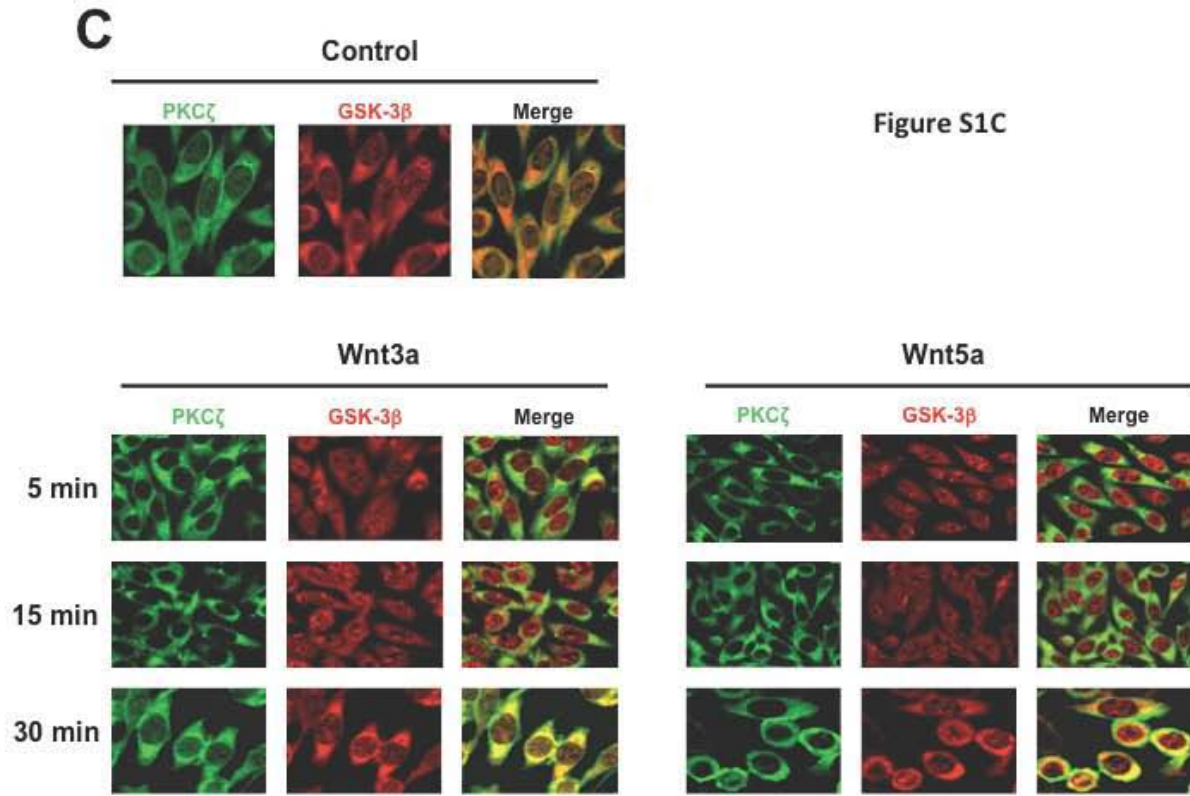
82 Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA (2010) Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 24 (22): 2517-2530.

18 Anexos

Figura 1. Curso temporal de estimulación con ligandos Wnt A, B y C)

Inmunofluorescencia de células en estado basal donde se observa la localización intracelular de la GSK-3 β (rojo) con PKC ζ (verde) y su interacción (amarillo) dentro de las células. El tratamiento de las células con ligandos Wnt (100 ng/ml) induce una relocalización intracelular de ambas proteínas a los 5 minutos. Las células se incubaron por distintos tiempos con cada uno de los tratamientos (5, 15 y 30 min.) y la localización de GSK-3 β y PKC ζ se siguió por microscopia confocal.

A**B**



**GSK-3 β is positively regulated by PKC ζ -mediated phosphorylation induced
by Wnt agonists**

Nydia Tejeda-Muñoz, Héctor González-Aguilar, Paula Santoyo-Ramos, M. Cristina Castañeda-Patlán and Martha Robles-Flores \ddagger .

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

\ddagger Corresponding author:

Dra. Martha Robles-Flores

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

Av. Universidad 3000, C.U., 04510 México, D.F., México.

Phone: (+52) (55) 5623-2258; Fax: (+52) (55) 5616-2419.

E-mail: rmartha@unam.mx

Running title: PKC ζ regulates constitutive GSK-3 β activity

Keywords: GSK-3 β , Protein kinase C ζ , Wnt signaling, colon cancer

ABSTRACT

The molecular events that drive Wnt-induced regulation of GSK-3 β activity are poorly defined. In this study we found that PKC ζ and GSK-3 β interact mainly in colon cancer cells. Wnt stimulation induced a rapid GSK-3 β redistribution from the cytoplasm to the nuclei in malignant cells, and a transient PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β at a different site from serine 9. In addition, while Wnt treatment induced a decrease in PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β in non-malignant cells, in malignant ones this phosphorylation was increased. Pharmacological inhibition and siRNA-mediated silencing of PKC ζ abolished all of these effects, but unexpectedly, also abolished the constitutive basal activity of GSK-3 β . *In vitro* activity assays demonstrated that GSK-3 β phosphorylation mediated by PKC ζ enhanced GSK-3 β activity. We mapped Ser147 of GSK-3 β as the site phosphorylated by PKC ζ , i.e., its mutation into alanine abolished GSK-3 β activity resulting in β -catenin stabilization and increased transcriptional activity, whereas phosphomimetic substitution of Ser147 by glutamic acid maintained GSK-3 β basal activity. Thus, we found that PKC ζ phosphorylates GSK-3 β at Ser147 to maintain its constitutive activity in resting cells, and that Wnt stimulation modifies the phosphorylation of Ser147 to regulate GSK-3 β activity in an opposite manner in normal and malignant colon cells.

Introduction

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) was first discovered in 1980 as a protein kinase that inactivates glycogen synthase (1). Since then, GSK-3 has been revealed as one of the master regulators that play central roles in a diverse range of signaling pathways, including those activated by Wnts, Hedgehog, growth factors, cytokines, and G protein-coupled ligands. GSK-3 is involved in the regulation of many cellular functions and more than 40 proteins have been reported to be phosphorylated by this kinase, suggesting that its activity is tightly regulated (2). Numerous studies have pointed to an association of GSK-3 dysregulation, particularly hyperactivation, with the onset and progression of human diseases including diabetes mellitus, obesity, inflammation, neurological disorders, and cancer (3).

A distinct feature of GSK-3 is its constitutive kinase activity in resting cells, which is inhibited in response to cellular signaling-mediated by growth factors, cytokines and hormones via phosphorylation of Ser21 in GSK-3 α and Ser9 in GSK-3 β (4-6). Several kinases can phosphorylate these serines, including Akt, Protein kinase A (PKA), and p90Rsk. TPA-sensitive isoforms of Protein kinase C (PKC) have also been shown to be involved in agonist-induced inactivation of GSK-3 β by phosphorylating the enzyme at Ser9 (7, 8). It has also been reported that *in vitro*, GSK-3 β is inactivated in the same manner by particular forms of PKC: conventional α , β , and γ , and the novel δ and η isoforms (9, 10). Interestingly, these experiments showed that neither PKC ϵ , nor atypical PKC ζ , phosphorylate GSK-3 β at

Ser9 (9, 10) and that in contrast, the related GSK-3 α is not a substrate for any of these PKC isozymes (9). However, the mechanisms of GSK-3 regulation are varied and not yet fully understood; precise control appears to be achieved by a combination of phosphorylation, localization, and sequestration by a number of GSK-3-binding proteins (6).

Wnt signaling is a key pathway in embryonic development and adult homeostasis (11, 12) and has been defined as one of the most important contributors to tumorigenesis. Indeed, aberrant Wnt signaling is a hallmark of the majority of colorectal cancers. GSK-3 β is a central player in the canonical pathway, which operates through regulating the phosphorylation and degradation of the transcription co-activator β -catenin. In the absence of Wnt stimulation, β -catenin is assembled into the so-called destruction complex, consisting of GSK-3 β , Casein kinase 1 (CK1) Adenomatous Polyposis Coli (APC), and Axin. This complex directs a series of phosphorylation events in β -catenin that targets it for degradation via the proteasome (11, 12). Stimulation by Wnt leads to inhibition of β -catenin breakdown, and to phosphorylation of the co-receptor LRP5/6 by GSK-3 β , followed by inhibition of GSK-3 β activity by a mechanism not fully understood to date (11-13). In this respect, it has been demonstrated that canonical Wnt signaling pathway employs a distinct mechanism for regulating GSK-3 β that is independent of N-terminal domain serine phosphorylation or tyrosine phosphorylation and, instead, relies on protein-protein interactions and intracellular sequestration (6, 11, 14).

It is well known that Wnt and PKC signaling pathways are both involved in colon carcinogenesis and tumor progression. Recent studies have found specific interactions between GSK-3 β and atypical PKC as a key component of the Par complex (15, 16) participating in polarity determination. We have recently reported that atypical PKC ζ plays an important role in the positive regulation of canonical Wnt pathway by controlling nuclear β -catenin localization in colon cancer cells (17). In this study, we found that PKC ζ and GSK-3 β interact specifically mainly in colon cancer cells. Furthermore, we found that upon cell treatment with Wnts, GSK-3 β activity is rapidly and transiently activated in cancer cells as a result of PKC ζ -mediated phosphorylation at Ser147. Unexpectedly, we also found that PKC ζ -mediated phosphorylation of Ser147 is required to maintain the constitutive basal activity of GSK-3 β under resting conditions, in both non-malignant and malignant cells.

Materials and Methods

Reagents and Antibodies. Antibodies against GSK-3 β were from the following sources: rabbit polyclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and mouse monoclonal antibody was from Millipore (Billerica, MA, USA). The rabbit monoclonal antibody against Phospho-(Ser) PKC Substrate was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Rabbit polyclonal antibodies against Akt and against P-Thr308-Akt were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Protein A-sepharose,

the pseudosubstrate-specific PKC ζ inhibitor, and the GSK-3 β inhibitor IX (BIO, (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime) were from Calbiochem/Merck (Darmstadt, Germany). The GSM (GSK-3 substrate peptide) was obtained from Millipore.

Plasmids. Plasmid encoding human GSK-3 β (HA-GSK3 β wt pcDNA3, Addgene plasmid 14753) was obtained from Addgene, a non-profit organization devoted to facilitate the sharing of plasmids among scientists. For knockdown PKC ζ experiments, we utilized the control (void plasmid pSUPER) or the pSUPER.PKCzeta.RNAi plasmid donated by Dr. Alex Toker to Addgene (Addgene plasmid 10803) whose construction and effectiveness have been described (18). The pTOPFlash and pFOPFlash reporter plasmids were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA).

Cell culture. RKO (human colon carcinoma), or SW480 (human colorectal adenocarcinoma) malignant cells, and non-malignant 112 CoN (human colon) cells and IEC-18 (mouse intestine), were all obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). RKO and 112CoN cells were maintained in Dulbeco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (120 mg/ml penicillin and 200 mg/ml streptomycin) and 2 mM L-glutamine. SW480, HEK293 or IEC-18 cells were maintained in DMEM F-12 supplemented with 5% FBS, antibiotics and 2mM glutamine. For IEC-18 cells, the medium was also supplemented with 0.1 UI/ml of insulin, which was removed from the medium 12 h before each experiment. All cells were cultured

in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Human cell lines were authenticated by DNA profiling using Short tandem repeat (STR) analysis on an AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification System at the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) in México City. RKO human malignant cells display normal canonical Wnt signaling (expressing wild-type APC protein) and are responsive to Wnt ligand in comparison with SW480 human malignant cells, which express a truncated version of APC and have constitutively active Wnt signaling.

Incubation with Wnt ligands and pharmacological inhibition of PKC ζ . For the pharmacological PKC ζ inhibition in RKO and SW480 cells, serum-starved cells (2% serum instead of 10%) were incubated in the absence or presence of the myristoylated PKC ζ -selective inhibitor (20 μ M) for 1 hour. Then, the cells were incubated in the absence or presence of Wnt3a or -5a ligand (100ng/mL) for 5 minutes and the cells were then washed and lysed.

Immunofluorescence analysis. 112CoN, RKO and SW480 cells were grown on coverslips. Cells were washed with PBS, fixed in ice cold methanol for 10 min, washed in PBS, and blocked with 1% IgG-free BSA for 1 hour. 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 (FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody or rhodamine goat anti-mouse antibody). After washing,

the coverslips were mounted with the antifade reagent Vectashield. Cell fluorescence was examined using a confocal microscope (Leica TCS SP5) with a krypton argon laser.

Western blotting. Protein samples (100 μg) were separated by 10 or 12% SDS-PAGE followed by electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 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, USA) with a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. An actin antibody was utilized as control for equal loading.

Immunoprecipitation. Confluent cells were washed and homogenized in ice- cold lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EGTA, 2mM EDTA, 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of primary antibody at 4°C with gentle shaking. Then, 20 μl protein A-sepharose (30%) was added and incubation continued for 2 h. Immune complexes were then washed three times with buffer A (50 mM Tris-HCl, 0.6M NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, pH 8.3) supplemented with 0.1 mg/ml trypsin inhibitor and 1 mM PMSF and once with buffer B (20 mM Tris HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl) containing protease and phosphatase inhibitors.

PKC ζ Knockdown. PKC ζ silencing was performed by transient transfection of cells with 2 μ g of pSuperPKC ζ -RNAi plasmid, constructed and reported by Dr. Alex Toker [18] or with control plasmid (void plasmid pSUPER) obtained from Addgene (ID 10803) using Lipofectamine 2000. Silencing efficiency was analyzed by Western blot and flow cytometry.

FACS analysis. The cells were detached and dissociated in 10 mM EDTA solution. The cell suspension was washed, resuspended in PBS supplemented with 4% fetal calf serum (staining buffer), stained with the corresponding primary antibody (rabbit polyclonal anti-pThr308-Akt or goat polyclonal anti-pSer9-GSK-3 β), and then incubated with the secondary antibody. Cells stained with the secondary antibody alone were employed as negative control.

***In vitro* GSK-3 β activity assay.** GSK-3 β was immunoprecipitated from cells incubated for 5 min in the absence (vehicle) or presence of Wnt ligands (100ng/mL). Immune complexes were washed twice with buffer A [50 mM Tris/HCl, 0.6M NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% Igepal (v/v) (pH8.3)] containing protease and phosphatase inhibitors and once with buffer B (50 mM Tris/HCl, 0.15 M NaCl, 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5). Kinase activity was initiated by resuspending the immunoprecipitates in 50 μ l of the assay mixture, consisting of kinase buffer (40 mM Tris, 20 mM MgCl₂, pH 7.5), plus [γ ³²P] ATP and 4mg/ml of GSK3 substrate (GSM), in the absence or presence of the GSK-3 β inhibitor BIO (5 μ M). Reactions proceeded for 20 min at 30°C, and were then terminated by the addition of

50 μ l of SDS/PAGE sample buffer, boiled for 5 min, and analyzed by SDS/PAGE [18 % (w/v) gel] and autoradiography. Data were quantified by densitometric analysis performed both in Coomassie-stained gels and the corresponding autoradiographs. The specific phosphorylation was determined as the ratio of phosphorylated protein to the total protein content normalizing with respect to control cells.

Site-directed mutagenesis. The human GSK-3 β S147A and S147E mutants were generated employing the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit obtained from Stratagene (La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and utilizing the following primers: S147A forward: 5'- GTTGCCAGACACTATGCTCGAGCCAAACAGACGCTC-3'; and reverse: 5'- GAGCGTCTGTTTGGCTCGAGCATAGTGTCTGGCAAC-3'. For S147E forward: 5'-GTTGCCAGACACTATGAACGAGCCAAACAGACGCTC-3' and reverse: 5'- GAGCGTCTGTTTGGCTCGTTCATAGTGTCTGGCAAC-3'. Both mutant constructions were verified by sequencing.

β -catenin/TCF transcriptional activity reporter assay. The cells were seeded on 24-well plates at a density of $1.2-1.8 \times 10^5$ cells per well. Twenty-four hours after seeding, the cells were placed in a serum-free medium and transfected with 1 μ g of a reporter plasmid (pTOPFlash or control plasmid pFOPFlash), with 0.05 μ g of the pRL luciferase plasmid (transfection control) and with 1 μ g of plasmid HA-GSK3 β -wt or HA-GSK3 β -S147A. The luciferase reporter activity in the cell lysates was measured 24 h after transfection using the

Dual Luciferase Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). The activity was normalized with respect to the activity of *Renilla* luciferase or with respect to the protein content in each sample.

Statistical analysis. The data are expressed as mean \pm Standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of the data was performed using the Student *t* test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

PKC ζ and GSK3- β Co-immunoprecipitate in a Reciprocal Manner and Co-localize in Both Non-malignant and Malignant Colon Cells. PKC has been shown to be involved in agonist- (growth factors, cytokines and hormones, but not Wnts) induced inactivation of GSK-3 β by phosphorylating the enzyme at Ser 9 (7, 8). It has also been reported that *in vitro*, GSK-3 β , but not GSK-3 α , is inactivated in this way by particular isozymes of PKC, but not by others such as PKC ϵ , and PKC ζ (9, 10, 14). Because we have previously reported that the atypical PKC ζ participates in the regulation of nuclear β -catenin localization, playing an important role in the positive regulation of canonical Wnt pathway (17), we hypothesized that PKC ζ probably does not interact *in vivo* with GSK-3 β . To our surprise, co-immunoprecipitation studies clearly showed that GSK-3 β interacts in cells with PKC ζ because they co-immunoprecipitated in a reciprocal manner from 112CoN human colon non-

malignant cells, and from RKO and SW480 human colon cancer cells exhibiting normal Wnt signaling, and constitutive active Wnt signaling, respectively (Figure 1).

Consistent with these results, immunofluorescence assays followed by confocal microscopy analysis, depicted in Figure 2, revealed co-localization of GSK-3 β with PKC ζ under basal conditions both in normal (Figure 2A) and malignant cells (Figure 2, panels B and C) in the cytoplasm and in some regions of the nucleus. To investigate whether their co-localization changes as a result of Wnt stimulation, the cells were treated during 5, 15, and 30 min with canonical (Wnt3a) or with non-canonical (Wnt5a) ligands. As can be observed in Figure 2, although co-localization of GSK-3 β with PKC ζ remained upon Wnt treatment, stimulation of cells with Wnt3a or Wnt5a provoked rapid changes (detected at 5 min) in the intracellular distribution of GSK-3 β and PKC ζ : they induced a GSK-3 β redistribution from cytoplasm to nucleus in both non-malignant (panel A) and malignant cells (panels B and C), but whereas the localization of PKC ζ did not change in non-malignant cells, Wnt treatment produced an exit of PKC ζ from nucleus to cytoplasm in malignant cells. Analysis of the time-course of stimulation with Wnt ligands indicated that these results were maintained until 30 min in non-malignant 112CoN cells (Figure S1A), but not in malignant cells, because the Wnt-induced exit of PKC ζ was transient (Figures S1B and S1C), appearing located again both at the nucleus and the cytoplasm after 30 min of treatment.

Wnt3a and Wnt5a Ligands Increase the PKC-mediated Phosphorylation of GSK3- β in Cancer Cells and Induce the Opposite Effect in Non-malignant Cells. To investigate the biochemical meaning of the interaction between PKC ζ and GSK-3 β , we first examined whether GSK-3 β could be a PKC substrate in cells upon Wnt stimulation employing an antibody that specifically recognizes phospho-serine-PKC substrates (Cell Signaling). Serum-starved non- malignant or malignant cells were incubated in the absence or presence of canonical Wnt3a or non-canonical Wnt5a during 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell lysates and analyzed by Western blot. The results presented in Figure 3A indicated that in 112CoN or IEC-18 non-malignant cells, GSK-3 β exhibits basal PKC-mediated phosphorylation that is diminished as a result of 5 min of treatment with either Wnt3a or Wnt5a ligands. Interestingly, and in an opposite manner, in RKO or SW480 cancer cells, basal PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β was nearly negligible, and the 5-min stimulation of cells with Wnt3a or -5a induced an increase in PKC-mediated GSK-3 β phosphorylation (Figure 3B). The phosphorylation of GSK-3 β by PKC occurs rapidly and transiently, as can be observed in the time-course illustrated in Figure 3C, because after 5 min of RKO cell treatment with Wnt5a, PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β began to return to the basal state.

Wnt Agonists Increase the PKC-mediated Phosphorylation of GSK3- β in Cancer Cells at a Different Site from Ser 9. In order to confirm that canonical Wnt ligands do not

produce GSK-3 β inactivation by inducing its phosphorylation at Serine 9, we tested whether the phosphorylation of GSK-3 β mediated by PKC in RKO cancer cells (responsive to Wnt ligands) occurs at this site as a result of Wnt stimulation. As shown in Figure 4A, the time course of GSK-3 β phosphorylation at Ser 9 obtained upon Wnt3a or -5a treatment of cells in comparison with insulin, which is well known to induce phosphorylation of Ser 9 of GSK-3 β via Akt activation and phosphorylation at Thr 308 (5, 6), indicated that canonical Wnt3a does not induce the phosphorylation of GSK-3 β at serine 9 nor did it induce phosphorylation of Akt at Thr 308. It can also be observed that although Wnt5a produced only transient Akt phosphorylation at Thr 308, it did not increase phosphorylation of GSK-3 β at Ser 9 in the same manner (Figure 4A). To confirm these results, we performed an immunoblot analysis of GSK-3 β immunoprecipitated from RKO cells stimulated in the absence or presence of insulin or Wnts for 5 min. As it can be seen in Figure 4B, only insulin treatment of cells induced the phosphorylation of GSK-3 β at Ser 9, reproducing the flow-cytometry results.

PKC ζ Phosphorylates GSK-3 β in colon cells. To investigate which PKC isoform phosphorylates GSK-3 β in response to Wnt stimulation, we first examined the effect of PKC ζ inhibition on GSK-3 β phosphorylation mediated by PKC. We used the Wnt5a ligand, which has been reported to transduce mainly in a non- canonical way, such as Wnt/Ca⁺⁺ signaling, activating calcium-dependent conventional PKC isoforms. Non-malignant 112CoN or RKO and SW480 cancer cells were incubated for 1 h in the absence or presence

of the selective PKC ζ - myristoylated pseudosubstrate inhibitor and then in the absence or presence of Wnt5a for 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell extracts and analyzed by Western blot using an anti-phospho-serine-PKC substrate antibody. Unexpectedly, the results obtained clearly indicated that in normal 112CoN cells, inhibition of PKC ζ abolished basal PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β and reduced the phosphorylation induced by Wnt5a (Figure 5A). Consistent with the results previously shown in Figure 3A, in both RKO and SW480 cancer cells, there was less basal phosphorylation (RKO cells) or no basal phosphorylation (SW480 cells) compared with normal 112CoN or IEC-18 cells. However, Wnt5a stimulation produced an increase in the PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β that was also abolished by PKC ζ inhibition in the absence of Wnt5a stimulation or greatly reduced in the presence of Wnt5a stimulation (Figure 5A). In order to confirm that the observed effects were mediated by PKC ζ , we utilized an RNA interference (RNAi) approach to transiently block PKC ζ expression. It is noteworthy that the plasmids utilized were previously constructed and successfully probed previously by Dr. Alex Toker (18), and we also employed these plasmids in a previous report (17). As can be observed in Figure S2, a great reduction in the PKC ζ protein level was observed 36 h after transfection of RKO or SW480 cells with 2 μ g siRNA plasmid in comparison with plasmid control. The siRNA transfected RKO cells were serum starved and then incubated in the absence or presence of Wnt5a. GSK-3 β was immunoprecipitated from

cell extracts and analyzed by Western blot with the anti-Phospho-Ser-PKC substrate antibody. The results presented in Figure 5B confirmed that the effects observed in GSK-3 β phosphorylation status in colon cancer cells were mediated by the atypical PKC ζ . Taken together, these results clearly indicated that GSK-3 β is a substrate of PKC ζ in colon cells at a different site from Ser 9, and that Wnt stimulation induces rapid and transient changes in the phosphorylation status of GSK-3 β mediated by PKC ζ in an opposite manner in normal or cancer cells.

The PKC ζ -induced Phosphorylation of GSK-3 β Stimulates GSK-3 β Activity. To investigate the effect of the phosphorylation produced by PKC ζ on GSK-3 β activity, we first incubated the serum-starved non-malignant or malignant cells in the absence (vehicle) or presence of Wnt ligands during 5 min, and then proceeded to immunoprecipitate GSK-3 β in order to analyze the effect of each treatment on its activity *in vitro*, as described in the Experimental Procedures section. Kinase activity was measured with the GSK-3 β immune complexes obtained from the cell extracts, in the absence or presence of the substrate added (GSM peptide) and in the absence or presence of the selective GSK-3 β inhibitor BIO, to validate assay specificity. Figure 6A illustrates how the GSK-3 β obtained from normal 112CoN cells was inhibited upon Wnt3a or -5a treatment, because the amount of 32 P-labeled GSM produced was less than that produced by the GSK-3 β obtained from 112CoN untreated control cells. In marked contrast, the activity of GSK-3 β obtained from RKO or from SW480

cancer cells (Figure 6B and 6C, respectively) was increased in comparison with control cancer untreated cells, producing more ^{32}P -labeled GSM substrate. As expected, phosphorylation of the GSM substrate was abolished *in vitro* in all cases when the inhibitor of GSK-3 β BIO was added to the assay. Thus, these results indicated that phosphorylation induced in GSK-3 β by PKC ζ stimulates enzymatic activity. This is consistent with the decrease in the PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β previously observed in non-malignant cells (Figure 3A), as well as with the increase in PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β previously observed upon Wnt treatment of cancer cells (Figure 3B).

The PKC ζ -induced Phosphorylation of GSK-3 β Is Required to Maintain Constitutive Basal GSK-3 β Activity. To confirm that the transient effects on GSK-3 β activity observed upon Wnt treatment of cells are the result of phosphorylation of GSK-3 β mediated by PKC ζ , we again utilized an RNAi approach to transiently block PKC ζ expression in colon cancer cells. RKO cells were transfected with the control scrambled-RNAi plasmid or with pSuperPKC ζ -RNAi plasmid, and 30h post-transfection incubated in the absence (vehicle) or presence of Wnt3a or -5a agonists for 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell extracts to examine its activity *in vitro*. Figure 6D revealed how the silencing of PKC ζ in cancer RKO cancer cells inhibited enhancement in GSK-3 β activity induced by Wnt3a or -5a stimulation of cells, but in addition, and unexpectedly, the PKC ζ blockade of expression also abolished constitutive basal GSK-3 β activity.

Taken together, our results indicate the following: i) that PKC ζ activity is required to maintain constitutive basal activity of GSK-3 β in colon cells; ii) that Wnt stimulation induces rapid and transient changes (5-min) in the phosphorylation status of GSK-3 β mediated by PKC ζ , and iii) that the changes induced by Wnts are opposite in normal or cancer cells: in non malignant cells, PKC ζ -mediated phosphorylation and GSK-3 β activity decrease upon Wnt treatment, whereas in cancer cells, PKC ζ -mediated phosphorylation of GSK-3 β and its activity are transiently increased.

PKC ζ Phosphorylates GSK-3 β at Serine 147. In view that we demonstrated here that Wnt agonists induce the phosphorylation of GSK-3 β at a site that is not Serine 9, we next investigated which GSK-3 β site or sites are phosphorylated by PKC ζ . An *in silico* analysis of the GSK-3 β amino acid sequence shown in Figure S3 employing the PhosphoMotif Finder program (<http://www.dabi.temple.edu/disphos/pred/predict>), or the NetphosK 2.0 program (<http://expasy.com/>) showed that GSK-3 β possesses several putative PKC phosphorylation sites, three of these displaying the classical PKC consensus sequence with high probability score, but only one of these exactly matched the consensus sequence recognized by the P-Ser-PKC-substrate antibody utilized in our experiments: R/K₍₀₋₂₎ Ser X_(hydrophobic)R/K. This consensus sequence is only located around Serine 147 of GSK-3 β . Therefore, we decided to construct an epitope-tagged GSK-3 β -HA mutant with Ser147 replaced by Alanine (GSK-3 β /S147A-HA), and a phosphomimetic GSK-3 β mutant with Ser147 replaced by Glutamic

acid (GSK-3 β /S147E-HA), and to examine the effects of these mutations in GSK-3 β activity upon Wnt stimulation. To this end, RKO cells were transfected with plasmid-encoding wild type GSK-3 β -HA or with plasmid-encoding GSK-3 β -HA mutants. The level of wild type or mutant GSK-3 β expression obtained in transfected RKO cells with respect to the endogenous GSK-3 β level is presented in Figure S4. RKO cells expressing epitope-tagged mutant or control wild type GSK-3 β were incubated in the absence or presence of PKC ζ -myristoylated pseudosubstrate inhibitor (Ih) and then in the absence or presence of Wnt5a for 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell extracts (anti-HA immunoprecipitation) to be analyzed for its catalytic ability *in vitro*. To our surprise, the results depicted in Figure 7A revealed that the replacement of S147 with Alanine was sufficient to abolish not only the enhancement of GSK-3 β activity induced by Wnt agonists, but also to abolish the basal activity of GSK-3 β in the same manner as it inhibits PKC ζ . Instead, Figure 7B revealed that the phosphomimetic GSK-3 β /S147E-HA mutant displayed constitutive basal GSK-3 β activity, which was not significantly further increased as a result of Wnt stimulation and which was insensitive to PKC ζ inhibition. In view of these results, we reasoned that in cells expressing GSK-3 β /S147A-HA mutant, the loss of basal GSK-3 β activity would promote β -catenin stabilization levels. To examine this, RKO cells were transiently co-transfected with pTOPFlash or pFOPFlash (control) β -catenin/TCF transcriptional activity reporter plasmids and with plasmid-encoding wild type GSK-3 β -HA or plasmid-encoding GSK-3 β /S147A-HA

mutant. At 24 h post-transfection, β -catenin levels were analyzed by Western blot in cell extracts, and the reporter activity was examined. Indeed, as shown in Figure 7C, β -catenin protein levels were increased in RKO cells expressing the GSK-3 β /S147A-HA mutant, as well as the β -catenin transcriptional activity. To explore if this type of GSK-3 β regulation occurs in other cell types, HEK-293T cells expressing wild type GSK-3 β -HA or GSK-3 β /S147A-HA mutant, were incubated in the absence or presence of the PKC ζ -myristoylated pseudosubstrate inhibitor and then in the absence or presence of Wnt5a for 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from HEK293T cell extracts and analyzed by Western blot using the anti-phospho-serine-PKC substrate antibody. The results presented in Figure 7D confirmed that GSK-3 β was regulated by Wnt5a in the same way as in non malignant colon cells, since inhibition of PKC ζ abolished basal PKC-mediated phosphorylation of GSK-3 β and reduced the phosphorylation induced by Wnt5a. In addition, it can also be confirmed that the anti-Phospho-Ser-PKC substrate antibody specifically recognizes the phosphorylated Ser147 in GSK-3 β . Consistent with these results, Figure 7E shows how co-transfected HEK293T cells with pTOPFlash or pFOPFlash reporter plasmids and with plasmid-encoding wild type GSK-3 β -HA or plasmid-encoding GSK-3 β /S147A-HA, displayed the same effect as in colon cells: β -catenin protein levels were increased in cells expressing the GSK-3 β /S147A-HA mutant, as well as the β -catenin transcriptional activity. Taken together, our results indicate that GSK-3 β is phosphorylated in cells at Ser147 by PKC ζ to maintain its constitutive basal activity, that

Wnt3a or -5a short treatment of cells can transiently modulate this basal activity in opposite fashion in non-malignant or cancer cells, and that this is a widely used mechanism for GSK-3 β regulation mediated by PKC ζ and Wnts in cell systems other than colon epithelial cells.

Discussion

GSK-3 β is a serine threonine kinase involved in the regulation of a diverse range of signaling pathways, including those activated by Wnts, and has been linked to the onset and progression of human diseases such as Alzheimer, diabetes and cancer. The mechanisms regulating GSK-3 have proven to be a topic of great debate, because they are varied and not fully understood. In this regard, despite the molecular mechanisms of Wnt-induced regulation of GSK-3 β activity have been intensively studied in recent years, they remain unclear. These studies have shown that canonical Wnt signaling pathway employs a distinct mechanism for regulating GSK-3 β that is independent of N-terminal domain serine phosphorylation or tyrosine phosphorylation and that, instead, relies on protein-protein interactions and intracellular sequestration (13, 19, 20).

PKC isozymes are commonly dysregulated in many types of cancers, such as colon cancer, and it has been demonstrated that they may act as both oncogenes (21) or as tumor suppressors (22), depending on the cell's context, and of which protein adaptors interact with PKC isoforms. In this respect, the atypical isoforms, PKC ι and PKC ζ , have demonstrated to

be critical components of cell-survival signal transduction pathways frequently suppressing apoptosis by activation of pro-survival NF κ B and MAPK signaling pathways (21, 23, 24), but it has also been reported that the loss of PKC ζ in mice results in enhanced intestinal tumorigenesis and in increased stem cell activity (25, 26). These atypical isoforms differ from other PKCs in that their catalytic activity is not dependent upon diacylglycerol, calcium, or phosphatidylserine. Instead, their activity can be regulated by 3-phosphoinositides produced as the result of PI-3 kinase (PI3K) activation induced by growth factors, by phosphorylation by the phosphoinositide-dependent kinase PDK1, and through specific protein–protein interactions (27).

With respect to the role played by PKC isozymes in Wnt signaling, the first evidence of possible crosstalk between PKC and canonical Wnt signaling emerged with the observation that some PKC isozymes phosphorylate (at Ser 9) and inactivate GSK-3 β in vitro (9, 10). It is now well known that PKC is one of the key targets of non-canonical Wnt signaling, particularly in the Wnt/Ca²⁺ pathway, and we previously demonstrated that PKC ζ plays an important role in the positive regulation of canonical Wnt pathway, by controlling nuclear β -catenin localization in colon cancer cells (17).

The interaction of PKC ζ with GSK3 β had been previously described. Etienne-Manneville et al (15) reported that GSK-3 β physically associates with PKC ζ , forming a complex with Par6. Both fluorescence resonance energy transfer (FRET) and immunofluorescence studies (28)

confirmed the existence and close association of these proteins with PKC ζ at the meiotic spindle. Interestingly, it was observed that when the two proteins are precipitated together after scratch-induced migration, phosphorylated GSK-3 β (at Ser 9) cannot be detected in the PKC ζ precipitate, indicating that GSK-3 β phosphorylation at Ser 9 leads to its dissociation from PKC ζ (15). Here, we report, to our knowledge, an unprecedented function for aPKC ζ in regulation of the constitutive basal activity of GSK-3 β and in regulation of its activity by Wnt ligands. Our data demonstrate that PKC ζ positively regulates GSK-3 β activity by phosphorylating Serine 147, in order to maintain the constitutive activity of GSK-3 β in resting cells. Furthermore, we found that Wnt stimulation induces a rapid and transient modification in the PKC ζ -mediated Ser147 phosphorylation status and GSK-3 β activity, which results in non-malignant cells in a reduction of the GSK-3 β basal activity, but in an enhancement of GSK-3 β activity in colon cancer cells. Although all these findings at this cellular level need to be further validated using animal models, they have substantial implications for the understanding of the mechanisms of Wnt signaling and for the understanding of GSK-3 β regulation. In canonical Wnt signaling, GSK-3 β plays a dual role: besides its well-known negative role targeting β -catenin for ubiquitylation and proteosomal degradation in the absence of Wnt stimulation, GSK-3 β activity is required to transduce the signal at the cell's membrane upon Wnt stimulation in order to phosphorylate the cytoplasmic tail of the LRP5 co-receptor and to induce the signalosome formation at the

membrane, a step that is widely recognized to be crucial for Wnt signaling activation (29). However, Wnt-induced signalosome formation at the plasma membrane is the key step that precedes inhibition of GSK-3 β . How signalosomes lead to a block of β -catenin phosphorylation by GSK-3 β remains an open question and there are two main models that describe how this might occur (13, 30). Our data provide insight into the events that precede LRP phosphorylation and are consistent with the time courses reported for LRP phosphorylation and signalosome formation. In this respect, Bilic et al. 2007 (29) showed that LRP6-signalosomes- containing aggregates of phospho-LRP6, Frizzled (Fzd), Dvl, Axin, and GSK-3 β - are formed at and under the plasma membrane 15 min after Wnt addition. Thus, the time course of Wnt-induced upregulation that we observed here (peaking at 5 min), correlates in cancer cells with the time required for GSK-3 β to be activated to phosphorylate LRP5/6 at PPPSP repeats.

Here we also found that Wnt stimulation modifies the phosphorylation of Ser147 to regulate GSK-3 β activity in an opposite manner in normal and malignant colon cells. A possible explanation of this is that in cancer cells, Wnts increase the activity of GSK-3 β only during the first 5 min after stimulation by increasing the phosphorylation of the Ser147 in GSK-3 β to phosphorylate LRP5 and to hyperactivate Wnt signaling, but after 15 min the activity returns to the basal. In non-malignant cells, Wnts diminish the activity of GSK-3 β during the first 5 min upon stimulation, probably delaying the signalosome formation whereas β -catenin

levels accumulate, but after 30 min of Wnt stimulation the final effect would be the same in both cell types: GSK-3 β would be inhibited once signalosome is formed.

Our data is consistent with previously reported evidence for ligand-stimulated elevation of GSK3 activity: Plyte et al (31) demonstrated that in *Dictyostelium*, extracellular cAMP acting via the serpentine receptor cAR3 cause a rise in GSKA kinase activity, which regulates cell-type patterning during initial stages of multicellularity. The timing of this rise correlates with the requirement for the *Dictyostelium* homolog of GSK-3, GSKA, to specify cell fate (31). Later, Kim et al (32) identified a novel cAMP-activated protein tyrosine kinase, ZAK1, that is involved in cAR3- mediated activation of GSK3.

Our results also indicate that either Wnt3a, a prototype canonical ligand, and Wnt5a, a prototype non-canonical ligand, both induce increase in GSK-3 β activity. However, the consequences produced by each one would be different in the cell depending on which receptor/co-receptor complex interacts with the ligand at the membrane: canonical Wnt3a would promote transient up-regulation of GSK-3 β to participate in signalosome formation and phosphorylation of LRP5/6, and non-canonical Wnt5a would promote Ror2 phosphorylation at Ser 864 to induce cell migration (27, 28). In this respect, Yamamoto et al. first demonstrated that Ror2 is phosphorylated on serine/threonine residues upon stimulation of cultured cells expressing Ror2 endogenously with Wnt5a, but not with Wnt3a, and that inhibition or depletion of GSK-3 β blocked this phosphorylation and cell migration (33).

Consistent with this, Grumolato et al. (34) demonstrated that prototype canonical Wnt3a and non-canonical Wnt5a ligands specifically trigger completely unrelated endogenous co-receptors —LRP5/6 and Ror1/2, respectively— through a common mechanism involving their Wnt-dependent coupling to the Fzd /co-receptor and recruitment of shared components, including Dvl, Axin, and GSK-3. The authors identified Ror2 Ser 864 as a critical residue phosphorylated by GSK-3 β and required for non-canonical receptor activation by Wnt5a, analogous to the priming phosphorylation of LRP6 in response to Wnt3a (34).

Finally, here we found that Wnt stimulation induced a rapid GSK-3 β redistribution from cytoplasm to nuclei in both non-malignant and malignant cells, and a transient exit of PKC ζ from nucleus to cytoplasm in malignant cells, and this correlation between nuclear GSK-3 β and Wnt signaling has not been, to our knowledge, previously demonstrated. In this regard, although the mechanisms governing the intracellular localization of GSK-3 β are not fully elucidated, GSK-3 β is known to be located at cytoplasm, nucleus, and mitochondria (4). Moreover, it has been reported that the nuclear localization of GSK-3 β is dynamic and cell cycle-dependent (35), and that nuclear GSK-3 β plays a role in controlling the nuclear/cytoplasmic distribution of several proteins, such as cyclin D1, STAT, GATA-4, c-Myc, NRF2, Snail and p53 (36). In addition, there is evidence that nuclear GSK-3 β can form a complex with β -catenin, thereby lowering the levels of β -catenin/TCF –dependent transcription and negatively affecting canonical Wnt signaling at the nuclei (36). However,

other reports have shown that depletion of nuclear GSK-3 β or pharmacological inhibition of its kinase activity impaired survival and proliferation of cultured colon cancer cells (37). Thus, the biochemical and physiological meaning of the GSK-3 β redistribution observed in this study from cytoplasm to the nucleus as a result of Wnt stimulation in non-malignant and malignant cells, remains to be elucidated.

Taking all of this experimental evidence, and our findings exposed here, together reveals multifaceted roles of this kinase in Wnt signaling, thus establishing a central role for GSK-3 β strict regulation of its activity, which is different in normal and malignant cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN226111, and IN215514) and from CONACYT (CB2010-151731).

Nydia Tejeda-Muñoz is a Ph. D student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACYT (260991).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PKC ζ interacts with GSK-3 β . PKC ζ or GSK-3 β 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

proteins indicated in the figure. The results are representative of three independent experiments using different cell preparations. IgG was shown as control of immunoprecipitation equal loading and actin antibody was used as control for equal loading for cell extracts.

Figure 2. GSK-3 β co-localizes with PKC ζ in both normal and malignant cells. (A) Wnt ligands (100 ng/ml, 5 min) induce GSK-3 β redistribution from cytoplasm to nuclei in non-malignant 112CoN cells. (B and C) In malignant RKO and SW480 cells, Wnt ligands cause an exit of PKC ζ from nucleus to cytoplasm and a redistribution of GSK-3 β from the cytoplasm to the nucleus. In all cases, the cells were fixed, permeabilized and co-immunostained with antibodies against GSK-3 β and PKC ζ . Fluorescence was analyzed by laser confocal microscopy. PKC ζ was visualized with FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody and GSK-3 β with rhodamine goat anti-mouse antibody. Data are representative of three independent experiments.

Figure 3. Wnt3a and Wnt5a Ligands Increase the PKC-mediated Phosphorylation of GSK3- β in Cancer Cells and Induce the Opposite Effect in Non-malignant Cells. A, B) Non-malignant (panel A) or malignant cells (panel B) were incubated in the absence or presence of Wnt3a or -5a ligands for 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by Western blot using the anti-P-Ser-PKC substrate antibody. The results shown are representative of at least three independent

experiments using different cell preparations. A densitometric analysis was performed to estimate the changes in Wnt-induced GSK-3 β phosphorylation levels with respect to the levels found in basal non-stimulated cells: the bar graphs represent the means \pm SEM from at least three independent assays. **C)** Time course of stimulation of RKO cells with Wnt5a (100 ng/ml). GSK-3 β was immunoprecipitated from cell lysates obtained at each time point indicated in the figure and analyzed by Western blot using the anti-P-Ser-PKC substrate antibody. IgG is shown as control of immunoprecipitation equal loading. Results shown are representative of three independent experiments using different cell preparations.

Figure 4. Wnt stimulation does not induce GSK-3 β phosphorylation at Ser 9. **A)** FACS analysis of the time course of stimulation of cells with or without Wnts or insulin. Serum-starved RKO cells were incubated in the absence (time 0) or presence of Wnt3a or -5a (100 ng/ml) or in the absence or presence of insulin (0.3 IU/ml) during 5, 10, and 15 min. The cells were stained with the corresponding primary antibody (anti-pSer9-GSK-3 β or anti-pThr308-Akt) as described in Experimental Procedures and analyzed by flow cytometry. The figure shows the overlapping histograms of the time-course obtained from at least three independent experiments. **B)** Western blot analysis of the time course of stimulation of cells with or without Wnts or insulin. Serum-starved RKO cells were incubated in the absence (time 0) or presence of Wnt3a or -5a (100 ng/ml) or in the absence or presence of insulin (0.3 IU/ml) during 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from RKO cells and analyzed by

Western blot using anti-pSer9-GSK-3 β or anti-GSK3 antibodies and developed with a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations.

Figure 5. PKC ζ inhibition blocks the GSK3- β phosphorylation. A) Non malignant 112CoN cells and malignant RKO or SW480 serum-starved cells were incubated in the absence or presence of the myristoylated PKC ζ -selective inhibitor (20 μ M) for 1 hour. Then, cells were incubated in the absence or presence of Wnt5a (100ng/mL) for 5 minutes. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by Western blot using the anti-P-Ser-PKC substrate antibody. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations. A densitometric analysis of the changes in Wnt-induced GSK-3 β specific phosphorylation levels with respect to the levels found in basal non-stimulated cells is shown at the right and the data represent the means \pm SEM from at least three independent assays. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. B) PKC ζ knockdown decrease the phosphorylation of GSK-3 β . PKC ζ -silenced RKO and SW480 cells were serum-starved for 6 h and then incubated in the absence or presence of 100 ng/ml Wnt5a during 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated from cell extracts and immunoprecipitates were analyzed by Western blot with the anti-P-Ser-PKC substrate antibody. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations. The densitometric analysis shown in bar graphs represents

the means \pm SEM from at least three independent assays. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 6. PKC ζ -induced Phosphorylation of GSK-3 β Stimulates GSK-3 β Activity.

Serum-starved non-malignant 112CoN cells (panel A) or malignant RKO (panel B) or SW480 cells (panel C) were incubated in the absence (vehicle) or presence of Wnt ligands during 5 min and then washed and lysed. GSK-3 β was immunoprecipitated to analyze the effect of each treatment on its activity *in vitro*. Kinase activity was measured with the GSK-3 β immune complexes, in the absence or presence of substrate added (GSM peptide) and in the absence or presence of the selective GSK-3 β inhibitor (2'Z, 3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxime (BIO), to validate the specificity of the assay. A representative autoradiogram with its corresponding Coomassie Blue-stained gel is shown (in panel B, the tiny white line that appears between 3 and 4 lanes corresponds to an anomaly in the original stained gel). Autoradiograms and their corresponding stained gels were quantified with an image densitometer and the specific phosphorylation was determined as the ratio of phosphorylated protein to the total protein content. Values plotted are means \pm S.E.M. for at least three experiments with different cell preparations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **D**) Silencing of PKC ζ in cancer RKO cells inhibited the enhancement of GSK-3 β activity induced by Wnt treatment. RKO cells were transfected with the control scrambled-RNAi plasmid or with pSuperPKC ζ -RNAi plasmid and 30h post-transfection were serum- starved for 6 h and then incubated in the absence (vehicle) or presence of Wnt3a or -5a agonists for 5 min. GSK-3 β was

immunoprecipitated to analyze its kinase activity *in vitro* in the absence or presence of substrate added (GSM peptide). A representative autoradiogram with its corresponding Coomassie Blue-stained gel is shown. Autoradiograms and their corresponding stained gels were quantified with an image densitometer to determine the specific phosphorylation normalizing with respect to control cells. Values plotted are means \pm S.E.M. for at least three experiments with different cell preparations. * $p < 0.05$.

Figure 7. Ser147 to Alanine mutation inactivates GSK-3 β whereas the phosphomimetic mutation Ser147 to Glutamic acid allows constitutive activation of GSK3. A, B) 24h post-transfection, RKO cells expressing epitope-tagged (HA) mutant or control wild-type GSK-3 β were incubated 1 h in the absence or presence of the selective PKC ζ -myristoylated pseudosubstrate inhibitor (20 μ M) and then in the absence or presence of 100 ng/ml of Wnt5a for 5 min. GSK-3 β was immunoprecipitated (with anti HA antibody) from cell extracts to be analyzed for its catalytic ability *in vitro*. A representative autoradiogram with its corresponding Coomassie Blue-stained gel is shown. Data were quantified by densitometric analysis performed both in Coomassie-stained gels and the corresponding autoradiographies to determine the specific phosphorylation normalizing with respect to control cells. Values plotted are means \pm S.E.M. for at least three experiments with different cell preparations. * $p < 0.05$. **C, E)** RKO or HEK293T cells were transiently co-transfected with pTOPFlash or pFOPFlash (control) reporter plasmids, with 0.05 μ g of the pRL luciferase plasmid

(transfection control) and with plasmid-encoding wild type GSK-3 β -HA or plasmid-encoding GSK-3 β /S147A-HA mutant. At 24 h post-transfection, β -catenin levels were analyzed by Western blot in cell extracts, and the luciferase activity was assayed. The activity was normalized with respect to the activity of *Renilla* luciferase or with respect to the protein content in each sample. All of the assays were performed in triplicate, and the data represent the means \pm SEM from at least three independent assays. ** $p < 0.01$. **D)** Non-malignant HEK293T cells expressing wild type GSK-3 β -HA or GSK-3 β /S147A-HA were serum-starved for 7 h and then incubated in the absence or presence of the myristoylated PKC ζ -selective inhibitor (20 μ M) for 1 hour. Then, cells were incubated in the absence or presence of Wnt5a (100ng/mL) for 5 minutes. GSK-3 β was immunoprecipitated with anti HA antibody from cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by Western blot using the indicated antibodies in the Figure. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations.

References

1. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107**: 519–527.

2. Jope RS, Johnson GV. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**: 95-102.
3. Wu D, Pan W. 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* **35**: 161–168.
4. Takahashi–Yanaga F. 2013. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochem Pharmacol* **86**: 191–199.
5. Frame S, Cohen P. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2** :769–776.
6. Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. 2011. GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Front Mol Neurosci* **16** :40.
7. Chen RH, Ding WV, McCormick F. 2000. Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **275**: 17894–17899.
8. Cook D, Fry MJ, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett JR, Dale TC. 1996. Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J* **2**: 4526-4536.
9. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. 1992. Differential regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β by Protein Kinase C isotypes. *J Biol Chem* **267**: 16678-16882.

10. Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB. 2002. Convergence of multiple signaling cascades at Glycogen Synthase Kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a Protein Kinase C-dependent intracellular pathway. *Mol Cell Biol* **22**: 2099-110.
11. Behrens J. 2013. Everything you would like to know about Wnt Signaling. *Sci Signal* **6**: pe 17.
12. Clevers H, Nusse R. 2012. Wnt/ β -Catenin signaling and disease. *Cell* **149**: 1182- 1205.
13. Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM. 2010. Wnt signaling requires the sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**: 1136–1148.
14. McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR. 2005. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J* **24**: 1571–1583.
15. Etienne-Manneville S, Hall A. 2003. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**: 753–756.
16. Schlessinger K, McManus EJ, Hall A. 2007. Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol* **178**: 355–361.

17. Luna-Ulloa B., Hernández-Maqueda J., Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. 2011. Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* **32**: 1615-1624.
18. Storz P, Döppler H, a 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**: 2614-2626.
- 19 Kimelman D, Xu W. 2006. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**:7482-7491.
20. Mishra R. 2010. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer* **9**:144.
21. Fields AP, Regala RP. 2007. Protein kinase C ι : human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacological Res* **55**: 487-497.
22. Antal CE, Hudson AM, Kang E, Zanca C, Wirth C, Stephenson NL, Trotter EW, Gallegos LL, Miller CJ, Furnari FB, Hunter T, Brognard J, Newton AC. 2015. Cancer-associated Protein Kinase C mutations reveal kinase's role as tumor suppressor. *Cell* **160**: 489-502.
23. Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Chapkin RS, Moscat J. 1993. Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction.

Cell **74**: 555–563.

24. Lee H, Park M, Shin N, Kim G, Kim YG, Shin JS, Kim H. 2012. High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **424**: 321-326.

25. Ma L , Tao Y, Duran A, Llado V, Galvez A, Barger JF, Castilla EA, Chen J, Yajima T, Porollo A, Medvedovic M, Brill LM, Plas DR, Riedl SJ, Leitges M, Diaz-Meco MT, Richardson AD, Moscat J. 2013. Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKC ζ in tumorigenesis. *Cell* **152**: 599-611.

26. Llado V , Nakanishi Y , Duran A , Reina-Campos M , Shelton PM , Linares JF , Yajima T , Campos A , Aza-Blanc P , Leitges M , Diaz-Meco MT , Moscat J. 2015. Repression of intestinal stem cell function and tumorigenesis through direct phosphorylation of β -catenin and Yap by PKC ζ . *Cell Rep* **10**: 740-754.

27. Lin,D. Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signaling and cell polarity. *Nat. Cell Biol* **2**: 540– 547.

28. Baluch DP, Capco DG. 2008. GSK3 β mediates acentromeric spindle stabilization by activated PKC ζ . *Dev Biol* **317**: 46-58.

29. Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. 2007.

Wnt induces LRP6 Signalosomes and promotes Dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**: 1619–1622.

30. Metcalfe C, Bienz M. 2011. Inhibition of GSK3 by Wnt signalling – two contrasting models. *J Cell Sci* **124**: 3537-3544.

31. Plyte SE, O'Donovan E, Woodgett JR, Hardwood AJ. 1999. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during Dictyostelium development via the serpentine receptor cAR3. *Development* **126**: 325-333.

32. Kim L, Liu J, Kimmel AR. 1999. The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* **99**: 399-408

33. Yamamoto H, Yoo SK, Nishita M, Kikuchi A, Minami Y. 2007. Wnt5a modulates glucogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells* **12**: 1215-1223.

34. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA. 2010. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* **24**: 2517-2530.

35. Diehl JA, Cheng M, Roussel MR, Sherr CJ. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**: 3499-3511.

36. Caspi M, Zilberberg A, Eldar-Finkelman H, Rosin-Arbesfeld R. 2008. Nuclear GSK-3 β inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a β -catenin phosphorylation-independent manner. *Oncogene* **27**: 3546-3555.
37. Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T. 2005. Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **334**:1365–73.

