UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

"Estudio de la participación de la proteína fosfatasa 2 A en la ruta de señalización Wnt".

Tesis Que para optar por el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta M. en C. **Ma. Isaura del Carmen Figueroa Aldaríz**

Tutor: Dra. Martha Robles Flores Facultad de Medicina Depto. de Bioquímica

México D.F.

MARZO- 2015



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. Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Martha Robles Flores.

La investigación fue financiada por donativos otorgados a la Dra. Robles Flores por la UNAM (DGAPA) a través del Progama PAPIIT (IN226111), y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 151731). M.I del Carmen Figueroa Aldariz fue becada por CONACYT durante sus estudios de Doctorado 103335.

El Comité Tutoral estuvo conformado por las Doctoras Martha Robles Flores, Marcela Lizano Soberón y por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

El Jurado del Examen de grado estuvo conformado por los Doctores:

Dra. Martha Robles Flores Dr. Jesus Chimal Monroy Dr. Jorge Meléndez Zajgla Dra. Marina Macias Silva Dr. Gonzalo Castillo Rojas

DEDICO ESTA TESIS A MI MAMI

MA. DEL CARMEN ALDARÍZ ALARCÓN

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A MIS MAESTROS Y TUTORES DE LA UNAM Y DEL IPN

"LAS PALABRAS SOBRAN CUANDO DE SENTIMIENTOS SE TRATA"

I. ÍNDICE GENERAL

	Pag.
I. Índice General	3
II. Índice de Figuras	6-8
III. Índice de Tablas	9
IV. Abreviaturas	10-11
1.0 Resumen.	12-13
1.0 Abstract	14
2.0 Relevancia del trabajo que se presenta.	15
3.0 Antecedentes.	16-21
4.0 Introducción.	22-23
5.0 El Cáncer Colorectal	24
5.1 Epidemiologia	24
5.2 Etiologia	25
5.3 La Familia de las Proteína Fosfatasas de Serina y Treonina	27-29
5.4 La Subunidad Estructural PP2A-A	29-31
5.5 La subunidad Catalítica PP2A-C	31
5. 6 La subunidad regulatoria PP2A-B	34
5.6.1 La familia de subunidades B/PR55	34
5.6.2 La familia B'/PR61	34-35
5.7 La PP2A en la Señalización celular	35
5.8 La proteína Fosfatasa PP2A y la ruta de Señalización Wnt	35-38
5.9 El papel de la subunidad PP2A-A en la supresión tumoral	39-43
5.9.1 La expresión disminuida de las subunidades de la PP2A	43-45
5.9.2 Regulación Negativa de la PP2A en Cáncer	45
5.9.3 Las holoenzimas funcionales de la PP2A son blancos específicos	
de las proteínas virales	46-47
Objetivo general del proyecto.	48
Hipótesis.	48
Objetivos específicos.	48
6.0 Materiales y métodos	48
Carácter+iticas de los pacientes	49-51
Cultivo celular.	51

Western blot.	51
Inmunoprecipitación.	52
Inmunofluorescencia.	53
Determinación de la actividad de PP2A in vitro	54
Ensayo de RT-PCR	54
Transfecciones y ensayo de Luciferasa.	55
Ensayo de proliferación celular por reducción de MTT.	
3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazolio bromide	56
Ensayo de apoptosis	56
Ensayo de activación de RalA	57
Análisis estadístico	57
7.0 Resultados	58

7.1La actividad basal total de PP2A está disminuida en las células malignas de colonen comparación con la actividad encontrada en las células normales.58-60

7.2 La expresión de la subunidad de anclaje A isoforma β de PP2A se pierde en las células malignas a nivel proteína pero varía a nivel del RNAm, en las diferentes líneas celulares analizadas.
60-66

7.3.1 La pérdida de la expresión de la subunidad regulatoria Aβ correlaciona con una actividad alta de la GTPasa RalA.
66-67

7.3.2 Incrementos en la expresión del RNAm de la A β var 2, en las células cancerosas, disminuye la actividad de la GTP asa Ral A, y la proliferación celular.

67-69

7.4 Las subunidad AC que forman el "core" de PP2A co-inmunoprecipitan de manera recíproca con β-catenina y co-localizan sólo en las células cancerosas.

70-75

7.5 La inhibición de la proteína PP2A induce efectos negativos en la actividad transcripcional de β -catenina y en la proliferación de células de cáncer de colon.

75-82

8.0	Figuras suplementarias	83-87
9.0	Discusión.	88-95
10.0	Conclusiones	96-99
11.0	Perspectivas Futuras	100-105
12.0 5 F H₹ 1	Referencias. @.	106-113

II. Indice de Figuras

Figura 1.

Modelo del origen celular del cáncer de colon Pag. 26

Figura 2.

Diagrama de la proteína fosfatasa PP2A, se muestran la subunidades que conforman el heterotrímero: subunidad estructural (A), subunidad catalítica (C) y subunidades regulatorias agrupadas en las familias, B, B', B", B"

Pag.28

Figura 3.

Diagrama que muestra la estructura tridimensional de la subunidad estructural PP2A-Aβ, muestra los 15 repetidos tipo armadillo (HEAT); formados por las dos a-helices antiparalelas, que le dan una conformación de media luna, también se muestran los extremos amino con la cola adicional de 12 aa. y el extremo carboxilo de la proteína.

Pag. 31

Figura 4.

Regulación de la ruta de señalización Wnt canónica por la proteína fosfatasa PP2A. Pag.38

Figura 5.

Mapa del Cromosoma 11 (q 23-24) mostrando la ubicación del gen PPP2R1B; Isoforma PP2A-Aβ Pag. 40

Figura 6.

La actividad basal total de PP2A está disminuida en células de cáncer de colon en comparación con la actividad encontrada en células no-malignas. Pag. 59

Figura 7.

La expresión de la isoforma de la subunidad estructural Aβ, se pierde en las células malignas a nivel de proteína pero varia a nivel del RNAm en las diferentes líneas celulares evaluadas. (A) Niveles de expresión de la subunidad catalítica C de PP2A. (B) nivelas de expresión de la

subunidad PP2A-A. (C). Secuencia aminoácida correspondiente a los RNAm de los transcritos que codifican para las variantes 1 y 2 de la isoforma Aβ de PP2A.(D) Expresión de los RNAm que codifican para las isoformas de la subunidad regulatoria A de PP2A en líneas celulares de colon y en biopsias de pacientes.

Pag. 61-63

Figura 8.

La pérdida de la expresión de la subunidad estructural Aβ correlaciona con niveles altos de actividad de la GTPasa pequeña Ral A, en las células cancerosas, asimismo la expresión de la isoforma Aβ var 2 disminuye la actividad de la GTPasa pequeña Ral A, y la proliferación celular. (A) Las células cancerosas tienen una actividad basal mayor de la GTPasa RalA que las células no malignas. (B) Restablecimiento de la expresión de la subunidad Aβ en células RKO. (C) El restablecimiento de la expresión de Aβ disminuye la actividad de RalGTPasa. (D)Efecto del inhibidor de Endothal sobre la proliferación celular.

Pag. 67-69

FIGURA 9.

La subunidades catalítica y estructural PP2A-C/A co-inmunoprecipitan con la proteína βcatenina de manera recíproca, y colocalizan solamente en las células malignas de colon. (A) PP2A-Ca/β y PP2A-Aa/β co-immunoprecipitan de manera recíproca con β-catenina. (B) Ensayos de inmunofluorescencia; β-catenina co-localiza con PP2A-A en células malignas. (C)Cuadro resumen de resultados de las inmunofluorescencias en las líneas celulares normales. (D)Cuadro resumen de resultados de ls inmunofluorescencias en las líneas celulares cancerosas de colon.

Pag. 71-75

FIGURA 10.

La inhibición de la actividad de PP2A, mediante el uso de inhibidores específicos, bloquea de manera dosis dependiente la actividad transcripcional mediada por β -catenina. (A) y (B). Pag. 77

FIGURA 11.

La inhibición de la actividad de PP2A con el inhibidor específico de la PP2A denominado endotal, no afecta la tasa de apoptosis en células (A) RKO y en células (B) SW480.

(C) La inhibición de la actividad de PP2A con dosis crecientes del inhibidor específico de la PP2A conocido como Endotal, disminuye la proliferación celualr de manera dosis dependiente en las células RKO y SW480 (C).

Pag. 79-81.

FIGURA S1.

Ensayo de proliferación celular por el método de MTT, en células normales de colon 112CoN, a los tiempos y dosis de Endothal mostradas en la gráfica. Pag. 83

FIGURA S2.

Electroferograma de la secuenciación nucleotídica para el cDNA obtenido de la línea celular normal 112CoN, correspondiente a la isoforma PP2A-Aβ2.

Pag. 84

FIGURA S3.

Electroferograma de la secuenciación nucleotídica para el cDNA obtenido de la línea celular cancerosa RKO, correspondiente a la isoforma PP2A-Aβ2. Pag. 85

FIGURA S4.

Secuenciación aminoacídica del cDNA correspondiente a la isoforma PP2A-β2, obtenido de la línea celular normal 112CoN, y (B) de la línea celular cancerosa RKO, para su comparación, como puede observarse ambas secuencias codifican para la variante PP2A-Aβ2.

Pag.86

FIGURA S5

Comparación aminoacídica de las isoformas Aa y A β de la PP2A.

Pag. 87

III. Índice de Tablas

Tabla 1. Total de proteínas codificantes, de Cinasas y de Proteína Fosfatasas en el genoma Eucarionte. Pag. 22

Tabla 2.- Mutaciones de la subunidad PP2A-A identificadas en cánceres humanos. Pag. 41

Tabla 3. Inhibidores de la proteína fosfatasa PP2A. Pag. 47

ABREVIATURAS:

BAD	Bcl2-Agonista
Вр	Pares de Bases
BSA	Albumina de Suero Bovina
CAMK II	Cinasa de Proteina II dependiente de Calcio/Calmodulina
Células CHO	Células de Ovario de Hamster Chino
CIP2A	Inhibidor Canceroso de la PP2A
DAPI	4´.6 Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modiefed eagle's médium
DUSP	Fosfatasa Especifica Dual
E Coli	Escherichia coli
FGF	Factor de Crecimiento Epidermal
FGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Hormonal
FACS	Eluorescence activated cell sorting
FAK	Cinasa de Adheción Focal
GSK3B	Glicogeno Sintasa Cinasa-38
HEAT (repetido)	Huntington-elongation-PP2A-A subunit-TOR
	Cálulas de Piñón embriónico Humano, inmortalizados por la adición.
de	hter SV/4017 y el ancogén activo de Par
	Subunidad Catalítica do la Tolomorara Humana
	Con X 1 de Persuesta temprana Inmediata
	Gen X-1 de Respuesia templana inmediata Kilodaltan
	Cipara Supresera de Par
	Cirilasa supresora de Kas Carboyil Motil Transforana de Loucina
	Carboxii Menii Itansielasa de Leocina Antígono Igrao I dol Virus SV40
	Annigeno largo i del vilos sv40 Bretaína Cinara Astivada par Mitá aspes
MARK	Proteina Cinasa Activada por Milogenos
M-LEU3U9	PPZA-C Mefiliada en la Leucina 309
MMP	Metaloproteinasa ae Matrix
M-PPZA-C	PPZ-A Metiliada
MIOR	Bianco Mamario de la Rapamicina
NF-KB	Facto Nuclear de KB
OA DDG	Acido Ukadalico Ruffan Salia a ala Fasfata
PBS	Butter Salino de Fostato
PCK	Reaccion en Cadena de la Polimerasa
PDK-I	Proteina Cinasa I dependiente de 3-tostoinosito
PIJK	
PIP2	tostatidii inositol (4,5)P2
PIP3	Fostatiali inositol (3,4,5)P3
РКА	Proteina Cinasa A
PKR	Proteina Cinasa R
PME-I	Fostatasa Metilesterasa (especifica para PP2A)
PP	Proteina Fostatasas de Ser/Ihr
PP2A	Proteina Fostatasa 2 A
PP2A-A	Subunidad Estructural A de la PP2A
PP2A-C	Subunidad Catalítica C de la PP2A
P-PP2A-C	PP2A-C tosforilada
PPM	Proteina Fosfatasa dependiente de Metaloproteína
PTEN	Homologo de la Tensin Fosfatasa
PTP	Proteina Fosfatasas de Tirocina

RTK SDS SEM Ser shRNA siRNA ST SV40 TBST TH Thr Tyr	Error Estandar de la Media Serina RNA short hairpin RNA small interfering Antígeno T Pequeño del Virus SV40 Virus 40 de los simios Buffer salino de Tris-Tween 20 Tirocina hidroxilasa Treonina Tirocina
Tyr	Tirocina
WT	Cepa Silvestre

1.0 RESUMEN

El epitelio intestinal está sujeto a una continua renovación a expensas de células troncales madres durante toda la vida del organismo. Su homeostasis está basada en el balance preciso entre proliferación, diferenciación y apoptosis; la pérdida del control de este balance lleva al desarrollo de cáncer. Los tumores de tipo colo-rectal, se encuentran entre las formas de neoplasias humanas más frecuentes. Diversos estudios han demostrado que en la mayoría de los casos de este tipo de cáncer se presentan alteraciones en la vía de señalización denominada Wnt.

El elemento distintivo de la vía Wnt canónica es la regulación de los niveles intracelulares y de la localización del co-activador transcripcional de la vía, la β-catenina, a través de fosforilación y desfosforilación de la misma. La fosforilación/desfosforilación reversible de proteínas juega un papel central en la regulación de las rutas de señalización intracelular. La desregulación de los mecanismos que regulan este balance juegan un papel directo en el inicio y mantenimiento del cáncer. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es la principal fosfatasa de serina/treonina en las células de mamífero. Su disfunción se ha involucrado en la carcinogénesis y se considera que frecuentemente actúa como un supresor tumoral. La evidencia experimental actual indica que PP2A puede modular tanto positiva como negativamente a la ruta Wnt a través de su interacción con diferentes componentes de la vía utilizando diferentes subunidades regulatorias. Sin embargo, su función precisa *in vivo* se desconoce.

En este trabajo, utilizando líneas celulares de colon humano en cultivo, así como, muestras de pacientes, tanto normales (no malignas) como cancerosas, encontramos que la actividad basal de PP2A es mucho menor en las células cancerosas que en las normales. Experimentos de coinmunoprecipitación recíproca e inmunofluorescencia mostraron que las subunidades catalítica C y la regulatoria A de PP2A interaccionan *in vivo* con β-

catenina solamente en células malignas. Interesantemente, encontramos que mientras que las células normales expresan tanto las isoformas a y β de la subunidad A, las células cancerosas sobreexpresan sólo una de ellas. Estudios de RT-PCR revelaron que el RNAm que codifica para ambas isoformas se expresa en células normales y en cancerosas que tienen ruta Wnt aparentemente normal, pero en contraste, no se expresa el RNAm para la isoforma AB en las células cancerosas que tienen una ruta Wnt alterada por mutaciones activadoras. Es decir, todas las células cancerosas de colon pierden la expresión a nivel de proteína de la subunidad AB, pero a nivel de RNAm solamente las que tienen una ruta WNt alterada. Consistente con esto, la GTPasa Ral, que interacciona específicamente con PP2A-AB, exhibe niveles muy altos de actividad en las células cancerosas (que no expresan la proteína A β), en comparación con las células no malignas. La inhibición selectiva de PP2A no afectó significativamente la apoptosis celular basal, pero indujo efectos negativos dosis-dependientes en la actividad transcripcional mediada por β catenina y en la proliferación celular de las células malignas. En conjunto, nuestros resultados indican que la actividad residual de PP2A en células malignas, debida a las subunidades –C y A α , juegan un papel regulador positivo crítico para mantener la actividad transcripcional de la β -catenina en células tumorales de colon, mientras que la isoforma β de la subunidad A, así como, sus dos variantes de splicing, actúan como un supresor tumoral en estas células.

1.0 ABSTRACT

Canonical Wnt signaling is altered in most cases of colorectal cancer. Experimental evidence indicates that protein phosphatase 2A (PP2A) may play either positive or negative roles in Wht signaling but its precise in vivo functions remain elusive. In this work, using colon cultured cell lines we showed that basal PP2A activity is markedly reduced in malignant cells compared to non-malignant counterparts. We found that whereas normal or cancer cells displaying not altered Wnt signaling express mRNAs coding for PP2A-A scaffold a and β isoforms, cancer cells which have altered Wnt signaling do not express the Aß isoform mRNA. Remarkably, we found that the Aß protein levels are lost in all colon cancer cells, and in patients' tumor biopsies. In addition, all cancer cells exhibit higher levels of RalA activity, compared to non-malignant cells. Rescue experiments to restore AB expression in malianant RKO cells, diminished the RalGTPase activation and cell proliferation, indicating that the Aβ isoform acts as tumor suppressor in colon cancer cells. Reciprocal co-immunoprecipitation and immunofluorescence studies showed that the PP2A-C and -Aa subunits, expressed in all colon cells, interact in vivo with β -catenin only in malignant cells. Selective inhibition of PP2A did not significantly affect cellular apoptosis but induced dose-dependent negative effects in β-catenin-mediated transcriptional activity and in cell proliferation of malignant cells, indicating that the residual PP2A activity found in malignant cells, mediated by -C and $A\alpha$ core subunits, is essential to maintain active Wnt signaling and cell proliferation in colon cancer cells.

2.0 RELEVANCIA DEL TRABAJO QUE SE PRESENTA

El cáncer de colon ocupa el tercer lugar de causas de muerte por cáncer en México y en países industrializados como los de América del Norte, tanto en hombres como en mujeres, por lo que el entendimiento de la enfermedad, así como la identificación de posibles blancos para un tratamiento más eficiente resulta de sumo interés. Actualmente no se dispone de algún marcador de malignidad del colon que pueda ser utilizado para el diganóstico precoz o el tratamiento oportuno de este tipo de cáncer. Numerosos estudios indican que la proteína fosfatasa 2A (PP2A) actúa como supresor tumoral y particularmente la isoforma β de la subunidad A de PP2A, se ha identificado como un posible supresor tumoral. En este trabajo demostramos tanto en líneas celulares de colon humano en cultivo como en biopsias de pacientes, que las células malignas no expresan la proteína correspondiente a la subunidad regulatoria Aβ del heterotrímero que constituye a PP2A. Esto sugiere que la pérdida de la expresión de esta isoforma de la subunidad A, podría ser utilizada como un posible marcador de malignidad en el epitelio intestinal. Es bien conocido que los procesos inflamatorios crónicos del tracto intestinal (síndrome de Cusi, síndrome de Chron, etc.) constituyen un factor de riesgo para desarrollar cáncer de colon. Por tanto, los resultados de nuestro estudio serían de gran utilidad para el desarrollo de un posible marcador bioquímico para el diagnóstico precoz de malignidad, cuando las células del epitelio intestinal dejan de expresar una de las dos isoformas de la subunidad estructural A, lo que permitiría proporcionar a estos pacientes un tratamiento precoz y eficaz temprano. Además, hemos encontrado que las subunidades del "core", C y A de la PP2A interaccionan in vivo con β-catenina solamente en las células malignas, y que a pesar de que la actividad basal total de PP2A está muy disminuida en la células malignas respecto a las normales, esta actividad residual juega un papel esencial de regulador positivo para mantener activa la ruta Wht canónica y por ende, la proliferación celular.

3.0 ANTECEDENTES

Los tumores de tipo colo-rectal se encuentran entre las formas de neoplasias más frecuentes. Las células epiteliales del colon residen en uno de los ambientes más tóxicos y de mayor estrés mecánico de nuestro organismo. Esto ha generado que las células estén en un continuo proceso de renovación a partir de células troncales madres durante toda la vida del organismo. Su alta tasa de renovación (4 días en promedio) las hace susceptibles a la transformación maligna.

La homeostasis de este epitelio está basada en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La evidencia experimental actual indica que la ruta de señalización Wnt, importante en el control de la capacidad de autorenovación de células troncales, es la fuerza dominante en el control de esta homeostasis, y que cuando está alterada se produce cáncer. Consistente con esto, estudios moleculares han demostrado mutaciones activadoras de la ruta Wnt en un número abrumador de casos de cáncer colo-rectal, aproximadamente en el 90% de los casos; (Logan, C.Y. et al., 2004; Radtke, F. et. al., 2001).

La fosforilación/desfosforilación reversible de proteínas juega un papel central en la regulación de las rutas de señalización intracelular. La desregulación de los mecanismos que regulan este balance juegan un papel directo en el inicio y mantenimiento del cáncer. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es la principal proteína fosfatasa de serina/treonina en las células de mamífero. La PP2A constituye en realidad una gran familia de serina/treonina fosfatasas heterotriméricas presentes en todas las células eucarióticas. La PP2A consiste de tres subunidades A, B, y C. El corazón de la PP2A está compuesto por la subunidad catalítica C y por la subunidad estructural A también conocida como PR65. En mamíferos, existen dos genes distintos que codifican para dos

proteínas muy relacionadas a la subunidad A de PP2A (A α y A β) y dos proteínas de la subunidad C (C α y C β). Una tercera subunidad, denominada como B, se une al heterodímero ó Core AC para formar la holoenzima funcional; la subunidad B, de las que existen múltiples miembros divididos en 4 subfamilias, regulan tanto la especificidad de sustrato como la localización de los complejos de PP2A, (Oving, I. et. al., 2002; Keen JC, et al., 2005), y son tejido específicas. Las diferentes asociaciones de todas estas subunidades da como resultado un grupo muy amplio de holoenzimas oligoméricas. Esto le permite a la PP2A tener una amplia flexibilidad regulatoria y una especificidad de sustrato diferencial. Las proteínas fosfatasas están involucradas en la regulación de muchos procesos celulares tales como: la regulación del ciclo celular, la diferenciación, trascripción, metabolismo, y apoptosis celular; (Oving I, et al., 2002). Asimismo, la PP2A parece estar críticamente involucrada en el crecimiento celular y en el desarrollo de cáncer. Algunos estudios indican que esta enzima puede actuar como supresor tumoral (Keen JC, et al., 2005, ya que la isoforma β de la subunidad A de la PP2A, se ha identificado como un posible supresor tumoral, para diferentes tipos de canceres.

Como se mencionó anteriormente, el "Core" de la enzima consiste de la subunidad de anclaje Aa β de 65 kDa a la que se une la subunidad catalítica Ca β de 36 kDa. La subunidades A (tanto α como β) tienen un papel de andamiaje en la holoenzima PP2A. Contienen características estructurales únicas tales como 15 repetidos en tandem con una secuencia conservada de 39 residuos conocida como motivo "Huntington-elongation-A subunit-TOR (HEAT), los cuales están organizados en forma de una L extendida, ó una media Luna. La subunidad catalítica C interacciona con la región Carboxilo (-COOH) terminal de alguna de las isoformas y variantes de splicing de la subunidad A o PR65 específicamente en el repetido HEAT 15 para la variante de splicing 2 ó

Var. 2; de ésta misma isoforma. Una vez formado el dímero AC, la subunidad estructural se dobla permitiendo el libre acceso de la subunidad catalítica a su sustrato, el cual es reclutado a la holoenzima por la subunidad regulatoria B. La mayoría de las holoenzimas contienen la isoforma PR65 α , de la subunidad A, mientras que sólo una pequeña fracción, menos del (10%) contienen a la isoforma PR65 β de la subunidad A. Aunque las dos isoformas comparten un 86.2% de identidad en su secuencia, se ha demostrado que PR65 β posee propiedades bioquímicas únicas y es incapaz de sustituir la pérdida de PR65 α en ratónes (Mumby M. rt al., 2007). Además, PR65 β se expresa a niveles mucho menores que PR65 α en los tejidos adultos. Sin embargo, en oocitos, durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de vertebrados, se ha encontrado que el RNAm de PR65ß es más abundante que el de PR65a. En sí, estos dos transcritos difieren en su habilidad para interaccionar con las diferentes subunidades regulatorias B. De manera interesante, se han identificado algunas mutaciones tumor-específicas en PR65ß que alteran su habilidad para formar holoenzimas con subunidades regulatorias específicas (Janssens V. et al., 2001; Mumby M. et. al., 2007; Bononi A. et. al., 2011; Pallas D.C. et al.; 1990; Sablina AA et al., 2007; Eichhorn PJA, et al., 2009).

La importancia funcional de la subunidad A de PP2A deriva de dos observaciones importantes: primero, mutaciones tanto en la isoforma β como en la α resultan en alteraciones en la unión de la subunidad regulatoria B o de la subunidad catalítica C. Como consecuencia, las subunidades funcionales A de andamiaje son disminuidas o reducidas sustancialmente, comprometiendo la actividad específica de PP2A; segundo; una gran variedad de tumores primarios humanos, incluyendo los de colon y pulmón, se han asociado con mutaciones en esta subunidad A β ; (Ruediger R, et al., 1999; Janssens V, et al., 2001; Mumby M, et al., 2007; Bononi A, et al., 2011; Pallas DC, et al., 1990). Puesto que tanto la subunidad C como la B se unen a la subunidad A, la función normal de la

subunidad A de anclaje juega un papel crítico en el ensamble de determinados heterotrímeros de la holoenzimas de PP2A para gobernar su actividad específica sobre blancos proteícos específicos. Esta conclusión se ha derivado de muchos estudios, tales como en los que se ha empleado el antígeno t pequeño del virus SV40, que se sabe que se une exclusivamente a las subunidades A α/β (en los repetidos HEAT 3-6) interrumpiendo la función de la subunidad A de andamiaje, inhibiendo y disminuyendo significativamente la actividad de la PP2A, (Ruediger, et al., 1999).

Además de la función reguladora negativa de la unión de subunidades específicas B en rutas de señalización asociadas con cáncer, se han encontrado varias mutaciones asociadas con cáncer en ambas isoformas de PR65. La secuenciación extensiva de muestras de tumores humanos ha revelado que PR65ß está mutada en un 15% en tumores cancerosos primarios de pulmón, en un 6% en líneas celulares derivadas de tumores pulmonares, y 15% en tumores primarios de cáncer de colon (Schonthal A.H. et al., 2001). Múltiples neoplasias epiteliales han mostrado la pérdida de la heterogenicidad en el locus cromosomal 11q23, donde se encuentra localizado el gen para la subunidad Αβ, sugiriendo que juega un papel de supresor tumoral. Notablemente, la isoforma β del gene PR65 se ha encontrado que está específicamente reducida en aproximadamente el 50% de 34 líneas tumorales analizadas. En contraste con lo encontrado con la soforma $A\beta$, cuando se examinó la integridad de la isoforma A α en las mismas líneas celulares tumorales, no se encontró disminución en la expresión en ninguna de ellas (Eichhorn PJA, et al., 2009). En otro estudio, los niveles de PR65 α se encontraron reducidos en el 43% en gliomas humanos primarios, mientras que en líneas celulares establecidas de glioma se encontraron altos niveles de expresión (ref). Esto puede sugerir que en el establecimiento de tumores primarios en cultivo, existe una fuerte presión selectiva a favor de la expresión de altos niveles de A α .

Se ha reportado que la pérdida de A α es letal en el desarrollo embrionario en ratas, por lo que sería muy sorprendente observar mutantes nulos en tumores, ya que todos los estudios realizados indican que se requiere por lo menos de un nivel de expresión mínimo de Aa para mantener la viabilidad celular (Jassen V, et al., 2001; Mumby M, et al., 2007; Bononi A, et al., 2001; Pallas Dc, et al., 1990; Sablina AA, et al., 2007; Eichhorn PJA, et al., 2009). Para determinar las funciones individuales de cada una de las isoformas de la subunidad estructural A en la tumorigénesis; Hahn et al., 2004 realizaron el knockdown de cada una de ellas en células HEK-TER. Como se esperaba, la supresión casi completa de la expresión de PR65α indujo muerte celular por apoptosis, mientras que la inhibición parcial indujo el fenotipo tumorigénico. Interesantemente, la pérdida de la subunidad PR65ß tuvo un potencial tumorigénico total, que no pudo ser rescatado por la expresión ectópica de PR65 α . Adicionalmente, se ha observado que la inhibición de complejos de PP2A que contienen PR65 α o PR65 β pueden llevar a la transformación celular. Sin embargo, sus mecanismos de acción para hacerlo son distintos y únicos. Es posible que las diferentes aberraciones genéticas acumuladas durante la formación de tumores cancerosos requieran la pérdida serial y acumulativa de diferentes complejos heterotrimericos de la holoenzima PP2A para que el tumor sobreviva y tenga ventajas competitivas de crecimiento sobre las células normales.

El papel que juega PP2A en la regulación de la ruta Wnt parece ser similar al que juega en la cascada de señalización Raf-MEK-ERK, en la que miembros individuales de la familia de PP2A ejercen tanto efectos positivos como negativos, locales; dependiendo de la composición de los complejos heterotrímericos presentes. Sin embargo, la contribución relativa de varios complejos de la PP2A en la regulación de la ruta Wnt en sus diferentes niveles se desconoce mayoritariamente; así como el significado que esto podría tener en los diferentes tipos de cáncer; (Zhang W, et al., 2009).

Interesantemente, se ha reportado recientemente que la ruta de señalización Wnt es regulada negativamente por PP2A a través de la interacción de su subunidad regulatoria B' (PR61 β o γ) con las proteínas Axina y con la proteína supresora tumoral APC; (Bononi A, et al., 2011). Adicionalmente; (Yokoyama et al., 2007) han encontrado que la proteína DvI, que es la encargada de transducir la señal para la estabilización y translocación de β -catenina al núcleo, es desfosforilada de manera directa por la PP2A; pero también regula negativamente a esta proteína a través de la proteína Naked y la subunidad regulatoria PR72, resaltando la importancia que la PP2A tiene en la regulación de la ruta Wnt.

4.0 INTRODUCCION

Un gran número de rutas de señalización son utilizadas para gobernar virtualmente todos los aspectos de la función celular, permitiendo a las células responder a cambios en el ambiente interno ó externo de la célula, crecer, multiplicarse y mantener la homeostasis "normal" de la célula. Estas rutas de señalización están cuidadosamente reguladas a través de una variedad de vías de Señalización que definen y determinan el destino celular, a través de diversos mecanismos; entre los más importantes se incluyen las modificaciones post-transcripccionales de las proteínas por procesos reversibles de fosforilación. Se ha estimado que aproximadamente un tercio de todas las proteínas celulares son susceptibles de ser fosforiladas de manera reversible en residuos específicos de Ser y Treo (Ser/Treo). La fosforilación reversible de las proteínas, es un proceso dinámico controlado por la acción coordinada de las Cinasas (Fosforilación) y las Fosfatasas (Desfosforilación) (Guergnon J, et al., 2001). Dos grupos de proteínas claves están involucradas en éstos procesos reversibles, las Cinasas; que adicionan grupos fosfatos a las proteínas blanco y las Proteína fosfatasas que remueven éstos grupos fosfato de dichos blancos celulares.

Tabla 1 Total de proteínas codificantes, así como de Cinasas y Proteína Fosfatasas en el genoma eucarionte. Tomado de P. Seshacharyulu, et. al.

Proteínas	S. cerevisiae	D. melanogas	ter C. elegai	nts Human
Total de Proteínas	6122	13,600	18,988	25,000
Total Cinasas de Prote	ína 124	236	493 Proteina-Cinasas-411 Tipo Proteína cinasas-82	518 Cinasas de Proteína de Ser/Tre-385 Cinasas de Tirosina -90 Proteínas tipo PTK-43
Total de Proteína Fosfatasas	37	93	185	119 Proteína-Fosfatasas de Ser/Treo-21 Proteína Tirosina Fosfastasas-98

Interesantemente, el número de reportes publicados que caracterizan a las cinasas de proteína excede por mucho los artículos que describen las funciones de las proteína fosfatasas en una proporción de 15:1, es decir por cada 15 artículos relacionados con la actividad de las Cinasas, se publica sólo un artículo, no por eso menos importante, que describe alguna función ó blanco específico de las proteínas fosfatasas. No es de sorprender por ende que nuestro conocimiento sobre las funciones, blancos y regulación de éste importante grupo de enzimas seg significativamente menor, al que tenemos en relación con el grupo de las cinasas mencionado. No obstante lo anterior, durante los últimos 15 años, se ha destacado la función como supresores tumorales de ciertas proteína fosfatasas por lo cual han empezado a recibir una mayor atención e interés. Por citar un ejemplo, mutaciones ó pérdida de la fosfatasa de lípidos PTEN, considerada actualmente como un supresor tumoral, PTEN; ocurre a una frecuencia muy alta en una gran variedad de cánceres humanos y sólo es sobrepasada por la frecuencia con la cual el supresor tumoral clásico p53 esta alterado, en dichos tumores (Logan YC, et al., 2004). Adicionalmente, la proteína fosfatasa 2A, ha recibido una atención considerable como resultado de la demostración de su actividad como supresor tumoral (Radtke F, et al., 2001; Clevers H, et al., 2004; Bienz M, et al., 2000). Sin embargo ciertos aspectos de la función de la PP2A, como su participación en el ciclo celular y en la regulación de la apoptosis, han minimizado y confundido su posible función como supresor tumoral bajo el argumento de que las funciones mencionadas se encuentran precisamente involucradas con la iniciación y la progresión tumoral, no obstante lo anterior un número cada vez creciente de artículos describen las múltiples funciones que como regulador negativo ésta fosfatasa ejerce tanto en ciclo celular, como en muchas otras rutas de señalización relacionadas directamente con proliferación celular y sobrevivencia de la célula, como en las rutas de PI3K y AKT. Asimismo, existe suficiente información de que esta proteína

fosfatasa regula positivamente la apoptosis, a través de Bad, Bax y Bcl2, lo que concuerda con su papel de supresor tumoral.

5.0 El Cáncer Colorectal

5.1 Epidemiología

El cáncer de Colon es mucho más común en el mundo Occidental, que en el Africa rural, por lo que está directamente relacionado con la dieta alimenticia, un consumo alto de grasa en la dieta Occidental, parece ser altamente carcinogénica para el Cólon. Otro de los factores ampliamente mencionado como posible causal de la enfermadad es que la dieta Occidental al tener más carbohidratos refinados y menos fibra cruda, provoca que las heces fecales permanezcan por periódos más prolongados de tiempo, lo que expondría a las células de este epitelio a ambientes físicos y químicos potencialmente dañinos. Similarmente se ha mencionado que un transito fecal lento favorece que los acidos biliares, que son de por sí carcinogénicos; estén en contacto con el epitelio intestinal por periodos más prolongados de tiempo.

En USA, se registran alrededor de 570,000 muertes debido al cáncer de colon y al cáncer rectal, alrededor de 138,000 casos son reportados por cáncer de estómago, 83,000 casos para cáncer de esófago, y 1,100,000 para cáncer de pulmón. Los carcinomas de Colon y Recto se asocian a la segunda causa de muerte por ésta enfermedad. En cuanto a la incidencia de la enfermedad podemos mencionar que en países como Japón y Finlandia la incidencia del cáncer de colon y en general del Tracto alimentario es muy bajo. Sin embargo, los japoneses que se han movido a Hawaii ó a América (USA) y han adoptado la dieta americana típica, desarrollan una incidencia de cáncer colorectal similar al del resto de los americanos, por lo que la dieta juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Tanto hombres como mujeres pueden desarrollar la enfermedad aparentemente a la misma tasa de inciencia. En

cuanto a la edad de los pacientes, podemos mencionar que 2 de cada 3 sobrepasan los 50 años de edad. En los casos de *Poliposis Familiar* ó *Colitis Ulcerativa*, el cáncer aparece a edades tempranas.

5.2 Etiología:

De los casos de cáncer de colon el 16% ocurren en el Cecum y Cólon ascendente, 8% de los casos se dan en el Colon Transverso y en el Pliegue Esplénico, 6% de los casos se presentan en el Colon descendente, 20% en el Colon Sigmoideo, y 50% en el Recto, de ahí la denominación de **Cáncer Colorectal**. Por otra parte, se ha mencionado que esta distribucción en la incidencia de la enfermedad ha sido atribuída a los tiempos de permanencia del contenido fecal en la zona sigmoidea y en el recto, pero ésta teoría permanece sin confirmación ciéntifica contundente (Haenszel W, and Carrea P et al., 2001) (Tabla no. 1).

Los adenocarcinomas son raros en la zona del apéndice. Los Carcinomas son los tumores más comúnes, y éstos raramente sufren metástasis ó se expenden hacia la zona del mesoapéndice, a menos que la enfermedad esté en etapas avanzadas.

En el recto, ocacionalmente un pequeño pólipo puede ser detectato histológicamente como un Carcinoma. Estos pequeños pólipos individuales tienen un comportamiento normalmente benigno y un potencial reducido de provocar metástasis, por lo que la cirugia de extirpación, comúnmente permite la remoción de la enfermedad.



Figura 1 Modelo del origen celular del cáncer de colon. (a) representación esquemática de las células madre del epitelio intestinal, células de amplificación (TA) y otros linajes intestinales diferentes. La activación constitutiva de la ruta de señalización wnt/β-catenina en las células madre intestinales columnares, através de la deleción del supresor tumoral APC, ó en las céluals +4 ISCs (células madre en la posición +4 desde la base de la cripta) através de la estabilización de la proteína β-catennina, liderean la formación de adenomas malignos de colon, en un periódo de un mes; mientras que cuando la deleción del supresor tumoral APC, se presenta en las células TA, éstas sólo inducen un microadenoma en el mismo periódo de tiempo (Adaptado de Barker, N et al y Sangiorgi E. et al)

5.3 La Familia de las Proteína Fosfatasas de Serina y Treonina.

Las proteína fosfatasas están agrupadas en dos grandes categorías, basadas en su habilidad de desfosforilar los residuos de Tirosina (Tyr); ó bien los residuos de Serina y/ó Treonina (Ser/Tre).

Las fosfatasas de Ser/Tre fueron originalmente clasificadas como del tipo-1 (PP1) ó del tipo-2 (PP2), de acuerdo a la especificidad de sustrato y susceptibilidad a inhibidores farmacológicos característicos. Adicionalmente las fosfatasas tipo-2 fueron subdivididas en subclases, que incluían a la PP2A, a la PP2B Calcineurina fosfatasa dependiente de Ca⁺² y las PP2C, dependientes de Mg⁺². Actualmente, y basados en la secuencia y homología estructural de las subunidades catalíticas, y los mecanismos enzimáticos, las fosfatasas de Ser/Treo se han dividido en dos grandes familias, conocidas como las PPP (Fosfatasas fosfo-proteina). Adicionalmente, otras proteínas PPP relacionadas, como la PP4, PP5, PP6, PP7, y PP8 son mucho menos abundantes y se expresan de manera tejido específica, así como, estadio de desarrollo específicas, también han sido caracterizadas. (Guergnon J, et al., 2000).

De la familia de las Ser/Tre proteína-fosfatasas, la PP2A es considerada la más importante, siendo responsable del 45-55% de toda la actividad de las proteína-fosfatasas de Ser y Tre, dependiendo el tipo celular y tejido.

La PP2A es una proteína heterotrimérica, constituida por una subunidad estructural "A", una subunidad catalítica "C", y una muy variable subunidad regulatoria "B" (Figura 1). La subunidad estructural "A" está formada por dos isoformas, denominadas como Alpha (a) y Beta (β), y sirven como proteínas de Anclaje (Scaffold), para las subunidades catalítica C y una subunidad regulatorio B. La subunidad Estructural A esta constituida por 15 unidades no idénticas denominadas HEAT (*Huntingtin-Elongation-A-Subunit-TOR-like*), que facilitan la unión de las subunidades B y C (Eichhorn PJA, et al., 2009; Sablina AA, et al., 2007). Similar a la subunidad A, la subunidad C también tiene dos isoformas a y β, y es Ia subunidad catalíticamente activa, de la enzima. La unión de la subunidad A (α/β) con la subunidad C (α/β), constituye el "Core" ó corazón de la enzima. La subunidades B regulatorias, han sido clasificadas en las siguientes familias: B/B55/PPP2R2, B'/PR61/B56/PPP2R5, B" y B''' (Figura 1), que se unen a la subunidad A de una manera mutuamente exclusiva, para formar distintas holoenzimas de la PP2A. Es importante señalar que la subunidad regulatoria B le confiere a la holoenzima de la PP2A especificidad de sustrato y localización celular.



Figura 2: Diagrama de la proteína fosfatasa PP2A, se muestran la subunidades que conforman el heterotrímero: subunidad estructural (A), subunidad catalítica (C) y subunidades regulatorias agrupadas en las familias, B, B', B", B", ". Tomado de Janssens V and Goris J, 2001.

Al día de hoy se han reportado alrededor de 25 subunidades regulatorias B, las que nos permitirían formar alrededor de 100 holoenzimas diferentes de la PP2A, a través de diversas combinaciones de las subunidades A y C con las diferentes subunidades B, finalmente es interesante mencionar que para las subunidades B se ha reportado que presentan expresiones diferenciales dependiendo del tipo celular, que se trate, asimismo pueden ser tejido específicas y expresarse diferencialmente en las diversas etapas de desarrollo de un organismo (gastrulación, desarrollo embrionario, desarrollo fetal, y diversas etapas de crecimiento y reparación de tejidos).

Dado los objetivos específicos de este trabajo de Doctorado, dedicaremos un apartado para la descripción más detallada de la subunidad estructural A (isoformas Alpha y Beta) de la PP2A, así mismo describiremos los antecedentes que sustentan sus funciones como supresor tumoral.

5.4 La Subunidad Estructural PP2A-A

Un modelo de la holoenzima PP2A se muestra en la Figura No. 1. La subunidad Alpha (a) consiste de 15 repetidos no idénticos. Cada repetido está formado de dos hélices alpha (a), conectadas por un intra-repetido, se ha demostrado que los intrarepetidos juegan un rol muy importante en la unión de las subunidades B y C, así como, de los antígenos T del virus SV40. Los repetidos adyacentes están a su vez conectados, por inter-repetidos. Colectivamente los repetidos forman una molécula extendida que es estabilizada por interacciones hidrofóbicas. Las subunidades B, regulatorias se unen a los repetidos 1-10, los antígenos T a los repetidos 2-8, y la subunidad C a los repetidos 11-15. (Zhanw W, et al., 2009; Sablina AA, et al., 2007). La estructura de rayos X de la subunidad Aa permite predecir una estructura en forma de media luna para esta proteína (Sablina AA, et al., 2007). Es interesante mencionar que las diferentes familias de las subunidades B, se unen a la misma región de la subunidad A, a pesar de sus diferencias en su

composición de aa. Sin embargo recientemente (Li X and Virshup et al., 2001), identificaron dos dominios de unión a la subunidad A, en las subunidades B, B', B", que contienen un número limitado de aa conservados que han sido involucrados en la unión a la subunidad A.

Aunque la holoenzima que contiene la subunidad Aa, han sido estudiada en gran detalle, poco se conoce en relación con la holoenzima que contiene la subunidad AB. En parte esto es debido porque la subunidad AB se expresa a niveles mucho menores que la subunidad Aa; es probable que las subunidades Aa y Aß tengan funciones únicas como lo indica el hecho de que aparentemente un switch de la isoforma AB a la isoforma Aa toma lugar, durante el desarrollo embrionario de Xenopus, sugiriendo que las holoenzimas Aq y Aß están involucradas en diferentes programas durante el desarrollo (Virshup et al., 2009). Adicionalmente, el extremo NH2-terminal de la subunidad AB tiene una cola adicional de 12 aa, que no se encuentra presente en la subunidad Aa (Ruediger R et al., 1999). Es muy probable que esta cola de aa tenga funciones específicas, por lo que Aa y Aβ difieren en su habilidad para unir a las subunidades regulatorias (B) y catalítica (C) (Pallas DC, et al., 1990). Por otro lado, el patrón de expresión de la subunidad Aβ en los tejidos normales y en las diferentes líneas celulares cancerosas difiere considerablemente de los patrones de expresión de la subunidad Aa. Mientras que el nivel de expresión de Aa es alto en la mayoría de los tejidos (Pallas DC, et al., 1990), los nivel de Aβ son bajos en todos los tejidos excepto en tejido testicular (Pallas DC, et al., 1990). Otros ensayos muestran que en las líneas celulares tumorales, los nivel de Aa fueron ligeramente elevadas y similares entre las líneas cancerosas estudiadas (Pallas DC, et al., 1990), mientras que los niveles de A β varían enormemente (Pallas DC, et al., 1990). Finalmente, también se ha reportado que la expresión de la subunidad AB, es notablemente más elevada en los tejidos epiteliales en comparación con el resto de los tejidos no epiteliales estudiados (Pallas DC, et al., 1990). Mientras que la subunidad Aa (PR65a) puede

interactuar con todas las subunidades regulatorias de la familia "B", la subunidad Aβ (PR65β), se une débilmente con las subunidades de la familia "B" (PR55) (Zhou, HTJ, et, al. 2003) y muestra una preferencia por algunas de las isoformas de la familia B", de las subunidades B regulatorias como a la subunidad PR72 (Zhou, HTJ et., al., 2003).



Figura 3: Diagrama que muestra la estructura tridimensional de la subunidad estructural PP2A-Aβ, muestra los 15 repetidos tipo armadillo (HEAT); formados por las dos a-helices antiparalelas, que le dan una conformación de media luna, también se muestran los extremos amino con la cola adicional de 12 aa. y el extremo carboxilo de la proteína. La cola adicional de 66 aa. en el extremo carboxilo (en rojo) representaría a la subunidad Aβ var 2. Tomado y modificado de Xing Y. et al.,2006.

5.5 La subunidad Catalítica C de la PP2A.

La subunidad catalítica C tiene un largo dominio conservado que forma un sitio

bimetálico activo para la hidrólisis de fosfoésteres. Este sitio activo ataca los grupos fosfato

en los residuos tanto de Serina (Ser) como de Treonina (Treo), y bajo algunas condiciones presenta cierta actividad contra los grupos fosfato presentes en residuos de Tirosina (Felner T, et al., 2003). La actividad catalítica de la PP2A esta codificada por dos genes, localizados en los cromosomas humanos 5q23 para la isoforma Ca, y en el cromosoma 8p12-p12.2 para la isoforma Cβ, ésta última se expresa unas 10 veces menos, debido a aue posee un promotor más débil, es interesante mencionar que ésta isoforma presenta a su vez dos variantes de splicing (Kwe Y, et al., 1988). Ambas subunidades son proteínas de 36 kDa de peso y comparten un 97% de homología, en su secuencia de aminoácidos. Los niveles de PP2Ac están cuidadosamente regulados en la célula a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional, haciendo que la expresión ectópica de esta proteína sea extremadamente difícil de loararse (Baharians Z, et al., 1998); la pérdida de la expresión de la subunidad Ca, es letal tanto en levaduras como en ratones (Gotz JA, et., al., 1998), poniendo en relevancia la importancia de esta subunidad de la fosfatasa para el adecuado mantenimiento de la homeostasis celular. La elucidación de la estructura cristalina por rayos X de la holoenzima de PP2A ha permitido determinar que una cola conservada (304TPDYFL309) de la subunidad de la PP2Ac mantiene una interface crítica entre el dominio estructural de la PR65 y la subunidad B PR61Y; (Cho, W and Y. Xu. Y. et., al., 1998). De tal manera que el reclutamiento de la subunidad B al Core de la enzima esta cuidadosamente regulada por la metilación y los patrones de fosforilación de la cola terminal de la subunidad C. La metilación de la Leu³⁰⁹ del grupo COOH- terminal por la Carboxil Transferasa 1 de la S-adenosilmetionina, es requerida para la unión de los miembros de la familia de subunidades regulatorias B (PR55) (Longin KS, et., al., 2007). La metilación del extremo COOH-terminal puede ser revertido por un tipo específico de metilesterasa fosfatasas (PME-1) añadiendo otro nivel de regulación de la holoenzima (Ogris XE. et., al., 1999). La fosforilación parece ocurrir en los residuos Tyr³⁰⁷ como en Thr³⁰⁴ (Longin KS, et., al., 2007). La fosforilación en Tyr³⁰⁷, inhibe el reclutamiento de las subunidades de la familia B (PR55) y de la B '(PR61) a,β,ε, al Core de la enzima (Chem BLJ et., al., 1992). De manera interesante podemos mencionar que este sitio es regulado por el oncogén c-Src, sugiriendo la posibilidad que la inhibición de la unión de alguna o todas estas subunidades al Core de la PP2A podría ser un requerimiento para la transformación mediada por c-Src. De manera similar el extremo COOH-terminal puede ser fosforilado en Thr³⁰⁴, lo cual inhibe la unión de las subunidades B (PR55), pero no otras subunidades regulatorias (Login S, et al., 2007). Interesantemente el estado de metilación y fosforilación del extremo COOH-terminal no influye en la unión de las subunidad PR70; que regula negativamente a la proteína DvI, en la ruta Wnt canónica, así como, a las subunidades PR72 ó PR61 δ.

La subunidad catalítica de la PP2A-C es también regulada por fosforilación y metilación. La metilación de un residuo de lisina conservado en el extremo C, se requiere para el ensamble de la holoenzima (Rodriguez VP, et al., 2006; Haupt Y, et al., 1997) y la fosforilación de la subunidad C en la Tyr 307 por la cinasa Src, por el receptor del factor de crecimiento (EGFR) y otras cinasas inhiben la actividad de la fosfatasa (Okamoto K, et al., 1996). Adicionalmente, la subunidad catalítica forma complejos con las proteínas inhibitorias como CIP2A, I₂PP2A (denominado también como SET ó factor 1) y el inhibidor I₁PP2A (Dohoney KM, et al., 2004; Manning BD, et al., 2007). El sitio catalítico de la PP2A es una Cisteína con un bajo pKa que es susceptible a la oxidación por estrés (Bellacosa A, et al., 1995). Las especies reactivas de oxigeno (O₂⁻ y el H₂O₂) producidos por las NADPH oxidasas de las células tumorales, después de la activación del EGFR; pueden oxidar el Thiol del sitio activo de la enzima (Carpten JD et al., 2007; Kuo YC, et al., 2007). Esta modificación reversible resulta en la inhibición de la proteína- fosfatasa y es otro mecanismo por el cual la actividad de la PP2A es suprimida.

5.6 La subunidad regulatoria PP2A-B

En la actualidad, se han reportado 15 genes en el genoma humano que codifican para al menos 26 transcriptos diferentes y variantes de splicing que representan las subunidades B de la holoenzima B de la PP2A (figura 1), Estas subunidades B pueden ser expresadas de una forma tejido específico, y se ha propuesto que son las responsables de la especificidad de sustrato de la holoenzima PP2A (Zolnierowics S, et al., 1994). En esta tesis únicamente se incluye una descripción muy breve de dos familias de la PP2A-B, por su importancia en el desarrollo de cáncer.

5.6.1 La familia de subunidades B/PR55

La familia B/PR55 consiste de al menos seis miembros, y son los transcritos de por lo menos cuatro genes diferentes (Figura 1). Los miembros de la familia PR55 exhiben un patrón de expresión tanto temporal como espacial (Strack S, et al., 1999; Mayer RE, et al., 1991; Zolnierowics S, et al., 1994). La regulación de sustrato por los miembros de la familia PR55 parece depender de un número de factores. Primero la unión del sustrato depende de cinco repetidos degenerados WD40, los repetido WD40 tiene una secuencia de 40 aa conservados, que terminan con un aspartato-triptofano característico que parece mediar directamente las interacciones proteína-proteína. En segundo lugar, la subunidad PP2Ac del Core de la enzima necesita estar metilada en la Leu³⁰⁹ y desfosforilada en la Thr³⁰⁴ para poder interaccionar con los miembros de la familia PR55.

5.6.2 La familia B'/PR61

La familia PR61 contiene al menos ocho miembros (a, β , Υ , δ and ϵ) representados por cinco genes diferentes, localizados en los cromosomas 1q41, 11q12, 3p21, 6p21, y

7p11.2-p12. (Figura 1); (McCraig B, et al., 1996). Los miembros de la familia PR61 muestran una distribución diversa en los tejidos, y una distribución celular distinta, mientras que PR61a, β, y ε son expresados en el citoplasma de la célula, PR61Y 1, PR 61Y 2, y PR61Y 3 son expresados en el núcleo celular. PR61δ parece ser expresado tanto en citoplasma como en núcleo. La diferenciación celular también influye en una expresión de algunos de los miembros de ésta familia, incrementándose durante la diferenciación celular, sugiriendo que alguna de estas subunidades están reguladas durante el desarrollo. Todos los miembros de esta familia son fosfoproteínas, a excepción de la PR61Y1, por tal motivo pueden ser fosforiladas *in vitro* por la proteína Cinasa A (PKA) (Usui M, et al., 1988).

5.7 La PP2A en la señalización celular

La PP2A regula múltiples rutas de señalización celular implicadas en la tumorigenesis. Las mutaciones en la PP2A han sido identificadas en una gran variedad de canceres y se hipotetiza que la modificación en la expresión de las subunidades de la PP2A es capaz de perturbar muchos de las rutas de señalización que contribuyen a la progresión de cáncer.

5.8 La proteína fosfatasa PP2A y la ruta de Señalización Wnt

La ruta de señalización Wnt es otra ruta de señalización que puede ser regulada por la PP2A tanto positivamente ó negativamente, a diferentes niveles; dependiendo de las subunidades regulatorias B involucradas (Figura 4). Sin embargo, la inhibición global de la PP2A por el inhibidor farmacológico, denominado como ácido okadaico ó la supresión de la expresión de la subunidad PP2A-C, provoca la estabilización de la proteína β-catenina, sugiriendo que la proteína fosfatasa PP2A actúa globalmente como un
regulador negativo de la ruta de señalización Wnt y como un supresor tumoral; (Seeling et al, 1999; Zhang et al, 2009).

Mientras que la ruta Wnt tiene un papel crucial en la embriogénesis, la sobre regulación de ésta ruta de señalización puede incrementar la proliferación celular y la tumorigénesis (Eichhorn et al.,2008).

En un número abrumador de casos de cáncer colorectal (>90%); esta ruta de señalización presenta mutaciones, lo cual también se presenta en otros tipos de cánceres, siendo la estabilización de la proteína β-catenina el principal conductor responsable de la tumorigénesis. En la ausencia de los ligandos wnt, la proteína βcatenina es fosforilada por la cinasa GSK-38 en un complejo proteíco que también contiene a la proteína supresora tumoral APC; y a la proteína Axina. La fosforilación de la β-catenina marca ésta proteína para su ubiquitinación y destrucción vía proteosoma. La sobreexpresión de los miembros de la familia PP2A-B' reduce la expresión de la β catenina, ya sea por la unión de la PP2A-B´ a la APC, aunque el mecanismo preciso de regulación aún no ha sido determinado (Seeling et al., 1999). Otro grupo ha encontrado que la subunidad PP2A-Bα forma directamente un complejo con la proteína β-catenina y la Axina en las células, y que la expresión de ésta subunidad directamente altera la expresión de la β -catenina. Esto es, la supresión de la subunidad PP2A-B α incrementa la fosforilación de la β-catenina y por lo tanto su degradación, mientras que la sobreexpresión de la PP2A-B α suprime la fosforilación de la β -catenina e incrementa la expresión de la proteína (Zhang et al. 2009).

Cuando el ligando Wnt está presente, el complejo de degradación de la proteína β -catenina, constituído por las proteínas GSK3- β se desensambla por la activación de la proteína Dishevelled (DvI), lo cual resulta en la estabilización de la β -catenina, que se transloca al núcleo celular y consecuentemente activa la trascripción de genes directamente relacionados con la proliferación celular (Eichhorn et al. 2008). La proteína

Naked, normalmente inhibe a la proteína Dvl, cuando los ligandos Wnt no están presentes, manteniéndose por tanto el complejo de degradación de la β-catenina. Por un mecanismo desconocido, las subunidad PR72 (PP2A-B´´), es requerida para la acción de la proteína Naked; (Creyghton et al. 2055). Sin embargo cuando el ligando Wnt está presente, la subunidad PR130 de la PP2A-B´´ inhibe a la proteína Naked, permitiendo que el complejo de degradación de la β-catenina se desacople (Creyghton et al.2006) y entonces la subunidad PR130 actúa como un regulador positivo de la ruta de señalización Wnt, en presencia de los ligandos Wnt.

Adicionalmente, la subunidad PP2A-B' ϵ es un regulador positivo de la ruta de señalización Wnt por la regulación de un blanco río arriba de la proteína DvI (Eichhorn et al 2008). A pesar de la regulación a múltiples niveles, la inhibición global de la PP2A por el inhibidor farmacológico, ácido okadaico ó la supresión de la expresión de la subunidad PP2A-C, liderea la estabilización de la proteína β -catenina, sugiriendo que la PP2A actúa globalmente como un regulador negativo de la ruta de señalización Wnt (Seeling et al, 1999; Zhang et al, 2009).



Figura 4. Regulación de la ruta de señalización Wnt canónica por la PP2A.

En ausencia del ligando Wnt (izquierda), la Cinasa GSK-3β fosforila a la β-catenina en el complejo de degradación formado por la proteína APC, y Axina, las cuáles marcan a la β-catenina para su ubiquitinación y destrucción vía proteasoma. La PP2A regula negativamente a la β-catenina al incrementar su fosforilación, ya sea por su unión directa a la subunidad PP2A-Ba, ó indirectamente a través de las subunidades PP2A-B'que hacen blanco en la proteína APC. Tomado y modificado de Watt Frances Lauren 2012.

En la presencia del ligando wnt (derecha) el receptor frizzel activa a la proteína Dishevelled (Dsh/Dvl), la cual desacopla al complejo de destrucción de la proteína β -catenina, estabilizando la expresión de la proteína β -catenina y la transcripción génica. La PP2A regula a Dsh ya sea por mecanismos desconocidos que involucran a la PP2A-B' ϵ , y también a través de la proteína Naked. En la ausencia de los ligandos wnt, la subunidad PR72 PP2A-B'', activa a Naked. Durante la ruta de señalización Wnt normal; la subunidad PP2A-B-PR130 inhibe a la proteína Naked, permitiendo la activación de Dsh el desacoplamiento del complejo de degradación y la estabilización de la proteína β -catenina. Por lo que el papel de la PP2A es crucial, ya que regula la ruta Wnt en ausencia y presencia de ligandos wnt, en las células epiteliales normales. Tomado y modificado de Watt FL (2012).

5.9 El papel de las subunidades PP2A-A en la supresión tumoral.

Alteraciones somáticas de la subunidad A-β de la PP2A (PPP2R1B) han sido reportados en Cáncer de Cólon, Pulmón, Melanoma y Mama. Notablemente, mutaciones puntuales en uno de los alelos de A-β están frecuentemente acompañados por la pérdida del segundo alelo de Aβ. En trabajos previos se ha demostrado que las subunidades A-β mutantes y asociadas con cáncer forman alelos nulos funcionalmente. Estos estudios indican también que la subunidad Aβ es inactivada epigenéticamente en una amplia gama de canceres humanos. Adicionalmente ha sido descrito que la supersión de la subunidad Aβ coopera con H-Ras, con la subunidad catalítica de la hTERT y con el antígeno largo T del virus SV40 para inducir la transformación de células normales humanas, mientras que la introducción de la subunidad Aβ silvestre, en líneas celulares de cáncer de pulmón que carecen de la subunidad Aβ funcional, parcialmente revierte este fenotipo tumorigénico. Todos estos datos proporcionan evidencia de las funciones regulatorias como supresor tumoral de la subunidad Aβ, además de las funciones generalmente reconocidas a la proteína como subunidad estructural.

Trabajos previos han mostrado que las mutantes de la subunidad Aβ, encontradas en tumores cancerosos, exhiben una habilidad marcadamente disminuida para formar los complejos PP2A-C con la subunidad catalítica C y con algunas subunidades regulatorias como la subunidad PR72. (Jassen V, et al., 2001); que regulan de manera directa la desfosforilación de la proteína Dvl, encargada de propagar la señal de los ligandos Wnt, una vez que estos se han unido al receptor Fzl y al correceptor LPR5/6. También se ha encontrado que las mutantes de A-β muestran una menor habilidad para unirse a las subunidades Ba (B55-a) y a varios miembros de la familia de las subunidades B' (B56). Estos datos indican que las subunidades mutadas asociadas con tumores cancerosos de la subunidad Aβ de la PP2A resultan en la disrupción de la mayoría sino de

todos los complejos donde participan PP2A-Aβ. Es interesante señalar que los complejos de la PP2A asociados a la subunidad A-β, con algunas de las subunidades regulatorias como la subunidad *B56a y B56Y*, juegan un papel crucial en el control de los niveles de algunas proteínas oncogénicas como la β-catenina y la proteína c-Myc, por lo que resulta fácil imaginar lo que la ausencia ó disrupción de estos complejos PP2A-Aβ-B56a, ó PP2A-Aβ-B56Y, pueden significar en la regulación de las rutas de proliferación celular que dependen directamente de estas proteínas.



Mapa Cromosoma 11q 23-24

Figura 5: Mapa del cromosoma 11q 23-24 mostrando al gen PPP2R1B y la región crítica de pérdida de heterocigocidad LOH, mostrando diferentes marcadores polimórficos en el gen. Tomado de Wang S.S. et al., 1998.

Mutación	Tipo de cáncer Identificada	Dominio Estructural	Unión in vitro
<u> PP2A-A</u>			
E64G	Cáncer de Mama	HEAT 2	Unión defectuosa en B´pero normal en B,
E64D	Cáncer de Pulmón	HEAT 2	B y subunidad C. Unión defectuosa en B´pero normal en B, B´´ y subunidad C
Frame shift aa170 Del 171-589	Cancer de mama Cancer de mama	HEAT 5-13 HEAT 5-13	ND No une a las subunidades Regulatorias -B
P179A		HEAT 5	Reducción en la unión de Subunidades – B, deficiente Para subunidades Rí ND en Subunidades C
R418W	Melanoma	HEAT 11	No une subunidades regulatorias -B ni -C
D492G	Eauivalente a D504G in PP2A-Aβ	HEAT 13	ND Puede desestabilizar a la proteína.
<u>ΡΡ2Α-Αβ</u>			
G8R G15A A51D	Cáncer de Pulmón Cáncer de colon Cáncer de Colon	Antes HEAT1	Unión normal a -B´´ y –C ND ND
G90D	Cáncer de Mama y Pulmón	HEAT 2	Inhibe la unión de B56y, normal B´´ y -C
Del exón 9 P65S L101P/V488A Del 250-518	Cáncer de mama Cáncer de Pulmon Cáncer de Pulmón Línea celular de Cáncer de Pulmón	HEAT 2 HEAT 3 y 12 HEAT 6-12	ND Unión reducida de -B´´ Unión reducida de-B´´ ND
K343E Frame shift 422-601	Cáncer de Pulmón Adenocarcinoma De Colon	HEAT 9	Unión normal de-B´´ y –C ND
V498E L4911 V500G D504G	Cáncer de Colon Cáncer de Colon Cáncer de Colon Linea cellular de Cáncer de Pulmón	HEAT 13 HEAT 13 HEAT 13 HEAT 13	ND ND ND Incremento en la unión de B´´ y -C
Frame shift V536A W151R	Cáncer de Pulmón Cáncer de Colon Cáncer de Colon	HEAT 14	ND Unión reducida de -C ND
V545A	Adenocarcinoma de Colon	HEAT 14	Unión reducida de-B´´ y -C

Tabla 2. Mutaciones de la subunidad PP2A-A identificadas en cánceres humanos.

La estructura cristalina de la PP2A-A tiene 15 repetidos HEAT. Los repetidos 1-10 estan involucrados en la unión de las subunidades regulatorias B, mientras los repetidos 11-15 unen a la subunidad regulatoria C (Ruediger et al. 1992; Ruediger et al. 1994). Datos obtenidos de (Wang et al. 1998; Ruediger et al. 1999; Calin et al. 2000;Takagi et al. 2000; Ruediger et al. 2001b; Ruediger et al. 2001a; Tamaki et al. 2004;Esplin et al. 2006). ND= No definido.

Por otro lado, mutaciones somáticas, de la subunidad estructural Aa de la PP2A que es la isoforma más abundante en las células epiteliales de los mamíferos; han sido reportadas en distintos tipos de canceres humanos; aunque a bajas frecuencias (Westermarck J, et al., 2008, Bononi A, et al., 2011). Se ha demostrado que las mutaciones de Aa, relacionadas con cáncer contribuyen con la transformación celular, creando un estado de haploinsuficiencia (Pallas DC, et al., 1990). Aunaue las dos isoformas Aa v AB, comparten un 86% de identidad, no se ha elucidado que funciones comparten y cuáles serían completamente específicas para cada una de las isoformas involucradas (Eichhorn PJA, et al., 2009). Apoyando lo anterior se ha encontrado que la sobreexpresión de Aa es insuficiente para revertir el fenotipo tumorigénico inducido por la supresión de la isoforma Aß, sugiriendo que los complejos de la PP2A- Aa y PP2A-Aß son funcionalmente distintos. Para identificar a los sustratos blanco específicos de la PP2A-AB, se han realizado ensayos de inmunopurificación recíproca de los complejos de las isoformas Aa y AB, a través de estos ensayos se ha encontrado que los complejos PP2A-Aβ, pero no los complejos de PP2A-Aa, se unen e inhiben la actividad de la GTP asa pequeña RalA, a través de la desfosforilación directa de la Ser 183 y la Ser 194. Las isoformas mutantes de Aß relacionadas con cáncer son incapaces de desfosforilar RalA, sugiriendo que la pérdida de funciones de Aß impide la unión con RalA y desregula su actividad. Esto es consistente con lo hasta hoy reportado para RalA y su participación en diversas rutas de señalización relevantes en la transformación celular. Estudios de pérdida de función de la RalA, revelan que ésta es crucial para la transformación celular, mediada por la pérdida de función de la subunidad AB. Estos estudios siguieren que la acumulación de p-RalA en células deficientes de AB, contribuyen con la transformación celular. En resumen mientras que la pérdida de función de Aβ, permite la acumulación de p-RalA, la haploinsuficiencia de Aa induce la transformación celular por activación de la ruta de señalización AKT/PI3K. Sin embargo, permanece sin aclararse si la subunidad Aa ó Aß de la PP2A determinan la

especificidad de sustrato de los complejos heterotriméricos por su unión directa al sustrato; ó la bien por la formación de los complejos PP2A-Aa, ó PP2A-Aβ con un set particular de subunidades B y C, que hacen blanco sobre sustratos específicos. Es muy probable que en los próximos años se demuestre que esto ocurre, lo que conferiría a la PP2A un nivel de especificidad mayor por parte de la proteína fosfatasa en la selección de sus proteínas blanco, y adicionalmente esto permitiría ampliar la gama de posibilidades de heterotrímeros funcionales para actuar sobre una gran diversidad de proteínas blancos.

5.9.1 La expresión disminuida de las subunidades de la PP2A

Aún en la ausencia de mutaciones, la expresión de la PP2A se encuentra reducida en algunos cánceres humanos (Colella et al. 2001; Suzuki et al. 2006; Mannava et al. 2011) y líneas celulares derivadas de tumores cancerosos (Suzuki et al. 2003b; Zhou et al 2003). La subunidad PP2A-Aβ, es la más extensamente estudiada a la fecha, aunque básicamente en líneas celulares cancerosas. Un estudio examino un panel de líneas celulares cancerosas de pulmón, colon, glioblastoma y cáncer de mama, en las que únicamente se hicieron comparaciones visuales con respecto a células de pulmón normal y tejido mamario normal. Aproximadamente el 50% de estas líneas celulares cancerosas mostraron una expresión reducidad de la proteína de PP2A-Aβ, mostrándose que alrededor de ³/₄ partes de las líneas celulares evaluadas tenían una expresión claramente reducida de la proteína de PP2A-Aβ, mostrándose que alrededor de la proteína de PP2A-Aβ comparadas con células epiteliales mamarias humanas (Zhou, et al, 2003).

La expresión de la subunidad PP2A-Aa se encontró severamente reducida en cerca de 40% de los glioblastomas y oligodendrogliomas analizados, en comparación con tejido cerebral normal (Colella et al. 2001). Interesantemente, la expresión de las subunidades

PP2A-Ba y -C permanecieron constantes en todas las muestras. Como ha sido previamente demostrado la reducción en la expresión de las subunidades estructurales resulta en la degradación de otras subunidades de la PP2A (Strack et al. 2004), asimismo estos tumores cerebrales fueron analizados para evaluar posibles mutaciones, sin embargo solo unas pocas mutaciones fueron detectadas en la subunidad PP2A-Aa, en estas muestras. Adicionalmente, una pérdida de heterogenicidad no explica la reducción en la expresión de la proteína (Colella, et al 2001). Un grupo examino la expresión de la PP2A-Aa en cáncer de mama, encontrando una expresión reducida en una línea celular de cáncer de mama denominada MCF7, en comparación con células quiascentes del tejido normal adiacente (Suzuki et al. 2006). En 28 pares de grupos de tejidos cancerosos y tejido normal adiacentes, 27 (96%) de los tejidos normales expresaron a la subunidad PP2a-Aa por inmunnohistoquímica, mientras que sólo 12 (43%) de los tejidos tumorales demostraron una finción positiva para esta subunidad.

Los efectos funncionales de la supresión de la PP2A-Aa han sido investigados en el modelo de HER-TER y también en el ratón con Knockout de la subunidad PP2A-Aa. La expresión reducida de la subunidad PP2A-Aa por shRNA por debajo de un tercio de los niveles normales en las células HEK-TER resultaron en la muerte por apoptosis de las células, demostrando que la subunidad PP2A-Aa es crítica para la sobrevivencia celular (Chen et al. 2005b). Soportando lo anterios, el ratón Knockout para la subunidad PP2A-Aa es letal en la etapa embriónica, y la expresión inducible de la PP2A-Aa por debajo de un tercio de sus niveles normales en etapas posteriores al desarrollo causa severas enfermedades y la muerte debida a la apoptosis hepática (Ruediger et al. 2011). Sin embargo, la supresión de la PP2A-Aa a aproximadamente el 50% de los niveles normales transforma las células HEK-TER, demostrado por una proliferación acelerada, un crecimiento independiente del contacto celular y la formación de tumores en ratones (Chen et al. 2005b). En el ratón

PP2A-Aa Knockout inducible, niveles reducidos de la PP2A-Aa a aproximadamente el 50% incrementan la incidencia de cáncer de pulmón en un 50-60% cuando son cruzados con cepas de ratones que exhiben una predisposición para desarrollar cáncer de pulmón (Ruediger, et al. 2011).

En conclusión, las mutaciones en la subunidad PP2A-A han sido identificadas en el cáncer de colon, asimismo la expresión reducida de la PP2A-A también contribuye a la progresión de la enfermedad,

5.9.2 Regulación Negativa de la PP2A en Cáncer:

Las células cancerosas deben reducir la actividad de la enzima proteína fosfatasa PP2A para proseguir su proliferación descontrolada mediada por las cascadas de señalización de la cinasas (Jassen V, et al., 2001). Esta por demás documentado que la inhibición de la actividad de la PP2A es necesaria en la iniciación del cáncer (Calin GA, et al., 2000; Wang SS, et al., 1998). Debido a que la PP2A es esencial para muchos procesos biológicos y tiene diversos sustratos, su actividad es regulada a diversos niveles. Como se ha descrito, la composición de las subunidades controla la actividad específica y localización de la PP2A (Flegg CP, et al., 2010). Sin embargo mutaciones ó infecciones virales pueden alterar la actividad de las subunidades de la PP2A (Berry M, et al., 2000; Calin GA, et al., 2000). El virus de los simios Poliomavirus 40 (SV40), produce una proteína llamada antígeno t pequeño, que contribuye a la carcinogénesis al unirse a la subunidad A de la PP2A (Strack S, et al., 2004; Calin GA, et al., 2000). El antígeno pequeño t bloquea a la subunidad B para formar el heterodímero PP2A-AB, y por lo tanto inhibe las funciones adecuadas de la PP2A. Similarmente, las mutaciones somáticas en las subunidades A ó B permiten una señalización oncogénica no regulada, debido a que la holoenzima PP2A funcional, que regula la señal está ausente (Ruediger R, et al., 2001).

5.9.3 Las Holoenzimas funcionales de la PP2A son blancos específicos de las proteínas Virales.

Las proteínas virales codificadas por diferentes virus pueden formar complejos estables con las holoenzimas de la PP2A, ó con las proteínas celulares que interactúan con la PP2A, con la finalidad de interrumpir ó modificar selectivamente las acciones de la PP2A en importantes rutas de señalización celular (Guergnon J et. al 2011). Como se ilustra en la siguiente Tabla, la diversidad de las proteínas virales asociadas a la PP2A sugiere una estrategia viral muy amplia que puede ser esquematizada en la siguiente tabla.

Tabla 3						
Inhibidores de la	PP2A					

PP2A inhibidores	Origen	IC ₅₀ (nM)	Propiedades
Ac. Okadaíco	Espongas marinas Halicondria Okadai	0.05-0.5	Promotor Tumoral
Caliculinas	Esponjas marinas Discodermia calyx	0.3-7	Promotor Tumoral
Dragmacidinas	Esponjas marinas Spondosorites sp .	ND	Alcaloide
Microcystinas	Cianobacterias	0.04-1	Toxina Hepática
Nodularinas	Cianobacterias	0.1-1	Toxina Hepática
Tautomicinas	Bacteriano Streptomyces Verticillatus	10-30	Antibiotico
Foestricin	Bacteriano S.p	*3.2	Antibiotico antitumoral
Foslactomicinas	Bacteriano Streptomyces	*4700	Antibiotico antifungal
Cantharidin	Escarabajo Blister	*160	Toxico natural
Derivados del Endothal	Sintético	>1000	Herbicida altamente tóxico

Tomado de Sontag E. et al., Protein phosphatase 2A: The trojan horse of celular signaling. (*)=valor estimado.

Hipótesis:

Las células malignas de colon mostrarán cambios en el patrón de expresión de las subunidades de la PP2A; y/o cambios en la actividad de esta enzima con respecto a las células no malignas. Estos cambios podrían ser relevantes en la actividad transcripcional mediada por β-catenina.

Objetivo general de este proyecto:

Caracterizar el mecanismo molecular por el cual participa la proteína fosfatasa 2A en la ruta de señalización Wnt. En particular se investigará si PP2A ejerce alguna regulación sobre las acciones mediadas por la proteína β-catenina en esta ruta de señalización.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad de la enzima PP2A en células normales y en células malignas de colon.

2. Determinar si existen cambios en la expresión de las isoformas de las subunidades de la PP2A en células malignas de colon con respecto a las células normales.

3. Determinar si la proteína β -catenina interacciona con alguna de las subunidades de la enzima PP2A.

4. Investigar el efecto de la inhibición de la actividad de PP2A en la actividad transcripcional mediada por β -catenina y en la proliferación celular.

5.- También se investigará si la actividad de la GTPasa pequeña RAL A se ve afectada por los cambios de expresión en las isoformas de la PP2A-Aa/ β , presentes en las líneas celulares cancerosas respecto de las células epiteliales normales.

6.0 Materiales y métodos

Características de los pacientes

Para lograr los objetivos propuestos, se utilizaron biopsias de pacientes tanto sanos como con cáncer de colon proporcionadas por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Estas muestras se congelan en nitrógeno líquido y se manejan de forma anónima, sin personalizar. Cabe aclarar que la obtención de estas muestras cumple con los principios expresados en la declaración de Helsinki y con toda la reglamentación estipulada por el Comité ético de la Facultad de Medicina y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición con el cual establecimos un convenio de colaboración a través del Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Jefe del Departamento de Bioquímica.

Metodología de trabajo.

Los pacientes fueron hombres y mujeres, sanos y con tumores colorectales citados para una colonoscopía de rutina; de las biopsias de epitelio sano ó tumoral obtenidas, una fracción pequeña se colocó en un tubo ependorff y se introdujo en nitrógeno líquido a -80°C, la muestra fue trasladada al laboratorio con hielo seco, en donde la muestra de tejido se introdujo en un tanque de nitrógeno líquido, hasta su análisis.

BIOPSIAS FINALES DE COLON NORMAL:

(1) NOMBRE: RUTH (M-1)
Expediente: 298772
Género: FEMENINO
Edad: 45
Colonoscopia: 23-JUNIO-2008
Observaciones Colonoscopia: COLON NORMAL
Histología: NO CANCER
Estadío: NO CANCER

(2) NOMBRE: FRANCISCO (M-2)
Expediente: 250132
Género: MASCULINO
Edad: 40 AÑOS
Colonoscopia: 15-JUNIO-2010
Observaciones Colonoscopía: ABSCESO PERIANAL, INFILTRANTE, BENIGNO.
Histología: NO CANCER, PACIENTE CON VIH, LINFOMA NO HODCKINS DE CEL B GDES.
DIFUSAS.
Estadío: NO CANCER DE COLON.

(3) NOMBRE: RAMÓN (M-3)
Expediente: 12344
Genero: MASCULINO
Edad: 39
Colonoscopía:23-JUNIO-2008
Observaciones Colonoscopía: NO CANCER
Histología: NO CANCER
Estadío: NO CANCER

BIOPSIAS FINALES DE TUMORES DE COLON CANCEROSOS:

(1) NOMBRE:MARIA (T-1)Expediente:251853Género:FEMENINOEdad:59 AÑOSColonoscopia:04-OCTUBRE-2010Observaciones Colonoscopía: TUMOR ANAL ESTENOSANTE, ANG ESPLENICOHistología:ADENOCARCINOMA INVASIVO MOD. DIFRERENCIADOEstadío:IIIB, ACE: 9.22 MG/ML

(2)NOMBRE: MARTHA (T-2) Expediente: 249910 Género: FEMENINO Edad: 56 AÑOS **JUNIO-2008** Colonoscopia: Observaciones Colonoscopía: ADENO SIGMOIDEO MAL PRONOSTICO Histología: ADENOCARCINOMA DE COLON/MOD DIFERENCIADO/INVASIVO. Estadío: IV, METASTASIS, ACE: 5 MG/ML

(3)NOMBRE:FRANCO (T-3)Expediente:250132Género:MASCULINOEdad:45 AÑOSColonoscopía:15-JUNIO-2010Observaciones Colonoscopía:ABSCESO PERIANAL, INFILTRANTE CON CARACT. MALIGNAS.Histología:ADENOCARCINOMA COLONEstadío:IIIA ADENOCARCINOMA ACE: 21MG/ML

También se utilizaron lineas celulares de colon humano obtenidas de la American Tipe Culture Colecction (ATCC), y autentificadas por el Instituto Nacional de Medicina Genómica mediante análisis STR de DNA. Se utilizaron dos líneas de células normales (IEC-18 y CoN112) y tres líneas de células cancerosas (RKO, HT-29 y SW480). Las células RKO expresan la proteína APC normal y tienen ruta Wnt normal, mientras que las células HT-29 y las SW480 expresan sólo formas truncadas de la proteína supresora tumoral APC y en las SW480 está constitutivamente activa la ruta Wnt. Estas líneas se han estudiado en nuestro laboratorio y se conoce la expresión y localización de las proteínas de la ruta Wnt APC, βcatenina, y GSK-3β.

Cultivo celular.

Las células RKO se cultivaron en Dulbeco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Las células IEC-18 se suplementan con 4.5 g/L de glucosa y 0.1 unidades/mL de insulina. Las células SW480 y HT-29 se mantienen en medio DMEM F-12 suplementado con 5% de suero fetal antibióticos y glutamina. Todas las células se mantienen a una temperatura de 37° C en una atmósfera de 95% aire 5% CO₂.

Western blot.

Para analizar la expresión de las subunidades de PP2A por medio de Western Blot, se utilizan anticuerpos específicos que reconocen a las isoformas a y β de la subunidad A obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc.

Para ensayos de Western blot la células se lisan en buffer de homogenización (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM pH 7.5, Tritón X-100 0.5%, inhibidor de tripsina 0.1 mg/mL, Leupeptina 10 μg/mL y PMSF 1 mM). Los lisados se clarifican por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante se obtiene una alícuota para la

determinación de proteína; ésta se realiza por el método de Bradford con reactivo comercial adquirido de Bio-Rad. El resto del homogenado se diluye con buffer de muestra Laemmli y se guarda a 4°C. La extracción de proteínas nucleares se realiza mediante el kit comercial adquirido de Siama siguiendo el protocolo sugerido. Cantidades iguales de proteína (50-75 mg) se separan por electroforesis en un gel de poligcrilamida (7.5-10% SDS-PAGE) y se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquean toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente con leche libre de grasa adquirida de Bio-Rad; la incubación con el anticuerpo primario se realiza durante toda la noche a 4°C o durante 3 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavan tres veces y se incuban con un anticuerpo secundario dirigido contra ratón o conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) durante dos o tres horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavan nuevamente y se revelan por quimioluminiscencia (mediante el kit comercial de Supersignal de Pierce). La intensidad de las señales se analiza por densitometría mediante un programa adquirido de Bio-Rad (Quantity one), normalizando con respecto a la intensidad de la banda correspondiente a actina, la cual se detecta con anticuerpo específico en la mismas membranas.

Inmunoprecipitación.

Las células con un 90% de confluencia se lavan dos veces en PBS frío adicionado con inhibidores de proteasas. Se agrega a la monocapa buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0.5% e inhibidores de proteasas y fosfatasas). Las muestras se pre-clarean con 10 µl de proteína A-sepharosa y 10 ml de suero pre-inmune durante una hora a 4°C. La muestra se precipita con el anticuerpo indicado durante toda la noche a 4°C. Al inmunoprecipitado obtenido se le añaden 25 µl de proteína A-sepharosa y se incuba durante 2 horas en frío. Los complejos precipitados se lavan dos veces con el buffer Tris 50mM, NaCl 0.6 M a pH 8.3 adicionado de 0.1 mg/ml inhibidor de tripsina e

inhibidores de fosfatasas. Finalmente se hace un lavado con buffer Tris 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7.5 adicionado de inhibidor de tripsina e inhibidores de fosfatasas, y se centrifugan las muestras a 9000 rpm a 4°C por 1 min. Se retira el sobrenadante y los complejos se re suspenden en buffer de carga de electroforesis Laemli 2X.

Inmunofluorescencia.

Las células se siembran en cubreobjetos y se incuban en cajas multipozos a 37°C en una atmósfera de 95% aire 5% CO2 hasta confluencia. Las células se lavan dos veces con PBS y se fijan con metanol a -20°C durante 10 minutos. Después de retirar el metanol, se lavan 3 veces con PBS y se permeabilizan por 10 minutos con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Después se lavan las células 3 veces con PBS y se bloquean con BSA (libre de IgG, Research Organics) al 1% durante 30 minutos. Las células tratadas para visualizar la proteína GSK-3 se trataron de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Upstate Biotechnology), esto es, se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con acetona 100% durante 10 minutos y posteriormente se bloquearon en BSA (libre de IgG) 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente al bloqueo, en todos los casos se procede a incubar las monocapas toda la noche a 4°C en cámara húmeda con los anticuerpos primarios policional y monocional diluidos en PBS. Las monocapas que sirven de control se incuban sólo con PBS. Después de lavar 3 veces con PBS, se incuban las monocapas 1 h a 4°C en obscuridad con los anticuerpos secundarios (IgG anti-conejo acoplado a FITC, e IgG anti-ratón acoplado a TRITC) y las monocapas control también se incuban con estos anticuerpos. Se montan las monocapas con amplificador de fluorescencia (antifade Vectashield), y se examina la fluorescencia por microscopía confocal.

Determinación de la actividad de PP2A in vitro.

Para determinar la actividad de fosfatasa en lisados celulares totales, se procedió primero a remover el fosfato libre presente en estos lisados, mediante cromatografía en columnas de Sephadex G-25. La actividad de fosfatasa se determinó entonces utilizando el kit comercial de Upstate Biotechnology Inc con el que se mide el fosfato liberado durante la reacción utilizando verde de malaquita. Para esto las muestras de lisado se incubaron con el sustrato fosfopéptido por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró con la adición de solución de verde malaquita y después de 15 minutos, se cuantificó la liberación de fosfato midiendo la absorbancia a 650 nm. La actividad de fosfatasa se definió como pmol de PO4 libre generado/µg protein/min.

Ensayo de RT-PCR

El ensayo de RT-PCR se realiza utilizando el sistema de SuperScript One-step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). Este sistema contiene una mezcla de la enzima Reverso transcriptasa (RT) Super script II y la enzima Tag DNA polimerasa platinum, lo cual permite que la reacción de RT y PCR sea en un solo paso. La reacción de RT-PCR se realiza en un termociclador (EPPENDORF) a una temperatura inicial de 55°C, seguida del ciclo normal de PCR. A partir de 30 ng de RNA se obtiene el cDNA correspondiente al gen de interés utilizando los oligonucleótidos específicos a una concentración de 10 pmol por microlitro. La secuencia de los oligonucleótidos (5'-3') para amplificar la subunidad A alfa de PP2A son: sentido 5'-GGGAAGGAGIGGGCCCAIGCC-3': antisentido 5'-TCTTCCAGCATCAGGCGAGAGACA-3'. Para amplificar la subunidad A beta de PP2A son: var1/var2 sentido 5'-CAAAGTGTTAGTAATGGCAATGATCC-3'; antisentido var1 5'-TCCTGCTCCTCATTATGCCAATGCA-3' y antisentido var2 5'-TAGTICITITGTGCCACCCICAGC-3'.

Como control de amplificación se utilizan los oligonucleótidos de GAPDH: sentido 5'-CATCTCTGCCCCTCTGCTGA -3' y antisentido 5'- GGATGACCTTGCCCACAGCCT -3' El producto de amplificación se coloca en un gel de agarosa al 1.5% y se realiza la electroforesis de DNA. Al final se obtiene una fotografía digital del DNA amplificado.

Transfecciones y ensayo de Luciferasa.

Las transfecciones se realizan utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Carlsbad, Ca) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se siembran 3.8 X10⁵, 1.5X10⁵ y 3.5 X10⁵ células RKO, IEC-18 y SW480, respectivamente, en placas de 12 pozos. Los siguientes plásmidos fueron usados: reportero de luciferasa TOP flash (plásmido reportero de la actividad transcripcional mediada por β -catenina-TCF que lleva en el promotor varios sitios de unión para β-catenina/TCF)), plásmido control FOP flash (el mismo reportero pero con los sitios de unión a TCF mutados) y como control de transfección el reportero de renilla luciferasa. Las células se colocan en un medio libre de suero y transfectan con 1 µg de plásmido TOP flash o FOP flash, y con 50 ng de plásmido reportero renilla luciferasa, los cuales son diluidos en Opti-MEM. 6 horas después de la transfección, las células se colocan en medio normal durante 24 horas para su recuperación. Posteriormente, las células se lavan con PBS y lisan 15 minutos a temperatura ambiente; los lisados se clarifican por centrifugación a 12000 RPM durante 5 min a temperatura ambiente y se utilizan 10 µl de cada lisado para medir la expresión del gen reportero de luciferasa (Luciferasas Assay Kit Promega). La actividad se normaliza con la actividad de Renilla luciferasa o con la cantidad de proteína presente en el lisado. Todos los experimentos se realizan por duplicado al menos 3 ocasiones (con preparaciones celulares distintas).

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

Este método se basa en la habilidad de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolio (MTT) en su sal de formazán, un compuesto insoluble en agua de color morado, por la enzima mitocondrial succinato deshidrognasa. Se sembraron células RKO y se incubaron en medio reducido de suero (2% en lugar de 10%) por 8 horas. Se adicionó entonces ligando Wnt3a ((100 ng/ml) para estimular a las células po 24, 48 o 72 horas en la ausencia o presencia de 1, 10, ó 100 µM del inhibidor de PP2A endotal. En el caso de las células SW480, que tienen constitutivamente activa la vía Wnt, solo en ausencia o presencia de endotal por 24, 48 ó 72 horas. Transcurrido el tiempo se les añadió la solución de MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y las células se incubaron a 37° durante 3 horas; la reacción se detuvo añadiendo 1 mL de isopropanol ácido en cada pozo y las sales de formazán se cuantificaron espectrofotométricamente leyendo la absorbancia a 570 nm.

Ensayo de apoptosis

Se sembraron las células en placas de 24 pozos y después de 24 horas se incubaron en la ausencia o presencia de 1 µM endotal, o 120 µM ciclosporina o 1 mM H₂O₂ durante 12 h. El porcentaje de apoptosis de midió por citometría de flujo utilizando el kit comercial de Roche de Annexina V- FITC de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El porcentaje de necrosis se midió por la permeabilidad a yoduro de propidio en ausencia de detergente.

Ensayo de actividad para la GTP asa RalA,

El estado de activación de la GTPasa RalA se analizó usando un kit comercial de Upstate Biotechnology Inc. de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los lisados celulares (i mg) se incubaron con 20 µl de RalBP1 (proteína de unión a Ral-GTP) agarosa por 1 hora a 4ªC. Se lavaron las perlas de agarosa y se sometieron las muestras a SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectó la cantidad de RalA total y de Ral-GTP (activo) con anticuerpo anti RalA (BD Biosciencies).

Análisis estadístico

En todos los experimentos que se realizan con líneas celulares humanas establecidas, los datos de al menos tres experimentos independientes se comparan estadísticamente mediante una t de student tomando como valores significativos una p<0.05 (*) y p< 0.001 (**).

7.0 RESULTADOS

7.1 La actividad basal total de la PP2A está disminuida en las células malignas de colon en relación con la actividad encontrada en las células normales.

La actividad in vitro de la proteína fosfatasa PP2A se midió en los lisados totales por el ensayo de verde de malaquita, en el que se mide la cantidad de fosfato liberado como se describe en el apartado de materiales y métodos. Puesto que este ensayo no permite diferenciar completamente entre las actividades de la PP1 y de la PP2A, la especificidad de los ensayos realizados para la actividad de la PP2A se demostraron usando una concentración 900 nM del inhibidor específico para la PP2A, llamado endotal; la selección de este inhibidor se debió a que presenta una mayor especificidad con la fosfatasa PP2A (IC₅₀= 0.090 μ M) que para PP1 (IC₅₀=5 μ M), en lugar de usar otro inhibidor también especifico, como el ácido okadáico, pero cuya IC₅₀ para la PP2A está en el rango de (0.1–0.3 nM) y es muy cercana a la IC₅₀ para la PP1 de (15–50 nM).

Como se puede observar en la Figura 6, todas las células malignas examinadas mostraron una actividad total de PP2A menor a la encontrada en las células no malignas 112 CoN y IEC-18 de ileum de rata. La actividad de la PP2A en las células normales varió de aproximadamente el doble con respecto a la actividad de PP2A encontrada en las células cancerosas RKO y HT-29, hasta 6 veces mayor que la actividad encontrada en las células cancerosas SW480.

Lo anterior es importante porque se ha reportado frecuentemente en la bibliografía, que la inhibición de la actividad de la PP2A es un prerrequisito para la transformación de células humanas (Ray RM, et al., 2005; Ruediger R, et al., 2001). Como se puede observar en la Figura 6, todas las células malignas examinadas mostraron una actividad total de PP2A menor a la encontrada en las células no malignas 112 CoN y en

las células IEC-18 de ileum de rata. Y cuando el inhibidor de la PP2A, endotal es empleado la actividad de la fosfatasa PP2A disminuye a menos del 10% de la actividad total observada sin el uso del inhibidor.

Interesantemente, a pesar de que las células RKO, HT-29 y SW480 son todas líneas celulares malignas, difieren en su contexto de la ruta Wnt, ya que las células RKO expresan una proteína APC normal y muestran una señalización Wnt normal, mientras que las HT-29 y las SW480 expresan formas truncadas de la proteína APC que resulta en un señalización Wnt alterada, particularmente en las células SW480, que tienen una actividad Wnt constitutivamente activa, (Ruediger R, et al., 2001), presenta los valores más bajos de actividad de la PP2A.





El fosfato libre fue removido de los lizados celulares, mediante el uso de columnas de Sephadex G-25. Posteriormente la actividad de la fosfatasa fue medida por el ensayo del verde de Malaquita. Las muestras fueron incubadas con 100 μ]M de un fosfopéptido durante 30 a 60 min a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la adición de la

solución de verde de malaquita, y la cantidad de fosfato liberado fue cuantificado espectrofotométricamente a 650 nm. Las cantidades totales en picomoles del fosfato formado fueron calculadas através de una curva standarizada de fosfatos. La actividad de fosfatasa fue definida como pmol de PO₄/µg proteína/min. Los resultados representan el promedio mas menos la S.E.M. de tres experimentos. *p<0.05; **p<0.01.

7.2 La expresión de la subunidad A isoforma β de PP2A se pierde en las células malignas a nivel proteína aunque su expresión varía a nivel del RNAm, en las diferentes líneas celulares cancerosas analizadas.

En mamíferos, existen dos genes que codifican dos versiones muy relacionadas de la subunidad estructural PP2A-A; las isoformas Aa y Aβ, y dos versiones de la subunidad catalítica C, Ca y Cβ (Takagi Y, et al., 2000). Adicionalmente hasta el momento, se han reportado 5 variantes de transcritos correspondientes a cinco variantes de splicing, que codifican exclusivamente para la isoforma PP2A-Aβ (NCBI Reference Sequences NM_002716.4, NM_181699.2, NM_181700-1, NM_001177562.1 and NM_001177563.1) y que corresponden a dos transcritos silvestres, (con una masa molecular de 65Kd y de 75 Kd) y a tres transcritos aberrantes, producidos por edición anormal del RNAm asociados frecuentemente a tumores cancerosos.

Ahora bien para investigar si la baja actividad de la PP2A encontrada en las células malignas de colon se debía a un cambio en los niveles de expresión de las subunidad catalítica C o de la subunidad estructural A que forman el corazón o "Core" de PP2A, examinamos primero el perfil de expresión de estas subunidades mediante ensayos de Western Blot.

Como se puede observar en la Figura 7A, no hubo ningún cambio de expresión en la subunidad catalítica Caß entre el estado normal y el canceroso, lo mismo en las biopsias de pacientes analizadas. Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de expresión de las subunidad estructural Aaß (Figura 7B), encontramos claras diferencias entre las células normales y las tumorales, pues las células no malignas así como las biopsias normales de epitelio de Colon, mostraron la presencia de dos bandas que presumiblemente corresponden a las isoformas Aa y Aβ; las cuáles son reconocidas indistintamente por el anticuerpo empleado (ver apartado de materiales y métodos); mientras que en las células malignas y en las biopsias de tumores colorectales analizadas, los western blots mostraron la presencia de una sola banda, que además aparece sobre expresada.



FIGURA 7(A) **Expresión de la subunidad catalítica C, en líneas celulares y biopsias humanas.**Se muestran los niveles de expresión de la subunidad PP2A-C, en líneas celulares epiteliales normales y cancerosas, asi como en biopsias humanas de colon normales y tumorales



Figura 7(B) La expresión de la proteína de la subunidad regulatoria Aβ se pierde en células malignas. Se muestran los niveles de expresión de la subunidad PP2A-A, en líneas celulares epiteliales normales y cancerosas, así como en biopsias humanas de colon normales y tumorales.

Líneas celulares de colon 4SW480 ⁴SW480 72CON 12CON ⁴HT-29 SW480 RKO 4Rho SW480 ⁴€0 ΡΡ2Α-Αα ΡΡ2Α-Αβ ΡΡ2Α-Αα ΡΡ2Α-Αβ Var 1 Var 1 ΡΡ2Α-Αβ GAPDH ΡΡ2Α-Αβ GAPDH Var 2 Var 2 Biopsias de colon ΡΡ2Α-Αβ ΡΡ2Α-Αα GAPDH Var¹Var² Var Var 2 Var Var 2 Normal Tumor 1 Tumor 2 Ν Τ1 Т2 Ν T1 T2

В

С

Figura 7(C) La expresión de los RNAm que codifican para las isoformas de la subunidad regulatoria A de PP2A en líneas celulares de colon y en biopsias de pacientes, es variable. El RNA total fue obtenido de las líneas celulares de colon normales y cancerosas y/ ó de las biopsias normales ó tumorales de colon humano, usando la técnica de Trizol, para realizar los ensayos de RT-PCR uilizando primers específicos, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, los datos son representativos de por lo menos tres experimentos independientes

D Isoforma Beta de la subunidad regulatoria A, proteina fosfatasa 2 isoforma var. 1 [Homo sapiens] >gi]32455246|ref|NM_002716.4| beta isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2 [Homo sapiens]

> MAGASELGTGPGAAGGDGDDSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIKKLSTIALALGVERTRSELLPFLTDT IYDEDEVLLALAEQLGNFTGLVGGPDFAHCLLPPLENLATVEETVVRDKAVESLRQISQEHTPVALEAYF VPLVKRLASGDWFTSRTSACGLFSVCYPRASNAVKAEIRQQFRSLCSDDTPMVRRAAASKLGEFAKVL ELDSVKSEIVPLFTSLASDEQDSVRLLAVEACVSIAQLLSQDDLETLVMPTLRQAAEDKSWRVRYMVAD RFSELQKAMGPKITLNDLIPAFQNLLKDCEAEVRAAAAHKVKELGENLPIEDRETIIMNQILPYIKELVSDT NQHVKSALASVIMGLSTILGKENTIEHLLPLFLAQLKDECPDVRLNIISNLDCVNEVIGIRQLSQSLLPAIVE LAEDAKWRVRLAIIEYMPLLAGQLGVEFFDEKLNSLCMAWLVDHVYAIREAATNNLMKLVQKFGTEWA QNTIVPKVLVMANDPNYLHRMTTLFCINALSEACGQEITTKQMLPIVLKMAGDQVANVRFNVAKSLQKIG PILDTNALQGEVKPVLQKLGQDEDMDVKYFAQEAISV<u>LALA</u> Sitio de unión PP2A-ß var1/C

Isoforma Beta de la subunidad regulatoria A, proteina fosfatasa 2 isoforma var. 2 [Homo sapiens] >gi|32455244|ref|NM_181699.2| beta isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2 [Homo sapiens]

MAGASELGTGPGAAGGDGDDSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIKKLSTIALALGVERTRSELLPFLTDT IYDEDEVLLALAEQLGNFTGLVGGPDFAHCLLPPLENLATVEETVVRDKAVESLRQISQEHTPVALEAYF VPLVKRLASGDWFTSRTSACGLFSVCYPRASNAVKAEIRQQFRSLCSDDTPMVRRAAASKLGEFAKVL ELDSVKSEIVPLFTSLASDEQDSVRLLAVEACVSIAQLLSQDDLETLVMPTLRQAAEDKSWRVRYMVAD RFSELQKAMGPKITLNDLIPAFQNLLKDCEAEVRAAAAHKVKELGENLPIEDRETIIMNQILPYIKELVSDT NQHVKSALASVIMGLSTILGKENTIEHLLPLFLAQLKDECPDVRLNIISNLDCVNEVIGIRQLSQSLLPAIVE LAEDAKWRVRLAIIEYMPLLAGQLGVEFFDEKLNSLCMAWLVDHVYAIREAATNNLMKLVQKFGTEWA QNTIVPKVLVMANDPNYLHRMTTLFCINALSEACGQEITTKQMLPIVLKMAGDQVANVRFNVAKSLQKIG PILDTNALQGEVKPVLQKLGQDEDMDVKYFAQEAISV<u>VAQRLRKLEFPVKDSGEPSVPRADK</u> NHFPRPTVPGEDMGKGPVYQLRGDTRDTLAQLGIAELVHFSQSTD

Sitio de union-PP2A-ß var/ C

Figura 7(D) Secuencia de aminoácidos correspondiente a los RNAm de los transcritos que codifican para las variantes 1 y 2 de la isoforma A β de la PP2A.En la figura se muestran las diferencias en el extremo carboxilo (–COOH), para cada una de las dos variantes de splicing de la isoforma A β , y que corresponde al sitio de unión de la subunidad PP2A-C (catalítica); se muestra con letras remarcadas; asimismo se muestran subrayadas las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las dos variantes de splicing.

Como ya lo mencionamos existen reportados 5 transcritos posibles para la isoforma

Aß y puesto que tres de los cinco transcritos codifican para proteínas más pequeñas que

las silvestres, (variantes 3, 4 y 5), y como nosotros no observamos por Western blot

proteínas de tamaño más pequeñas del esperado (Figura 7B), concluimos que las dos

señales detectadas en los western blots de las células normales corresponderían con las

isoformas Aa y Aβ.

Dado que el anticuerpo empleado para detectar las subunidades de PP2A-A reconoce indistintamente a ambas isoformas; para investigar qué isoforma de la subunidad A deja de expresarse en las células malignas de colon, decidimos examinar los niveles de expresión de los RNAm correspondientes a la isoforma Aa y a la isoforma Aβ diseñando los oligos específicos correspondientes para reconocer a cada una de las dos variantes de splicing silvestres de la isoforma Aβ; las cuáles denominaremos a partir de éste momento como PP2A-Aβ1, (Aβ1) y PP2A-Aβ2, (PP2A-Aβ2) utilizando el método de PCR.

Para dejar perfectamente claro lo anterior, la Figura 7D muestra la secuencia aminoácidica correspondientes a las variantes de Aβ analizadas, (Aβ1 y Aβ2). Como se puede observar resaltado en letras negritas, ambas variantes difieren en su extremo carboxilo (-COOH), precisamente en donde se encuentra el sitio de unión de la subunidad catalítica Caβ. Como se puede observar, la variante 2 de Aβ tiene cambiados los 4 últimos aminoácidos que están en la variante 1 de Aβ y además tiene una cola de 66 aminoácidos adicionales en esta posición por lo que de acuerdo a la secuencia primaria reportada para cada una de estas isoformas; la subunidad Aa y la variante 1 de Aβ tendrían una masa molecular similar (de alrededor de 65 y 66 KDa, respectivamente) mientras que la variante 2 de Aβ tendría una masa molecular mayor de 75 KDa. (lo anterior debido principalmente a la cola adicional de 66 aminoácidos presente en este transcrito). También se muestra, en la figura S5 un NCI-BLAST donde se pueden observar las principales diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas correspondientes a la isoforma Aa y a la isoforma Aβ1.

Por tanto, nuestros resultados de Western blot indicaban que probablemente la variante 2 de la Aβ deja de expresarse en las células malignas; y que las dos señales detectadas en los western blots de las células normales y en las biopsias de pacientes sanos; corresponderían con las isoformas Aa y Aβ var 2.

Dado las claras diferencias en la expresión de la subunidad Aβ, decidimos realizar análisis de RT-PCR, en todas las líneas celulares empleadas, utilizando los oligonucleótidos específicos para la isoforma Aa y para las dos variantes silvestres de la subunidad Aβ.

Los resultados de RT-PCR muestran que todas las líneas celulares de colon así como todas las biopsias de pacientes examinadas, tanto malignas como no malignas, expresan los RNAm correspondientes a las isoformas Aa y Aβ1, como se ve en la Figura 7C. Por lo que también esperaríamos que la proteína correspondiente se hubiesen expresando en los ensayos de western blot realizados.

Sin embargo, mientras que la expresión de la proteína de la Aβ2 se encontró en las líneas celulares normales y en las biopsia de pacientes normales, si se observaron claras diferencias de expresión a nivel del RNA_m; entre las líneas celulares malignas: es decir, las células cancerosas RKO, que poseen una señalización Wnt normal, expresan ambas variantes de Aβ; pero la expresión de Aβ2 está notablemente disminuida en las células HT-29 ó completamente ausente en las células SW480 que tienen una ruta Wnt alterada; es particularmente interesante que en las células SW480, que tienen una ruta Wnt alterada; es constitutivamente activa (Figura 7C), el RNA_m de Aβ2 no se expresa en dichas células cancerosas. Lo anterior nos permitiría suponer que las líneas celulares cancerosas de RKO y HT-29 mantienen la expresión de la proteína Aβ1, aunque en la línea HT-29 (Figuras 7B y 7C) la expresión esperada sería baja.

Sin embargo, la actividad tan elevada observada en las células cancerosas (RKO, HT-29 y SW480) para la GTPasa pequeña Ral A, nos permitó confirmar, que ninguna de las dos variante de la isoforma Aβ, y que están directamente relacionadas con la GTPasa pequeña Ral A, se estarían expresando a nivel proteíco en las células cancerosas.

Adicionalmente y para complementar los resultados obtenidos se analizó el producto de RT-PCR correspondiente al cDNA de la variante 2 Aβ obtenido de la células RKO, y 112 CoN, el cual se cortó, purificó y secuenció, los electroferogramas se muestran

en las Figuras S2 y S3. Los resultados confirmaron que codifican para la variante 2 de A β (datos mostrados en la Figuras S4).

En conjunto, nuestros datos indicaron que la expresión de la isoforma estructural Aβ2; se suprime solamente en células cancerosas; ya sea únicamente a nivel de proteína, (RKO y HT-29) ó a nivel de proteína así como también a nivel del RNAm (SW480 con una ruta wnt alterada.

7.3.1 La pérdida de la expresión de la subunidad estructural Aβ correlaciona con una actividad alta de la GTP asa pequeña RalA.

En trabajos recientes se ha identificado a la GTPasa pequeña RalA como una proteína que interacciona específicamente con la subunidad Aß pero no con la subunidad Aa (Sablina AA, et al 2007). Los complejos de PP2A que contienen a Aß desfosforilan a RalA en las serinas 183 y 194, y este evento de desfosforilación modula negativamente la actividad de RalA; (Mumby M,et al 2007; Sablina AA, et al 2007; Sablina AA and Chen et al, 2007). Con base en esta información, examinamos el estatus de la actividad de la GTPasa de RalA en las líneas celulares de colon. Consistente con la pérdida de la expresión de las proteínas de Aß observada en las células cancerosas de colon, encontramos que precisamente éstas exhiben muy alta actividad de GTPasa RalA con respecto a la encontrada en las células no malignas 112 CoN y en las IEC-18. Como se puede apreciar en la Figura 8, encontramos un incremento de 4 veces en los niveles de Ral A-GTP en células cancerosas que carecen de las proteínas de Aß (células SW480, RKO, HT29) comparado con las células normales.



FIGURA 8(A). La Pérdida de expresión de la subunidad Aβ correlaciona con niveles altos de actividad de la GTP asa pequeña Ral A, en las líneas celulares cancerosas y la expresión de la isoforma Aβ2, disminuye la actividad de la GTP asa Ral A, y la proliferación celular.

(A) La actividad de Ral A fue determinada por el ensayo con la proteína de unión BP1, en las células malignas RKO y SW480, y en las células epiteliales normales 112CoN y IEC-18. Los lizados celulares (1mg) fueron incubados con 20µl de la agarosa con la proteína RalBP1 por 1 h a 4°C. Las perlas fueron lavadas y sujetas a una electroforesis SDS-PAGE, y transferidas a la membrana de nitrocelulosa e incubada con el anticuerpo específico anti-Ral A. La actividad específica de Ral A fue calculada por densitometría, en al menos tres experimentos independientes más menos la desviación estándar ** p<0.01.

7.3.2 Incrementos en la expresión del RNAm de la Aß2, en las células cancerosas,

disminuye la actividad de la GTP asa Ral A, y la proliferación celular.

Α

Para demostrar que la variante de splicing denominada por nosotros como Aβ2, actúa como un supresor tumoral, nosotros llevamos a cabo experimentos de rescate. Las células cancerosas fueron transfectadas de manera estable con 1 μg del plásmido que codifica para la Aβ2, ó con un plásmido vacío, y los efectos en la actividad de la GTP asa Ral A (Figura 8B, 8C) y en la proliferación celular (Figura 8D), fueron analizados.

Interesantemente, la expresión de la Aβ2 sólo pudo rescatar la actividad en las células RKO, pero nó en las células SW480, dado que nosotros sólo pudimos observar por PCR (dado que los anticuerpos no discriman entre las isoformas Aa y Aβ) un incremento en la expresión en éstas células, como puede observarse en la (figura 8B). Interesantemente, una reducción en la actividad de la GTP asa Ral A pudo observarse en las células RKO transfectadas con el plásmido que codifica para la Aβ2 en comparación con las células transfectadas con el pásmido vacío, control (figura 8C), también pudo ser observada una reducción del 25% en la proliferación celular a las 96h posteriores a la transfección marcadas para su evaluación por citometría de flujo (CFSE). Por lo anterior, estos resultados confirman la idea de que la variante Aβ2 es un supresor tumoral en cáncer colorectal, lo anterior constituye una de las principales aportaciones del presente trabajo de tesis y correspondería a la primera referencia bibliográfica al respecto de la actividad supresora tumoral de esta variante de splicing, PP2A-Aβ2; que hasta ahora no había sido explorada, y que concuerda con lo previamente descrito por Sablina et al; 2007; en relación a la actividad supresora tumoral descrita para la variante PP2A-Aβ1.



Figura 8(B) Las células cancerosas SW480 y RKO fueron trasnfectadas establemente con 1µg del plásmido que codifica para la A β var 2 (pCMV6-A β 2), ó con un plásmodo vacío (pCMV6). El RNA total fue obtenido de los lisados celulares para obtener por RT-PCR la expresión para la A β var 2, usando primers específicos como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, los datos son representativos de tres experimentos independientes.



Figura 8(C) La actividad de Ral A fue determinada en células malignas RKO transfectadas establemente con el plásmido que codifica para la Aβ var 2 (pCMV6-Aβ2),

ó con un plásmido vacío (pCMV6). Los lisados celulares fueron incubados con la agarosa RalBP1 durante 1h a 4°C. Las perlas fueron lavadas, y las muestras fueron sujetas a una electroforesis SDS-PAGE al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo específico anti-Ral A. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.



Figura 8 (D) Las células RKO fueron transfectadas establemente con 1µg del plásmido que codifica para la variante de splicing humana PP2A-Aβ (pCMVV6-XL5-Aβ2) ó con el plásmido control (pCMV6-ZL5). Las células fueron marcadas con 7µM CFSE en PBS 0.1% BSA a 37°C por 10 min. Las células fueron posteriormente incubadas in vitro y después del periodo de tiempo indicado en la figura, las células fueron tripsinizadas, lavadas en PBS al 4% FSB y fijadas con 4% PFA. Las células fueron analizadas por citometría de flujo mediante la detección logarítmica de la fluorescencia verde (CFSE). Los resultados representan el promedio mas menos la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes * p<0.05.

7.4 Las subunidades AC que forman el "core" de la PP2A co-inmunoprecipitan de manera recíproca con la β -catenina y colo calizan con ella en las células cancerosas.

Existe evidencia experimental de que la PP2A juega tanto papeles positivos como negativos en la señalización Wnt probablemente a través de diferentes componentes (Janssens V, et al., 2001). Interesantemente, se ha reportado que la degradación de β-catenina, pero no su fosforilación, se inhibe en la línea cancerosa de colon SW480, y que los experimentos utilizando siRNA en estas células sugieren que PP2A es esencial para la desfosforilación de la β-catenina (Zhang W, et al; 2009). Esto ha llevado a proponer que algún heterotrímero de la PP2A constituido por alguna de sus isoformas, podrían desfosforilar y estabilizar a la β-catenina, para favorecer su tras locación al núcleo, jugando entonces un papel regulador positivo en la señalización Wnt alterada en ésta línea celular cancerosa (SW480), por una delecion en la proteína APC, que inactivan a la proteína supresora tumoral.

Para investigar si existe alguna interacción *in vivo* entre la proteína β-catenina y las subunidades AC del "core" de PP2A, se realizaron experimentos de coinmunoprecipitación recíproca. Para ello se inmunoprecipitó a la β-catenina a partir de extractos de células normales 112 CoN y de células malignas RKO o SW480 y se analizaron los inmunoprecipitados por Western blot utilizando anticuerpos contra las subunidades Ca/β o contra Aa/β. Como se puede observar en la Figura 9A, aunque la β-catenina coinmunoprecipitó con las subunidad catalítica C y con la regulatoria A obtenidas tanto de células normales como de células malignas, solamente lo hizo de manera recíproca en las células cancerosas. Α




FIGURA 9. La PP2A-Ca/ β y PP2A-Aa/ β co-immunoprecipitan de manera recíproca y colocalizan con β -catenina sólo con las células cancerosas de colon.

(A) La PP2A-Caβ y la PP2A-Aaβ coinmumoprecipitan con la β-catenina de una manera recíproca. Los niveles de expresión de la PP2A-Caβ. PP2A-Aaβ y de β-catenina fueron analizados en los extractos celulares (50 μg) obtenidos de las células de colon no malignas 112coN y de las células malignas de colon RKO y SW480 (crudos). El anticuerpo de Actina fue usado como control de carga. La PP2A-Caβ, la PP2A-Aaβ ó la β-catenina fueron inmunoprecipitadas de los lizados celulares y analizados por western bblot para evaluar la presencia de las proteínas indicadas en la figura. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes usando diferentes preparacionbes celulares.

(B) La PP2A-Ca/ β y PP2A-Aa/ β co-localiza con la proteína β -catenina sólo en las células cancerosas de colon.

La proteína β-catenina co-localiza con la PP2A-A en las células de malignas de colon. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y co-inmunoprecipitadas con los anticcuerpos contra la PP2A-Aaβ y la β-catenina. La fluorescencia fue analizada en un microscopio laser confocal como es descrito en el apartado de Materiales y Métodos. La PP2A-Aaβ fue visualizada con el anticuerpo de FITC-conjugado con un anticcuerpo cabra anti-conejo, y para la β-catenina con TRIC-conjugado con el anticuerpo cabra anti-ratón. Los núcleos celulares fueron teñidos al incubar lo cubreobjetos con el compuesto DAPI (46-diamidino-2-fenilindol). Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

Consistente con estos resultados, los análisis de inmunofluorescencia seguidos de su análisis por microscopía confocal, presentados en la Figura 9B, mostraron una clara colocalización de la β-catenina con las subunidad Aa solamente en las células malignas. Como se puede ver, en células epiteliales intestinales no malignas, ya sea humanas como las 112 CoN o en las de îleum de rata IEC-18, la subunidad Aa/β aparece compartamentalizada en el núcleo celular; mientras que la β-catenina aparece en la membrana plasmática o en el citoplasma. En marcado contraste, en células cancerosas, en donde sea que se localice la proteína β-catenina, la subunidad Aa siempre colocaliza con ella. Así por ejemplo, en las células RKO, con una β-catenina localizada principalmente fuera del núcleo, Aa co localiza en el mismo sitio; pero en las células SW480, que muestran una acumulación y localización nuclear de la β-catenina, la subunidad Aa también co localiza con la β-catenina en el núcleo celular. En conjunto nuestros datos sugieren que la interacción *in vivo* observada entre el "core" de PP2A compuesto por la subunidad regulatoria Aa, y la subunidad C, con la β-catenina, parece ser fisiológicamente relevante en las células cancerosas de colon analizadas. La colocalización observada entre el core de la PP2A y la proteína β-catenina permite establecer dos patrones de regulación de la actividad transcripcional de la β-catenina por parte de la proteína fosfatasa, dependiente del fenotipo celular; a continuación presentamos las figuras 9C, en donde se resumen los datos encontrados para las líneas celulares normales y la figura 9D para las líneas celulares cancerosas. De acuerdo a lo que se puede observar en la figura 9C, en las células normales se observa primeramente que la señal de la subunidad Aaβ de la PP2A es alta y se encuentra compartamentalizada en el nucléo de las células normales, mientras que la señal para la β-catenina es débil y se encuentra preferentemente en el citoplasma celular y en la membrana celular. Lo anterior indicaría que la actividad de la PP2A es alta en el núcleo celular; y baja en el citoplasma y en la membrana celular, donde se localiza la proteína β-catenina; en conclusión los ensayos de inmunofluorescencia muestran que en las células normales la PP2A y la βcatenina ocupan espacios celulares mutuamente excluyentes ya que ambas proteínas no colocalizan en las células normales, ó ésta colocalización es mínima.

Por otro lado en las células cancerosas y como puede observarse en la figura 4D, la señal correspondiente a la PP2A es débil y se encuentra dispersa en toda la célula cancerosa; mientras que la señal de la proteína β-catenina es fuerte y se encuentra principalmente compartamentalizada en las líneas celulares cancerosas, sin embargo esta compartamentalización varía entre las diferentes líneas celulares cancerosas, por ejemplo en las células HT-29, la β-catenina se encuentra presente principalmente acumulada en la membrana celular, en las células RKO ésta se encuentra en el citoplasma celular y en la membrana nuclear; mientras que en las células SW480 la proteína β-catenina se encuentra compartamentalizada en su totalidad en el núcleo; interesantemente en las todas las líneas celulares analizadas la PP2A colocaliza con la proteína β-catenina independientemente de donde ésta se localice en dichas células; lo anterior permitiría anticipar que la PP2A juega una papel regulador sobre la actividad de la proteína β-

catenina en las células cancerosas, lo cuál fue confirmado por los ensayos de Top y Fop que se discutirán más adelante. Finalmente estos resultados nos permiten dilucidar dos comportamientos distintos de la PP2A.

En las células normales la PP2A no interacciona de manera directa con la proteína βcatenina; y su inhibición con endotal incrementa ligeramente la proliferación celular en la línea celular normal 112CoN, (figura suplementaria S1); por lo que en resumen podemos comentar que la PP2A actúa como un supresor tumoral en las líneas celulares normales; ya que cuando éste supresor tumoral se inhibe, se incrementa la proliferación celular; mientras que en las células cancerosas la PP2A juega una papel distinto, de regulador positivo de la actividad transcripcional de la β-catenina, lo cual favorece la proliferación de las células cancerosas, como se describe en detalle a continuación.



Cuadro resumen células normales

Figura 9(C): Cuadro resumen de resultados de las inmunofluerescencias en las líneas celulares control, 112CoN (epitelio embrionario) y IEC-18 (ileum de rata). En el cuadro resumen de la izquierda se muestran las principales características de las dos líneas celulares control, relacionadas con la ruta Wnt.

Cuadro resumen células cancerosas



Figura 9(D): Cuadro Resumen de resultados de las inmunofluerescencias en líneas celulares cancerosas, RKO (carcinoma de colon) y HT-29 (Adenocarcinoma de colon), y SW-480 (Adenocarcinoma de colon). En el cuadro resumen de la derecha se muestran las principales características de las tres líneas celulares cancerosas, relacionadas con la ruta Wnt.

7.5 La inhibición de la actividad de PP2A induce efectos negativos en la actividad transcripcional de β -catenina y en la proliferación celular de las células cancerosas.

Puesto que siempre encontramos que dondequiera que se localice la β-catenina en las células malignas, la isoforma PP2A-Aa co-localiza con dicha proteína, decidimos explorar los efectos que tendría la inhibición de la PP2A en las células malignas (que no expresan la subunidad Aβ). Para realizar lo anterior utilizamos las células malignas RKO que poseen una ruta Wnt normal (expresan una proteína APC silvestre) y que son responsivas a ligando Wnt3a, en comparación con las células malignas SW480, que expresan una versión truncada de APC y que tienen constitutivamente activa la ruta Wnt canónica. Para examinar los efectos de la inhibición en esta ruta Wnt canónica, empleamos el sistema

reportero de la actividad transcripcional de la β -catenina denominado como TOP Flash/FOP Flash.

Inhibimos la actividad de PP2A con el compuesto Endotal, el cual es un inhibidor permeable a las células, y específico de la PP2A (IC₅₀ =90 nM), que tiene un efecto débil sobre la PP1 (IC₅₀ =5 μ M). 24 horas post-transfección de las células con el plásmido pTOP Flash o pFOP Flash (control), las células RKO ayunadas de suero se incubaron en la ausencia o en la presencia del ligando Wnt3a (100 ng/ml) por 8 horas y se incubaron entonces en la ausencia o presencia de 1, 10, ó 100 μ M de Endotal por 6 horas. Las células SW480 solamente se incubaron en la ausencia o presencia de 1, 10, ó 100 μ M de Endotal por 6 horas. Como se puede observar en la Figura 10, tanto la actividad transcripcional de β -catenina estimulada por Wnt3a en las células RKO, como la actividad constitutiva de β -catenina en las células SW480, se bloquearon de manera dependiente de la dosis como resultado del tratamiento por 6 horas con endotal, alcanzando un 50% de la actividad control con la concentración de 100 μ M del inhibidor de PP2A en ambas líneas celulares cancerosas.



FIGURA 10. La inhibición de la actividad de PP2A, mediante el uso de inhibidores específicos, bloquea de manera dosis-dependiente la actividad transcripcional mediada por la proteína β-catenina.

El inhibidor específico de la PP2A denominado como Endothal, bloquea de una manera dosis dependiente la actividad transcripcional contitutivamente activa en las células (SW480) y la actividad transcripcional inducida por el ligando Wnt 3Aen las células (RKO). Las células SW480 y las RKO fueron co-transfectadas con el pRL y los plásmidos reporteros para TOPFlash ó FOPflash. A las 24 h posteriores a la transfección, las células RKO fueron ayunadas en un medio de cultivo libres de suero durante 10 h, y adicionadas con el ligando Wnt2A (100ng/ml) adicionado en el medio de cultivo para estimular a las células durante un periodo de 12 h. Durante las siguientes 6 h las células fueron incubadas en la ausencia ó presencia de 1, 10 ó 100 µM del compuesto Endothal. En el caso de las células SW480, 24h posteriores a la transfeccion de las células éstas fueron incubadas en la ausencia ó presencia de 1, 10 ó 100 µM del compuesto Endothal durante 6 h. Después de la incubación con ó sin el inhibidor, las células fueron lavadas, lisadas y la actividad de luciferasa fue evaluada. La actividad fue normalizada con respecto a la actividad de la Renilla - Luciferasa ó con respecto a la concentración de proteínas de cada muestra. Los resultados representan el promedio más menos la desviación estándar, de al menos tres

experimentos independientes. * p<0.01.

Puesto que la PP2A se ha implicado en la inducción de apoptosis (Zhou J, et al., 2003), investigamos si los efectos negativos obtenidos con endotal se debían a un incremento en la tasa de apoptosis celular. La tinción con Anexina V-PI seguida del análisis por citometría de flujo se empleó para determinar la apoptosis inducida por el tratamiento con 1 µM de endotal durante 12 horas, en comparación con tratamiento con otros inductores típicos de apoptosis tales como 1mM de H₂O₂ \circ 120 μ M de ciclosporina durante 12 horas. Los resultados mostrados en la Figura 11A y B, demostraron que la incubación con 1 µM de endotal durante 12 horas no afecta significativamente la apoptosis observada en comparación con las células control no tratadas (sólo vehículo), ni en las células RKO (Figura 6A), que se comportan muy resistentes a apoptosis inducida con cualquiera de los compuestos, ni en las células SW480 (Figura 11B), en las cuales la ciclosporina y el H_2O_2 produjeron un incremento de 5.5 y 3 veces la apoptosis, respectivamente, en comparación con las células control. Probamos concentraciones de endotal mayores y encontramos que aún en la presencia de 900 µM de endotal, el 50% de las células RKO permanecen resistentes a apoptosis después de 3 horas de tratamiento (datos no mostrados).



FIGURA 11(A) La inhibición de la actividad de PP2A con 1 µM endotal no afecta la tasa de apoptosis en células maligna RKO, pero si disminuye la proliferación de las células cancerosas.

La apoptosis celular fue inducida cultivando las células en la ausencia (vehículo) ó presencia de 1µM del inhibidor de Endothal, 120 µM de ciclosporina ó 1mM de H₂O₂ durante 12h. Las células RKO (A) ó SW480 (B) fueron tripccinizadas, lavadas dos veces con PBS, y los cultivos tratados y no tratados fueron teñidos con V-FITC y IP como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, seguidos por el análisis de citometría. Los diferentes patrones de tinción en este ensayo permite la identificación de diferentes poblaciones celulares: las células vivas (PI-negativas/anexina V-negativas), las células apoptoticas (anexina V-positivas) y las células necróticas (PI-positivas/ anexina V-negativas). Se presenta un experimento representativo (arriba del panel). Los histogramas representan el porcentaje de las células apoptoticas/necróticas son mostrados debajo de la figura. Los datos representan los valores promedio mas menos la desviación estándar de tres experimentos independientes.



FIGURA 11(B) La inhibición de la actividad de PP2A con 1 µM endotal no afecta la tasa de apoptosis en células maligna SW480, pero si disminuye la proliferación de las células cancerosas.

La apoptosis celular fue inducida cultivando las células en la ausencia (vehículo) ó presencia de 1µM del inhibidor de Endothal, 120 µM de ciclosporina ó 1mM de H₂O₂ durante 12h. Las células RKO (A) ó SW480 (B) fueron tripccinizadas, lavadas dos veces con PBS, y los cultivos tratados y no tratados fueron teñidos con V-FITC y IP como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, seguidos por el análisis de citometría. Los diferentes patrones de tinción en este ensayo permite la identificación de diferentes poblaciones celulares: las células vivas (PI-negativas/anexina V-negativas), las células apoptoticas (anexina V-positivas) y las células necróticas (PI-positivas/ anexina V-negativas). Se presenta un experimento representativo (arriba del panel). Los histogramas representan el porcentaje de las células apoptoticas/necróticas son mostrados debajo de la figura. Los datos representan los valores promedio mas menos la desviaicón estándar de tres experimentos.



FIGURA 11(C) Ensayos de Proliferación celular, a diferentes dosis del inhibidor de Endothal, específico para la proteína fosfatasa PP2A.

(C) las células SW480 fueron incubadas en la ausencia ó presencia de 1. 10 ó 100 μ M del compuesto de Endothal durante 24, 48 ó 72 h. Las células RKO ayunadas fueron estimuladas con 100 ng/ml del ligando Wnt 3ª duran te 12h antes de la incubación con las mismas concentraciones de Endothal durante 24h, 48 ó 72h. Durante las últimas 3h del periódo de incubación, el reactivo MTT fué adicionado al medio de cultivo en ambos tipos celulares (a una concentración final de 0.5 mg/ml). Después del tiempo de incubación se interrumpe y las muestras cuantificadas por esprectrofotometría a 570 nm. * p<0.05.

С

Debido a que la activación de la ruta Wnt canónica promueve la proliferación celular vía la expresión de genes tales como c-myc y ciclina D, hipotetizamos que el bloqueo de la actividad transcripcional de β-catenina inducida por el tratamiento con endotal, afectaría la proliferaión celular. Para examinar esto, se incubaron células SW480 en ausencia o presencia de 1, 10 ó 100 µM de endotal por periódos de 24, 48 ó 72 horas. Las células RKO fueron ayunadas de suero y se estimularon con 100 na/ml Wnt3a antes de la incubación con endotal. Durante las tres últimas horas de cada periodo de incubación, se adicionó el MTT al medio de cultivo de ambos tipos celulares y se usó como índice de proliferación celular la presencia de células viables metabólicamente activas. Como se observa en la Figura 11C, el inhibidor de PP2A disminuyó de manera dependiente de la dosis la proliferación celular de ambos tipos celulares en más de un 70% después de 72 horas de tratamiento con 100 µM endotal. Por lo anterior, estos resultados indicaron claramente que la actividad de la PP2A es esencial para mantener activa la ruta Wht canónica en las células malignas, sugiriendo un papel importante de la actividad residual de PP2A en estas células para favorecer las acciones mediadas por la β-catenina y la proliferación celular "in vivo".

8.0 FIGURAS SUPLEMENTARIAS



CELULAS 112CoN

Figura S1: Ensayos de proliferación celular por el método de MTT, en células normales de colon 112CoN, a los tiempos y dosis de Endothal mostradas en la gráfica.

Secuenciación Nucleótidos cDNA: 112 CoN



Figura S2: Electroferograma de la secuenciación nucleotídica para el cDNA obtenido de la línea celular normal 112CoN, correspondiente a la isoforma PP2A-Aβ2.

Secuenciación Nucleótidos cDNA: RKO



Figura S3: Electroferograma de la secuenciación nucleotídica para el cDNA obtenido de la línea celular normal 112CoN, correspondiente a la isoforma PP2A-β2.

А

PROTEIN TRANSLATION_ TABLE: UNIVERSAL cDNA>1b-112-CON_Abeta-Var1-Var2-Fwd_Frame3

XLLA*NDHFILH*CTV*GLWSGNNY*ANAAHRIKNGRRPSSK CSLQCGQISTKDWTNSRYQCFTGRSEASTTEVRSR*RHGC QILCTGSYKCGGTKAEEA

B PROTEIN TRANSLATION_TABLE: Universal cDNA>2b-RKO_Abeta-Var1-Var2-Fwd_Frame1

XXLLA*NDHFILH*CTV*GLWSGNNY*ANAAHRIKNGRRPSSK CSLQCGQISTKDWTNSRYQCFTGRSEASTTEVRSR*RHGC QILCTGSYKCGGTKAEEA

Figura S4(A): Secuencia aminoacídica del cDNA correspondiente a la isoforma PP2A-β2, obtenido de la línea celular normal 112CoN, y (B) de la línea celular cancerosa RKO;. Para su comparación, como puede observarse ambos secuencias codifican para la variante PP2A- Aβ2.



A BETA	14	MAGASELGTGPGAAGGDGD	19	#8	TLNDLIPAFQNLLKDCEAEVRAAAAHKVKELGENLPIEDRETI	333
A ALPHA Repeat	1 2	MAAADGD	7		TKTDLVPAFQNLMKDCEAEVRAAASHKVKEFCENLSADCRENV	321
#1	DSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIKKLSTIALALGVER		58	#9	IMNQILPYIKELVSDTNQHVKSALASVIMGLSTILGKEN	372
	DSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIKKLSTIALALGVER		46		IMSQILPCIKELVSDANQHVKSALASVIMGLSPILGKDN	360
#2	TRSELLPFLTDTIYDEDEVLLALAEQLGNFTGLVGGPD		96	#10	TIEHLLPLFLAQLKDECPDVRLNIISNLDCVNEVIGIRQ	411
	TRSELLPFLTDTIYDEDEVLLALAEQLGTFTTLVGGPE		84		TIEHLLPLFLAQLKDECPEVRLNIISNLDCVNEVIGIRQ	399
#3	FAHCLLPPLENLATVEETVVRDKAVESLRQISQEHTPVA		135	#11	LSQSLLPAIVELAEDAKWRVRLAIIEYMPLLAGQLGVEF	450
	YVHCLLPPLESLATVEE	TVVRDKAVESLRAISHEHSPSD	123		LSQSLLPAIVELAEDAKWRVRLAIIEYMPLLAGQLGVEF	438
#4	LEAYFVPLVKRLA <mark>S</mark> GDWFTSRTSACGLFSVCYPR <mark>AS</mark> NA LEAHFVPLVKRLA <mark>G</mark> GDWFTSRTSACGLFSVCYPRVSSA		173	#12	FDEKLNSLCMAWLVDHVYAIREAATNNLMKLVQKFGTEW	489
			161		FDEKLNSLCMAWLVDHVYAIREAATSNLKKLVEKFGKEW	477
#5	VKAETRQQFRSLCSDDTPMVRRAAASKLGEFAKVLELDS VKAELRQYFRNLCSDDTPMVRRAAASKLGEFAKVLELDN		212	#13	AQNTIVPKVLVMANDPNYLHRMTTLFCINALSEACGQEI	528
			200		AHATIIPKVLAMSGDPNYLHRMTTLFCINVLSEVCGQDI	516
#6	VKSEIVPLFTSLASDEQDSVRLLAVEACVSIAQLLSQDD VKSEIIPMFSNLASDEQDSVRLLAVEACVNIAQLLPQED		251	#14	TTKQMLPIVLKMAGDQVANVRFNVAKSLQKIGPILDTNA	567
			239		TTKHMLPTVLRMAGDPVANVRFNVAKSLQKIGPILDNST	555
#7	LETLVMPTLRQAAEDKSWRVRYMVADRFSELQKAMGPKI		290	#15	LQGEVKPVLQKLGQDEDMDVKYFAQEAISVLALA	601
	LEALVMPTLRQAAEDKS	WRVRYMVADKFTELQKAVGPEI	278		LQSEVKPILEKLTQDQDVDVKYFAQEALTVLSLA	589

Figura S5: Comparación de las isoformas Aa y A β de la PP2A. La figura superior, es un modelo de la isoforma Aa, (Chen Y Xu et al., 2008), mostrando los residuos de aminoácidos que son diferentes en la isoforma AB. Verde olivo corresponden a sustituciones conservativas; color magenta aminoácidos cambiados con carga; color naranja, sustituciones polares por aa cargados; color amarillo, adiciones de prolina ó sustracciones; color rosa, aa polar por polar; color azul, polar por no polar; color morado, no polar por polar. En la vista de la izquierda, se muestra la interacción de la subunidad A con la subunidad B. El extremo –N (amino), de A ésta a la izquierda. La figura central esta rotada 180º para mostrar la vista trasera de la estructura, y el extremo –N (amino) se muestra ahora a la derecha. La figura derecha muestra la misma orientación con la subunidad B (en rojo) y la subunidad C (en blanco). En la parte baja de la figura se muestra la secuencia aminoacídica de la isoforma humana Aßvar1 (genbank AAC63525.1), que es comparada con la secuencia de la isoforma humana de Aa (NM 014225.5) mediante un NCIBLAST. Los repetidos HEAT 1-15 de las subunidades A están alineados. La comparación muestra a los residuos idénticos en negro, los residuos conservados en verde, y las diferencias más pronunciadas entre ambas isoformas en rojo, (Ruediger et al). Tomado y modificado de (Hwang H. J; 2013)

9.0 DISCUSION

El cáncer de colon ocupa el tercer lugar como causa de muerte por cáncer, en México tanto en hombres como en mujeres, y en los países industrializados como USA y Canadá; por lo que el entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad, así como la identificación de posibles blancos terapéuticos y de nuevos marcadores bioquímicos, para un tratamiento más eficiente resultan de sumo interés.

Las células epiteliales en aeneral están sujetas a una continua renovación. Esto es particularmente cierto para las células epiteliales del Colon de todos los mamíferos, incluyendo el hombre, que presentan la tasa de auto renovación más alta en comparación con el resto de los tejidos de un organismo adulto. Estas células se originan a partir de células troncales que permanecen activas durante toda la vida del organismo. La homeostasis de éste epitelio está basada en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La evidencia experimental actual indica que la ruta de señalización Wingless (wnt), es la fuerza dominante que controla la proliferación de las células troncales y por ende la principal responsable de mantener la homeostasis celular en el epitelio intestinal y que cuando ésta ruta está alterada se produce el cáncer (Logan C.Y., et al.; Radtke F. et. al., 2004?). Consistente con esto, estudios moleculares han demostrado mutaciones activadoras de la Ruta Wnt en un número abrumador de casos de cáncer colorectal, aproximadamente en un 85-90% de los casos (Bienz M. et al.,2000; Oving I., et al 2002). Asimismo, mutaciones en otras proteínas que participan en la ruta Wht como la proteína Axina han sido relacionados con carcinomas hepáticos, y el cáncer gástrico se ha asociado a mutaciones en el dominio NH₂ de la β -catenina (Kollings et., al., 2002). En el caso del melanoma, se han descrito mutaciones en la proteína β -catenina ó en la proteína supresora tumoral APC que se relacionan con la progresión de la enfermedad (Rubifeld et., al., 1997).

La proteína fosfatasas PP2A, es la principal proteína fosfatasa de la familia de las Serina y Treonina fosfatasas y es responsable de hasta el 55% de toda la actividad de desfosforilación atribuida a las proteínas fosfatasas, dependiendo del linaje celular. La enzima es un heterotrimero que consiste de tres subunidades denominadas como A, B, y C. El corazón ó core de la proteína fosfatasa PP2A está compuesto por la subunidad catalítica C (PR37) y por la subunidad estructural A (PR65)

Una variedad de mecanismos para inhibir la actividad de la PP2A se han reportado en las células transformadas: la PP2A es inhibida por el antígeno tumoral pequeño de los virus tumorales de DNA; por la sobre regulación del inhibidor CIP2A; por el oncogen c-myc; a través de la inactivación mutacional bialélica de la subunidad A β ; ó por la expresión disminuida de la subunidad A α Mumby M, et al., 2007 (Schonthal et al., 2001).

Adicionalmente, existe mucha evidencia experimental que indican que múltiples miembros de la familia de las fosfatasas de PP2A actúan como supresores tumorales, y se ha encontrado que la PP2A está genéticamente alterada ó está funcionalmente inactivada en muchos cánceres sólidos y leucemias.

Consistente con toda esta evidencia experimental, en nuestro trabajo observamos que la actividad basal de la PP2A está marcadamente reducida en las células de colon malignas con respecto a las células de colon no malignas (figura 6).

Nosotros también hemos mostrado aquí que en las células cancerosas de colon no se observa ningún cambio de expresión en la proteína de la subunidad catalítica PP2A-C, con respecto a las células no malignas de colon (figura 7A), lo mismo puede ser observado en las biopsias de colon normal y tumoral.

Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que muestran que la expresión de PP2A-C al interior de las células es cuidadosamente regulada, para asegurar que un nivel relativamente constante de la subunidad C de PP2A esté presente. Este

control auto regulatorio es ejercido a nivel traduccional y no involucra mecanismos transcripcionales (Baharians Z, et al., 1998).

La fosfatasa PP2A existe como el core de la enzima y como holoenzima en las células (Sablina AA, et al., 2010; Janssen V, et al., 2001). Dado que las subunidades C y B se unen a la subunidad A, la función normal de la subunidad A de anclaje para estas subunidades es crítica para el ensamblado del core de la enzima ó la holoenzima para aobernar su actividad específica. Los dos genes alternativos, PR65a y PR65B, codifican proteínas que tienen un 87% de homología en la secuencia de identidad, pero la subunidad Aβ tiene propiedades bioquímicas únicas; ya que a diferencia de la subunidad Aa, cuenta con una cola de 12 aa en el extremo -NH2 y hasta el momento, se han reportado 5 variantes de transcritos correspondientes a cinco variantes de splicina, que codifican exclusivamente para ésta isoforma PP2A-Aß (Secuencia de Referencia NCBI NM_002716.4, NM_181699.2, NM_181700-1, NM_001177562.1 y NM_001177563.1) y que corresponden a dos transcritos silvestres de una masa molecular aproximada de 65 Kd y 74 Kd respectivamente, la diferencia en masa entre ambas variantes proteícas se debe principalmente a que AB2 cuanta además con una cola adicional de 66 aa; las otras tres variantes corresponden a tres transcritos aberrantes producidos por edición anormal del RNAm y asociados frecuentemente a tumores cancerosos, de orígenes diversos; y que corresponden con proteínas más cortas de entre -40-<50kd<<65Kd. Es interesante mencionar que ambas colas de aa. presentes en la variante A β 2 (12 aa en extremo -NH₂ y de 66 aa localizada en el extremo -COOH) se encuentra precisamente en la zona de reclutamiento de las subunidades regulatorias de la famila B y de la subunidad catalítica C, de la PP2A, respectivamente; por lo que a pesar de la homología entre ambas isoformas, estas tienen propiedades bioquímicas únicas y que así como Aβ es incapaz de sustituir la pérdida de la subunidad Aa en ratones (Eichhorn PJA, et al., 2009); la subunidad Aa es incapaz de formar los complejos específicos de Aβ y de sustituir su actividad.

Se ha demostrado también que la subunidad Aβ se expresa a niveles mucho menores que la subunidad Aa en tejidos adultos, mientras que durante las primeras etapas del desarrollo de los vertebrados es mucho más abundante que la subunidad Aa (Shao J et al. 2012, Sablina AA et al., 2007). De lo anterior se desprende que se requiere de la correcta expresión de ambas isoformas de la subunidad estructural A, y de sus variantes proteícas para el correcto funcionamiento celular.

Los resultados aquí presentados mostraron claramente que mientras que no existen cambios de expresión en la subunidad catalítica PP2A-C, si existen diferencias de expresión en la subunidad estructural A entre las células con el fenotipo maligno y el normal.

De acuerdo con lo anterior, nosotros observamos, que las células de colon normales; así como las biopsias de colon normal y las células epiteliales obtenidas del colon de ratas wistar sanas; expresan ambas isoformas Aa y A β , (con sus dos variantes A β 1 y A β 2) de forma constitutiva y que la isoforma Aa se expresa en una mayor proporción que la isoforma A β (figura 7B).

Sin embargo un resultado importante obtenido en nuestro trabajo es que las células cancerosas (RKO, HT-29 y SW-480) sobre expresan a la proteína de la isoforma Aa (65Kd); pero no expresan la proteína de la isoforma Aβ, (Aβ1 y Aβ2) ya sea a nivel de proteína (RKO, HT29) ó tanto a nivel proteíco como a nivel del RNAm (SW480; Figura 7C).

La ruta Wnt canónica opera a través de la regulación de la fosforilación y degradación del coactivador transcripcional β-catenina. Como se ha mencionado antes, existe evidencia de que la PP2A a través de una variedad de mecanismos, puede tener un rol positivo ó negativo en la regulación de la ruta Wnt canónica, enfatizando el papel crítico de la regulación de la PP2A tanto en embriogénesis y en la regulación de la proliferación celular de los tejidos adultos que tiene dicha fosfatasa. La primera evidencia de que la PP2A controla la ruta Wnt fue obtenida usando a la proteína APC como una

proteína anzuelo en un ensayo de doble híbrido. Por lo que se ha demostrado que la PP2A se puede asociar con un número importante de componentes de la ruta de señalización Wnt, tales como Naked (Creyghton MP. Et al., 2005), APC (Seeling JM. Et al., 199), Axina (Li X. et al., 2001; Yamamoto H. et al., 2001) y la proteína β-catenina (Gotz J. et al., 2000). Es interesante mencionar que todas estas proteínas son reguladas por fosforilación. Sin embargo, aunque se ha demostrado que varias proteínas cinasas regulan la ruta de señalización Wnt/β-catenina, las proteína fosfatasas involucradas han recibido mucho menos atención, siendo que éstas enzimas son las únicas capaces de revertir la acción de las cinasas que participan en la regulación de la ruta wnt.

En relación con lo anterior Bos et. al.; fue el primero que reportó que la actividad enzimática de la PP2A influye en el estado de fosforilación de la proteína β-catenina, cuando él demostró que el tratamiento de las células cancerosas de colon tratadas con diferentes dosis de aspirina promueven la fosforilación de la β-catenina por inactivación de la fosfatasa PP2A (Bos Cl, et al., 2006). Más tarde, Zhang W, et. al., en el 2009; encontraron que la PP2A puede también estabilizar a la β-catenina de manera directa.

Ellos encontraron que la subunidad PR55 (B55a), una subunidad regulatoria de la familia B de la PP2A, puede interactuar directamente con la β-catenina y con la proteína Axina para regular la fosforilación de la β-catenina y su degradación. Interesantemente, ellos también reportaron en experimentos con siRNA en la línea celular cancerosa de colon SW480 que la PP2A es esencial para la desfosforilación de la β-catenina (Zhang W, et al., 2009). Por lo que toda esta evidencia experimental indicaba que la PP2A puede jugar un rol positivo en la ruta de señalización Wnt a nivel del complejo de degradación de la β-catenina. Es importante señalar que todos los estudios mencionados fueron realizados empleando únicamente diferentes líneas celulares cancerosas.

También hemos demostrado aquí, que la subunidades PP2A-C y A interaccionan *in vivo* con la proteína β-catenina, sólo en las células cancerosas y que aunque la

actividad de la fosfatasa PP2A es baja en las células cancerosas, ésta parece ser crucial para mantener la actividad transcripcional de la β-catenina activa, así como la proliferación celular, favoreciendo el fenotipo maligno, mientras que en las células normales lo anterior no se observa (figura 8D y figura 9A y 9B).

Con respecto al mecanismo por el cual la pérdida de función de la isoforma Aβ contribuye con el desarrollo del tumor, se ha encontrado que varias mutaciones tumorespecíficas se han identificado en la subunidad Aβ las cuáles interrumpen la habilidad para formar holoenzimas con subunidades regulatorias específicas *in vitro* (Sablina AA, et al., 2010; Sablina AA, et al., 2007; Sablina AA, and Chen W, et al., 2007). Mientras que la subunidad Aa puede interaccionar con todas las subunidades regulatorias B, *la subunidad* Aβ es *incapaz* de *interaccionar con la familia* de subunidades *B/PR55*, y preferentemente se unen a la subunidad PR72 (Sablina AA, et al., 2007). Esto muestra que alteraciones en la PP2A-Aβ resultan en la disrupción de todos los complejos específicos de la PP2A, lidereando la pérdida de todos los complejos específicos formados por la holoenzima PP2A, por lo que en las células de cáncer de colon las subunidades funcionales están disminuidas ó sustancialmente reducidas y la actividad de la PP2A puede estar comprometida.

Adicionalmente a este efecto en la actividad total de la PP2A, Sablina et.al., Sablina AA y Chen W, et al., 2007 han identificado a la GTPasa pequeña Ral A como una proteína que interactúa específicamente con la isoforma PP2A-Aβ, pero no con PP2A-Aa Westermarck J, et al., 2008; Sablina AA, et al., 2007). Estos autores mostraron que Ral A silvestre pero no la Ral A con mutantes de fosforilación (S183A a S194A) median la transformación celular inducida por la supresión de la expresión de PP2A-Aβ, y las líneas celulares de cáncer de pulmón que tienen mutaciones en la PP2A-Aβ exhiben una fosforilación constitutiva elevada de la GTPasa Ral A. Sus observaciones sugieren que la acumulación de p-RalA en las células deficientes en PP2A-Aβ promueven la

transformación celular (Sablina AA. Et al., 2007). Consistente con esto, nosotros hemos mostrado en nuestro trabajo que las células de cáncer de colon, no expresan las proteínas de la isoforma Aβ (Aβ1 y Aβ2); por lo que todas exhiben una actividad muy elevada en la GTPasa pequeña Ral A, en comparación con las células no malignas de colon que expresan las proteínas de ambas variantes de splicing de la isoforma Aβ (figura 3A).

Tal como hemos mencionado, encontramos que en las células cancerosas la actividad de la fosfatasa PP2A, aunque está muy disminuída juega un papel positivo en el mantenimiento de la actividad de la ruta Wnt canónica, en las células cancerosas exclusivamente, adicionalmente, éstas sobre expresan a la subunidad Aa; ya que dicha isoforma de la subunidad A, es la única que podría formar complejos con la subunidad PR55a, y favorecer de manera directa la estabilización, por desfosforilación de la proteíina β-catenina, resultando favorecido nuevamente el fenotipo de las células malignas.

El hallazgo en la identificación de la expresión de la proteína de la variante Aβ2; en las células normales de colon, constituye una de las principales aportaciones del presente trabajo de tesis, de acuerdo con la evidencia experimental mostrada aquí encontramos que la expresión de la subunidad Aβ2 de la PP2A se pierde en las células cancerosas de colon, ya sea en las biopsias de tumores, como en las líneas celulares cancerosas analizadas y que el rescate de su expresión (figura 8B) produce efectos negativos en la actividad de la GTPasa pequeña Ral A y en la proliferación celular de las células cancerosas RKO (figura 8D); lo que constituye a nuestro entender como la primera referencia bibliográfica, de que la expresión de la proteína de la variante Aβ2 es necesaria y participa de manera directa en la regulación de la actividad de la GTPasa pequeña Ral A; como lo demostró Sablina AA et al., 2017 para el caso de la variante Aβ1. Por lo que nuestros resultados indican que la expresión de ambas variantes de la isoforma Aβ de la PP2A se observan de manera natural en las células del epitelio de colon normal y

que éstas actúan como supresores tumorales en el cáncer colorectal. Lo anterior apoya lo reportado en la bibliografía en relación a que la fosfatasa PP2A es considerada como un supresor tumoral, particularmente por las acciones mediadas por la subunidad Aβ asimismo muchas observaciones apoyan el papel de la PP2A como un regulador negativo en la tumorigénesis (Mumby M, et al., 2007).

En suma, nosotros hemos encontrado que en las células cancerosas la actividad residual de la PP2A presente principalmente a través de la isoforma Aa de la PP2A, juega un papel positivo en el mantenimiento de la actividad de la ruta Wnt canónica (figura 10), favoreciendo la proliferación celular (figura 11) a través de la regulación de la proteína βcatenina, y que la pérdida de las variantes de la isoforma Aβ, son las responsables del control de la actividad de la GTPasa pequeña Ral A, que al estar constitutivamente activa (p-RalA) ejerce sus acciones oncogénicas favoreciendo nuevamente el fenotipo maligno.

Queremos enfatizar que no existen referencias bibliográficas anteriores a nuestro artículo que permitan destacar la importancia que tiene en las células normales de colon, la expresión de las dos variantes proteícas de la isoforma Aß a niveles normales, como los observados en éste trabajo; por lo que la pérdida de la expresión de la proteína de la subunidad Aß2 de la PP2A podría servir como un biomarcador de malignidad en el epitelio del colon, sobre todo en pacientes con un riesgo elevado, por ejemplo aquellos que sufren enfermedad inflamatoria crónica en el sistema digestivo así como aquellos que padecen de colitis ulcerativa.

Finalmente y de manera importante podemos mencionar que estudios preclínicos han mostrado que la restauración farmacológica de la actividad supresora tumoral de la PP2A por diversos compuestos; (Kalev P, et al., 2011), son bastante prometedores para efectivamente antagonizar el desarrollo y progresión de diversos tipos de cánceres humanos.

10.0 CONCLUSIONES.

I.- Las diferencias de actividad de la PP2A, observadas en el presente trabajo entre las líneas celulares normales y las cancerosas son por sí mismas significativas, y podrían emplearse para evaluar la homeostasis celular del epitelio de colon; queda claro por toda la evidencia bibliográfica reportada al día de hoy, (Watt F.L., 2012; Kim et al., 2008) que una disminución significativa en la actividad de la PP2A, detectada en el tejido analizado, podría alertar al médico especialista para solicitar estudios más detallados para la detección temprana de posibles anormalidades de tipo benignas ó cancerosas.

II.- La disminución en la actividad de la PP2A observada tanto en las líneas celulares cancerosas como en biopsias tumorales de pacientes, podría ser uno de los primeros mecanismos de iniciación para el cáncer de colon; ya que la caída en la actividad supresora tumoral de la fosfatasa PP2A, se podría dar en regiones pequeñas, que abarquen sólo unas pocas criptas del epitelio de colon; y en donde una célula madre con mutaciones iniciadoras en la ruta wnt, como por ejemplo en la proteína APC; podrían iniciar una proliferación descontrolada, que se convierte en muy poco tiempo en un pólipo, ó adenoma benigno susceptible de seguir acumulando mutaciones que la dirijan hacia la transformación celular maligna y la progresión de la enfermedad.

III.- No se oberservan cambios de expresión en la proteína de la subunidad catalítica PP2A-C, entre las células de epitelio de colon normales y las líneas celulares de cáncer de colon estudiadas, tampoco se observaron cambios de expresión de la proteína de la subunidad catalítica entre las biopsias normales y las tumorales, como puede observarse en los western blots obtenidos, por lo que puede observarse la expresión proteíca de ésta subunidad no se ve afectada por el fenotipo celular. No obstante lo anterior, esto no significa que la proteína observada en las biopsias tumorales ó en las líneas celulares cancerosas sea funcional, es necesario realizar otro tipo de estudios para probar lo anterior; adicionalmente se pueden presentar modificaciones post-transcripcionales que afectan la actividad de la subunidad catalítica de la PP2A que tampoco fueron evaluados.

IV.- La expresión alterada de la proteína de la subunidad estructural PP2A-A, observadas tanto en la isoforma A α (sobre expresada), como la pérdida de expresión de la isoforma supresora tumoral A β y sus varientes de splicing A β 1 y A β 2, pueden ser un mecanismo potencial para sustentar la progresión tumoral de la enfermedad.

La sobreexpresión de la proteína de la PP2A-A α (que prácticamente sustenta la actividad residual de la PP2A observado en todas las células cancerosas) sugiere que ésta isoforma es muy importante para las células cancerosas, ya que regula positivamente la actividad transcripcional de la proteína β -catenina, lo que favorece la proliferación celular y además podría favorecer la formación de complejos con la isoforma de la familia B regulatoria; B55 α que puede desforforilar de manera directa a la proteína β -catenina y favorecer su traslocación al núcleo.

V.- Por otra parte la pérdida de expresión de las variantes proteicas de la isoforma Aβ1 y Aβ2 favorecen las acciones oncogénicas mediadas por la GTPasa pequeña Ral A, las cuales están directamente relacionadas con incrementos en la proliferación celular, y favorecen la migración de las células cancerosas, promoviendo la metástasis celular; ambos eventos favorecen la progresión de la enfermedad, a estadios más avanzados que hacen prácticamente imposible la erradicación de la misma y acortan dramáticamente las expectativas de vida de los pacientes que la padecen.

VI.- Incrementos en la expresión del RNAm de la Aβ2, en las células cancerosas RKO de carcinoma de colon, disminuyen la actividad de la GTPasa pequeña Ral A alrededor de un 50% y disminuyen la proliferación celular alrededor de un 40% en las células trasnsfectadas de RKO, destacando la importancia de ésta variante proteíca de la isoforma Aβ como supresora tumoral para cáncer de colon.

VII.- Las subunidades PP2A-AC que forman el core de la enzima fosfatasa, coinmunoprecipitan de manera recíproca con la proteína efectora de la ruta wnt canónica β-catenina, exclusivamente en las células cancerosas de colon analizadas; independientemente del compartimiento celular que ocupe dicha proteína. Mientras tanto en las células normales de epitelio de colon, el core de la PP2A-AC, se encuentra compartamentalizado en el núcleo de las células normales, y la proteína β-catenina ocupa otros compartimientos célulares, de manera que ambas proteínas colocalizan muy poco en las líneas celulares normales de colon.

VIII.- La proteína fosfatasa PP2A se comporta como un supresor tumoral en las células del epitelio de colon normal, ya que regula negativamente la proliferación celular (ver figura S1); mientras que en las células cancerosas de colon la PP2A se encuentra muy disminuída y la actividad residual, representada principalmente por una de las isoformas; la PP2A-Aa, regula positivamente la actividad transcripcional de la β-catenina y promueve la proliferación celular. Por lo que regula positivamente a la ruta wnt canónica.

IX.- La pérdida de expresión de la proteína Aβ2 en las líneas celulares de cáncer de colon, podría utilizarse como un posible marcador bioquímico de malignidad en el tejido del

colon. Que podría utilizarse para una detección temprana y en el tratamiento más eficaz de la enfermed.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

1.-Sería interesante evaluar los niveles de expresión de algunas de las proteínas inhibidoras de la actividad de la PP2A, tales como SET y $\alpha 4$, en el panel de las líneas celulares cancerosas; así como en biopsias de pacientes de tejido normal y canceroso. Ya que la sobreexpresión de alauna de las proteínas en cuestión podrían estar relacionadas con la caída tan significativa en la actividad de la PP2A observadas. Una expresión incrementada de SET ha sido observada en leucemias mieloides gobernadas por la actividad oncogénica de las tirosina cinasas, (Neavi, et al., 2005; Roberts, et al., 2010), así como, en algunos carcinomas sólidos de riñón y de colon (Carlson, et al., 1998; Jiang, et al., 2011). Por lo que la existencia de estos inhibidores endógenos de la actividad de la PP2A en los tumores de colon podría arrojar información importante de los mecanismos de inhibición endógena de la actividad de la enzima PP2A. Interesantemente, un péptido inhibidor de SET conocido como COG112, que disocia a la PP2A-C de SET, ha sido recientemente desarrollado y es capaz de incrementar la actividad de la PP2A en algunas líneas celulares de cáncer de mama (Switzer, et al., 2011), estudios similares podrían ser realizados en las líneas celulares de cáncer de colon, y ver su efecto en el desarrollo tumoral en modelos murinos.

2.-Otro aspecto intrigante a investigar más detalladamente, en estudios futuros sería la relativamente constante expresión de la subunidad PP2A-Cαβ, en las líneas celulares cancerosas de colon y las obtenidas en las líneas celulares normales; lo mismo pudo ser observado en las biopsias normales en comparación con las tumorales; lo cual no deja de sorprender, ya que estamos hablando de la subunidad catalítica de la enzima; lo anterior podría ser debido al tamaño limitado de las líneas y biopsias analizadas; interesantemente

varios artículos han sido reportados con resultados muy similares, es decir no observan cambios significativos en la expresión de la proteína de la PP2A-C. Por lo que, sería interesante evaluar, cambios post-traduccionales, como por ejemplo si hay cambios en la metilación de la Leu³⁰⁹ de la subunidad catalítica C; esta modificación postraduccional es importante porque reduce la capacidad de ésta, de unirse a las diferentes isoformas de la familia de subunidades B regulatorias; varias de las cuáles han sido identificadas de manera individual, como posibles supresores tumorales; por lo que limitaría la formación de dichos heterotrímeros. El papel que juega la metilación post-traduccional de la PP2A-C ha sido poco investigada, en términos generales por lo que convendría su evaluación en futuros trabajos. Mutaciones puntuales y deleciones en ambas isoformas Ca, Cβ son reportadas en el 5% de los casos de cáncer colorectal, por lo que este punto también debe considerarse en estudios futuros.

3.- Otro aspecto importante a revisar, es la relación de que incrementos en la actividad de la PP2A correlacionan con una reducción en la señal de AKT, la cuál puede ser revertida por la adición de ácido okadaíco; sugiriendo que la actividad de la PP2A por sí sola es responsable de la disminución en AKT; por lo que la activación de la PP2A a través de la inhibición de proteínas que inhiben a la PP2A como SET, puede ser una opción terapéutica para el tratamiento de otros tipos de cáncer, como el cáncer de colon, de pulmón y hepático. En relación con lo anterior, también se han reportado que mutaciones puntuales en PP2A-Aα, están relacionados con incrementar la proliferación celular por ésta vía; como ya lo hemos mencionado nosotros encontramos una sobre expresión de la isoforma Aα, en todas las líneas celulares cancerosas analizadas. La PP2A es un regulador negativo de ésta ruta de señalización a diferentes niveles; PP2A-Bα y PP2A-Bδ regulan esta ruta de señalización al nivel de Raf, MEK y ERK, mientras que las isoformas de la familia

PP2A-B' particularmente hacen blanco en ERK, siendo la isoforma PP2A-B'Y la que ha mostrado regular la actividad de ERK a través del gen de respuesta inmediata X-1(IEX-1). Estos resultados sugieren que la PP2A puede contribuir al desarrollo y progresión del cáncer de colon, a través de mutaciones en la isoforma Aa, así como, por cambios en la expresión de las subunidades B regulatorias mencionadas; a través de la regulación positiva de la ruta de señalización de ERK. Por lo que, futuros experimentos que diluciden la composición aminoacídica de la proteína de la isoforma Aα sobre expresada en las células cancerosas de colon, y la medición de la expresión de algunas isoformas de las subunidades B regulatorias, permitiría; la identificación de mutuciones puntuales que podrían afectar la actividad. Asimismo, el uso de inhibidores en futuros experimentos, contra proteínas específicas en esta ruta de señalización ERK; pueden aclarar el papel que juega la sobreexpresión de la PP2A-Aα en las células cancerosas.

4.- Se sabe también que la PP2A juega un papel negativo en la migración celular, particularmente a través de la inhibición de la GTP asa Rac 1 de la familia de Rho. Rac 1 controla la formación de contactos focales en el frente migratorio de la célula, las cuáles son similares a largas adhesiones focales, con fibras adicionales de F-actina, que son reguladas por Rho; la PP2A promueve la formación de estas largas adhesiones focales por la desfosforilación directa de las integrina β1, permitiendo que éstas se unan a las fibras de actina (Mulrooney, et al., 2000). La PP2A también mantiene a la molécula adaptadora paxillina en un estado desfosforilado para prevenir la migración celular (Ito, et al., 2000; Jackson, et al., 2002; Young, et al., 2003). Una posible teoría para el papel de la PP2A en la migración celular, y adhesión, es que la PP2A mantiene las adhesiones focales focales en las células no migrantes, pero en las células migrantes, la PP2A es inhibida para

permitir que Rac1 forme nuevos contactos focales. Sería interesante evaluar algunos de éstos aspectos en las células de cáncer de colon.

5.- Un aspecto controversial de nuestro trabajo fue la detección por western blot, de dos bandas para la subunidad PP2A-A; en las células normales de colon, así como en las bipsias de tejido normal: la primera banda (65 KDa) es más intensa que la segunda; y puesto que el peso molecular de la isoforma $A\alpha$ es de 65 kDa lo cuál es muy cercano a la masa molecular de la variante A β 1 de 65 kDa de la isoforma A β de la PP2A; suponemos que en las células de colon normal ambas bandas se sobreponen; la segunda banda tiene un peso de 75 kDa y presumiblemente corresponde a la variante AB2 de la PP2A. Ésta banda se pierde en las células cancerosas y biopsisas tumorales de colon. Desgraciadamente no se han desarrollado a la fecha anticuerpos comerciales que distingan a la isoforma Aa de las variantes de splicing de la isoforma A β , ya que ambas isoformas tienen una enorme homología (sólo difieren en el extremo –NH2 en 12 aa, y en el extremo –COOH, por 66 aa.). Por lo que nosotros nunca pudimos identificar con el uso de los anticuerpos comerciales existentes, que las bandas detectadas por western blot efectivamente correspondan con las isoformas antes mencionadas. Por lo que, la identificación de estas proteínas usando otras técnicas tales como la electroforesis en gel 2D (bidimensional), seguido de la identificación de las bandas por espectrometría de masas puede ser de interés para aclarar éste punto.

6.- Para corroborar si la reducción en la expresión de las subunidades PP2A-Aβ1 y Aβ2 en las líneas celulares cancerosas de colon fue debido a cambios en la regulación de la transcripción del gen, considero que sería necesario evaluar la expresión del RNAm, pero por PCR en tiempo real, esto permitiría saber con precisión si los niveles de expresión de la proteínas Aβ1 y Aβ2, concuerdan con los valores observados para el RNAm, ó si existe una supresión post-traduccional de estas subunidades y si ésta supresión podría tener alguna relación con el contexto celular de la ruta wnt (normal ó mutada) presente en las células cancerosas evaluadas.

7.- Con la finalidad de determinar algunas de las rutas de señalización de la PP2A que pudieran ser alteradas por la supresión de la variante proteica Aβ2 de la PP2A; y sabiendo que algunos de los genes blancos de la PP2A tales como AKT, ciclina A, D1, y c-myc; son regulados negativamente por la fosfatasa, se podrían analizar los lizados completos obtenidos de las células SW480; y usando técnicas de electroforesis bidimensional y de espectrometría de masas; identificar la expresión alterada de numerosas proteínas; así como la detección de interacciones con proteínas blanco diferentes en las células cancerosas, en comparación con lo observado en las líneas celulares normales 112CoN ó IEC-18.

12. REFERENCIAS

Baharians Z, Schönthal AH. Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. J Biol Chem 1998; 273:19019-19024.

Baker, N. et al. Cryp stem cells as the cells-of-origen of intestinal cancer. Nature. 2009; 457: 608-611.

Berry M, Gehring W. Phosphorylation status of the SCR homodomain determines its functional activity: Essencial role for protein phosphatase PP2A. EMBO J. 2000; 19(12):2946-2957.

Bienz, M., Clevers, H. Linking coleorectal cancer to Wnt signaling. Cell 2000; 103: 311-320.

Bononi A, Agnoletto C, DeMarchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P. Protein Kinases and Phosphatases in the Control of Cell Fate. Enzyme Res 2011; 329098.

Bos CL, Kodach LL, van den Brink GR, Diks SH, van Santen MM, Richel DJ, Peppelenbosch MP, Hardwick JCH. Effect of aspirin on the Wnt/b-catenin pathway is mediated via protein phosphatase 2A. Oncogene 2006;25:6447–6456.

Calin GA, di Lasio MG, Caprini E., Vorechovsky I., Natali PG, Sozzi G, Croze CM, Barbanti-Brodano G., russo G., Negrini M. Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and Beta (PPP2RiB) isoforms of the subunit A of the Serine-Threonine phosphatase 2A in human neoplasm. Oncogene 2000;19(9):1191-1195.

Carlson, S. G., E. Eng. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. J Am Soc Nephrol. 1998;9(10): 873-880.

Clevers, H. Wnt breakers in colon cancer. Cancer cell 2004;117:5-7.

Colella S, Ohgaki H, Ruediger R, Yang F, Nakamura M, Fujisawa H, Kleihues P, Walter G. Reduced expression of the Aalpha subunit of protein phosphatase 2A in human gliomas in the absence of mutations in the Aalpha and Abeta subunit genes. Int J Cancer 2001;93:798–804.

Creyghton MP, Roel G, Eichhorn PJ, Hijmans EM, Maurer I, Destree O, Bernards R. PR72, a novel regulator of Wnt signaling required for Naked cuticle function. Genes Dev 2005; 19: 376–86.

Chen W, Arroyo JD, Timmons JC, Possemato R and Hahn WC. Cancerçassociaged PP2A $A\alpha$ subunits induce functional haploinsufficiency and tumorigenicity. Cancer Res 65 (18): 8183-8192 (2005).

Eichhorn PJA, Creyghton MP, Bernards RAL. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. Biochim Biophys Acta 2009; 1795: 1–15

Estelle Sontag E. Protein phosphatase 2A: The Trojan horse of cellular signaling. Cell Signaling; 2001, 13 (1) 7-16, Review.

Flegg CP, Sharma M, Medina-Palazone C, Jamieson C, Galea M, Brocardo MG., Mills K, Henderson BR., Nuclear export and centrosome targeting of the protein phosphatase 2^a subunit B56 alpha: role of B56 alpha in nuclear export of the catalytic subunit, J. Biol. Chem. 285 (2010) 18144-18154.

Gotz J, Probst A, Mistl C, Nitsch RM, Ehler E. Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development. Mech Dev 2000; 93: 83–93

Green DD, Yang SI, Mumby MC. Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1987; 84: 4880-84.

Guergnon AN, Guergnon J, Galioot A, Falonga PB. Targetting of PP2A enzymes by viral proteins and cancer signaling. Med Sci (Paris), 2011; 27 (12) 1106-11.

Ito, A., T. R. Kataoka. A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. Embo J; 2000, 19(4): 562-71.

Jackson, J. L. and M. R. Young. Protein phosphatase-2A modulates the serine and tyrosine phosphorylation of paxillin in Lewis lung carcinoma tumor variants. Clin Exp Metastasis; 2002, 19(5): 409-15.

Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem. J. 2001; 353: 417-39.
J. Zhou, H.T. Pham, R. Ruediger, G. Walter, Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution, Biochem. J. 369 (2003) 387–398.

Julien Guergnon, Alphonse García; PP2A tergeting by viral proteins: Biochimica et Biophysica Acta, 2011

Jiang, Q., C. Zhang. The set gene is a potential oncogene in human colorectal adenocarcinoma and oral squamous cell carcinoma. Mol Med Report; 2011, 4(5): 993-9.

Kalev P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2011; 11: 38-46.

Kallings G. A functional role for the B-56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl-2 phopsphorylation status and function. J. Biol. Chem, 2002; 21, 277(25) 22847-52.

Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM. Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in Xenopus, EMBO J 2001; 20: 4122–31.

Logan, C.Y and Nusse, R. "The Wnt signaling pathway in development and disease". Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20: 781-810 (2004).

Mirzoeva, O. K., D. Das. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. Cancer Res; 2009, 69(2): 565-72.

108

Mumby M. PP2A: Unveiling a Reluctant Tumor Suppressor. Cell 2007; 130: 21-24.

Mulrooney, J., K. Foley. Phosphorylation of the beta1 integrin cytoplasmic domain: toward an understanding of function and mechanism. Exp Cell Res; 2000, 258(2): 332-41.

Neviani, P., R. Santhanam. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABLregulated SET protein. Cancer Cell, 2005; 8(5): 355-68.

Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigan DL, Roberts TM. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A, *Cell* 1990; 60: 167–76.

Park, C. C., H. Zhang. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. Cancer Res, 2006; 66(3): 1526-35.

Ray RM, Bhattacharya S, Johnson LR. Protein Phosphatase 2A regulates apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2005; 280: 31091-100.

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

Roberts, P. J. and C. J. Der . Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. Oncogene, 2007; 26(22): 3291-310.

Rubinfeld B. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. Science, 1997; 21, 275(5307) 1790-2.

Ruediger R, Pham HT, Walter G (2001a) Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene. Oncogene 2001: 1892–1899.

Ruediger R, Pham HT, Walter G (2001b) Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A alpha subunit gene. Oncogene 20 (2001): 10–15.

Ruediger R, Fields K, Walter G. Binding specificity of protein phosphatase2A core enzyme for regulatory B subunits and T antigens. J. Virol. 1999; 73: 839–42. Sablina AA, Hahn WC. The role of PP2A A subunits in tumor suppression. Cell adhesion & migration, 2007; 1: 140–41.

Sablina AA, Chen W, Arroyo JD, Corral L, Hector M, Bulmer SE, DeCaprio JA, Hahn WC. The tumor suppressor PP2A Aβ regulates the RalA GTPase. *Cell* 2007; 129: 969–82.

Sablina AA, Hector M, Colpaert N, Hahn WC. Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation. Cancer Res 2010; 70: 10474–84.

Schonthal AH. Role of serine/treonine protein phosphatase 2A in cancer. Cancer Lett. 2001. Sep 10;170(1):1-13.

Serra, V., M. Scaltriti. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. Oncogene, 2011; 30(22): 2547-57.

Strack S, Cribbs JT, Gómez L. Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival, J. Biol. Chem. 279 (2004) 47732-47739.

Sangiorgi, E and Cappecchi, M.R. Bmi 1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. Nat. Genet. 2008, 40, 915-929.

Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. Science 1999; 283: 2089–91.

Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer, Cancer Lett. 2013; 335: 9-18.

Strack S, Cribbs JT, Gomez L. Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival, J Biol Chem 2004; 279: 47732–739.

Suzuki, K. and K. Takahashi . "Induction of E-cadherin endocytosis by loss of protein phosphatase 2A expression in human breast cancers." Biochem Biophys Res Commun, 2006; 349(1): 255-60.

Switzer, C. H., R. Y. Cheng. Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. Oncogene 2011

Takagi Y, Futamura M, Yamaguchi K, Aoki S, Takahashi T, Saji S. Alterations of the PPP2R1B

gene located at 11q23 in human colorectal cancers. Gut 2000; 47: 268–71.

Tamaki M, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. PPP2R1B gene alterations inhibit interaction of PP2A-Abeta and PP2A-C proteins in colorectal cancers. Oncol Rep 2004; 11: 655–59.

Ten Klooster et al. "Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET." EMBO J 26(2): 336-45.

Virshup DM, Shenolikar S. From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. Mol Cell 2009; 33: 537-45.

Wang Siqing Steven, Esplin Erward D, Li Jian Li, Huang Liying, Gazdar Adi, Minna John, Evans Glen A. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. Science 1998; 282: 284–87.

Watt Frances Laurent, B.Biomed Sci (Hons); Tesis, "The role of protein phosphatase 2A as a tumor suppressor in breast cancer, 2012.

Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. Trends in Molecular Medicine 2008; 14: 152-60.

Westermarck J and Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in trnsformation. Trends in Molecular Medicine 14 (4) 152-160 (2008).

Xing Yongna, Xu Yanhui, Chen Yu, Philip D, Jeffrey, Yang Chao, Zheng Lin, Zhu Li, Stefan Strack, Jeffry B, Stock, and Yigong Shi. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. Cell 2006; 127, 341-353.

Yamamoto H, Hinoi T, Michiue T, Fukui A, Usui H, Janssens V, Van Hoof C, Goris J, Asashima M, Kikuchi A. Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. J Biol Chem 2001; 276: 26875–882.

Yokoyama, N. and Malbon, C. 2007. Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt 3a/β-catenin signaling. J. Mol. Signaling 2: 12.

Young, M. R., S. W. Liu. Protein phosphatase-2A restricts migration of Lewis lung carcinoma cells by modulating the phosphorylation of focal adhesion proteins. Int J Cancer; 2003, 103(1): 38-44.

Zhang W, Yang J, Liu Y, Chen X, Yu T, Jia J, Liu C. PR55 α , a regulatory subunit of PP2A, specifically regulates PP2A-mediated β -catenin dephosphorylation. J Biol Chem 2009; 284: 22649–656.

Zhou J, Pham HT, Ruediger R, Walter G. Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. Biochem J 2003; 369: 387–98.

AGRADECIMIENTOS

DEDICO ESTA TESIS A MI MAMI:

MA. DEL CARMEN ALDARÍZ ALARCÓN

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A MIS MAESTROS Y TUTORES DE LA UNAM Y DEL IPN

2015

Protein Phosphatase 2A Is Essential to Maintain Active Wnt Signaling and its Aβ Tumor Suppressor Subunit Is not Expressed in Colon Cancer Cells

M. Carmen Figueroa-Aldariz,¹ M. Cristina Castañeda-Patlán,¹ Paula Santoyo-Ramos,¹ Alejandro Zentella,² and Martha Robles-Flores¹*

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F., Mexico

²Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico D.F., Mexico

Canonical Wht signaling is altered in most cases of colorectal cancer. Experimental evidence indicates that protein phosphatase 2A (PP2A) may play either positive or negative roles in Wnt signaling but its precise in vivo functions remain elusive. In this work, using colon cultured cell lines we showed that basal PP2A activity is markedly reduced in malignant cells compared to non-malignant counterparts. We found that whereas normal or cancer cells displaying not altered Wht signaling express mRNAs coding for PP2A-A scaffold α and β isoforms, cancer cells which have altered Wnt signaling do not express the Aβ isoform mRNA. Remarkably, we found that the Aβ protein levels are lost in all colon cancer cells, and in patients' tumor biopsies. In addition, all cancer cells exhibit higher levels of RalA activity, compared to non-malignant cells. Rescue experiments to restore AB expression in malignant RKO cells, diminished the RalGTPase activation and cell proliferation, indicating that the AB isoform acts as tumor suppressor in colon cancer cells. Reciprocal coimmunoprecipitation and immunofluorescence studies showed that the PP2A-C and -Aa subunits, expressed in all colon cells, interact in vivo with β-catenin only in malignant cells. Selective inhibition of PP2A did not significantly affect cellular apoptosis but induced dose-dependent negative effects in β-catenin-mediated transcriptional activity and in cell proliferation of malignant cells, indicating that the residual PP2A activity found in malignant cells, mediated by -C and $A\alpha$ core subunits, is essential to maintain active Wnt signaling and cell proliferation in colon cancer cells. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: protein phosphatase 2A; wnt signaling; colon cancer; tumor suppressor; PP2A-A subunit

INTRODUCTION

Protein phosphatase 2A (PP2A) is the serine/threonine phosphatase that accounts for the majority of this phosphatase activity in mammalian cells and has been implicated in the regulation of a wide diversity of signaling pathways [1] In fact, PP2A refers to a large family of heterotrimeric complexes. The core enzyme is a dimer consisting of a 36-kD catalytic C subunit (PP2A-C) and a 65-kD scaffolding A subunit also known as PR65 [2]. In mammals, two distinct genes encode closely related versions of the PP2A -A (Aα and A β) and C (C α and C β) subunits [1,2]. The active core of PP2A interacts with a wide variety of regulatory subunits (B subunits) expressed in specific tissues to generate at least 100 different heterotrimeric PP2A holoenzymes that regulate both the substrate specificity, the localization and the functions of individual forms [1-4]. Four unrelated families of B subunits have been identified to date: B/B55/PR55, B'/B56/ PR61, B"/PR72/PR130, and B"'/ PR93/PR110/Striatin [2]. Since both C and B subunits bind to the A subunit, the normal function of the scaffold A subunit plays a critical role in the assembly of either core enzyme or holoenzyme of PP2A to govern its specific activity. Single amino acid alterations in either $A\alpha$ or Aβ subunits disrupt the binding of specific B subunits,

suggesting that the A subunits regulate PP2A holoenzyme composition [5].

Initial evidence for a negative role for PP2A in carcinogenesis came from the observation that a potent inhibitor of PP2A, okadaic acid, is a tumor promoter [6,7]. Indeed, the dysfunction of particular PP2A complexes regulates specific phosphorylation events necessary for cancer initiation. Moreover, the disruption of functional PP2A complexes also induces transformation [2,7]. Similarly, it was established that the SV40 small tumor antigen, which is required for cellular transformation in human cells, can alter PP2A activity by displacing the regulatory B subunit from the holoenzyme complex [8,9]. Consistent with all these experimental evidence, a variety of mechanisms

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Grant sponsor: DGAPA-UNAM; Grant numbers: IN226111; IN215514; Grant sponsor: CONACYT; Grant number: CB2011-151731

^{*}Correspondence to: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Av. Universidad 3000, C.U., 04510 México, D.F., México

Received 3 July 2014; Accepted 1 August 2014 DOI 10.1002/mc.22217

for inhibiting PP2A are present in transformed cells and mutations of both structural and regulatory subunits have been shown to contribute to different subsets of human cancers by distinct mechanisms [10].

PP2A complexes have been involved in the regulation of Wnt signaling pathway and there is evidence that PP2A can play both a positive and antagonistic roles in this pathway targeting different components and utilizing several regulatory B subunits [11]. However, the relative contributions of the various PP2A complexes in regulating Wnt-β-catenin pathway in specific human cancers remain unknown and as yet, only β -catenin has been identified for the phosphatase activity of PP2A in this pathway [12]. Here, we have investigated how PP2A participates in canonical Wnt signaling using human colon cultured cell lines. We have found that despite the PP2A activity in colon cancer cells is very reduced compared with the activity found in normal cells, PP2A -C and A α subunits play a critical role to maintain β -catenin transcriptional activity in tumor cells, particularly in those who have altered the Wnt pathway. We also found that the scaffold $A\beta$ subunit of PP2A acts as tumor suppressor in colon epithelial cells and its expression is completely lost in constitutively active β-catenin colon cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies

The antibodies against PP2A-A α/β (sc-15355), PP2A–C α/β (sc-81603), PP2A–B56 α (sc-56954), and β -catenin (sc-7963) were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Goat antimouse and anti-rabbit IgG-horseradish peroxidaseconjugates were from Pierce (Rockford, IL). Endothall was obtained from Calbiochem/Merck (Darmstadt, Germany). The Annexin-V FLUOS Staining Kit from Roche Applied Science (Mannheim, Germany) was used for the detection of apoptosis. RNA was reversetranscribed using SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). All other chemicals were reagent grade.

Ethics Statement

Biopsies from healthy patients or with colorectal carcinoma were taken in routinely colonoscopy exams. This work was approved by the Ethical Committee of Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico. A written informed consent was obtained from all patients.

Plasmids

The pTOPFlash and pFOPFlash reporter plasmids were obtained from Upstate Biotechnology. The plasmids encoding human PP2A-A β transcript variant 2 (pCMV6-XL5) and void control (pCMV6-ZL5) were obtained from Origene Technologies Inc (Rockville, MD).

Cell Culture

RKO (human colon carcinoma), HT29 or SW480 (human colorectal adenocarcinoma) malignant cells and non-malignant IEC-18 (non-transformed rat epithelial intestinal crypt cells) and 112CoN (human colon) cells were all obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and grown as described previously [13]. The human cell lines were authenticated by DNA profiling using short tandem repeat (STR) analysis on an AmpFISTR[®] IdentifilerTM PCR Amplification System at "Instituto Nacional de Medicina Genómica" (INMEGEN), Mexico, D.F.

PP2A Activity Assay

Non-malignant or malignant cells were washed twice with PBS and homogenized in phosphatase extraction buffer containing 20 mM imidazole-HCL, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.0, supplemented with 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, antipain, and trypsin inhibitor, 1 mM benzamidine, and 1 mM PMSF. Free phosphate was removed from cell lysates by Sephadex G-25 column chromatography (Amersham/GE Healthcare Biosciences, Piscataway NJ). Then, phosphatase activity was determined by measuring the generation of free phosphates from the phosphopeptide (K-R-pT-I-R-R) using the malachite green-based phosphatase assay kit (Upstate Biotechnology Inc., Temecula, CA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, sample lysates were incubated with 100 µM of phosphopeptide for 30-60 min at room temperature. The reaction was stopped by the addition of malachite green solution. After 15 min of color development, the release of phosphate was quantified by measuring the absorbance at 650 nm, and the amount of phosphate released was calculated from a standard curve. Phosphatase activity was defined as pmol of free PO₄ generated/µg protein/min. Because this assay cannot fully differentiate between PP1 and PP2A activity, the specificity of the assay was validated using 900 nM of the potent PP2A-specific inhibitor endothall [14-17].

Luciferase Reporter Gene Assay

Transfection was carried out with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cells were transiently transfected with 1 μ g of the reporter plasmid (pTOPFlash) or control plasmid (pFOPFlash) and with 0.05 μ g of the pRL luciferase plasmid (transfection control). 24 h after transfection the cells were incubated in the absence or presence of endothall (1, 10, and 100 μ M) for 6 h. In the case of RKO cell line, transfected cells were serum-starved (2% instead of 10%) for 10 h, and treated with Wnt3a (100 ng/ml, Chemicon) for 8 h before the incubation in the absence or presence of

endothall for 6 h. The luciferase reporter activity was measured in cell lysates using the Dual luciferase assay kit (Promega; Madison, WI). The activity was normalized with respect to the activity of *Renilla luciferase* or with respect to the protein content in each sample.

Western Blot Analysis

Samples of protein (50–100 μ g), were separated by 10% or 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) followed by electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) as described in a previous report [13]. An actin antibody was used to control for equal loading.

Immunofluorescence Analysis

All cells were grown on coverslips. Then they were washed with PBS, fixed with methanol at -20° C during 10 min, permeabilized with 0.3% Triton X-100, and blocked with 4% IgG-free BSA (Research Organics; Cleveland, OH) for 1 h. RKO or SW480 cells were washed with PBS, fixed in ice-cold acetone for 5 min, washed in PBS, and blocked with 1% IgG-free BSA for 1 h. All cells were incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies and processed for immunofluorescence as described previously [13].

RT-PCR

Total RNA was isolated from cells using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) and was reverse transcribed using SuperScript One-Step RT–PCR with Platinum Taq (Invitrogen) using the following gene-specific primers: human PP2A-A alpha Fw: 5' GGGAAGGAGTGGGCCATGCC; human PP2A-A alpha rev: 5' TCTTCCAGCATCAGGCGAGAGACA. Human PP2A-A beta var1/2 Fw: 5' CAAAGTGTTAG-TAATGGCAAATGATCC. Human PP2A-A beta var1 Rev: 5' TCCGCTCCTCATTATGCCAATGCA. Human PP2A-A beta var2 Rev: 5' TAGCTTCCTCAGCCTTT-GTGCCAC. GAPDH was reverse transcribed under the same conditions to be used as control, with the following primers: Fw 5' CATCTCTGCCCCTC-TGCTGA; Rev 5'GGATGACCTTGCCCACAGCCT.

Immunoprecipitation

The cells were homogenized in ice-cold RIPA buffer containing protease inhibitors and protein phosphatase inhibitors. The protein concentration was measured utilizing a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad). Aliquots of these extracts (1 mg/ml) were incubated overnight at 4°C with $2 \mu g/ml$ of primary antibody. Then, the samples were mixed with protein A-sepharose for 2 h. Immune complexes were washed twice with buffer A (50 mM Tris-HCl, 0.6M NaCl, pH 8.3) and once with buffer B (50 mM Tris HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl) containing protease and phosphatase inhibitors.

Cell Proliferation Assay

RKO cells were stable transfected with $1 \mu g$ of plasmid encoding human PP2A-A β transcript variant 2 (pCMV6-XL5- A β 2) or with void control (pCMV6-ZL5). Cell proliferation was measured in these cells with the CellTraceTM CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) cell proliferation kit (Molecular Probes, Invitrogen). Stable transfected RKO cells were labeled with 7 μ M CFSE in PBS 0.1% BSA at 37°C for 10 min and then cultured in vitro. After appropriate time intervals, the cells were trypsinized, washed in PBS 4% FBS and fixed with 4% PFA. The cells were analyzed by flow cytometry with logarithmic detection of green fluorescence (CFSE).

Viability Assay

The cell viability was measured with the 3-(4,5dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. RKO cells were grown and serumstarved for 8 h; then, recombinant mouse Wnt3a (100 ng/ml) was added to the medium to stimulate cells for 24, 48 or 72 h in the absence or presence of 1, 10 or 100 μ M of endothall. In the case of SW480 cells, they were grown and then incubated in the absence or presence of endothall for 24, 48 or 72 h. Both cell types were also incubated with MTT (0.5 mg/ml) during the last 3 h of each incubation period at 37°C. The reaction was stopped adding 0.1 ml of acid isopropanol to each well. Formazan salts were dissolved and spectrophotometrically quantified at 570 nm.

Apoptosis

The cells were seeded into 24-well plates at a density of $1.5\times10^5\,$ cell per well. Twenty-four hours after seeding, the cells were incubated in the absence or presence of 1 μM endothall, or 120 μM cyclosporine or 1 mM H₂O₂ for 12 h. Apoptosis was measured by flow cytometry using the Annexin V- FITC kit (Roche) as recommended by the manufacturer's instructions. Necrosis was measured by propidium iodide (PI) permeability in the absence of detergent.

Ral Activation assay

The RalA activation status in cells was analyzed using RalA activation kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) according to manufacturer's instructions. Briefly, cell lysates (1 mg) were incubated with $20 \,\mu$ l of RalBP1 agarose for 1 h at 4°C. The beads were washed, and the samples were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with an anti-RalA antibody (BD Biosciences, San Jose CA).

Statistical Analysis

The data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical analysis of the data

was performed using the Student's *t* test. A value of P < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Total PP2A Activity Is Diminished in Colon Cancer Cells Compared With the Activity Found in Non-Malignant Cells

Inhibition of PP2A activity has been identified in many cases as a prerequisite for the transformation of human cells [7,8]. Thus, we first examined the basal PP2A activity found in colon cancer cells in comparison with the activity found in non-malignant ones using different cell lines with either normal or altered Wnt signaling genetic context: RKO cancer cells express wild-type APC protein and exhibit normal Wnt signaling, whereas HT-29 and SW480 malignant cells express truncated versions of APC, that results in altered Wnt signaling [13]. In vitro PP2A activity was then measured in whole cell lysates by the malachite green-based phosphatase assay kit as described in Materials and Methods section. Since this assay cannot fully differentiate between PP1 and PP2A activity, the specificity of the assay was demonstrated using 900 nM of the potent PP2A-specific inhibitor endothall because it is more potent against PP2A $(IC_{50} = 90 \text{ nM})$ than PP1 $(IC_{50} = 5 \mu \text{M})$, instead of using okadaic acid, whose IC50 for PP2A (0.1-0.3 nM) is very close to its IC50 for PP1 (15-50 nM) [14-17]. As can be observed in Figure 1, all malignant cells examined showed diminished total PP2A activity compared with the activity found in



Figure 1. Total PP2A basal activity is diminished in colon cancer cells compared with the activity found in non-malignant cells. The phosphatase activity was measured in cell lysates obtained from non malignant (112CoN and IEC-18) or malignant cells (RKO, HT-29 or SW480) as described in Materials and Methods by the malachite green assay, in the absence (control) or presence of 900nM endothall (inhibitor). The release of phosphate was quantified spectrophotometrically at 650 nm. Total amounts, in picomoles, of formed phosphate were calculated from a phosphate standard curve. Phosphatase activity was defined as pmol free PO₄ generated/µg protein/min. The results represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01.

of normal cells ranged approximately from twofold bigger with respect to the PP2A activity found in cancer RKO and HT-29 cells, to sixfold bigger than the PP2A activity found in SW480 cancer cells. Interestingly, as shown in Figure 1, the main Ser/ Thr phosphatase activity found in all colon cell lines can be attributed to PP2A and not to PP1, because the activity was severely blocked by endothall, which specifically inhibits PP2A [14–17].

112CoN and IEC-18 non-malignant cells. The activity

The Expression of Scaffold A Subunit β Isoform Is Lost in Malignant Cells at the Protein Level but Varies at mRNA Level

To investigate if the PP2A low activity displayed by colon cancer cells was due to a change in subunits expression levels with respect to non-malignant cells, we first examined the expression profile of PP2A core subunits C and A. In mammals, two distinct genes encode closely related versions of the PP2A-A (A α and A β) and C (C α and C β) subunits [2,4,6]. As can be observed in Figure 2A, there were no differences in PP2A-C subunit expression levels between malignant and non-malignant colon cell lines, neither between normal and tumor biopsies obtained from patients. However, when we analyzed the expression levels of PP2A-A subunits, we found clear differences between normal and tumor cells: non-malignant cells or normal biopsies exhibited two bands presumably corresponding to the A α and A β isoforms, whereas malignant cells exhibited only the lower molecular mass band that appeared abundantly expressed (Figure 2B). The antibody employed to detect PP2A-A subunits is able to detect both α and β isoforms; therefore, to investigate which A subunit isoform is not expressed in colon malignant cells, we examined the expression levels of $A\alpha$ and $A\beta$ mRNAs by PCR. Five transcript variants encoding PP2A-AB isoform have been reported (NCBI Reference Sequences NM_002716.4, NM_181699.2, NM_181700-1, NM_ 001177562.1, and NM_001177563.1) corresponding to the wild type and to aberrant transcripts produced by cancer-associated abnormal RNA splicing. Since three out of the five transcript variants encode proteins shorter than the wild type (variants 3, 4, and 5), and we did not observe by Western blot smaller sizes than the expected ones (Figure 2B), we analyzed the mRNA expression of the $A\alpha$ subunit and AB variants 1 and 2. Supplemental Figure S1 shows the aminoacid sequence of the AB variants analyzed, and as can be seen in bold letters, they differ at their carboxyl termini, corresponding to their PP2A-C subunit binding sites. The AB variant 2 has the last four aminoacids changed compared to the AB variant 1, and has an additional 66 amino acid sequence at this position. According to the primary sequence reported for each A subunit isoform, A α and A β variant 1 would have similar size (65 kDa and 66 kDa, respectively) and the AB variant 2 would have 74 kDa



Figure 2. The expression of scaffold A subunit β isoform is lost in malignant cells at the protein level but varies at mRNA level. (A, B). Expression levels of PP2A-C subunit (panel A) and PP2A-A subunit (panel B) in colon cell lines and patients' biopsies. Samples of cell extracts obtained from non-malignant IEC-18 and 112CON cells, from malignant RKO and HT-29 cells or from human biopsies (n = 5 for normal and n = 5 for tumors) were subjected to 10% SDS-PAGE followed by Western blotting using antibody against PP2A-C(α/β) or against PP2A-A(α/β) and developed with a horseradish peroxidase conjugated second antibody. An actin antibody was used as control for equal loading. Densitometric analysis was performed to estimate the

levels of PP2A subunits expression in colon cell lines. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations in case of cell lines, or representative of three out of five human biopsies. (C). Total RNA was isolated from the indicated colon cell lines or from human colon biopsies (n = 5 for normal and n = 5 for tumors) using Trizol reagent to perform RT-PCR using gene specific primers as described in the Materials and Methods section. The data are representative of three independent experiments, preparations in case of cell lines, or representative of two out of five human biopsies.

molecular mass. Thus, our Western blot results indicated that the $A\beta$ variant 2 was lost in malignant cells. To confirm this, we then performed RT–PCR analysis using specific oligonucleotides for each



Molecular Carcinogenesis

A-isoform. We found that all colon cell lines and patient's biopsies, normal or malignant, express the A α and A β variant 1 mRNAs (Figure 2C). Remarkably, whereas the expression of the AB variant 2 mRNA was found in every non-malignant cell (from cell lines or patient's biopsies), there were clear differences in its expression levels among colon cancer cells: it only was present in those cells exhibiting normal Wnt signaling, such as RKO cancer cells, but was diminished (HT-29) or lost in colon cancer cells that have altered Wnt signaling, particularly in SW480 cells, which exhibit constitutively active canonical Wnt signaling (Figure 2C). The RT-PCR product corresponding to the AB variant 2 mRNA from RKO cells was purified and sequenced. The results confirmed that it encodes for the A β variant 2 (shown in Sup. Figure S1). Taken together, our data indicate that the expression of the A β 2 subunit is suppressed in cancer cells, either only at the protein level (RKO cells) or both at the mRNA and protein levels.

The Loss of Expression of the Scaffold A β Subunit Correlates With High Ral-GTpase Activity in Cancer Cells

Recent work has identified the small RalA-GTPase as a protein that interacts with PP2A-A β but not with A α subunits [18]. PP2A-A β -containing complexes dephosphorylate RalA at serines 183 and 194, and this dephosphorylation downregulates RalA activity [7,10,18]. Therefore, we examined the RalA-GTPase activity status in the colon cell lines. As can be observed in Figure 3A and consistent with the loss of A β protein expression observed in colon malignant cells, we found that cancer cells exhibit much higher

Figure 3. Loss of expression of the A β subunit correlates with the presence of high activated Ral- GTPase in colon cancer cells and A β 2 expression rescue diminishes activated Ral-GTPase and cell proliferation. (A) RalA activation status (GTP-bound Ral) was determined by RalA-BP1 binding assay in RKO and SW480 malignant cells compared with 112CoN and IEC-18 non-malignant cells. Cell lysates (1 mg) were incubated with 20 μ l of RalBP1 agarose for 1 h at 4^aC. The beads were washed, and the samples were subjected to 12% SDS-PAGE transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with an anti-RalA antibody. The amount of activated RalA was calculated by densitometric analysis of the GTP-bound RalA detected in cell lysates The results represent the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. P < 0.05, ** P < 0.01. (B) SW480 or RKO colon cancer cells were stable transfected with plasmid encoding the human $A\beta$ variant 2 (pCMV6- AB2), or with void plasmid pCMV6. Total RNA was isolated from cell lysates to perform RT-PCR for AB2A mRNA expression using gene specific primers as described in the Materials and Methods section. The data are representative of three independent experiments (C) RalA activation was determined in stable transfected RKO cells with plasmid encoding the human AB variant 2 (pCMV6- AB2), or with void plasmid pCMV6 as in A). The amount of activated RalA was calculated by densitometric analysis of the GTP-bound RalA detected in cell lysates. Results shown are representative of three independent experiments. (D) RKO cell were stable transfected with plasmid encoding human PP2A-A β transcript variant 2 (pCMV6-XL5- A β 2) or with void control (pCMV6-ZL5). Cells were labeled with 7 µM CFSE in PBS 0.1% BSA at 37°C for 10 min and cultured. After each time period indicated in the figure, they were trypsinized, washed and fixed with 4% PFA. Cells were analyzed by flow cytometry with logarithmic detection of green fluorescence (CFSE). The results represent the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * P < 0.05

RalA activation than non-malignant 112CoN and IEC-18 cells, since we found a 4-fold increase in GTPbound RalA levels in cancer cells lacking the A β protein (SW480 and RKO) compared to normal cells.

Increasing Aβ2 mRNA Expression Levels in Colon Cancer Cells Diminish Ral-GTPase Active Form and Cell Proliferation

To demonstrate that the Aβ-variant 2 acts as tumor suppressor, we performed rescue experiments. Colon cancer cells were stable transfected with 1 µg of plasmid encoding the human A β variant 2, or with control void plasmid, and the effects on Ral-GTPase activation status (Figure 3C) and cell proliferation (Figure 3D) were analyzed. Interestingly, the expression of the Aβ2 mRNA could only be rescued in RKO cells but not in SW480 cells (Figure 3B): we observed by PCR (since antibodies do not discriminate between $A\alpha$ and $A\beta$ subunits) an increase in the expression level of the AB2 mRNA compared with its basal endogenous expression. Remarkably, a 45% reduction in the activated Ral-GTPase form was concomitantly found in rescued RKO cells (Figure 3C), and also a 25% reduction in the proliferation of these cells 96 h after their labeling with CFSE (Figure 3D). Taken together, these results are consistent with the notion that the $A\beta 2$ subunit is a tumor suppressor in colorectal cancer, as it has been observed in other cancer types.

PP2A Core AC Subunits and β -Catenin Co-Immunoprecipitate in a Reciprocal Manner and Co-Localize in Malignant Cells

Reports provide evidence that PP2A plays both positive and negative roles in Wnt signaling likely by targeting different components [11]. Interestingly, it has been reported that the β -catenin degradation, but not its phosphorylation, is inhibited in the colon cancer cell line SW480. In these cells, knockdown experiments have shown that PP2A is essential for β -catenin dephosphorylation [12], suggesting that PP2A may play a positive role in Wnt signaling by dephosphorylating and stabilizing β -catenin.

To investigate whether there is interaction in vivo between β -catenin and PP2A core subunits, we performed reciprocal co-immunoprecipitation studies. β-catenin was immunoprecipitated from normal 112CoN and from malignant RKO or SW480 cell extracts and the immunoprecipitates analyzed by Western blotting using antibodies against $C\alpha/\beta$ or against A α / β . As shown in Figure 4Å, although β catenin co-immunoprecipitated with PP2A (catalytic and scaffold A subunits) both from normal and from malignant cells, it only co-immunoprecipitated in a reciprocal manner from cancer cells. Consistent with these results, immunofluorescence assays followed by confocal microscopy analysis presented in Figure 4B, showed a clear co-localization of β-catenin with PP2A- $A\alpha/\beta$ subunit only in malignant cells. As can be observed, in either human 112CoN or rat IEC-18 intestinal non malignant cells, the $A\alpha/\beta$ appeared at the nuclei whereas β -catenin was at the plasma membrane or at the cytoplasm. In marked contrast, in cancer cells, wherever β -catenin appeared located, $A\alpha/\beta$ co-localized with it, that is, in RKO cells, with β -catenin localizing mainly outside of the nucleus, $A\alpha/\beta$ co-localized there, but in SW480 cells, which display almost total nuclear β -catenin, $A\alpha/\beta$ also co-localized with β -catenin there. Taken together, our data suggest that in vivo interaction between β -catenin and PP2A core- enzyme composed of scaffold $A\alpha$ seems to be physiologically relevant in colon cancer cells.

Inhibition of PP2A Activity Induces Negative Effects in $\beta\text{-}Catenin$ Transcriptional Activity and Cell Proliferation of Colon Cancer Cells

Since we found here that wherever β-catenin is located in malignant cells, PP2A-A α co-localized with it, we decided to explore the effects of PP2A inhibition in malignant cells (which do not express Aβ subunit). To achieve this, we used human malignant RKO cells that display normal canonical Wnt signaling (they express wild-type APC protein) and are responsive to Wnt3a ligand, in comparison with SW480 human malignant cells, which express a truncated version of APC and display constitutive active Wnt signaling. We incubated the cells in the absence or presence of several concentrations of the specific and cell permeable PP2A inhibitor endotall and then examined the effect on the β -catenin transcriptional activity using the reporter system TOPFlash/FOPFlash. As can be observed in Figure 5, both the Wnt3a-stimulated β-catenin transcriptional activity in RKO cells and the constitutive active β -catenin activity in SW480 cells were blocked in a dose-dependent manner by 6h treatment with endothall, reaching 50% of the control activity with 100 µM of PP2A inhibitor. Since PP2A has been involved in apoptosis [19], we investigated if the negative effects obtained with endothall treatment were due to an increase in apoptosis rate. Annexin V-PI staining followed by flow citometry analysis was employed to test cell apoptosis induced by 1 µM endothall treatment of cells during 12 h in comparison with treatment with other typical apoptotic inducers: 1mM H₂O₂ or 120 µM cyclosporine during 12 h. The results shown in Figure 6 (A and B) demonstrated that the incubation with 1µM endothall during 12h did not significantly affect the apoptosis rate observed compared with control untreated cells, neither in RKO cells (Figure 6A), which behaved very resistant to apoptosis induced with any inducer, nor in SW480 cells (Figure 6B), in which cyclosporine and H_2O_2 produced a 5.5- and threefold increase in apoptosis, respectively, compared with untreated cells. We tested higher endothall concentrations and found that even in the presence of 900 µM endothall, 50% of



Figure 4. PP2A-C/A and β -catenin co-immunoprecipitate in a reciprocal manner and co-localize only in colon malignant cells. (A) PP2A-C α/β and PP2A-A α/β -catenin co-immunoprecipitate in a reciprocal way with β -catenin. Samples of cell extracts (50 μ g) obtained from non-malignant 112CON cells and from malignant RKO and SW480 cells were analyzed by immunoblotting (Input). An actin antibody was used as control for equal loading. PP2A-C α/β , PP2A-A α/β or β -catenin were immunoprecipitated from cell lysates and analyzed by Western blotting for the presence of the proteins indicated in the Figure. The results are representative of four independent experiments using different cell

preparations. (B) β -catenin co-localizes with PP2A-A in malignant cells. Cells were fixed, permeabilized and coimmunostained with antibodies against PP2A-Aa/ β and β -catenin. Fluorescence was analyzed by laser confocal microscopy as described under "Materials and Methods." PP2A-Aa/ β was visualized with FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody and β -catenin with TRITC-conjugated goat anti-mouse antibody. Nuclear staining was obtained by incubating the coverslips with 4'6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Data are representative of four independent experiments.



Figure 5. Inhibition of PP2A activity blocks β -catenin transcriptional activity in a dose dependent manner. SW480 or RKO cells were cotransfected with pRL and the TOPFlash or FOPFlash reporter plasmids. 24 h post-transfection, RKO cells were serum-starved for 10 hours, and then stimulated with Wnt3a (100 ng/ml) for 12 h. During the last 6 hours, cells were also incubated in the absence or presence of 1, 10 or 100 μ M endothall. In the case of SW480 cells, 24 h post transfection cells were only incubated in the absence or presence of endothall for 6 h. Then cells were washed, lysed and luciferase activity was assayed. The activity was normalized with respect the activity of *Renilla luciferase* or with respect the protein content in each sample. The results represent the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01.

RKO cells remained resistant to apoptosis after 3 h (data not shown). Because canonical Wnt signaling activation promotes cell proliferation via the expression of target genes such as C-MYC and CYCLIN D1, we reasoned that the blockade of β-catenin transcriptional activity upon endothall treatment of cells would affect the cell proliferation. To examine this, SW480 cells were incubated in the absence or presence of 1, 10 or 100 µM endothall for 24, 48 or 72 h. Serum starved RKO cells were stimulated with Wnt3a before the incubation with endothall. During the last 3 h of each incubation period, MTT was added to the medium of both cell types and the presence of metabolically active viable cells was used as an index of cell proliferation. As shown in Figure 6C, the PP2A inhibitor dose-dependently diminished cell proliferation of both cancer cell types more than 70% after 72 h with 100 µM endothall. Therefore, these results clearly indicated that PP2A is essential to maintain active canonical Wnt signaling in cancer cells, suggesting an important role for residual PP2A activity to favor β-catenin actions and cell proliferation in vivo.

DISCUSSION

PP2A is considered to be a tumor suppressor, and inhibition of its activity is a characteristic of neoplastic transformation [7]. Consistent with this, here we found that basal PP2A activity is markedly reduced in colon malignant cells compared with non-malignant counterparts.

PP2A exists in both core enzyme and holoenzyme within cells [1,6]. Since both C and B subunits bind to the A subunit, the normal function of the scaffold Asubunit is critical for the assembly of either core enzyme or holoenzyme of PP2A to govern its specific activity. The two alternative genes, PR65 α (A α) and PR65 β (A β) encode proteins that share an 87% sequence identity, but AB has unique biochemical properties and is unable to substitute for the loss of $A\alpha$ in mice [11]. Somatic mutations of the PP2A-A α and -Aβ subunits have been reported in human lung, breast, and colon cancers as well as in melanomas, albeit at low frequency [2,20-23]. When addressing the integrity of the $A\alpha$ isoform, no reduction in its expression has been found in many tumor cell lines tested, which was in contrast to the β isoform [24], as we also observed in this study. Mutations have also been described in Aa isoform but at much lower frequency than in AB [25] and it has been demonstrated that the loss of $A\alpha$ is lethal in rats. Thus, it appears that at least a minimal level of $A\alpha$ is likely to be required to maintain cell viability [26].

A salient feature obtained here is that colon cancer cells did not display any change in PP2A-C catalytic subunit expression with respect to non-malignant cells, but they display clear differences in A-isoform expression when compared with non-malignant counterparts, that is, cancer cells overexpress the Aa isoform but do not express the AB isoform, either at the protein level, or both at the protein and mRNA levels. Our results are consistent with previous studies showing that the expression of PP2A–C within cells is tightly controlled to ensure the presence of relatively constant levels of PP2A. This auto-regulatory control is exerted at the translational level and does not involve transcriptional mechanisms [27]. Supporting this, the attempts to overexpress functional PP2A-C in mammalian cells with standard gene transfer techniques have long been unsuccessful [28].

Interestingly, PP2A AB has been reported to be a tumor-suppressor gene [2,7,8]. Sablina et al. [18] provided the first evidence that loss of the functional scaffold $A\beta$ due to cancer-associated mutations contributes to transformation. Notably, they identified the small GTPase RalA as a protein that interacts with PP2A-A β but not with -A α [2,18]. These authors showed that wild-type RalA but not RalA phosphorylation site mutants, mediate cell transformation induced by suppression of PP2A-AB expression, and lung cancer cell lines that harbor inactivating mutations of PP2A-AB exhibit constitutive phosphorvlation of RalA. Interestingly, they showed that wildtype A β could reverse the tumorigenic phenotype of patient derived lung carcinoma cell lines harboring mutations in A β . They also found that exogenous expression of wild-type AB inhibited cell growth, anchorage-independent colony formation, and



Figure 6. Inhibition of PP2A activity with 1 μM endothall does not affect apoptosis rate but decreases proliferation of colon cancer cells. (A, B) Apoptosis was induced by culturing the cells in the absence (vehicle) or presence of 1 μM endothall, 120 μM cyclosporine or 1 mM H₂O₂ for 12 h. RKO (panel A) or SW480 (panel B) cells were stained with annexin V-FITC and PI as described in Material and Methods, followed by flow cytometric analysis. The different labeling patterns in this assay identify the different cell populations: living cells (PI-negative/annexin V-negative), apoptotic cells (annexin V-positive) and necrotic cells (PI-positive/annexin V-negative). A representative experiment is

shown at the upper part of the panel and the histogram shown at the bottom represent the mean values ± SEM of three independent experiments of the percentage of apoptotic/necrotic cells. (C) Cell proliferation assay. SW480 cells were incubated in the absence or presence of 1, 10 or 100 μ M endothall for 24, 48 or 72 h. Serum starved RKO cells were stimulated with 100 ng/ml Wnt3a 12h before the incubation with the same endothall concentrations for 24, 48 or 72 h. During the last 3 h of each incubation period, MTT was added to the medium of both cell types. Reaction was stopped and the cell samples quantified spectrophotometrically at 570 nm. * P < 0.05.

Molecular Carcinogenesis

tumor growth of cancer lines in which both alleles of the A β gene were defective [18]. In agreement with these experimental evidence, here we found that the expression of the scaffold A β 2 subunit of PP2A is lost in colon cancer cells, either derived from patients' biopsies or from colon cell lines, and that the rescue of its expression produces negative effects in Ral-GTPase activation and in cell proliferation of RKO colon cancer cells. Our results therefore indicate that A β gene also acts as tumor suppressor in colorectal cancer.

With respect to the molecular mechanism by which $A\beta$ loss of function contribute to tumor development, it has been shown that while the $A\alpha$ scaffold can interact with all regulatory B subunits, the $A\beta$ scaffold is unable to interact with the B/PR55 family of B subunits and shows a preference for binding to PR72 [18]. This means that alterations of PP2A-A β result in disruption of all PP2A-A β -containing complexes leading to an overall loss of specific PP2A holoenzyme complexes. Thus, in colon cancer the functional scaffold subunits are diminished or substantially reduced and the specific PP2A activity could be compromised.

In this work, we have also found that PP2A–C and -A subunits interact in vivo with β -catenin only in malignant cells and that despite PP2A specific activity is low in colon cancer cells, it seems that it is essential to favor β -catenin transcriptional activity and cell proliferation. Canonical Wnt signaling operates through regulating the phosphorylation and degradation of the transcription co-activator β -catenin. As mentioned before, there is evidence that PP2A plays both positive and negative roles in the regulation of Wnt signaling, thus emphasizing the critical role in PP2A-mediated regulation of both embryogenesis and the regulation of cellular proliferation in adult tissues.

The first evidence that PP2A controls Wnt signaling was obtained using the adenomatous polyposis coli (APC) protein as bait in a yeast two-hybrid assay. So far, it has been demonstrated that PP2A can associate with a number of Wnt signaling components such as Naked [29], APC [30], axin [31,32], and β-catenin [33]. It is interesting that all these proteins are regulated by phosphorylation. However, although a number of protein kinases have been shown to influence Wnt/βcatenin signaling, the protein phosphatases involved have received less attention. In this regard, Bos et al. [34] first reported that PP2A enzymatic activity influences the phosphorylation status of β -catenin when they demonstrated that treatment of colon cancer cell lines with aspirin promotes B-catenin phosphorylation by inactivating PP2A [34]. Later, Zhang et al. [12] found that PP2A can also stabilize β catenin directly. They found that $PR55\alpha$ (B55alpha), a regulatory subunit of PP2A, directly interacts with βcatenin and with Axin to regulate β-catenin phosphorylation and degradation. Interestingly, they also reported that siRNA experiments in the colon cancer

Molecular Carcinogenesis

cell line SW480 suggested that PP2A is essential for β -catenin dephosphorylation [12]. Therefore, all these experimental evidence suggest that PP2A may play a positive role in Wnt signaling at the β -catenin degradation complex. In agreement with these data, we observed here that PP2A-AC core enzyme interacts in vivo with β -catenin only in colon cancer cells, and that this interaction appears to be crucial to maintain active β -catenin transcriptional activity and cell proliferation.

In summary, we have found that in colon cancer cells, the overall PP2A activity is diminished in comparison with normal non-malignant cells probably as result of the loss of expression of the scaffold A β subunit, and that the residual PP2A activity plays a positive role in the maintenance of an active canonical Wnt signaling. Importantly, the loss of expression of the A β subunit of PP2A may serve as biomarker of colon malignity in high-risk patients that suffer of inflammatory bowel disease and ulcerative colitis. In addition, preclinical studies have shown that pharmacological restoration of PP2A tumor-suppressor activity by PP2A activating drugs [35], is promising to effectively antagonize cancer development and progression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Enrique Pedernera, Ph.D, and Silvia Reyes-Maya, M.Sc. from the Embryology Department, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, for their help with the use of the confocal microscope (SDI-PTID.05.01). We also thank Vilma Maldonado-Lagunas, Ph.D. and Jorge Melendez-Zajgla, Ph.D., for their valuable help with the cell lines authentication by DNA profiling using short tandem repeat (STR) analysis. This work was submitted in partial fulfillment requirements for the obtention of a Ph.D. degree by M.C. Figueroa-Aldariz (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM).

REFERENCES

- Sablina AA, Hector M, Colpaert N, Hahn WC. Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation. Cancer Res 2010;70:10474–10484.
- Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. Trends Mol Med 2008;14:152–160.
- Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. Cancer Lett 2013;335:9–18.
- Virshup DM, Shenolikar S. From promiscuity to precision: Protein phosphatases get a makeover. Mol Cell 2009;33:537– 545.
- Ruediger R, Fields K, Walter G. Binding specificity of protein phosphatase2A core enzyme for regulatory B subunits and T antigens. J. Virol 1999;73:839–842.
- Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: A highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth, signalling. Biochem. J. 2001;353:417–439.
- 7. Mumby M. PP2A: Unveiling a reluctant tumor suppressor. Cell 2007;130:21–24.

- Bononi A, Agnoletto C, DeMarchi E, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. Enzyme Res 2011;2011:329098.
- Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, et al. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. Cell 1990;60: 167–176.
- 10. Sablina AA, Hahn WC. The role of PP2A A subunits in tumor suppression. Cell Adh Migr 2007;1:140–141.
- Eichhorn PJA, Creyghton MP, Bernards RAL. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. Biochim Biophys Acta 2009;1795:1–15.
- Zhang W, Yang J, Liu Y, et al. PR55α, a regulatory subunit of PP2A, specifically regulates PP2A-mediated β-catenin dephosphorylation. J Biol Chem 2009;284:22649–2656.
- Luna-Ulloa B, Hernández-Maqueda J, Santoyo P, et al. Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wht signaling pathway in tumoral colon cell lines. Carcinogenesis 2011;32: 1615–1624.
- Li YM, Casida JE. Cantharidin-binding protein: Identification as protein phosphatase 2A. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89: 11867–11870.
- Li YM, Mackintosh C, Casida JE. Protein phosphatase 2A and its [3H]cantharidin/[3H]endothall thioanhydride binding site. Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues. Biochem Pharmacol 1993;46:1435–1443.
- Thiery JP, Blazsek I, Legras S, et al. Hepatocellular carcinoma cell lines from diethylnitrosamine phenobarbital-treated rats. Characterization and sensitivity to endothall, a protein serine/ threonine phosphatase-2A inhibitor. Hepatology 1999;29: 1406–1417.
- 17. Shao J, Diamond MI. Protein phosphatase 2 dephosphorylates Profilin-1 at Ser-137. PLOS ONE 2012;7:e32802.
- 18. Sablina AA, Chen W, Arroyo JD, et al. The tumor suppressor PP2A A β regulates the RalA GTPase. Cell 2007;129: 969–82.
- Ray RM, Bhattacharya S, Johnson LR. Protein Phosphatase 2A regulates apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2005;280:31091–3100.
- Ruediger R, Pham HT, Walter G. Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene. Oncogene 2001;20:1892–1899.
- Takagi Y, Futamura M, Yamaguchi K, et al. Alterations of the PPP2R1B gene located at 11q23 in human colorectal cancers. Gut 2000;47:268–271.
- 22. Tamaki M, Goi T, Hirono Y, et al. PPP2R1B gene alterations inhibit interaction of PP2A-Abeta and PP2A-C proteins in colorectal cancers. Oncol Rep 2004;11:655–659.

- 23. Wang SS, Esplin ED, Li JL, et al. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. Science 1998;282: 284–287.
- 24. Zhou J, Pham HT, Ruediger R, Walter G. Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: Differences in expression, subunit interaction, and evolution. Biochem J 2003;369:387–398.
- 25. Ruediger R, Pham HT, Walter G. Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A alpha subunit gene. Oncogene 2001; 20:10–15.
- 26. Strack S, Cribbs JT, Gomez L. Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. J Biol Chem 2004;279:47732–4739.
- 27. Baharians Z, Schönthal AH. Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. J Biol Chem 1998;273: 19019–19024.
- Green DD, Yang SI, Mumby MC. Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. Proc Natl Acad Sci U.S.A 1987;84:4880– 4884.
- 29. Creyghton MP, Roel G, Eichhorn PJ, et al. PR72, a novel regulator of Wnt signaling required for naked cuticle function. Genes Dev 2005;19:376–386.
- Seeling JM, Miller JR, Gil R, et al. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. Science 1999;283:2089–2091.
- Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM. Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in Xenopus. EMBO J 2001;20:4122–4131.
- 32. Yamamoto H, Hinoi T, Michiue T, et al. Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. J Biol Chem 2001;276:26875–2882.
- Gotz J, Probst A, Mistl C, et al. Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development. Mech Dev 2000;93: 83–93.
- 34. Bos CL, Kodach LL, van den Brink GR, et al. Effect of aspirin on the Wnt/b-catenin pathway is mediated via protein phosphatase 2A. Oncogene 2006;25:6447–6456.
- 35. Kalev P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy. Anticancer Agents Med Chem 2011;11:38–46.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

12