



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio comparativo de la expresión de  
isoformas de proteína cinasa C y de  
calreticulina en líneas celulares normales y  
malignas de colon.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

ELEONORA FLORES RAMÍREZ

DRA. MARTHA ROBLES FLORES



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2007



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.

<p>1. Datos del alumno  Apellido paterno:  Apellido materno:  Nombre:  Teléfono:  Universidad:  Facultad o Escuela:  Carrera:  No. de cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno  Flores  Ramírez  Eleonora  5446 70 04  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Biología  09819945-1</p>
<p>2. Datos del tutor  Grado:  Nombre:  Apellido paterno:  Apellido materno:</p>	<p>2. Datos del tutor  Dra.  Martha  Robles  Flores</p>
<p>3. Datos del sinodal 1  Grado:  Nombre:  Apellido paterno:  Apellido materno:</p>	<p>3. Datos del sinodal 1  Dra.  Claudia  González  Espinosa</p>
<p>4. Datos del sinodal 2  Grado:  Nombre:  Apellido paterno:  Apellido materno:</p>	<p>4. Datos del sinodal 2  Dr.  Luis Felipe  Jiménez  García</p>
<p>5. Datos del sinodal 3  Grado:  Nombre:  Apellido paterno:  Apellido materno:</p>	<p>5. Datos del sinodal 3  Dr.  Rafael  Villalobos  Molina</p>
<p>6. Datos del sinodal 4  Grado:  Nombre:  Apellido paterno:  Apellido materno:</p>	<p>6. Datos del sinodal 4  Dra.  Marina  Macías  Silva</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito  Título:   Número de páginas:  Año:</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito  Estudio comparativo de la expresión de isoformas de proteína cinasa C y de calreticulina en líneas celulares normales y malignas de colon.  68  2007</p>

Dedicatoria:

Dedico mi tesis a mi madre y a mi padre, que están siempre presentes en mi vida.

A todos los que estuvieron en este largo camino que ha sido mi tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Ciencias.

## **Agradecimientos:**

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

A los Doctores:

Claudia González Espinosa  
Luis Felipe Jiménez García  
Rafael Villalobos Molina  
Marina Macías Silva

Por sus valiosos comentarios en la realización de este trabajo.

Agradezco el apoyo otorgado por el Dr. Adolfo García Sainz.

A la Dra. Cristina Castañeda Patlán, por ayudarme y guiarme en el desarrollo de la investigación y de los experimentos.

Agradezco al Biól. Bernardo Luna, por toda su paciencia y serenidad para ayudarme en todo.

Al Biól. Martín A. por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A mi Madre, por su apoyo incondicional.

A Rubén, por estar junto a mí en este camino.

Este proyecto fue apoyado por CONACyT y por PAPIIT.

# ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	1
Resumen .....	3
<b>1. Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Cáncer .....</b>	<b>5</b>
-Colon y cáncer colo-rectal .....	8
<b>1.2 Proteína Cinasa C .....</b>	<b>15</b>
-Estructura .....	16
-Activación de la PKC .....	19
-Funciones .....	21
<b>1.3 Calreticulina .....</b>	<b>22</b>
-Estructura .....	23
-Localización celular .....	27
-Funciones .....	28
<b>1.4 Proteína cinasa C, calreticulina y cáncer .....</b>	<b>32</b>
<b>2. Justificación .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>33</b>
<b>5. Materiales y métodos</b>	
<b>5.1 Líneas celulares y su mantenimiento .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Obtención de núcleos a partir de cultivos celulares .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Lisis de núcleos .....</b>	<b>35</b>
<b>5.4 Obtención de extractos protéicos totales .....</b>	<b>36</b>
<b>5.5 Cuantificación de proteína .....</b>	<b>36</b>
<b>5.6 Electroforesis e Inmunoblot .....</b>	<b>36</b>
<b>5.7 Inmunofluorescencia y DAPI seguida de microscopía confocal .....</b>	<b>37</b>
<b>6. Resultados</b>	
-Expresión de isoformas de PKC en líneas celulares de colon .....	38
-Expresión de calreticulina en líneas celulares de colon .....	42
-Expresión de calreticulina en líneas celulares de hígado .....	46
-Ensayo de inmunofluorescencia .....	47
<b>7. Discusión .....</b>	<b>51</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>60</b>
<b>9. Perspectivas .....</b>	<b>60</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS:

APC: proteína de la adenomatosis en colon (adenomatous polyposis coli)

ATP: adenosin trifosfato

BSA: albúmina sérica bovina

Ca<sup>2+</sup>: calcio

CRC: cáncer colo-rectal

CRT: calreticulina

D.O.: densidad óptica

DAG: diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Dulbeco's Modified Eagle's medium

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido tetra acético etilen-diamino

EGTA: ácido tetra acético etilen-glicol

Erp57: proteína 57 del retículo endoplásmico

FITC: isotiocianato de fluoresceina

GSK-3 $\beta$ : glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$

HACBP: high affinity calcium-binding protein

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IP3: inositol-3-fosfato

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado

JNK: cinasa Jun-N-terminal

kb: kilobases

kDa: Kilodaltones

KDEL: (Lys-Asp-Glu-Leu)

LEF/TCF: factor potenciador linfóide (lymphoid enhancer-binding factor) / factor de transcripción de células T (T-cell factor)

LRP/Arrow: receptor relacionado a lipoproteínas de baja densidad (low density related lipoprotein)

MAPK: cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinase)

NLS: señal putativa de localización nuclear  
PBS: buffer salino de fosfatos  
PDI: proteína disulfuro isomerasa  
PH: plecstrina  
PIP<sub>2</sub>: fosfatidil inositol 4, 5-bifosfato  
PIP<sub>3</sub>: fosfatidil inositol 3, 4, 5-trifosfato  
PKC: proteína cinasa C  
PLC: fosfolipasa C  
PMA: forbol-12-miristrato-13-acetato  
PMSF: fenilmetanosulfonilfluoruro. Inhibidor de proteasas de serina  
PS: fosfatidilserina  
RE: retículo endoplásmico  
RNAi: técnica de RNA de interferencia  
S.E.M.: media del error estándar  
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato  
SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico  
TBS: buffer salino Tris.  
TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato  
Wnt: Wingless  
Zn<sup>2+</sup>: Zinc



## RESUMEN

Desde su descubrimiento en 1977 por Yasutomi Nishizuka, la proteína cinasa C (PKC) ha sido el foco de atención de investigadores interesados en estudiar el cáncer, ya que no solamente es el blanco de moléculas promotoras de tumores, sino que está implicada en la activación de oncogenes, en el control de la proliferación celular y de la apoptosis. Por lo tanto, es un enzima clave en el proceso de carcinogénesis. Existen datos que muestran que procesos de carcinogénesis intestinal están asociados con alteraciones en la actividad y expresión de las isoformas de PKC, pero la contribución de estos cambios en la progresión del tumor en este tejido continúa aún sin definirse. Por otro lado, se ha encontrado que la proteína calreticulina también muestra marcados cambios de expresión en varios tipos de cáncer y en recientes estudios se ha reportado su interacción *in vivo* con la PKC.

El objetivo del presente trabajo fue investigar si hay expresión diferencial de calreticulina y de isoformas de PKC en líneas celulares normales y malignas de colon. Mediante estudios de inmuno-blot demostramos la presencia de ocho isoformas de PKC con expresión diferencial significativa entre las células normales y malignas. Se encontró en líneas celulares malignas una sobre-expresión de las isoformas  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\mu$ , y  $\zeta$ , una disminución de expresión de isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I, y  $\delta$  y la expresión exclusiva en carcinoma de la isoforma  $\eta$ . Mediante estudios de inmunoblot e inmunofluorescencia con calreticulina, se encontraron diferencias de expresión entre células normales y malignas en las fracciones nucleares pero no en las citoplásmicas. Se encontró que la expresión de calreticulina en el núcleo es mayor que la normal en las células cancerosas HT-29, pero en las células malignas RKO es menor la expresión que en su contraparte normal. Esto sugiere que la expresión de estas proteínas puede estar relacionada con la patología del cáncer colo-rectal y con el estado de diferenciación del tumor.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos tanto unicelulares como pluricelulares tienen mecanismos de comunicación, que les permiten reaccionar ante el medio; ya sea externo, en los organismos unicelulares o, como en el caso de las células de un organismo pluricelular, reaccionar a las señales del medio interno, generando una respuesta al exterior o regulando algún proceso al interior. Esta habilidad de las células de recibir y actuar en respuesta a señales emitidas más allá de la membrana plasmática es fundamental para la vida, haciéndose más compleja conforme pasamos de la unicelularidad a seres con una organización tisular.

Las células bacterianas perciben señales por medio de los receptores de membrana que monitorean el medio circundante, y esto les permite responder a estímulos tales como pH, fuerza osmótica, disponibilidad de comida, oxígeno, predadores, competidores, etc. En organismos más complejos como vegetales y animales, los distintos tipos celulares intercambian una amplia variedad de señales: información de su entorno y de las actividades metabólicas interdependientes que se llevan a cabo en diferentes tejidos. En todos estos casos las señales son detectadas por receptores específicos y se traducen en respuestas celulares apropiadas.

A pesar del inmenso número de señales biológicas, así como igual cantidad de respuestas, los organismos usan solo unos pocos mecanismos evolutivamente conservados para detectar señales extracelulares y *transducirlas* en cambios intracelulares (Nelson & Cox, 2000).

La transmisión de una señal involucra la interacción de un ligando extracelular con una proteína que tiene dominios en ambos lados de la membrana. La unión del ligando estabiliza la conformación del receptor, de una forma inactiva en una activa. El principio básico de esta interacción es que la unión del ligando en el lado extracelular modifica la actividad del dominio receptor en el lado citoplásmico, desencadenando una actividad catalítica. El proceso es llamado transducción de señales debido a que una señal ha sido

en efecto transducida a través de la membrana y provee de una amplificación de la señal original (Lewin, 2000).

Estos mecanismos de comunicación a veces sufren alteraciones debido a múltiples factores, tanto genéticos como epigenéticos, que ocasionan fallas en la actividad celular, dando como resultado en algunos casos una proliferación excesiva de las células, lo que en muchos casos resulta en una transformación maligna de las mismas.

Debido a que diversos estudios han descubierto una red de intercomunicación entre estos sistemas de señalización y que una vía puede interactuar con otra, en el presente trabajo se estudiaron dos proteínas que han sido recientemente reportadas como interactuantes *in vitro*, y se ha sugerido que participan en el desarrollo y progresión de la carcinogénesis colo-rectal.

## **1.1 Cáncer**

El cáncer ha sido definido de muchas maneras, comenzando por las observaciones de la angiogénesis hechas por Hipócrates, en donde la palabra cáncer se refiere a los gruesos vasos sanguíneos que alimentan los tumores y que recuerdan las tenazas de un cangrejo (Feinberg *et al.*, 2006).

Existe un equilibrio particular en cada órgano en lo concerniente a proliferación y muerte celular. A este estado fisiológico se le denomina cinética celular normal y se regula en cada tejido según su función. La ruptura de este equilibrio a favor de la acumulación de células somáticas, ya sea por mecanismos genéticos o epigenéticos llevan a la aparición de fenotipos alterados que son sujetos a selección; ésta es la esencia del origen de las neoplasias. El proceso durante el cual las mutaciones sucesivas convierten una célula normal en un clon de células neoplásicas y su progenie sobrepasa los controles normales de proliferación y territorio se denomina carcinogénesis (Nowell, 1974). En la visión de la carcinogénesis como un proceso multifactorial, cada paso mutacional conduce a la expansión clonal de células que llevan la nueva mutación: de este modo, la probabilidad de que mutaciones múltiples ocurran en una misma célula se incrementa. Sin esta

expansión clonal de células mutantes, las probabilidades de acumulación de varios eventos poco frecuentes en la misma célula serían muy bajas (McCormick, 1999).

El ritmo normal de mutaciones y sus mecanismos de reparación, así como las vías hacia la apoptosis, se ven afectados en el cáncer, ya que de forma habitual las células son capaces de reparar la gran mayoría de sus mutaciones (Ponder, 2001).

Se conocen gran cantidad de genes y sus productos, así como las funciones de estas moléculas en el complejo engranaje intracelular. La gran mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones anormales en genes que cumplen las funciones de proliferación celular, apoptosis, reparación del DNA y envejecimiento celular. Después, las divisiones celulares sucesivas de esta población tumoral inicial producen nuevas mutaciones que alteran otras funciones celulares y otorgan nuevos atributos biológicos como: motilidad celular, adhesividad celular, protección inmunológica y metástasis. La alteración de cada función celular varía con el tipo de tumor. Las características del fenotipo canceroso, de manera general, son: ignorar las señales antiproliferativas y de diferenciación, capacidad de proliferación sostenida, evasión de apoptosis, invasión y angiogénesis (Hanahan & Weinberg, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

Las células cancerosas poseen todo tipo de mutaciones incluyendo las puntuales, las deleciones o pérdida de un segmento grande del cromosoma, la amplificación, la translocación y las aneuploidías, que afectan el número de cromosomas. La exposición continua a los agentes carcinogénicos provoca variaciones genéticas progresivas en las células susceptibles. La mayoría de los carcinógenos no son activos en su forma inicial, pues requieren de una transformación metabólica en el organismo mediada por los citocromos P450, cuya expresión varía en cada individuo. Algunas personas no poseen las enzimas que metabolizan los pro-carcinógenos y esto los protege frente a su efecto mutagénico. Esto explica, en parte, la diferente frecuencia de tumores en individuos con el mismo grado de exposición a agentes químicos (Ferbeyre & García, 2005)

Muchos factores, ya sea de tipo genético o epigenético, pueden influenciar la proliferación celular excesiva que evoluciona en cáncer. En cuanto a los factores de tipo genético hay de varios tipos:

De ganancia o adquisición de una función genética, que es un mecanismo en donde los genes que tienen funciones en el control normal de crecimiento celular o la diferenciación tienen una activación inapropiada y debido a esto, por una variedad de mecanismos, pueden conducir a cáncer. Los genes celulares activados de forma normal fueron llamados “proto-oncogenes” y su contrapartes activadas “oncogenes”.

La pérdida de funciones genéticas es otro mecanismo en la carcinogénesis, en donde la pérdida de un “gene supresor de tumores”, a diferencia de los oncogenes, es requerida para la tumorigénesis. Las mutaciones de pérdida de función son mucho más comunes que las mutaciones de ganancia de función en el caso de cáncer hereditario (que se da por alteraciones heredadas en la secuencia de DNA de la célula) (Ponder, 2001; Alberts *et al.*, 2002), debido a que la pérdida es enmascarada durante el desarrollo por el alelo normal restante. En términos de “genes supresores” hay dos categorías: en la primera la pérdida de la función (debida a cualquier mecanismo) está limitada al desarrollo de cáncer y recae directamente en una vía decisiva. El segundo grupo acelera la adquisición de cambios en la vía, pero su pérdida no es la esencial y su acción recae fuera de la vía decisiva; son genes involucrados en la reparación del DNA y la integridad del genoma (Alberts, *et al.*, 2002)

La pérdida de heterocigosis (LOH loss of heterozygosity) se da cuando la pérdida somática de un alelo, de un gene supresor, involucra la pérdida de material cromosómico en un rango que va de una sub-banda al cromosoma completo. Aunque existe evidencia que el silenciamiento epigenético, más que la mutación, es un mecanismo común para suprimir la función génica (Ponder, 2001).

Por el lado de los factores epigenéticos tenemos la metilación de DNA como mecanismo de determinación del destino celular en la embriogénesis, mecanismos epigenéticos de disrupción, en el caso de la traducción génica, como responsables de la pérdida de traducción (LOI, loss of imprinting) (Kaneda & Feinberg, 2005; Feinberg, 2006). Se ha observado que la metilación de las regiones ricas en dobletes de citosina-guanina (“islas CpG”), en la región promotora de las células somáticas, es un mecanismo común de

silenciamiento epigenético de uno o de los dos alelos de los genes supresores de tumores (Ponder, 2001).

Eventos exógenos en los alrededores de la célula cancerosa también pueden determinar su destino; tal es el caso de heridas e inflamación crónica, que se asocian con cáncer. Sus efectos pueden estar mediados a través de mitogénesis incrementada, lo que se asocia con un aumento en la mutación, o a través de efectos paracrinicos como el de las células inflamatorias, que incrementan la producción de metaloproteinasas de matriz. Otro factor importante son las variaciones en los niveles de hormonas o factores de crecimiento circulantes, que muestran asociaciones significativas con el riesgo de cáncer (Ponder, 2001).

Se han observado patrones en las alteraciones o eventos genéticos, necesarios para el desarrollo de cánceres epiteliales comunes. No es de sorprender que el patrón preciso de las alteraciones génicas difieran entre cánceres de diferentes tipos, y hasta del mismo tipo. Pero los patrones no son aleatorios. Asociaciones específicas de eventos se han visto dentro de tumores individuales y eso posiblemente refleja la evolución de los tumores en rutas particulares. De ahí la base del actual optimismo en el desglose molecular de los tumores por cambios génicos o de expresión que provean información de importancia clínica, tal y como actualmente se utiliza la historia clínica familiar de los pacientes, pues desde hace tiempo que se ha reconocido la predisposición hereditaria y hay un espectro de posibilidades de que dicha historia refleje su predisposición.

### **- Cáncer colo-rectal (CRC) y Colon**

El cáncer es, sin duda, una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico del país desde finales del siglo XX, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo –genéticos y epigenéticos- con los que se asocia.

México ha visto el aumento continuo de las enfermedades crónico-degenerativas, hasta constituirse en las principales causas de muerte y de enfermedad, entrando el cáncer en

este género. Entre 1922 y 2001 la proporción de muertes por cáncer en México pasó de 0.6 a 13.1% de las defunciones totales ocurridas por todas las causas y en toda la población (108).

El cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país y desde 1980, en que el registro de información permitió diferenciar la localización de la neoplasia, han sido las principales causantes de las defunciones: a) tráquea, bronquios y pulmón, b) estómago y c) cérvico uterino; aumentando de forma alarmante el número de casos de cáncer de colon en los últimos años. En el año 2001 el cáncer provocó 55,731 defunciones anuales, 52 y 48% para mujeres y hombres respectivamente (108). A nivel internacional el cáncer de colon se ubica entre los cinco cánceres más comunes, junto con el de pulmón, estómago, cérvico uterino y mama (Alberts, *et al.*, 2002).

Médicos investigadores del ISSSTE y del Instituto Nacional de Salud Pública han realizado un estudio, que revela que el cáncer de colon afecta en igual proporción a hombres y mujeres, con un promedio de edad de los afectados de 63 años, que en los mayores de 45 años, los enfermos por esta causa han aumentado 100%, y con una mortalidad muy alta (46). Por estas razones, es importante continuar con el estudio de esta enfermedad, aportando datos que ayuden a esclarecer este proceso.

-El colon

El epitelio intestinal se caracteriza por su alta tasa de autorenovación, lo que lo hace muy susceptible a la transformación maligna y además presenta los paradigmas de la biología de las células troncales, establecida para otros tejidos con gran capacidad de autorenovación (Radtke & Clevers, 2005). Debido a que la homeostasis del epitelio intestinal se fundamenta en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis, representa un atractivo modelo experimental para el estudio integrado de la homeostasis de estos procesos celulares, que se llevan a cabo en un lapso promedio de tres días y medio.

El colon forma parte del aparato digestivo, el cual absorbe y después suministra al organismo un aporte continuo de agua, electrolitos y nutrientes. Para ello se requiere: el

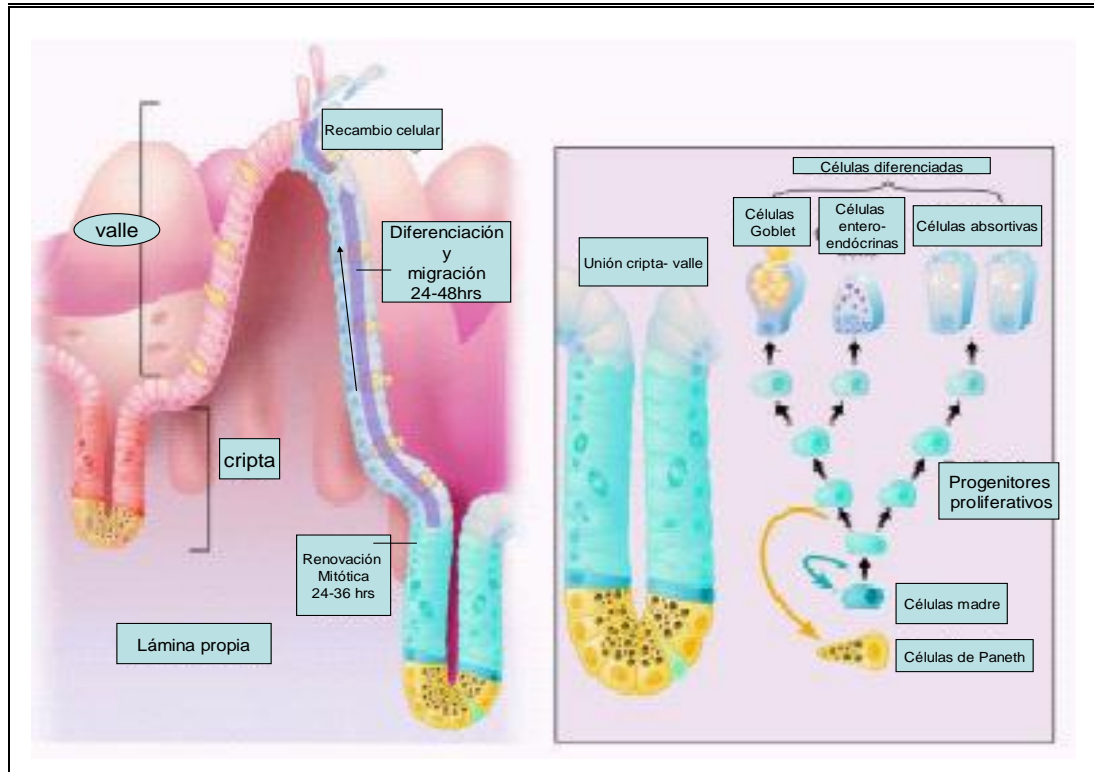
tránsito de los alimentos a lo largo de todo el tubo digestivo; la secreción de los jugos digestivos y la digestión de los alimentos; la absorción de los productos digeridos, el agua y los distintos electrolitos; la circulación de la sangre por los órganos gastrointestinales para transportar las sustancias absorbidas, y un control de todas estas funciones por parte de los sistemas nervioso y hormonal (Geneser, 2000).

A **nivel microestructural** el colon, como la epidermis de la piel, constituye una barrera entre el cuerpo y el exterior. Mientras la epidermis está constituida de múltiples capas celulares, el epitelio intestinal consiste de una sola capa de frágiles células epiteliales. Estas células absorben la mezcla resultante de productos biológicos aprovechados mientras mantienen el quimo indigerible y la microflora asociada dentro del lumen (Radtke & Clevers, 2005).

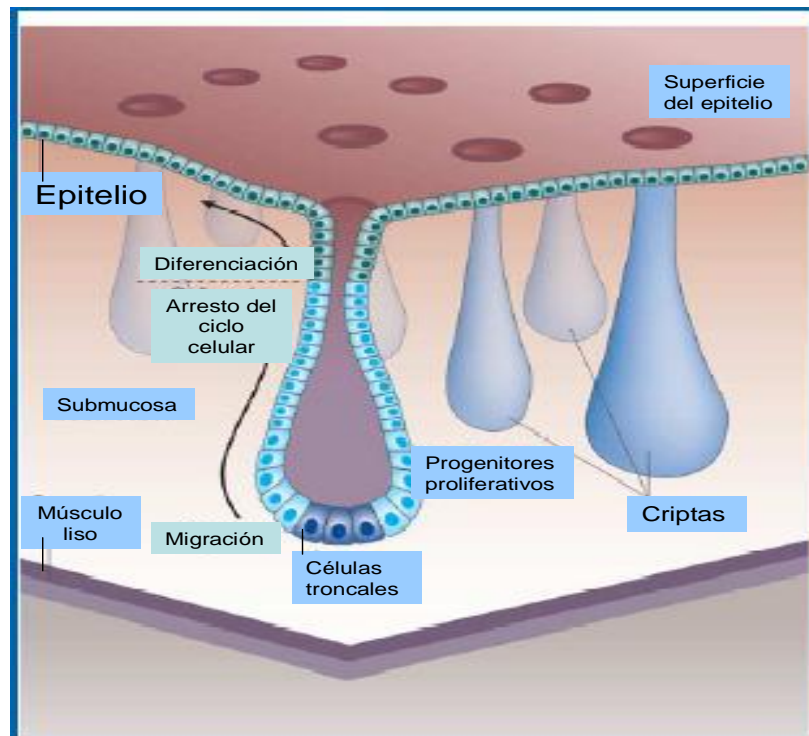
La capa epitelial posee una topología única; está formada por una estructura bidimensional plegada en valles (criptas) y crestas (vellosidades). En la base de las criptas proliferativas residen las células troncales, las cuales dan origen a células hijas que migran hacia arriba después de experimentar dos o tres ciclos de división, para diferenciarse al alcanzar las crestas en células absortivas (enterocitos) o en células secretoras de hormonas o de mucus. En estas crestas, finalmente, degeneran las células a través de apoptosis y son desprendidas al lumen del intestino para su expulsión (Radtke & Clevers, 2005).

Dos linajes principales de tipos de células diferenciadas se observan dentro del epitelio intestinal: el linaje absortivo o enterocitos y el linaje secretor. Éste último comprende a las células caliciformes, al linaje enteroendócrino, y a las células Paneth. Los enterocitos son las células más abundantes en el intestino, secretando hidrolasas y absorbiendo nutrientes. Las células caliciformes secretan mucosas protectoras e incrementan en número del duodeno al colon. Las células del linaje enteroendócrino secretan hormonas (serotonina, sustancia P, o secretina) y las células Paneth, que sólo se encuentran en el intestino delgado, secretan agentes antimicrobianos como criptidinas, defensinas y lisozima para controlar el contenido microbiano en el intestino delgado (ver Fig. 1 y 2) (Potten, 1998; Radtke & Clevers, 2005).





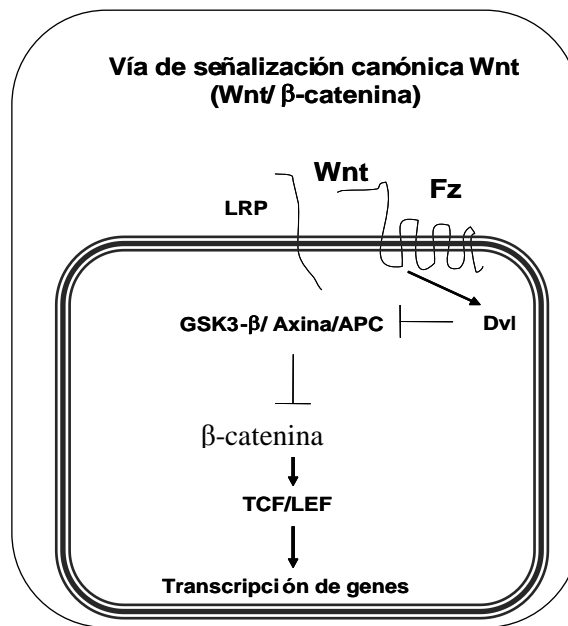
**Fig. 1.** La anatomía del epitelio del intestino delgado. El epitelio está formado por crestas y valles. Modificado de Radkte & Clevers 2005.



**Fig 2.** Estructura del colon. En el colon no hay células de Paneth, ni valles, es la superficie lisa, con criptas.

En cuanto a las **moléculas** que regulan dicha homeostasis, hay varias líneas de evidencia experimental *in vivo* que han demostrado que la ruta de señalización “Wingless o “Wnt”, juega un papel esencial en la homeostasis de tejidos de autorenovación, como el epitelio intestinal. Su relevancia en la biología del colon se estableció hace más de una década, cuando se encontró que el gen que codifica para la proteína supresora tumoral APC (Adenomatous Polyposis Coli), está mutado en un número abrumador de casos de carcinoma de colon hereditarios o esporádicos. Estudios moleculares, han demostrado mutaciones activadoras de la vía Wnt en aproximadamente el 90% de los casos (Gregorieff & Clevers, 2005).

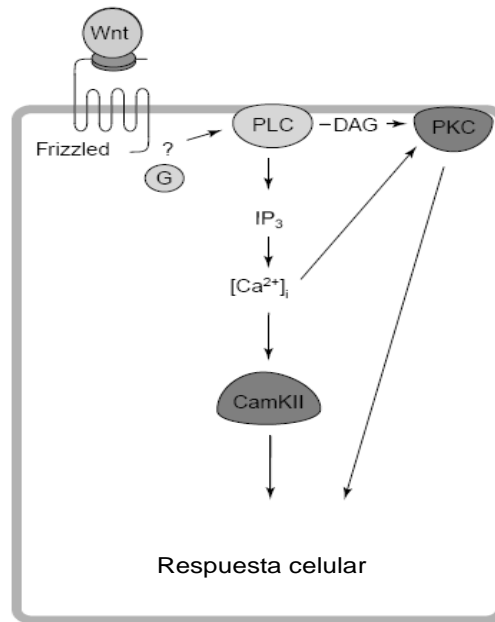
El elemento distintivo de la vía canónica de Wnt es la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina citoplásmica (Fig. 3). La  $\beta$ -catenina es una proteína multifuncional que combina las características de una proteína estructural de las uniones adherentes con aquellas de un factor de transcripción. En ausencia de ligando Wnt (familia de glucoproteínas palmitoiladas), la proteína  $\beta$ -catenina es fosforilada por las cinasas de serina/treonina, caseína cinasa  $\alpha$  lo que a su vez permite la fosforilación por parte de la glucógeno sintasa cinasa  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ). La interacción entre estas cinasas y la  $\beta$ -catenina es facilitada por las moléculas de andamiaje Axina y APC, que en conjunto forman un complejo de degradación de la  $\beta$ -catenina; la  $\beta$ -catenina fosforilada es reconocida por el sistema ubiquitin-proteosoma y subsecuentemente degradada. En ausencia del ligando Wnt, este complejo de degradación es muy activo y mantiene los niveles de  $\beta$ -catenina citoplásmica en un nivel bajo. Cuando los ligandos Wnt se unen a su complejo de receptores, formado por el receptor de siete dominios membranales de la familia frizzled y el co-receptor LRP/Arrow, inhiben la actividad de la GSK- $3\beta$  a través de la fosfoproteína Dishevelled, lo cual resulta en la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma. La acumulación citoplásmica de la  $\beta$ -catenina es un factor clave para su posterior translocación al núcleo, donde interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción LEF/TCF, funcionando como activador transcripcional para promover la activación de factores proliferativos celulares (Amerongen & Berns, 2006; Gregorieff *et al.*, 2005).



Se han descrito tres mecanismos por los cuales se da la acumulación de  $\beta$ -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  $\beta$ -catenina. Efectivamente, aproximadamente en el 85% de los casos de cáncer de colon se ha demostrado pérdida de función de la proteína APC; este evento lleva a la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo, lo cual desencadena una respuesta transcripcional de genes involucrados en la proliferación (Fodde & Brabletz 2007; Gregorieff & Clevers, 2005).

Hasta aquí, hemos descrito la vía de señalización Wnt colocando a la  $\beta$ -catenina como un elemento clave. Esta vía se ha descrito ahora como canónica, para diferenciarla de al menos 3 vías distintas de señalización mediadas por ligandos Wnt, independientes de la acción de la  $\beta$ -catenina. Hace aproximadamente 15 años, fue descrita la activación de los receptores Frizzled principalmente por los ligandos Wnt 4, 5a y 11, sin una actividad transcripcional aparente de la  $\beta$ -catenina (Kuhl *et al.*, 2000). Mediante estudios realizados en *Drosophila*, se describió la vía de polaridad planar celular (PCP), la cual promueve la activación de la proteína cinasa jun-N-terminal (JNK) (Bejsovec, 2005). Por otra parte, se observó que algunos receptores Frizzled, al igual que otros receptores de siete dominios transmembranales, actuaban a través de proteínas G, activando la fosfolipasa C (PLC) y la fosfodiesterasa. Este hallazgo sugirió que debía producirse un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$

intracelular debido a la formación del mensajero  $IP_3$ . Esta hipótesis fue corroborada al demostrarse que la inyección de Wnt 5a, en embriones de pez cebra, aumentó transitoriamente la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. El aumento de  $Ca^{2+}$  lleva a la modulación de proteínas tales como la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina II y la **PKC**; además, el diacilglicerol producido también por la activación de PLC, activa a la PKC (Fig. 4). Efectivamente, la expresión ectópica de Wnt 5a resulta en la translocación de la PKC a la membrana plasmática y aumenta su actividad de cinasa *in vitro* (Kuhl *et al.*, 2000; Bejsovek, 2005; Montcouquiol *et al.*, 2006; Veeman *et al.*, 2003).



**Fig 4.** Vía de señalización de Wnt no canónica. Modificada de Kuhl *et al.*, 2000.

Se ha observado la importancia de la vía de señalización no canónica, principalmente en la modulación de los movimientos celulares durante la embriogénesis (Veeman *et al.*, 2003); sin embargo, se conoce poco acerca de los posibles eventos de señalización independientes de la  $\beta$ -catenina en el mantenimiento de tejidos adultos de autorenovación, como es el caso del mantenimiento de células troncales y su posible convergencia con otras vías intracelulares de señalización, incluyendo la vía Wnt canónica. De este modo, el grado de entrecruzamiento de la ruta de señalización Wnt con otras vías de señalización celular, apenas empieza a considerarse y es, sin duda, una importante área de investigación dado el potencial de la ruta Wnt de interactuar con la actividad de otros oncogenes y la pérdida de supresores tumorales.

Debido a la posible convergencia entre PKC con una vía no canónica recientemente estudiada de Wnt, y a la reconocida participación de PKC y Wnt en eventos de carcinogénesis, hacen importante el estudio de la cinasa en un sistema biológico como el colon y el cáncer colo-rectal.

## 1.2 Proteína cinasa C

La PKC forma parte de una familia de cinasas de serina/treonina que juegan un papel clave en los procesos de transducción de señales, acopladas a receptores que inician una cascada de degradación de componentes lipídicos de membrana, para controlar importantes procesos biológicos tales como desensibilización de receptores, procesos metabólicos, neurotransmisión, regulación de la transcripción, mediación de la respuesta inmune, memoria, diferenciación celular y tumorigénesis. Desde su descubrimiento en 1977 por Yasutomi Nishizuka, la PKC ha sido el foco de atención de investigadores interesados en estudiar el cáncer, ya que no solamente es el blanco de moléculas promotoras de tumores, sino que está implicada en la activación de oncogenes, en el control de la proliferación celular, de la apoptosis y de la adhesividad celular (Nishizuka, 1995; Toker, 1998).

Los estudios de clonación molecular, así como los análisis bioquímicos, han revelado que la PKC es una familia de 12 isoformas de cinasas de serina/treonina con estrecha homología estructural en mamíferos y con enzimas homólogas en levaduras, nemátodos y en la mosca de la fruta. Estas isoformas identificadas poseen diferencias en su localización, propiedades cinéticas, especificidad de sustrato y pueden subdividirse en tres grupos: las clásicas o convencionales (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, y  $\gamma$ ) activadas por calcio, fosfolípidos (como la fosfatidilserina o PS), ésteres de forbol y diacilglicerol (DAG); las nuevas (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) activadas solamente por ésteres de forbol, DAG y fosfolípidos, aunque independientes de calcio; las atípicas (aPKC:  $\zeta$  y  $\iota$ , de la cual su homólogo en ratón se ha llamado PKC $\lambda$ ) que no responden ni a calcio ni a DAG, y además PKC $\mu$  o PKD, que tiene múltiples características que la hacen una pariente lejana de las isoformas de PKC. (Dorit & Kazanietz, 1999). Cada miembro de la familia de PKC posee diferente

modo de activación, pero todos tienen en común el requerir de fosfatidilserina (Griner & Kazanietz, 2007; Farhadi *et al.*, 2005; Newton, 2003).

Los activadores endógenos de la PKC generalmente son de naturaleza lipídica. El más importante, para las PKC convencionales y nuevas, es el 1,2-diacilglicerol (DAG), producto de la degradación del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Otros son el ácido lisofosfatídico, la lisofosfatidilcolina, algunos ácidos grasos cis-insaturados como el araquidónico y el oleico, quienes activan a la PKC en presencia de DAG. Se han mencionado a otros lípidos como la ceramida y al fosfatidil inositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) como activadores específicos de las PKC atípicas no dependientes de DAG (Griner & Kazanietz, 2007).

Los ésteres de forbol son los compuestos exógenos más comunes para activar a la PKC de modo farmacológico. De este grupo de diterpenos, el más utilizado es el TPA o llamado también PMA (forbol miristato-acetato), el cual se aisló del árbol *Croton tiglium*. El TPA, cuya actividad es tres órdenes de magnitud más potente que el DAG, se intercala rápidamente en la membrana y al unirse directamente a la PKC, la activa durante tiempos prolongados, debido a que es poco metabolizable por la célula. Un activador con una potencia igual o mayor al del TPA es la briostatina, sustancia derivada de briozoarios marinos. Un rasgo especial de la briostatina, bajo ciertas condiciones, es su capacidad de antagonizar algunos efectos biológicos del TPA. Otros compuestos exógenos análogos son resiniferotoxina, mezereína, timeleatoxina, ingenol y las DAG-lactonas. Todos ellos activan a la PKC mimetizando bioquímicamente al DAG.

### **-Estructura**

Cada isoforma de PKC es el producto de un gen separado, con excepción de PKCβI y βII, que sufren procesamiento alternativo, siendo variantes del mismo gen.

Cada isoforma de PKC consiste de una sola cadena polipeptídica con dos dominios bien definidos: el dominio regulatorio en el extremo amino y el dominio catalítico en el extremo carboxilo. La región regulatoria posee los motivos involucrados en la unión de los cofactores fosfolipídicos y el Ca<sup>2+</sup> y participa en las interacciones proteína-proteína que

regulan la actividad y localización de PKC. La región carboxilo terminal es el dominio de cinasa e incluye motivos involucrados en la unión a ATP y unión de sustrato. Los dominios regulatorios y catalíticos están conectados por una región “bisagra” que es altamente sensible a rompimiento proteolítico por proteasas celulares (Dorit & Kazanietz, 1999).

Las enzimas poseen regiones que están altamente conservadas entre las diferentes isoformas: regiones C1 a C4, y regiones variables: V1 a V5. La región C1 está presente en todas las isoformas de PKC y contiene un dominio de autoinhibición o pseudosustrato, que se une al sitio de unión del sustrato en el dominio catalítico y mantiene la enzima en un estado inactivo en la ausencia de cofactores y activadores. La secuencia de aminoácidos del pseudosustrato se asemeja al motivo de fosforilación en los sustratos de PKC, pero posee un aminoácido no fosforilable (como alanina) en vez de serina o treonina (House & Kemp, 1987).

Una característica distintiva de la región C1 es la presencia de dominios ricos en cisteína, que participan en la unión del segundo mensajero DAG y los ésteres de forbol en las PKCs clásicas y nuevas (Ono *et al.*, 1989; Burns & Bell, 1991), mientras las PKCs clásicas y nuevas tienen solo dos copias de estos motivos en tandem, sólo una copia se halla en las PKCs atípicas. Las PKCs clásicas poseen una región C2 involucrada en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  inmediata al extremo carboxilo a los dominios ricos en cisteína. Un dominio tipo C2 está presente cerca del extremo amino en las PKCs nuevas, aunque este dominio es incapaz de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  (Sossin & Schwartz, 1993).

Los dominios ricos en cisteína de la región C1 unen con gran afinidad DAG y ésteres de forbol en presencia de fosfatidil serina como cofactor, uniéndose los primeros en el mismo sitio, y teniendo un alto grado de conservación en los sitios de unión entre las diferentes isoformas (Kazanietz *et al.*, 1993). Cada uno de estos dominios ricos en cisteína requieren de un mínimo de 43 aminoácidos en el dominio para la unión de los ésteres de forbol, y poseen un motivo  $\text{HX}_{12}\text{CX}_2\text{CX}_{13/14}\text{CX}_2\text{CX}_4\text{HX}_2\text{CX}_7\text{C}$ , donde H es histidina, C es cisteína, y X es otro aminoácido. Cada dominio une fuertemente a dos átomos de  $\text{Zn}^{2+}$ , resultando en una estequiometría de 4  $\text{Zn}^{2+}$  por molécula de cPKC o nPKC (Dorit & Kazanietz, 1999).

Cada dominio rico en cisteína en PKC tiene una conformación de estructura globular, y los ésteres de forbol se unen en un surco formado por dos láminas  $\beta$ . El ligando no induce cambios significativos en la conformación del dominio rico en cisteína, pero cubre un sitio hidrofóbico al principio de la estructura formando una región hidrofóbica contigua que promueve la inserción del dominio en la bicapa lipídica (Zhang *et al.*, 1995).

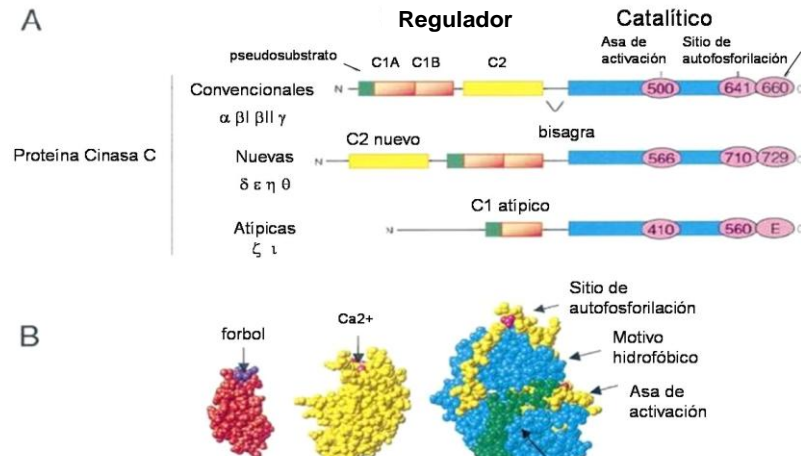
El dominio C2 en las cPKCs se encuentra inmediatamente después del extremo carboxilo del dominio rico en cisteína y es un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . A pesar de la variación en las secuencias primarias, análisis estructurales revelan que se pliega en una estructura que consiste de dos láminas  $\beta$  antiparalelas conectadas por asas con el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  localizado en una de las orillas del dominio, y tiene cinco residuos de Asp conservados involucrados en la coordinación de dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El dominio C2 actúa como un módulo de membrana, donde los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y los residuos básicos contribuyen a la unión electrostática de la membrana. En las nPKC los residuos de Asp que se requieren para la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  no están presentes, y es por eso que no cumple con esta función (Sossin & Schwartz, 1993).

El dominio catalítico de las isoformas de PKC incluye los dominios C3 y C4; el C3 posee el sitio de unión para ATP, el donador de fosfatos para la actividad fosfotransferasa; el C4 posee el sitio de unión para los sustratos. Cuando la PKC se mantiene en un estado inactivo el pseudosustrato ocupa su sitio, bloqueando la unión de los sustratos. No hay información estructural de este sitio (Dorit & Kazanietz, 1999).

El caso de la  $\text{PKC}_\mu$  y su homólogo en ratón, PKD, es especial. A pesar de ser considerada una isoforma de la familia de PKC, ésta difiere en su regulación y la selectividad de su sustrato.  $\text{PKC}_\mu/\text{PKD}$  contiene un dominio transmembranal putativo en el extremo amino, una región C1 con dos dominios ricos en cisteína que unen ésteres de forbol y DAG, un dominio homólogo de Plecstrina (PH) y no ha sido identificado un dominio pseudosustrato en esta isoforma. El dominio catalítico exhibe algún grado de similitud con los otros miembros de la familia PKC, pero está más relacionado con los dominios de cinasa de la cadena ligera de miosina, de la cinasa de *Dyctiostelium* y de la



cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina.  $\text{PKC}\mu$  no fosforila sustratos importantes de otras PKC y su localización es principalmente el aparato de Golgi (Dorit & Kazanietz, 1999).



**Figura 5.** Estructura esquemática de las isoformas de proteína cinasa C. Todas tienen una estructura de cinasa (en color cyan) y una extensión C-terminal que contiene dos sitios conservados de fosforilación: un sitio de autofosforilación y un motivo hidrofóbico. En las PKCs atípicas un residuo de glutamato ocupa la posición del fosfoceptor, Todas las isoformas tienen una secuencia de pseudosustrato (en verde) que es el extremo amino del dominio C1 (en naranja). El dominio C1 en una repetición en tandem, presente en las PKCs nuevas y convencionales, y funciona como sensor de diacilglicerol. Las PKCs atípicas tienen un dominio C1 [impaired] que no responde a los ésteres de forbol ni al DAG. Las PKCs convencionales tienen un dominio C2 (amarillo) que funciona como módulo de unión a fosfolípidos regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ , y en las nuevas PKCs no se une ni a fosfolípidos de membrana ni a  $\text{Ca}^{2+}$ . Modificado de Newton, 2003

### -Activación de la PKC

La base molecular del proceso de activación de la PKC dista mucho de ser clara en el presente y constituye un campo de estudio muy activo. Se ha demostrado que la activación de la enzima se regula por dos mecanismos distintos e igualmente importantes: por fosforilación y por la unión de moduladores positivos (segundos mensajeros). Para que pueda ocurrir el segundo mecanismo, es indispensable que la enzima haya sido previamente fosforilada. La evidencia experimental indica que la PKC recién sintetizada es convertida a su forma catalíticamente competente por transfosforilación, por una cinasa

de la PKC (denominada PDK-1), en el asa de activación localizada en su sitio activo. La incorporación de fosfato alinea correctamente a los residuos implicados en la catálisis y localiza a la enzima en el citosol. Como consecuencia de la transfosforilación, la PKC sufre una autofosforilación en su extremo carboxilo, que probablemente estabiliza la conformación catalíticamente competente. Esta forma de la enzima ahora puede ser activada por la unión de moduladores positivos, tales como el diacilglicerol, fosfolípidos ácidos de cadena larga (particularmente la fosfatidilserina), y en el caso de las isoformas convencionales de PKC, también por el calcio (Chou *et al.*, 1998; Newton, 2003).

La siguiente fase de activación es cuando esta PKC fosforilada contacta sus activadores. El efecto de los activadores contribuye a promover la afinidad de PKC por los compartimentos membranales, teniendo lugar la translocación de PKC, es decir, la enzima se redistribuye del citosol hacia las membranas. La translocación posiblemente contribuye a la activación de la cinasa, al acceso a sustratos específicos y a la degradación de la enzima (Orr & Newton, 1992).

La activación de PKC por segundos mensajeros que promueven su asociación con las membranas no parece deberse a una simple interacción de ligando entre el DAG y la molécula de PKC, por lo que varios modelos de su interacción con lípidos han sido propuestos. El modelo aceptado de la activación de PKC por lípidos indica que en la unión de DAG (o ésteres de forbol), en presencia del cofactor fosfolípido, ocurre un cambio conformacional en la enzima que remueve al pseudosustrato de su sitio de unión, y una vez removido, puede contribuir a su unión en la membrana a través de sus residuos básicos [Orr & Newton 1992; Newton, 1993]. En cuanto a la regulación de PKC por  $\text{Ca}^{2+}$  no se sabe demasiado. Un modelo indica que el  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa la afinidad de las cPKCs por los fosfolípidos aniónicos, y sugiere que las bajas concentraciones del catión promueven una interacción membranal débil, lo que se acompaña con cambios conformacionales que no son suficientes para promover la activación de la enzima. Concentraciones más altas de  $\text{Ca}^{2+}$  producen un cambio conformacional que resulta en la liberación del pseudosustrato de su sitio de unión en el dominio catalítico, llevando a la

activación de la enzima (Bazzi & Nelsestuen, 1990; Keranen & Newton, 1997; Medkova & Cho, 1998).

En estudios recientes, se ha demostrado que además de los segundos mensajeros lipídicos que regulan la activación y redistribución de PKC, existen proteínas de anclaje isozima-específicas que controlan su actividad y/o localización intracelular. Se han encontrado proteínas adaptadoras que forman complejos multienzimáticos con cinasas y/o fosfatasas que se usan en más de una vía de señalización. La presencia de motivos o módulos en las proteínas hacen posible la interacción específica entre ellas, manteniéndolas en sitios específicos en los que sólo tienen acceso a sustratos localizados en ese lugar (Mochly-Rosen, 1995). Los estudios bioquímicos, genéticos y celulares han revelado la existencia de un grupo heterogéneo de proteínas que se unen a PKC para influenciar su localización intracelular, disponibilidad de sustratos, exposición a activadores alostéricos y a su re-localización dependiente de activación dentro de la célula, lo que ha abierto un nuevo campo de investigación. Se han identificado varias proteínas que son sustrato de PKC o que interaccionan con ella por medio de distintas estrategias, como la de "overlay" o la de doble híbrido. En nuestro laboratorio, utilizando la técnica de "overlay", se identificó a calreticulina como una de las proteínas que interaccionan específicamente con PKC, en la fracción insoluble en Tritón X-100 de hepatocitos de rata, y se determinó también que es fosforilada por PKC tanto *in vitro* como *in vivo* (Rendón-Huerta *et al.*, 1999).

### **-Funciones biológicas de la PKC**

Los primeros estudios sobre la importancia biológica de la PKC se obtuvieron mediante el uso del activador TPA, aunque la dificultad, todavía vigente, es asignar una respuesta en particular a cada una de las isoformas de PKC debido a que: 1) cada célula por lo general co-expresa simultáneamente varias isoformas de PKC, 2) carencia de inhibidores isozima-específicos (aunque ya existen para alguna de ellas, no para todas) y 3) carencia de activadores isozima-específicos.

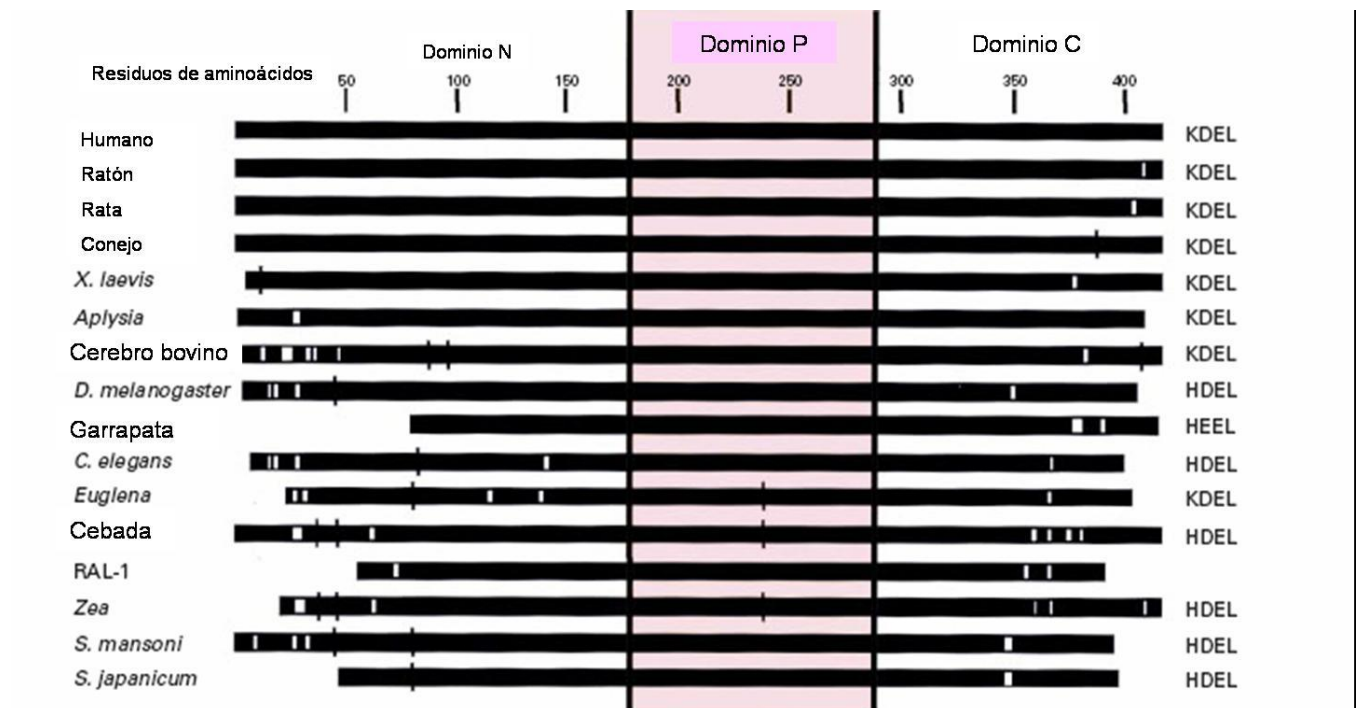
El hecho de que la PKC fosforile un amplio espectro de proteínas que incluyen canales iónicos, proteínas de citoesqueleto y numerosas enzimas, confirma el papel esencial que desempeña esta cinasa en la fisiología celular. La distribución selectiva de las isoformas de PKC, proporciona una idea aproximada de su función; además, la presencia de varias isoformas en el mismo tejido o célula, sugieren que las PKCs por separado pueden intervenir en distintas actividades celulares. Algunas de las respuestas celulares en donde participa la PKC son: la desensibilización de receptores, regulación de la transcripción, mediación de la respuesta inmune, regulación del crecimiento, proliferación celular y apoptosis, modulación de daño y reparación de la barrera intestinal, y en los procesos neuronales de memoria y aprendizaje, entre otros más (Toker, 1998; Dempsey *et al.*, 2000; Farhadi *et al.*, 2005; Harrington *et al.*, 1997 y Lucas & Sanchez-Margalet, 1995).

### 1.3 Calreticulina

En 1974 se aisló una proteína con alta afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico de músculo de ratón y se le dio el nombre de HACBP (por: high affinity calcium-binding protein) (Ostwald y MacLennan, 1974). La importancia de este hallazgo se hizo evidente cuando se reveló la presencia de la secuencia de retención de proteínas en el retículo endoplásmico KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) en el extremo carboxilo de la proteína; análisis posteriores revelaron que esta es una proteína abundante en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y que posee la propiedad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  y, debido a estas características fue renombrada calreticulina (Johnson *et al.*, 2001).

La **calreticulina (CRT)** es una proteína altamente conservada, ya que se ha encontrado en diversos organismos eucariotas -con excepción de las levaduras-, incluyendo mamíferos, insectos, nemátodos, protozoos y plantas (Michalak *et al.*, 1999). Las grandes similitudes encontradas entre calreticulinas de diversas especies, tanto en la organización genómica como en la secuencia de aminoácidos, particularmente en dominios de la proteína que son funcionalmente relevantes (Fig. 6), sugieren que participa en funciones celulares importantes. A pesar de esto, las funciones precisas de calreticulina han sido el objeto de mucho debate y hasta ahora empiezan a entenderse mejor. Esta proteína tiene diversas funciones, la más conocida es en la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  por su

capacidad de almacenamiento de este catión en el retículo endoplásmico. La calreticulina se ha caracterizado como una chaperona esencial en este organelo, como lectina extracelular, mediador intracelular de la acción de integrinas en la adhesividad celular, inhibidor de la expresión génica regulada por hormonas esteroides, supresor tumoral, y muy recientemente como regulador de las acciones de p53. Sin embargo, no se conocen con precisión los mecanismos moleculares mediante los cuales la CRT lleva a cabo esta amplia variedad de funciones (Michalak *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2001).

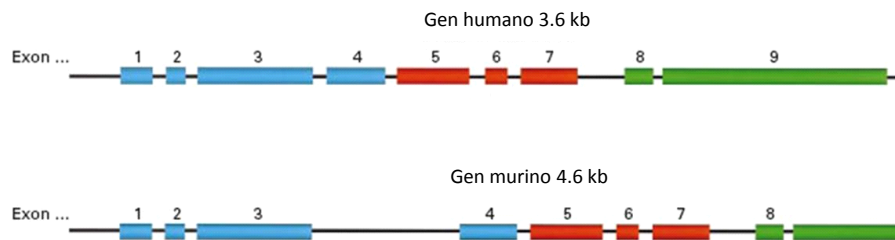


**Fig. 6** .Dominios de la calreticulina en diversos organismos. Se puede observar una marcada conservación, principalmente en el dominio P de la proteína. Las regiones blancas en las barras negras representan huecos en la secuencia de aminoácidos. Las líneas verticales cortas en las barras negras representan zonas no apareadas. La localización del dominio P está sombreada en rosa. Modificado de Michalak 1999.

### -Estructura

La proteína está codificada por un solo gen, y solamente se ha identificado una especie de RNAm de 1.9 kb que codifica para calreticulina, y no hay evidencia de procesamiento alternativo del mismo (McCauliffe *et al.*, 1992).

El gen de la calreticulina consiste de 9 exones y 10 intrones, que ocupan aproximadamente 3±6 kb o 4±6 kb de DNA genómico de humano o de ratón, respectivamente. En el humano el gen de calreticulina está localizado en el cromosoma 19, locus p13.3-p13.2 y el gen homólogo en los ratones se encuentra en el cromosoma 8. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos entre el gen del ratón y el de humano muestra una homología mayor al 70%, con una organización exon-intron casi idéntica (Fig.7), con la excepción de los intrones 3 y 6, lo que indica una alta conservación del gen. En el gen del ratón estos intrones son aproximadamente dos veces el tamaño de los intrones correspondientes en el gene humano (McCauliffe *et al.*, 1992; Rooke *et al.*, 1997).



**Fig. 7.** Representación esquemática de la configuración genómica del gen de calreticulina tanto humano como de ratón, el RNAm de calreticulina, y la estructura de los dominios de la proteína. Las predicciones estructurales para la calreticulina sugieren que la proteína tiene al menos tres dominios estructurales y funcionales. Los exones que codifican para el dominio-N (incluyendo la secuencia señal N- terminal), el dominio-P y el dominio-C están en azul, rojo y verde, respectivamente. Calreticulina contiene una secuencia señal aminoácido N-terminal (caja negra) y una señal de retención de proteínas en el retículo endoplásmico KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) en el extremo C-terminal. Se indica la localización de tres residuos de cisteína y el puente disulfuro en el dominio N. Las flechas indican la localización de sitios potenciales de glicosilación (residuos 162 y 327). Las repeticiones A (secuencia de aminoácidos PXXIXDPDAXKPEDWDE) y B (secuencia de aminoácidos GXWPPXIXNPXYX) están indicadas con triángulos púrpuras y cuadrados púrpuras respectivamente. Modificado de Michalak 1999.

El promotor de los genes de calreticulina en humano y ratón contiene varios sitios probables de regulación, incluyendo los sitios AP-1 y AP-2, áreas ricas en GC, incluyendo un sitio Sp1, un sitio H4TF-1 y cuatro secuencias CCAAT. Las secuencias de reconocimiento AP-2 y H4TF-1 se encuentran típicamente en genes que están activos durante la proliferación celular. También muchas secuencias poli(G), incluyendo motivos GGGNNGGG, se han encontrado en la región promotora de la calreticulina y de otras proteínas tanto del retículo endoplásmico, como sarcoplásmico (Michalak *et al.*, 1999). Dichos motivos pueden tener un papel en la expresión de proteínas del lumen del retículo endoplásmico, como en la activación del gene de la calreticulina dependiente de estrés.(Waser *et al.*, 1997).

Varios factores inducen la transcripción del gen de la calreticulina, como son: la falta de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y choque térmico. La expresión de la calreticulina es también inducida por infección viral, falta de aminoácidos, y en células T citotóxicas estimuladas, lo cual indica que el gen de la calreticulina es activado por una variedad de estrés químico y biológico (Andrin *et al.*, 1998; Michalak *et al.*, 1999; Gelebart *et al.*, 2005 y Johnson *et al.*, 2001).

La proteína humana consiste de una secuencia señal de 17 residuos hidrofóbicos en el extremo N terminal, que constituyen el péptido señal para insertarse al retículo endoplásmico, seguida de 400 aminoácidos de la proteína madura y con un peso de 46 kDa. Los últimos residuos (KDEL) en el extremo C terminal constituyen la secuencia de retención de retículo (Fliegel *et al.*, 1989). La proteína tiene tres residuos de cisteína, los cuales están localizados en el dominio N de la proteína. Dos de ellos forman un puente disulfuro (Cys<sup>120</sup> y Cys<sup>146</sup>), lo cual puede ser importante para el plegamiento adecuado de la región terminal N de calreticulina (Matsuoka *et al.*, 1994).

Con base en el análisis de la secuencia primaria de la proteína se ha dividido en tres dominios funcionales y estructurales (Fig. 8). El **dominio N** (residuos 1-180) se predice que forma una estructura globular altamente plegada que comprende ocho láminas  $\beta$  conectadas por asas de proteína. Esta región de la proteína se une a metales pesados ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e interacciona *in vitro* con otras chaperonas del RE. El dominio N, junto con el dominio P-central de la calreticulina es responsable de la función de chaperona de la

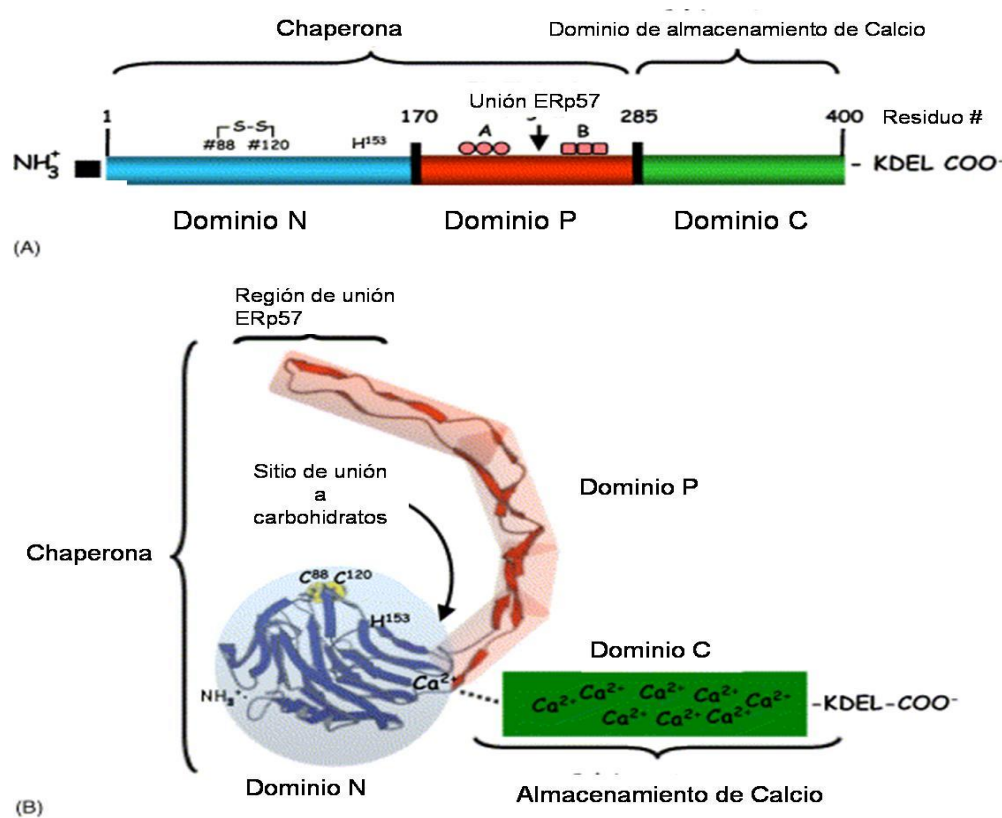
proteína; un simple cambio en un residuo de histidina del dominio N destruye esta función. En este dominio se localiza uno de los dos sitios potenciales de glicosilación (residuo 162) aunque, dependiendo de la especie pueden ser uno o más sitios potenciales (Gelebart *et al.*, 2005).

El **dominio P** de la calreticulina (residuos 181-290) contiene una región rica en prolina, la cual forma una estructura de brazo extendido e interacciona con otras chaperonas en el lumen del RE. Dicha estructura se predice que se curva, formando una abertura en la cual se acomoda el sustrato para unirse, e incluye un sitio de unión de carbohidratos (Schrag *et al.*, 2001). Este dominio consiste de tres hélices cortas: seis láminas  $\beta$  arregladas en tres hojas  $\beta$ -plegadas antiparalelas. Contiene tres repeticiones de la secuencia aminoácida PXXIXDPDAXKPEDWDE, seguida de tres repeticiones de la secuencia GXWXPPXIXNPXYX. Dichas repeticiones son esenciales para la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad ( $K_d=1\mu\text{M}$ ) y son importantes para la actividad de chaperona lectina.

El dominio P de la calreticulina interacciona además con la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y con la perforina, un componente de los gránulos de las células T citotóxicas (Michalak *et al.*, 1999; Gelebart *et al.*, 2005).

El **dominio C** (residuos 291-400) es altamente ácido debido a la presencia de múltiples residuos de ácido aspártico y ácido glutámico que le permiten unir al  $\text{Ca}^+$  con baja afinidad ( $K_d= 2 \text{ mM}$ ), pero con alta capacidad (20-30 mol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol proteína), lo cual sugiere que participa en el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE (Nakamura *et al.*, 2001). Adicionalmente, este dominio contiene la secuencia de retención de proteínas en el retículo endoplásmico KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) y en él se localiza el segundo sitio potencial de glicosilación (residuo de Asparagina 327). La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  en este dominio participa en la regulación de la interacción de calreticulina con otras proteínas del retículo endoplásmico, tales como PDI, ERp57 y tal vez otras chaperonas. Hasta ahora no hay información estructural de este dominio (Gelebart *et al.*, 2005).





**Figura 8.** Representación lineal de los dominios de calreticulina en [A]. La proteína contiene una secuencia señal de aminoácidos en el extremo N-terminal (caja negra) y una secuencia de retención de retículo KDEL en el extremo C terminal. Las repeticiones A (secuencia de aminoácidos PxxlxDPDAxKPEDWDE) y B (secuencia de aminoácidos GxWxPPxIxNPxYx) se indican por círculos y cuadrados, respectivamente. [B] Modelo 3D de los dominios N y P de la calreticulina basados en estudios de RMN [Ellgaard *et al.*, 2001] y estudios de cristalografía de calnexina [IJHN] [Schrage *et al.*, 2001]. El dominio globular N (en azul), y centralmente tiene al dominio P rico en prolina (en rojo) que forma un asa característica. Los dominios N + P de la calreticulina son responsables de la función de chaperona de la proteína. El dominio C-terminal del dominio C contiene un gran número de aminoácidos negativamente cargados y está implicado en una alta capacidad de almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los círculos amarillos representan la cisteína (Cys88 y Cys120), que forma un enlace disulfuro C-C en calreticulina. La localización de una His153 y un sitio putativo de unión a carbohidratos están indicados. El sitio de unión a ERp57 también está indicado (Ellgaard *et al.*, 2002). Modificado de Gelebart, 2005.

### -Localización celular

La calreticulina se identificó originalmente como una proteína de membrana de RE/RS, y numerosos estudios confirmaron la localización de la proteína en dicho organelo en muy diversas especies, incluyendo plantas. Sin embargo, a pesar de ser conocida como una proteína de RE, también se ha reportado en una gran variedad de sitios celulares y ha sido localizada también en los gránulos citoplásmicos de las células T citotóxicas, en los acrosomas de espermias, en la superficie celular, en el núcleo, en el citoplasma y puede

ser secretada a la corriente sanguínea. (Johnson *et al.*, 2001; Kuwabara, *et al.*, 1995, Roderick *et al.*, 1997, Paschal *et al.*, 2005). Dicha localización es posible, a pesar de poseer un péptido señal que la dirige al lumen del RE, ya que se ha demostrado la existencia de retrotranslocación de calreticulina del retículo al citoplasma por varios grupos de investigación (Paschal *et al.*, 2005).

### **-Funciones**

En muchas y variadas funciones celulares se ha observado la participación de la calreticulina, entre ellas la regulación y homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , actividad de chaperona lectina (Johnson *et al.*, 2001), efectos anti-trombóticos en la superficie celular, (Kuwabara, *et al.*, 1995), modulación de la expresión génica, modulación de la adhesión celular (Gelebart *et al.*, 2005), interacciona *in vitro* con el dominio de unión a DNA del receptor de glucocorticoides (Burns *et al.*, 1994) y modula a p53 (Mesaeli, *et al.*, 2004).

Muchas de estas funciones se le atribuyen directamente a la conformación de sus dominios y a la especialización de algunos de ellos. A continuación se muestra un cuadro que resume las funciones putativas de los dominios de la calreticulina que se han descubierto. Se especifican algunas características estructurales, sus funciones, si tienen unión a iones y si tienen unión a moléculas:

<b>Funciones putativas de los dominios de calreticulina</b>		
a) Características estructurales y funciones		
<b>Dominio N</b>	<b>Dominio P</b>	<b>Dominio C</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Seguido por la secuencia N-terminal que dirige a la proteína al lumen del RE</li> <li>-Secuencia de aminoácidos altamente conservada</li> <li>-Sitio potencial de fosforilación</li> <li>-Sitio potencial de glicosilación</li> <li>-Actividad putativa de autocinasa</li> <li>-Inhibe la actividad de PDI</li> <li>-Supresor de tumores</li> <li>-Inhibe angiogénesis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Dominio rico en prolinas</li> <li>-Secuencia de aminoácidos similar a calnexina, calmegina, y CANLUC</li> <li>-Sitio putativo de glicosilación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rico en aminoácidos ácidos</li> <li>-Señal de recuperación de RE</li> <li>-sitio putativo de glicosilación</li> <li>-actividad antitrombótica</li> <li>-Previene restenosis</li> <li>-Sensor de Ca<sup>2+</sup></li> </ul>
b) Unión a iones		
Se une a Zn <sup>2+</sup>	-Sitio de unión con alta afinidad a Ca <sup>2+</sup> y baja capacidad	-Sitio de unión con alta capacidad a Ca <sup>2+</sup>
c) Unión a moléculas		
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se une al dominio de unión a DNA del receptor esteroide</li> <li>-Se une a la subunidad <math>\alpha</math> de las integrinas</li> <li>-Se une al RNA de rubella</li> <li>-Interactúa con PDI</li> <li>-Interactúa con ERp57</li> <li>-Interacciones débiles con perforina</li> <li>-interacciona <i>in vitro</i> con el dominio de unión a DNA del receptor de glucocorticoides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se une a una serie de proteínas de RE</li> <li>-Se une fuertemente a PDI</li> <li>-Se une fuertemente con perforina</li> <li>-Sitio de chaperona tipo lectina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se une a varias proteínas de RE</li> <li>-Se une al Factor IX y Factor X</li> <li>-Se une a la superficie celular</li> </ul>

**Tabla 1.** Funciones putativas de los dominios en los que se divide la calreticulina. Modificado de Gelebart 2005

Las dos funciones mejor conocidas de la calreticulina son: su actividad de chaperona y la de modular la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>. Su función como chaperona molecular evita la agregación de proteínas parcialmente plegadas, incrementa la producción de proteínas con un plegamiento y ensamblaje adecuado e incrementa la proporción de intermediarios correctamente plegados, con la ayuda de otras enzimas de plegamiento. Con respecto a esta función, se sabe que la calreticulina se une a los oligosacáridos monoglucosilados con manosa (Glc<sub>1</sub>, Man<sub>9</sub>, GlcNAC<sub>2</sub>) y reconoce la glucosa terminal y cuatro manosas internas en las glicoproteínas recién sintetizadas (Gelebart *et al.*, 2005). Para realizar esta función de chaperona, se asocia a la calnexina (una proteína chaperona integral de la membrana del RE que es similar a la calreticulina), y participa con la proteína disulfuro

isomerasa (PDI, una thiol reductasa del lumen del RE) y con ERp57 (una proteína de tipo PDI residente en el RE), formando el llamado “ciclo calreticulina/calnexina” que es responsable del control de calidad y el plegamiento en las (glico)proteínas recién sintetizadas (Zapun *et al.*, 1998).

El retículo endoplásmico (RE) es un almacén intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  con una función relevante en el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, siendo calreticulina parte importante para tal regulación. La gran capacidad que tiene el retículo endoplásmico de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  puede deberse, en parte, a la presencia de proteínas chaperonas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (Nash *et al.*, 1994) como la calreticulina, la proteína disulfuro isomerasa, la calcistorina. La reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del retículo endoplásmico conduce a la acumulación de proteínas mal plegadas, bloquea el transporte de moléculas a través de los poros nucleares y afecta las funciones de las chaperonas. John *et al* han propuesto que el extremo C terminal de una isoforma de SERCA puede estar glicosilada *in vivo* y que calreticulina modula la actividad de esta bomba, interactuando directamente con este segmento glicosilado. En condiciones de bajo almacenaje de  $\text{Ca}^{2+}$ , calreticulina no interactúa con SERCA, y la APTasa tiene una actividad enzimática máxima para recargar el almacenamiento, mientras que en condiciones de gran almacenaje de  $\text{Ca}^{2+}$ , calreticulina se podría unir al extremo carboxilo de SERCA, resultando en el decremento de su actividad.

Estas funciones se han estudiado en ratones y en otros sistemas en los que se han observado los efectos por sobre-expresión de calreticulina o de la deficiencia de expresión de ésta (Tabla 2). La deficiencia de calreticulina es letal en el desarrollo embrionario; esto resulta del desarrollo cardíaco alterado y de problemas en las vías transcripcionales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . En cuanto a su papel en la adhesividad celular, se ha demostrado que la sobre-expresión de calreticulina produce un incremento en la adhesividad celular y de contactos focales como resultado del incremento en la síntesis de fibronectina, de N-cadherina y de vinculina, así como un efecto drástico en los niveles celulares de fosfotirosina (Michalak *et al.*, 1999). También hay estudios que han comprobado que calreticulina se une *in vitro* a una región de residuos de aminoácidos del extremo

carboxilo de la subunidad alfa de las integrinas, proponiendo que puede modular su función (Dehdar, 1999, 1994; Coppolino, 1997; Michalak *et al.*, 1999).

**Tabla 2. Efectos de la expresión celular alterada de calreticulina.**

<b>Sobre-expresión de calreticulina</b>
Incremento de la capacidad de almacenamiento de $Ca^{2+}$ en el retículo endoplásmico.
Modulación de la adhesividad celular.
Modulación de la entrada de $Ca^{2+}$
Sensibilidad incrementada a apoptosis
Modulación negativa de expresión de genes sensibles a esteroides
Aparición de calreticulina en la superficie celular
Modulación de la función de la ATPasa de $Ca^{2+}$ (SERCA)
<b>Deficiencia de calreticulina</b>
Letal en embriones al día 14
Disminución del desarrollo cardíaco
Cambios en adhesividad celular
Incremento en la resistencia a apoptosis
Acumulación de proteínas mal plegadas
Modulación de transcripción dependiente de $Ca^{2+}$
Inhibición de la liberación de los agonistas $Ca^{2+}$ -dependientes de los almacenamientos del RE

El papel de la calreticulina en la superficie celular no es muy claro. Se ha demostrado que la calreticulina se une a proteínas de fibrinógeno y de matriz extracelular (Gray *et al.*, 1995). Se ha reportado que la calreticulina en la superficie celular puede formar complejos con las integrinas (Zhu *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000). Otro papel importante para la calreticulina en la adhesión celular, es el hecho de que la proteína completa o fragmentos de ella inhiben la angiogénesis y suprimen el crecimiento de tumores, ya que la calreticulina específicamente inhibe la proliferación de células endoteliales (Molina *et al.*, 2005; Pike *et al.*, 1999).

De la calreticulina presente en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos se ha propuesto que evita que la perforina forme poros en la membrana del gránulo, ya sea quelando  $Ca^{2+}$  o por interacción directa con la perforina (Andrin *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que juega un papel más activo, al prevenir la autólisis del linfocito uniéndose directamente a la superficie celular (Fraser *et al.*, 2000).

Estudios recientes también demuestran que la proteína calreticulina es importante para la adecuada estabilización y localización de la proteína p53, ya que los niveles de calreticulina afectan de forma importante la degradación y localización nuclear de esta proteína supresora de tumores (Mesaeli *et al.*, 2004).

#### **1.4 Proteína cinasa C, calreticulina y cáncer**

Como se mencionó anteriormente, el papel que juega la PKC en el cáncer es un tema que se ha estudiado extensamente. Diversos estudios indican que los niveles de expresión de sus diferentes isoformas en las células malignas generalmente se encuentran alterados, ya sea sobreexpresando o suprimiendo alguna isoforma de PKC. La importancia de esta cinasa se acentúa si se toma en cuenta la reciente información de la vía no canónica de Wnt, en la cual la PKC es activada por el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y el diacilglicerol producido por la activación de PLC (Kuhl *et al.*, 2000).

En cuanto a la relación de calreticulina con el cáncer, ésta no es muy clara. A pesar de que se ha reportado que en muchos cánceres humanos se sobre-expresa calreticulina (Nakamura *et al.*, 2000; Sarvaiya *et al.*, 2006; Alfonso *et al.*, 2005; Jazii *et al.*, 2006; Ramsamooj *et al.*, 2005; Brünagel *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2002), no se conoce exactamente cuál es su participación en el proceso de carcinogénesis, ni el por qué de su ubicación. Una posible correlación puede intuirse en la antes mencionada vía no canónica Wnt dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que a su vez activa a PKC, debido a que recientemente se demostró la interacción de CRT con PKC (Rendón-Huerta *et al.*, 1999), pues hay que recordar que además de la unión a lípidos, PKC puede interactuar con proteínas directamente, vía un sitio de unión de no sustrato (Dorit & Kazanietz, 1999), lo que influye en la localización y función de las isoformas de PKC.

Se ha encontrado que la calreticulina es fosforilada por la PKC tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha visto también por mutagénesis dirigida que las modificaciones postraduccionales de la calreticulina son importantes para su interacción con PKC (Robles-Flores *et al.*, datos no publicados). Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál es la importancia fisiológica de la interacción calreticulina-PKC, ni los niveles de expresión que tienen en los diversos sistemas biológicos.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Existe evidencia que señala a PKC y calreticulina como participantes en el proceso de carcinogénesis. Es por esto que al identificar las diferencias básicas de expresión de isoformas de PKC y de expresión de calreticulina (CRT) entre células normales y malignas de colon se sientan las bases para estudiar la participación de estas proteínas en el proceso de generación y/o mantenimiento del estado canceroso en estas células.

## **3. HIPÓTESIS**

Al estudiar los patrones de expresión de PKC, de expresión y localización de la CRT en células normales (colon o hepatocitos) y compararlos con los de células de carcinoma de colon, podremos encontrar diferencias relevantes de su expresión entre el estado normal y el canceroso.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un estudio comparativo de la expresión y localización de la proteína calreticulina (CRT), así como un estudio comparativo de la expresión de isoformas de la proteína cinasa C en células normales y tumorales de colon humano.

### **4.1 Objetivos específicos:**

1. Analizar la expresión de calreticulina en células normales y cancerosas de colon por la técnica de Western Blot en compartimentos celulares, como núcleo y citoplasma.
2. Examinar la localización de calreticulina por inmunofluorescencia y microscopía confocal tanto en células normales como en cancerosas de colon.
3. Analizar la expresión de isoformas de PKC en extractos totales de células normales y cancerosas por la técnica de Western Blot.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Líneas celulares utilizadas y su mantenimiento.

A continuación una tabla que resume las principales características de las células utilizadas (Tabla 3).

CCD-112CoN	<p>Organismo: <i>Homo sapiens</i> (humano)  Morfología: fibroblasto  Característica de crecimiento: adherente  Órgano: colon  Enfermedad: estado normal  Características del organismo: 22 semanas de gestación; femenino</p>
RKO	<p>Organismo: <i>Homo sapiens</i> (humano)  Morfología: epitelial  Órgano: colon  Enfermedad: carcinoma  Característica de crecimiento: adherente  RKO es una línea de carcinoma de colon pobremente diferenciada, desarrollada por Michael Brattain.  Las células RKO tienen p53 silvestre, pero no cuentan con el receptor humano tiroideo nuclear endógeno (h-TRbeta1).  Tumorigenicidad: Sí, en ratones desnudos y en agar blando</p>
HT-29	<p>Organismo: <i>Homo sapiens</i> (humano)  Morfología: epitelial  Órgano: colon  Enfermedad: adenocarcinoma colo-rectal  Características del organismo: 44 años; femenino; caucásico.  Característica de crecimiento: adherente  Productos celulares: antígeno carcinoembrionario (CEA); factor de crecimiento transformante beta (TGFβ); mucina.  Fecha de aislación: la línea celular fue aislada de un tumor primario en 1964 por J. Fogh, usando el método de cultivo por explante.  Susceptibilidad a virus: a virus de inmunodeficiencia humana (VIH, LAV)  Las células HT-29 son negativas para CD4; positivas para la expresión de los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis y fos. La proteína p53 está sobreexpresada y tiene una mutación de G → A en el codón 273 del gen, lo que resulta en una sustitución de Arg → His.  Tumorigenicidad: Sí, en ratones desnudos; forma adenocarcinomas bien diferenciados, consistentes con tumores primarios colónicos (grado 1).</p>
Hep G2	<p>Organismo: <i>Homo sapiens</i> (humano)  Morfología: epitelial  Órgano: hígado  Enfermedad: carcinoma hepatocelular  Características del organismo: 15 años; masculino; caucásico  Productos celulares: alfa-fetoproteína; macroglobulina alfa2; antitripsina alfa1; ceruloplasmina; plasminógeno; C4; activador C3; fibrinógeno; lipoproteína beta; proteína de unión a retinol.  Receptores: insulina; IGF II  Tumorigenicidad: No, en ratones inmunosuprimidos; sí, en medio semisólido.</p>
C9	<p>Organismo: Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)  Morfología: epitelial  Característica de crecimiento: adherente  Órgano: hígado  Enfermedad: estado normal  Producen ácido araquidónico, prostaglandinas I2, E2 and F2 alpha.</p>

**Tabla 3.** Líneas celulares utilizadas y sus características. Información tomada del American Type Culture Collection (ATCC) (107)



Se cultivaron en cajas petri células humanas fetales normales de colon CCD-112CoN, células cancerosas de colon humano RKO (carcinoma), HT-29 (adenocarcinoma), hepatocitos cancerosos de humano Hep G2 (carcinoma hepatocelular) y hepatocitos normales de rata C9 adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC) (Tabla 3). Las células RKO y 112CoN se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Las células HT-29 se mantuvieron en medio McKoy con 10% de suero fetal bovino, con 1% de antibióticos y glutamina. La línea celular HepG2, de carcinoma hepatocelular y morfología epitelial, se cultivó con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 1% de antibióticos y glutamina. Todas las células se mantuvieron a una temperatura de 37°, en una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>, y se mantuvieron en crecimiento hasta que alcanzaran de un 80% a un 90% de confluencia.

## **5.2 Obtención de núcleos a partir de cultivos celulares**

Para los ensayos de CRT las células [112CoN, HT-29, RKO, HepG2, HT29] se lisaron separando la fracción citoplásmica y la nuclear; la fracción nuclear se obtuvo utilizando el Nuclei EZ prep. Nuclei Isolation Kit (de SIGMA, NUC-101) siguiendo el protocolo sugerido. Esto es, una vez que las células llegaron a confluencia se les retiró el medio, se lavaron con PBS, y se les agregó 1ml de solución del Nuclei EZ Lysis Buffer. Se raspó la monocapa celular y el lisado obtenido se agitó en vórtex, y se incubó en hielo por 5 minutos. La muestra se centrifugó a 8274 xg por 5 minutos para obtener la *fracción citoplásmica*. A la fracción nuclear se le resuspendió con 1ml de Nuclei EZ Lysis Buffer y se volvió a centrifugar, para así obtener la fracción nuclear limpia. A esta fracción se le agregaron 100µl de Nuclei EZ Storage Buffer, se observó al microscopio y se almacenó la muestra a -20°C hasta su posterior uso.

## **5.3 Lisis de núcleos.**

Se centrifugó (a 7426 xg) la muestra de la fracción nuclear para extraer el Nuclei EZ Storage Buffer y se agregaron 200µl de buffer de lisis de núcleos (20mM HEPES, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA a 7.9 pH para el stock; añadidos al momento de usarse: 20mM β- mercaptoetanol, 1mM PMSF, 0.5 Tritón X-100, tripsina, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 11 mM NaF,

10 µg/ml Leupeptina) frío al pellet para resuspender. Se dejó en agitación a 4° C por 15 min y después se centrifugó a 8274 xg por 5 min a 4° C.

#### **5.4 Obtención de extractos protéicos totales**

Para ensayos de western blot de PKC la células (112CoN, HT-29 y RKO) se lisaron con buffer de homogenización (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM pH 7.5 Tritón X-100 0.5% inhibidor de tripsina 0.1 mg/mL, Leupeptina 10 µg/mL PMSF 1 mM). Los lisados se clarificaron por centrifugación a 13201 xg durante 10 minutos a 4°C, del sobrenadante se obtuvo una alícuota (30µl) para la determinación de proteína y el resto del homogenado se diluyó con buffer de muestra Laemmli y se guardó a 4°C.

#### **5.5 Cuantificación de proteína.**

Del sobrenadante de cada una de las fracciones y de los extractos totales a analizar se extrajeron alícuotas para determinación de proteína, realizada por el método de Bradford con reactivo comercial adquirido de Bio-Rad. Se utilizó una dilución 1:100 de los extractos de proteína y fueron leídos a una D. O. de 595nm.

#### **5.6 Electroforesis e Inmunoblot.**

Cantidades equivalentes de proteína (50 µg) de los extractos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, por duplicado (un gel para tinción con azul de Coomasie y otro para el Western Blot). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave, en una solución de leche libre de grasa (BioRad) al 5% en TBS. Los blots fueron lavados con TBS-Tween dos veces por 5 min. Después fueron incubados con anticuerpos primarios para los correspondientes ensayos: policlonal anti CRT H170 y policlonal anti PKC de cada una de las isoformas estudiadas (todos de Santa Cruz Biotechnology), diluidos en TBS-Tween a una concentración de 1:1000 a 4°C toda la noche. Se lavaron 3 veces y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (PIERCE, Goat antirabbit) a una concentración 1: 5000. Después de lavarse e incubarse con la solución de la reacción por quimioluminiscencia (Pierce Supersignal), las bandas fueron detectadas por exposición en placas de autorradiografía. Como control de carga se utilizó la proteína actina, para lo cual las membranas fueron

lavadas (con stripping buffer), bloqueadas con una solución de leche (BioRad) al 5% en TBS, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo de ratón monoclonal anti-actina (proporcionado por Dr. Lorenza González-Mariscal, CINVESTAV), revelándose también por quimioluminiscencia.

La intensidad de las señales se analizó por densitometría mediante un programa adquirido de Bio-Rad (Quantity one). Los datos de al menos tres experimentos independientes se compararon, tomando como dato base la densidad obtenida en las células normales y comparando con las densidades de las células malignas dándoles unidades arbitrarias, en las cuales la normalización se tomó como 1.

### **5.7 Ensayos de inmunofluorescencia y DAPI seguida de microscopía confocal.**

Las células se crecieron en cubreobjetos previamente tratados con Histogrip (Zymed), a un 90% de confluencia. Luego de 3 lavados con PBS se fijaron con metanol absoluto durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las células se volvieron a lavar tres veces con PBS y se procedió a su permeabilización con Tritón X-100, 0.4% en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Se hicieron los lavados de la misma forma con PBS y el bloqueo de las células se hizo con BSA, libre de IgG al 0.5% en PBS por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente la monocapa de células se dejó con el anticuerpo primario (H170, Sta. Cruz Biotechnology) toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron con una dilución 1:100 de anticuerpos secundarios acoplados a FITC anti-conejo (Jackson) durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Las células se lavaron 3 veces con PBS y una vez al final con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada antes de montarse en portaobjetos con Anti fade (Bio Rad). En el caso de las muestras que se procesaron con DAPI se realizó una dilución 1:1000, se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se le agregó el Anti fade (Bio Rad) para ser montadas.

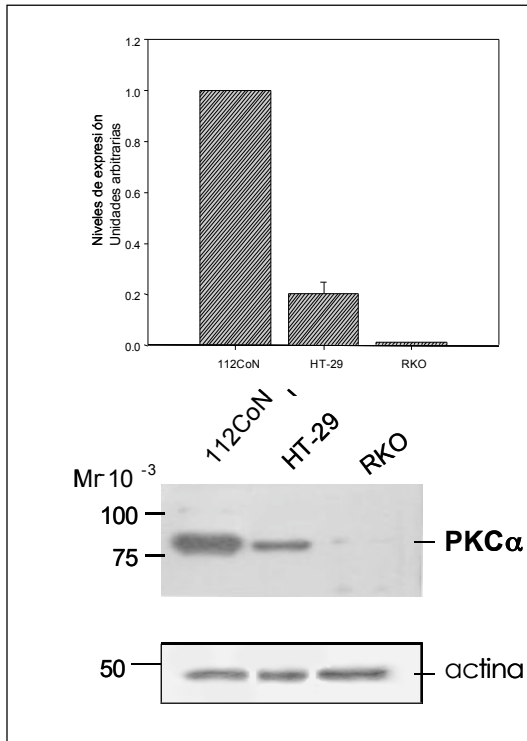
Se examinó la fluorescencia de las células con un microscopio confocal y se fotografiaron a un aumento de 60X.

## 6. RESULTADOS

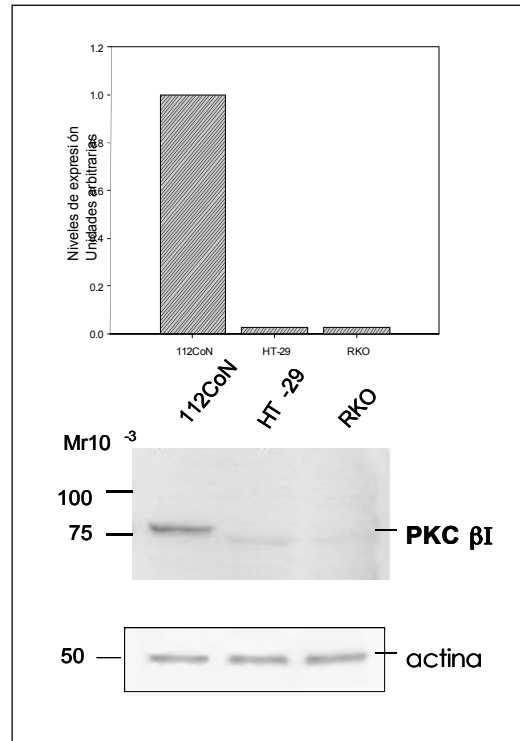
### -Expresión de ocho isoformas de PKC en líneas celulares de colon

Con el propósito de conocer la expresión de las isoformas de PKC presentes en colon humano, y si había diferencias en el patrón de expresión de isoformas de PKC entre el estado normal y el maligno, se realizaron ensayos de Western blot en las líneas celulares normales 112-CoN y en las malignas RKO y HT-29. El análisis de expresión de ocho isoformas de PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\eta$  y  $\zeta$ ) por Western blot (Figuras 8-15) mostraron que en el colon normal se expresan todas las isoformas convencionales, nuevas y atípicas probadas, excepto la isoforma PKC $\eta$ . Interesantemente, y en concordancia con los reportes para algunas isoformas, encontramos también que existen cambios de expresión muy marcados en las isoformas de PKC en las células tumorales con respecto a las normales, como puede observarse en la Tabla 3, en la que se presenta la cuantificación densitométrica utilizando el programa *Quantity one* (normalizada con respecto al control) de los resultados obtenidos para cada isoforma de por lo menos 4 experimentos independientes. En esta tabla, se indican con color rojo las isoformas que bajan su expresión con respecto a las normales, y en azul las que aumentan su expresión. Como puede apreciarse, los colonocitos humanos normales expresan mayoritariamente las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\delta$  de PKC. Las líneas celulares malignas sobre-expresan las isoformas  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\mu$ , y  $\zeta$ , mientras que las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I, y  $\delta$  disminuyen o dejan de expresarse en relación a las células normales. Adicionalmente, solamente las líneas de carcinoma de colon expresan la isoforma  $\eta$  (ver Tabla 4).

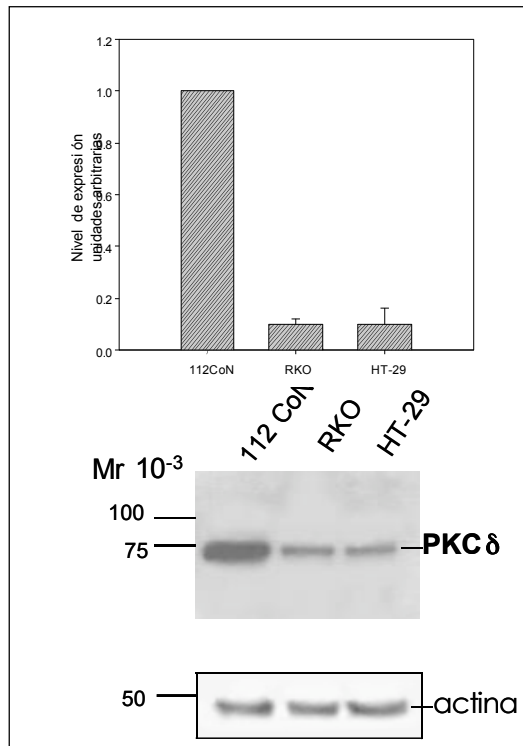
Los Western blot correspondientes a cada una de estas isoformas se muestran en las figuras 9 a la 16, y en la gráfica 1 se presenta el resumen de la abundancia de las diferentes isoformas encontradas en las líneas celulares 112CoN, HT29 y RKO.



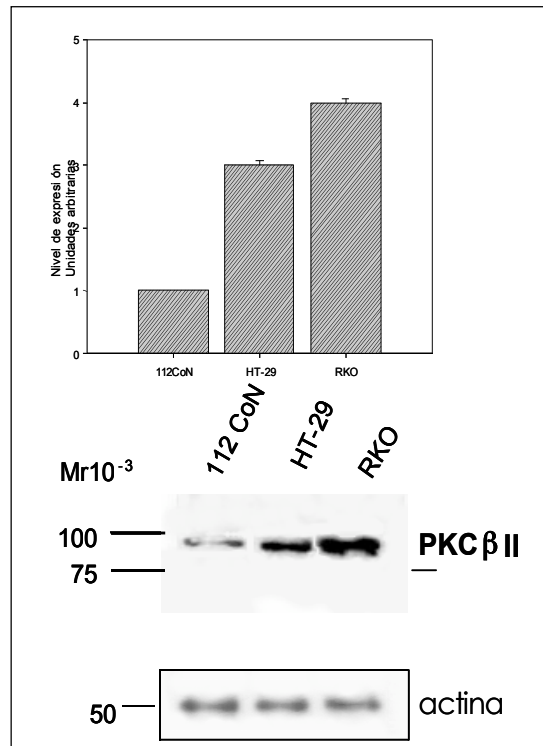
**Fig 9.** Western blot y gráfica de PKC $\alpha$ . Se observa un decremento en la expresión en las células HT-29 y ausencia de expresión en las células RKO, en comparación con las normales. Actina como control de carga.



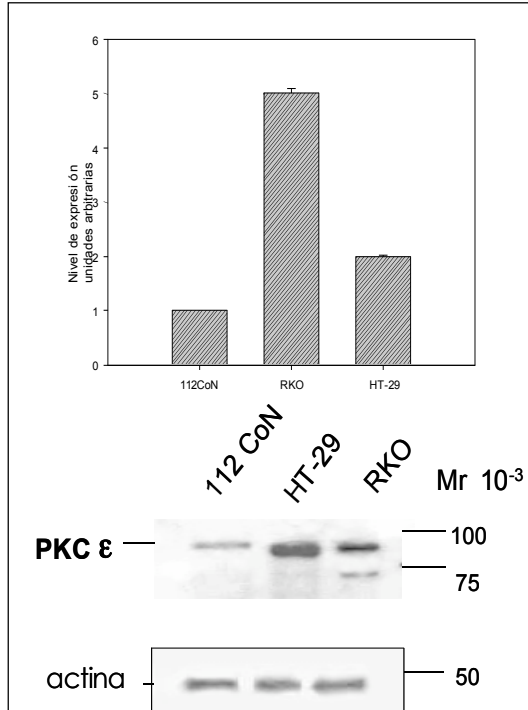
**Fig 10.** Western blot y gráfica de PKC $\beta$ I. Se observa ausencia de expresión en las células malignas, con respecto a las normales. Actina como control de carga.



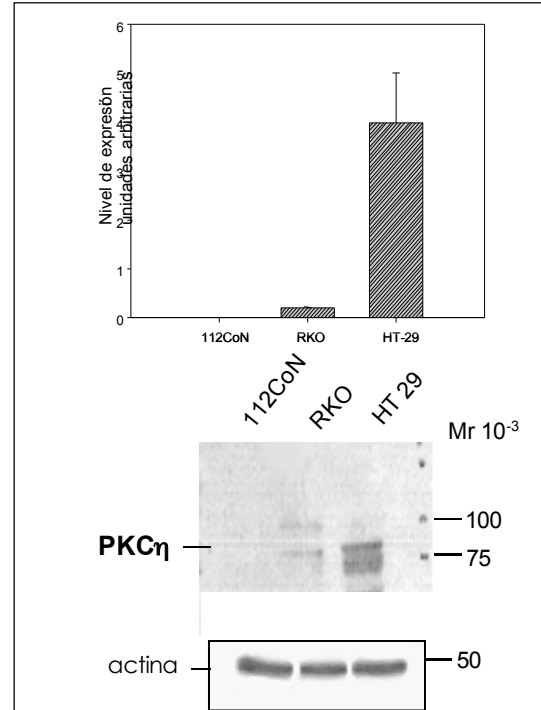
**Fig 11.** Western blot de PKC $\delta$  delta. Se observa una disminución de expresión en las células malignas con respecto a las normales. Actina como control de carga.



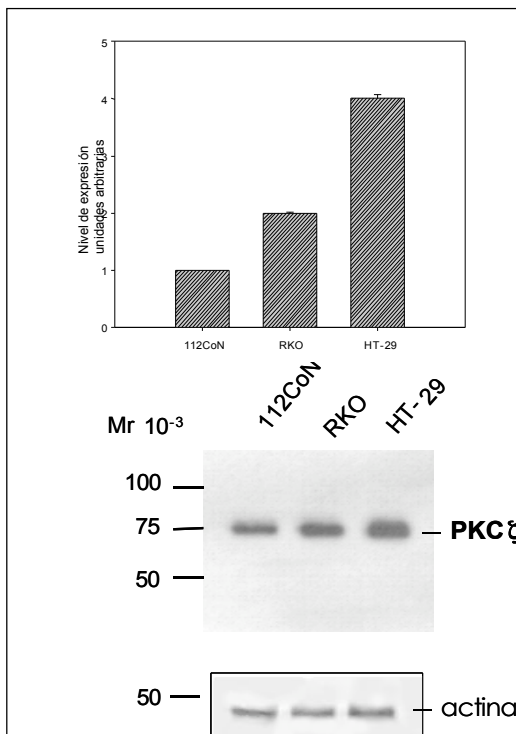
**Fig 12.** Western blot de PKC $\beta$ II. Se observa un aumento de la expresión en las células malignas, con respecto a las normales. Actina como control de carga.



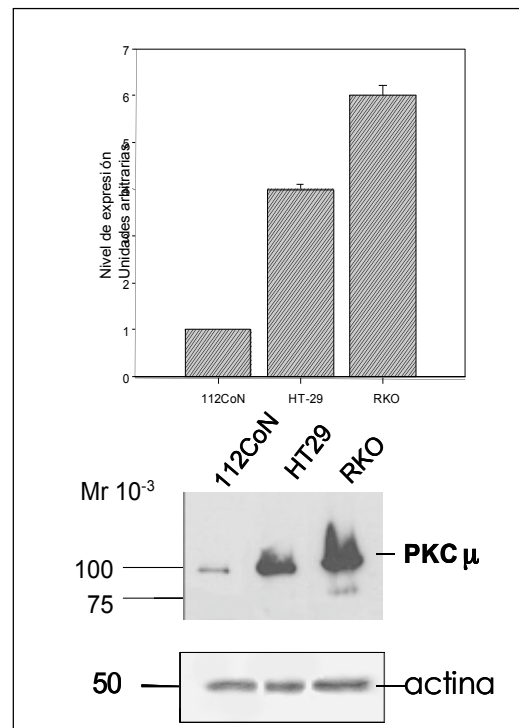
**Fig.13** Western blot y gráfica de PKCε. Se observa un incremento de expresión en las células malignas, en especial en HT-29, con respecto a las normales. Actina como control de carga.



**Fig.14** Western blot de PKCη. Se observa una sobreexpresión en las células HT-29, y ausencia de expresión en las células normales. En RKO se registra una expresión baja. Actina como control de carga.



**Fig.15** Western blot y gráfica de PKCζ. Se observa un incremento de expresión en las células malignas, con respecto a las normales. Actina como control de carga.

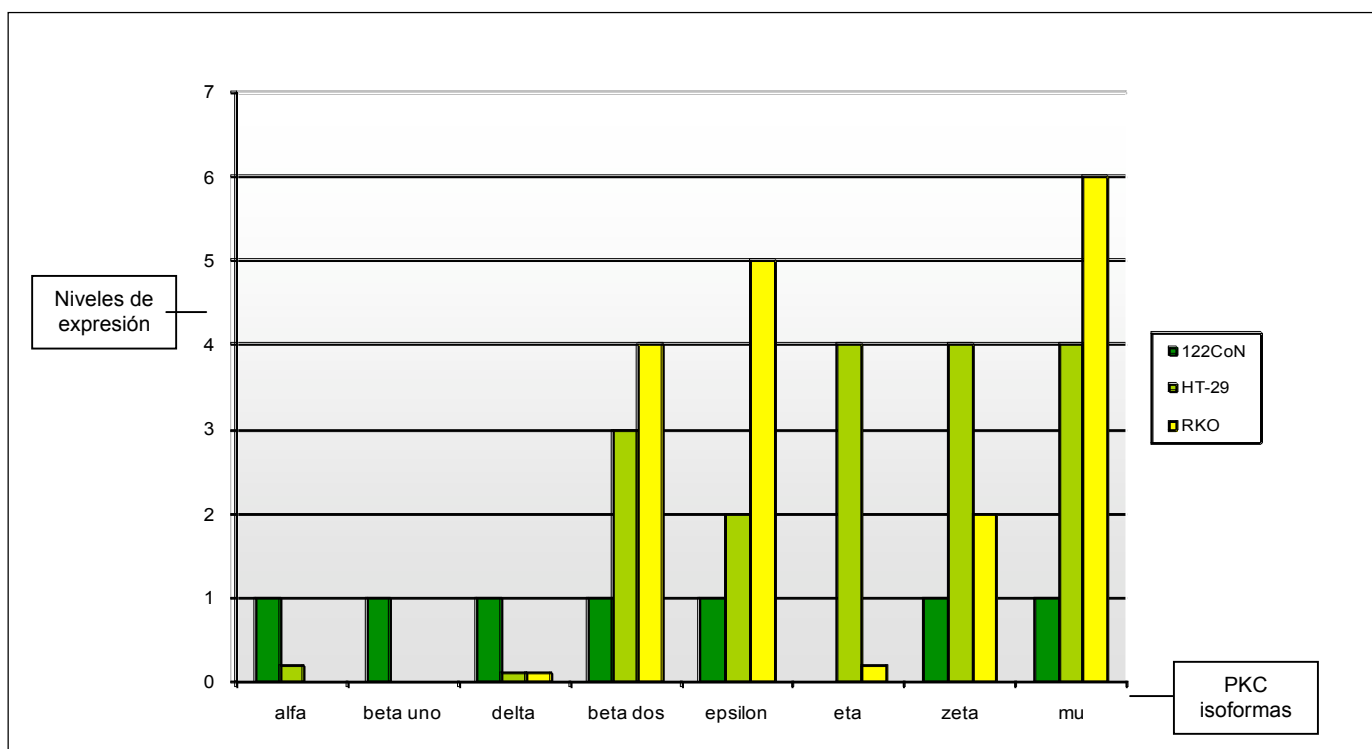


**Fig.16** Western blot y gráfica de PKCμ. Se observa un incremento de expresión en las células malignas, con respecto a las normales. Actina como control de carga.

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

DISMINUCIÓN DE EXPRESIÓN
  AUMENTO DE EXPRESIÓN

**Tabla 4.** Expresión comparativa de isoformas de PKC en las líneas celulares malignas de colon de humano (RKO y HT-29) y en células normales de colon de humano 112-CoN. Los resultados se obtuvieron normalizando el análisis densitométrico correspondiente a la expresión en células normales a 1, y representan los datos del promedio  $\pm$  S.E.M de por lo menos cuatro experimentos con diferentes preparaciones celulares.



**Gráfica 1.** Abundancia de las diferentes isoformas encontradas en las líneas celulares 112CoN, HT29 y RKO. Errores estándar en Tabla 4.

## **+Expresión de calreticulina en líneas celulares de colon+**

Los datos obtenidos de los ensayos de inmunoblot para la prueba de CRT realizadas en líneas celulares humanas tanto normales (CCD-112CoN), como cancerosas de colon (RKO y HT29), divididas en fracciones proteicas citoplásmica y nuclear, revelan diferencias de expresión y abundancia en cada uno de los extractos celulares, así como entre el estado normal y maligno (Fig. 17).

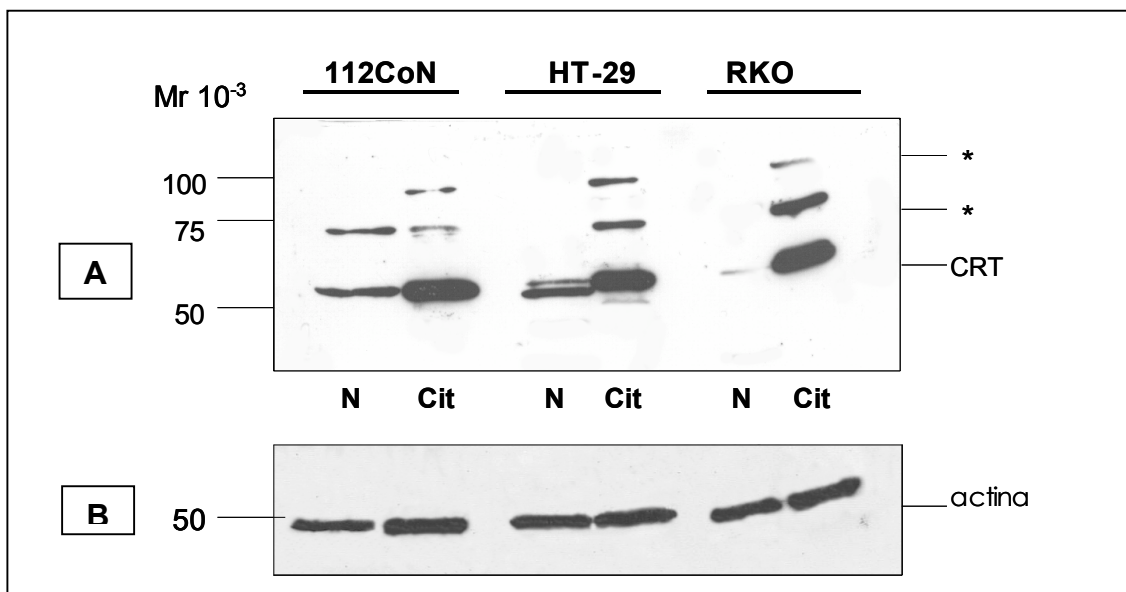
Se observó un patrón de dos a tres bandas en las fracciones de núcleo y citoplasma de las líneas celulares estudiadas, con movilidades relativas de 55 kDa, 75 kDa, y 90 kDa.

En las células normales 112CoN, se distinguen dos bandas en la fracción nuclear, y de dos a tres en la fracción citoplásmica. De la fracción nuclear, la más abundante es la banda de 55 kDa, siguiéndole una de 75 kDa, con una expresión menor. En la fracción citoplásmica, de las dos bandas expresadas, la más abundante es la de 55 kDa, y se ve una menor expresión en la banda de 75kDa.

En el caso de las células cancerosas HT-29, se observa para la fracción nuclear un doblete de 53-55 kDa. En cuanto a la fracción citoplásmica, la banda de 55 kDa es la más abundante, observándose dos bandas extras de poca expresión, de 75 y 90 kDa, respectivamente.

En las otras células malignas RKO, se observan bandas para la fracción nuclear, con una expresión muy ligera, siendo más abundantes las bandas de la fracción citoplásmica. En la fracción nuclear la banda tiene un peso de 55 kDa aproximadamente, mientras que la banda de expresión abundante en el citoplasma tiene un peso de 75 kDa y otras dos con ligera expresión, de 75 kDa y de 90 kDa, aproximadamente.





**Fig 17. A.** Resultados representativos de los ensayos de Western blot, donde se pueden apreciar hasta tres bandas presentes de CRT, principalmente en las líneas cancerosas RKO y HT29. N equivale al extracto nuclear y C al extracto citoplásmico de cada una de las líneas celulares. Se puede observar reconocimiento inespecífico del anticuerpo (\*) **B.** Control de carga (actina).

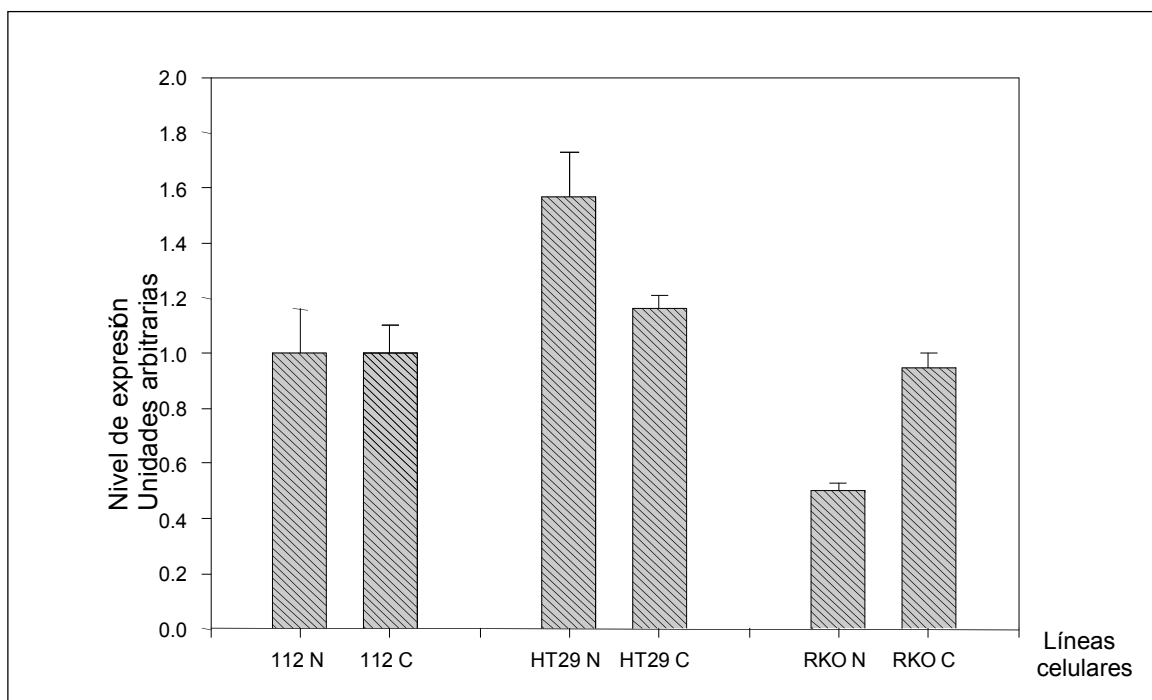
La cuantificación densitométrica de la suma de las bandas expresadas de cada una de las fracciones mostró que hay un ligero aumento en la expresión de calreticulina nuclear en la línea celular cancerosa HT-29 con respecto a las normales, mientras que la fracción citoplásmica tiene una expresión muy semejante a las células normales 112CoN. La expresión nuclear de calreticulina en las células RKO disminuyó a la mitad con respecto al parámetro normal y en la fracción citoplásmica conserva prácticamente el mismo valor que el parámetro normal, tal y como resume la Tabla 4, y como se observa en la Gráfica 2.

El análisis estadístico de ANOVA, comparando las fracciones nucleares de las tres líneas celulares, indica que sí hay diferencias significativas, con un valor de  $p=0.0004$  ( $p<0.05$ ). La misma prueba hecha para las fracciones citoplásmicas de las tres líneas celulares, indica que no hay diferencias significativas entre sí, con una  $p=0.8068$ .

El análisis estadístico de t de Student, comparando la fracción nuclear y citoplásmica de las células HT-29 indica que sí hay diferencias significativas, con un valor de  $p=0.0157$  ( $p<0.05$ ). La misma prueba, comparando la fracción nuclear con la citoplásmica de las células RKO, indica que hay diferencias significativas, con un valor de  $p=0.014$  ( $p<0.05$ ).

	112CoN	HT29	RKO
<b>Núcleos</b>	1 ± 0.16	1.57 ± 0.16	0.5 ± 0.03
<b>Citoplasma</b>	1 ± 0.1	1.16 ± 0.05	0.95 ± 0.05

**Tabla 4.** Expresión comparativa de CRT en las diferentes fracciones celulares estudiadas en las líneas celulares malignas de colon de humano (RKO y HT-29) y en células normales de colon de humano 112-CoN, cuantificando todas las bandas expresadas. Los resultados se obtuvieron normalizando el análisis densitométrico correspondiente a la expresión en células normales a 1, y representan los datos del promedio ± S.E.M de por lo menos cuatro experimentos con diferentes preparaciones celulares.



**Gráfica 2.** Expresión de CRT en las diferentes fracciones celulares estudiadas en las líneas celulares 112CoN, HT29 y RKO, cuantificando todas las bandas expresadas. El análisis estadístico de ANOVA entre las tres fracciones nucleares indica que hay diferencias significativas ( $p=0.0004$ ), mientras que no hay diferencias significativas entre las tres fracciones nucleares ( $p=0.8058$ ). La prueba estadística de t, indica que hay diferencias significativas entre las fracciones nucleares y citoplásmicas de HT-29 y de RKO, ambas con un valor de  $p<0.05$ .

La cuantificación de la banda de 55 kDa, de cada una de las fracciones celulares, expresada en cada línea celular, da resultados muy similares a los anteriores como muestra la Tabla 5 y como se observa en la Gráfica 3.

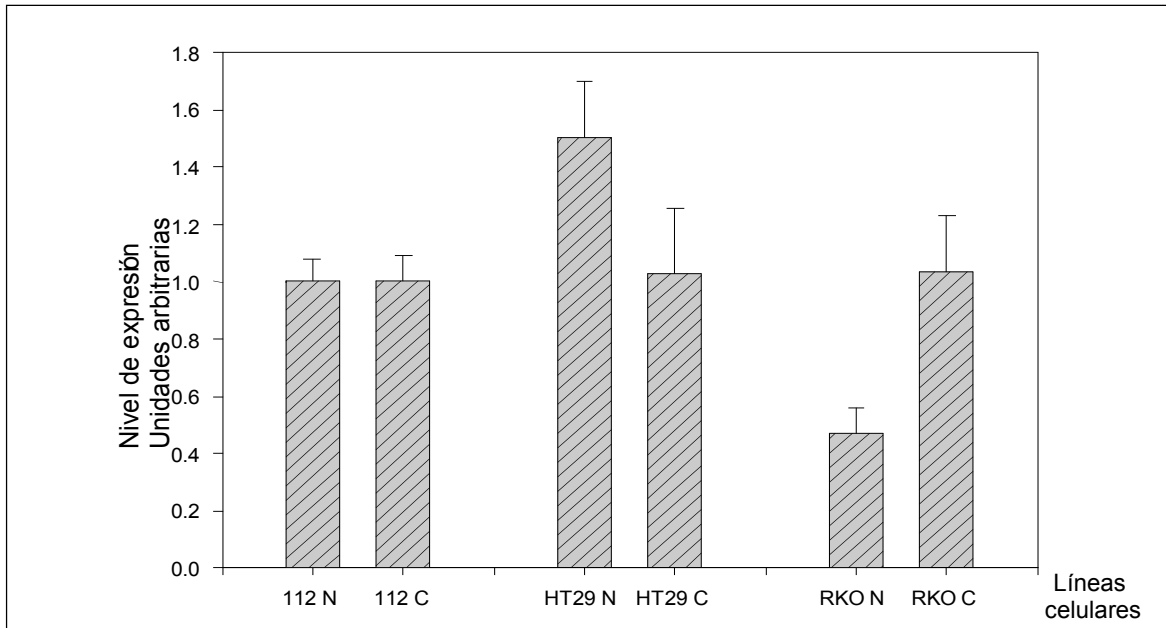
El análisis estadístico de ANOVA para estos valores (cuantificación de la banda de 55kDa), comparando las fracciones nucleares de las tres líneas celulares, indica que las diferencias son significativas, con un valor de  $p=0.0003$  ( $p<0.05$ ). La misma prueba

hecha para las fracciones citoplásmicas de las tres líneas celulares, indica que las diferencias no son significativas, con una  $p=0.9822$ .

El análisis estadístico de t de Student, comparando la fracción nuclear y citoplásmica de las células HT-29 indica que las diferencias son significativas, con un valor de  $p=0.0368$  ( $p<0.05$ ). La misma prueba, comparando la fracción nuclear con la citoplásmica de las células RKO, indica que las diferencias son significativas, con un valor de  $p=0.018$  ( $p<0.05$ ).

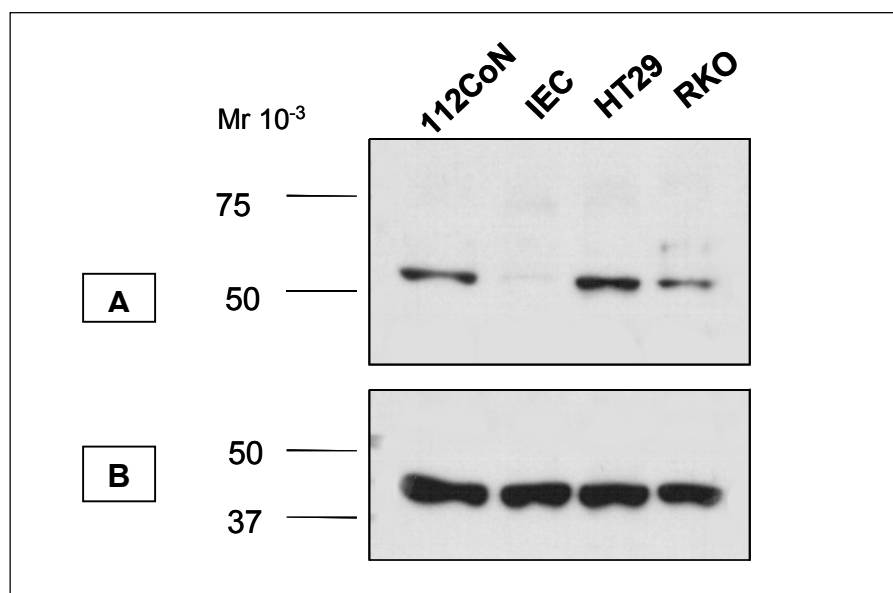
	112CoN	HT29	RKO
<b>Núcleos</b>	$1 \pm .08$	$1.5 \pm 0.2$	$0.47 \pm 0.09$
<b>Citoplasma</b>	$1 \pm .09$	$1.025 \pm 0.23$	$1.03 \pm 0.2$

**Tabla 5.** Expresión comparativa de CRT de la banda expresada en 55kDa en las líneas celulares malignas de colon de humano (RKO y HT-29) y en células normales de colon de humano 112-CoN. Los resultados se obtuvieron normalizando el análisis densitométrico correspondiente a la expresión en células normales a 1, y representan los datos del promedio  $\pm$  S.E.M de por lo menos cuatro experimentos.



**Gráfica 3.** Expresión de CRT en las diferentes fracciones celulares estudiadas en las líneas celulares 112CoN, HT29 y RKO, cuantificando la banda de 55kDa, donde N=núcleo y C=citoplasma. El análisis estadístico de ANOVA entre las tres fracciones nucleares indica que hay diferencias significativas ( $p=0.0003$ ), mientras que no hay diferencias significativas entre las tres fracciones nucleares ( $p= 0.9822$ ). La prueba estadística de t, indica que hay diferencias significativas entre las fracciones nucleares y citoplásmicas de HT-29 y de RKO, ambas con un valor de  $p<0.05$ .

Se hizo un Western blot del extracto total proteico de las tres líneas celulares (112CoN, HT29 Y RKO) con el fin de comparar el total con las variaciones de expresión obtenidas en las fracciones, observándose una relación muy similar entre ambos experimentos (Fig. 18), es decir, se obtuvo un ligero aumento de expresión de calreticulina en las células malignas HT-29, y una disminución de expresión de calreticulina total en las células cancerosas RKO.

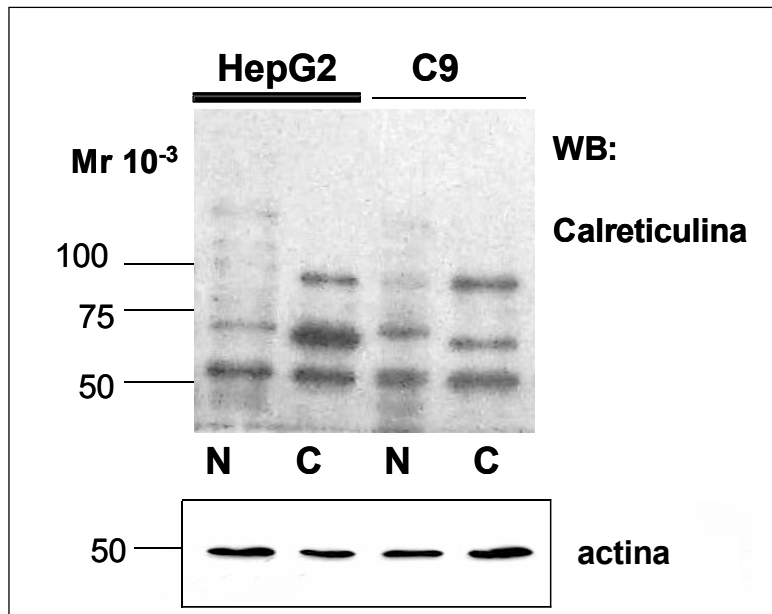


**Fig.18 A.** Western blot del extracto total de calreticulina en células 112CoN, células IEC (en donde no se expresa), células HT29 y células RKO. **B.** control de carga, actina.

### **+Expresión de calreticulina en líneas celulares de hígado+**

A fin de comparar los resultados de expresión de calreticulina obtenidos en las células de colon con la expresión en otro tipo celular, se utilizaron líneas celulares de hepatocitos normales y transformados: HepG2, de carcinoma hepático humano con morfología epitelial, y la línea celular C9 de hepatocitos normales de rata. En el análisis de la expresión por Western blot se observan diferencias entre las fracciones nuclear y citoplásmica de cada línea celular, expresando también en este sistema celular de dos a tres bandas en las fracciones celulares y que tienen movilidades relativas de 57 kDa, 70 kDa y 95 kDa (Fig.19). En las células normales de hígado se expresan en núcleo dos bandas, una de 57 kDa y otra de 70 kDa, siendo más abundante la primera. En el citoplasma se expresan las tres bandas, las más abundantes son las bandas de 57 kDa y la de 95 kDa.

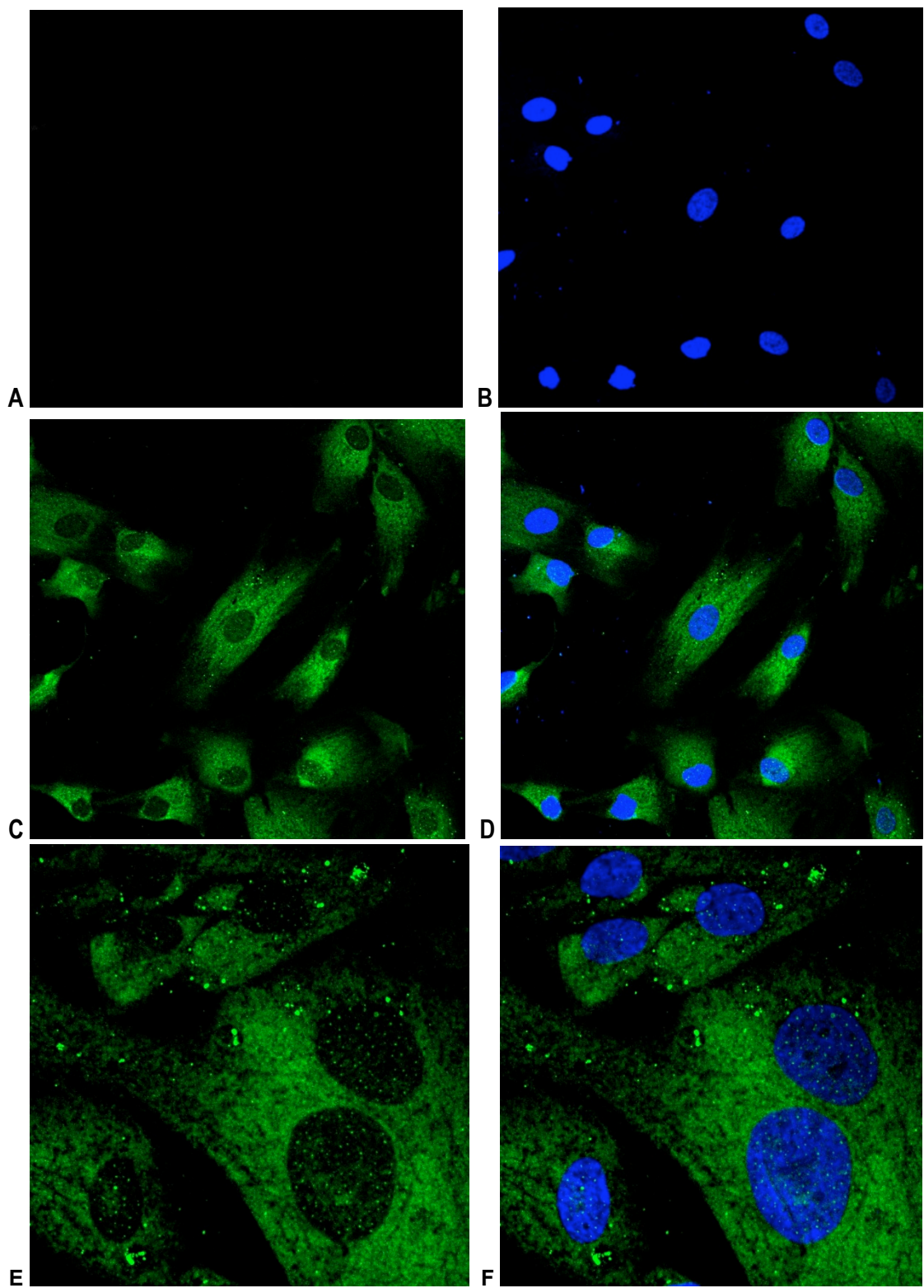
En el caso de Hep G2 (hepatoma) se puede observar un incremento sustancial con respecto a C9 (hepatocitos normales) en la fracción citoplásmica, y de las tres isoformas que expresa, la más abundante es la de 70 kDa, seguida por la de 57 kDa y la menos abundante es la de 95 kDa. En la fracción nuclear se expresan dos bandas: una de 57 kDa y otra de 70 kDa, siendo más abundante la primera.



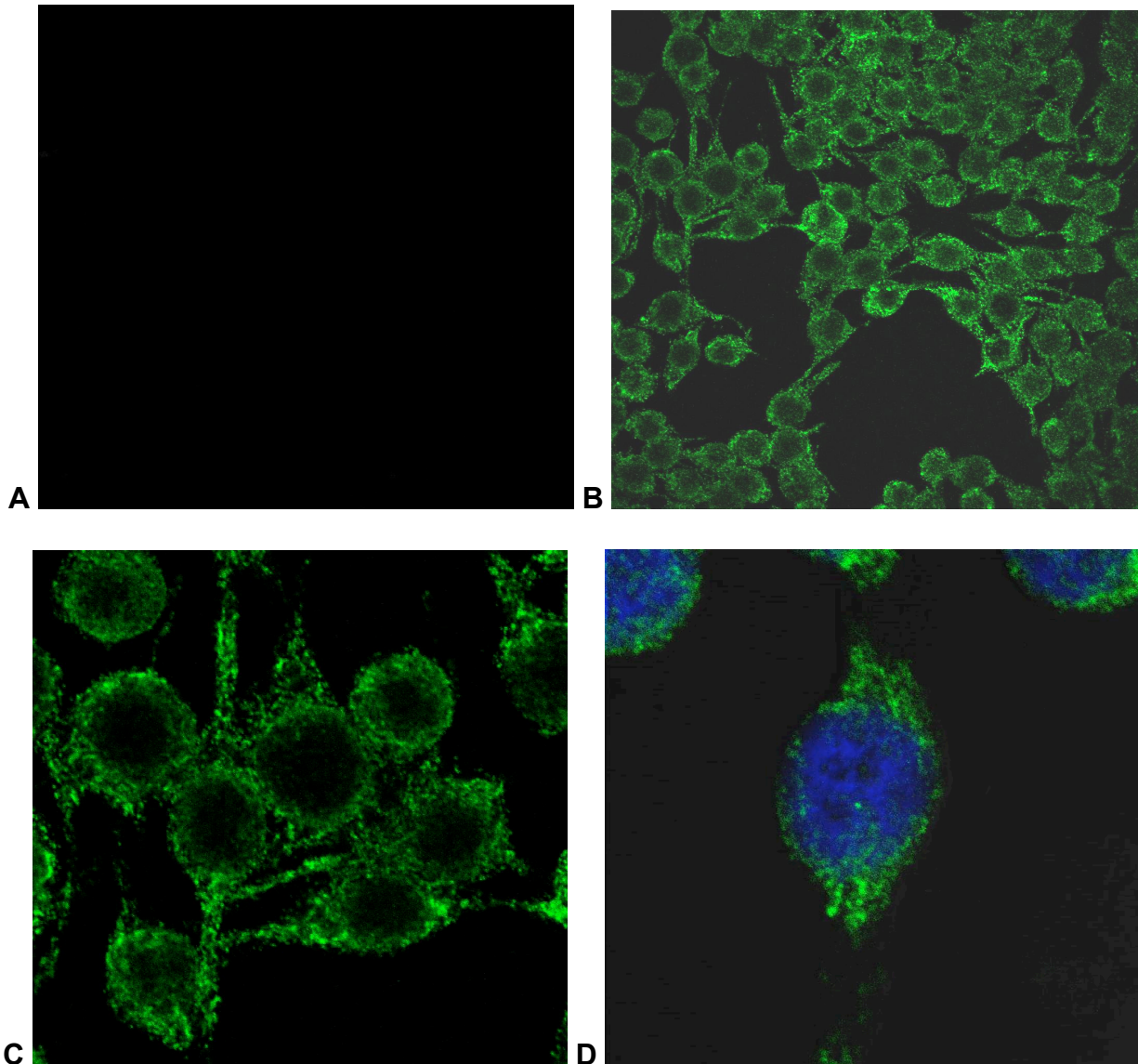
**Fig 19.** Resultados de los ensayos de Western blot, donde se pueden apreciar hasta tres bandas presentes de CRT, tanto en la línea celular hepática normal de rata C9, como en la línea celular de hepatoma humano HepG2. N es equivalente al extracto nuclear y C equivale al extracto citoplásmico de cada una de las líneas celulares.

### **+Ensayo de inmunofluorescencia+**

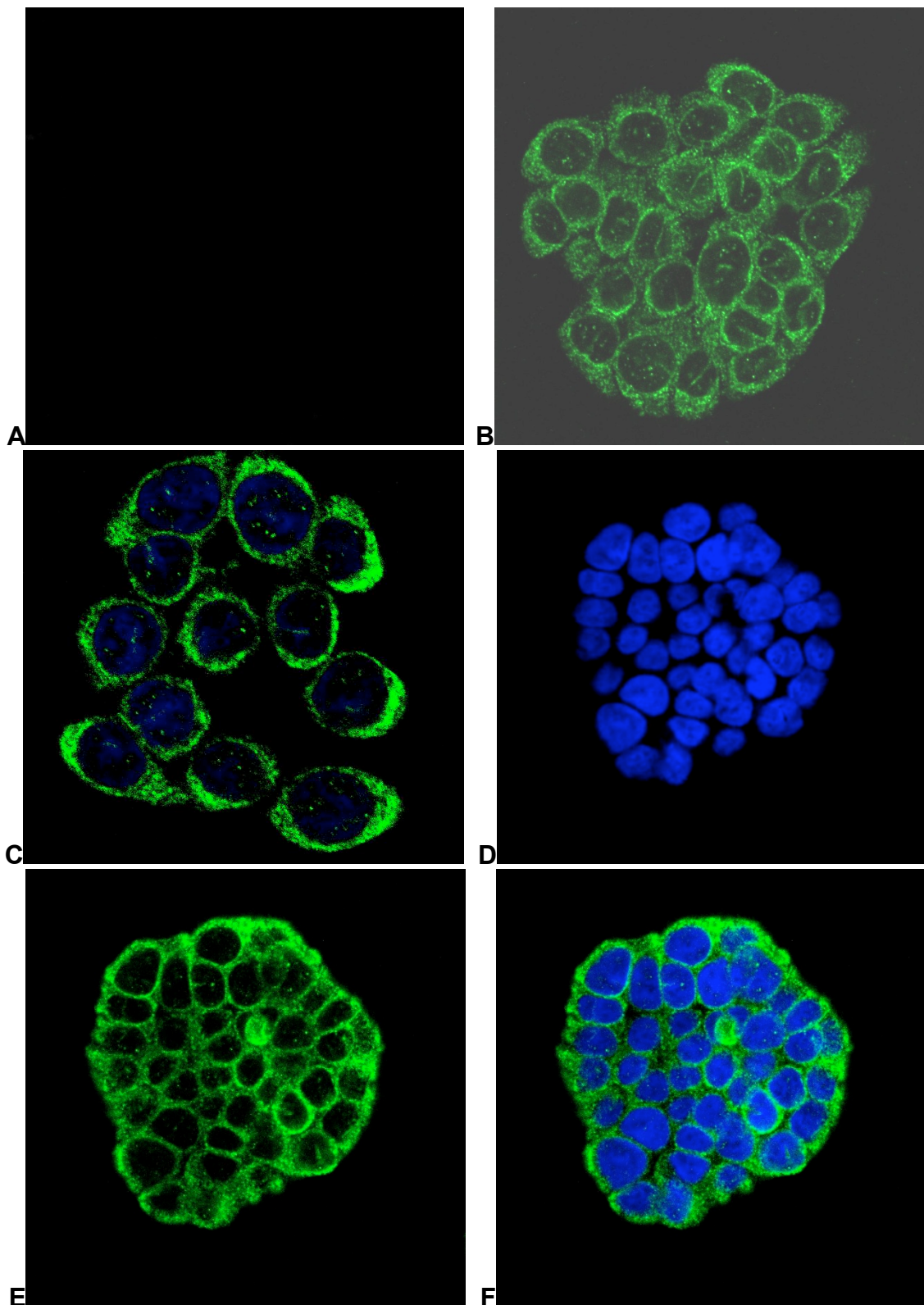
A fin de examinar la localización intracelular de la calreticulina y de confirmar los cambios de expresión encontrados entre los estados normales y cancerosos, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Se observó en todas las líneas celulares presencia de CRT en el núcleo y en el citoplasma, lo cual corroboró los experimentos de Western blot. Para confirmar la presencia de CRT en el núcleo, se hicieron cortes ópticos a las células y se hicieron reconstrucciones tridimensionales que comprobaron la expresión de CRT dentro del núcleo. A fin de distinguir mejor la zona nuclear, se hicieron experimentos con DAPI, en las cuales se observa con claridad la zona del núcleo celular (Figuras 20-22).



**Fig. 20.** Imágenes obtenidas del ensayo de inmunocitoquímica realizada en las células normales **112CoN** a 60x (B., C. y D.) y 100x (E. y F.) con microscopía confocal **A.** Control negativo **B.** Tinción de núcleos celulares con DAPI **C.** y **E.** Revelado con anticuerpo anti CRT H170 y anticuerpo secundario PIERCE, Goat antirabbit [1: 5000] acoplado a fluoresceína (FITC). **D.** y **F.** Anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (FITC) y DAPI.



**Fig. 20** Imágenes obtenidas de la prueba de inmunocitoquímica realizada en células cancerosas **RKO** a 60x (B) y 100x (C Y D) en microscopía confocal **A.** Control negativo. **B.** y **C** Imagen del revelado con anticuerpo anti CRT H170 y anticuerpo secundario PIERCE, Goat antirabbit [1: 5000] acoplado a fluoresceína (FITC). **D.** Imagen de los núcleos teñidos con DAPI y FITC.



**Fig. 21** Imágenes obtenidas de la prueba de inmunocitoquímica realizada en células cancerosas **HT-29** a 60x (B., D., E. y F.) y 100x (C.) en microscopía confocal. **A.** Control negativo **B. y E.** Imágenes del revelado con anticuerpo anti CRT H170 y anticuerpo secundario PIERCE, Goat antirabbit [1: 5000] acoplado a fluoresceína (FITC). **C. y F.** Imágenes de los núcleos teñidos con DAPI y FITC. **D.** Núcleos teñidos con DAPI.



## 7. Discusión

El cáncer y, en general, los procesos de proliferación celular y amplificación de señales implican una intercomunicación y una multifactorialidad que apenas se empiezan a conocer y definir; por esto, las cascadas de transducción a veces nos llevan por diversos caminos y relaciones a un mismo punto o función, siendo común descubrir convergencia con otras vías intracelulares de señalización.

En el cáncer, igualmente, la visión de que las mutaciones afectan a cascadas de señalización únicas que contribuyen al fenotipo maligno completo resulta muy simplista, pues ahora se sabe que los oncogenes y los supresores de tumores dependen uno de otro para su ventaja selectiva, y que afectan múltiples rutas que se intersectan y sobrepone. Uno de los caminos para conocer los mecanismos moleculares que controlan la autorenovación homeostática es estudiar aquellos que controlan el cáncer colo-rectal, ya que se ha comprobado que son marcadamente simétricos.

Existe una gran cantidad de evidencia experimental que indica que en los procesos cancerosos se altera la homeostasis de calcio, y que frecuentemente se altera la expresión de las proteínas que son pieza clave del mantenimiento de esta homeostasis, tales como la calreticulina, la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA), así como los sensores o receptores de calcio de membrana plasmática. Un punto de atención es que, siendo además las PKCs convencionales y nuevas dependientes de calcio y la CRT una proteína reguladora de la homeostasis del calcio celular, las rutas de transducción de ambas en algún momento confluyan. Así, un camino más de activación y función, añadido a los muchos descubiertos de la PKC, puede estar comunicado con CRT, tomando en cuenta que nuestro laboratorio ha reportado que PKC y CRT interactúan *in vivo* y que PKC fosforila a CRT (Rendón-Huerta *et al.*, 1999).

En este estudio demostramos que existen cambios en los patrones de expresión de distintas isoformas de PKC en células malignas de colon, con respecto a las normales, que de manera interesante coinciden con resultados reportados para el colon y para otros sistemas biológicos en cuanto a función y expresión. Antes se pensaba que las PKCs eran pro-mitogénicas, pero estudios recientes revelan que esto es dependiente de

las isoformas expresadas en cada tipo celular y del contexto de la célula, por lo que pueden conferir distintos y contrastantes efectos en proliferación, y que varias isoformas tienen un efecto antiproliferativo o pro-apoptótico, tales como  $\alpha$ ,  $\beta I$ , y  $\delta$ , (Griner & Kazanietz, 2007), las cuales en este estudio encontramos disminuida su expresión en las células malignas. La disminución de **PKC**  $\alpha$  y  $\delta$  que encontramos en las células tumorales, en relación con las normales, es consistente con el papel de posibles supresoras tumorales que se ha sugerido para ambas en células normales de colon, ya que la evidencia experimental reportada sugiere que limitan el crecimiento y sobrevivencia de las células intestinales, y que la pérdida de una o ambas isoformas confiere propiedades a estas células que permiten el desarrollo de neoplasias intestinales (Guan *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 1997). Adicionalmente, se cree que PKC $\alpha$  es importante para inducir el progreso del ciclo celular normal de las células intestinales cuando migran fuera de las criptas intestinales (Frey *et al.*, 2000), y se ha visto que tiene efectos antiproliferativos en varios tipos celulares, incluyendo el intestinal, el pancreático y las células mamarias. En un estudio hecho con ratones knockout de PKC $\alpha$ , se reporta un incremento en las neoplasias intestinales espontáneas sin mutación en APC, revelándose como supresor tumoral en el intestino (Oster, 2006). A pesar de estos reportes hay estudios en los que al abatir la expresión de PKC $\alpha$  y  $\beta I$  con oligonucleótidos antisentido en células humanas de cáncer gástrico, se reduce el crecimiento celular en agar blando y la formación de tumores en ratones implantados (Jiang, X, *et al.*, 2004).

En cuanto a la **PKC** $\delta$ , se ha demostrado que transduce señales anti-proliferativas y apoptóticas en varios tipos celulares y se ha encontrado una disminución en su expresión en células transformadas. El abatimiento de PKC $\delta$  por tratamiento con ésteres de forbol confiere un fenotipo maligno, indicando no sólo el papel de supresor tumoral, sino que también la generación de tumores inducida por los ésteres de forbol puede estar involucrada en la modulación negativa de esta PKC (Griner & Kazanietz, 2007). Los resultados de este estudio apoyan esta evidencia, reportando una disminución de expresión con respecto al parámetro normal.

Isoformas reportadas con efectos de resistencia a quimioterapia, que confieren ventajas proliferativas o promueven el crecimiento y anclaje independiente son  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\mu$ , y  $\zeta$ , teniendo una sobre-expresión en líneas celulares malignas de dichas isoformas, siendo nuestros resultados consistentes con lo reportado.

Numerosos artículos han reportado la sobreexpresión de la isoforma  $\beta$ II en casos de carcinoma colo-rectal, al igual que lo que nosotros encontramos en este estudio, por lo que parece haber cierto acuerdo en su sobreexpresión en células cancerosas (Gökmen-Polar *et al.*, 2001). La relacionan también con hiperproliferación del epitelio colónico, y su sobreexpresión en ratones transgénicos causa alta sensibilidad a los carcinógenos (Dempsey *et al.*, 2000), observándose una reducción simultánea en la expresión de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I. Otras evidencias indican que esta cinasa puede ser un regulador importante de la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Zhang *et al.*, 2004).

Sin embargo, para el resto de las isoformas de PKC probadas, no existe un consenso sobre los patrones de su expresión en el colon. Tal es el caso para **PKC $\zeta$** , que se ha visto que interacciona directamente con el oncogene Ras, involucrándosele en procesos de proliferación (Diaz-Meco *et al.*, 1994). Berra *et al.*, han encontrado que la activación de esta isoforma es suficiente para producir desregulación en el control de crecimiento de fibroblastos de ratón, y que una dominante negativa provoca la activación mitogénica en oocitos y fibroblastos. A pesar de esto, hay reportes en los que se encontró disminuída en su expresión en tumores intestinales de ratones Apc<sup>min/+</sup> (Oster & Leitges, 2006). Por parte de este estudio, los resultados que se obtuvieron apoyan la primera evidencia, pues se encontró una sobreexpresión de PKC $\zeta$  en las células malignas con relación a los parámetros normales.

Ensayos con **PKC $\epsilon$**  indican, por una parte, que promueve la supervivencia de varios tipos celulares a través de un incremento en la vía de Akt y regulación positiva de factores de sobrevivencia (Griner y Kazanietz, 2007). Por otra parte, otros reportes indican que la sobreexpresión de  $\epsilon$  en varios modelos celulares confiere ventajas proliferativas, incremento en el crecimiento independiente de anclaje y promueve un

fenotipo tumorigénico en ratones (Cacace *et al.*, 1996; Mischak *et al.*, 1993). Esta isoforma también se ha encontrado sobreexpresada en varios tipos de cánceres (Griner y Kazanietz, 2007). En este estudio se corrobora esta correlación, pues se sobreexpresa en células malignas en comparación con las células normales.

Información de **PKC $\mu$** /PKD indica que se le relaciona en cascadas mitogénicas debido a la activación que hace de p42/p44 MAPK (Brandlin *et al.*, 2002). Aunque ha sido poco estudiada, hay reportes que indican que no cambia significativamente su expresión entre el estado normal y el maligno en varios cánceres, como es el caso de cáncer de próstata (Cornford *et al.*, 1999). En nuestro estudio encontramos que la forma completa de 115 kDa se sobreexpresa en una relación 1:4 en células HT29 y 1:6 en células RKO sugiriendo que tiene un papel importante en el mantenimiento del fenotipo maligno. Dichas discrepancias pueden deberse a la línea celular estudiada o a las diferencias propias de cada tejido.

La sobreexpresión en carcinoma de la isoforma **PKC $\eta$**  y su ausencia en células normales indica una activación específica en estado maligno. De esta isoforma han sido reportados ensayos que la relacionan con un incremento en la susceptibilidad a formación de tumores, inducida por ésteres de forbol o DMBA (7, 12-dimetilbenzoantraceno) cuando ésta se sobreexpresa (Chida *et al.*, 2003); también se ha reportado que confiere resistencia a apoptosis inducida por radiación y que el nivel de PKC-eta, expresado por transfección en células de glioblastoma (dichas células normalmente no expresan esta isoforma) correlaciona con el grado de proliferación inducido por el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). (Uht *et al.*, 2006). Su ausencia en células normales y su posterior activación en células malignas de colon en este ensayo, concuerdan con esta evidencia experimental aunque hasta ahora se desconoce cuál es el mecanismo de inducción de su expresión específica en el estado maligno, pues además se conoce muy poco acerca de la regulación de la expresión génica de PKC (Griner y Kazanietz, 2007).

Los resultados obtenidos para PKC $\mu$  y PKC $\eta$  pueden ser de gran utilidad para posteriores estudios si tomamos en cuenta ensayos de co-localización realizados por Brandlin *et al.*, con ambas isoformas que indican que PKC $\mu$ /PKD es activada por una vía

dependiente de PKC $\eta$ . El análisis confocal demuestra que PKC $\mu$  parcialmente co-localiza con PKC $\eta$  en diferentes tipos celulares (HEK293 y MCF7). La co-expresión constitutivamente activa de  $\eta$  conlleva a un aumento significativo de la capacidad de fosforilación del sustrato de PKC $\mu$ , siendo así que PKC $\eta$  funciona como un activador directo río arriba de procesos celulares activados por PKC $\mu$  (Brandlin *et al.*, (A)2002 y (B)2002). Este punto puede investigarse en un futuro para la expresión de ambas isoformas en el colon y sus relaciones con la proliferación celular.

En resumen, las isoformas que han sido reportadas como antiproliferativas en este estudio vieron disminuida su expresión, mientras que las que tienen efectos de sobrevivencia en estado maligno se sobreexpresaron. Si analizamos en conjunto la expresión de las isoformas en ambas líneas celulares malignas, se puede observar que tienen el mismo comportamiento entre éstas con respecto a las células normales.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la expresión de CRT indican que hay diferencias importantes de expresión en la fracción nuclear con respecto a las normales en las líneas celulares de colon. Utilizando un anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo de CRT (H170), se detectaron tres bandas con pesos moleculares aparentes de 55 kDa, de 75 kDa y de 90 kDa. Es posible que las bandas de 75 y 90 kDa, de mucho mayor peso molecular al esperado para calreticulina (masa calculada de 46.6 kDa) no correspondan a isoformas de calreticulina sino a otras proteínas, como la hsp70 y la hsp90 que contienen la secuencia de anclaje a retículo endoplásmico KDEL reconocida por el anticuerpo, pues abarca un gran espectro de residuos aminoácidos (248-417). A este respecto, hay evidencia en nuestro laboratorio que sugiere que solamente la banda de 55 kDa es calreticulina, ya que la CRT inmunoprecipitada de células Cos7 transfectadas con calreticulina marcada con un epítipo FLAG solamente precipita la banda de 55 kDa. Adicionalmente, no se han reportado diferencias en el procesamiento del RNA en CRT, aunque nuestro equipo ha observado modificaciones postraduccionales como glucosilación (O-GlcNAc) y fosforilación (Robles-Flores *et al.*, datos no publicados), lo que seguramente afecta la movilidad y peso de la proteína, aunque no lo suficiente como para expresarse en bandas tan separadas. Debido a lo

anterior, se cuantificaron todas las bandas y también se cuantificó la banda principal de 55 kDa, obteniendo los mismos resultados que se resumen a continuación:

Se sobreexpresa calreticulina en la fracción nuclear de la línea HT29 y reduce su expresión a la mitad en las células RKO en la misma fracción, aunque no hay cambios significativos en la fracción citoplásmica. Si se toma en cuenta la expresión total hubo un aumento en las células HT29 y una disminución en RKO con respecto a las 112CoN. Ambas expresiones de las células malignas apoyan la evidencia de cambios en la localización celular de CRT en el estado maligno. La sobreexpresión en núcleo en HT29 apoya reportes de un aumento de expresión nuclear, como en el caso de células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello (SQ-20B) analizadas nuclearmente después de un tratamiento con radiación ionizante, donde se reporta un aumento de CRT (Ramsamooj *et al.*, 1995). Por otra parte, el resultado de RKO coincide con otro estudio realizado en adenocarcinomas de colon humano, en donde se vio una reducción sustancial de 51.7% (Toquet *et al.*, 2007). Otros estudios que la asocian a estados alterados de proliferación, la identifican como una proteína de matriz nuclear sobreexpresada asociada con el cáncer de colon humano (Brünagel *et al.*, 2003), también se ha visto sobreexpresada en estudios de cáncer colo-rectal (Alfonso *et al.*, 2005) y de esófago (Jazii *et al.*, 2006), ambos usando muestras de biopsias de tumores y mucosa normal y expresada de forma alterada en la línea celular MCF7 de cáncer de mama (Sarvaiya *et al.*, 2006). Interesantemente, la sobreexpresión de CRT ha sido relacionada con la sensibilización celular a señales proapoptóticas inducidas por fármacos (Nakamura *et al.*, 2000; Kageyama *et al.*, 2002), mientras que células deficientes de calreticulina son más resistentes a apoptosis inducida por rayos UV o por fármacos (Nakamura *et al.*, 2000), sucediendo lo mismo con la sensibilidad a la apoptosis inducida por radiación en células de glioblastoma U251MG (Okunaga *et al.*, 2006). Estos estudios abren un campo para estudiar si el decremento en la expresión o la sobreexpresión de CRT en este sistema, tiene los mismos resultados de sensibilidad a factores proapoptóticos y si se relacionan estos cambios con el nivel de diferenciación de las líneas celulares, ya que la línea de carcinoma RKO está pobremente diferenciada en comparación con HT-29 que es de adenocarcinoma.

Poco se puede especular en cuanto al cambio de la expresión de CRT observado en estos ensayos en células malignas a nivel citosólico, el cual debe afectar directamente

en las funciones que tiene, comenzando con las actividades mejor conocidas: la regulación y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Gelebart *et al.*, 2005) como chaperona, tal y como se ha visto que sucede cuando hay choque térmico o algún estrés celular en el que se necesite actividad extra en el plegamiento de las proteínas (Liu *et al.*, 1997) y en la adhesividad celular (Coppolino *et al.*, 1997), debido a que no hubo un aumento sustancial de CRT en la fracción citoplásmica de las líneas celulares malignas con respecto a la normal y porque no se sabe si hubo una distribución diferencial entre lumen y RE, pues a calreticulina se le asocia con varias funciones fuera del retículo.

El análisis nuclear se hizo debido a que se ha reportado que células transformadas con alto potencial metastásico despliegan un patrón alterado de proteínas nucleares reclutadas en asociación con la transformación maligna u otros cambios celulares relacionados (Samuel *et al.*, 1997). A pesar de la señal de retención en RE, calreticulina se localiza también en el núcleo, donde su presencia no es clara, pero se tienen reportes en los que la presencia en este compartimiento celular está relacionada a la interacción del dominio N con receptores a glucocorticoides (Michalak *et al.*, 1996; Roderick *et al.*, 1997), así como relacionada con el transporte nuclear de los mismos (Holaska *et al.*, 2002), en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  intranuclear (Holaska *et al.*, 2001) y con la regulación del transporte nuclear (tanto entrada como salida) de los factores transcripcionales NFAT3 (Mesaeli *et al.*, 1999) y MEF2C (Li *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2005).

Los datos obtenidos por Roderick *et al.*, revelan que la presencia de calreticulina dentro del núcleo, a pesar de no ser muy abundante, se ve aumentada como resultado de la interacción con receptores de glucocorticoides, se relaciona con la cantidad y presencia de éstos dentro del núcleo y se infiere que la proteína es capaz de entrar al núcleo en asociación con dichos receptores. A pesar de que no se conoce con certeza el mecanismo que permita esta localización subcelular, hay estudios que demuestran que la retrotranslocación de calreticulina es posible, que está mediada por el extremo carboxilo de la proteína y que primero se encuentra en el RE antes de ser citosólica (Paschal *et al.*, 2005). También se sabe que tiene una señal putativa de localización nuclear (NLS) en su dominio P, lo que da elementos para que su localización nuclear sea posible, y que no sea sólo cuestión de error en la metodología (Roderick *et al.*, 1997).

Otro aspecto en el que se le involucra en el núcleo, es la participación en la regulación del supresor tumoral p53 mediada por calreticulina, afectando su grado de degradación, su función y su localización nuclear. Estos estudios muestran que un decremento significativo en CRT implica un fallo en la localización nuclear de tan importante supresor tumoral (Mesaeli & Phillipson, 2004).

Ahora, a todos los elementos anteriores se agrega una posible función más a la ya multifactorial calreticulina, pues su interacción con PKC le añade otras posibilidades de funcionalidad y participación probable en las vías en donde se inserta PKC, particularmente la vía de Wnt no canónica (Wnt que se ha asociado, entre otras cosas, a tumorigénesis y a la vía canónica) (Katoh & Katoh, 2007; Kuhl *et al.*, 2000), en donde puede participar indirectamente con la modulación de calcio, y/o en la unión de PKC con CRT, sin tener certeza de cuáles serían las consecuencias biológicas de dicha interacción.

Respecto a las líneas hepáticas, en HepG2 se observa un aumento en la fracción citoplásmica, aunque en la fracción nuclear es poca la variación observada con respecto a las normales (C9). Aunque no se pueden hacer conclusiones certeras, debido a que sólo se tomaron como una referencia externa, se pueden intuir cambios que apoyan estudios en los que se analizaron proteínas de la matriz nuclear de 11 carcinomas hepatocelulares y los compararon con su correspondiente tejido normal, encontrando expresión diferencial de calreticulina en el núcleo de las células malignas con respecto a las normales (Yoon *et al.*, 2000). Esto muestra que hay patrones diferentes entre cada tejido y línea celular en estado maligno con respecto a las células normales, pues se obtuvieron diferencias entre los resultados de colon e hígado, y se puede concluir que hay cambios de expresión proteica de CRT para cualquiera de los dos sistemas.

Esta proteína puede llevar a cabo tantas funciones que es intrigante y controversial, y claramente se requieren investigaciones a futuro para poder entender a fondo las funciones de calreticulina y dilucidar los múltiples papeles que desempeña en la célula, tanto en condiciones normales como en malignas.



Una visión integral de todos los procesos simultáneos realizados por CRT deben ser en un futuro próximo analizados y ahí se debe tomar en cuenta la caracterización proteica en las células a estudiar, para lo cual se ha dado un primer paso al conocer los niveles de expresión tanto de CRT y de PKC en este sistema biológico.

El cáncer en general y específicamente el de colon tienen una importancia crucial, ya que la incidencia en la población mundial es grande, y se continúa agravando. Este tipo de estudios es una aportación significativa al conocimiento y al posible combate a esta enfermedad tan multifactorial. Las estadísticas nacionales indican que en las personas mayores de 45 años, los enfermos por esta causa han aumentado 100%, de acuerdo a una investigación realizada por especialistas del ISSSTE y del Instituto Nacional de Salud Pública, y se precisó que mientras en México y el mundo el cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por tumor, en el ISSSTE el cáncer de colon ocupa esta posición por su incidencia entre los derechohabientes. Esta institución reporta que el cáncer de colon afecta en igual proporción a hombres y mujeres, además de que el promedio de edad de los afectados es de 63 años y que la mortalidad es muy alta (46).

Es por esto que este tipo de estudios tienen como objetivo general contribuir al esclarecimiento de los mecanismos que conducen a esta enfermedad, y aportar información que en un futuro cercano resulte práctica y de manejo clínico que pueda aportar datos tanto preventivos como de tratamiento.

## 8. CONCLUSIONES

- Se encontraron cambios significativos de expresión de isoformas de PKC que coinciden con estudios en otros sistemas biológicos.
- Las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I, y  $\delta$ , para las que se ha reportado que tienen un efecto antiproliferativo, se encontró en este estudio que disminuyen su expresión en las células malignas con respecto a las normales.
- Las isoformas  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\eta$ , y  $\zeta$ , que han sido relacionadas con ventajas proliferativas, se encontraron sobreexpresadas significativamente en células malignas.
- Se detectó un aumento de expresión significativo de CRT en la fracción nuclear de la línea celular maligna HT-29, mientras que en las células malignas RKO se redujo su expresión a la mitad con respecto a la línea celular normal 112CoN.
- Se detectó la presencia de calreticulina en el núcleo celular, donde hubo cambios de expresión significativos, así como en la fracción citoplásmica, donde no hubo cambios importantes de expresión entre las líneas celulares.
- También hubo diferencias de expresión de calreticulina entre el estado maligno y el normal en las células hepáticas analizadas.

## 9. PERSPECTIVAS:

Debido a que este trabajo tuvo como objetivo sentar las bases para posteriores estudios, se pueden plantear varios panoramas que continúen y ayuden a dilucidar la importancia fisiológica de las proteínas estudiadas.

Las diferencias básicas de expresión de CRT y de las isoformas de PKC, y en muchos casos, de localización intracelular encontradas en este estudio, indican que existen alteraciones significativas entre el estado maligno y el estado normal de las células analizadas con respecto a estas dos proteínas, lo que sugiere que ambas juegan un papel fisiológico importante en la generación y/o mantenimiento

del fenotipo canceroso. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden utilizarse como base para los siguientes estudios:

--- Investigar el papel que juega la proteína cinasa C en la carcinogénesis de colon. Específicamente, se puede investigar la participación de las distintas isoformas de PKC en la regulación de la ruta de señalización Wnt, que está alterada en la mayoría de los casos de cáncer colorectal, ya sea abatiendo la expresión con RNAi o sobreexpresando las proteínas.

---- Dado que la homeostasis de calcio está alterada en el cáncer colorectal, y que la calreticulina es esencial en el mantenimiento de esta homeostasis, sería importante investigar cómo participa esta proteína en esta regulación, tanto en el estado normal como en el maligno.

---- Teniendo en cuenta que se conoce que la calreticulina es sustrato de PKC, y se conocen sus patrones de expresión, sería importante investigar las consecuencias de esta fosforilación, y las isoformas de PKC encargadas realizarlo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Chapter 23. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press. 1313-1361
2. Alfonso, P., Núñez, A., Madoz-Gurpide, J., Lombardía, L., Sánchez, L., Casal, J. I. (2005) *Proteomic expression analysis of colo-rectal cancer by two dimensional differential gel electrophoresis*. *Proteomics* 5, 2602-2611
3. Amerongen R. & Berns A. (2006) *Konclout mouse models tu study Wnt signal transduction*. *Trends in Genetics*. Vol 22 No 12. Elsevier Rev.
4. Andrin C., Pinkoski M.J., Burns K., Atkinson E.A., Krahenbuhl O., Hudig D., Fraser S.A., Winkler U., Tschopp J., Opas M. (1998) *Interaction between a Ca<sup>2+</sup> binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell garnules*. *Biochemistry*. 37. 10386-10394
5. Bazzi, M. D. And Nelsestuen, G. L. (1990) *Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process*. *Biochemistry* 29, 7624-7630
6. Bejsovec A. (2005) *Wnt Pathway Activation: New Relations and Locations*. *Cell*, Vol. 120, 11–14, January 14
7. Berra, A. Diaz-Meco, M. Domínguez, I. Municio, M. Sanz, L. Lozano, J. Chapkin, R. Moscat, J. (1993). *Protein kinase C z isoform is critical for mitogenic signal transduction*. *Cell* 74: 555-563.
8. Brandlin I, Eiseler T, Salowsky R, Johannes FJ. (2002) *Protein kinase C(mu) regulation of the JNK pathway is triggered via phosphoinositide-dependent kinase 1 and protein kinase C(epsilon)*. *J Biol Chem*. Nov 22;277(47):45451-7. (B)
9. Brandlin, I., Hubner, S. Eiseler, T., Martinez-Moya, M., Horschinek A., Hausser A., Link G., Rupp S., Store P., Pfizenmaier K. and Johannes F. K. (2002) *Protein Kinase Cμ (PKC)μ-mediated PKCε activation modulates ERK and JNK signal pathways*. *J. of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 8, Issue of February 22, pp. 6490–6496 (A)
10. Brünagel, G., Shah, U., Schoen, R. E., Getzenberg, H. R. (2003) *Identification of Calreticulin as a Nuclear Matrix Protein Associated With Human Colon Cancer*. *Journal of Cellular Biochemistry* 89:238-243
11. Burns D. J. and Bell. (1991) *Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains*. *J. Biol. Chem*. 266, 18330-18338
12. Burns K., Duggan B., Atkinson E.A., Famulski K.S., Nemer M., Bleackley R.C. and Michalak M. (1994) *Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor*. *Nature*. 367, 476-480.
13. Cacace AM, Ueffing M, Philipp A, Han EK, Kolch W, Weinstein IB. (1996) *PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase*. *Oncogene*. Dec 19;13(12):2517-26.
14. Chida K, Hara T, Hirai T, Konishi C, Nakamura K, Nakao K, Aiba A, Katsuki M, Kuroki (2003) *Disruption of protein kinase Cε results in impairment of wound healing and enhancement of tumor formation in mouse skin carcinogenesis*. *Cancer Res*. May 15;63(10):2404-8.
15. Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., and Toker, A. (1998) *Regulation of protein kinase C zeta by PI3-kinase and PDK-1*. *Curr. Biol*. 8, 1069-1077
16. Coppelino MG, and Dedhar S. (1998) *Calreticulin*. *Int Journal of Biochemistry Cell Biol*. May;30(5):553-8.
17. Coppelino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S. (1997) *Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion*. *Nature*. Apr 24;386(6627):843-7.

18. Cornford P, Evans J, Dodson A, Parsons K, Woolfenden A, Neoptolemos J, Foster CS. *Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer*. Am J Pathol. 1999 Jan;154(1):137-44.
19. Dedhar, S. (1994) *Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression?* Trends Biochem Sci. Jul;19(7):269-71
20. Dedhar, S. (1999) *Integrins and signal transduction*. Curr Opin Hematol. Jan;6(1):37-43
21. Dempsey, C Alexandra C. Newton, Daria Mochly-Rosen, Alan P. Fields, Mary E. Reyland, Paul A. Insel and Robert O. Messing (2000). *Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:429-438
22. Diaz-Meco M., Lozano, J., Municio, M., Berra, E., Frutos, S., Sanz, L., Moscat, J. (1994) *Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with Protein Kinase C* z. Journal Biological Chemistry 269: 31706-31710
23. Dorit R. & Kazanietz (1999) *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. FASEB J. Oct;13(13):1658-76.
24. [Eggleton P, Ward FJ, Johnson S, Khamashta MA, Hughes GR, Hajela VA, Michalak M, Corbett EF, Staines NA, Reid KB](#). (2000) *Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization*. Clin. Exp. Immunol. 120. 384-391
25. Farhadi A., Keshavarzian A., Ranjbaran Z., Fields J., Banan A. (2006) *The role of Protein Kinase C Isoforms in Modulating Injury and repair of the Intestinal Barrier*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol 316 No 1
26. Feinberg A. P., Ohlsson R. and Heinikoff S. (2006) *The epigenetic origin of human cancer*. Nature Reviews Genetics. Jan;7(1):21-33. Review.
27. Ferbeyre-Binelfa L., Salinas-García J. C. (2005) *Bases genéticas y moleculares del cáncer/1ª parte*. Gamo Vol. 4 Núm. 2 Mar-Abr
28. Fliedel L. Burns K. Maclennan D.H. Reithmeier R.A and Michalak M. (1989) *Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. J. Biol Chem. 264, 21522-21528..
29. Fodde R. and Brabletz T. (2007) *Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior*. Current Opinion in Cell Biology. Apr;19(2):150-8. Epub Feb 16.
30. [Fraser, S. A., Karimi, R, Michalak M, Hudig, D](#). (2000) *Perforin lytic activity is controlled by calreticulin*. J. Immunol. 164. 4150-4155
31. Frey , M. R. et al. *Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium*. J. Cell Biol. 151. 763-777 (2000)
32. [Frey MR, Saxon ML, Zhao X, Rollins A, Evans SS, Black JD](#). (1997) *Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21(waf1/cip1) and p27(kip1) and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells*. [J Biol Chem](#). Apr 4;272(14):9424-35
33. Gelebart, P., Opas, M., Michalak, M. (2005). *Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-binding chaperone of the endoplasmic reticulum*. The International Journal fo Biochemistry & Cell Biology. 37 260-266
34. Geneser, F. (2000). *Histología*. 3a ed. Ed. Panamericana.
35. [Gökmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP](#). (2001) *Elevated protein kinase C beta11 is an early promotive event in colon carcinogenesis*. [Cancer Res](#). Feb15;61(4):1375-81.
36. [Gray AJ, Park PW, Broekelmann TJ, Laurent GJ, Reeves JT, Stenmark KR, Mecham RP](#). (1995) *The mitogenic effects of the B beta chain of fibrinogen are mediated through cell surface calreticulin*. J. Biol. Chem. 270. 26602-26606.
37. Gregorieff A, Clevers H. (2005) *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*. Genes Dev. Apr 15;19(8):877-90. Review.
38. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. (2005) *Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine*. Gastroenterology. Aug;129(2):626-38.

39. Griner, E. M. & Kazanietz, M. G. (2007). *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer*. Nature Reviews. Cancer. Vol. 7. April. 281-294.
40. [Guan, L.](#), [Song, K.](#), [Pysz, M. A.](#), [Curry, K. J.](#), [Hizli, A. A.](#), [Danielpour, D.](#), [Black, A. R.](#), [Black, J. D.](#) (2007) *Protein kinase C-mediated down-regulation of cyclin D1 involves activation of the translational repressor 4E-BP1 via a phosphoinositide 3-kinase/Akt-independent, protein phosphatase 2A-dependent mechanism in intestinal epithelial cells*. [J Biol Chem](#). May 11; 282(19):14213-25
41. Hanahan, D. And Weimberg, R. A. (2000) *The hallmarks of cancer*. Cell 100, 57-70
42. Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, and Ware JA. (1997) *Enhancement of Migration by protein kinase Ca and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells*. J Biol Chem 272:7390–7397,
43. Holaska, J. M., Black BE, Rastinejad F, Paschal BM. (2002) *Ca<sup>2+</sup>-dependent nuclear export mediated by calreticulin*. Mol Cell Biol. Sep;22(17):6286-97.
44. Holaska, J.M., Black, B. E., Love, D. C., Hanover, J. A., Leszyk. J., Paschal, B. M. (2001) *Calreticulin Is a receptor for nuclear export*. J Cell Biol. Jan 8;152(1):127-40.
45. House, C, Kemp, B. E. (1987) *Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain*. Science. Dec 18;238(4834):1726-8.
46. [http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/diciembre/b006\\_2006.html](http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/diciembre/b006_2006.html)
47. Jazii FR, Najafi Z, Malekzadeh R, Conrads TP, Ziaee AA, Abnet C, Yazdznbod M, Karkhane AA, Salekdeh GH. (2006) *Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer*. World J Gastroenterol. Nov 28;12(44):7104-12.
48. Jiang, X. H. et al. (2004) *Antisense targeting protein kinase C $\alpha$  and  $\beta$ [1] inhibits gastric carcinogenesis*. Cancer Res. 64, 5787-5794
49. John, L. M., Lechleiter, J. D. and Camacho, P. (1998) *Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin*. Journal of Cell Biology. Aug 24;142(4):963-73.
50. Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., and Eggleton, P. (2001). *The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space*. Trends in Cell Biology. Vol. 11 No. 3
51. Kageyama K, Ihara Y, Goto S, Urata Y, Toda G, Yano K, Kondo T (2002) *Overexpression of calreticulin modulates protein kinase B/Akt signaling to promote apoptosis during cardiac differentiation of cardiomyoblast H9c2 cells*. J Biol Chem. 2002 May 31;277(22):19255-64. Epub Mar 20
52. Kaneda A., Feinberg A.P. (2005) *Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk*. Cancer Res. Dec 15;65(24):11236-40. Review.
53. [Kato, M.](#), [Kato, M.](#) (2007) *WNT signaling pathway and stem cell signaling network*. [Clin Cancer Res](#). Jul 15;13(14):4042-5
54. Kazanietz M. G. Areces L. B., Bahador A., Mischak H., Goodnight K., Muschinski K. F., and Blumberg P. M. (1993) *Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependdnt and calcium-independent protein kinase C isozymes*. Mol. Pharmacol. 44, 298-307
55. Keranen, L. M., and Newton A. C. (1997) *Ca<sup>2+</sup> differentially regulates conventional protein kinase Cs' membrana interaction and activation,*. J. Biol. Chem. 272, 25959-25967
56. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. (2000) *The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends Genet. Jul;16(7):279-83.
57. Kuwabara K, Pinsky DJ, Schmidt AM, Benedict C, Brett J, Ogawa S, Broekman MJ, Marcus AJ, Sciacca RR, Michalak M, et al. (1995) *Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric*

- oxide production, and limits thrombosis in canine coronary arteries. *J Biol Chem.* Apr 7;270(14):8179-87.
58. [Kwon, M. S., Park, C. S., Choi, K., Ahn, J., Kim, J. I., Eom, S. H., Kaufman, S. J., Song, W. K.](#) (2000) *Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin – mediated calcium signaling.* *Mol. Biol. Cell.* 11. 1433-1443
  59. Lewin, B. (2000). *Genes VII.* Oxford University Press
  60. Li J, Puceat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME.(2002) *Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis.* *J Cell Biol.* Jul 8;158(1):103-13. Epub 2002 Jul 8.
  61. Liu H, Bowes RC 3rd, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL. (1997) *Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca2+ disturbances, and cell death in renal epithelial cells.* *J Biol Chem.* Aug 29;272(35):21751-9.
  62. Liu N, Fine RE, Simons E, Johnson RJ. (1994) *Decreasing calreticulin expression lowers the Ca2+ response to bradykinin and increases sensitivity to ionomycin in NG-108-15 cells.* *J Biol Chem.* Nov 18;269(46):28635-9.
  63. Lucas M and Sanchez-Margalet V. (1995) *Protein kinase C involvement in apoptosis.* *Gen Pharmacol* 26: 881–887,
  64. Lynch, J., Guo, L., Gelebart, P., Chilibeck, K., Xu, J., Molkenin, J. D., Agellon, L. B., Michalak, M. (2005) *Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca(2+)-dependent signaling cascade.* *J Cell Biol.* Jul 4;170(1):37-47.
  65. Matsuoka K, Seta K, Yamakawa Y, Okuyama T, Shinoda T, Isobe T. (1994) *Covalent structure of bovine brain calreticulin* *Biochem J.* Mar 1;298 ( Pt 2):435-42
  66. McCauliffe, D. P., Yang Y. S., Wilson, J., Sontheimer, R. D., and Capra, J. D. (1992) *The 5'-flanking region of the human calreticulin gene shares homology with the human GRP78, GRP94, and protein disulfide isomerase promoters.* *J Biol Chem.* 1992 Feb 5;267(4):2557-62.
  67. McCormick, F. *Signalling networks that cause cancer.* Millenium Issue. Elsevier Science. M53-M56. 1999
  68. Medkova, M, and Cho, W. (1998) Mutagenesis of the C2 domain of protein kinase C- $\alpha$ . Differential roles of Ca<sup>2+</sup> ligand and membrane binding residues. *J Biol. Chem* 273, 17544-17552
  69. Mesaeli N., Nakamura K., Zvaritch E., Dickie P., Dziak E., Krause K.H., Opas M., MacLennan D.H., and Michalak M. (1999) *Calreticulin is essential for cardiac development.* *J. Cell Biol.* 144. 857-868.
  70. Mesaeli N., Phillipson, C. (2004) *Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin – deficient cells.* *Mol. Biol. Cell.* 15. 1868-1870.
  71. Michalak, M., Corbett, E., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M. (1999). *Calreticulin: one protein,, one gene, many functions.* *Biochemistry Journal.* 344, 281-292
  72. Mischak H, Goodnight J, Henderson DW, Osada S, Ohno S, Mushinski JF. (1993) Unique expression pattern of protein kinase C- $\theta$ : high mRNA levels in normal mouse testes and in T-lymphocytic cells and neoplasms. *FEBS Lett.* Jul 12;326(1-3):51-5.
  73. Mochly-Rosen, D. (1995). *Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction.* *Science* 268, 247-251.
  74. Molina M.C., Ferreira V., Valck C., Aguilar L., Orellana J., Rojas A., Ramirez G., Billela R., Schwaeble W., Lemus D., Ferreira A. (2005) *An in vivo role for Trypanosoma cruzi calreticulin in antiangiogenesis.* *Mol. Biol Par.* 140. 133-140..
  75. Montcouquiol, M., Crenshaw E. B., Kelley, M. W. (2006) *Noncanonical Wnt signaling and neural polarity.* *Annu Rev Neurosci.*;29:363-86
  76. Nakamura K., Bossy-Wetzels, E., Burnsa, K., Fadeld, M. P., Lozykd, M., Gopingb, I. S., Opasd, M., Bleackleyb, C., Greenc, D. and Michalak, M. (2000) *Changes in*

- Endoplasmic Reticulum Luminal Environment Affect Cell Sensitivity to Apoptosis* The Journal of Cell Biology, Volume 150, Number 4, August 21, 731-740
77. Nash P.D., Opas M and Michalak M. (1994) *Calreticulin: not just another calcium-binding protein*. Mol. Cell. Biochem. 135. 71-78.
  78. Nelson D., & Cox M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers
  79. Newton, A. C. (1993) *Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 1-25
  80. Newton, A.C. (2003). *Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm*. Biochem. J. 370, 361-371
  81. Nigam SK, Goldberg AL, Ho S, Rohde MF, Bush KT, Sherman M., Yu (1994) *A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca(2+)-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily*. J Biol Chem. Jan 21;269(3):1744-9.
  82. Nishizuka, Y. (1995) *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses*. FASEB J. 9, 484-496..
  83. Nowell, P. C. (1974) *The clonal evolution of tumour cell populations*. Science 94, 23-28
  84. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. (2006) *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med. 2007 Jan;13(1):54-61. Epub Dec 24.
  85. Okunaga T, Urata Y, Goto S, Matsuo T, Mizota S, Tsutsumi K, Nagata I, Kondo T, Ihara Y. (2006) *Calreticulin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum, Modulates Radiosensitivity of Human Glioblastoma U251MG Cells* Cancer Res. Sep 1;66(17):8662-71.
  86. Ono Y., Fujii T., Igarashi K., Kuno T., Tanaka C., Kikkawa U., and Nishizuka Y. (1989) *Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cystein-rich zinc-finger-like sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4868-4871
  87. Orr, J. W., and Newton, A. C. (1992) *Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 1. Cooperativity in lipid binding*. Biochemistry 31, 4661-4667
  88. Oster, H., Leitges, M. (2006) *Protein kinase C $\alpha$  but not PKC $\zeta$  suppresses intestinal tumor formation in Apc<sup>Min/+</sup> mice*. Cancer Res. 66: 6955-6963.
  89. Ostwald, T., J. and MacLennan, D.,H. (1974) *Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum*. J. Biol. Chem. 249, 974-979.
  90. Paschal M. B, Black E. B., Afshar N. (2005) *Retrotranslocation of the Chaperone Calreticulin from the Endoplasmic Reticulum Lumen to the Cytosol*. Molecular and Cellular Biology. 25, 8844 – 8853.
  91. Pike E.S., Yao L., Setsuda J., Jones K.D., Cherney B., Appella E., Sakaguchi K., Nakhasi H., Atreya C.D., Teruya-Feldstein J., Wirth P., Gupta G., Tosato G. (1999) *Calreticulin and Calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth*. Blood. 94:7. 2461-2468.
  92. Ponder A. J. (2001) *Cancer genetics*. Nature. Vol 411 May
  93. Potten C.S. (1998) *Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death*. Philosophical transactions of the Royal Society. Biol. Sci. Jun29;353 (1370):821-30
  94. Radtke F, Clevers H. (2005) *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin* Science. Mar 25;307(5717):1904-9. Review
  95. Rendón-Huerta, E., Mendoza-Hernández, G. and Martha Robles-Flores. (1999) *Characterization of Calreticulin as a Protein Interacting with Protein Kinase C*. Biochemical Journal 344(2): 469-475.
  96. Robles-Flores M., Castañeda-Patlán M. C., González-Aguilar H. and Flores G.. (2004). *Molecular characterization of the interaction between calreticulin and protein kinase C*



- in the Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins. Medimond International Proceedings E803C0197: 159-164
97. Roderick, H. L., Campbell A. K. and Llewellyn D. H. (1997) *Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors* FEBS Letters Volume 405, Issue 2, 24 March, Pages 181-185
  98. Rooke K, Briquet-Laugier V, Xia YR, Lulis AJ, Doolittle MH. (1997) *Mapping of the gene for calreticulin (Calr) to mouse chromosome 8. Mamm Genome.*;8(11):870-1
  99. Samuel, S. K., Minish, T. M., and Davie, J. R. (1997) *Altered nuclear matrix profiles in oncogene-transformed mouse fibroblasts exhibiting high metastatic potential.* Cancer Res., 57: 147-157
  100. Sarvaiya HA, Yoon JH, Lazar IM. (2006) *Proteome profile of the MCF7 cancer cell line: a mass spectrometric evaluation.* Rapid Commun Mass Spectrom.;20(20):3039-55.
  101. Sossin, W. S. and Schwartz J. H. (1999) *Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence.* Trends Biochem. Sci. 18, 207-20820
  102. Toker A. (1998) *Signaling through protein kinase C.* Front Biosci. Nov 1;3:D1134-47.
  103. Toquet C, Jarry A, Bou-Hanna C, Bach K, Denis MG, Mosnier JF, Laboisie CL. (2007) *Altered Calreticulin expression in human colon cancer: maintenance of Calreticulin expression is associated with mucinous differentiation.* Oncol Rep. May;17(5):1101-7.
  104. Uht R. M., Amos S., Martin P. M., Riggan A. E., Hussaini I. M. (2006) *The protein kinase C-eta isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway.* Oncogene. May 3;26(20):2885-93. Epub Dec 4.
  105. Veeman M. T., Axelrod J. D. Moon R. T. (2003) *A Second Canon: Functions and Mechanisms of  $\beta$ -Catenin-Independent Wnt Signaling.* Developmental Cell, Vol. 5, 367–377, September,
  106. Waser M, Mesaeli N, Spencer C, Michalak M. (1997) *Regulation of calreticulin gene expression by calcium.* J Cell Biol. Aug 11;138(3):547-57.
  107. [www.atcc.org](http://www.atcc.org) American Type Culture Collection
  108. [www.dgepsi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm](http://www.dgepsi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm) Compendio Morbilidad/Mortalidad 2001.
  109. Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K, Lee I. (2000) *Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma.* Cancer Res. Feb 15;60(4):1117-20.
  110. Zapun A., Darby N.J., Tessier D.C., Michalak M., Bergeron J.J.M. and Thomas D. (1998) *Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57.* J.Biol. Chem. 273. 6009-6012.
  111. Zhang, G, Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Hurley, J. H., (1995) *Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester.* Cell. Jun 16;81(6):917-24.
  112. Zhang, J., Anastasiadis, P. Z., Liu, Y., Thompson, E. A. & Fields, A. P. (2004) *Protein kinase C (PKC)  $\beta$ II induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC $\alpha$ /Rac 1 dependent signaling pathway.* J. Biol. Chem, 279, 22118-22123
  113. [Zhu, Q., Zelinka P., White, T., Tanzer, M. L.](#) (1997) *Calreticulin – integrin bidirectional signaling complex.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 232. 354-358.