



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL PAPEL QUE JUEGA LA PROTEINA CINASA C EN LA  
ACTIVACIÓN DE LA PROTEINA DISHEVELLED EN LA RUTA DE  
SEÑALIZACION WNT

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
DORA MARIA VELAZQUEZ HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR  
DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS  
INMEGEN  
DR. JESUS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2018



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.

## INDICE

	Número de página
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	5
1.-ANTECEDENTES	5.5
2.-INTRODUCCIÓN	6
2.1 El Colon.	7
2.2 Cáncer de Colon y Recto.	7
2.3 Vía de señalización Wnt canónica.	9
2.4 Vías Wnt no canónicas.	10
2.5 La proteína Dishevelled (Dvl).	11
2.6 Regulación de Dvl por degradación.	13
2.7 Regulación de Dvl por fosforilación.	14
2.8 Proteina cinasa C.	14
2.9 Proteina cinasa C zeta (PKC $\zeta$ ).	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVO GENERAL	18
4.1 Objetivos específicos.	18
5. MATERIALES Y METODOS	18
5.1 Reactivos y anticuerpos.	19
5.2 Plásmidos.	19
5.3 Análisis <i>in silico</i> .	19
5.4 Cultivo Celular.	19
5.5 Inmunoprecipitación.	19
5.6 Transfección.	20
5.7 Silenciamiento de la expresión de PKC $\zeta$ .	20
5.8 Inhibición farmacológica de PKC.	21
5.9 Western blot.	21
5.10 Ensayo de inmunofluorescencia.	21
5.11 Aislamiento y purificación de PKC a partir de hepatocitos de rata.	22
5.12 Ensayo de actividad in Vitro de PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$ .	22
5.13 Analisis estadísticos.	23
6. RESULTADOS	23
6.1 DVL tiene una alta probabilidad de ser fosforilada por PKC.	23
6.2 Las isoformas de Dvl 1, 2 Y 3 están sobre-expresadas en las células de cáncer de colon.	25
6.3 El curso temporal con el tratamiento del ligando Wnt3a en las células RKO induce la fosforilación de Dvl2 y Dvl3, lo que resulta en la estabilización de los niveles de proteína de Dvl.	26
6.4 Purificación y expresión de la proteína Dvl3-GST.	28
6.5 PKC $\epsilon$ y PKC $\beta$ fosforilan a Dvl3 in vitro.	29

6.6 La fosforilación de Dvl 3 inducida por Wnt3a puede ser bloqueada por la inhibición farmacológica de PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ y PKC $\zeta$ .	30
6.7 Dvl3 Interacciona con PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ y PKC $\zeta$ en Células Malignas.	33
6.8 PKC fosforila a Dvl y afecta su estabilización.	34
6.9 PKC $\delta$ también fosforila a Dvl.	
6.10 La fosforilación de Dvl3 mediada por PKC $\zeta$ se requiere para evitar su degradación a través del proteasoma.	36
6.11 Mapeo de la interacción entre los dominios de Dvl y PKC $\zeta$ : El dominio DIX se requiere para estabilizar a Dvl2 y Dvl3 fosforilados por PKC $\zeta$ , pero no es la región fosforilada por PKC $\zeta$ en Dvl3.	39
6-12.-La actividad de PKC y el dominio DIX de Dvl son necesarios para activar la señalización Wnt canónica.	41
6.13 Mapeo de los dominios de interacción entre Dvl y PKC $\zeta$ : El dominio DEP interactúa con PKC $\zeta$ .	43
7.- DISCUSION	45
8.- MODELO	47
9.- CONCLUSIONES	48
10.-PERSPECTIVAS	48
11.-REFERENCIAS	48

## ABSTRACT

Dishevelled (Dvl) proteins are central mediators of both canonical and non canonical Wnt signaling. It is well known that, upon Wnt stimulation, Dvl becomes phosphorylated. However, how Wnt-induced phosphorylation of Dvl is regulated and its consequences are poorly understood. Here we found that Dvl proteins are overexpressed in colon cancer cells, in addition, we found that Wnt3a treatment rapidly induces hyperphosphorylation and stabilization of Dvl2 and Dvl3. The latter can be blocked by inhibition of Protein Kinase C (PKC) $\alpha$ , PKC $\delta$  and PKC $\zeta$  isoforms. We also found that Wnt3a-induced phosphorylation of Dvl3 by PKC $\delta$  is required to avoid Dvl3 degradation via proteasome. This demonstrated, to our knowledge for the first time, that hyperphosphorylation of Dvl by PKC $\delta$ , results in Dvl stabilization. This is clear contrast with the consequences reported to date of CK1 $\delta/\epsilon$ -mediated Dvl phosphorylation upon Wnt treatment. Mapping the interaction domain between PKC $\zeta$  and Dvl3 indicated that, although the Dvl-DIX domain is required to stabilize PKC $\zeta$ -phosphorylated Dvl, it is not the region phosphorylated by this kinase. Our data show that the Dvl-DEP domain, required for specific interaction with PKC $\zeta$ , is the site phosphorylated by the kinase, and also probably the Dvl-C terminus. Our findings suggest a model of positive regulation of PKC $\zeta$ -mediated Dvl signaling activity, to produce a strong and sustained response to Wnt 3a treatment by stabilizing Dvl protein levels.

## ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
APC	Poliposis adenomatosa del colon
Ca	Calcio
Cdc42	Fosfatasa de guanosina pequeña
CaMKII	Proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CK1 $\alpha$	Cinasa de caseína 1 $\alpha$
CK1 $\delta$	Cinasa de caseína 1 $\delta$
CK1 $\epsilon$	Cinasa de caseína 1 $\epsilon$
CK2	Cinasa de caseína 2
CUCI	Colitis ulcerativa crónica
Dsh	Dishevelled de Drosophila
DSV	Dominio Dishevelled
Dvl	Dishevelled
Dvl-DEP	Dominio DEP de la proteína Dishevelled
Dvl-DIX	Dominio DIX de la proteína Dishevelled
Dvl-PDZ	Dominio PDZ de la proteína Dishevelled
Dvl1	Dishevelle 1
Dvl2	Dishevelle 2
Dvl3	Dishevelled 3
FLAG- $\Delta$ Cter-Dvl3	Carboxilo terminal de la proteína Dishevelled 3 con una bandera
Fz	Receptor de siete dominios transmembranales Frizzled
GSK3 $\beta$	Glucogeno sintasacinas tres $\beta$
GTP	Trifosfatasa de guanosina
IP3	Inositol trifosfato,
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal JNK
LEF	Factor de unión al potenciador linfoide
LRP5/6	Proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad 5 o 6
MMR	Genes de reparación
MSI	Inestabilidad microsatelital
PAR 1	Receptor que activa Proteasa 1
PKC	Proteína Cinasa C
PKC	Proteína Cinasa C alfa
PKC $\beta$	Proteína Cinasa C beta
PKC $\delta$	Proteína Cinasa C delta
PKC $\epsilon$	Proteína Cinasa C epsilon
PKC $\zeta$	Proteína Cinasa C zeta
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
Rac	Fosfatasa de guanosina pequeña
RhoA	Fosfatasa de guanosina pequeña
RhoU	Fosfatasa de guanosina pequeña
ROR	Receptor de cinasa de tirosina
Xdsh	Dishevelled de Xenopus
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Wnt3a	Ligando Wnt

## 1. ANTECEDENTES

El cáncer de colon es un problema de salud pública en México (1). El epitelio del colon es un sistema de renovación continua que mantiene un estricto balance entre autorenovación, proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Existe evidencia experimental *in vivo*, que ha demostrado que la ruta de señalización Wnt, juega un papel esencial en la homeostasis de tejidos de auto-renovación, como el epitelio intestinal. La pérdida de control en esta vía comúnmente conduce a cáncer( 2-4) .

Se ha demostrado que la fosfoproteína Dishevelled (Dvl) es esencial para la transducción de la señalización Wnt tanto canónica como no canónica. Esta proteína tiene tres dominios altamente conservados en la escala evolutiva, y estos dominios le permiten la interacción con una gran cantidad de proteínas, permitiendo así llevar a cabo sus funciones. Existen tres isoformas de proteínas Dvls en los humanos y la expresión de las tres Dvls cambia en varios tipos de cáncer (5), lo que sugiere que muy probablemente la participación de esta proteína de la vía Wnt en cáncer sea de suma importancia.

La evidencia hasta ahora muestra que, Dvl actúa río abajo del receptor Frizzled para ligandos Wnt y que además se requiere para la estabilización del complejo de transcripción de genes blanco de la vía Wnt (6).

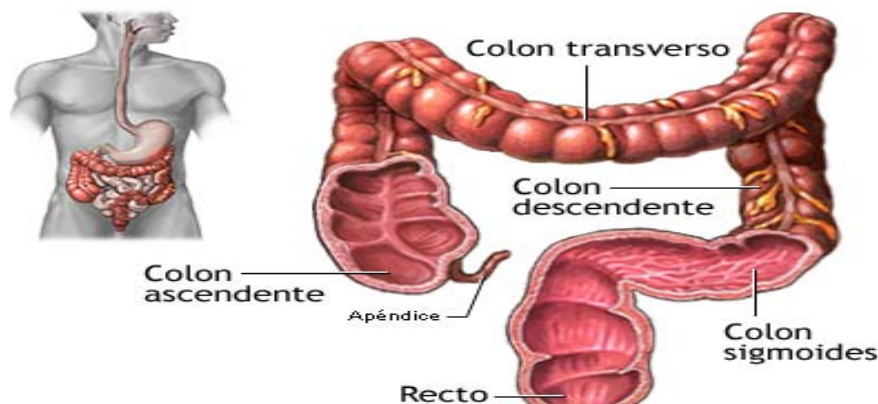
Desde hace mucho tiempo se sabe que esta proteína necesita estar fosforilada para llevar a cabo sus funciones. Las cinasas que hasta la fecha se ha demostrado que fosforilan a Dvl y regulan la señalización Wnt son: Las cinasas de Caseína 1 epsilon y delta (CK1  $\epsilon$  y  $\delta$ ), CK2, PAR 1 y PKC(6). Existen dos evidencias experimentales que demuestran que PKC fosforila a Dvl. En el 2001, Kuhl et al (7), reportó que la PKC $\alpha$  fosforila a dishevelled de *Xenopus* (Xdsh) *in vitro*, y posteriormente Kinoshita en el 2003 (8) demostró que la proteína cinasa C delta fosforila *in vivo* a Xdsh en *Drosophila*. En los últimos años en nuestro laboratorio se ha demostrado que PKC $\zeta$  regula positivamente la vía de señalización Wnt regulando la localización nuclear de  $\beta$ -catenina y la actividad de GSK3 $\beta$  en células de cáncer de colon. En este trabajo se demostró que PKC $\zeta$  fosforila a Dvl y que esta fosforilación es muy importante para la regulación positiva de la vía de señalización Wnt.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 El Colon

El colon es la última parte del sistema digestivo, su tamaño es aproximadamente de 1,5 metros de largo, con un diámetro aproximado de 6,5 centímetros.

El colon humano y de los mamíferos se puede dividir en cuatro secciones, el colon ascendente, el transverso, el descendente y el sigmoide, como se observa en la figura 1. El colon es la parte del intestino grueso, que está situada entre el ciego y el recto. El colon funciona como el órgano para almacenar los productos de desecho, reabsorber el agua a partir de los desechos y mantener el balance del agua en el cuerpo. Además de esto, favorece el crecimiento de las bacterias y otros microorganismos beneficiosos, que ayudan a fermentar el material no digerido y absorber los alimentos. Estas bacterias también ayudan a controlar el crecimiento de las bacterias dañinas, y a mantener el equilibrio del pH en el cuerpo. Los electrolitos vitales y algunas vitaminas, especialmente la vitamina B y la vitamina K, que son necesarias para la coagulación de la sangre, que se absorben en el colon (9).



**Figura 1.-** El colon es la parte del intestino grueso situado entre el ciego y el recto, cuenta con cuatro segmentos: ascendente, trasverso, descendente y sigmoide; y su función es absorber algunos nutrientes, agua y sal de los alimentos.

### 2.2 Cáncer de Colon y Recto.

El cáncer de colon y recto ocupa el tercer lugar en frecuencia de cáncer en México y a nivel mundial (1), y esta neoplasia es responsable de 700 000 muertes en el mundo cada año (1).

El cáncer de colon y recto se presenta principalmente en personas mayores de 50 años. Es más común en países industrializados donde la dieta es rica en colesterol y pobre en fibra. Mas del 95% de los cánceres de colon y recto comienzan en las glándulas productoras de moco que protege el interior del colon y el recto; a este tipo de cáncer se le conoce como adenocarcinoma.

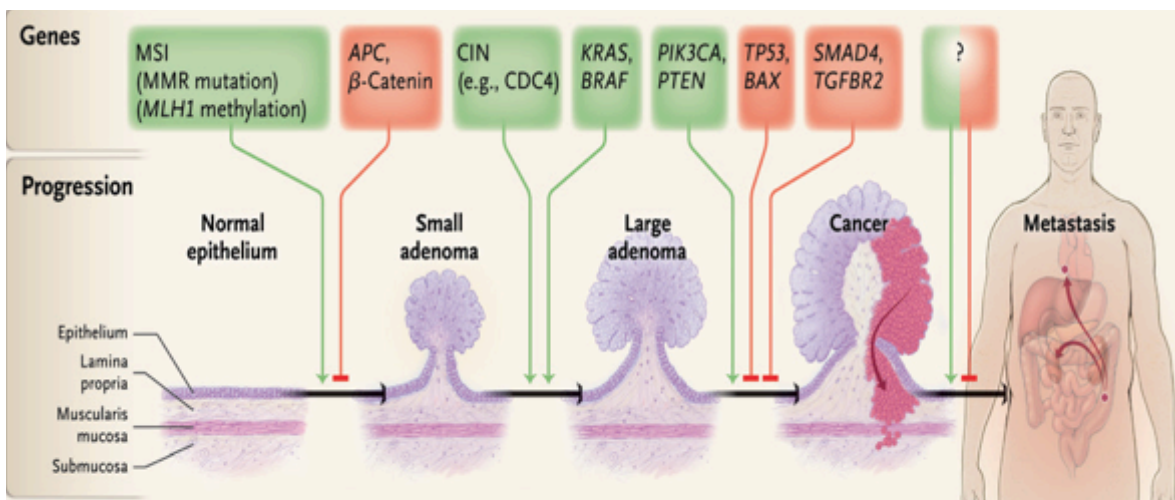
Por sus características clínicas y genéticas el cáncer de colon y recto se divide en: esporádico, familiar, hereditario y el relacionado con enfermedades inflamatorias



como la colitis ulcerativa crónica inespecífica (CUCI) y la enfermedad de Crohn (1).

El cáncer de colon y recto presenta múltiples alteraciones, como: activación aberrante de proto-oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores, mutaciones en genes de reparación de DNA, inestabilidad cromosómica, metilación aberrante del DNA, y la desregulación de las vías de señalización intracelulares, entre las que típicamente se encuentra la vía de señalización Wnt. Todas estas alteraciones promueven el fenotipo oncogénico, el cual está caracterizado por proliferación celular libre de anclaje, evasión de la apoptosis, invasión y metástasis, angiogénesis, resistencia a múltiples fármacos y evasión a la vigilancia inmunológica (10).

### Progresión del cáncer de colon



Markowitz, D. et al (2009)

**Figura 2.-** En la parte superior de esta imagen se pueden observar los genes que presentan alteraciones genéticas que promueven el cáncer de colon. La inestabilidad microsatelital (MSI) se inicia con la mutación de los genes de reparación (MMR) o por la metilación aberrante de MLH1. La mutación más común del cáncer de colon es la de APC seguida por la de β-catenina. Las vías de señalización claves que se alteran durante el desarrollo de esta neoplasia se muestran en los recuadros siguientes a los que muestran a APC y β-catenina. En el último recuadro se puede observar un signo de interrogación que indica que los cambios genéticos y epigenéticos específicos que llevan hacia la progresión de la metástasis aún no han sido identificados en su totalidad.

El tracto intestinal está formado por una monocapa de células epiteliales organizadas en una estructura bidimensional plegada en crestas y en invaginaciones denominadas criptas de Lieberkühn. Las células epiteliales del colon están sujetas a una continua renovación y se originan a partir de células troncales durante toda la vida del organismo. La homeostasis del epitelio intestinal se fundamenta en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis, por lo que representa un atractivo modelo para el estudio integrado de la homeostasis de estos procesos celulares. La evidencia experimental actual indica que la ruta de señalización “Wnt” es la fuerza principal en el control de esta homeostasis, y que cuando está alterada se produce cáncer (2-4).

La relevancia biológica de la vía Wnt en el colon se estableció hace más de una década, cuando se encontró que el gen que codifica para la proteína supresora tumoral APC (Adenomatous Polyposis Coli) estaba mutado en un número abrumador de casos de carcinoma de colon hereditarios o esporádicos (1,2). Estudios moleculares, han demostrado mutaciones activadoras de la vía Wnt en aproximadamente el 90% de los casos.

### **2.3 Vía de señalización Wnt canónica**

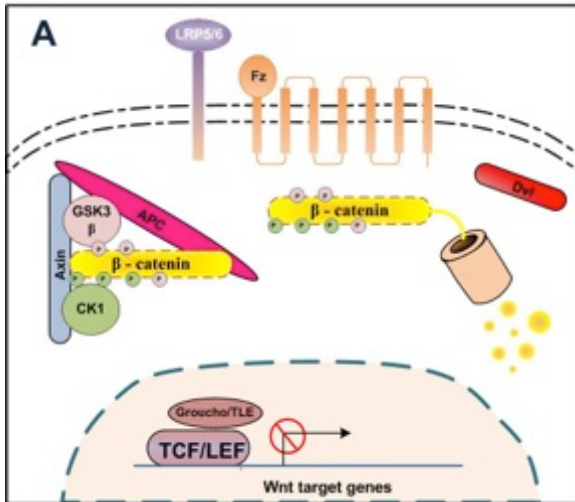
La vía de señalización Wnt está implicada en una variedad de procesos celulares tales como la proliferación celular, diferenciación, sobrevivencia, apoptosis y movilidad celular. El elemento distintivo de la vía Wnt canónica es la regulación de los niveles y de la localización intracelular del co-activador transcripcional  $\beta$ -catenina (2). Sin embargo, los ligandos Wnt pueden producir respuestas independientes de  $\beta$ -catenina, procesos conocidos como vías de señalización Wnt no canónicas, que se han implicado en la modulación negativa de la vía canónica y de promover la invasión y metástasis de las células cancerosas (3).

Los genes Wnt, de los cuales se conocen 19 en el humano, codifican para glucoproteínas ricas en cisteína. La producción de Wnts biológicamente activos depende de su palmitoilación en residuos de cisteína conservados. En ausencia de ligandos Wnt, la proteína  $\beta$ -catenina es degradada por un complejo de proteínas que incluye axina, al supresor tumoral APC, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y dos cinasas: la glucógeno sintetasa cinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y la cinasa de caseína  $1\alpha$  (CK1 $\alpha$ ). La fosforilación secuencial de  $\beta$ -catenina dentro de este complejo, primero por CK1 $\alpha$  y luego por GSK3 $\beta$ , provoca su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma; como resultado, en condiciones basales los niveles de  $\beta$ -catenina citosólicos se encuentran bajos (2-4 y 6).

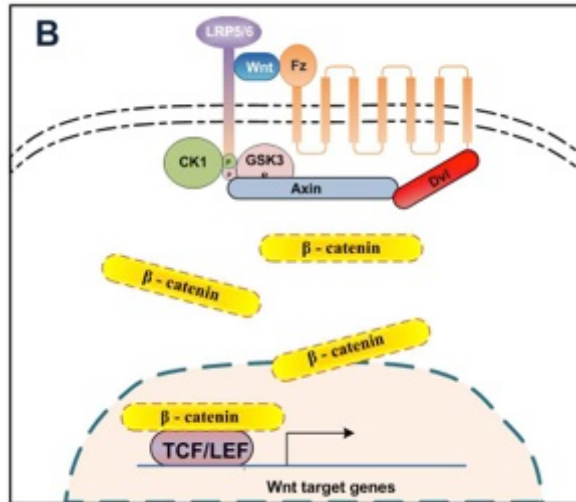
En la vía canónica los ligandos Wnt inician la señalización con la unión al receptor de siete dominios transmembranales Frizzled (Fz) y con la proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad (LRP5/6), que en el caso del colon es LRP5. Después de la unión del ligando al receptor se inicia el reclutamiento de las proteínas Dishevelled (Dvl), Axina, APC, GSK3 $\beta$  y CK1 hacia la membrana plasmática, las cuales forman parte del complejo de destrucción del cofactor  $\beta$ -catenina. Estos eventos permiten la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citosol y su posterior translocación hacia el núcleo en donde se une con los miembros de la familia de factores de transcripción TCF/LEF (lymphoid enhancer-binding factor (LEF)/ T-cell factor (TCF). La unión del factor de transcripción y  $\beta$ -catenina provoca la transcripción de programas de expresión génica involucrados principalmente en proliferación, tales como el oncogen *c-myc*, ciclina D1, entre otros (2-4).

## Vía canónica

En ausencia del ligando Wnt



En presencia del ligando Wnt



Kafka, et al. (2014)

**Figura 3.-** En esta figura se observa la vía de señalización Wnt y sus componentes. En el recuadro A, la ausencia del ligando Wnt promueve que el complejo de destrucción de β-catenina, el cual está conformado por AXINA1, APC, CK1 y GSK3β, fosforilen y ubiquiten a β-catenina para su degradación en el proteasoma, en el recuadro B se muestra la unión del ligando Wnt al receptor Frizzled (FZ) y al correceptor LRP5/6, lo que permite el reclutamiento de Dvl a la membrana para unirse con FZ y AXINA. Esto desactiva la formación del complejo de destrucción de β-catenina, permitiendo que la β-catenina se acumule en el núcleo donde activa los genes diana de Wnt al unirse al factor (LEF / TCF).

### 2.4 Vías Wnt no canónicas

Alternativamente, los Wnt pueden unirse solamente al receptor Frizzled, formando complejo con otros co-receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina como el co-receptor ROR, para producir respuestas independientes de β-catenina. Se ha descrito que la interacción de ciertos ligandos Wnt con Frizzled transducen señales vía proteínas G heterotriméricas produciendo IP3 y movilización de calcio a través de la activación de la fosfolipasa C. La producción de Ca<sup>++</sup> y de diacilglicerol por esta vía denominada Wnt no canónica, lleva a la activación de la proteína cinasa C (PKC) y de otras cinasas dependientes de calcio (11), lo que abre la interesante posibilidad de una participación compartida de estas dos vías de señalización durante el desarrollo y progresión de la carcinogénesis colorectal. La vía de señalización independiente de β-catenina comúnmente es dividida en dos, la vía Wnt/JNK, en la cual está involucrada la cinasa c-Jun, que en *Drosophilla* es comúnmente llamada de polaridad celular (PCP) y sus efectos principalmente se encuentran involucrados en el rearrreglo de citoesqueleto. La otra vía se denomina dependiente de calcio Wnt/Ca<sup>2+</sup> acoplada a PKC y descrita en el párrafo anterior y se le ha relacionado con el desarrollo del embrión, principalmente es un tipo de movimiento morfogénico (extensión convergente), en

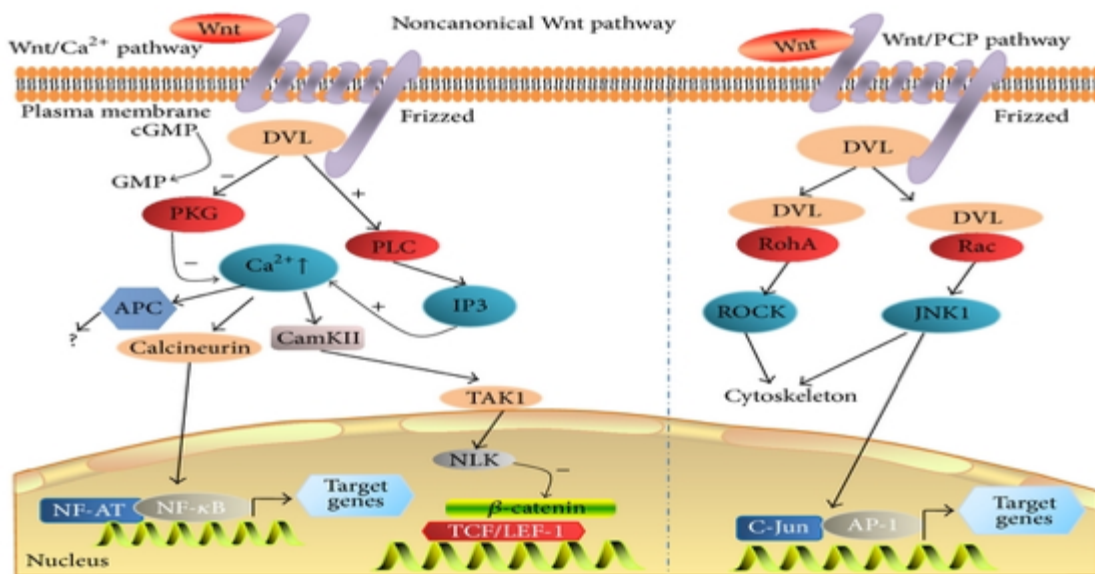
el cual, las células de una capa tisular se redistribuyen, de manera que la lámina disminuye su espesor (converge) y se elonga (extiende).

En las vías no canónicas la proteína dishevelled también es la encargada de la transducción de la señal, para lo cual necesita estar fosforilada para poder hacer la transducción de la señal a sus moléculas efectoras río debajo de ella, tales como las GTPasas pequeñas RhoA, RhoU, Rac y Cdc42, así como a PKC y a proteínas cinasas dependientes de calcio o del complejo Ca<sup>++</sup>/calmodulina. Aún se desconoce cómo es que Dishevelled transfiere la señal (11).

## Vía no canónica

Vía dependiente de calcio

Vía de polaridad celular



Shi J, et al. 2016

**Figura 4.-** En esta imagen se muestra la vía de señalización Wnt no canónica. El ligando Wnt no canónico (como el Wnt5a, un típico Wnt no canónico) se une a su receptor (Fzd) y coreceptor (Ror1 / 2) y desencadena las cascadas de señalización no canónicas, que incluye la de Wnt/Calcio (Ca<sup>2+</sup>) y Wnt/(PCP). En la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> que se puede observar del lado izquierdo, la proteína Wnt se une al receptor Fzd y Ror2 y permite activar a las proteínas G, resultando en un incremento en los niveles de calcio intracelular, o disminuye cGMP; la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) o la proteína cinasa C (PKC) se activan. En la vía Wnt/PCP que puede observarse en el lado derecho de esta imagen. Las proteínas Wnt se unen a los receptores Fzd en la superficie celular seguido por la activación de las GTPasas pequeñas Rho/Rac y la cinasa JNK para ayudar con la organización del citoesqueleto y la expresión génica.

### 2.5 La proteína Dishevelled (Dvl)

El primer alelo del gen de Dishevelled fue identificado en el año de 1959 por los investigadores Fahmy y Fahmy, cuando descubrieron un cambio en la orientación

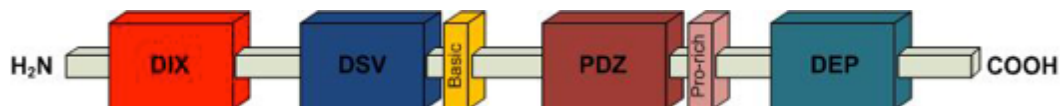
de las vellosidades del cuerpo y de las alas de *Drosophila*, pero fue hasta 1980 cuando realmente se le dió la importancia al gen de Dishevelled por el descubrimiento de su participación en el desarrollo del embrión, específicamente en la polaridad de los segmentos y en 1994 con experimentos genéticos en *Drosophila* se descubre que Dishevelled es parte de la vía de señalización Wnt canónica, y un año más tarde también se le relaciona en la vía de polaridad celular o vía Wnt no canónica. Con la clonación del gen de Dishevelled se dió a conocer una nueva proteína. Entre 1995 y 1997 varios investigadores descubrieron los genes homólogos en vertebrados (*Xenopus*, ratón y humano) desde entonces hasta ahora las investigaciones han demostrado que la proteína Dishevelled es un punto central en la vía de señalización Wnt (12).

En mamíferos existen tres genes de Dvl, Dvl1, 2 y 3, los cuales, a pesar de tener un alto grado de homología en su secuencia, no son del todo redundantes pues se ha demostrado que cada uno juega un papel único en la señalización Wnt, y tal vez por esta razón todos los sistemas celulares estudiados hasta ahora co-expresan las tres isoformas (14).

La proteína Dishevelled esta formada por cuatro dominios bien definidos (ver figura 5), al primero de ellos se le ha llamado dominio DIX (Axin Dishevelled), se encuentra en la parte amino terminal de la proteína y en Dvl1 este dominio tiene 85 aminoácidos, en Dvl2 y Dvl3 tienen 83 aminoácidos, este dominio es necesario para la dimerización dinámica con otras proteínas Dishevelled y con la proteína Axina para la formación del señalosoma en la vía de señalización Wnt. En la parte central de la proteína se encuentra el dominio PDZ (Postsynaptic density 95, Discs Large, Zonula occludens-1), que tiene 73 aminoácidos en las tres proteínas Dvl de humano; este dominio facilita la unión a otras proteínas, tales como las cinasas de cisteínas 1 y 2, proteínas fosfatasa (PP2C de serina y treonina), proteínas adaptadoras como  $\beta$ -arrestina, y al receptor Frizzeld. Este dominio tiene el papel de regulación, estabilización, localización y módulo de transducción de la señal (13).

En la parte mas cercana al carboxilo terminal se encuentra el dominio DEP (Dvl, Egl-10, Pleckstrin) con 75 aminoácidos en las tres Dvls de humanos, a este dominio se unen proteínas como Daam1, RhoA, entre otras. Este dominio también se encuentra en las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G o RGS, por experimentos hechos con mutantes se cree que DEP es importante para el reclutamiento de Dishevelled a la membrana (13).

Recientemente al parecer se encontró un cuarto dominio llamado dominio Dishevelled o DSV, pero su importancia funcional aún no esta clara. Adicionalmente Dvl contiene otras dos regiones de aminoácidos cargados positivamente. La primera de estas regiones se llama región básica y esta compuesta de residuos de serina y treonina y esta ubicado entre el domino DIX y el domino DSV. La segunda de estas regiones es una región rica en prolinas y se le ha llamado SH3, por su homología con *src* 3, esta región esta situada después del dominio PDZ.



**Figura 5.-** Esta imagen muestra los dominios de la proteína Dvl. En la parte más cercana al amino terminal se encuentra el dominio DIX, que es necesario para la dimerización con otras proteínas Dvl, así como para la unión con la proteína Axina. El siguiente dominio, que muy recientemente ha sido identificado y que se encuentra después del dominio DIX se llama dominio dishevelled (DSV) y aún falta investigar su función, inmediatamente después del dominio DSV se encuentra una región con residuos de serina y treonina. El dominio PDZ que se encuentra ubicado entre la región básica y la región rica en prolina, es el sitio de unión de diversas proteínas. Finalmente el dominio DEP se ubica hacia la parte del carboxilo terminal de la proteína y se encuentra involucrado en la transducción de la señal Wnt no canónica.

En células de mamífero se demostró que Dvl 2 en el núcleo interactuaba con c-Jun y  $\beta$  catenina, permitiendo la formación de un complejo estable  $\beta$  catenina/TCF, lo cual activa los genes Wnt (14). Adicionalmente a esta información se sabe que Dvl interactúa con algunos factores nucleares, tales como Hipk1 61 y XNET. Todo esto sugiere que Dvl participa en la regulación transcripcional de los genes Wnt.

## 2.6 Regulación de Dvl por degradación.

La actividad de la señalización de Dvl puede ser regulada por ubiquitinación, degradación de la proteína y por fosforilación. Durante los últimos diez años se han identificado ligasas de ubiquitina que regulan la actividad de Dvl. La estabilidad de Dvl puede ser controlada por degradación vía proteosoma o lisosoma-autofagia. Se han reportado muchas proteínas que interactúan con Dvl y facilitan su ubiquitinación y/o degradación. Un ejemplo de estas proteínas es NEDL1, una ligasa de ubiquitina tipo HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) de la subfamilia E3, NEDL1 ubiquitina a Dvl1 y contribuye a su degradación vía proteosoma.

Pricke 1 regula negativamente la vía Wnt, porque puede potenciar la degradación de Dvl3 a través de la vía de ubiquitinación. La baja regulación de Prickle 1 se ha correlacionado con la sobre-regulación de Dvl3 y la acumulación de  $\beta$ -catenina (6). Se han reportado otras ligasas de ubiquitina que interactúan con Dvl y regulan la vía de señalización Wnt estas proteínas son: KLHL12, ITCH, inversina, entre otras (15-18). Alternativamente la ubiquitinación de Dvl por la ligasa von Hippel-Lindau (pVHL) E3, promueve su degradación vía autofagia. La proteína Dapper1 que interactúa con Dvl, actúa como una proteína de andamiaje para promover la interacción entre pVHL y Dvl, facilitando así la degradación de las proteínas Dvl por autofagia.

Existen otras proteínas que interactúan con Dvl y que se ha sugerido que están involucradas con su estabilidad, pero los mecanismos por los cuales llevan a cabo su función aún no han sido elucidadas. Por ejemplo la proteína ANAPC2, una subunidad del complejo que promueve la anafase (APC/C) promueve la degradación de Dvl vía proteosoma promoviendo esto una baja regulación de la vía Wnt canónica, en células de humano y en el desarrollo de Xenopus. Hasta antes de este reporte nunca se había sugerido que la fosforilación de Dvl por una

cinasa como PKC, provocara la estabilidad de Dvl (6).

## 2.7 Regulación de Dvl por fosforilación

El estímulo de los ligandos Wnt inducen la fosforilación de Dvl, pero el papel de la fosforilación hasta la fecha permanece pobremente entendida. Se han reportado múltiples cinasas que fosforilan a Dvl y cómo estas cinasas regulan la señalización Wnt. Entre las cinasas que se han reportado que fosforilan a Dvl se encuentran PAR1, Plk1, PKC y CK1 y 2 (19-22). Sin embargo la mayoría de los reportes se han enfocado en las proteínas cinasas de caseína 1 y 2. Los primeros reportes demostraron que CK1  $\delta/\epsilon$  y CK2 eran responsables de la fosforilación de Dvl, esta fosforilación se observa como un cambio en la movilidad electroforética de la proteína (15-18). Sin embargo el autor Bernatik et al 2011. demostró que aunque la isoforma de CK1 es necesaria para que exista un cambio en la movilidad electroforética de Dvl, esta cinasa no se requiere para la actividad de Dvl3 en la vía de señalización Wnt canónica (dependiente de  $\beta$ -catenina). También la mayoría de los eventos de fosforilación detectados en Dvl no fueron promovidos por CK1 $\epsilon$ . Además estos mismos autores demostraron que la inhibición farmacológica o el bloqueo de la expresión de CK2 no bloqueó o disminuyó la formación de la P-Dvl inducida por Wnt, esto sugiere que existen otras cinasas que fosforilen a Dvl3 (20).

Las isoformas  $\epsilon$  y  $\delta$  de la cinasa de caseína se unen a Dvl y regulan positivamente la vía de señalización Wnt mediante la fosforilación de Dvl. A pesar de que se mutaron en la proteína recombinante de ratón Dvl 1 los dos sitios de fosforilación por CK1 $\epsilon$  (Ser 139 y Ser 142), la fosforilación de Dvl no se abatió por completo, lo que sugiere que existen otros sitios de fosforilación por la misma cinasa o muy probablemente es porque existen otras proteínas cinasas que fosforilen a Dvl y regulen a la vía de señalización Wnt (19-22).

## 2.8 Proteína cinasa C

La proteína cinasa C (PKC) fue descubierta hace más de 30 años como una nueva cinasa de residuos de serina y treonina. Posteriormente se encontró que fisiológicamente la holoenzima puede ser activada por calcio, lípidos de membrana (particularmente fosfatidilserina) y diacilglicerol. El hecho de que la actividad de PKC sea regulada por lípidos derivados de segundos mensajeros generados por eventos mediados por receptores sitúa a PKC en un punto crítico en muchas vías de transducción de señales. PKC representa una familia de proteínas cinasas relacionadas estructuralmente que juegan un papel clave en la regulación de diferentes funciones celulares, entre las que se pueden mencionar proliferación celular, control del ciclo celular, diferenciación, polaridad y sobrevivencia. El descubrimiento de que PKC fuera uno de los receptores celulares que mejor promueven tumores por esteres de forbol, fuertemente sugirió una relación de PKC y cáncer. Diversas isoenzimas de PKC participan en varios aspectos del fenotipo transformante, que incluye hiperproliferación, migración invasión, metástasis angiogénesis y resistencia a apoptosis. La alteración de la actividad de PKC, en la localización y expresión ha sido observada virtualmente en todos los

tipos de tumores examinados (23).

La superfamilia de PKC consiste de al menos 12 isoenzimas clasificadas de acuerdo a criterios estructurales y de activación. Las isoenzimas se han categorizado en tres subclases: proteínas cinasas C convencionales (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, y  $\gamma$ ) las cuales son reguladas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y  $\text{Ca}^{++}$ ; PKC nuevas (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , y  $\theta$ ) las cuales son reguladas por DAG y PS; y las PKC atípicas (aPKC:  $\zeta$  y  $\iota$ ,  $\lambda$ ) que requieren de PS para su activación. Los requerimientos de cofactores para la activación de las distintas isoenzimas difieren en función de cada subfamilia (figura 6). Así, el grupo de las PKCc requiere de fosfolípidos cargados negativamente, DAG o ésteres de forbol, y calcio. El grupo de las nPKC depende de fosfolípidos cargados negativamente y de DAG o ésteres de forbol para su activación óptima y son independientes de calcio. Por último, el grupo de las aPKC sólo requiere de la presencia de fosfolípidos cargados negativamente para su activación (24). Desde el punto de vista estructural, todas las isoenzimas constan de una sola cadena polipeptídica donde se pueden identificar dos regiones bien definidas: la región reguladora en el extremo amino terminal y la región catalítica en el extremo carboxilo terminal, las cuales quedan separadas por la región variable V3 o región bisagra. En todas las subfamilias, las principales diferencias residen en la región reguladora estando muy conservada la región catalítica (Figura 6).

Dentro de las PKC clásicas (cPKC) se pueden distinguir tres dominios conservados (C1, C2 y el dominio catalítico) y cinco regiones variables (V1, V2, V3, V4 y V5). La región reguladora incluye la secuencia pseudosustrato y los dominios C1 y C2 mientras que la región catalítica contiene el dominio cinasa o también denominado dominio catalítico. La secuencia pseudosustrato es capaz de bloquear el sitio activo presente en el dominio catalítico inhibiendo así la actividad enzimática. El dominio C1 posee una región rica en residuos de Cys y aparece duplicado en tandem (C1A y C1B), siendo el responsable de la unión al diacilglicerol y a los ésteres de forbol. El dominio C2 en esta subfamilia es de tipo I y contiene los sitios de enlace para fosfolípidos ácidos y para los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, la región catalítica contiene los sitios de unión para el ATP y para el sustrato susceptible de fosforilación por PKC.

Las PKC nuevas (nPKC) son muy similares estructuralmente a las cPKC. Contienen dos dominios C1 en tandem pero a diferencia de las isoenzimas clásicas, tienen un dominio C2 de tipo II y se sitúa en el extremo amino terminal por delante de los dominios C1. Además, este dominio C2 no contiene los sitios de unión para el  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, las PKC atípicas (aPKC) sólo poseen un dominio C1 y por ello se denomina atípico y no contienen dominio C2. Además, y a diferencia de las otras isoenzimas, las aPKC poseen un dominio peculiar denominado dominio PB1. Este dominio se encuentra localizado en el extremo amino terminal, consta de 85 aminoácidos y se caracteriza porque se une a otras proteínas que contienen dominios PB1 tales como Zip/p62, Par6 o MAPK5 a través de la interacción entre los dominios PB1 (24).



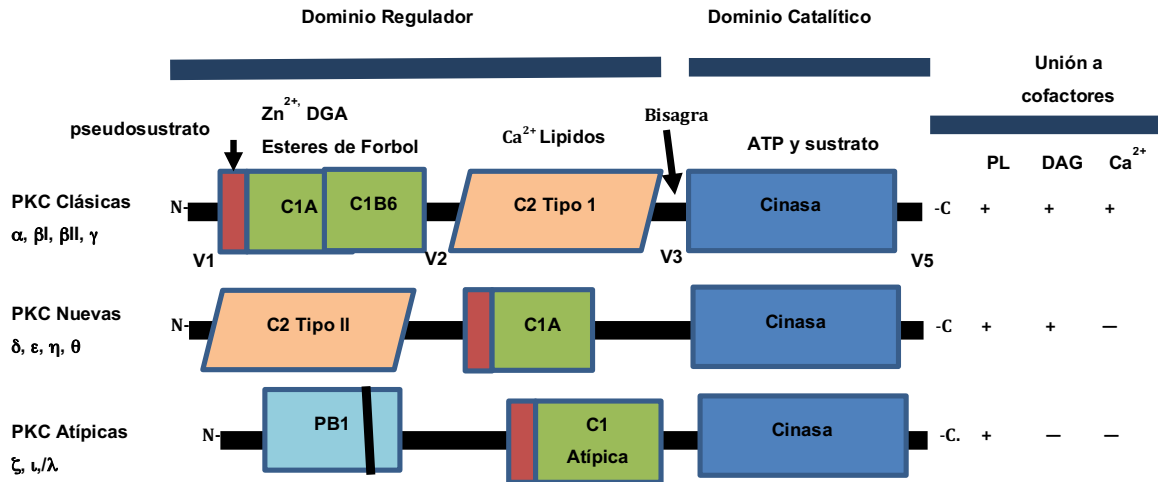


Figura 6.- Representación esquemática de la estructura primaria de las isoformas de la PKC. Se muestran los distintos dominios que las forman, así como los requerimientos de cofactores para su regulación. El extremo amino terminal contiene la región regulatoria con el dominio pseudosustrato, el dominio C1 de unión a DAG y esterres de forbol y el dominio C2 de unión a fosfolípidos aniónicos. El extremo carboxilo terminal contiene la región catalítica de la enzima con el dominio cinasa de unión a ATP y al sustrato.

La expresión, activación y función de las PKCs han sido estudiadas extensivamente en el epitelio intestinal. Sin embargo, aunque la evidencia experimental muestra que el proceso de carcinogénesis intestinal está asociado con alteraciones en la actividad y expresión de las isoformas de PKC, la contribución de estos cambios en la progresión del tumor en este tejido continúa aún sin definirse en gran parte (25).

En el epitelio de colon normal, los niveles de expresión más elevados de PKC tales como las isoformas α y δ, se encuentran en el tercio superior de la cripta, con una disminución gradual de su expresión que se extiende hacia la base de la cripta en la que se presenta una proliferación normal en el epitelio (25 y 26). Se piensa que PKC puede funcionar como regulador de eventos post-mitóticos, por ejemplo, en la diferenciación e inhibición del crecimiento durante la autorenovación del epitelio intestinal, un concepto apoyado por el hecho de que PKC media un programa coordinado de salida del ciclo celular en células intestinales (27, 28 y 29).

Varios estudios sobre PKCα han demostrado que participa en la inhibición de la progresión del ciclo celular a través de la fase de transición G1/S en células epiteliales intestinales, por medio de la inducción del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 cip/waf1 y de inhibir el inicio de la traducción de la ciclina D1 (27, 28 y 29). También se ha demostrado que al aumentar la expresión de PKCδ en células CaCo-2 (línea celular tumoral de colon), se limita el crecimiento celular al retardar la transición a la fase G1, aumenta la diferenciación celular y acelera la apoptosis, mediante la regulación negativa de la ciclina D1 y la ciclina E y de la inducción de los niveles de expresión del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 (25 y 30). Estos resultados sugieren que las vías de

señalización dependientes de PKC $\alpha$  pueden controlar el crecimiento celular y provocar diferenciación celular en este epitelio. A este respecto, se ha observado una marcada disminución de los niveles de expresión de PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\eta$  (25 y 27) en adenomas de colon humano, y que la actividad total de PKC disminuye comparada con el epitelio de colon normal (31). Sin embargo, aunque los niveles de algunas de las isoformas de PKC disminuyen, otras como PKC $\beta$ II y PKC $\zeta$ , incrementan su expresión en diversos modelos de cáncer de colon (25.). Interesantemente, existen datos que sugieren la participación de la isoforma PKC $\beta$ II en la ruta de señalización Wnt, ya que se ha reportado que la sobreexpresión de PKC $\beta$ II promueve el cáncer de colon a través de la supresión de la señalización del TGF $\beta$  y de la activación de la vía de señalización APC/ $\beta$ -catenina, pero se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esto (32). Además, se ha observado que después de la exposición de células de cáncer colo-rectal a ácidos biliares, PKC $\beta$ II fosforila e inactiva a GSK-3 $\beta$  (33). Asimismo, el producto del gen *wnt5a* parece estar sobre-expresado por la activación de PKC y disminuido por su inhibición, lo cual apoya la hipótesis de una posible convergencia de la señalización por Wnt y PKC durante el desarrollo de procesos cancerosos (34, 35 y 36) Sin embargo, la convergencia de señalización de la PKC y la ruta Wnt no está bien establecida. Esta relación fue sugerida originalmente por la observación de que la PKC puede, bajo ciertas circunstancias, fosforilar e inactivar a la GSK-3. En un estudio realizado en fibroblastos se demostró que la inactivación de la GSK-3 por ligandos Wnt es sensible a inhibición por PKC (35). Estudios recientes también han mostrado que PKC fosforila directamente los residuos Ser33/Ser37/Ser45 de  $\beta$ -catenina y que el abatimiento de la expresión de PKC $\alpha$  por RNA de interferencia previene la fosforilación de estos residuos en ella y su degradación vía proteosoma, sugiriendo que PKC $\alpha$  regula negativamente los niveles de  $\beta$ -catenina (37).

## 2.9 Proteína cinasa C zeta (PKC $\zeta$ )

Las PKC atípicas (aPKC) son una subclase de las PKC ya que estructuralmente y funcionalmente son distintas a las otras PKCs. Las PKC atípicas entre las que se encuentra a PKC $\zeta$ , es diferente a las otras PKCs porque su actividad catalítica no es dependiente de diacilglicerol, calcio o fosfatidilserina. Esta aPKC tienen un dominio de regulación único en el amino terminal y no presentan los sitios de unión a calcio, fosfolípidos y diacilglicerol. La actividad de las PKC atípicas puede ser regulado por fosfoinositidos, por medio de la fosforilación de la cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK1) y a través de la interacción específica proteína-proteína. La aPKC ha sido implicada en el establecimiento de la polaridad celular, proliferación celular y sobrevivencia celular. Se piensa que la aPKC pueden llevar a cabo sus diversas funciones celulares a través de la interacción directa proteína-proteína, entre la aPKC y moléculas efectoras mediante un dominio Phox Bem 1 (PB1), sin utilizar la región regulatoria de las aPKCs. El dominio PB1 esta conservado estructuralmente y es encontrado en la familia de moléculas de señalización (23).

Se sabe muy bien que las vías de Wnt y PKC están involucradas en la carcinogénesis del colon y la progresión tumoral. Este reporte demuestra como estas dos vías están íntimamente ligadas.

**3. HIPÓTESIS:** La PKC regula por fosforilación a Dishevelled en líneas celulares de colon, por lo cual la inhibición de PKC alterará la activación de Dvl y la vía de señalización Wnt.

**4. OBJETIVO GENERAL:** Investigar si la PKC regula la activación de la ruta Wnt a través de la fosforilación de Dishevelled, e investigar si esta regulación ocurre de manera diferente entre el estado normal y el maligno de células de colon humano en cultivo.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.- Realizar un análisis *in silico* de los posibles sitios de fosforilación de la proteína Dvl por la Proteína Cinasa C (PKC).
- 2.- Analizar la expresión de las proteínas de Dvl y de las isoformas de PKC, en células normales y cancerosas por la técnica de Western Blot.
- 3.- Analizar por Western blot y por inmunofluorescencia que sucede cuando se estimulan las células con el ligando Wnt3a en diferentes tiempos.
- 4.- Investigar si la proteína cinasa C, fosforila *in vitro* a la proteína Dvl por medio de un ensayo actividad de cinasa, los experimentos se harán en ausencia o en presencia de inhibidor isozima-específico de PKC.
- 5.- investigar cual de las PKCs podría fosforilar a Dvl mediante un inhibidor isozima-específico.
- 6.- Examinar la interacción de las isoformas de Dvl con las de PKC por co-inmunoprecipitación recíproca.
- 7.- Confirmar los resultados de fosforilación de Dvl por PKC por el inhibidor isozima-específico mediante una forma dominante negativa y RNAi de la isoforma de PKC de interes.
- 8.- Mapear el sitio de fosforilación de Dvl por PKC como resultado del estímulo de las células con ligando Wnt canónico.
9. Examinar el efecto del bloqueo de la fosforilación de Dvl por PKC en la activación de la ruta Wnt.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 Reactivos y anticuerpos.**

Los anticuerpos que se usaron en los experimentos de este trabajo son los siguientes: anti-Dvl3 murino (4D3, sc-8027), anti-Dvl2 murino (10B5, sc-8026), anti-Dvl1 murino (3F12, sc-8025), anti PKC $\zeta$  conejo (C-20, sc-216) y anti- $\beta$ -catenina murino (E-5, sc7963), los anticuerpos antes mencionados fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc (Sta. Cruz, CA, USA). Los anticuerpos de anti-Dvl3 conejo (cat# 3218), y anti- $\beta$ -tubulina conejo (9F3, cat#21289), fueron

obtenidos de Cell Signaling technology (Denver, MA, USA); El anticuerpo anti-Flag murino (F3165) fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

La proteína A sefarosa, el inhibidor de proteasoma MG-132 y los inhibidores de las diferentes isoformas de PKC: (Ro-31-8220 cat #557520, Rottlerin cat# 557370, Go6976 cat#36250 y inhibidor específico pseudosustrato PKC $\zeta$  cat #539624, fueron obtenidos de Calbiochem/Merck (Alemania Darmstadt,)

## 5.2 Plásmidos.

Los plásmidos que codifican para la dominante negativa PKC $\zeta$  (Flag.PKCzeta K/W plasmid 10800) y el plásmido que codifica para el RNA de interferencia de PKC $\zeta$  (pSUPER-PKCZeta RNAi, plasmid 10803), así como los plásmidos que codifican para las diferentes proteínas de Dvl completas (Flag-hDsh3, plasmid 16758), (Flag-Dsh2, plasmid 24802) y los fragmentos de Dvl 2 y 3 (Flag-82-716, plasmid 16756), (Flag-  $\Delta$ DIX plasmid 24805), (Flag-hDsh3-deltaCTER, plasmid 16753), Flag-hDsh3-trunc before DEP, plasmid 16752), (Flag-hDsh3-trunc before PDZ, plasmid 16754), fueron obtenidos de Addgene (Cambridge, MA, USA).

## 5.3 Análisis *in silico*.

Las secuencias primarias de las proteínas Dvl 1, Dvl 2 y Dvl 3 fueron obtenidas del NCBI (National Center of Biotechnology Information) y analizadas con el programa PhosphoMotif Finder (<http://www.dabi.temple.edu/disphos/pred/predict>) con la finalidad de saber si existían sitios de fosforilación probables por la proteína cinasa C PKC.

## 5.4 Cultivo Celular

Las células HEK-293T (Riñón embrionario humano), RKO (Carcinoma de colon humano) y 112CoN, fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's), complementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos (120mg/ml de penicilina y 200mg/ml de estreptomina), y 2mM de L-glutamina. Las células SW480 fueron cultivadas en DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium F-12) complementado con 5% de suero fetal bovino, antibióticos (120mg/ml de penicilina y 200mg/ml de estreptomina) y 2mM de L-glutamina. Todas las células fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C en una incubadora al 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific series 8000 WJ; Marietta, OH, USA).

Las líneas celulares usadas en este estudio se verificaron por un perfil de DNA mediante el análisis STR (short tandem repeat) o por el análisis de sistema de amplificación por PCR en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en la Ciudad de México.

## 5.5 Inmunoprecipitación.

Las células RKO y SW480 fueron sembradas en cajas de 6 pozos a una densidad de  $3.2 \times 10^5$  células. Para las células 112 CoN se sembraron  $6.4 \times 10^5$  células en

cada pozo. Veinticuatro horas después de haber sembrado las células se cambió el medio con suero a medio sin suero por 12 h a los pozos que se estimularían con ligando. Después de las 12 h se estimuló por 1 h con 200ng de ligando Wnt 3a, pasado el tiempo de estímulo, las células fueron lavadas con PBS dos veces y lisadas con una solución de lisis que contenía 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl y 0.5% Triton X-100 con un pH 7.5 y con 0.1mg/ml de inhibidor de tripsina y un 1mM de PMSF. Para la inmunoprecipitación de las isoformas de PKC, las células se lavaron con PBS y se lisaron con un solución que contenía 50 mM de Tris, 80 mM de NaCl con un pH 8 y con 0.1mg/ml de inhibidor de tripsina y 1mM de PMSF. La cantidad de proteína fue cuantificada siguiendo las instrucciones del kit de Bio-Rad, Hercules, CA, USA.

Alícuotas de 1mg/ml de los extractos celulares se incubaron en microtubos de 1.5ml, toda la noche a 4°C con 2µg/ml del anticuerpo primario en agitación constante. Al día siguiente a las alícuotas se les adicionó 25µl de proteína sefarosa-A (30%Calbiochem) por dos horas a 4°C. Los complejos inmunes se lavaron dos veces con la solución A (50 mM Tris-HCl, 0.6M NaCl, pH 8.3); y una vez con la solución B (50 mM Tris HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl). A ambas soluciones se les adicionó 0.1mg/ml de inhibidor de tripsina y 1mM de PMSF. A los complejos inmunes se les realizó una electroforesis y posteriormente un Western blot como se describe en materiales y métodos.

## **5.6 Transfección.**

Las células RKO fueron sembradas en cajas de 6 pozos a una densidad de  $2,8 \times 10^4$  células por pozo, 24 h después de haber sembrado las células se agregaron 500µl de medio sin suero, y la mezcla de 50µl de medio OPTIMEM (Gibco) con 2µg de los plásmidos usados en este trabajo, más 50µl de OPTIMEM con lipofectamina 2000 (Life Technologies, Waltham, MA USA cat# 11668-019) en una relación de 3:2 con el DNA. La mezcla de los 100µl se dejó durante 6 h a 37°C, después de este tiempo se cambió el medio de cada pozo a medio con suero y 24 h después de la transfección, el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de suero por 12 h a los pozos que se estimularían con ligando. Posteriormente a las 12 h se estimuló por 1 h con 200ng de ligando Wnt 3a (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) por 1 h. Las células se lavaron con solución salina PBS y se homogenizaron con la solución de lisis RIPA (50mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% Desoxicolato de Sodio, 1 mM de fenil metil sulfonil fluoride, 10 µg/ml de leupeptina, y 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina) durante 30 min a 4 °C en agitación, para después centrifugar a 1300 r.p.m durante 15 min a 4 °C. Posteriormente los lisados celulares fueron cuantificados según las instrucciones del kit de Bio-Rad, Hercules, CA, USA, y posteriormente se realizó un Western blot.

## **5.7 Silenciamiento de la expresión de PKCζ.**

Para el silenciamiento de PKCζ en las células se realizó la transfección con 2µg

del plásmido pSuper RNAi PKC $\zeta$ , el cual fue hecho y probado por el Dr. Alex Toker, como se describe en la cita número 22, o con el plásmido control obtenido de Addgene (ID10803) usando lipofectamina 2000. La eficiencia del silenciamiento fue analizada en los lisados celulares por Western Blot 36 horas pos-transfección. Inhibición de las isoformas de PKC e incubación con el ligando Wnt 3a.

### **5.8 Inhibición farmacológica de PKC**

Para la inhibición farmacológica de las isoformas de PKC en las células RKO y HEK293, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de  $1.6 \times 10^4$  células por pozo. Veinticuatro horas después de haber sembradas las células se les cambio a medio sin suero por 12 horas, y se incubaron en ausencia o presencia del inhibidor isoforma específica de PKC. El inhibidor Gö6976 se uso a 70nM para la inhibición de las cPKC  $\alpha$  y  $\beta$ ; El inhibidor Ro-31-8220 se uso a 10nM para la inhibición de PKC convencionales y nuevas; El inhibidor de Rottlerin se uso a  $3\mu\text{M}$  para inhibir a PKC $\delta$  y finalmente el inhibidor de PKC $\zeta$  se uso a  $20\mu\text{M}$ . Todos los inhibidores se usaron por 1 hora. Posteriormente las células fueron incubadas otra hora con 200ng/ml de ligando Wnt 3a (R&D Systems, Minneapolis MN, USA). Las células se lavaron con solución salina PBS y se homogenizaron con una solución para lisar llamada RIPA (50mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% Desoxicolato de Sodio, 1 mM de fenil metil sulfonil fluoride, 10  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina, y 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina), Posteriormente se realizó una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y el Western blot

### **5.9 Western blot**

Los lisados celulares se obtuvieron a partir de células cultivadas, bajo las condiciones indicadas en el apartado de cultivo celular. Las células se lavaron con solución salina PBS y se homogenizaron con la solución de lisis RIPA (50mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% Desoxicolato de Sodio, 1 mM de fenil metil sulfonil fluoride, 10  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina, y 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina) durante 30 min a 4 °C en agitación, para después centrifugar a 1300 r.p.m durante 15 min a 4 °C. Posteriormente los lisados celulares fueron cuantificados según las instrucciones del kit de Bio-Rad, Hercules, CA, USA.

Las muestras de proteínas (100  $\mu\text{g}$ ) fueron sometidas a una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) para después ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas con 1% de BSA (Research Organics, Cleveland OH, USA) y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente. La detección de la señal fue hecha con el kit supersignal (Pierce, Rockford IL, USA). Los anticuerpos de actina y  $\beta$ -tubulina se utilizaron como control de carga.

### **5.10 Ensayo de inmunofluorescencia.**

Las células RKO se sembraron en cajas de 12 pozos que contenían cubreobjetos limpios, esteriles y secos a una densidad de  $1.6 \times 10^4$  células y 24 h después de ser sembradas las células, el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de suero por 12 h a los pozos que se estimularían con ligando. Posteriormente a las 12 h se estimuló con 200ng de ligando Wnt 3a (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) por 1 h. Una vez terminada la hora de estímulo las células fueron lavadas con PBS dos veces, para posteriormente ser fijadas con 4% de paraformaldehído durante 30 min, pasado este tiempo se lavó cada pozo dos veces con 300 $\mu$ l de PBS, posteriormente se permeabilizaron las células con 0.1% de Triton X-100 por 10 min, después se lavaron las células dos veces con 300 $\mu$ l PBS, y se bloquearon con 4% de BSA libre de IgG (Research Organics; Cleveland, OH, USA) por una hora. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Al día siguiente las células se lavaron tres veces con 300 $\mu$ l PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (FITC-conjugated goat anti-rabbit y TRITC-conjugated goat anti-mouse) en oscuridad y a temperatura ambiente por 1 hora, posteriormente los cubreobjetos fueron lavados 4 veces con 300 $\mu$ l de PBS y una vez con 300 $\mu$ l de agua bidestilada y finalmente fueron montados con VectaShield-DAPI. La emisión de fluorescencia se analizó por microscopia confocal (Microscopio Leica TCS SP5) con un laser de Kriptón y Argón.

### **5.11 Aislamiento y purificación de PKC a partir de hepatocitos de rata.**

Las isoformas de PKC se aislaron de hepatocitos de rata (wistar) como se describe a continuación: Se extrajo el hígado y se lavó vía vena porta, con amortiguador Krebs-Ringer a pH 7.35 a 37° C, en un ambiente saturado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (5%/95%), hasta eliminar los residuos y coágulos sanguíneos. se perfundió el hígado con amortiguador Krebs-Ringer + CaCl<sub>2</sub> 1.27 mM, se disolvió colagenasa tipo II (215 U/mg) en este amortiguador y se dejó que la solución recirculara 15 o 20 minutos hasta ablandar el tejido, después de lo cual se disgregó cuidadosamente en presencia de amortiguador Krebs-Ringer + CaCl<sub>2</sub> hasta obtener una suspensión homogénea. Una vez obtenidos los hepatocitos se llevaron a una concentración de 150 a 200 mg/ml en buffer de lisis adicionado con beta mercaptoetanol, 0.1mg/ml de inhibidor de tripsina y 1mM de PMSF. Posteriormente se lisaron con un homogenizador por 90 segundos en hielo. Se dejó reposar 30 minutos a 4°C, después se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se llevó a cabo una semipurificación de PKC empleando columnas empacadas con DEAE celulosa equilibrada con Tris 20 mM pH 7.5. Se cargó el sobrenadante a estas columnas, se lavaron y se eluyeron las isoformas de PKC con NaCl 0.08M, Tris 20 mM, EDTA 2mM pH 7.5. Finalmente se colectaron las fracciones eluidas y se concentraron mediante ultrafiltración con membranas de Amicon YM-30 en 1 ml.

### **5.12 Ensayo de actividad in Vitro de PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$ .**

Después de haber concentrado a las isoformas de PKC expresadas en los

hepatocitos, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de las isoformas de PKC $\beta$ II y  $\epsilon$  con anticuerpo isozima-específico. Para esto, al eluado de PKCs semipurificadas y concentrado según se describió en el punto anterior, se le agregó leupeptina 20mM (2  $\mu$ l por tubo) mas el anticuerpo de anti-PKC ( $\beta$ II o  $\epsilon$ ) 1  $\mu$ g/ml y se incubó toda la noche a 4° C en agitación. Al día siguiente se añadió 25  $\mu$ l de proteína A sefarosa y se dejó incubando dos horas más en agitación a 4° C. Pasadas las dos horas, los complejos precipitados fueron lavados dos veces con la solución que contiene Tris 50mM, NaCl 0.6 M a pH 8.3 adicionado de 0.1 mg/ml inhibidor de tripsina y 1mM de PMSF más Tritón X-100 al 1%. Finalmente se hizo un lavado con amortiguador Tris 50mM, NaCl 150 mM a pH 7.5 adicionado de inhibidor de tripsina e inhibidores de fosfatasa, y se centrifugaron las muestras a 9000 rpm a 4°C por 1 min, se retiró el sobrenadante y se agregó  $\beta$ -mercaptoetanol. Se resuspendió el inmunoprecipitado en buffer de ensayo de cinasa y se dejó por 20 minutos a 4° C. Después de esto, los inmunoprecipitados se centrifugaron a 9000 rpm por 1 min a 4° C, se les retiró el sobrenadante y se añadió la Histona H1 (200  $\mu$ g/ml) o Dvl purificada, y el inhibidor correspondiente a cada isoforma de PKC: hispidina para PKC $\beta$ II y Ro 318220 para PKC $\epsilon$ . Posteriormente se inició la reacción de actividad de cinasa agregando 50 $\mu$ l de la mezcla de reacción [buffer de cinasa 2X, 0.8  $\mu$ g/ml dioleína, 20  $\mu$ g/ml fosfatidilserina, 10  $\mu$ M [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (6000 Ci/amol) por tubo y se dejaron incubando por 20 minutos a 30° C en agitación moderada. Finalmente la reacción se detuvo añadiendo 30  $\mu$ l de solución Leammli 2X. La fosforilación de la Histona H1 o de Dvl3 por PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$  se analizó por SDS-PAGE (12.5%) seguido de autorradiografía.

### 5.13 Analisis estadísticos.

Los datos se presentaron como la mediana  $\pm$  el error estándar (SEM). El análisis estadístico entre grupos comparables se realizó mediante la prueba de ANOVA con la prueba de Bonferroni y fue hecha con el software incluido en el programa GraphPad Prism. Un valor de probabilidad  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dvl es un sustrato potencial de la PKC

Se ha demostrado que, aunque CK1 $\delta$  y CK1 $\epsilon$  fosforilan a Dvl en respuesta a los estímulos Wnt, la fosforilación promovida por estas cinasas no se requiere para activar la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina por Dvl. Además, se ha demostrado que, reducen la acumulación de Dvl al disminuir la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina en lugar de aumentarla [20-22]. Por estas razones, investigamos la posibilidad de que las isoformas de PKC fosforilaran a Dvl y activaran la vía de señalización Wnt en respuesta a Wnt3a. Como puede observarse en la Figura 7, el análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de cada isoforma de Dvl muestra muchos sitios putativos de fosforilación por PKC distribuidos a través de las proteínas, con la puntuación de probabilidad más alta para los sitios encontrados en los carboxilos terminales de Dvl 1, Dvl2, y Dvl3.



**dishevelled 1 [Homo sapiens]** 670 aa

GenBank: AAB65242.1 [GenPept Identical Proteins Graphics](#)

>gi|2291006|gb|AAB65242.1| dishevelled 1 [Homo sapiens]

MGETKIIYHMDEEETPYLVKLPVAPERVTLADFKNVL**SNRPVHAYKFFFKSMDQDFGVVKEEIFDDNAKL**  
**PCFNDRVSVLVLAEGAHSDAGSQGTDSDHTLPPPLERTGGIGDSRPPSFHPNVASSRDGMDNETGTESM**  
VSHRRERARRRREEAPRTNGHPRGDRRDVGLPPDSASTALSSELESSFVDSDEDGSTRLSSTEQS  
TSSRLIRKHKRRRQRRLQADRASSFSSITDSTMSLN**IVTVTLNMRHHFLGISIVGQSNDRGDGGIYI**  
**GSIMKGGAVAADGRIEPCDMLLQVNDVNFENMSNDDAVRVLREIVSQTGPISLTVAKCWDPTPRSYFTVP**  
RADPVRPIDPAAWLSHTAALTGALPRYELEEAPLTVKSDM**S**AVVRVMQLPDSGLEIRDRMWLKITIANAV  
**IGADVVDWLYTHVEGFKERREARKYA****S**LLKHGFLRH**T**VNKITFSEQCYVYVFGD**LCSNLATLNLNSGSSG**  
TSDQDTLAPLPHPAAPWPLGQGYPYQYPGPPPCFPAYQDPGFSYSGSGSTGSQQSEGSKS**SGSTRSSRA**  
PGREKERRAAGAGSGSESHTAPSGVGSWRERAPQLSRG**SS**PRSQASATAPGLPPPHTTKAYTVVG  
GPPGPPVRELAAPPELTGSRQSFQKAMGNPCEFFVDIM

Posición	Score
Ser 38 (Dominio DIX)	0.185
Thr 348	0.633
Ser 391 (Dominio DEP)	0.275
Ser 447 (Dominio DEP)	0.350
Ser 448 (Dominio DEP)	0.371
Thr 458 (Dominio DEP)	0.137
Ser 551 (Carboxilo ter)	0.960
Ser 553 (Carboxilo ter)	0.985
Ser 556 (Carboxilo ter)	0.992
Ser 557 (Carboxilo ter)	0.996
Ser 603 (Carboxilo ter)	0.960
Ser 604 (Carboxilo ter)	0.964

**dishevelled 2 [Homo sapiens]** 736 aa

GenBank: AAB65243.1

[GenPept Identical Proteins Graphics](#)

>gi|2291008|gb|AAB65243.1| dishevelled 2 [Homo sapiens]

MAGSSTGGGGV**ETKVIYHLDEEETPYLVKIPVPAERITLGDGFKSVLQRPAGAKYFFKSMDQDFGVVKEE**  
**ISDDNARLPCFNDRVSVLVSDDNPQPEMAPPVHEPRAELAPPAPLPPPERTSGIGDSRPPSFHPNV**  
SSSHENLEPETETESVSLRRERPRRRDSSEHGAGGHRTGGPSRLERHLAGYESSTLMTSELESTSLGD  
SDEEDTMSRFSSSTEQSSASRLKRRRRRQRPPRLERTSSFSVTDSTMSLN**IITVTLNMEKYNFLGI**  
**SIVGQSNRERDGGIYIGSIMKGGAVAADGRIEPCDMLLQVNDMNFENMSNDDAVRVLDRDIVHKPGPIVLT**  
**VAKCWDPSPOAYFTLPRNEPIQPIDPAAWVSHSAALTGTFPAYPGSSSMSTITSGSSLPDGCEGRGLSVH**  
**TDMASVTKAMAAPESGLEVRDRMWLKITIPNAFLGSDVVDWLYHHVEGFPERREARKYA****S**GLLKAGLIRH  
**T**VNKITFSEQCYVYVFGD**L**SGGCESYLVNLSLNDNDGSSGASDQDTLAPLPGATPWPLLPTFSYQYPAPHP  
YSPQPPYHELSSYTYGGGSASSQHSEGSRS**SGSTR**SDGGAGR**T**GRPEERAP**S**KSGSGSESEPPSSRGG  
**SLRRGGEASGTS**DGGPPPSRGSTGGAPNLRAPGLHPYGPMPGMALPYNPMVMMPPPPPVPPAVQPP  
GAPPVRDLGSPPELTASRQSFHMAMGNPSEFFVDVM

Posición	Score
Ser 45 (Dominio DIX)	0.143
Ser 480 (Dominio DEP)	0.253
Thr 491 (Dominio DEP)	0.208
Ser 592 (Carboxilo ter)	0.981
Ser 594 (Carboxilo ter)	0.961
Thr 604 (Carboxilo ter)	0.930
Ser 614 (Carboxilo ter)	0.979
Ser 630 (Carboxilo ter)	0.996

**dishevelled 3 [Homo sapiens]** 716 aa

GenBank: AAB65244.1

[GenPept Identical Proteins Graphics](#)

>gi|2291010|gb|AAB65244.1| dishevelled 3 [Homo sapiens]

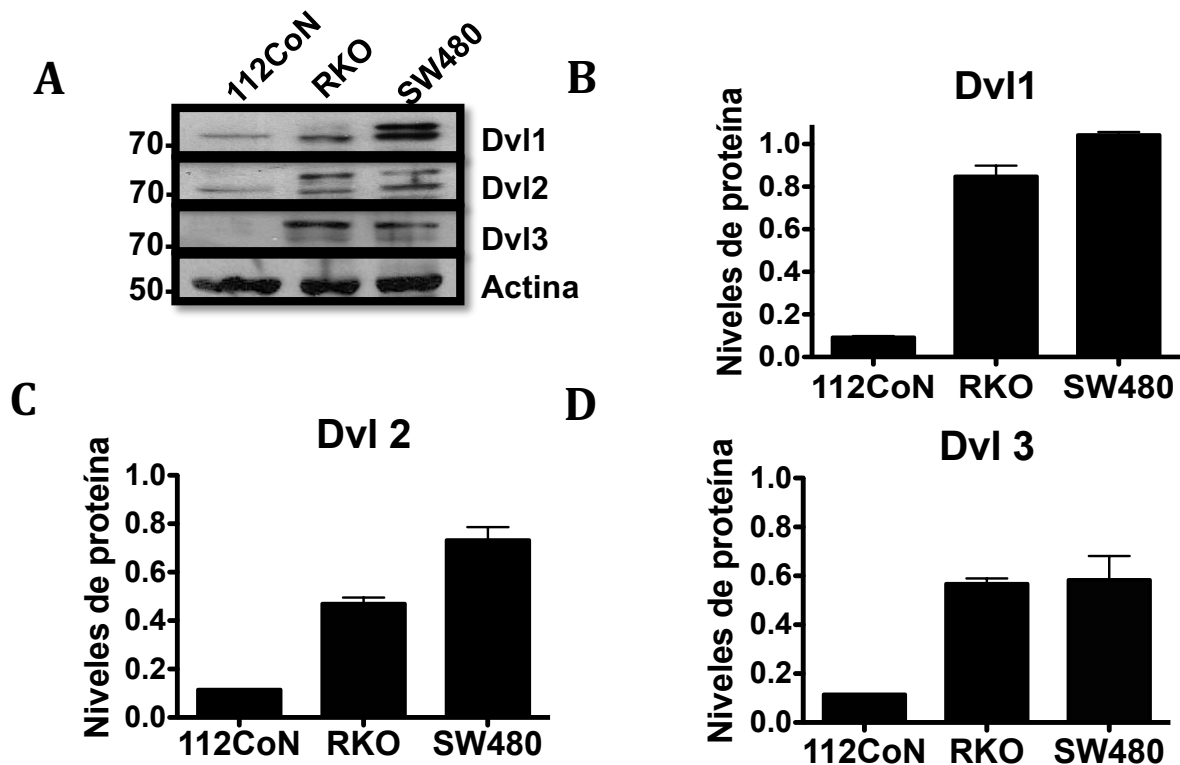
MGETKIIYHLDGQETPYLVKLPVAPERVTLADFKGVLQRP**SYKFFFKSMDDDDFGVVKEEISDDNAKLPCF**  
**NGRVVSWLVS**AEAGSHDPAPFCADNPSELPPMERTGGIGDSRPPSFHPHAGGGSQENLNDTETDLSVS  
AQRERPRRRDGPEHATRLNG**T**AKGERRRREPGGYDSSSTLMSSELETTSSFFDSEDDSTSRFSSSTEQSSA  
SRLMRRHKRRRQR**QKV****S**RIERSSSFSSITDSTMSLN**IITVTLNMEKYNFLGISIVGQSNRERDGGIYIGS**  
**IMKGGAVAADGRIEPCDMLLQVNEINFENMSNDDAVRVLREIVHKPGPITLTVAKCWDPSPRGCF****T**LPR**S**  
**EPIRPIDPAAWVSHTAAMTGTFFPAYGMSPLSTITSTSSITSSIPDTERLDDFHLSDMAAIVKAMA**  
**SPESGLEVRDRMWLKITIPNAFIGSDVVDWLYHNVEGFTDRREARKYA****S**NLLKAGFIRH**T**VNKITFSEQ  
**YYIFGDL**CNGMANLSLHDHGGSSGASDQDTLAPLPHPGAAPWPMAFFPYQYPPRPHYPNHPGLGELGYSY  
GGGSASSQHSEGSRS**SGSNRSG**DRRKEKDPKAGD**SK**GGSGSESHTTRS**SLR**GRPRERAP**S**ERSGPAA  
SESHRSHSLASSLRSHHTPSYGPVPPYLYGPPMLMPPPPAAMGPPGAPGRDLASVPELTASRQ  
**S**FRMAMGNPSEFFVDVM

Posición	Score
Ser 41 (Dominio DIX)	0.480
Thr 161	0.585
Ser 227	0.931
Thr 346	0.554
Ser 350	0.351
Ser 469 (Dominio DEP)	0.145
Thr 480 (Dominio DEP)	0.201
Ser 576 (Carboxilo ter)	0.988
Ser 578 (Carboxilo ter)	0.982
Ser 581 (Carboxilo ter)	0.974
Ser 583 (Carboxilo ter)	0.997
Ser 596 (Carboxilo ter)	0.976
Ser 612 (Carboxilo ter)	0.981
Ser 622 (Carboxilo ter)	0.988
Ser 700 (Carboxilo ter)	0.807

**Figura 7.-El análisis *in silico* de las secuencias primarias de Dvl1, Dvl2 y Dvl3 mostró muchos sitios putativos con alto puntaje de probabilidad de fosforilación por PKC.** Las secuencias primarias de Dvl1, Dvl2 y Dvl3 de humano se descargaron del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) y se sometieron a un análisis con el programa PhosphoMotif Finder (<http://www.dabi.temple.edu/disphos/pred/predict>) para obtener los sitios de fosforilación putativos para PKC. Los dominios DIX aparecen resaltados en amarillo, los dominios PDZ en azul y los dominios DEP, en verde. La tabla de la derecha representa las posiciones de los sitios putativos de fosforilación de PKC que se encuentran en todas las proteínas Dvl con sus correspondientes puntuaciones de probabilidad.

## **6.2 Las isoformas de Dvl 1, 2 y 3 están sobre-expresadas en las células de cáncer de colon.**

Una vez que supimos que Dvl tenía una enorme posibilidad de ser fosforilada por PKC y debido a que se ha reportado que las proteínas Dishevelled se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de tumores, nosotros investigamos los perfiles de expresión de estas proteínas mediante western blot, en dos líneas de cáncer de colon humano en comparación con la línea no maligna 112CoN. Dependiendo del contexto genético se seleccionaron dos tipos de células de cáncer de colon; las células RKO que representan la vía de señalización Wnt normal y las células SW480 que muestran una vía de señalización Wnt constitutiva. En la figura numero 8 se puede observar la sobreexpresión de las tres isoformas de Dvl, en las células RKO Y SW480 en comparación con las células no malignas 112CoN, y en cada isoforma se pueden ver dos bandas, las cuales corresponden a la forma fosforilada (P-Dvl) y no fosforilada (Dvl) de la proteína.



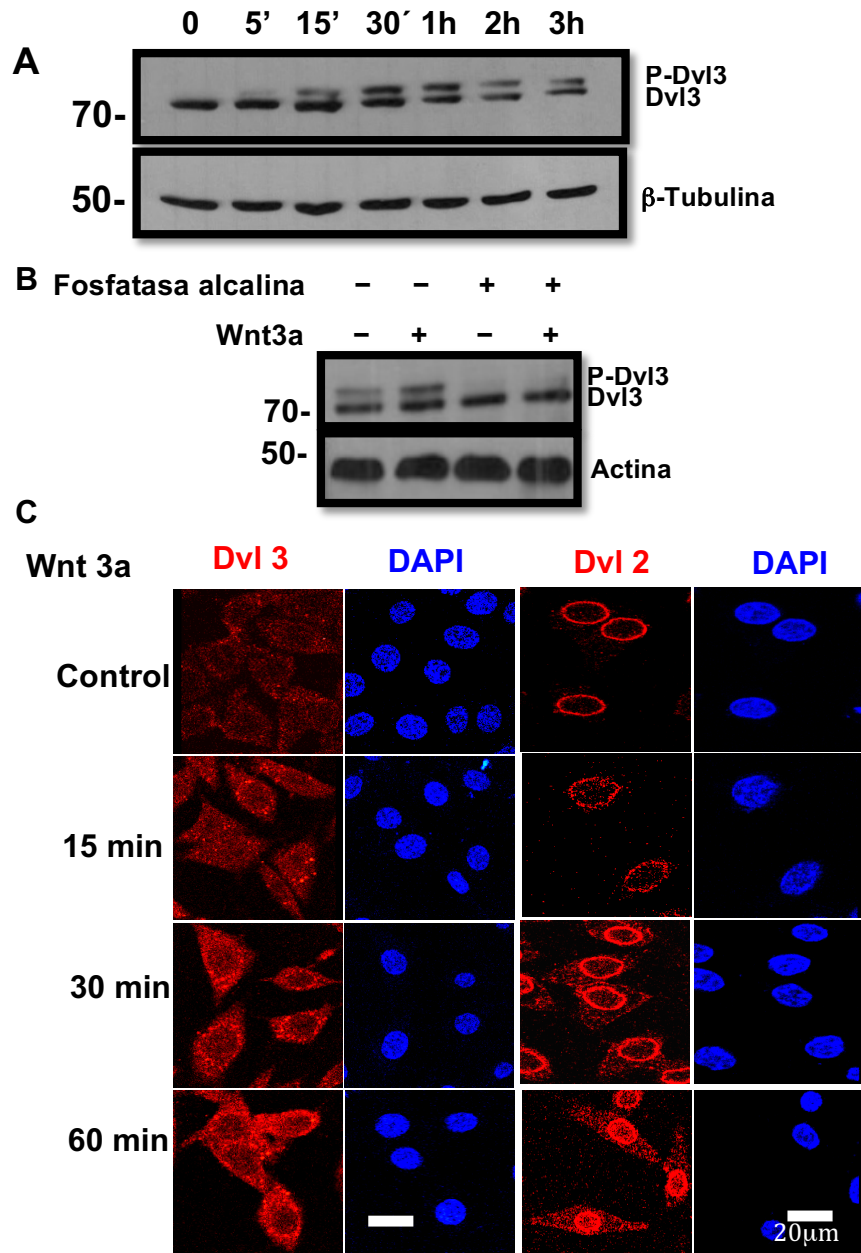
**Figura 8. Las isoformas de Dvl1, Dvl2 y Dvl3 están sobre-expresadas en células de cáncer de colon.** Las muestras de los extractos celulares (100µg) obtenidas de las células cancerosas RKO y SW480, así como de las células 112CoN no malignas, fueron sujetas a una electroforesis SDS-PAGE al 10% y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El análisis del inmunoblot fue hecho usando anticuerpos contra Dvl1,2 y 3, además de usar actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las dos bandas que se observan en cada inmunoblot para estimar los niveles totales de expresión de las isoformas de Dvl, en la células malignas RKO y SW480, se normalizó con respecto a la expresión en las células no malignas 112CoN. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares.

Posteriormente buscamos la manera de saber como detectar cambios en la fosforilación de la proteína Dvl, para esto se utilizó un anticuerpo que detectara la forma fosforilada y no fosforilada de la proteína Dvl, cuando se estimulará con el ligando Wnt3a, además de saber que sucedía visualmente con las proteínas con el estímulo del ligando Wnt3a.

### 6.3 El curso temporal con el tratamiento del ligando Wnt3a en las células RKO induce la fosforilación de Dvl2 y Dvl3, lo que resulta en la estabilización de los niveles de proteína de Dvl.

Se examinó el curso temporal de la fosforilación de Dvl inducido en respuesta al tratamiento de las células con Wnt3a, se usó la línea de células de cáncer de colon RKO. Esta línea fue usada porque posee una señalización Wnt normal; Por lo tanto, es sensible al tratamiento con ligando Wnt. Se incubaron células RKO

privadas de suero en ausencia o presencia de ligando canónico Wnt3a en diferentes tiempos de incubación para inducir la fosforilación de Dvl, esta fosforilación se puede visualizar como P-Dvl. Los resultados presentados en la Figura 9A se muestran claramente las apariciones de una banda de movilidad más baja (p-Dvl) en la transferencia de los Dvl a los 5 min del tratamiento con Wnt3a. Esta banda de baja movilidad aumentó y se mantuvo incluso después de 3 h de tratamiento. Se confirmó que la banda P-Dvl correspondía a un incremento en la fosforilación inducida por Wnt3a, ya que el tratamiento de las células en presencia del ligando y de la fosfatasa alcalina eliminó completamente la banda superior correspondiente a P-Dvl (Figura 9B). Curiosamente, el ensayo de inmunofluorescencia se realizó para observar la distribución intracelular de Dvl2 y Dvl3 en respuesta al tratamiento con Wnt3a (Figura 9C) mostrando que la estimulación de Wnt3a en las células RKO indujo la estabilización en ambas formas de la proteína Dvl. Esta estabilización aumentó con el tiempo de incubación con el ligando Wnt3a. En el control de tiempo cero (sin tratamiento), Dvl2 y Dvl3 apenas se detectaron, principalmente en la región que parece mas cercana al nucleo. Sin embargo, después de 30 min de tratamiento con Wnt3a, los niveles de proteína Dvl aparecieron aumentados a lo largo de la célula, y después de 1 h de tratamiento con Wnt3a, Dvl2 también apareció claramente acumulada en los núcleos celulares.



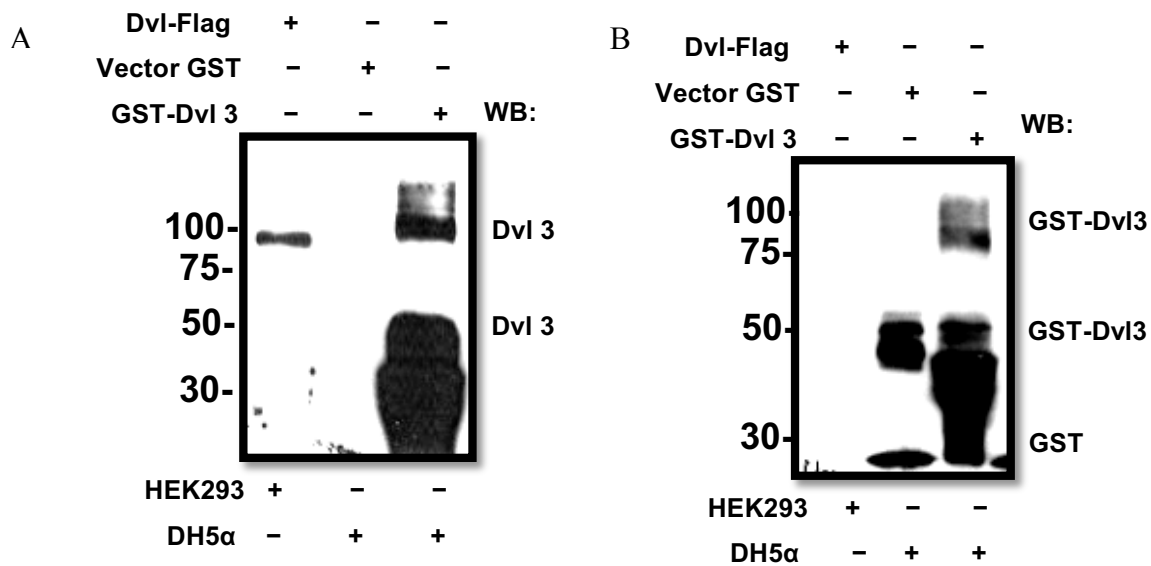
**Figura 9.-** Curso temporal con el ligando Wnt3a en las células RKO induce la fosforilación de Dvl2 y Dvl3, lo que resulta en la estabilización de los niveles de proteína de Dvl. (A) El curso en el tiempo de la activación de Dvl inducida por Wnt 3a. Las células RKO fueron incubadas en ausencia (0) o en presencia de Wnt 3a (100ng/ml) durante 5, 15 o 30 min, o 1, 2 o 3 h. Las células fueron lavadas, lisadas y sometidas al análisis por Western blot como se describe en la sección de materiales y métodos. La fosforilación de las isoformas de Dvl se detectó como un cambio en la movilidad de Dvl 3 total, dependiente de la fosforilación. Se indican las posiciones de Dvl desfosforilada (Dvl3) y Dvl fosforilada (P-Dvl3). La proteína  $\beta$ -tubulina se utilizó como control de carga. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares. B) Los lisados de células RKO obtenidos a partir de células tratadas durante 1 h en ausencia o presencia de Wnt3a se incubaron en ausencia o presencia de fosfatasa alcalina durante 30 min a 30°C y se sometieron a SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-Dvl3. C) Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la estabilización de Dvl. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos

contra Dvl 2 y Dvl3.

La fluorescencia se analizó por microscopía confocal láser como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Dvl 2 y Dvl3 se visualizaron con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con TRITC. Los controles de especificidad también se prepararon incubando células sólo con anticuerpos secundarios, y no produjeron la señal de inmunofluorescencia (no mostrada). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

#### 6.4 Purificación y expresión de la proteína Dvl3-GST.

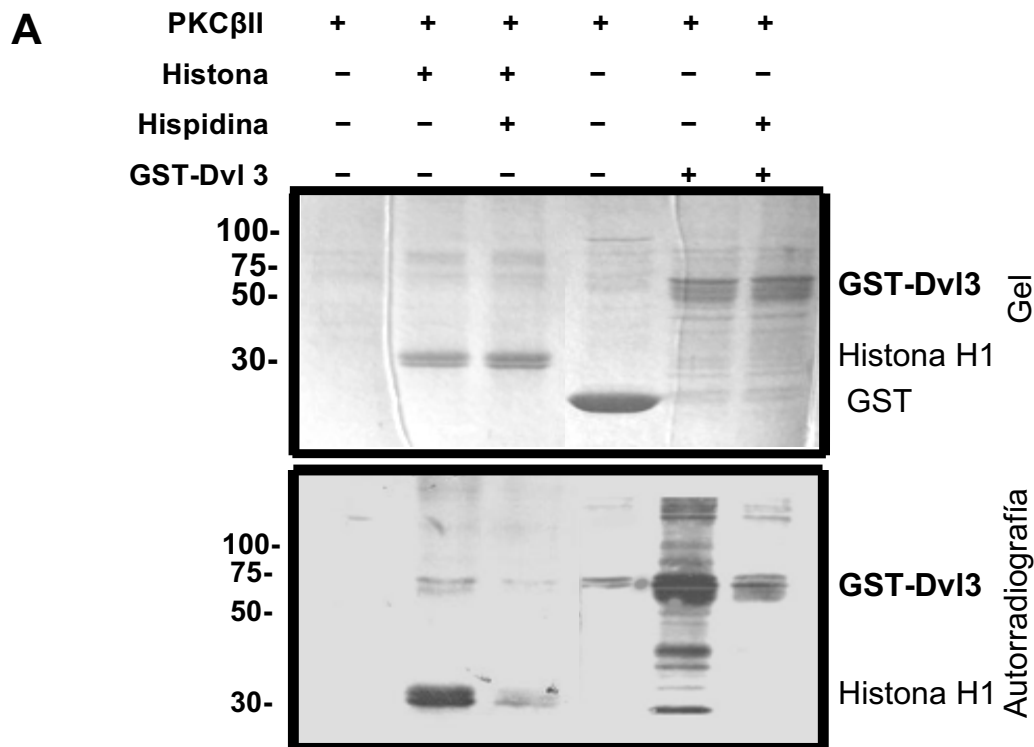
Una de las primeras inquietudes que teníamos era saber lo más pronto posible si PKC fosforilaría a Dvl, por lo que se decidió realizar ensayos de fosforilación *in vitro*, pero para la realización de este ensayo se necesitaba que las proteínas estuvieran purificadas, pero como no se contaba con la resina de Flag para la purificación de las proteínas Dvls, se decidió subclonar el cDNA que codifica para Dvl 3-Flag en el vector pGexT4, de expresión en bacterias, con el propósito de sobre-expresar una proteína de fusión GST-Dvl3 y purificarla con la resina de GST-sefarosa, que teníamos disponible en el laboratorio. El plásmido Dvl3-Flag se corto con las enzimas de restricción Bam H1 y Eco R1 y el vector pGexT se corto la enzima de restricción Bam H1, posteriormente se ligaron los fragmentos de los dos plásmidos para la obtención del plásmido Dvl3-GST. El plásmido Dvl3-GST se expreso en bacterias para la purificación de la proteína de fusión Dvl3-GST. Las bacterias no son el mejor sistema de expresión de proteínas de alto peso molecular de mamíferos, por lo que solo se pudo obtener una mínima cantidad de la proteína Dvl3-GST completa y una gran cantidad de fragmentos de menor peso molecular al esperado, pero que eran reconocidos por el anticuerpo de Dvl3. A pesar de los inconvenientes se decidió realizar el ensayo de fosforilación *in vitro* con la proteína GST-Dvl3 purificada con la resina de GST, para saber si la Proteína Cinasa C isoformas  $\beta$ II y  $\epsilon$  fosforilan a Dvl *in vitro*.

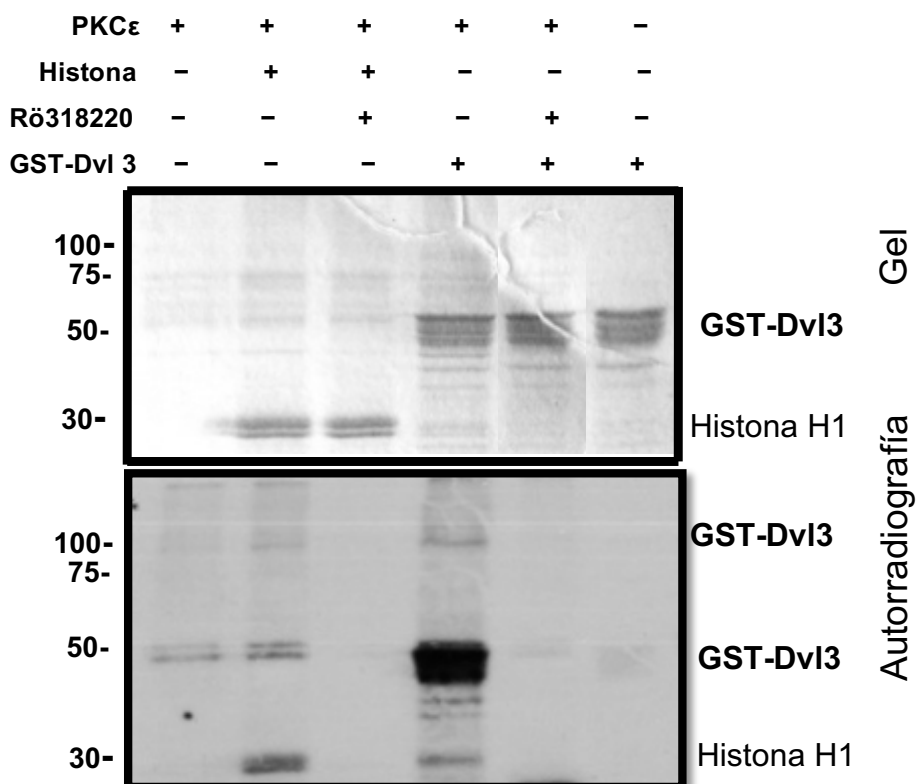


**Figura 10.-Expresión de la proteína Dvl3-GST.** A) En esta figura se observa la proteína de fusión Dvl3-GST completa que corresponde al peso mayor a 100 KDa, que era el peso esperado, pero además un fragmento menor de aproximadamente 50 KDa que es muy intenso. B) En esta figura se observa el resultado de desnudar la membrana y colocar el anticuerpo contra GST y lo que se observa, es que, en donde se localiza la proteína completa de Dvl3 y los fragmentos se puede detectar a GST.

### 6.5 PKC épsilon y PKC beta fosforilan a Dvl3 in vitro

En este experimento se utilizó la proteína de fusión Dvl3-GST, para saber si PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$  podrían fosforilar a Dvl3. Se utilizaron complejos inmunes de cada isoforma de PKC y como control positivo de la actividad de las PKCs el sustrato típico histona H1, y la especificidad del ensayo se validó utilizando el inhibidor específico de PKC $\beta$ II hispidina, y el Ro 318220 (inhibidor selectivo de PKCs convencionales  $\alpha$  y  $\beta$  y de la PKC nueva epsilon) para inhibir a PKC $\epsilon$ . El resultado muestra a la proteína Dvl3 fosforilada, tanto por el complejo inmune de PKC $\beta$ II, como por el de PKC $\epsilon$ . Se observa un incremento en la intensidad de las bandas de 100KDa y en la de 50Kda, aunque de manera prominente por éste último. Lo importante de este experimento es que claramente muestra que Dvl es sustrato in vitro de PKC, pero como ya se menciona anteriormente el sistema de expresión en bacterias no es el mejor para la expresión de proteínas de mamífero tan grandes como lo es Dvl.





**Figura 11.-PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$  fosforilan a Dvl3-GST.** Los complejos inmunes de (A) PKC $\beta$ II y (B) PKC $\epsilon$  fueron expuestos a la proteína Dvl3-GST o a la Histona H1 (200  $\mu$ g/ml), además del inhibidor hispidina (81.22 $\mu$ M) correspondiente a la isoforma PKC $\beta$ II y (10mM) Ro 318220 para PKC $\epsilon$ . Posteriormente se inició la reacción de actividad de cinasa agregando 50 $\mu$ l de la mezcla de reacción por cada tubo y dejando incubar por 20 minutos a 30° C en agitación. Finalmente la reacción se detuvo añadiendo 30  $\mu$ l de solución Leammli 2X. La fosforilación de la Histona H1 o de Dvl3 por PKC $\beta$ II y PKC $\epsilon$  se analizó por SDS-PAGE seguido de autorradiografía.

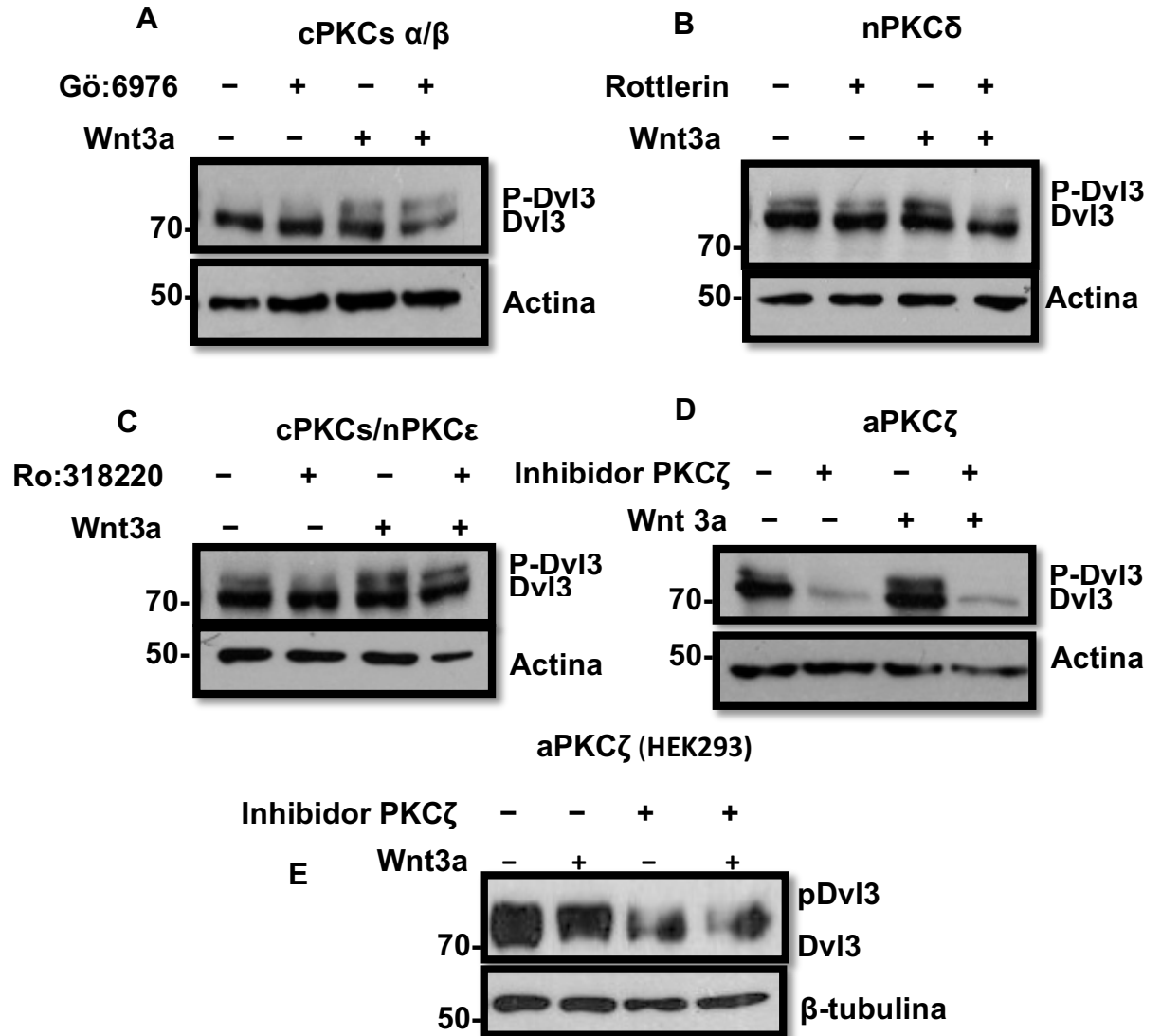
Al no tener las herramientas necesarias para una buena expresión y purificación de la proteína Dvl3, así como la utilización de material radiactivo, nos hizo pensar en una manera mas sencilla pero muy eficiente de saber cuales PKCs podrían estar fosforilando a la proteína Dvl 3 en las células, a continuación se muestra esta estrategia.

### 6.6 La fosforilación de Dvl 3 inducida por Wnt3a puede ser bloqueada por la inhibición farmacológica de PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ y PKC $\zeta$

A continuación, se investigó si la fosforilación de Dvl inducida por Wnt3a fue mediada por las isoformas de PKC. Para la inhibición farmacológica de las isoformas de PKC se utilizaron inhibidores específicos. Elegimos a Dvl3 porque se ha reportado que esta isoforma de Dvl es crucial y la más eficiente para la activación de la vía de señalización Wnt canónica. Se incubaron células RKO privadas de suero en ausencia o presencia de los inhibidores selectivos de las isoenzimas de PKC indicadas en la Figura 12 durante 1 h y luego se trataron durante 1 h en ausencia o presencia de Wnt3a. Los extractos celulares se



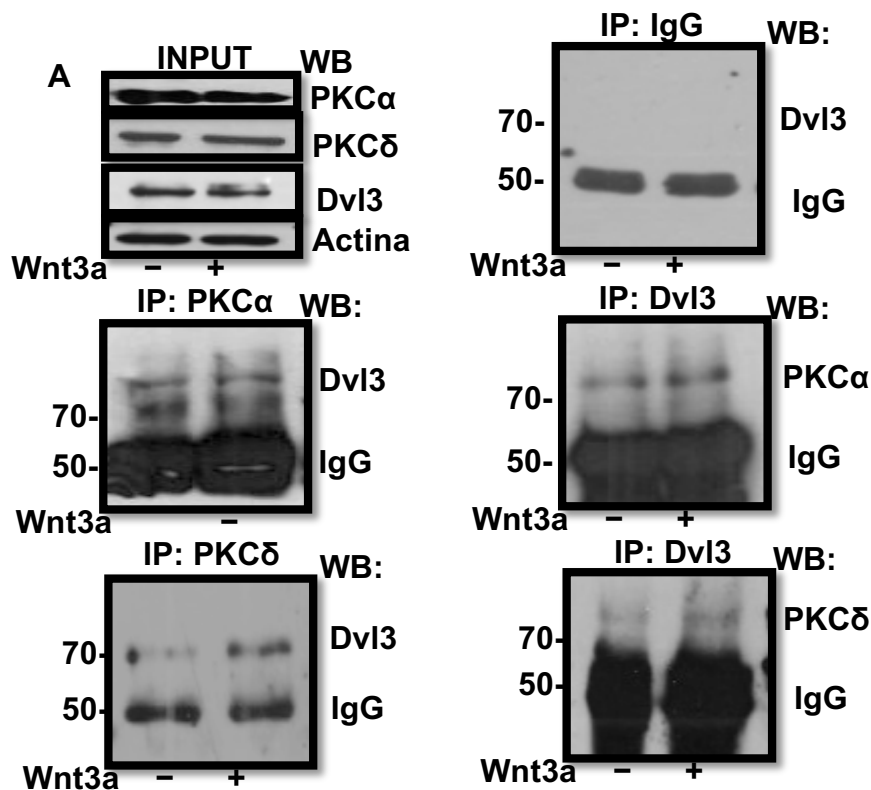
analizaron mediante Western blot para Dvl3. Como se puede observar en esta figura, existe una activación basal de Dvl 3 en las células RKO, que se visualiza como dos bandas que corresponden a P-Dvl y Dvl, respectivamente. En todos los casos, la incubación con Wnt3a en ausencia de inhibidores de PKC produjo, como era de esperar, un incremento en la intensidad de la banda P-Dvl superior en comparación con células no tratadas. También se puede observar que en la inhibición farmacológica de cPKC  $\alpha / \beta$  con Gö6976 (Figura 12A) o con Ro-318220 (Figura 12C), la inhibición de PKC $\delta$  (Figura 12B) y la inhibición de PKC $\zeta$  (Figura 12D) disminuyó la fosforilación de Dvl3 inducida por Wnt3a, esto se observa como una disminución o desaparición de la banda superior correspondiente a P-Dvl. Además, y de forma inesperada, la inhibición farmacológica de PKC $\zeta$  (Figura 12D) claramente produjo una disminución en ambas bandas P-Dvl3 y Dvl3, incluso bajo condiciones basales (sin tratamiento con Wnt3a) o cuando se estimulo con Wnt3a. Esto, por lo tanto, sugiere que la fosforilación de Dvl3 mediada por estas isoformas de PKC se requiere para estabilizar la proteína Dvl. Interesantemente, este efecto no puede atribuirse a una característica particular de las células RKO, porque se obtuvo el mismo efecto cuando se incubó con el inhibidor de PKC en células HEK293 no malignas, como se ilustra en la Figura 12E.



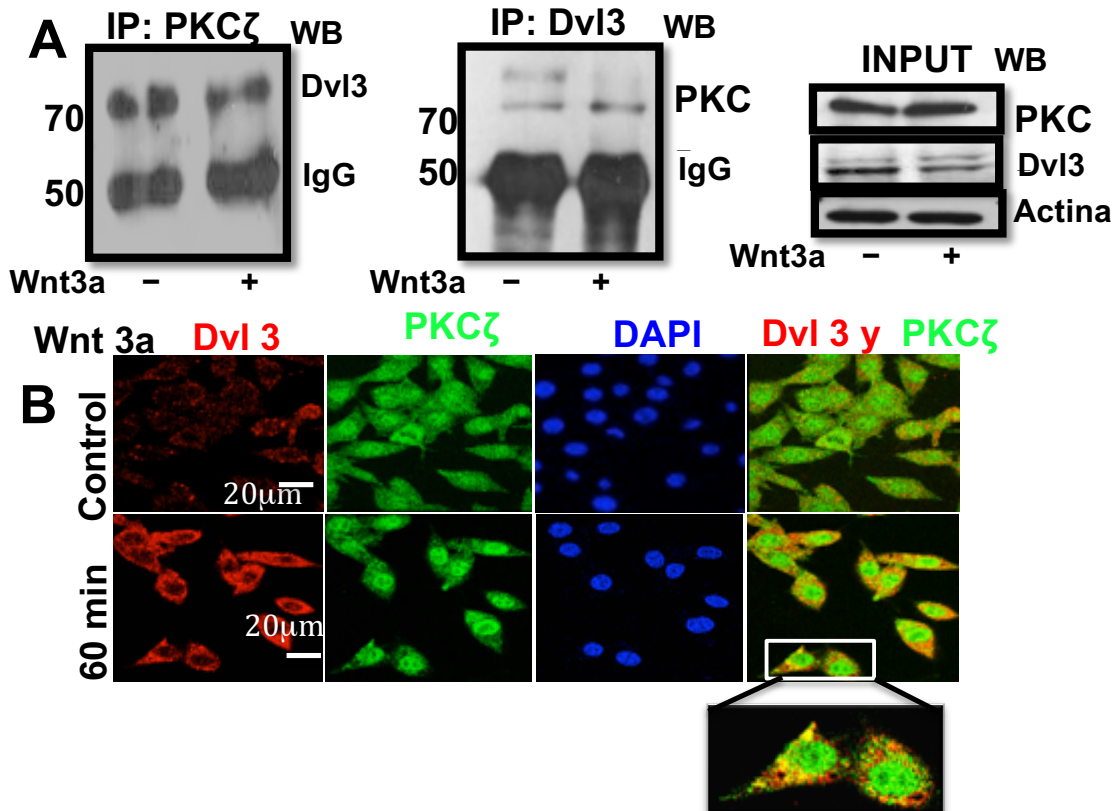
**Figura 12.** La fosforilación de Dvl2 y Dvl3 inducida por Wnt 3a puede bloquearse por la inhibición farmacológica de PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  y PKC $\zeta$ . Se pre-trataron las células RKO (paneles A-D) o HEK293 (panel E) durante 1 h en ausencia o presencia de los siguientes inhibidores específicos de PKC: A) Gö: 6976 (70 nM), específico para cPKC  $\alpha/\beta$  ; B) Rottlerin (3  $\mu$ M), específica para PKC $\delta$ ; C) Ro: 31 - 8220 (10 nM), específico para la inhibición de cPKCs / nPKC $\epsilon$ , o D y E) Inhibidor selectivo de PKC $\zeta$  pseudosustrato mirristoilado (20  $\mu$ M). Todas las células de los paneles A - E se incubaron en ausencia o presencia de Wnt3a (100 ng/ml) 1 h después del tratamiento previo con el inhibidor. Las células se lavaron y lisaron y las muestras se sometieron a SDS-PAGE al 10% seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-Dvl3 o anti-Dvl2. Se empleó actina o  $\beta$ -tubulina como controles de carga. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

## 6.7 Dvl3 Interacciona con PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ y PKC $\zeta$ en Células Malignas

Para investigar la interacción entre las isoformas de PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  y PKC $\zeta$  con Dvl3, se realizaron estudios de coimmunoprecipitación en células RKO estimuladas en ausencia o presencia de Wnt3a. Dvl3 se inmunoprecipitó a partir de extractos de células RKO y los inmunoprecipitados se analizaron mediante Western blot. Como puede observarse en la Figura 13, Dvl3 co-inmunoprecipitó de manera recíproca con PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , y también con isoformas de PKCs (Figura 14A), en ausencia o presencia de tratamiento Wnt3a. Consistente con estos resultados, los ensayos de inmunofluorescencia seguido de análisis de microscopía confocal, como se presenta en la Figura 14B, demostraron co-localización de Dvl3 con PKC $\zeta$  en el citoplasma de las células RKO no tratadas, es decir el control. interesantemente, como resultado de 1 h de tratamiento con Wnt3a, los niveles de proteína Dvl3 y la co-localización con PKC $\zeta$  se incrementaron, esto se visualiza como agregados multiproteicos muy característicos llamados punta.



**Figura 13.- Dvl3 interactúa con PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  en células malignas.** Las células RKO se incubaron en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1 h. Las células se lavaron y lisaron, y se inmunoprecipitaron Dvl3, PKC $\alpha$  o PKC $\delta$  a partir de lisados celulares. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante Western blot para detectar la presencia de las proteínas indicadas en la figura. Los perfiles de expresión de las isoformas PKC y Dvl3 encontradas en las células RKO se representan en la parte superior izquierda de la Figura (input) y a la derecha, el análisis con IgG como control negativo de la inmunoprecipitación. La actina se empleó como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares.

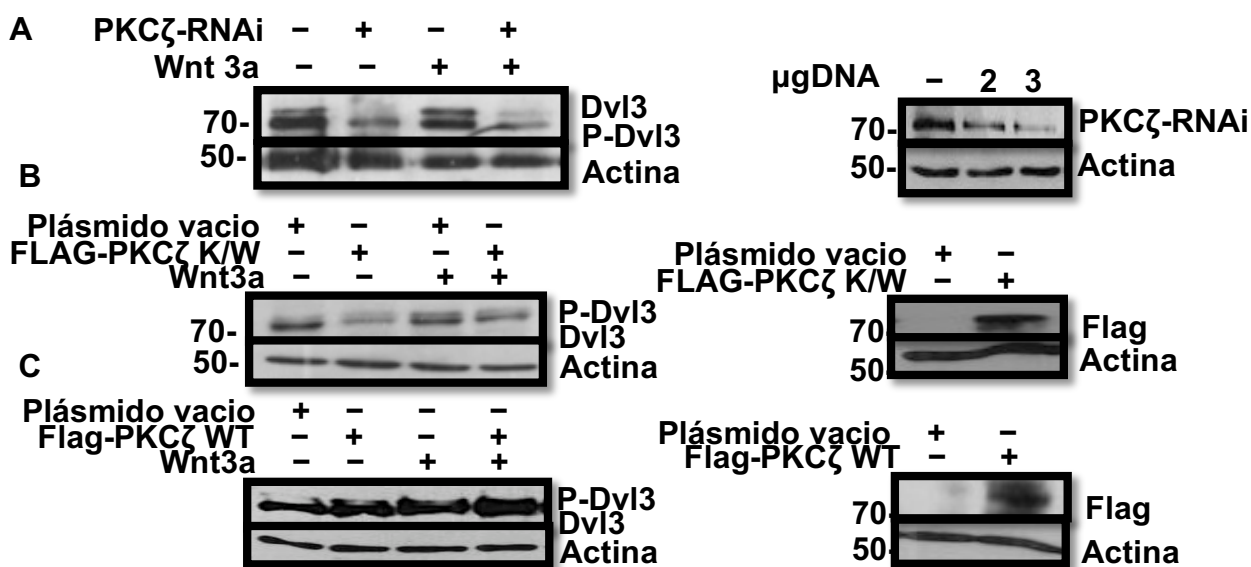


**Figura 14. Dvl3 interactúa con PKC $\zeta$  en células malignas.** A) Estudios de co-inmunoprecipitación. Las células RKO se incubaron en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1 h. Las células se lavaron y se lisaron, y se inmunoprecipitó a Dvl3 o PKC $\zeta$  a partir de los lisados celulares. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante Western blot para detectar la presencia de las proteínas indicadas en la Figura 14. Los perfiles de expresión de las isoformas de PKC y Dvl3 que se encuentran en las células RKO se representan en la parte superior derecha de la Figura (input). Actina se empleó como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares. B) Estudios de inmunofluorescencia. Las células RKO se incubaron durante 1 h en ausencia o presencia de Wnt3a. Las células se lavaron, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos contra Dvl3 y PKC $\zeta$ . La fluorescencia se analizó por microscopía confocal láser como se describe en la sección de Materiales y Métodos. PKC $\zeta$  se visualizó con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con FITC, y Dvl, con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con TRITC. Los controles de especificidad también se prepararon incubando células sólo con anticuerpos secundarios, y no produjeron ninguna señal de inmunofluorescencia (la imagen no es mostrada). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares.

### 6.8 PKC fosforila a Dvl y afecta su estabilización.

A continuación investigamos el mecanismo por el cual PKC fosforila a Dvl y afecta a su estabilización. Seleccionamos a PKC $\zeta$  porque observamos efectos más drásticos sobre los niveles de proteína de Dvl, cuando esta isoforma de PKC se inhibió. También elegimos a PKC $\zeta$  porque previamente reportamos que esta isoenzima de PKC regula de manera positiva la vía de señalización Wnt canónica [37, 39]. Para confirmar los resultados obtenidos con la inhibición farmacológica de

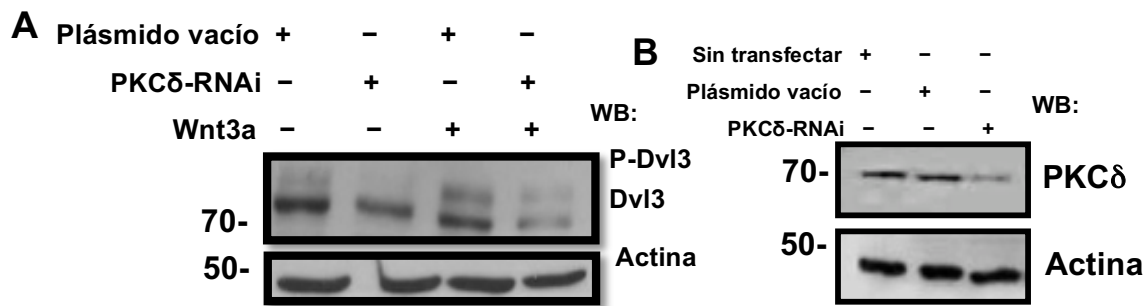
PKC $\zeta$ , se empleó un RNAi para bloquear transitoriamente la expresión de PKC $\zeta$ . La Figura 15C muestra una reducción considerable en los niveles de proteína de PKC $\zeta$  36 h después de la transfección de células RKO con 3 $\mu$ g de plásmido de RNA de interferencia (siRNA) en comparación con el plásmido vacío control. También puede observarse que el bloqueo de la expresión de PKC $\zeta$  por el RNAi bloqueó la fosforilación de Dvl3 inducida por Wnt3a y promovió la degradación de Dvl3, disminuyendo tanto a P-Dvl y Dvl. La expresión de una forma dominante-negativa de PKC $\zeta$  en estas células, como se observa en la Figura 15D, reprodujo los mismos efectos negativos sobre los niveles de P-Dvl3/Dvl3, confirmando que estos efectos sobre Dvl fueron inducidos por la fosforilación mediada por PKC $\zeta$ . Por el contrario, la sobreexpresión de PKC $\zeta$  marcada con un distintivo (Flag) en células RKO, como se muestra en la Figura 15E, dió como resultado un aumento en los niveles totales de proteína de Dvl3 después de 36 h de la transfección, incluso en ausencia de estimulación con Wnt3a. Por lo tanto esto confirma que PKC $\zeta$  promueve la estabilización de Dvl.



**Figura 15.-A)** Derecha: La eficacia de la eliminación de PKC $\zeta$  se determinó mediante Western blot 36 h después de la transfección de las células RKO con cantidades crecientes del plásmido pSuperPKC $\zeta$ -RNAi en comparación con el plásmido vacío usado como control. A la izquierda: se analizó por Western blot a P-Dv3/Dvl3 obtenido de células RKO transfectadas con el plásmido pSuperPKC $\zeta$ -RNAi e incubadas en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1 h. Se empleó el anticuerpo de actina como control de cargas iguales. **B)** Las células RKO se transfectaron con una forma dominante-negativa de PKC $\zeta$  marcada con Flag o con un plásmido vacío Control (derecha). Treinta y seis horas post-transfección las células se incubaron 1 h en ausencia o presencia de Wnt3a y la expresión de P-Dvl3 / Dvl3 se analizó por Western blot en los extractos celulares (izquierda). Se utilizó un anticuerpo de actina como control de cargas iguales. **C)** Sobreexpresión de PKC $\zeta$ : las células RKO se transfectaron con un plásmido vacío o con Flag-PKC $\zeta$  de tipo silvestre (derecha). Treinta y seis horas post-transfección las células se incubaron 1 h en ausencia o presencia de Wnt3a, y la expresión de P-Dvl3 / Dvl3 se analizó por Western blot en los extractos celulares (izquierda). Se utilizó un anticuerpo de actina como control de cargas iguales.

## 6.9 PKC $\delta$ también fosforila a Dvl

Ya se mencionó el por qué se seleccionó a PKC $\zeta$  en la fosforilación de Dvl, pero muy claramente se puede observar en la figura 12 que el inhibidor farmacológico rotlerina también disminuye la fosforilación de Dvl, además existen reportes de que la proteína cinasa C delta fosforila *in vivo* a Xdsh en *Drosophila*(8), lo que nos hizo pensar que muy probablemente en nuestras células de cáncer de colon también estaría pasando lo mismo, por lo que se realizaron experimentos de silenciamiento de la proteína PKC $\delta$  en las células RKO. Como se puede observar en la figura 16, cuando se bloquea la expresión de PKC $\delta$  mediante knockdown por siRNA, y se incubaba a las células en presencia del ligando Wnt-3a, se observa una disminución de la banda correspondiente a la forma fosforilada (P-Dvl3) y a la no fosforilada (Dvl3) de Dvl3, lo que nos sugiere que PKC $\delta$  está involucrada en la fosforilación de Dvl3 y al igual que PKC $\zeta$ , además de influir en la estabilización de Dvl, pero se necesita investigar quién fosforila primero a Dvl o si lo hacen simultáneamente y cuáles son las consecuencias de esta fosforilación en la vía de señalización Wnt.

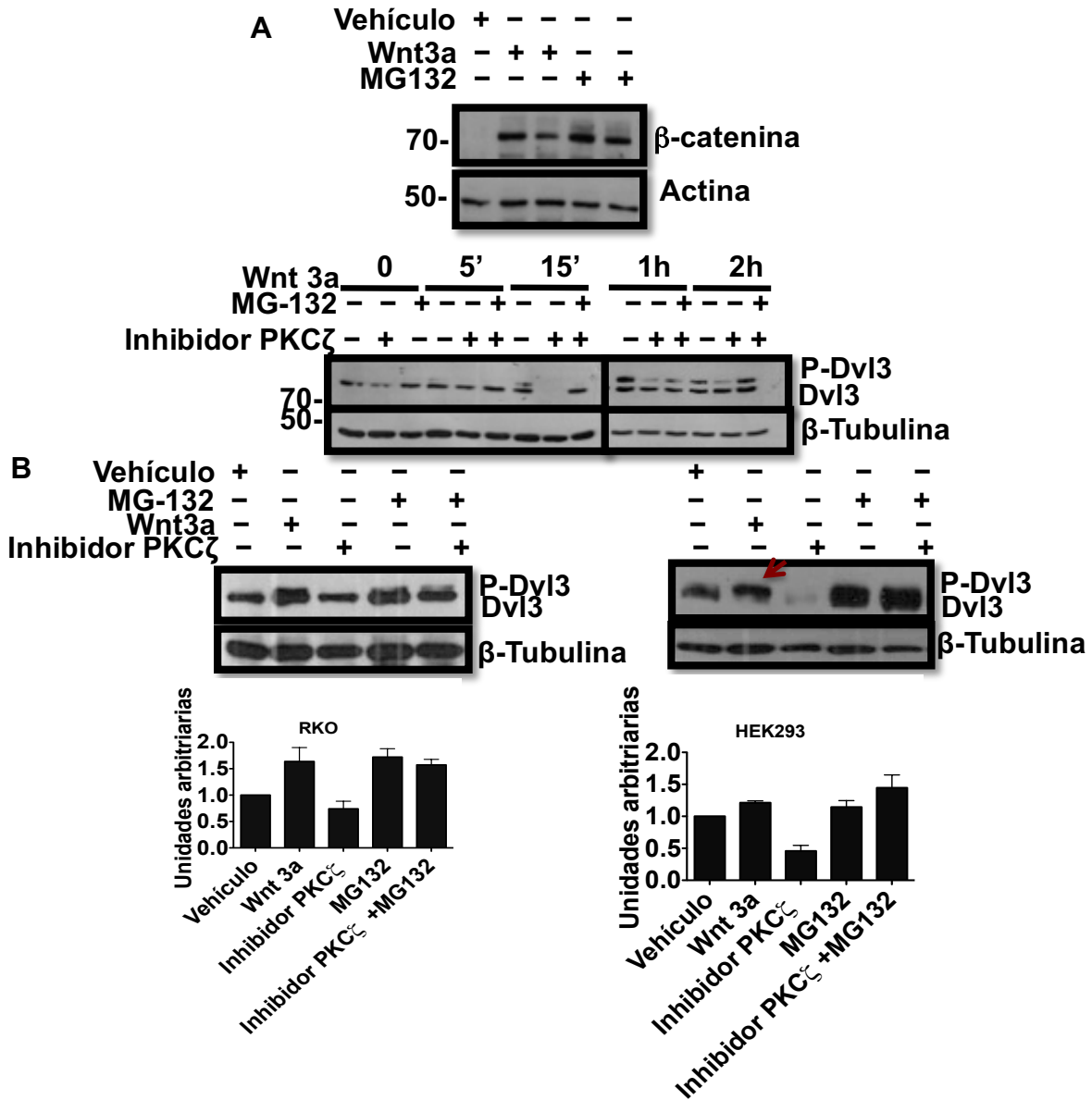


**Figura 16.-** PKC $\delta$  fosforila a Dvl; A) Se analizó por Western blot a P-Dvl3/Dvl3 obtenido de células RKO transfectadas con el plásmido pSuperPKC $\delta$ -RNAi e incubadas en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1 h. Se empleó el anticuerpo de actina como control de cargas iguales. B) La eficacia de la eliminación de PKC $\delta$  se determinó mediante Western blot 36 h después de la transfección de las células RKO con el plásmido pSuperPKC $\delta$ -RNAi, en comparación con el plásmido vacío usado como control.

## 6.10 La fosforilación de Dvl3 mediada por PKC $\zeta$ se requiere para evitar su degradación a través del proteasoma.

Debido a que se ha reportado que la estabilidad de Dvl puede ser regulada a través de su degradación vía lisosoma o proteasoma [5, 6, 8], se exploró si la degradación de Dvl3 como resultado de la inhibición de PKC era mediada por el proteasoma. Hemos reportado anteriormente que la incubación de las células RKO con 25 $\mu$ M del inhibidor de proteasoma MG-132 durante 2 h proporciona la concentración óptima y el tiempo de incubación idóneos para inducir la estabilización de  $\beta$ -catenina en estas células [37], en niveles similares a los inducidos por el tratamiento con Wnt3a en estas células (2h), como se puede observar en la figura 5A. Las células RKO se pre-incubaron en ausencia o presencia de MG-132 y en ausencia o presencia de inhibidor de PKC $\zeta$ .

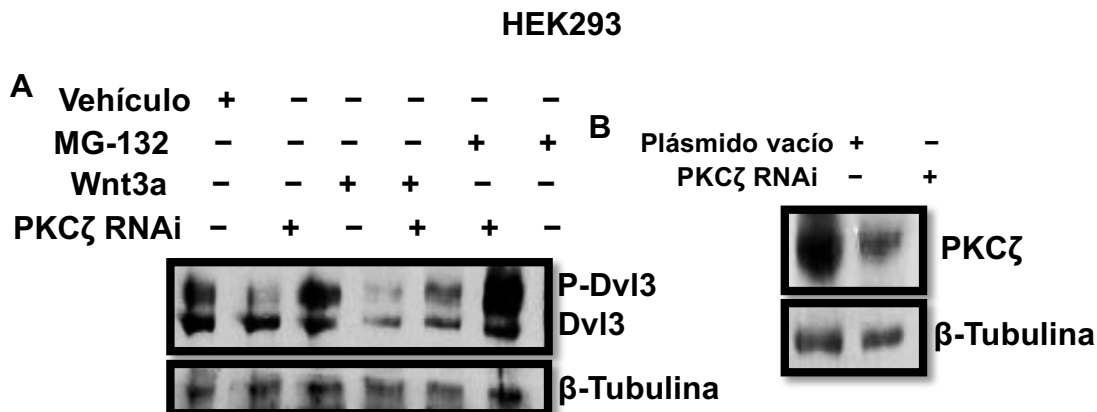
posteriormente se incubaron durante 5 min, 15 min, 1 h, o 2 h en ausencia o presencia de Wnt3a. Encontramos que la estabilización de P-Dvl3/Dvl3 es promovida por Wnt3a y que aumenta con los tiempos de incubación, el pico de estabilización de Dvl3 se observa a la hora de tratamiento con el ligando y se bloqueó por la inhibición de PKC $\zeta$  (Figura 17A]. Interesantemente, la degradación de P-Dvl3 / Dvl3 se evitó con el aumento en el tiempo de incubación con MG-132, lo que indica que la degradación de Dvl3 inducida como resultado de la inhibición de PKC $\zeta$  es mediada por el proteasoma (Figura 17A). Para estimar el porcentaje de degradación inducido en Dvl3 como resultado de la inhibición de PKC, las células RKO o HEK293 se pre-incubaron durante 1 h en ausencia o presencia de MG-132 y en ausencia o presencia de inhibidor de PKC $\zeta$ . A continuación se incubaron durante 1 h adicional en ausencia o presencia de Wnt3a. La Figura 17B ilustra los resultados obtenidos con células RKO (a la izquierda) o con células HEK293 (a la derecha) a partir del análisis densitométrico realizado sobre los Western blot obtenidos a partir de varios experimentos. Como se puede observar, la inhibición de PKC $\zeta$  produjo una pérdida del 50% en los niveles de proteína Dvl3 en células RKO (Figura 17B, a la izquierda) y una pérdida del 75% en los niveles de Dvl3 en células HEK293. En las células HEK293 el tratamiento con Wnt3a produjo la conversión de casi toda la Dvl en P-Dvl (resaltado con una flecha roja en la Figura 17B). Sin embargo, en ambos tipos de células, la degradación promovida por la inhibición de PKC $\zeta$  se bloqueó por preincubación con MG-132. Estos resultados fueron confirmados con el bloqueo de la expresión de PKC $\zeta$  por el siRNA en las células HEK293, como se muestra en la Figura 18 B. En conjunto, nuestros datos indican que el tratamiento con Wnt3a da lugar a la fosforilación de Dvl3 por PKC $\zeta$ , lo que resulta en la estabilización de los niveles de la proteína Dvl. Además, esto causa que la fosforilación de Dvl3 por PKC $\zeta$  sea necesaria para evitar su degradación a través del proteasoma.



**Figura 17. La fosforilación de Dvl3 mediada por PKC $\zeta$  se requiere para evitar su degradación a través del proteasoma.** A) Superior: La incubación de células RKO con 25  $\mu$ M del inhibidor de proteasoma MG-132 durante 2 h en ausencia de Wnt3a induce la estabilización de  $\beta$ -catenina detectada por Western blot, en comparación con  $\beta$ -catenina obtenida como resultado de 2 h de tratamiento con Wnt3a en las células RKO. Parte inferior: Las células RKO se pre-incubaron en ausencia o presencia de MG-132 y en ausencia o presencia del inhibidor de PKC $\zeta$  durante 1 h, y luego se incubaron durante 5 min, 15 min, 1 h, o 2 h en ausencia o presencia de Wnt3a. Dvl y su forma fosforilada, P-Dvl, se detectaron mediante Western blot. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. B) Se pre-incubaron células RKO (izquierda) o células HEK293 (derecha) en ausencia o presencia de MG-132 y en ausencia o presencia de inhibidor de PKC $\zeta$  durante 1 h; Estos se incubaron durante 1 h adicional en ausencia o presencia de Wnt3a. P-Dvl3 / Dvl3 se detectó por Western blot en los extractos celulares. En las células HEK293, una flecha roja indica la forma hiperfosforilada de Dvl3 (P-Dvl). Se realizó un análisis densitométrico para estimar los cambios en los niveles de proteína total de Dvl3 (P-Dvl3 / Dvl3) inducidos por el inhibidor de PKC $\zeta$  solo o en combinación con MG132, con respecto a los niveles encontrados en células control no tratadas



(vehículo): las gráficas de barras representan la media (SEM) ± Error Estándar de al menos tres ensayos independientes.



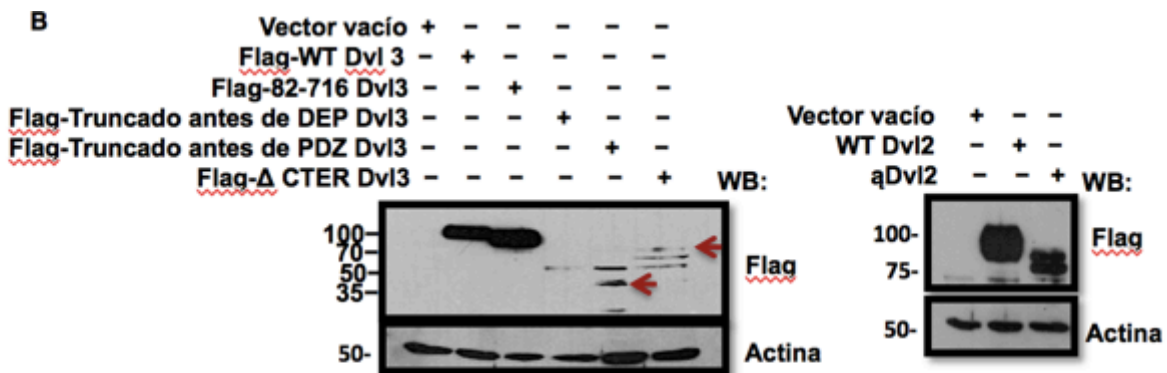
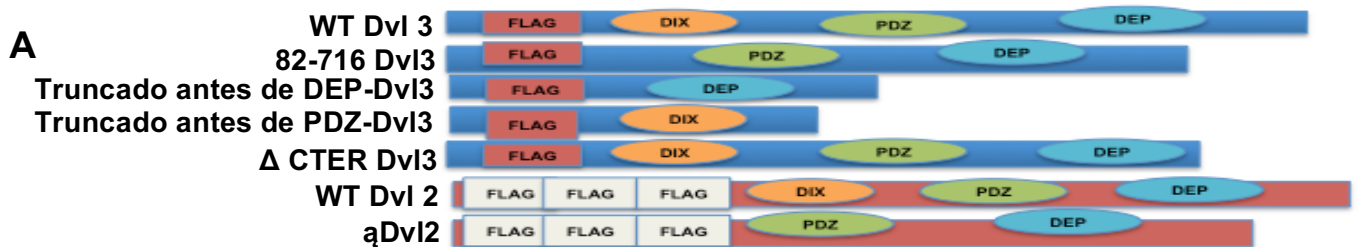
**Figura 18. El silenciamiento de la expresión de PKCζ por el siRNA en células HEK293 bloqueó la fosforilación de Dvl3 inducida por Wnt3a y promovió su degradación.**

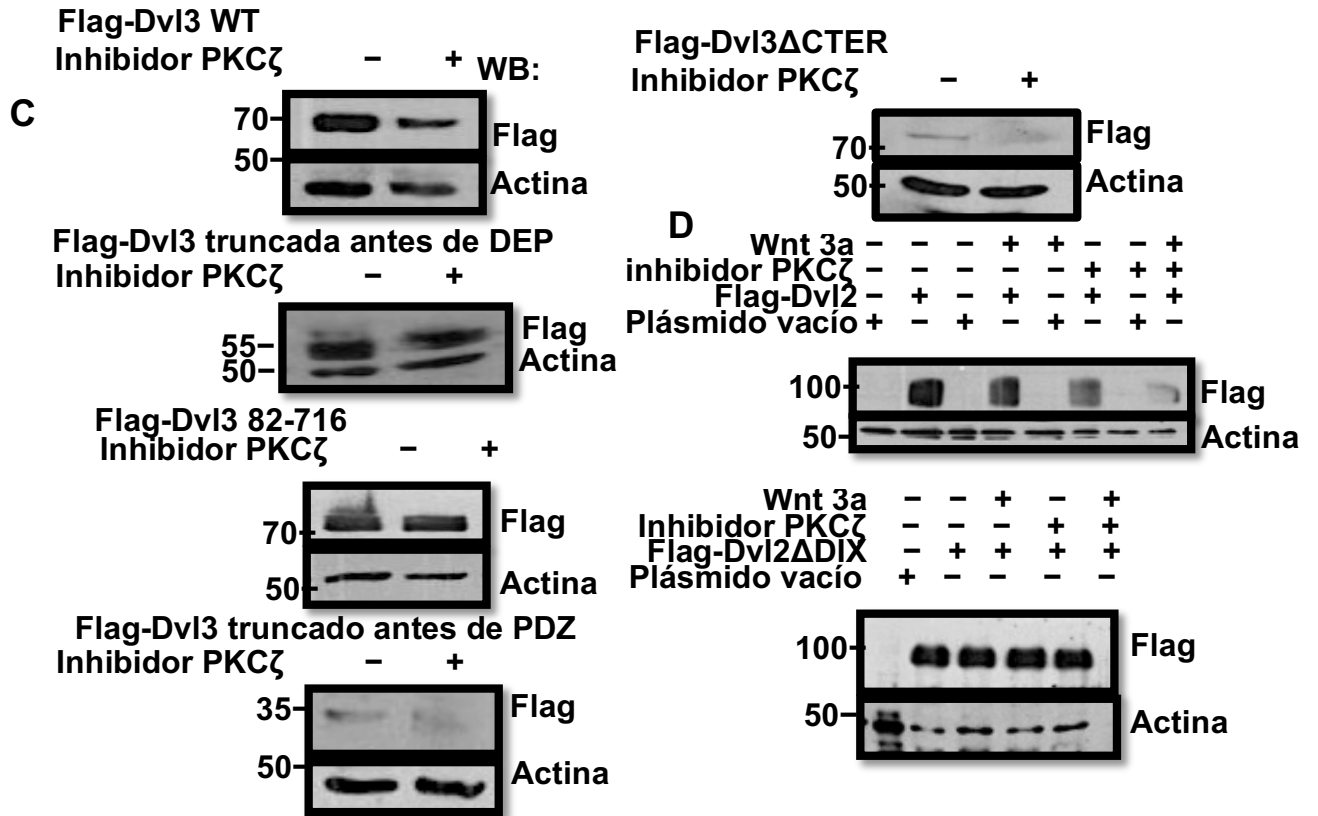
A) La eficiencia del silenciamiento de PKCζ se determinó mediante Western blot 36 h después de la transfección de células HEK293 con pSuperPKCζ-RNAi en comparación con el plásmido vacío usado como control. B) El análisis por Western blot de P-Dvl3 / Dvl3 obtenido de células HEK293 silenciadas de PKCζ incubadas en ausencia o presencia de MG-132 y en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1 h. Se usó β-tubulina como control de carga.

### 6.11 Mapeo de la interacción entre los dominios de Dvl y PKCζ: El dominio DIX se requiere para estabilizar a Dvl2 y Dvl3 fosforilados por PKCζ, pero no es la región fosforilada por PKCζ en Dvl3

Para definir qué dominios de Dvl3 son importantes para interactuar con PKCζ, hicimos uso de varias construcciones FLAG-Dvl3 obtenidas de Addgene (donadas por el laboratorio del Dr. Randall Moon (reportadas en la Referencia 9 y representadas en la (Figura 19A) Estas construcciones fueron expresadas en células HEK293. Además, como se puede observar en la Figura 19B, la expresión de FLAG-truncada antes de DEP-Dvl3, FLAG-truncada antes de PDZ-Dvl3 y FLAG-ΔCter-Dvl3 se expresaron de manera menos eficiente en células HEK293 en comparación con las otras construcciones, Como se reporto anteriormente por Angers et al (9) También observamos que estas últimas construcciones son menos estables, ya que a menudo se obtiene más de una banda de menor peso (véase la Figura 19B, carriles 4, 5 y 6.). Las células HEK293 que expresan cada construcción se incubaron en ausencia o presencia de inhibidor de PKCζ durante 1 h y se prepararon lisados celulares para el análisis por Western blot contra FLAG. La Figura 19C muestra la manera en la que la inhibición de PKCζ indujo la degradación de la construcción FLAG-Dvl3, excepto aquellos en los que el dominio DIX estaba ausente, es decir, FLAG-82-716-Dvl3 y FLAG-truncado antes de DEP. Sin embargo, y notablemente, en las células que expresan estas dos construcciones, la banda fosforilada superior correspondiente a P-Dvl3 era visible en células no tratadas, pero esta banda desapareció como resultado de la inhibición de PKCζ. Esto indicó que el dominio DIX es necesario para el efecto de

degradación inducido por la inhibición de PKC $\zeta$ . Sin embargo, el dominio DIX no es el dominio fosforilado por PKC $\zeta$  en respuesta al estímulo de Wnt3a (Figura 19C). En lugar de ello, los resultados indican que PKC $\zeta$  fosforiló el dominio Dvl-DEP y/o el dominio Dvl-Carboxilo terminal porque la construcción de Flag-Dvl truncado antes de DEP mostró la banda P-Dvl que desapareció como resultado de la inhibición de PKC $\zeta$ . Estos resultados también se obtuvieron con la construcción de 3xFLAG-Dvl2 expresada en células HEK293 incubadas en ausencia o presencia del inhibidor de PKC y en ausencia o presencia de Wnt3a. Como se puede observar en la Figura 19D, la sobreexpresión de 3xFLAG-Dvl2 produjo la activación per se de Dvl2, visualizada como un doblete P-Dvl2 / Dvl, que se degradó como resultado de la inhibición de PKC $\zeta$ . Como se observó con FLAG-Dvl3 suprimido del dominio DIX, la expresión de 3xFLAG- $\alpha$ Dvl2 (FLAG-DVL2 $\Delta$ DIX) demostró un bloqueo completo del efecto de degradación de Dvl2 inducido por la inhibición de PKC $\zeta$  cuando falta el dominio DIX (Figura 19D, en la parte inferior), en comparación con FLAG-Dvl2 silvestre. Esto reforzó la idea de que el DIX dominio es necesario para inducir la estabilidad en Dvl2 y Dvl3 fosforilados por PKC $\zeta$ .



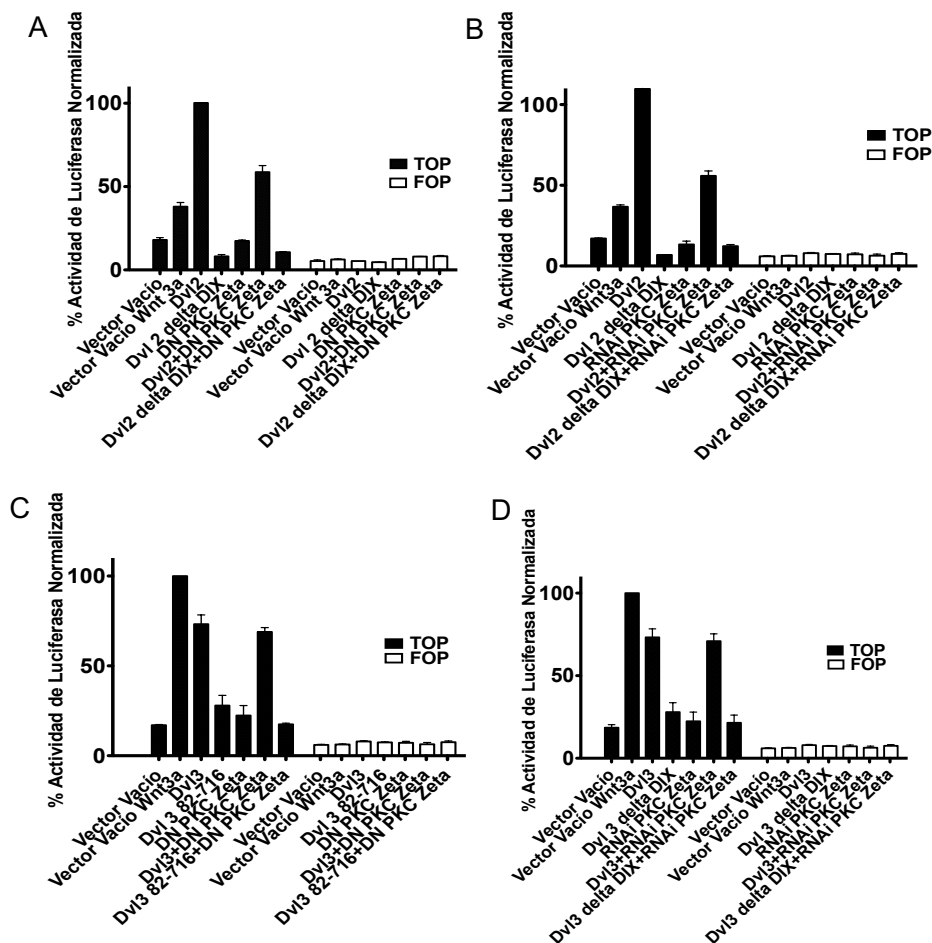


**Figura 19. Mapeo de los dominios de interacción entre Dvl y PKC $\zeta$ :** El dominio DIX es necesario para estabilizar a Dvl2 y Dvl3 fosforilados por PKC $\zeta$ , pero no es la región fosforilada por PKC $\zeta$  en Dvl3. A) Las construcciones que contenían Dvl3-FLAG se utilizaron para identificar los dominios de Dvl3 implicados en la interacción con PKC $\zeta$ . B) Las células HEK293 se transfectaron con el control, el plásmido vacío (Ctr) o con las de construcciones de Dvl3-FLAG. Treinta y seis horas después de la transfección, la expresión de las construcciones se examinó por Western blot contra Flag. Se utilizó un anticuerpo de actina como control de cargas iguales. C) Las células HEK293 que expresan cada construcción, se incubaron en ausencia o presencia del inhibidor de PKC $\zeta$  durante 1 h, y se prepararon lisados celulares para el análisis por Western blot contra FLAG. Se utilizó un anticuerpo de actina como control de cargas iguales. D) Las células HEK293 que expresan las construcciones indicadas en la Figura se pre-incubaron en ausencia o presencia del inhibidor de PKC $\zeta$  durante 1 h, y luego en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1 h. Los lisados celulares se prepararon para el análisis mediante Western blot contra FLAG. Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes utilizando diferentes preparaciones celulares.

#### 6-12.-La actividad de PKC y el dominio DIX de Dvl son necesarios para activar la señalización Wnt canónica

Se ha reportado que la sobreexpresión de Dvl *per se* activa la señalización Wnt y que el dominio DIX es necesario para activar la vía canónica Wnt. Para confirmar esto, a las 36 h después de la transfección con el sistema reportero de la actividad transcripcional  $\beta$ -catenina TOP-Flash (o plásmido control FOP-Flash) y con los plásmidos que contenían las construcciones indicadas en la Figura 19, las células HEK293 se incubaron en ausencia o presencia de Wnt3a durante 1h. Los resultados mostraron claramente que, de acuerdo con informes anteriores, la

sobreexpresión de Dvl2 sola (Figura 20A, carril 3) o de Dvl3 (Figura 20C, carril 3) inducen la activación de la señalización Wnt canónica independiente de ligando. Además, su dominio DIX es absolutamente necesario para activar la vía Wnt canónica. Además, y de acuerdo con nuestro informe anterior de que PKC $\zeta$  modula positivamente la señalización Wnt canónica (37), se puede observar, en la Figura 20B y 20D, que el bloqueo de la expresión de PKC $\zeta$  por el siRNA, bloquea la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina. Esto ocurrió incluso cuando Dvl2 está sobreexpresado, aunque no en el caso de la sobreexpresión de Dvl3, ya que es el más eficiente para activar la señalización Wnt canónica. Además se observa el mismo efecto con la dominante negativa de PKC $\zeta$  (DN PKC $\zeta$ ) como se puede observar en la figura 20A y 20C.



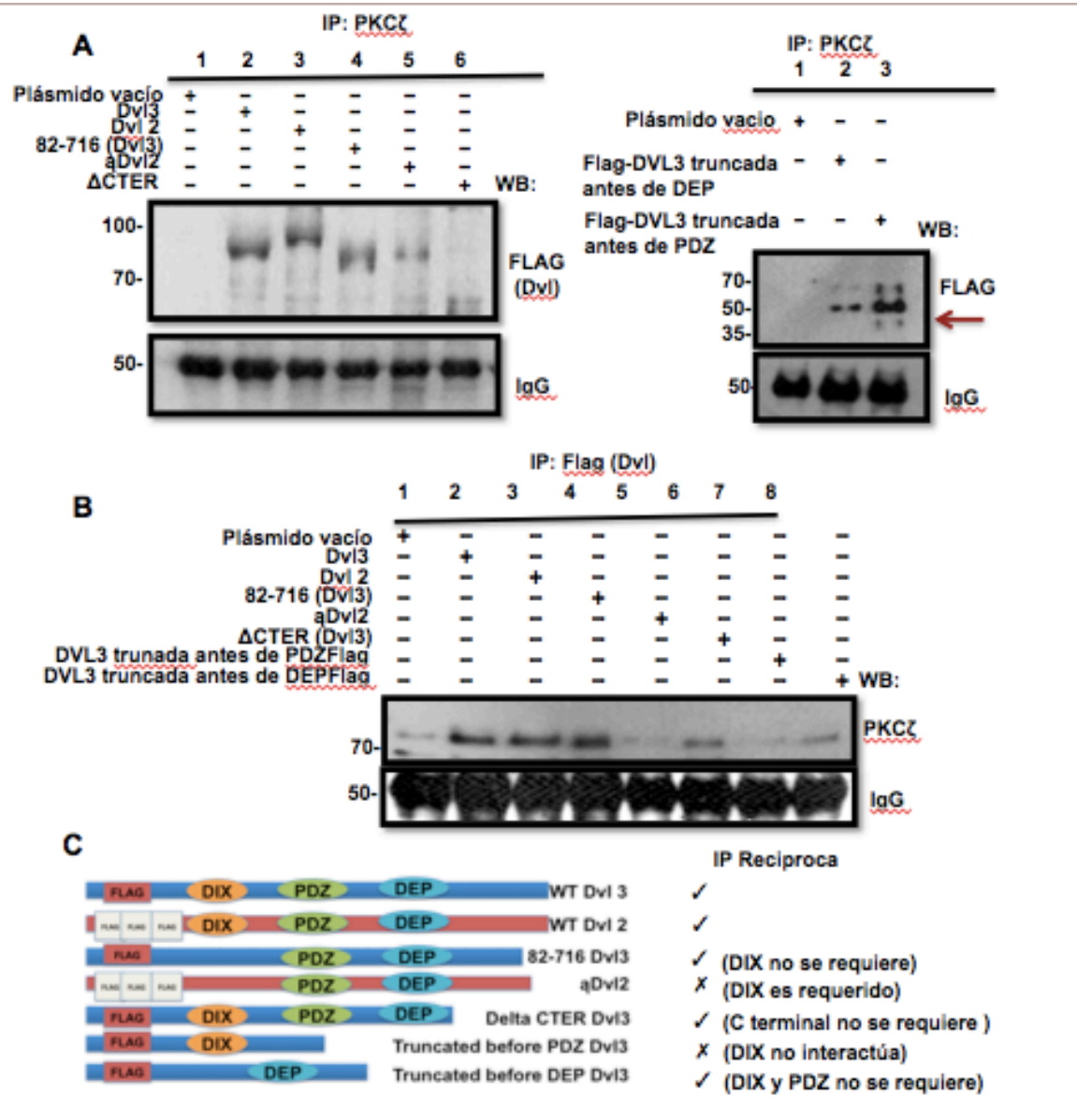
**Figura 20.- La actividad de PKC y el dominio DIX de Dvl son necesarios para activar la señalización Wnt canónica .** Las células HEK293 se co-transfectaron con pRL (control de tranfección), con plásmidos reporteros TOPFlash o FOPFlash (control) y con los plásmidos de las construcciones indicadas en la Figura. Los resultados obtenidos usando las construcciones de Dvl 2 se muestran en A y B y los resultados obtenidos con las construcciones de Dvl3 se muestran en el panel C y D. Treinta y seis horas después de la transfección, las células se lavaron, lisaron y se realizó el ensayo de actividad de luciferasa. La actividad se normalizó con respecto a la actividad de la luciferasa de Renilla o con respecto al contenido de proteína en cada muestra. Los resultados representan las medias  $\pm$  Error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos

independientes

### 6.13 Mapeo de los dominios de interacción entre Dvl y PKC $\zeta$ : El dominio DEP interactúa con PKC $\zeta$

Para investigar qué dominio o dominios de las proteínas de Dvl interactúan con PKC $\zeta$ , realizamos estudios de co-inmunoprecipitación en células HEK293 que expresaban las diferentes construcciones FLAG-Dvl3 / Dvl2. Las construcciones de FLAG-Dvl, el control (plásmido vacío) y PKC $\zeta$  fueron inmunoprecipitados de las células HEK293. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante Western Blot para detectar la presencia tanto de la proteína PKC $\zeta$  así como de Dvl. Como puede observarse en la Figura 21A, mientras que todas las construcciones FLAG-Dvl3/Dvl2 co-inmunoprecipitaron con PKC $\zeta$ , esta isoforma de PKC no co-precipitó recíprocamente con dos de las siete construcciones FLAG-Dvl probadas (Figura 21B) en comparación con el control (células no transfectadas). Las construcciones FLAG-Dvl3 truncado antes de PDZ (que expresa sólo el dominio DIX, carril 7), y FLAG- $\Delta$ Dvl2 (no tiene el dominio DIX, carril 5), mostraron sólo una débil banda inespecífica en el blot ilustrada en la Figura 21B, detectada también en células transfectadas con el plásmido vacío. Por lo tanto, como se puede observar en el resumen representado en la Figura 21C, los resultados obtenidos con las construcciones de Dvl3 indicaron claramente que no se requieren los dominios DIX y PDZ para la interacción entre Dvl3 y PKC $\zeta$ . En cambio, se requiere el fragmento con el dominio DEP. Cabe destacar que, aunque sólo probamos dos construcciones FLAG-Dvl2, observamos una clara diferencia entre Dvl3 y Dvl2 con respecto a la implicación del dominio DIX en la interacción con PKC $\zeta$  (compare los carriles 4 y 5, Figura 21B). Cuando el dominio DIX estaba ausente de Dvl3, PKC $\zeta$  y Dvl3 co-immunoprecipitaron recíprocamente (carril 4), lo que indica que el dominio DIX no es necesario para su interacción. En contraste, cuando el dominio DIX estaba ausente de Dvl2 (FLAG- $\Delta$ Dvl2), hubo co-inmunoprecipitación parcial, es decir, FLAG- $\Delta$ Dvl2 coprecipitado con PKC $\zeta$  (Figura 21A, carril 5). Esto no mostró el requisito de DIX, pero que PKC $\zeta$  no co-precipitar con FLAG- $\Delta$ Dvl2 (Figura 21B carril 5). Los resultados obtenidos de estos estudios de coimmunoprecipitación se resumen y se representan en la Figura 21C. Cuando una construcción de Dvl marcada con FLAG co-immunoprecipitó recíprocamente con PKC $\zeta$ , aparece marcada con este símbolo ( $\checkmark$ ), mientras que la no coimmunoprecipitación está marcada con ( $\times$ ). La conclusión deducida de estos estudios se indica entre paréntesis. Nuestros datos indican que el dominio DIX es absolutamente necesario, no sólo para la activación Wnt canónica, sino también para la inducción de la estabilidad de Dvl2 y Dvl3 promovida por la fosforilación de PKC $\zeta$ . Sin embargo, el dominio DIX no es el sitio fosforilado por PKC $\zeta$  para inducir la estabilización de Dvl. Por otro lado, el dominio DEP, que contiene dos sitios conservados con una alta probabilidad de fosforilación por PKC $\zeta$  (ver Figura 21), es necesario para su interacción. Recientemente reportamos que, tras la estimulación con Wnt3a durante 5 min en células cancerosas, GSK-3  $\beta$  es fosforilado por PKC $\zeta$ , produciendo un aumento transitorio en la actividad de GSK-3  $\beta$  (40). Todos nuestros datos en conjunto sugieren un modelo en el que el dominio

DIX de Dvl desencadena la formación del señalosoma en respuesta a Wnt3a favoreciendo la activación completa de PKCζ, probablemente por su interacción con los oligómeros de Dvl en los dominios DEP. Esto también sugiere que una vez que este activa PKC fosforile a Dvl, estabilizando la formación de los signalosomas para producir una activación fuerte y sostenida de la señalización Wnt canónica.



**Figura 21.-Mapeo de los dominios de interacción entre Dvl y PKCζ: el fragmento de Dvl3 que contiene sólo el dominio DEP interactúa con PKCζ.** A, B) las células HEK293 se transfectaron con las construcciones de FLAG-Dvl3, Dvl2 o con el plásmido vacío como control. Treinta y seis horas después de la transfección, las células fueron lisadas, y PKCζ (panel A) o FLAG (Dvl, panel B) fueron inmunoprecipitados de los lisados celulares. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos anti-FLAG (panel A) o anti-PKCζ (panel B). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares. C) Resumen de los estudios de inmunoprecipitación recíproca: la figura representa, cada construcción de Dvl marcada con FLAG, si co-inmunoprecipitó recíprocamente con PKCζ

esto se represento con este símbolo (✓) o si no con este otro símbolo (x). Las conclusiones inferidas de estos estudios se indican entre paréntesis. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos utilizando diferentes preparaciones celulares.

## 7. DISCUSIÓN

Las proteínas Dishevelled incurren en funciones cruciales para transducir las señales canónicas y no canónicas de Wnt que unen las respuestas de la membrana con las respuestas nucleares.

Como Dvl es un componente clave en la vía Wnt, la regulación de su actividad y estabilidad es muy importante para la propia transducción de la señal. A pesar de esto, los mecanismos precisos de su regulación son pobremente entendidos.

En este estudio encontramos que Dvl1, Dvl2, y Dvl3 están sobre-expresadas en células de cáncer de colon en comparación con las células de colon no malignas. De acuerdo con esto se ha reportado que Dvl se sobre-expresa en varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas cervicales y glioma (13, 38 y 39). A pesar de esto el papel de las proteínas Dvl en cáncer sigue siendo oscuro. En este sentido, se encontró que la sobre-expresión de cualquiera de las tres Dvls individualmente, son capaces de promover la actividad transcripcional de TCF/LEF en ausencia de Wnt 3a, es decir mimetizan a Wnt3a (41 y 42). Esto sugiere que la hiperactividad de Dvl asociada con su sobreexpresión, así como la estabilización de  $\beta$ -catenina debida a mutación, podrían ser la causa primaria del aumento de la señalización de Wnt en el cáncer. Esto tendría lugar particularmente en la señalización canónica, que es más sensible a los cambios en la abundancia de cualquiera de Dvl3 o Dvl1, esta última es menos abundante que Dvl2 en células no malignas (42).

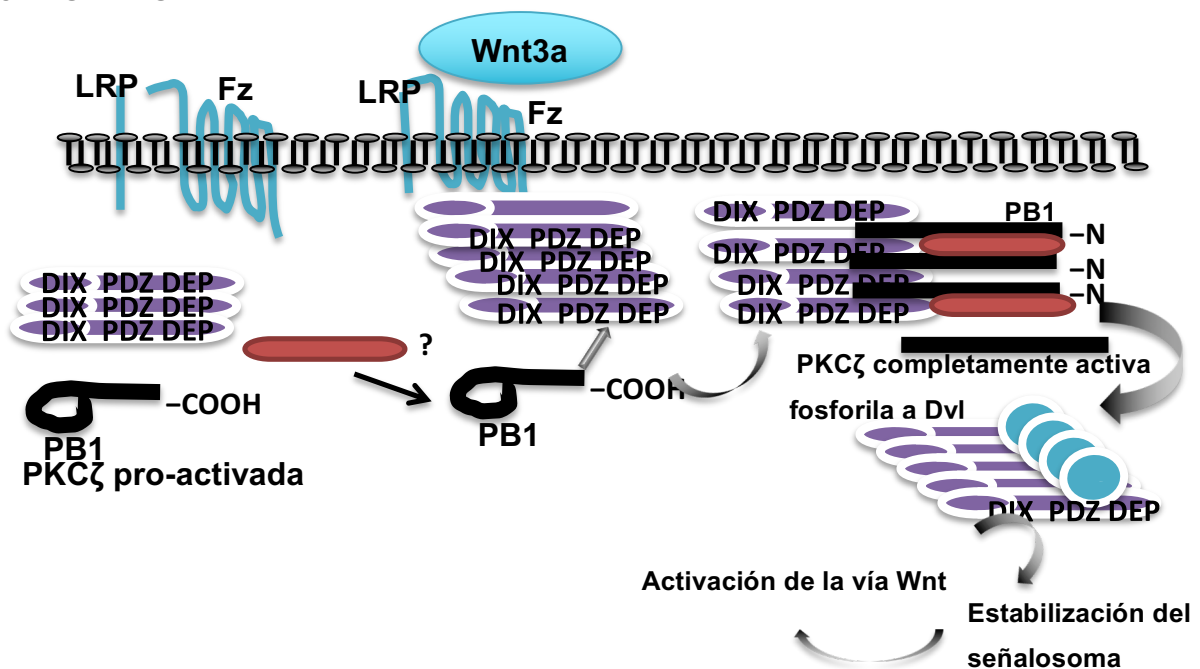
El principal hallazgo presentado en este trabajo es la demostración de que la actividad de señalización de Dvl y su estabilidad es positivamente regulada por la fosforilación mediada por PKC $\zeta$  en respuesta al tratamiento con Wnt3a. Es bien sabido que Dvl es una fosfoproteína, estas proteínas son sustrato de diversas cinasas, y algunas de estas cinasas fosforilan a Dvl en respuesta a los ligandos Wnt. Sin embargo, hasta la fecha, el papel preciso desempeñado por esta fosforilación en la regulación de la actividad de señalización de Dvl aún no se conoce bien. A este respecto, la evidencia experimental ha demostrado que tanto CK1 $\delta$  /  $\epsilon$  como CK2 fosforilan a Dvl en respuesta al estímulo con Wnt. Nosotros también encontramos que PKC $\zeta$  induce la fosforilación de Dvl con el tratamiento de Wnt, en concordancia con reportes previos PKC $\delta$  y PKC  $\alpha$  se encuentran involucradas en la regulación de Dvl (43 y 44). Se ha reportado que el silenciamiento de CK1 $\delta$ / $\epsilon$  mediado por el siRNA bloquea la formación de P-Dvl después del tratamiento con Wnt3a o Wnt5a, nosotros también mostramos lo mismo cuando la expresión de PKC $\zeta$  está disminuida, pero el silenciamiento de CK2 no produjo ningún efecto sobre el bloqueo en la formación de P-Dvl (21). Esta evidencia experimental por tanto, llevó a pensar que la fosforilación de Dvl mediada por CK1 $\delta$ / $\epsilon$  promovería la formación de agregados de Dvl/ signalosomas con la consecuente activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Sin embargo, estas predicciones no han sido apoyados por datos experimentales. Los resultados

obtenidos con respecto a las consecuencias de la fosforilación de Dvl inducida por CK1 están en claro contraste con los hallazgos obtenidos en este estudio con respecto a las consecuencias de la fosforilación de Dvl mediada por PKC $\zeta$ : **Primero** se reportó que la sobre-expresión de CK1 disolvió y no promovió los agregados de Dvl en todos los tipos de células probados,(21, 45 y 46) reduciendo la acumulación de Dvl en las “puntas” y atenuando la señalización de  $\beta$ -catenina. De hecho la fosforilación de Dvl por CK1, particularmente en el carboxilo terminal (CT), promueve un bucle de retroalimentación negativa que inhibe la señalización de Wnt. Además De Groot et al (16), también demostró que CK1 $\epsilon$  induce la unión de Huwe1 a Dvl. La poli-ubiquitinación de Dvl ligada a K63 y K11 dentro del dominio Dvl DIX por Huwe 1 no dirigió a Dvl a una degradación proteosómica. En cambio inhibió la multimerización de Dvl requerida para activar la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina. Consistente con esto, USP14, la cual quita las cadenas de poli-ubiquitinación unidas a K63 en Dvl, fue identificada como un regulador positivo de la vía Wnt (18). En un claro contraste nosotros mostramos que la sobre-expresión de PKC $\zeta$  da como resultado un incremento en el nivel total de proteína de Dvl 3 (por favor vea la Figura 14E). La fosforilación mediada por esta cinasa con los tratamientos por Wnt3a promueven la estabilidad de Dvl3, favoreciendo la formación de las “puntas” de Dvl 3 (Figura 14B). Por otro lado el silenciamiento de PKC $\zeta$  o su inhibición induce la degradación de Dvl vía proteosoma (Figuras 17A y B) y el bloqueo en la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina (por favor ver la Figura 20). **Segundo**, la cinética de fosforilación de Dvl por Wnt mediada por CK1 $\delta/\epsilon$  es diferente comparada con la inducida por PKC $\zeta$ . Mientras que la forma fosforilada de Dvl (P-Dvl) inducida por CK1 aparece excesivamente lenta para preceder a la estabilización de  $\beta$ -catenina necesaria para activar la señalización Wnt canónica [19], la fosforilación de Dvl inducida por PKC $\zeta$  aparece 5 min después del tratamiento con Wnt3a en las células. Consistentemente con esta cinética, nosotros reportamos anteriormente que PKC $\zeta$  modula positivamente la actividad de GSK-3 $\beta$  por fosforilación en la serina 147 después de 5 minutos del estímulo con Wnt 3a (40). El presente estudio identifica a Dvl como otro componente de la vía Wnt canónica que también es positivamente modulado por PKC $\zeta$ . Por lo tanto, la regulación de la estabilidad de la proteína por fosforilación parece ser un mecanismo regulador común en la señalización Wnt, porque además de la regulación de la estabilidad hecha por la fosforilación sobre el efector clave  $\beta$ -catenina, la actividad Dvl también se modula de esta manera. Sin embargo, en contraste con la  $\beta$ -catenina, cuya fosforilación induce su ubiquitinación y degradación, la fosforilación de Dvl mediada por PKC $\zeta$  induce su estabilización y el bloqueo de esta fosforilación induce su degradación a través del proteosoma. La región de Dvl3 que media la unión con PKC $\zeta$  se determinó utilizando varios fragmentos de la proteína Dvl3 con una etiqueta. Se encontró que PKC $\zeta$  se asoció con el dominio DEP de Dvl, pero no con el dominio DIX, dominio PDZ, o con el dominio carboxilo terminal. Con respecto a que sitios en Dvl son fosforilados por PKC $\zeta$ , se determinó que se encuentran en el dominio Dvl-DEP o dominio Carboxilo terminal (Ver Figura 19C). En concordancia con estos resultados, el análisis in silico de la secuencia primaria de las isoformas de Dvl mostró dos sitios putativos conservados de fosforilación por PKC $\zeta$  en las tres isoformas de Dvl localizados en



el dominio DEP, estos sitios son buenos candidatos para ser fosforilados por PKC $\zeta$ . Además, a pesar de que el dominio CT de Dvl se asoció con efectos negativos en la señalización Wnt canónica, no podemos descartar que PKC $\zeta$  también puede fosforilar algunos sitios ubicados en este dominio. Esto se debe a que la mayoría de estos sitios poseen la mayor puntuación de probabilidad (> 0,95). De acuerdo con nuestros resultados, Zhang et al. [47] reportó previamente que Dvl se asocia con el complejo de polaridad PAR-PKC $\zeta$ . Este complejo posteriormente interactúa directamente con PKC $\zeta$  a través del dominio DEP en cultivo de neuronas del hipocampo. Esto es para promover la diferenciación de axones en respuesta de Wnt5a. Interesantemente los autores demostraron que el resultado de esta interacción es la estabilización y activación de PKC $\zeta$  (47). Sin embargo ¿Cómo puede PKC $\zeta$  ser activado en respuesta al estímulo de Wnt3a? Newton et al. (48) recientemente demostró que PKC $\zeta$  naciente es co-traducionalmente fosforilada por mTORC2 localizado en los ribosomas, seguido de una fosforilación catalizada por PDK1 en el bucle de activación para producir una enzima constitutivamente fosforilada y catalíticamente competente (48). No obstante, para ser completamente activa, su seudosustrato auto-inhibidor debe ser removido de la cavidad de unión al sustrato. Este evento puede ocurrir por la unión a proteínas de andamios como PAR6 y p62 a través de sus dominios PB1 [48]. Aquí encontramos que tanto la presencia del dominio Dvl-DIX y la actividad PKC $\zeta$  son necesarias para producir la acumulación de Dvl y para activar la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina (Figura 20). La polimerización de Dvl a través de sus dominios DIX produce andamios dinámicos denominados "puncta" o "señalosomas", caracterizados por la producción de una alta concentración local de sitios de unión a proteínas. Esto resulta en una alta avidéz para sus efectores, como las proteínas cinasas, lo que permite la amplificación de las señales entrantes para convertirlos en respuestas robustas (49).

## 8. MODELO



Tomando en cuenta todas las pruebas experimentales que hasta este momento se tiene además de nuestros datos, nosotros sugerimos un modelo en el que el estímulo de Wnt3a desencadena la polimerización de Dvl a través de sus dominios DIX. Esto favorece el reclutamiento de otras proteínas de unión a Dvl, tales como PKC $\zeta$ , favoreciendo asimismo su polimerización a través de su interacción con dominios Dvl-DEP. Este último resulta en la activación completa de PKC $\zeta$ . Posteriormente PKC $\zeta$  fosforila a Dvl estabilizando el señalosoma para producir una robusta y sostenida activación de la vía Wnt canónica.

## **9. CONCLUSIONES**

Las proteínas Dvl están sobre-expresadas en células de cáncer de colon, y el tratamiento con Wnt3a induce la fosforilación de Dvl por las isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\zeta$ , lo que resulta en la estabilización y activación de Dvl. Encontramos que la fosforilación de Dvl 3 por PKC $\zeta$  inducida por el ligando Wnt-3a se requiere para evitar la degradación de Dvl vía proteosoma. El mapeo de la interacción entre Dvl3 y PKC $\zeta$  indicó que aunque Dvl se une a PKC $\zeta$  por medio del dominio DEP, el dominio DIX también es requerido para estabilizar a Dvl fosforilada por PKC. Se propone un modelo de cómo Dvl fosforilada por PKC $\zeta$  induce la formación del signalosoma.

## **10. PERSPECTIVAS.**

Hacer experimentos de espectrometría de masas para averiguar cuáles son los residuos de la proteína Dvl que están siendo fosforilados por PKC $\zeta$  es uno de los objetivos en el laboratorio.

Sería sumamente interesante realizar los experimentos que validaran el modelo propuesto en este trabajo.

En este trabajo se descubrió que PKC delta también fosforila a Dvl, pero no sabemos cuál es la consecuencia de esta fosforilación en las células. Y por qué y para qué, más de dos isoformas de PKC fosforilan a Dvl en las células de colon.

## **REFERENCIAS**

- 1.- <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>
- 2.-Clevers, H, Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell 127 (3) (2006) 469
- 3.-Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling and disease. Cell 2012; 149: 1182-1205.
- 4.-Behrens J. Everything you would like to know about Wnt signaling. Sci Signal 2013; 6: pe 17.
- 5.- Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, Jablons DM. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression

Oncogene; New York 22.46 (Oct 16, 2003): 7218-21.

6.-Gao C, Chen Y-G. Dishevelled: the hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 2010; 22: 717-727.

7.-Kuhl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech Dev* 2001; 106: 61-67.

8.-Kinoshita N, Iioka H, Miyakoshi A, Ueno N. PKC $\delta$  is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements *Gene Dev* 2003; 17: 1663-1676.

9.- Gerard J. Tortora y Bryan Derrickson, *Principios de Anatomía y Fisiología* 13<sup>a</sup> Editorial Medica Panamericana, pag. 140.

10.- Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Dec 17;361(25):2449-60.

11.-Kato M, 2007, WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical Cancer Research* Jul 15;13(14):4042-5.

12.-Wallingford. J and Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity

13.-Kafka A, Basic-Kinda S, Pecina-Slaus N. The cellular story of Dishevelleds. *Croat Med J* 2014; 55: 459-467.

14.- Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, Li L, 2008 Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction, *J Cell Biol*, Mar 24;180(6):1087-100.

15.-Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol* 2010;12:781-790.

16.- De Groot REA, Ganji RS, Bernatik O, Lloyd-Lewis B, Seipel K, Šedová K, et al. Huwe1-mediated ubiquitylation of Dishevelled defines a negative feedback loop in the Wnt signaling pathway. *Sci Signal* 2014; 7: ra26 1-14.

17.-Angers S, Thorpe CJ, Biechele TL, Goldenberg SJ, Zheng N, MacCoss MJ, Moon RT. The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt- $\beta$ -catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 348-357.

- 18.-Jung H, Kim BG, Han WH, Lee JH, Cho J-Y, Park WS. Deubiquitination of Dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. *Oncogenesis* 2013; 2: e64.
- 19.-González-Sancho JM, Greer YE, Abrahams CL, Takigawa Y, Baljinnyam B, Lee KH, et al. Functional consequences of Wnt-induced Dishevelled 2 phosphorylation in canonical and noncanonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2013; 288: 9428-9437.
- 20.-Bernatik O, Ganji RS, Dijksterhuis JP, Konik P, Cervenka I, Polonio T, et al. Sequential activation and inactivation of Dishevelled in the Wnt/beta-catenin pathway by casein kinase. *J Biol Chem* 2011;286:10396-10410
- 21.-Bernatik O, Šedová K, Schille C, Ganji RS, Červenka I, Trantírek L, et al. Functional analysis of Dishevelled-3 phosphorylation identifies distinct mechanisms driven by Casein Kinase 1 $\epsilon$  and Frizzled5. *J Biol Chem* 2014; 289: 23520-23533.
- 22.-Witte F, Bernatik O, Kirchner K, Masek J, Mahl A, Krejci P, et al. Negative regulation of Wnt signaling mediated by CK-1 phosphorylated Dishevelled via Ror2. *FASEB J* 2010; 24: 2417-2426.
- 23.- Fields AP, Regala RP. Protein kinase C iota: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol Res.* 2007 Jun;55(6):487-97.
- 24.- Sánchez Bautista, Sonia 2007, Estudio de la estructura y función de la familia de proteínas quinasas C (tesis doctoral) Universidad de Murcia. España.
- 25.- Black, J.D. 2001. Protein kinase C isozymes in colon carcinogenesis: Guilt by omission. *Gastroenterology*; 1868-1872.
- 26.-Brasitus TA, Bissonnette M. PKC isoforms: villains in colon cancer? *Gastroenterology.* 1998 Jul;115(1):225-7.
- 27.- Frey, M.R. 1997. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21<sup>waf1/cip1</sup> y p27<sup>kip1</sup> and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 14: 9424-9435.
- 28.- Black, J.D. 2000. Protein kinase c-mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* 5, D406-D423.
- 29.- Saxon et al. 1994. Activation of protein kinase C isozymes is associated with post-mitotic events in intestinal epithelial cells in situ. *J. Cell Biol.* 126: 747-763.
- 30.-Cerdeira, S. R. et al. 2006. Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene* ;25(22):3123-3138.

31.-Guillem, J.G. et al. 1987. Altered levels of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinases in human colon carcinomas. *Cancer Res*; 47: 2036-2039.

32.- Yu W. et al., 2003. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase cβII- mediated colon carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 278(13), 11167-11174.

33 16.-Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJ, Kikuchi A, Higuchi Y, Bienz M. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 484-492.

34 17.-Roberts DM, Slep KC, Peifer M. It takes more than two to tango: Dishevelled polymerization and Wnt signaling. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 463-465.

35.-Yokoyama N, Golebiewska U, Wang HY, Malbon CC. Wnt-dependent assembly of supermolecular Dishevelled-3-based complexes. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 21): 3693-3702.

36.-Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled *Mol Cell* 2003; 12:1251-1260

37.-Luna-Ulloa LB, Hernández-Maqueda JG, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1615-1624.

38.-Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, et al. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci* 2003; 94:515-518.

39.-Uematsu K, Kanazawa S, You L, He B, Xu Z, Li K, et al. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of β-catenin. *Cancer Res* 2003; 63: 4547-4551.

40.-Tejeda-Muñoz N, González-Aguilar H, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Glycogen synthase kinase 3β is positively regulated by protein kinase Cζ-mediated phosphorylation induced by Wnt agonists. *Mol Cell Biol* 2015; 36: 731-741. 43

41.-Guo J, Cagatay T, Zhou G, Chan CC, Blythe S, Suyama K, et al. Mutations in the human naked cuticle homolog NKD1 found in colorectal cancer alter Wnt/Dvl/β-catenin signaling. *PLOS ONE* 2009; 4(11): e7982.

42.-Lee Y-N, Gao Y, Wang H. Differential mediation of the Wnt canonical pathway

by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal* 2008; 20: 443- 452.

43.-Kinoshita N, Iioka H, Miyakoshi A, Ueno N. PKC $\delta$  is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements *Gene Dev* 2003; 17: 1663-1676.

44.-Kuhl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech Dev* 2001; 106: 61-67.

45.-Bryja V, Schulte G, Rawal N, Grahn A, Arenas EJ. Wnt5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *Cell Sci* 2007; 120 (Pt4): 586-595.

46.-Bryja V, Gradl D, Schambony A, Arenas E, Schulte G. Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta catenin signaling in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6690-6695.

47.-Zhang X, Zhu J, Yang G-Y, Wang O-J, Qian L, Chen Y-M, et al. Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 743-754.

48.-Tobias IS, Kaulich M, Kim PK, Simon N, Jacinto E, Dowdy SF, et al. Protein kinase C $\zeta$  exhibits constitutive phosphorylation and phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate- independent regulation. *Biochem J* 2016; 473: 509-523.

49.-Madrzak J, Fiedler M, Johnson CM, Ewan R, Knebel A, Bienz M, et al. Ubiquitination of the Dishevelled DIX domain blocks its head-to-tail polymerization. *Nat Commun* 2015; 6: 6718. DOI: 10.1038

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