

UCH - FC
Biotecnología
M617
C1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE PKCs EN LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA MEDIADA
POR TPA (12-O-TETRADECANOIL FORBOL-13-ACETATO) EN
CÉLULAS NIH3T3 Y LA RELACIÓN DE ESTA REGULACIÓN
CON TRANSFORMACIÓN CELULAR”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

FREDDY MICHEL MEZA ALFARO



Dr. Andrew Quest
Director de Seminario de Título.

Dr. Christian González-Billault
Co- Director de Seminario de Título.

Noviembre de 2010
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Freddy Michel Meza Alfaro

“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE PKCs EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA MEDIADA POR TPA (12-O-TETRADECANOIL FORBOL-13-ACETATO) EN CÉLULAS NIH3T3 Y LA RELACIÓN DE ESTA REGULACIÓN CON TRANSFORMACIÓN CELULAR”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Dr. Andrew Quest
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de Andrew Quest sobre una línea horizontal.

Dr. Christian González Billault
Patrocinante

Una línea horizontal para la firma del patrocinante.

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul de Marco Tulio Nuñez González sobre una línea horizontal.

Dr. Sergio Lavandero
Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul de Sergio Lavandero sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, noviembre de 2010



BIOGRAFÍA



Toda mi vida he vivido en Santiago y desde hace más de 13 años que he compartido mi vida con mi madre Edyth y mi hermano Marcelo con quienes hemos vivido altos y bajos bien bajos. Mi enseñanza media la pasé en el Liceo de Aplicación criado en un curso científico-humanista donde surgió mi interés por las ciencias en general. Debido a ello, por la cantidad de ramos diferentes y lo bonito que sonaba ingeniería en biotecnología molecular elegí estudiar esta carrera, que me enseñó a cuestionarme más la vida en general además de tratar de buscarle las soluciones adecuadas a las limitaciones que todos tenemos.

Deambulé por varias ideas antes de terminar el 2006 en el laboratorio de biología celular y molecular de la Dra. Lisette Leyton y mi profesor guía el Dr. Andrew Quest, a quien le debo mucho, inclusive la paciencia que tuvo y ha tenido conmigo para soportar que recién ahora me haga el tiempo de entregar mi tesis, como dice el dicho, "uno propone y Dios dispone".

En su laboratorio aprendí muchísimas cosas dentro de ellas el Dr. Quest me incentivó el pensamiento analítico, cosa que no siempre se logra cursando ramos en una carrera. Además, aprendí muchísimas cosas personales compartiendo con él y con todos mis compañeros y amigos del laboratorio. Considero una buena experiencia de vida aquel laboratorio del cual siempre estaré agradecido, el cual me brindó altos y bajos que me permitieron madurar como persona.

Gracias a este tipo de experiencias fue que me sentí motivado por seguir aprendiendo y descubriendo cosas nuevas. Fue así como terminé en el programa de Doctorado en Ingeniería Eléctrica de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de esta casa de estudios. Actualmente aún estoy deambulando por los enmarañados caminos de la tesis de Doctorado, la cual enfoqué en un tema completamente diferente a lo que hasta ahora un Ingeniero en Biotecnología Molecular podría haber hecho. Trabajo desarrollando un algoritmo de localización y mapeo simultaneo para robots móviles el cual aún no ve la luz, pero espero pronto tenerlo funcionando.

Durante mis saltos por la vida he llegado a ser padre y marido de dos hermosas mujeres a las cuales les debo mi corazón y a quienes espero hacer muy feliz.

La satisfacción que me ha dado todo lo que he hecho en esos años no la cambio por nada y lo único que espero es poder devolverle la mano al destino en algún minuto.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco por supuesto a mi madre, quien ha dejado su vida completamente de lado por nosotros y de quien espero se dé cuenta que su vida y la nuestra se la debemos a ella, así que ahora le toca vivirla.

Agradezco a mi hermano por los buenos momentos que recuerdo hemos compartido juntos. A toda la gente que he conocido en el camino y que gracias a simples detalles para conmigo o una buena conversación me han enseñado de sus experiencias de vida. A la Dra. Leyton y al Dr. Quest por aceptarme en su laboratorio y soportarme todo ese tiempo. Y a todos mis amigos y compañeros de pregrado, que fueron muchos, con quienes sufrimos estudiando por terminar bien cada semestre. Agradezco a mi mejor amiga y compañera todo ese tiempo a quien quiero mucho y de quien siempre estaré muy agradecido, y que por circunstancias de la vida nos perdimos. Agradezco a mis amigos Luis Negrete, Cristobal Dünner, Gonzalo Ravest, Jaime Troncoso, Jorge Gutierrez, Lillian Corona con quienes aún mantengo una buena amistad. Y a mis nuevos amigos en el Doc, Jose Miguel Yañez, Marcelo Saavedra, Victor Hugo Calle, Gabriel Hermosilla, Patricio Loncomilla, Rodrigo Ordoñez, David Nova quienes le han dado miscelaneidad a mi estadía en el Doc.

También y muy importante le doy las gracias a Dios y a mi señora esposa Natalia por la hermosura de hija que me dio y por catetearme en los pocos momentos libres que he tenido para corregir, mandar a empastar y entregar la tesis. Y a mi pequeña preciosa Valentina quien me alegra la vida con sus viejitos con cinco dientes.



Esta tesis se la dedico a mi familia de pequeñín: mi padre, mi madre y mi hermano, de quienes aprendí los valores primordiales para vivir esta vida y de la cual tengo mis momentos más felices.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS

TABLA DE FIGURAS

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPÓTESIS.....	10
1.2 OBJETIVOS GENERALES	10
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
2 MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 MATERIALES	11
2.1.1 Reactivos.....	11
2.1.2 Equipamiento	13
2.1.3 Materiales Biológicos – Líneas celulares	13
2.1.4 Anticuerpos	14
2.2 MÉTODOS	14
2.2.1 Cultivo celular	14
2.2.2 Tratamiento con drogas	15
2.2.3 Inducción de H-Ras.....	15
2.2.4 Tratamiento de células NIH3T3 con 4 β -TPA	15
2.2.5 Preparación de adenovirus.....	16
2.2.6 Estandarización de la multiplicidad de infección para los adenovirus.....	17
2.2.7 Tratamiento de células NIH3T3 con adenovirus.....	18
2.2.8 Tratamiento de células NIH3T3 infectadas con adenovirus + 4 β -TPA.....	19
2.2.9 Preparación de extractos celulares.....	19
2.2.10 Evaluación cuantitativa de experimentos y análisis estadístico.....	20
2.2.11 SDS-PAGE y Western blot.....	20



2.2.12 Extracción de RNA.....	21
2.2.13 Transcripción reversa y análisis por PCR.....	22
2.2.14 Protocolo inmunofluorescencia.....	24
2.2.15 Ensayo de Crecimiento independiente de Anclaje.....	25
2.2.16 Análisis estadísticos.....	25
3 RESULTADOS.....	26
3.1 Determinar la posible participación de PKCs en la regulación de la expresión de Caveolina-1 y evaluar si la activación y/o la desaparición de PKCs se asocian a la pérdida de Caveolina-1 en presencia de 4 β -TPA.....	26
3.1.1 Ensayo de dosis respuesta frente a 4 β -TPA.....	26
3.1.2 Cinética de activación/degradación de PKCs dependiente de 4 β -TPA.....	28
3.1.3 Cinética de desaparición de Caveolina-1 y Caveolina-2 dependiente de 4 β -TPA.....	30
3.1.4 Efecto de distintos inhibidores farmacológicos de PKCs sobre los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2.	31
3.1.5 Análisis de RT-PCR en células NIH3T3 de ATCC incubadas con 4 β -TPA. ..	33
3.1.6 Transducción de células NIH3T3-ATCC mediante adenovirus.....	35
3.1.7 Efecto del 4 β -TPA sobre células NIH3T3 transducidas con PKC α mediante adenovirus.	37
3.1.8 Efecto de distintos inhibidores farmacológicos sobre los niveles basales de Caveolina-1 y Caveolina-2.	38
3.1.9 Efecto de inhibidores farmacológicos sobre células NIH3T3 transducidas con adenovirus de PKC α	41



3.2 Estudiar los cambios de morfología de las células NIH3T3 de ATCC en presencia de 4 β -TPA.	42
3.2.1 Microscopía de contraste de fase de células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA.....	42
3.2.2 Microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) de células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA.....	43
3.2.3 Microscopía confocal de células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA.	44
3.3 Determinar si los cambios morfológicos inducidos por TPA-4 β se relacionan con los cambios en el crecimiento.....	46
3.3.1 Crecimiento Independiente de Anclaje.....	46
4 DISCUSIÓN	48
5 RESUMEN Y CONCLUSIONES	53
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55



TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los tres principales grupos de PKCs.....	6
Figura 2. Curva MOI para los adenovirus codificantes para PKCs.....	18
Figura 3. Efecto de distintas concentraciones de 4 β -TPA sobre los niveles de Caveolina-1, Caveolina-2 y PKC α en las células NIH3T3 de ATCC.....	28
Figura 4. Efecto de 4 β -TPA en la disminución de PKCs.....	29
Figura 5. Desaparición de Caveolina-1 y Caveolina-2 en presencia de 4 β -TPA.....	31
Figura 6. Expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en respuesta a distintos inhibidores farmacológicos de PKCs.....	32
Figura 7. Expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en respuesta a distintos inhibidores farmacológicos de PKCs junto con la adición de 4 β -TPA.....	33
Figura 8. RT-PCR de células NIH3T3 incubadas con 4 β -TPA.....	34
Figura 9. Expresión de Caveolina-1 en células NIH3T3 de ATCC infectadas por adenovirus codificantes para PKCs.....	36
Figura 10. Efecto del 4 β -TPA sobre células NIH3T3 transducidas con PKC α WT.....	38
Figura 11. Efecto de distintos inhibidores farmacológicos sobre la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2.....	39
Figura 12. Expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en respuesta a distintos inhibidores farmacológicos junto con la adición de 4 β -TPA.....	40
Figura 13. Efecto de inhibidores farmacológicos sobre células NIH3T3 transducidas con adenovirus de PKC α	42
Figura 14. Morfología de células NIH3T3 expuestas a 4 β -TPA.....	43
Figura 15. Morfología de células NIH3T3 expuestas a 4 β -TPA.....	44
Figura 16. Distribución de Caveolina-1 en células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA.....	45
Figura 17. Evaluación de crecimiento independiente de anclaje.....	47
Figura 18. Esquema del modelo propuesto para los cambios observados en Caveolina-1 y 2 en las células NIH3T3.....	54



RESUMEN

Caveolina es una proteína relacionada con la supervivencia celular que posee un dominio de unión a otras proteínas relacionadas con vías de transducción de señales. A través de este dominio inhibe a las otras proteínas, actuando de esta forma como promotor de tumores. Actualmente, existen identificadas tres isoformas de la proteína (Caveolina-1, -2, -3) que se expresan en diferentes tipos celulares. Por otra parte, las proteínas quinasas C (PKCs) son una familia multi-génica de enzimas que juegan un rol clave en las vías de transducción de señales, control del crecimiento celular y tumorigénesis.

En este contexto, se estudiaron los efectos producidos por ciertas PKCs presentes en la línea celular NIH3T3 de ATCC, correspondientes a PKC α , PKC δ , PKC ϵ y PKC ζ , sobre los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2.

Para este estudio se utilizó un conocido ester de forbol activador de las cPKCs y nPKCs, denominado 4 β -TPA (12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato), con el fin de estudiar su efecto sobre los niveles de Caveolina.

Al realizar ensayos de cinética de activación/degradación de las PKCs con 4 β -TPA se observó la disminución de PKC α y PKC δ , las cuales cinéticamente son degradadas luego de ser activadas. Por esta razón los ensayos posteriores se centraron en estas dos PKCs.

Al realizar ensayos con adenovirus codificante para PKC α en presencia de 4 β -TPA y Bisindolylmaleimida (BIM, un inhibidor farmacológico de PKC α), se logró determinar la contribución de PKC α como regulador negativo sobre los niveles de Caveolina-1.

Para el caso de PKC δ no se logró determinar su contribución sobre la disminución de Caveolina. Además, utilizando los inhibidores LY294002 y SP600125 se observó que PI3K y JNK participarían en la disminución de los niveles de Caveolina, con lo cual se pudo formular un modelo de acción de PKC α sobre Caveolina-1.

Por otra parte, mediante ensayos de RT-PCR se observó que no existe una regulación transcripcional de Caveolina-1 durante los tiempos en los que se realizaron los ensayos.

Para Caveolina-2 se observó una menor disminución de los niveles de proteína en comparación a Caveolina-1 en la mayoría de los experimentos. Sin embargo, utilizando los inhibidores SP600125 y SB203580 en presencia de 4 β -TPA los niveles de Caveolina-2 disminuyeron casi en su totalidad, lo cual demuestra que ambas isoformas poseen mecanismos de regulación diferentes.

Además, los experimentos mostraron cambios morfológicos que presumían transformación celular dado que Caveolina-1 disminuía casi completamente. A pesar de ello, mediante ensayos de crecimiento independiente de anclaje se demostró que no era transformación celular.

En conclusión, un nuevo mecanismo involucrado en la disminución de Caveolina-1 se presenta en esta tesis, involucrando a la vía de las PKCs, y específicamente a PKC α .

ABSTRACT

Caveolin is a protein involved in cell survival that has a binding domain to other proteins related to signal transduction pathways. Through this domain Caveolin inhibits other proteins, thus acting as a tumor promoter. Currently, there are identified three isoforms of the protein (Caveolin-1, -2, -3) that are expressed in different cell types. Moreover, kinase C proteins (PKCs) are a multi-gene family of enzymes that play a key role in signal transduction pathways, cellular growth control and tumorigenesis.

In this context, we studied the effects produced by certain PKCs present in the NIH3T3 cell line from ATCC (PKC α , PKC δ , PKC ϵ and PKC ζ) over levels of Caveolin-1 and Caveolin-2.

For this study we used a phorbol ester activator of cPKCs and nPKCs called 4 β -TPA (12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), to study their effect on levels of Caveolin.

When performing activation/degradation kinetic assays on PKCs with 4 β -TPA it was observed both PKC α and PKC δ decrease, which are kinetically degraded after being activated. For this reason, subsequent experiments were focused on these two PKCs.

In conducting trials with adenovirus coding for PKC α in the presence of 4 β -TPA and Bisindolylmaleimide (BIM, a pharmacological inhibitor of PKC α), it was determined the contribution of PKC α as a negative regulator of the levels of Caveolin-1. In the case of PKC δ it was not possible to determine its contribution on the reduction of Caveolin. Furthermore, using LY294002 and SP600125 inhibitors showed that PI3K and JNK participate in the decreased levels of Caveolin, thus we were able to formulate a model of action of PKC α on Caveolin-1.

Moreover, using RT-PCR assays was observed that there is not a transcriptional regulation of Caveolin-1 during the time when the experiments were conducted.

For Caveolin-2 was showed a smaller decrease in protein levels compared to Caveolin-1 in most experiments. However, using SP600125 and SB203580 inhibitors levels Caveolin-2 decreased almost completely in the presence of 4 β -TPA, showing that both isoforms have different regulatory mechanisms.

Furthermore, experiments showed morphological changes presumed as cell transformation due to Caveolin-1 diminished almost completely. However, anchorage independent growth assays showed that there was no cellular transformation.

In conclusion, a new mechanism involved in the decrease of Caveolin-1 is presented in this thesis, involving the PKCs pathway, and specifically PKC α .

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud de gran importancia a nivel mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y en adultos. Es producido por alteraciones entre las interacciones celulares y su entorno, que llevan a una proliferación incontrolada de células, propagación de clones de células transformadas, invasión celular y posterior metástasis.

Generalmente, las células normales tienen múltiples mecanismos independientes que regulan su crecimiento y potencial diferenciación. Alteraciones en estos mecanismos de control, tales como cambios en las secuencias y/o cambios en la regulación genética y/o regulación epigenética de proteínas, podrían llevar a producir la enfermedad (Karakosta et al., 2005). Tal es el caso, por ejemplo, de la activación de proto-oncogenes o la sobreexpresión de genes supresores de tumores (Egloff et al, 2006). Por esto surge la necesidad de entender los mecanismos genéticos y moleculares a nivel celular así como también las interacciones celulares que se establecen en el desarrollo de la enfermedad.

Actualmente se ha descrito una proteína relacionada con la supervivencia celular denominada Caveolina-1, la cual tiene un papel estructural en la membrana plasmática y actuaría como supresora de tumores (Quest et al, 2004). Las Caveolinas son proteínas integrales de las Caveolas, las que forman invaginaciones vesiculares de aproximadamente 50-100 nm que se ubican en la membrana plasmática. Estos microdominios están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, y debido a esto tienen la propiedad de ser insolubles a detergentes tales como Tritón X-100 a baja temperatura.

De esta manera, la estructura y composición de las caveolas permiten su participación en una variedad de procesos celulares como endocitosis, homeostasis lipídica, y regulación de vías de transducción de señales que van dirigidas a la supervivencia celular, entre otros (Quest et al, 2004; Razani et al., 2002; Smart et al, 1999).

A lo largo de los años, mediante clonamiento molecular, se han identificado tres isoformas de Caveolina: Caveolina-1, Caveolina-2 y Caveolina-3 (Okamoto et al., 1998). Caveolina-1 y Caveolina-2 se expresan principalmente en células endoteliales, adipocitos, y pneumocitos tipo-1. Mientras que Caveolina-3 se expresa exclusivamente en células de músculo esquelético y cardíaco (Razani et al., 2002).

Caveolina-1 posee dos isoformas: la isoforma α con un tamaño de 24 kDa y la isoforma β de menor tamaño con 21 kDa. Ambas isoformas difieren en su dominio amino terminal. Para Caveolina-1 α la traducción comienza en metionina 1, mientras que para Caveolina-1 β comienza en metionina 32. La secuencia 1-31 amino terminal de Caveolina-1 α no es necesaria para la interacción con estructuras caveolares debido a que ambas isoformas se encuentran en las Caveolas. Sin embargo, esta secuencia amino terminal podría jugar un rol regulatorio importante dado que en ella se encuentra una tirosina (Y14) que es fosforilada por varias proteínas quinasas (Scherer et al., 1995; Orlichenko et al., 2005). Además, se adscribe a la proteína fosforilada funciones distintas en comparación a su forma no fosforilada, permitiendo por ejemplo la migración celular al polarizarse la proteína fosforilada en el frente de avance de las células (Beardsley et al., 2004).

También, Caveolina-1 posee un dominio de unión a otras proteínas (quinasas de la familia src, H-Ras, NOS endotelial, proteínas G, MEK1, ERK2, EGF-R, PKA, PKC) (Sargiacomo et al., 1995; Song et al., 1997; Smart et al., 1999) denominado dominio de andamiaje (scaffolding domain) desde el aminoácido 82-101, el cual

reconoce un motivo característico de las proteínas que se unen a Caveolina-1 (x-x-x-φ, x-x-x-x-φ-x-x-φ, φ-x-φ-x-x-x-φ-x-x-φ) (Okamoto et al., 1998). De esta forma Caveolina-1 interactuaría con aquellas proteínas inhibiendo sus funciones (Smart et al., 1999; Razani et al., 2002). Además de esto, Caveolina-1 puede formar homo oligómeros o hetero oligómeros con Caveolina-2 en las Caveolas (Scherer et al, 1997).

La transformación celular es el proceso por el cual las células adquieren la propiedad de cancerígenas, existen diversas causas complejas en términos moleculares que se asocian al desarrollo de cáncer y que llevan a la célula a una transformación, como es la mutación genética ya sea por herencia o por consecuencia del tiempo o también por cambios dentro de las células inducido por sustancias tóxicas o algunos virus. Interesantemente, se han ido acumulando antecedentes en los últimos 20 años que relacionan cambios en Caveolina-1 con este proceso. Por ejemplo, se observó tempranamente en células transformadas inducidas por el virus del sarcoma de Rous, que la principal proteína fosforilada en tirosina era una proteína de 22 kDa posteriormente identificada como Caveolina-1 (Glenney, 1989; Glenney et al, 1992). Además, la transformación celular inducida en fibroblastos por la expresión de oncogenes como ras o src coincidía con la pérdida de expresión de Caveolina-1 (Koleske et al., 1995) y su reexpresión, en aquellas células transformadas que poseían bajos niveles de Caveolina-1, era suficiente para revertir la transformación celular (Engelman et al., 1997). A partir de estos antecedentes, se utilizó oligos antisentidos para eliminar la expresión de Caveolina-1 observando que era suficiente para provocar transformación en células NIH3T3 (Galbiati et al., 1998). Por lo tanto, la disminución en la expresión de Caveolina-1 podría ser un evento crítico en la transformación de ciertas poblaciones celulares.

Además, se ha visto que los niveles basales de expresión de Caveolina-1 en ciertos tipos de cáncer como cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de mama se encuentran disminuidos al menos en etapas tempranas de la enfermedad y la reexpresión de Caveolina-1, en ciertas células tumorales que carecen de la proteína, parece ser suficiente para revertir el fenotipo transformado. El conjunto de los datos aquí presentados y otros de la literatura sugiere que Caveolina-1 tiene actividad supresora de tumores (Quest et al, 2004). Por lo tanto, nos pareció importante estudiar mejor los mecanismos que controlan la expresión y función de Caveolina-1 dentro de las células.

En general, existen muy pocos casos que relacionan tumorigénesis con mutaciones en la proteína Caveolina-1 (Quest et al 2008). Más bien se relaciona este proceso con los cambios en los niveles de expresión de la proteína.

Actualmente, se han postulado por lo menos tres vías posibles de regulación de la expresión génica de Caveolina-1:

- Una vía involucra la regulación directa mediante la activación de la cascada p42/44 MAPK, por ejemplo la activación de Ras. Ya que células NIH3T3 transformadas con Ras (H-, K- y N-Ras) restablecen la expresión de Caveolina-1 al ser tratadas con PD98059, un inhibidor bien caracterizado de MEK (Engelman et al, 1999a).

- Otra vía es mediada por tirosinas quinasas no receptoras del tipo Src, ya que células NIH3T3 transformadas con v-Src y v-Abl que mantienen niveles bajos de Caveolina-1 no restauran su función al ser tratadas con PD98059 (Engelman et al, 1999a).

- Y por último, una tercera vía involucra a la proteína PKA, ya que al activar a PKA con agentes farmacológicos que aumentan el cAMP o por la sobreexpresión de

PKA, la expresión de Caveolina-1 disminuye en comparación a los controles (Smart et al., 1999, Engelman et al., 1999a, Costa et al, 2007).

Dado que en nuestro laboratorio se ha estudiado la participación que tienen las vías río abajo de Ras en la disminución de la expresión de Caveolina-1 favoreciendo la transformación celular, y dado que el éster de forbol 4β -TPA (12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato), un compuesto conocido como promotor de tumores activa a proteínas quinasas C (Castagna et al., 1982), se decidió investigar el rol de las PKCs en la regulación de la expresión de Caveolina.

¿Qué son las PKCs y cómo se activan?

Las PKCs son una familia de proteínas serina/treonina quinasas cuya actividad es modulada en respuesta a una gran variedad de agonistas. Fisiológicamente son reguladas por lípidos, el mayor y más complejo grupo de segundos mensajeros celulares, de esta forma, las PKCs están implicadas en complejos procesos biológicos que incluyen el desarrollo, proliferación, transformación neoplásica, diferenciación, y apoptosis.

A la fecha, por lo menos 12 diferentes subespecies de PKCs han sido identificadas en tejido mamífero, divididas actualmente en cuatro grupos, basado en su alineamiento de regiones conservadas (C1-C2) y variables (V1-V3) del dominio regulatorio. Estos grupos corresponden a:

- cPKC, cuatro isoformas calcio dependientes α , β I, β II y γ .
- nPKC, cuatro isoformas no calcio dependientes δ , ϵ , η y θ .
- aPKC, dos isoformas atípicas ξ , λ /1 (Quest, 1996; Quest, 2000).

- y un cuarto grupo de isoformas nuevas atípicas, compuesto por PKC μ y ν (Hayashi et al., 1999).

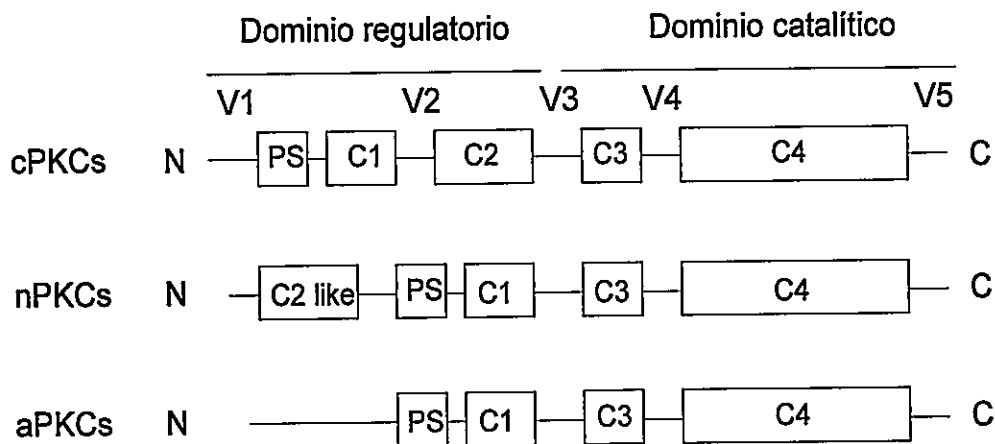


Figura 1. Esquema de los tres principales grupos de PKCs. PS corresponde al dominio de unión a pseudosustrato, C1 al dominio de unión rico en cisteína y C3 al dominio de unión de ATP.

Todas las PKCs tienen en común la presencia de dos segmentos funcionalmente distintos, un dominio quinasa COOH-terminal y un dominio regulatorio NH₂-terminal, sin el cual las PKCs serían constitutivamente activas (Quest, 1996). Además, el dominio regulatorio contiene un número de regiones distintas que promueven la interacción de la proteína con lípidos requeridos para su activación. La primera región variable (V1) contiene una secuencia llamada motivo pseudosustrato, similar al consenso necesario para la fosforilación dependiente de PKCs con la excepción de que los residuos serina/treonina necesarios para la fosforilación han sido reemplazados por otros no fosforilables, generalmente alanina (Quest, 1996). En la región C1 de las cPKC y nPKC se encuentran dos dominios ricos en cisteínas (C1A, C1B) involucrados en la unión con diacilgliceroles (DAGs), activadores fisiológicos de PKCs y con ésteres de forbol, como 4 β -TPA (12-*o*-tetradecanoil forbol-13-acetato), un conocido promotor de tumores. La región C2, presente sólo en cPKCs conferiría la

dependencia de Ca^{2+} observada para éstas isoformas, así como la interacción de lípidos dependiente de cationes bivalentes. Ambos motivos ricos en cisteínas (C1A, C1B) y la región C2 están involucrados en la activación de PKCs dependiente de lípidos así como también en la interacción PKC-proteínas. Las aPKCs contienen solamente un motivo rico en cisteínas y no son activadas ni por DAG ni por 4β -TPA. Finalmente, el dominio catalítico COOH-terminal de las PKCs con la región C3 y C4 es más similar a regiones de otras serina/treonina quinasas, en el cual se encuentran secuencias consenso para la unión de ATP, la región de transferencia de fosfato y el sitio de unión a sustrato (Quest, 1996; Quest, 2000).

Por lo tanto, en lo que concierne a la regulación por lípidos, las cPKCs son reguladas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina y el ion Ca^{2+} , las nPKCs son independientes de Ca^{2+} pero reguladas por DAG y fosfatidilserina, y finalmente las aPKC se activan en presencia de fosfatidilserina, pero son Ca^{2+} y DAG independientes.

El DAG puede ser producido transientemente por la hidrólisis de fosfolípidos de inositol (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) mediada por fosfolipasa C, liberando inositoltrifosfato (IP3) responsable de la elevación del Ca^{2+} intracelular y a su vez también del DAG. La elevación prolongada del DAG se debe a la hidrólisis alternativa de otros lípidos, tales como fosfatidilcolina mediada por fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC) o por la acción conjunta de fosfolipasa D y fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (Quest, 2000).

La forma de actuar del DAG es produciendo un incremento dramático de la afinidad de las PKCs por la fosfatidilserina ubicada en membranas. El resultado es una interacción de alta afinidad por las membranas (alta afinidad por la fosfatidilserina, Ca^{2+} y DAG), donde un cambio conformacional activa la enzima. El dominio autoinhibitorio pseudosustrato es removido del sitio activo, permitiendo de esta forma la unión con el

sustrato y catálisis. Adicionalmente, activadores endógenos incluyen ácidos grasos cis insaturados como el ácido araquidónico, linolénico y oleico, los cuales activan directamente a las cPKCs en ausencia de fosfatidilserina y Ca^{2+} . Mientras que los ácidos grasos trans-insaturados o los saturados no las inducen (Quest, 1996; Quest, 2000).

Además las cPKCs y las nPKCs son activadas por ésteres de forbol como TPA (12-*o*-tetradecanoil forbol-13-acetato) y ciertos otros ésteres de forbol, mientras que las aPKC no lo son. La forma activa del TPA, 4 β -TPA induce rápidamente una traslación de las cPKCs y nPKCs desde el citosol a la membrana plasmática, concomitantemente con una activación de ellas (Castagna et al., 1982; Quest, 1996).

De esta forma, al ser identificadas las PKCs como receptores intracelulares de alta afinidad de ésteres de forbol (promotores de tumores), las PKCs no sólo se encontrarían involucradas en el control de la proliferación normal de las células sino que también durante la carcinogénesis. La manera de actuar del éster de forbol sobre las PKCs es acoplándose de manera semejante a como lo hace el DAG, pero con la diferencia de que el éster de forbol posee más de 200 veces mayor afinidad que el DAG en presencia de lípidos y activa las PKCs por mayor período de tiempo. Por esta razón, los ésteres de forbol han sido utilizados para la activación de las PKCs tanto *in vitro* como *in vivo* (Quest, 1996).

Dada la mayor afinidad y el hecho de que no hay recambio de los ésteres de forbol, en presencia de estos compuestos se induce una activación básicamente irreversible de las cPKCs y nPKCs. La activación prolongada de las PKCs promueve su degradación por Calpaínas y también por el Proteosoma. Por lo tanto, una interrogante aún no resuelta es saber de qué forma los ésteres de forbol pueden actuar como promotores de tumores. Es decir, será su rol en la activación de ciertas PKCs y/o el

hecho de que promueven la desaparición de ciertas isoformas de PKCs los procesos claves que promoverían la tumorigénesis.

En resumen, en nuestro Laboratorio se han estudiado blancos río abajo de Ras involucrados en la expresión de Caveolina-1 y transformación celular. Además, se sabe que cambios morfológicos, en la línea celular NIH3T3, son producidos por la adición de 4 β -TPA el cual activa a las PKCs. Por todo lo anterior, sería interesante determinar el grado de contribución de las PKCs en la regulación de la expresión de Caveolina-1.

1.1 HIPÓTESIS

“PKCs participan en la regulación de Caveolina-1 y en la transformación celular mediada por la disminución de Caveolina-1 en presencia de 4 β -TPA”.

1.2 OBJETIVOS GENERALES

- 1) Definir si existe una contribución de distintas PKCs en la regulación de Caveolina-1.
- 2) Definir la relación entre los cambios morfológicos observados en células NIH3T3 de ATCC, en presencia de 4 β -TPA, y la regulación de la expresión de Caveolina-1 dependiente de PKCs.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la posible participación de PKCs en la regulación de la expresión de Caveolina-1 y evaluar si la activación y/o la desaparición de PKCs se asocian a la pérdida de Caveolina-1 en presencia de 4 β -TPA.
- 2) Estudiar los cambios de morfología de las células NIH3T3 de ATCC en presencia de 4 β -TPA.
- 3) Determinar si los cambios morfológicos inducidos por 4 β -TPA se relacionan con cambios en el crecimiento celular.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos

Alexis (San Diego, CA, EEUU): PD98059 (385-023-M010), LY 294002 (270038-M005), SB203580 (270-179-M001), 4 β -TPA (ALX-445-004).

Biorad (Hércules, CA, EEUU): Albúmina de suero de bovino (500-0007), Marcador de peso molecular de proteínas de bajo rango (161-0305), Membrana Nitrocelulosa (162-0115), β -mercaptoetanol (161-0710), Solución Acrilamida/Bis-Acrilamida 40% (161-0146).

Biomol (Plymouth, PA, EEUU): SP600125 (EJ-305).

Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU): Cloruro de Antipaina (178220), Higromicina B (400051), Mowiol 488 (475904).

Fulka (Suiza): Azul de Bromofenol (18030), Bromuro de etidio (46065), Coomassie Brilliant Blue R (27816), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (71729), Glicerol 87% (49782), Ponceau S (S81460), Isobutanol (58450).

Gibco (Paisley, Escocia, Gran Bretaña): Tampón fosfato salino (PBS) 10X para cultivo celular (70013-032), EDTA (15576), medio DMEM con alta glucosa (12800-017), PS (Penicilina 5mg/mL, Estreptomina 5mg/mL) (15640-122), Tripsina-EDTA (25200-056). Agar seleccionado (N°C: 30391-023).

Invitrogen (Paisley, Escocia, Gran Bretaña): Desoxinucleótidos-trisfosfato: dATP (10216-018), dCTP (10217-016), dGTP (10218), dTTP (10219-012), Agarosa bajo punto de fusión *Ultra pure* (N°C: 15517-014), Trizol (15596-026).

Merck (Darmstadt, Alemania): Etanol p.a. (AL-0205), Metanol p.a. (UN-1230), TEMED (1.10732.0100), Tritón X-100 (UN-3082), NaCl (K-25938104), Cloroformo (UN-1888).

Pierce (Rockford, IL, EEUU): Ensayo para medición de proteínas BCA (bicinchoninic acid) (23223/23224).

Promega (Madison, WI, EEUU): DNA polimerasa Taq (M1665), Fosfatasa Alcalina (M1821), Sistema de purificación de DNA Wizard®plus SV Miniprep (A1340), Sistema de purificación de DNA Wizard® PCR prep (A7170).

Sigma (St. Louis, MO, EEUU): Azida de Sodio (S-8032), Dimetil Sulfóxido (DMSO) (D-8779), orto-Vanadato de Sodio (S-6508), Bicarbonato de Sodio (S-5761), TRIZMA®Base (T-1503), Gelatina (G-7765), Glicina (G-7126), Ponceau S (P-3504), Benzamidina (B-6506), PMSF (P-7626), Tween 20 (P-1379), Faloidina (17466-454).

US Biological (Swampscott, Mt, EEUU): IPTG (18500).

Winkler (Santiago, Chile): Ácido Tricloroacético (BM-0060), Tampón fosfato salino PBS 10X (BM-1340), Marcador de DNA de 1Kb (BM-1090), Isopropanol p.a. (BM-0210).

Otras empresas: Azul de Tripan (riedel-de Haën, (Séles, Alemania), 32700), Hepes Buffer (HyClone (Logan, Utah, EEUU), SH30337) Films radiográficos o Películas fotográficas BMR1/BML1 (Kodak, (New Haven, CT, EEUU), 131-4319), Agarosa (Biowhittaker Molecular Applications, (Rockland, ME, EEUU), 50000), SFB (suero fetal bovino) (Hyclone (Logan, Utah, EEUU), 16777-014).

2.1.2 Equipamiento

Incubador de CO₂ para cultivo celular (SHEL LAB Modelo TC2323), cámara de flujo laminar para cultivo celular (FACTO MET), espectrofotómetros (Kontron modelo Uvikon 725 y Jenway modelo Genova), micro-centrifuga (SANYO modelo Micro Centaur MSB010.CX2.5), centrifugas (SANYO modelo Centaur 2 MSB020.CX1.5, IEC modelo Centra-7B y Eppendorf modelo 5415R), sonicador (Cole Parker Instruments serie 4710), cámara de video color (Sony SSC-DC50A), lector de ELISA (Bio-Rad modelo 3550), electroporador (Biorad modelo 1652103), agitador termoregulado orbital (Infors AG modelo HT), medidor de pH (Hanna Iris modelo HI8417), microscopio invertido (Fisher modelo XDS-1B) y termociclador (MJ Research Inc Modelo PTC100).

2.1.3 Materiales Biológicos – Líneas celulares

NIH3T3: Fibroblastos derivados de embrión de ratón (CRL-1658). Forman una monocapa adherente con una alta capacidad de inhibición por contacto. Se utilizó una línea celular adquirida de la ATCC (American Type Culture Collection).

A10: Línea celular obtenida a partir de la transfección de células NIH3T3 con una isoforma constitutivamente activa de H-Ras (RasG12V) clonada en el vector inducible placiOP. Proveniente de Suiza (Peli et al, 1999).

2.1.4 Anticuerpos

Anticuerpos primarios policlonales: anti-Caveolina-1 (Transduction Laboratories, C13630), anti-Actina (Sigma, A5060), anti-PKC α (Santa Cruz), anti-PKC δ (Santa Cruz), anti-PKC ϵ (Santa Cruz), anti-PKC ζ (Santa Cruz).

Anticuerpos primarios monoclonales: anti-Caveolina-2 (Transduction Laboratories).

Anticuerpos secundarios: Anti-IgG de ratón conjugada a HRPO (BioRad (Hércules, CA, EEUU), 1706516), Anti-IgG de conejo conjugada a HRPO (BioRad (Hércules, CA, EEUU), 176515).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivo celular

Las líneas celulares NIH3T3 y A10 se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, en medio DMEM alta glucosa con 10% de SFB (suero fetal bovino) y antibióticos (Penicilina 50 µg/mL y estreptomycin 50 µg/mL). El pasaje de células se realizó 2 veces por semana mediante tripsinización (Tripsina-EDTA). La confluencia de las células correspondió a 80% aproximadamente, en todas las condiciones finales de los experimentos, por lo cual en ensayos de 24 horas la confluencia inicial de las células era de 40% y en ensayos de 48 horas era de 20% aproximadamente.

2.2.2 Tratamiento con drogas

Según el tiempo de exposición a las drogas, se utilizaron placas de 6 cm donde se sembraron 250.000 o 500.000 células para experimentos de 48 o 24 horas respectivamente. Las drogas fueron diluidas en medio de cultivo. Al completar el tiempo de exposición a las drogas se retiró el medio de cultivo y se lavó las células con PBS en frío. Se retiró las células de la placa mediante un rastrillo, agregando a la placa 600 μ L de PBS frío con una mezcla de inhibidores de proteasas (Benzamidina 10 μ g/mL, Antipaina 2 μ g/mL, Leupeptina 1 μ g/mL y PMSF 1mM) y un inhibidor de fosfatasas (Na_3VO_4 1 mM). Se centrifugó las células a 3200 rpm y se guardó el pellet a -20°C para su posterior solubilización y cuantificación.

2.2.3 Inducción de H-Ras

En este ensayo de inducción de H-Ras se utilizó la línea celular A10 proveniente de Suiza. La inducción fue hecha con IPTG 5 mM diluido en medio de cultivo DMEM alta Glucosa, 10% de SFB y los antibióticos: Penicilina 50 μ g/mL y estreptomycin 50 μ g/mL.

2.2.4 Tratamiento de células NIH3T3 con 4 β -TPA

Se sembró 250.000 células en placas de 6 cm. Cerca de 4 horas luego de haber sembrado las células (para asegurar tiempo de adhesión a la placa), se retiró el medio y se agregó medio DMEM alta Glucosa 10% SFB, con 100 nM de 4 β -TPA. Luego de 24 horas en presencia de 4 β -TPA se obtuvo los extractos celulares según protocolo de preparación de lisados explicado en el punto 2.2.2. A modo de control

para comparar la actividad del 4 β -TPA se utilizó una isoforma inactiva del éster de forbol denominada 4 α -TPA la cual se sabe no permite la activación de las PKCs. Debido a que no existe diferencia en los niveles de PKCs y Caveolinas al utilizar o no el 4 α -TPA, los controles de los experimentos poseen indistinguiblemente presencia o ausencia de este compuesto.

2.2.5 Preparación de adenovirus.

Los constructos de adenovirus contienen vectores adenovirales que codifican para: PKC α silvestre (Wild-Type, WT), PKC α dominante negativo (DN, que contiene una mutación en el dominio de unión a ATP, K368R), PKC δ silvestre (Wild-Type, WT) y PKC δ dominante negativo (DN, que contiene una mutación en el dominio de unión a ATP, K384A) constructos generados y caracterizados de acuerdo a lo descrito (Matsumoto *et al*, 2001; Ohba *et al*, 1998). Como control negativo, las células NIH3T3 de ATCC también fueron transducidas con vector adenoviral vacío (MOCK). Estos vectores adenovirales fueron obtenidos utilizando el sistema de vector adenoviral AdEasy (He *et al*, 1998), en el cual el gen de interés fue clonado en un vector de transferencia. El plasmidio resultante se linearizó y se co-transformó, junto con el plasmidio adenoviral pAdEasy-1, en la cepa BJ5183 de *E. coli*. Los plasmidios adenovirales recombinantes se seleccionaron con Kanamicina (20 μ g/ml) y se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción (PacI/EcoRI). Los plasmidios adenovirales recombinantes se digirieron con PmeI y transfectaron en células HEK293, en las cuales se empaquetaron como partículas virales. Los vectores adenovirales señalados fueron preparados por Mario Chiong (Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas, Universidad de Chile, a cargo del Dr. Sergio Lavandero).

2.2.6 Estandarización de la multiplicidad de infección para los adenovirus

Se realizó una curva de estandarización de la cantidad de adenovirus necesaria para poder transducir eficientemente el vector codificante para la proteína sin perjudicar el desempeño celular. Para esto se procedió a realizar infecciones con diferentes MOIs de cada adenovirus a utilizar en los posteriores ensayos (PKC α WT, PKC α DN, PKC δ WT, PKC δ DN y MOCK). Se hicieron infecciones con MOIs de 1000, 3000, 5000, 9000, 12000 partículas virales por cada célula a infectar. Las células NIH3T3 fueron mantenidas durante 24 horas con los adenovirus disueltos en medio completo (DMEM alta Glucosa, 10%SFB). Posteriormente, los extractos celulares fueron analizados mediante ensayo de Western Blot.

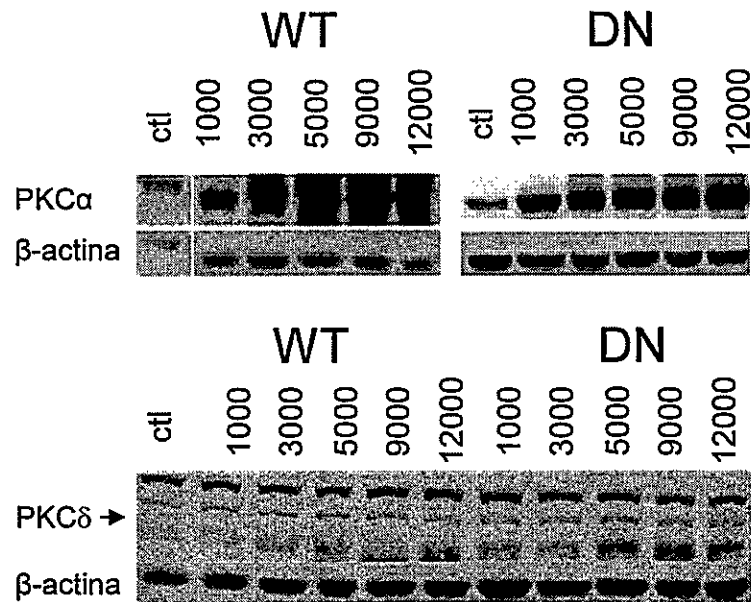


Figura 2. Curva MOI para los adenovirus codificantes para PKCs. Se sembró 250.000 células NIH3T3 en placas de 6cm, se les agregó adenovirus en las diluciones correspondientes a 1000, 3000, 5000, 9000, y 12000 partículas por cada célula a infectar (MOI: multiplicity of infection) en medio DMEM alta Glucosa, 10% SFB, y se mantuvieron por 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces para descartar la posibilidad de que aún quedaran virus viables. Los extractos celulares fueron analizados mediante ensayos de Western Blot.

2.2.7 Tratamiento de células NIH3T3 con adenovirus

Para poder analizar el efecto de PKCα y PKCδ, las células NIH3T3 se infectaron con adenovirus codificantes para PKCα WT (wild-type), PKCα DN (dominant-negative), PKCδ WT (wild-type), o PKCδ DN (dominant-negative). De acuerdo al ensayo de MOI (multiplicidad de infección) se determinó que la concentración de adenovirus para infectar la línea celular NIH3T3 de ATCC que se encuentra en nuestro laboratorio era 5000 virus por cada célula. Se sembraron 500.000 células NIH3T3 y se infectaron con MOI 5000 durante 24 horas en medio DMEM alta

Glucosa 10%SFB. Posterior al tratamiento las células se lavaron 2 veces con medio fresco para descartar el remanente de virus. Los extractos se hicieron de acuerdo al protocolo de preparación de extractos celulares (ver punto 2.2.2).

2.2.8 Tratamiento de células NIH3T3 infectadas con adenovirus + 4 β -TPA

Para ver el efecto que tendría PKC α sobre-expresada en conjunto con la adición de 4 β -TPA sobre la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2, las células NIH3T3 transducidas con el vector codificante para PKC α WT, PKC α DN y MOCK (vector vacío), luego de las 24 horas de infección, fueron incubadas en medio completo (DMEM alta Glucosa, 10% SFB) con la adición de 100nM de 4 β -TPA durante 24 horas. Luego de las 48 horas totales que duró el experimento, se procedió a extraer las proteínas de las células y mediante ensayo de Western Blot se analizó el contenido de Caveolina-1 y Caveolina-2 presentes.

2.2.9 Preparación de extractos celulares

Se removió el medio de cultivos celulares, se lavaron 2 veces con PBS 1X frío y se agregó 600 μ L de PBS 1X con una mezcla de inhibidores de proteasas (Benzamidina 10 μ g/mL, Antipaina 2 μ g/mL, Leupeptina 1 μ g/mL y PMSF 1mM) y un inhibidor de tirosina fosfatasas (Na_3VO_4 1mM). El pellet obtenido luego de una centrifugación de 3200 rpm se resuspendió en tampón de lisis el cual contiene detergente, tampón hepes (0,2M, pH 7,0-8,0) y la mezcla de inhibidores utilizada anteriormente.

Luego de homogenizar, los extractos celulares se sonicaron 2 veces durante 10 segundos y la concentración de proteínas fue determinada en el sobrenadante usando el ensayo de BCA.

2.2.10 Evaluación cuantitativa de experimentos y análisis estadístico.

Para evaluar cuantitativamente los resultados obtenidos mediante los ensayos de Western Blot, los films fueron escaneados a una resolución de 1200dpi y luego fueron cuantificadas las bandas mediante el programa UN-SCAN-IT gel Automated Digitizing System versión 4.1 para Windows® (Silk Scientific Corporation). Los resultados fueron enviados a una tabla de EXCEL de Microsoft office® y fueron normalizadas las concentraciones de las proteínas a analizar usando como referencia a la β -actina. Cada barra en los gráficos va asociada a su error estándar.

Para el análisis estadístico, se utilizaron los promedios y los errores estándar de al menos 3 experimentos independientes en cada caso, Se realizó para cada par de datos significativos una prueba T de student, utilizando una tabla EXCEL®, a partir de la cual se consideró significativo aquellos datos con valores menores o iguales a 0,05 en la prueba T.

2.2.11 SDS-PAGE y Western blot

El equivalente a 25 μ g de proteína total fue desnaturalado a 95°C durante 5 minutos en tampón de carga (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl, pH 6,8, β -mercapto etanol 5% y azul de bromofenol 0,1%) y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en tampón de corrida (Glicina 0,23 M, Tris 0,025 M y SDS

0,1%). Después de resolver, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Glicina 0,23 mM, Tris 25 mM y metanol 20%), la cual se tiñó con rojo Ponceau (Ponceau S 0,1% y ácido acético 0,5%) para verificar la transferencia de proteínas a la membrana. Luego se lavó la membrana con PBS y se bloqueó durante 1 hora con solución de bloqueo (leche 5% en PBS con Tween-20 0,1%) a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario: anti-Caveolina-1 hecho en conejo (1:5000); anti-Caveolina-2 hecho en ratón (1:1000); anti-PKC α hecho en conejo (1:10000), anti-PKC δ hecho en conejo (1:1000); anti-PKC ϵ hecho en conejo (1:1000); anti-PKC ζ hecho en conejo (1:1000), en solución de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces 5 minutos cada vez en PBS con Tween-20 0,1% y se incubaron con anticuerpo secundario anti IgG (de conejo o ratón según el anticuerpo primario) acoplados a HRPO (dilución 1:2500) diluido en PBS con Tween-20 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS 1X con Tween 20 0,1%, y 1 vez con PBS 1X, 5 minutos cada vez. Y luego se incubó con la solución ECL durante 5min, la cual mediante la reacción con el sustrato quimioluminiscente permite emitir una señal capaz de ser capturada en films radiográficos BioMax de Kodak.

2.2.12 Extracción de RNA

El RNA celular total se extrajo utilizando el reactivo Trizol® de Invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante. En términos generales, el procedimiento consiste en una primera etapa en la que se disociaron los componentes celulares con el reactivo Trizol® y se segregó el RNA a la fase acuosa al agregar cloroformo. Luego,

se precipitó el RNA con isopropanol y se lavó con etanol 75%. Finalmente, se secó el RNA y se resuspendió en agua libre de RNAsas y con RNasin 0,5 U/ μ L. La pureza del RNA fue verificada mediante la determinación de la razón de la absorbancia a 260/280 nm y la integridad, mediante visualización del RNAr de 28S y 18S en geles de agarosa al 1% en condiciones denaturantes.

2.2.13 Transcripción reversa y análisis por PCR

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA, primero se realizó la siguiente mezcla:

Mezcla Transcripción Reversa A	
RNA total (1 μ g/ μ L)	5 μ L
Random Primers (50 μ M)	2 μ L
Agua libre de RNAsa	2,2 μ L

Se calentó a 70°C por 5 min, luego se colocó en hielo y se le agregó la siguiente mezcla:

Mezcla Transcripción Reversa B	
Tampón 5x Transcriptasa Reversa AMV	4 μ L
dNTPs (10mM c/u)	6 μ L
RNasin (40 U/ μ L)	0,3 μ L
Transcriptasa Reversa AMV (9 U/ μ L)	0,5 μ L

Se incubó por 2 horas a 45°C y finalmente a 95°C por 5min para inactivar la enzima.

La amplificación se realizó utilizando la mezcla siguiente:

Mezcla PCR	
Tampón 10x Taq pol	5 µL
dNTPs (2mM c/u)	3 µL
MgCl ₂ (25mM)	3 µL
Partidor sentido Caveolina-1 (10µM)	2 µL
Partidor antisentido Caveolina-1 (10µM)	2 µL
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2 µL
cDNA	2 µL
Agua nanopura	31,8µL

Se realizó la PCR utilizando un programa donde el primer ciclo tuvo una temperatura inicial de denaturación de 94°C por 5 min, luego se realizaron 20 ciclos con temperatura de denaturación de 94°C por 1 min, una temperatura de apareamiento de 55°C por 30 seg, y una temperatura de extensión de 72°C por 45 seg. Al final se realizó una extensión final de 10 min a 72°C.

Los partidores utilizados para Caveolina-1 de ratón fueron:

5' ATG GCA GAC GAG GTG ACT GAG A 3'

3' CTG CTG CGA GAG CAA CTT GGA A 5'

Con los cuales se esperaba un producto de PCR con un fragmento de 500 pb.

Los partidores utilizados para Caveolina-2 de ratón fueron:

5' GCT TCG AGG ATC TGA TTG CAG AG 3'

3' TCA GTT GCA TGC TGA CCG ATG AG 5'

Con los cuales se esperaba un producto de PCR con un fragmento de 300 pb.

Los partidores utilizados para β -actina fueron:

5' GCA TTG TAA CCA ACT GGG ACG 3'

3' CAT GAG GTA GTC TGT CAG GTC 5'

Con los cuales se esperaba un producto de PCR con un fragmento de ~380 pb.

2.2.14 Protocolo inmunofluorescencia

Las células se sembraron sobre cubreobjetos y fueron tratadas según condiciones descritas más adelante (ver resultados). Una vez finalizado el período de incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavó 2 veces con PBS/ Na_3VO_4 1 mM y las células se fijaron con TREVOR (Paraformaldehído 4%, en buffer PIES 100 mM, pH 6,8 que contiene KOH 0,04 M, EGTA 2 mM, MgCl 2 mM) por 30 min, luego se lavó 2 veces con glicina 5 mM en PBS por 5 min cada vez y posteriormente las células se permeabilizaron con TRITON X-100 al 0.1% en PBS más Na_3VO_4 1mM por 5 min. Luego las células se bloquearon con BSA 1% por 30 min y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-Caveolina-1 diluido 1:200 en solución de bloqueo por 1 hora a 37°C en ambiente húmedo. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS/ Na_3VO_4 1 mM por 5 min cada vez e incubadas con el anticuerpo anti-IgG de conejo-FITC (verde) diluido 1:200 y Faloidina Sigma 1:1000 (rojo) por 1 hora a 37°C en ambiente húmedo, y lavadas de 3 veces con PBS/ Na_3VO_4 1 mM por 5 min cada vez. Finalmente, una vez lavado el cubreobjeto en agua nanopura, fue montado sobre un portaobjeto en medio de montaje que contiene Mowiol 13,3%-DABCO 2,5% en Tris pH 8,5 y glicerol 30% y almacenado en oscuridad a 4°C hasta su posterior observación en el microscopio confocal.

2.2.15 Ensayo de Crecimiento independiente de Anclaje

Se agregó 10.000 células a 2,5 mL de una mezcla que contenía agar blando 0,6%, medio DMEM alta Glucosa 1X y 10% SFB y se depositó sobre una placa de Petri de 6cm (preparada el día anterior y congeladas a 4°C para solidificación) la cual contenía 2,5 mL de agar blando 1%, medio DMEM alta Glucosa 2X y 10% SFB. Dependiendo de la condición, a la capa superior de agar que contenía las células, se le agregó 4 β -TPA 100 nM (para las NIH3T3) o IPTG 5mM (para las A10). Se realizó un seguimiento cada 2 días, agregando algunas gotas de medio DMEM alta Glucosa 1X, 10% SFB conteniendo 4 β -TPA 100 nM o IPTG 5 mM según fuera el caso, para evitar que se deshidratara el agar y a la vez mantener a las células con el estímulo, en caso de que se hidrolizara. Una vez pasada 2 semanas, se realizó el conteo del número de colonias, y los datos fueron expresados en n° de colonias/n° total de células sembradas.

2.2.16 Análisis estadísticos

Los resultados fueron comparados estadísticamente utilizando el test t de Student para el caso de dos muestras dependientes donde cada caso se apareó individualmente con su control. Los datos analizados de esta forma fueron indicados específicamente en las respectivas leyendas de las figuras. Todos los resultados fueron de tres o más experimentos independientes utilizando un intervalo de confianza de 95%.

3 RESULTADOS

Los objetivos generales de este trabajo fueron determinar cuál es el papel que cumplen algunas isoformas de PKCs en la regulación transcripcional y/o post-transcripcional de Caveolina-1 y de Caveolina-2, y estudiar si la reducción de los niveles de Caveolina-1 mediante PKCs en la línea celular NIH3T3 de ATCC lleva a una transformación celular. Cabe mencionar que dada la estrecha relación entre Caveolina-1 y Caveolina-2 todos los experimentos se desarrollaron simultáneamente para estas dos isoformas de la proteína.

3.1 Determinar la posible participación de PKCs en la regulación de la expresión de Caveolina-1 y evaluar si la activación y/o la desaparición de PKCs se asocian a la pérdida de Caveolina-1 en presencia de 4β -TPA

3.1.1 Ensayo de dosis respuesta frente a 4β -TPA

Primeramente, se determinó si existía una relación entre los niveles de las proteínas PKCs y los niveles de ambas isoformas de la proteína Caveolina presentes en la línea celular NIH3T3. Para ello se realizó un ensayo de dosis-respuesta utilizando 4β -TPA como activador irreversible de PKCs.

A las distintas concentraciones del éster de forbol utilizadas se observaron luego de 24 horas diferencias para los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2 en las células NIH3T3.

A una concentración de 20 nM de 4 β -TPA una disminución significativa de los niveles de ambas isoformas de Caveolina fueron observadas mediante ensayos de Western Blot, cuyos promedios se observan en la figura 3A. A concentraciones mayores del éster de forbol, se observó un aumento gradual en los niveles de Caveolinas siendo mayor a 250 nM. Sin embargo, a 1000 nM de 4 β -TPA los niveles de Caveolinas descendieron a un nivel semejante a los de la condición control (0 nM 4 β -TPA).

Por lo tanto, se puede apreciar que 4 β -TPA tiene un efecto reductor de los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2 sobre las células en algunas concentraciones, mientras que en otras, aumenta los niveles basales de Caveolinas. Sin embargo, no fue posible determinar consistentemente cual sería la mejor concentración de 4 β -TPA para realizar los experimentos, debido a los grandes errores estándar obtenidos en los datos. A pesar del hecho que el promedio corresponde a 3 experimentos independientes, al realizar una prueba T, no se observaron diferencias significativas menores al 5%. Vale destacar que se realizó este experimento al inicio de la tesis, cuando las condiciones experimentales aún no estaban bien establecidas.

Por otro lado, se determinó el efecto de distintas concentraciones de 4 β -TPA sobre los niveles de PKC α , durante 24 horas (ver figura 3B). Se observó una disminución gradual del nivel de PKC α a medida que aumenta la concentración del éster de forbol, disminuyendo el nivel de PKC α a 5 veces menos que el de la condición control cuando se incuban las células con 100 nM de 4 β -TPA. Por lo cual se decidió utilizar esta concentración de 4 β -TPA para los ensayos de estimulación posteriores, a pesar de que las concentraciones de 50 nM y 1000 nM también redujeron de los niveles de la proteína PKC α significativamente.

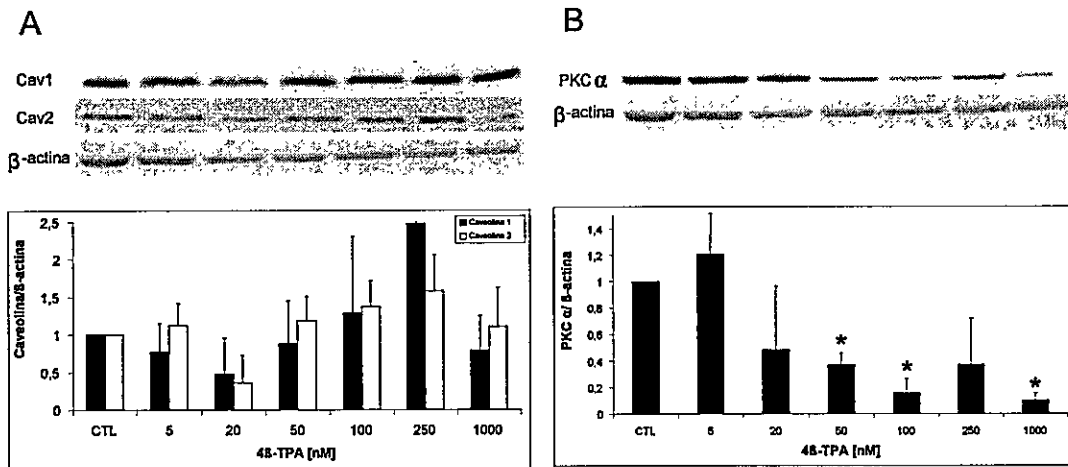


Figura 3. Efecto de distintas concentraciones de 4β-TPA sobre los niveles de Caveolina-1, Caveolina-2 y PKCα en las células NIH3T3 de ATCC. Se probó el efecto de distintas dosis de 4β-TPA sobre células NIH3T3 con el fin de evaluar su efecto sobre la expresión de las proteínas Caveolina-1 y Caveolina-2. Se sembraron 800.000 células en placas de 10cm y después de 4 horas se les agregó 4β-TPA en distintas concentraciones. Las concentraciones utilizadas correspondieron a 5, 20, 50, 100, 250 y 1000 nM. Después de 24 horas en presencia de 4β-TPA se hicieron los extractos y se determinaron los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2 (figura A) y PKCα (figura B) por Western Blot usando anticuerpos específicos. Se muestra el resultado de un experimento representativo. Se cuantificaron los resultados de varios experimentos (n=3) por análisis densitométrico. Se muestran los promedios ± el error estándar de 3 experimentos. Las diferencias significativas se indican con un asterisco (*, p≤ 0,05).

3.1.2 Cinética de activación/degradación de PKCs dependiente de 4β-TPA

Debido a que las PKCs se degradan rápidamente luego de activarse, para evaluar el efecto que se produce al activar las proteínas PKCs con el éster de forbol, se midieron los cambios en los niveles de las PKCs en presencia de 4β-TPA (100 nM) durante 24 horas.

A partir de este ensayo se observó que de las 4 isoformas de las proteínas PKCs existentes en la línea celular NIH3T3 de ATCC, solamente los niveles de PKC α y PKC δ se redujeron en presencia del éster de forbol (figura 4). La disminución de los niveles de PKC α y PKC δ fue gradual a lo largo del tiempo cuando las células fueron expuestas a 100nM de 4 β -TPA, siendo mayor el efecto luego de 24 horas. Cabe notar que fue más rápida la disminución para PKC δ que para PKC α . Por otro lado, la exposición a 4 β -TPA (100 nM) no tuvo ningún efecto sobre los niveles de las isoformas PKC ϵ y PKC ζ en las células. Con este experimento se demostró que la concentración de 4 β -TPA utilizada (100 nM), produjo una disminución de más del 80% en los niveles de PKC α y PKC δ después de 24 horas.

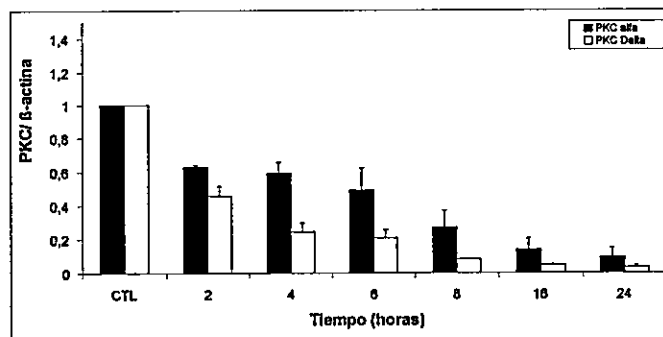
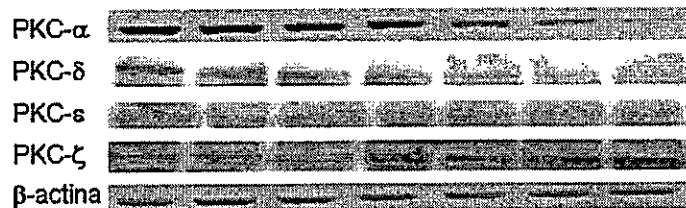


Figura 4. Efecto de 4 β -TPA en la disminución de PKCs. Se sembraron 800.000 células NIH3T3 en placas de 10cm y después de 4 horas se les agregó 100nM de 4 β -TPA disuelto en medio DMEM High Glucosa Glucosa, 10% SFB. En la figura se puede observar el efecto que produce el 4 β -TPA sobre la expresión de PKCs en función del tiempo. Se observa un blot representativo indicando el efecto en el tiempo de 4 β -TPA (100 nM) sobre las isoformas PKC α , δ , ϵ , ζ . Solamente hubo cambios significativos para PKC α y PKC δ . Se muestra la cuantificación densitométrica de aquellos cambios en PKC α y PKC δ de 3 experimentos

independientes \pm error estándar. Todos los valores que se muestran resultaron ser significativos con $p \leq 0,05$ en comparación al control.

3.1.3 Cinética de desaparición de Caveolina-1 y Caveolina-2 dependiente de 4β -TPA

Habiendo ya determinado la concentración de 4β -TPA a utilizar, se realizó una cinética de desaparición de las proteínas Caveolina-1 y Caveolina-2. Se utilizó únicamente la concentración 100 nM del éster de forbol, para poder evaluar si la disminución de las proteínas PKCs observada al tratar las células con 4β -TPA se relacionaba de alguna forma con los cambios en la expresión de Caveolina-1 y -2.

Mediante análisis por densitometría de 3 experimentos (figura 5), se observó que en el intervalo de 0 a 8 horas no hubo una diferencia entre los niveles basales de Caveolinas con respecto a la condición control (0 horas). A las 24 horas se observó una disminución en los niveles de Caveolina-1 consecuente a lo observado en las cantidades de PKC α y PKC δ , las cuales disminuyeron en mayor medida a 24 horas después de haber agregado 4β -TPA (100 nM). Además, los niveles de Caveolina-2 también se vieron afectados a las 24 horas, al ser tratadas las células con 4β -TPA (100 nM), pero el efecto observado fue menor en comparación al observado para Caveolina-1 en las mismas condiciones. Con estos resultados enfocamos los experimentos posteriores a ser analizados tras 24 horas de incubación con 4β -TPA (100 nM).

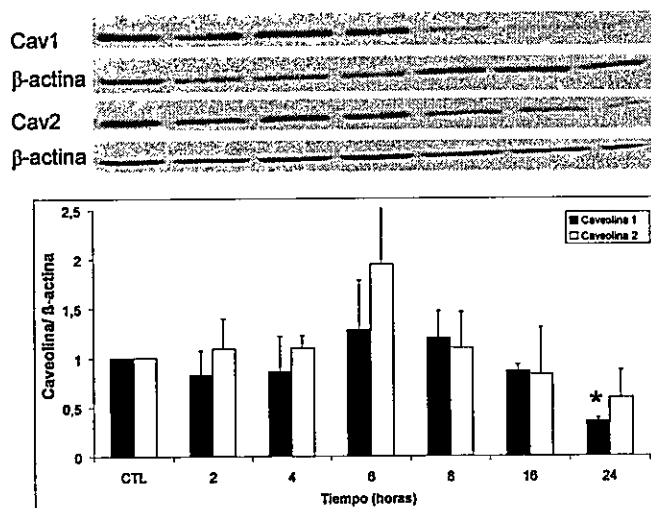


Figura 5. Desaparición de Caveolina-1 y Caveolina-2 en presencia de 4β -TPA. Se sembraron 800.000 células NIH3T3 en placas de 10cm. Se agregó 4β -TPA 100nM a 24, 16, 8, 6, 4 y 2 horas posterior a la siembra, para tener la misma confluencia al finalizar el experimento. Las células fueron extraídas y analizadas por Western Blot. Observando una notoria disminución de la cantidad proteica de Caveolina-1 a las 24 horas de tratamiento. Las diferencias significativas en comparación al control se muestran con *, para un $p \leq 0,05$. Para Caveolina-2 el efecto es más débil y no resultó ser estadísticamente significativo.

3.1.4 Efecto de distintos inhibidores farmacológicos de PKCs sobre los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2.

Una vez determinada la concentración y el tiempo necesario para observar el efecto del 4β -TPA sobre los niveles basales de las Caveolinas, se utilizaron 2 inhibidores para evaluar cual era la participación de las proteínas $PKC\alpha$ y $PKC\delta$ en aquel efecto. Para ello, se utilizaron los inhibidores bisindolylmaleimide (BIM, inhibidor general de las PKCs clásicas o calcio dependientes) y Röttlerin, inhibidor de $PKC\delta$.

En el gráfico de la figura 6, se muestra el efecto que produjo cada inhibidor sobre la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en un promedio de 5 experimentos

independientes. En aquellas células que fueron incubadas con el inhibidor BIM (5 μ M) los niveles proteicos de Caveolina-1 y Caveolina-2 se mantuvieron constantes con respecto al control, mientras que las células que fueron incubadas con el inhibidor Röttlerin (5 μ M) presentaron una disminución en los niveles basales de Caveolina-2, pero no en los niveles de Caveolina-1.

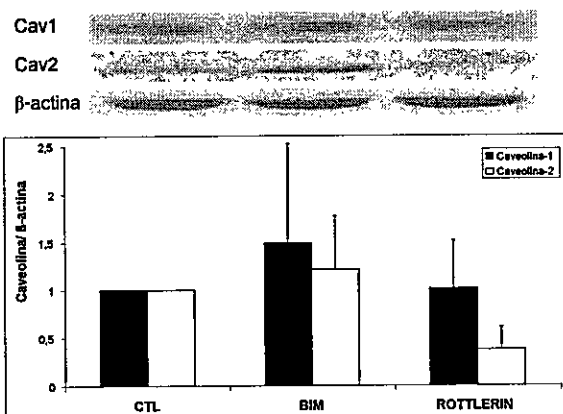


Figura 6. Expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en respuesta a distintos inhibidores farmacológicos de PKCs. Se sembraron 250.000 células NIH3T3 de ATCC en placas de 6cm, al día siguiente se agregó BIM (5 μ M) (inhibidor de cPKCs) o Röttlerin (5 μ M) (inhibidor de PKC δ), luego de 24 horas se retiró el medio y se preparó los extractos correspondientes. El análisis fue hecho mediante Western Blot y se determinaron los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2. En la figura se aprecia un experimento representativo junto al análisis densitométrico de 5 experimentos independientes. Todas las cuantificaciones fueron normalizadas de acuerdo a la cantidad de actina.

Además del ensayo con inhibidores, se realizó un ensayo con los mismos inhibidores en presencia de 4 β -TPA durante 24 horas (100 nM), el cual se agregaba 30 min después de haber agregado los inhibidores (figura 7), tiempo suficiente para permitirle a los inhibidores realizar su respectiva inhibición. Se observó para el caso de BIM (5 μ M) que las cantidades de Caveolina-1 y Caveolina-2 se mantuvieron parecidas con respecto al control, de lo cual se infirió que la inhibición de PKC α parece ser

importante para prevenir la desaparición de Caveolinas. Mientras que con Röttlerin (5 μ M) se observó claramente una disminución de Caveolina-1 semejante a la observada con 4 β -TPA. Cabe notar que para el caso de la incubación con Röttlerin en presencia de 4 β -TPA, los niveles basales de Caveolina-2 se mantuvieron iguales a los observados en el caso de la incubación con el inhibidor solo.

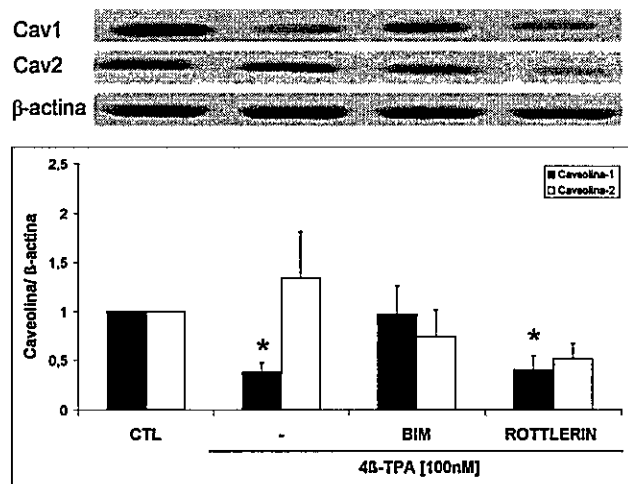


Figura 7. Expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en respuesta a distintos inhibidores farmacológicos de PKCs junto con la adición de 4 β -TPA. Se sembraron 250.000 células NIH3T3 de ATCC en placas de 6cm, al día siguiente se agregó BIM 5 μ M (inhibidor de cPKCs) o Röttlerin 5 μ M (inhibidor de PKC δ), luego de 20 minutos se les agregó 4 β -TPA a una concentración final de 100nM, Posterior a las 24 horas se retiró el medio y se realizaron los extractos correspondientes. El análisis fue hecho mediante Western Blot y se determinaron los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2. Las diferencias resultaron significativas para un $P \leq 0,05$ (*) en comparación al control.

3.1.5 Análisis de RT-PCR en células NIH3T3 de ATCC incubadas con 4 β -TPA.

Para evaluar si la regulación de Caveolina-1 y Caveolina-2 mediada por PKC α es transcripcional o post-transcripcional se realizó un ensayo de RT-PCR. Para ello se les agregó a las células NIH3T3 una concentración 100 nM de 4 β -TPA a diferentes

horas (0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas) teniendo la precaución de confirmar la actividad del 4 β -TPA mediante Western Blot. A partir de este ensayo se determinó que los datos presentados no eran estadísticamente significativos como para confirmar o descartar una regulación transcripcional. De esta forma sólo es posible hablar de una regulación post-transcripcional en este caso. A continuación se muestra en la figura 8 los resultados obtenidos del análisis mediante RT-PCR.

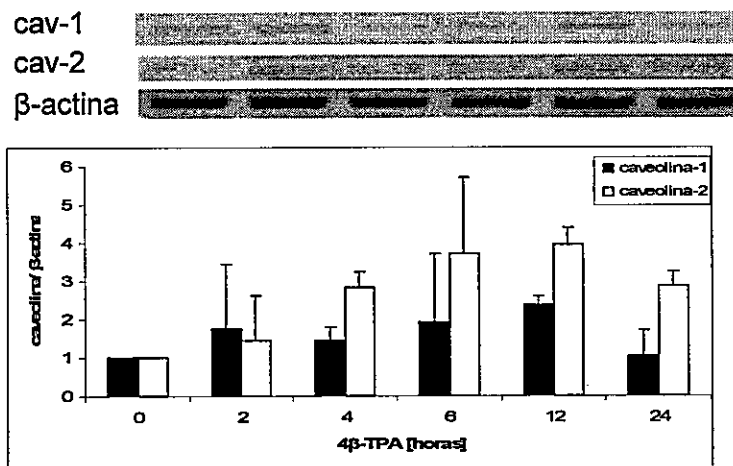


Figura 8. RT-PCR de células NIH3T3 incubadas con 4 β -TPA. Se sembraron 250.000 células en placas de 6cm, y se les agregó medio completo (DMEM High Glucosa, 10%SFB), con 100 nM de 4 β -TPA. Luego de 24 horas, las células se extrajeron con Trizol®, y se procedió, según materiales y métodos, con la extracción del mRNA. Luego de realizar la reacción de RT-PCR, los productos amplificados de mRNA fueron evaluados en un gel de agarosa al 1%. Y la cuantificación de los resultados fue hecha mediante análisis densitométrico. Las diferencias no resultaron ser significativas para un $P \leq 0,05$ (*).

3.1.6 Transducción de células NIH3T3-ATCC mediante adenovirus.

Anteriormente se determinó que existe una contribución por parte de la proteína PKC α sobre la regulación de los niveles proteicos de Caveolina-1 y Caveolina-2. Para poder corroborar lo anterior, se utilizó células NIH3T3 transducidas transientemente con vectores adenovirales codificantes para PKC α WT (wild-type) y PKC α DN (dominant-negative).

Los resultados mostraron que a las 24 horas de transducción con el adenovirus codificante para PKC α WT (figura 9A) los niveles basales de Caveolina-1 disminuían a menos de la mitad en relación al control. Y por el contrario, se observó que aquellas células que expresaban PKC α DN mantenían los niveles proteicos de Caveolina-1 semejantes al control.

Para el caso de Caveolina-2 es importante notar que a pesar de que los errores estándar resultaron ser amplios, las transducciones con los adenovirus produjeron por si solas un efecto en los niveles basales de Caveolina-2, por lo cual no fue posible sacar conclusiones para este caso. En la figura 9B, se observa que el aumento en PKC α con ambos adenovirus fue mayor a 4 veces.

Se realizó experimentos similares para los constructos de PKC δ WT y PKC δ DN. Sin embargo, como se muestra en materiales y métodos (figura 1) nunca hubo un aumento significativo en la expresión de PKC δ con estos constructos.

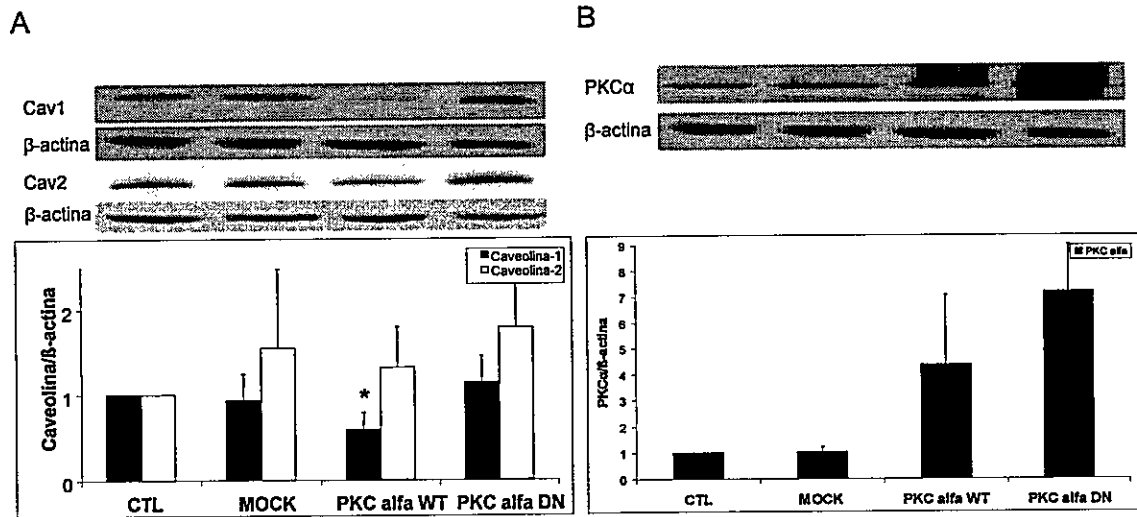


Figura 9. Expresión de Caveolina-1 en células NIH3T3 de ATCC infectadas por adenovirus codificantes para PKCs. Se utilizaron adenovirus codificantes para PKC α WT (wild-type), PKC α DN (dominant-negative) y MOCK (vector vacío). Los adenovirus se diluyeron en medio de crecimiento completo (DMEM High Glucosa, 10%SFB) a una multiplicidad de infección de 5000 partículas virales por cada célula a infectar (MOI=5000). Se mantuvo las células durante 24 horas, posterior a la infección, y luego se realizó un ensayo de Western Blot para determinar los niveles de expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2. En la figura A se observa la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2, de un promedio de 5 experimentos independientes, donde se ve una disminución en los niveles de Caveolina-1 proveniente de células transducidas con el vector codificante para PKC α WT con respecto al control, no así en los niveles de Caveolina-2. Las diferencias significativas en comparación al control se muestran con *, para un $p \leq 0,05$. En la figura B se observa la sobreexpresión de PKC α mediante los adenovirus, note que el aumento de PKC α varía aproximadamente de 6 a 7 veces.

3.1.7 Efecto del 4 β -TPA sobre células NIH3T3 transducidas con PKC α mediante adenovirus.

Una vez observado el efecto que se produjo con los adenovirus para PKC α sobre los niveles basales de Caveolinas, se procedió a combinar este ensayo con la adición de 4 β -TPA (100 nM), para evaluar si se podría modular de esta manera el efecto de 4 β -TPA sobre las concentraciones de Caveolinas.

La disminución de la concentración de Caveolina-1 observada para células transducidas con PKC α WT e incubadas con 4 β -TPA en este experimento, no fue diferente a la obtenida ya sea por el ensayo de infección con adenovirus o el ensayo de incubación con 4 β -TPA por separados. Al parecer, no existiría un efecto aditivo de disminución de Caveolina en este caso (figura 10). Se analizará con mayor detalle este caso en la discusión.

Para PKC α DN se observó un bloqueo de la disminución de Caveolina-1 en presencia de 4 β -TPA, sugiriendo nuevamente que la activación de la proteína PKC α sería necesaria para disminuir la concentración de Caveolina-1 (figura 10).

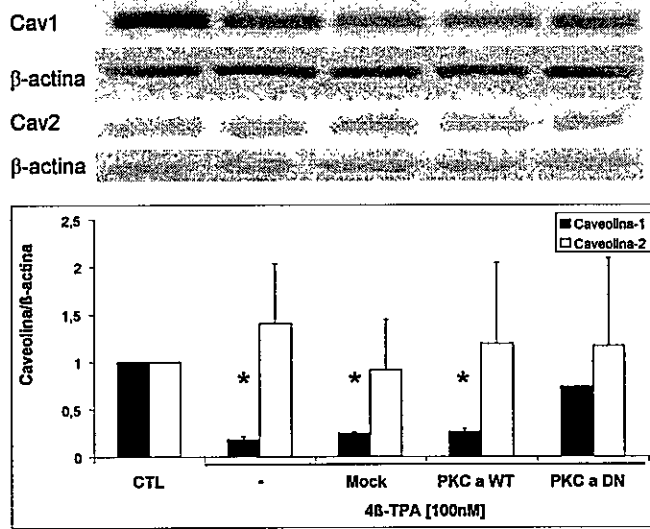


Figura 10. Efecto del 4β-TPA sobre células NIH3T3 transducidas con PKCαWT. Las células NIH3T3 de ATCC fueron transducidas durante 24 horas con adenovirus codificantes para PKCαWT (wild-type), PKCα DN (dominant-negative) y MOCK (vector vacío). Posterior a la infección, se les retiró el medio y se les agregó medio completo con 100nM de 4β-TPA. Luego de 24 horas con la droga se hizo los extractos que fueron analizados mediante Western Blot. Se observa que el efecto de 4β-TPA en células controles o transducidas con PKCα WT, es el mismo. Mientras que para PKCα DN, se observa solamente una leve disminución con respecto a la condición control. Se utilizó además un vector vacío como condición control de transducción. Las diferencias significativas en comparación al control se muestran con *, para un $p \leq 0,05$.

3.1.8 Efecto de distintos inhibidores farmacológicos sobre los niveles basales de Caveolina-1 y Caveolina-2.

Una vez determinada la relación existente entre PKCα y Caveolinas, se utilizó inhibidores de posibles blancos asociados a los efectos de PKCα. Para este propósito, se utilizó LY294002 (inhibidor de PI3K), PD98059 (inhibidor de MEK1), SP600125

(inhibidor de JNK) y SB203580 (inhibidor de p38). Se observó que todos los inhibidores por si solos tenían un efecto, aumentando en mayor o menor grado las cantidades de Caveolinas con respecto a la condición control (figura 11). Sin embargo, en ningún caso el aumento fue estadísticamente significativo para Caveolina-1 pero si para Caveolina-2.

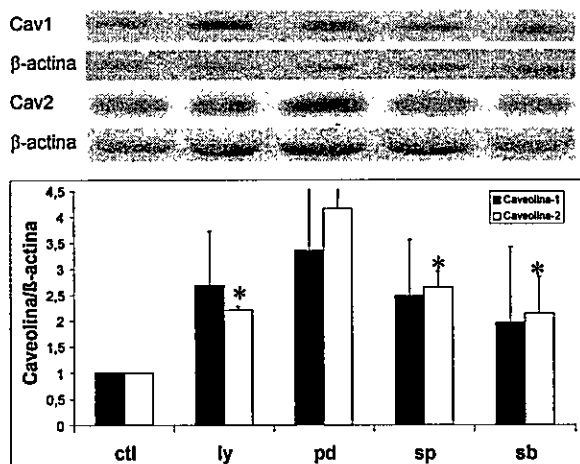


Figura 11. Efecto de distintos inhibidores farmacológicos sobre la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2. Se sembraron 250.000 células NIH3T3 de ATCC en placas de 6 cm, al día siguiente se agregó LY294002 10 μ M (inhibidor de PI3K), PD98059 50 μ M (inhibidor de MEK1, vía de las MAPK), SP600125 10 μ M (inhibidor de JNK) y SB203580 20 μ M (inhibidor de p38), luego de 24 horas se retiró el medio y se prepararon los extractos correspondientes. El análisis fue hecho mediante Western Blot y se determinaron los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2 en promedio de 3 ensayos independientes. Las diferencias significativas en comparación al control se muestran con *, para un $p \leq 0,05$.

Además de este ensayo, los mismos inhibidores se utilizaron en presencia de 4 β -TPA. Se observó que con LY294002 los niveles de Caveolina-1 se mantuvieron en presencia de 4 β -TPA, mientras que con PD98059 se observó que Caveolina-1

disminuyó su concentración con respecto al control. Para Caveolina-2 ninguno de los dos inhibidores tuvo efecto. Con SP600125 en presencia de 4 β -TPA se observó un aumento leve de Caveolina-1 pero una casi completa desaparición de Caveolina-2. Por otra parte, con SB203580 en presencia de 4 β -TPA ambas Caveolinas desaparecieron casi completamente (figura 12). Estos resultados indican que existen mecanismos bastante distintos que controlan la presencia o ausencia de Caveolina-1 y -2.

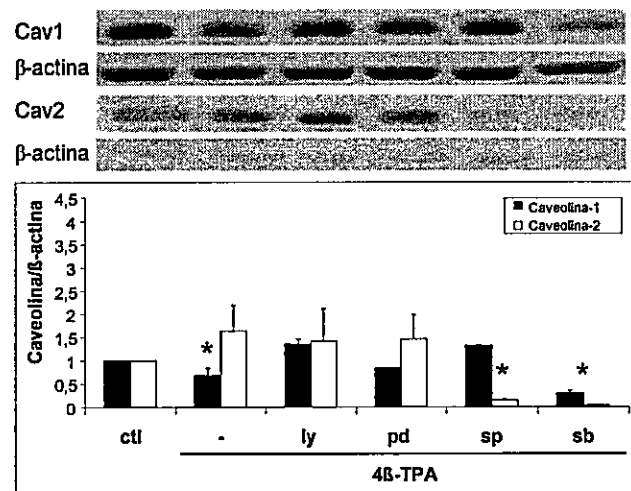


Figura 12. Expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2 en respuesta a distintos inhibidores farmacológicos junto con la adición de 4 β -TPA. Se sembraron 250.000 células NIH3T3 de ATCC en placas de 6 cm, al día siguiente se agregó LY294002 10 μ M (inhibidor de PI3K), PD98059 50 μ M (inhibidor de MEK1, vía de las MAPK), SP600125 10 μ M (inhibidor de JNK) y SB203580 20 μ M (inhibidor de p38), luego de 20 minutos se les agregó 4 β -TPA a una concentración final de 100 nM, Posterior a las 24 horas se retiró el medio y se realizaron los extractos correspondientes. El análisis fue hecho mediante Western Blot y se determinaron los niveles de Caveolina-1 y Caveolina-2 en promedio de 3 ensayos independientes. Las diferencias significativas en comparación al control se muestran con *, para un $p \leq 0,05$.

3.1.9 Efecto de inhibidores farmacológicos sobre células NIH3T3 transducidas con adenovirus de PKC α .

Una vez determinado el efecto de PKC α sobre la expresión de Caveolina-1 y Caveolina-2, nos propusimos averiguar si el efecto que se produce con los inhibidores LY294002, PD98059, SP600125 y SB2030580 es río arriba o río abajo de la PKC α . Para ello se utilizaron células NIH3T3 de ATCC transducidas con adenovirus codificante para PKC α WT y se les agregaron los inhibidores bisindolylmaleimide, Röttlerin, LY294002, PD98059, SP600125 y SB2030580, 30 min previo a la adición de 4 β -TPA (100 nM) por un período de 24 horas.

En la figura 13A se observa el efecto que tienen los inhibidores sobre células transducidas con PKC α WT, observando que para casi todos los inhibidores hubo disminución de los niveles de Caveolina-1 con excepción de LY294002 y BIM donde se observó una leve disminución en comparación con el resto.

Por otra parte, en la figura 13B se observó al igual que en el caso anterior una disminución de los niveles de Caveolina-1 y de la misma forma se observa con BIM una disminución menor en comparación a los otros dos inhibidores.

Cabe notar que para ambas figuras la regulación de Caveolina-1 resultó ser diferente en comparación con Caveolina-2 donde las variaciones de la proteína con los diferentes inhibidores no resultó ser significativa en general. Esto, al igual que en la figura 12 indica que existirían mecanismos diferentes que controlan la presencia o ausencia de Caveolina-1 y -2.

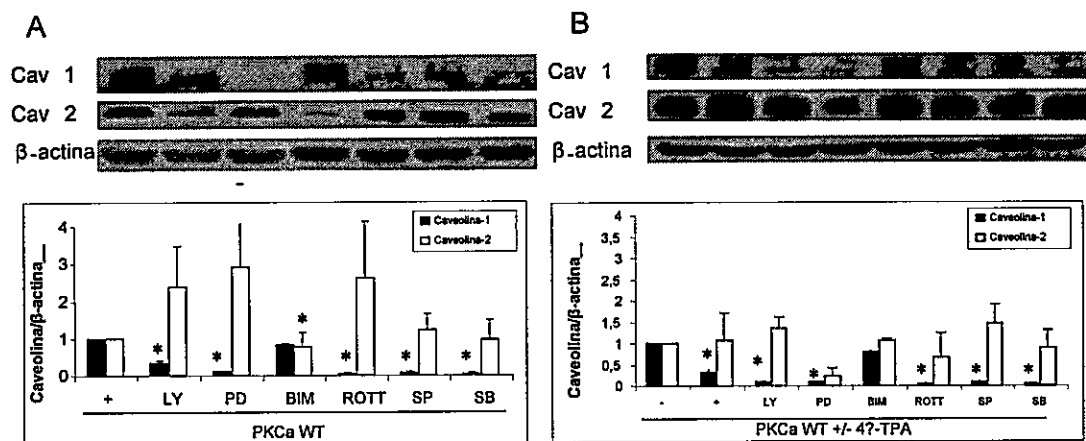


Figura 13. Efecto de inhibidores farmacológicos sobre células NIH3T3 transducidas con adenovirus de PKC α . El tratamiento de las células NIH3T3 de ATCC se realizó infectando todas las células con adenovirus codificantes para PKC α WT en medio completo durante 24 horas, MOI 5000. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces y se agregó los siguientes inhibidores: LY294002 10 μ M, PD98059 50 μ M, BIM, Röttlerin, SP600125 10 μ M y SB2030580 20 μ M durante 24 horas (A). Adicionalmente se esperó 20 minutos antes de agregar 4 β -TPA (100 nM) durante 24 horas (B). Después las células fueron lavadas y se prepararon extractos, los cuales fueron analizados mediante Western Blots. Las diferencias significativas en comparación al control se muestran con *, para un $p \leq 0,05$.

3.2 Estudiar los cambios de morfología de las células NIH3T3 de ATCC en presencia de 4 β -TPA.

3.2.1 Microscopía de contraste de fase de células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA.

Durante la realización de los ensayos con 4 β -TPA, se observó mediante microscopía óptica de contraste de fase que las células cambiaban su forma luego de ser tratadas con el éster de forbol. Se observó la morfología en células tratadas y no

tratadas con 4 β -TPA (100 nM) encontrando que aquellas células expuestas al éster de forbol durante 24 horas poseían una morfología alargada con mayor número de prolongaciones, un soma más pequeño que las células normales, y una forma estrellada (figura 14).

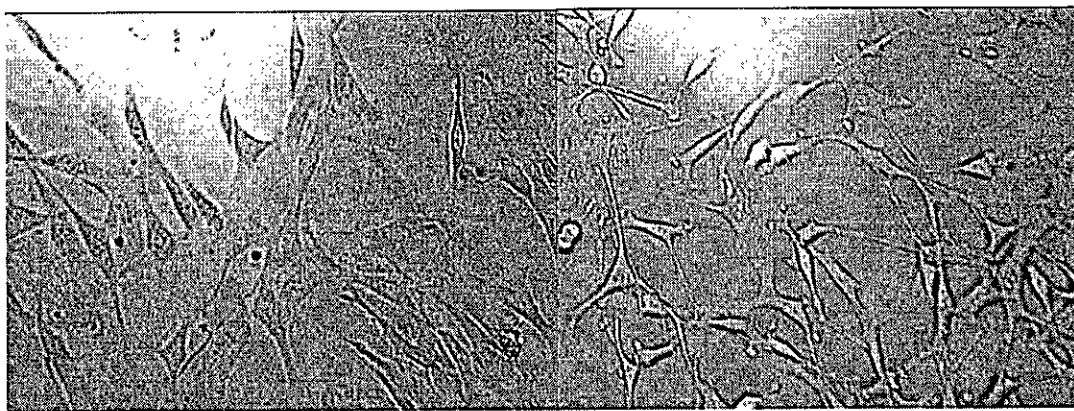


Figura 14. Morfología de células NIH3T3 expuestas a 4 β -TPA. Las células se incubaron con 100 nM de 4 β -TPA durante 24 horas y su morfología se visualizó mediante un microscopio de luz invertido, con contraste de fase. En la foto de la izquierda se observan células sin tratar. Al lado derecho se observan células tratadas con el éster de forbol las cuales poseen una morfología alargada en comparación a las NIH3T3 sin tratar. En ambos casos el aumento fue de 400X. La barra horizontal corresponde a 10 μ m.

3.2.2 Microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) de células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA

Para corroborar lo observado por microscopía de contraste, se realizó experimentos con microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC), a partir de la cual se obtuvo los mismos resultados anteriormente mostrados, donde la morfología de las células tratadas con 4 β -TPA (100 nM) durante 24 horas poseía mayor número de prolongaciones, una forma estrellada y un soma aparentemente más

pequeño que las células normales y que las células tratadas con la isoforma inactiva de éster de forbol (4α -TPA)(figura 15).

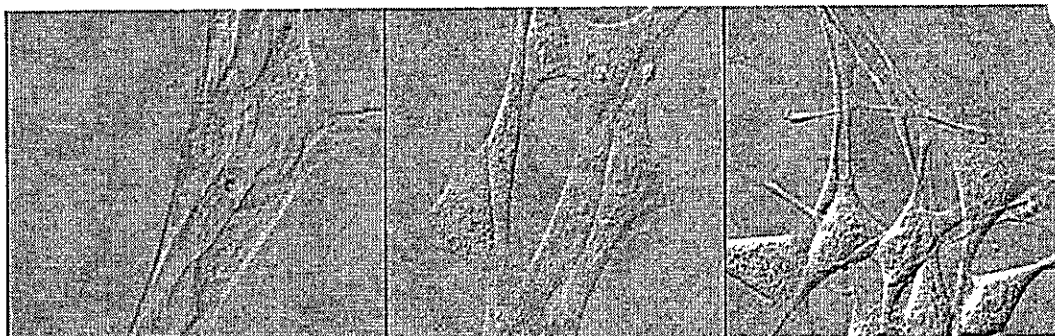


Figura 15. Morfología de células NIH3T3 expuestas a 4β -TPA. Las células fueron incubadas con 100 nM de 4β -TPA durante 24 horas y su morfología fue visualizada mediante un microscopio diferencial de contraste de interferencia (DIC). En la foto de la izquierda se observan células sin tratar. Al medio se encuentra una foto de células tratadas con 4α -TPA. Y al lado derecho se observan células tratadas con 4β -TPA. Nótese la morfología alargada en comparación a las NIH3T3 sin tratar y control negativo. En ambos casos el aumento fue de 600X. La barra horizontal corresponde a 10 μ m.

3.2.3 Microscopía confocal de células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4β -TPA.

Para evaluar si esos cambios observados en las células NIH3T3 se relacionaban con algún tipo de cambio en la distribución de las proteínas Caveolina-1 y Caveolina-2 dentro de la célula, se realizó ensayos de microscopía confocal de inmunofluorescencia indirecta.

Se observó cambios en la distribución de Caveolina-1 (Flechas blancas) en las células incubadas con 4β -TPA (100 nM) con respecto a la condición control (figura 16). Las células incubadas con 4β -TPA mostraron una reducción de su soma mostrando proyecciones varicosas de éste en comparación a las células en la condición control.

Si bien se puede observar en la figura 16 una disminución aparente de Caveolina-1, esta reducción de los niveles de Caveolina-1 es sólo cualitativa en estos experimentos.

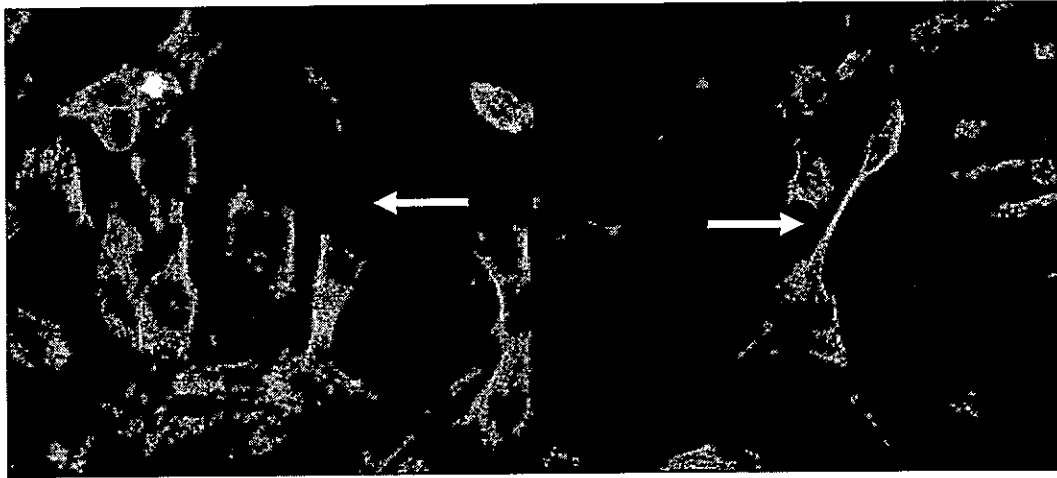


Figura 16. Distribución de Caveolina-1 en células NIH3T3 de ATCC tratadas con 4 β -TPA.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 10 cm, para luego de realizado el ensayo, los cubreobjetos pudieran ser retirados para preparar las muestras para microscopía confocal. Las células se fijaron, permeabilizaron y la F-actina se visualizó usando faloidina marcada con rodamina (ROJO), y Caveolina-1 marcada con FITC (verde). Se observó cambios morfológicos en las células crecidas en presencia de 4 β -TPA. Izquierda, condición control; derecha, condición 4 β -TPA. Las flechas blancas indican diferencia en la distribución de Caveolina-1 entre ambos casos. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 600X. La barra horizontal corresponde a 10 μ m.

3.3 Determinar si los cambios morfológicos inducidos por TPA-4 β se relacionan con los cambios en el crecimiento.

3.3.1 Crecimiento Independiente de Anclaje.

Una célula normal cuando se transforma en célula cancerígena no requiere de un sustrato sólido para crecer. Para poder evaluar si los cambios morfológicos que se producían en las células NIH3T3, al ser tratadas con el éster de forbol correspondían a una transformación celular, se hicieron ensayos de crecimiento independiente de anclaje (crecimiento en agar blando).

El cambio producido por la disminución de Caveolina-1 no fue suficiente para producir transformación celular (a pesar de los cambios morfológicos) ya que se observó solamente formaciones de colonias para las células A10 pero no hubo formación de colonias por parte de las células NIH3T3 (figura 17).

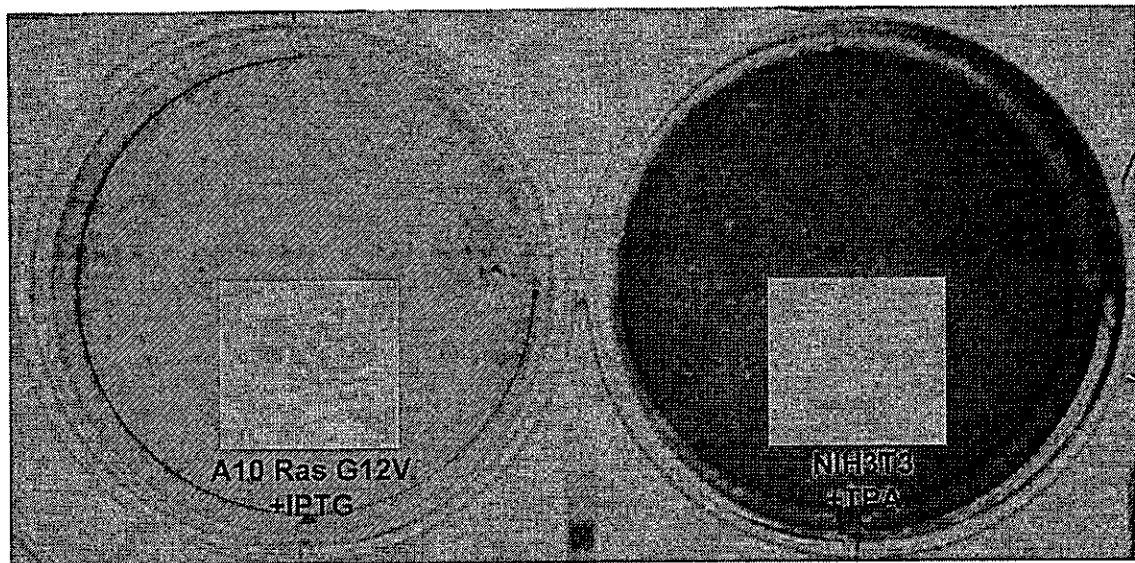


Figura 17. Evaluación de crecimiento independiente de anclaje. Se sembró 1500 células A10 las cuales poseen el vector inducible placiOP que codifica para una mutante de RAS constitutivamente activa (Ras G12V) y 1500 células NIH3T3 de ATCC. Las células A10 se utilizaron como control positivo. Se realizó un tratamiento de IPTG 5 mM y TPA 100nM para evaluar la capacidad de crecimiento de ambas líneas celulares (A10 y NIH3T3, respectivamente). Cada 48 horas se les agregó más medio con IPTG (para el caso de las A10) o con 4 β -TPA (para el caso de las NIH3T3) para mantener el efecto de las drogas. Se observó que para las células A10 la cantidad de colonias formadas a partir de una única célula fue efectivamente mayor que el número de colonias formada por las células NIH3T3. En la figura se muestra un experimento representativo de 3 ensayos independientes con 2 réplicas cada uno.

4 DISCUSIÓN

Caveolina-1 es una proteína integral de membrana, la que a través de su dominio de andamiaje interactúa con varias proteínas involucradas en vías de transducción de señales. Debido a que posee la capacidad de inhibir la actividad de muchas proteínas por interacción proteína-proteína, se piensa que su actividad supresora de tumores estaría principalmente relacionada con este dominio (Razani et al., 2002).

Dada la importancia de la actividad supresora de tumores de Caveolina-1 es fundamental entender qué mecanismos están involucrados en la regulación de esta proteína. Algunos trabajos indican que al menos tres vías de señalización estarían participando en su regulación: p42/44 MAPK, tirosina quinasa no receptoras del tipo Src y la proteína quinasa A (PKA) (Engelman et al, 1999a, Smart, 1999, Engelman, 1999a, Costa et al, 2007). Sin embargo, poco se sabe sobre la regulación de la expresión de Caveolina-1.

En este trabajo se estudió una nueva vía de regulación para Caveolina-1 que involucra la familia de isoformas de PKC. Para ello se utilizó el éster de forbol 4β -TPA, un conocido promotor de tumores que actúa como activador de cPKCs y nPKCs, el cual disminuyó los niveles basales de Caveolina-1 en las células NIH3T3 (figura 4). En este resultado estarían participando principalmente las isoformas PKC α y PKC δ , ya que se comprobó que los niveles proteicos de estas dos PKCs disminuyeron en presencia de la droga (4β -TPA) (figura 4).

Para asignarle algún rol a cada una de estas dos PKCs en estudio, se observó que con BIM existía una inhibición de la disminución proteica de Caveolina-1 producida

al agregar 4 β -TPA (figura 6). Por otra parte, con Röttlerin no se observó una regulación, ya que el inhibidor por si solo no modificó los niveles de Caveolina-1 ni tampoco tuvo efecto frente a la adición de 4 β -TPA (figura 6). Este último hecho discrepa de la posible regulación positiva por parte de PKC δ hacia Caveolina-1 observada en nuestro laboratorio para células NIH3T3 con Ras mutado inducible denominadas células A10 (Bravo, 2004). En este último trabajo se sugirió que la vía Ras/RalGDS/Src inhibiría a la PKC δ (Gschwendt, 1999), facilitando así la disminución de Caveolina-1 por la vía Ras/Raf/MEK/Erk. A su vez estos antecedentes sugieren una posible regulación negativa por parte de las PKCs río abajo de Ras.

Continuando con la idea de la regulación por parte de PKC α , se decidió expresar ectópicamente la isoforma de PKC α mediante la transducción de las células NIH3T3 con vectores adenovirales. En estas condiciones, los niveles basales de Caveolina-1 se redujeron en ausencia de 4 β -TPA (figura 7). Aún más, la adición del éster de forbol no favoreció la disminución de Caveolina-1 en presencia de la sobreexpresión adenoviral de PKC α (figura 8). Estos resultados podrían explicarse asumiendo que existirían otras proteínas blanco río abajo de PKC α que actuarían directamente sobre la regulación de Caveolina-1, las cuales otorgarían un papel limitante en la amplificación de la cascada de regulación. Además, cabe notar que para que se produjera una activación de PKC α WT en ausencia de 4 β -TPA, deberían existir algunos factores del suero que produjeran ese efecto, pudiendo facilitar la activación de las PKCs. Esto sugiere una regulación endógena de la activación de PKC en las condiciones de cultivo, probablemente asociado con el ciclo celular.

Para comprobar la hipótesis de que existirían otras vías de señalización funcionando en conjunto con PKC α para regular la expresión de Caveolina-1, se utilizaron inhibidores farmacológicos de PI3K, MEK, JNK y p38. Estos inhibidores

aumentaron los niveles basales de Caveolina-1, y en presencia de TPA se observó que solamente la inhibición de PI3K y JNK evitó la disminución mediada por TPA sobre los niveles Caveolina-1 (figura 11). Datos en la literatura concuerdan con la importancia de la vía PI3K dado que esta vía es importante para la transformación inducida por H-Ras (Wei-quan et al., 2004). Sin embargo, el hecho de que el inhibidor de MEK no tuviese efecto sobre los niveles de Caveolina-1 discrepa de los antecedentes que demuestran que la vía RAS-MAPK disminuye Caveolina-1 en fibroblastos de ratón (Sasai et al, 2007). Ensayos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que al activar Ras y utilizar un inhibidor general de PKCs, no es posible disminuir las concentraciones de Caveolina-1. Ello podría indicar entonces que PKC α estaría río arriba de Ras en la disminución de Caveolina-1. Por el contrario, Tourkina et al. (1995) mostraron que PKC α promueve el aumento proteico de Caveolina-1 en fibroblastos de pulmón humano. A diferencia de los resultados aquí mostrados, en fibroblastos humanos no se observó la participación de la vía MEK/ERK en este resultado. Por lo tanto, la forma de cómo se estaría regulando Caveolina-1 por parte de PKC α sería influenciado por el tipo celular en cuestión. Así por ejemplo, existen evidencias que muestran diferencias en las vías de regulación de proteínas entre células de origen humano y de ratón (Sasai et al, 2007). Esto pone en claro el problema que se presenta al utilizar diferentes modelos para estudios biológicos, ya que dependiendo de lo que se desea estudiar se debería elegir el modelo en cuestión.

Por otra parte, los resultados obtenidos para Caveolina-2 mostraron una menor regulación a la observada para Caveolina-1, en condiciones de activación de las PKCs. Este hecho, y dado que no existen más resultados que expliquen lo observado con Caveolina-2, nos hace inferir que los cambios producidos para esta proteína se relacionarían directamente a la regulación sobre Caveolina-1, mediada por el 4 β -TPA.

La idea principal de esta hipótesis se basa en la dependencia estructural documentada de Caveolina-2 por Caveolina-1 que permite a Caveolina-2 poder salir del aparato de Golgi, mediante la hetero-dimerización, evitando así su secuestro en las cisternas del Golgi y posterior degradación proteosomal (Parolini et al., 1999; Razani et al., 2001). Sin embargo, no queda claro si el efecto observado en Caveolina-2 es únicamente producido por este hecho, quizás existen otras vías de regulación sobre Caveolina-2 influenciadas de menor manera por PKC α y/o PKC δ . Además de lo anterior, en este trabajo se observó que es posible eliminar mediante 4 β -TPA la expresión de Caveolina-1 sin perder la expresión de Caveolina-2, por lo cual se demostró que la ausencia a corto plazo de Caveolina-1 no lleva inmediatamente a la pérdida de Caveolina-2.

Por otra parte, si bien existe evidencia que señala que la expresión de caveolina-1 es regulada por silenciamiento transcripcional vía cambios epigenéticos (Quest et al., 2008; Lin et al., 2004; Engelman et al., 1999) en este caso no se logró demostrar a partir de los datos la correspondencia con ese hecho. En el ensayo de RT-PCR realizado sobre las células NIH3T3 (figura 7) donde se agregó 4 β -TPA por 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas no se logró evidenciar regulación transcripcional. Se cree que no se obtuvieron los resultados esperados que justificaran la regulación transcripcional debido a que se trabajó con células NIH3T3 correspondientes a una línea celular de ratón y no una línea celular humana (Quest et al., 2008; Sasai et al., 2007).

Se ha demostrado que Caveolina-1 en condiciones de activación de Ras permite transformación celular en células NIH3T3. Sin embargo, la disminución de Caveolina-1 al agregar 4 β -TPA no indujo transformación. Ensayos de Agar blando permitieron verificar este hallazgo, pues no se obtuvo crecimiento independiente de anclaje en presencia de 4 β -TPA a pesar de los cambios morfológicos observados a las

24 horas de incubación con 4 β -TPA. De esta forma, la falta de transformación celular observada en este caso se podría explicar debido a que con 4 β -TPA no existió una pérdida de la expresión de Caveolina-2, lo cual hace inferir que el solo hecho de que se pierda Caveolina-1 y no Caveolina-2 no es suficiente para inducir transformación celular, pues en el caso de activación de Ras se pierde Caveolina-1 y Caveolina-2 coincidiendo los cambios morfológicos con transformación celular (Bravo, 2004).

De esta misma forma, los cambios de distribución en Caveolina-1 que se observaron en los ensayos de inmunofluorescencia podrían estar asociados a cambios en el citoesqueleto favorecidos por las fosforilaciones sobre otras proteínas producidas por la activación de las PKCs, reubicando componentes estructurales dentro de las células como por ejemplo, se ha visto que la polimerización de actina se ve negativamente regulada por PKC (Weston et al., 2008)

También, dado que no se pudo demostrar si existe o no algún tipo de regulación por parte de PKC δ sobre los niveles de Caveolina-1, sería interesante el poder realizar ensayos de sobreexpresión de PKC δ de la misma forma como se desarrollaron para PKC α permitiendo comprobar algún efecto por parte de PKC δ sobre Caveolina-1. A pesar de todos los experimentos aquí desarrollados, no es posible descartar a PKC ζ y PKC ϵ porque no se hayan observado cambios en los niveles de estas proteínas, pues una de ellas (PKC ζ) no posee un dominio de unión a 4 β -TPA y la otra (PKC ϵ) quizás tiene una vida media mucho mayor al tiempo de estudio realizado en estos experimentos.

En conclusión, hemos podido demostrar que 4 β -TPA regula negativamente a Caveolina-1 por un camino que involucra PKC α lo cual no ha sido documentado anteriormente. Además, existirían probablemente otras vías de regulación para

Caveolina-1 dado que 4 β -TPA no fue capaz de reducir completamente los niveles de esta proteína.

5 RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 4 β -TPA induce pérdida de PKC α , Caveolina-1 y cambios morfológicos en células NIH3T3. No se pudo demostrar si existe o no algún tipo de regulación por parte de PKC δ , PKC ϵ y PKC ζ
- La reducción en la expresión de Caveolina-1 en presencia de 4 β -TPA fue inhibida por la presencia de PKC α dominante negativo y los inhibidores de JNK (LY294002) y JNK (SP600125).
- PKC α wild-type sobreexpresada adenoviralmente disminuyó los niveles de Caveolina-1 en ausencia de 4 β -TPA. No así la PKC α dominante negativo
- Caveolina-2 mostró una menor regulación a la observada para Caveolina-1 al incubarse con 4 β -TPA, y al sobreexpresar PKC α . Sin embargo, en presencia de 4 β -TPA y los inhibidores SP600125 y SB203580 desapareció Caveolina-2.
- Los cambios morfológicos observados en células NIH3T3 debido a la presencia de 4 β -TPA no corresponden a transformación celular, a pesar de que este tratamiento elimina casi completamente a Caveolina-1.

A continuación se muestra un esquema que modela los resultados observados en las células NIH3T3.

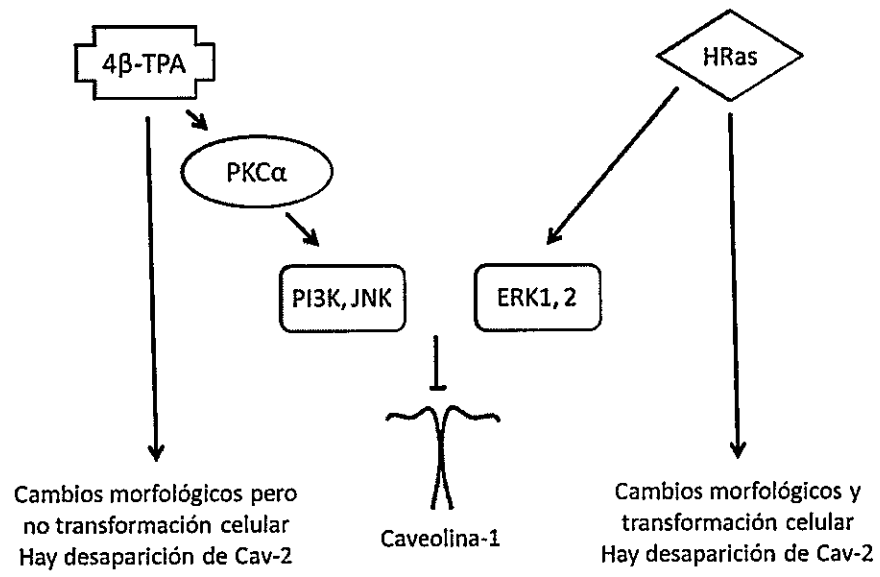


Figura 18. Esquema del modelo propuesto para los cambios observados en Caveolina-1 y 2 en las células NIH3T3.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beardsley A, Fang K, Mertz H, Castranova V, Friend S, Liu J (2005) Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 280:3541-3547.

Bravo DM (2004) Participación de las vías río abajo de Ras en la disminución de la expresión de Caveolina-1 y la transformación celular de las células NIH3T3. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257:7847-7851.

Costa MJ, Senou M, Van Rode F, Ruf J, Capello M, Dequanter D, Lothaire P, Dessy C, Dumont JE, Many MC and Van Sande J (2007). Reciprocal negative regulation between TSH/cAMP-mediated proliferation and caveolin-1 expression in human and murine thyrocytes. *Mol Endocrinol*, 21:921-32.

Egloff AM, Vella LA, Finn OJ (2006) Cyclin B1 and other cyclins as tumor antigens in immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 66:6-9.

Engelman JA, Wykoff C, Yasuharai S, Song K, Okamoto T, Lisanti M (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent Growth. *J Biol Chem* 272:16374-16381.

Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP (1999) Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* 448:221-230.

Engelman JA, Zhang XL, Razani B, Pestell RG, Lisanti MP (1999a) p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 274:32333-32341.

Glennay JR Jr (1989) Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 264:20163-20166.

Glennay JR Jr, Soppet D (1992) Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10517-10521.

Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP (1998) Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J.* 17:6633-6648.

Gschwendt M (1999) Protein kinase C delta. *Eur J Biochem* 259:555-564.

Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T (1999) PKC η , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochim. Biophys. Acta*, 1450:99-106.

Karakosta A, Golias Ch, Charalabopoulos A, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos K (2005) Genetic models of human cancer as a multistep process. Paradigm models of colorectal cancer, breast cancer, and chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukaemia. *J Exp Clin Cancer Res* 24:505-514.

Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chang JG (2004) Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res*. 24:1645-50.

Okamoto T, Schlegel A, Scherer P, Lisanti M (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273:5419-5422.

Orlichenko L, Huang B, Krueger E, McNiven MA (2005) Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 281:4570-4579.

Peli J, Schroter M, Rudaz C, Hahne M, Meyer C, Reichmann E, Tschopp J (1999) Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J.* 18:1824-1831.

Quest AF (1996) Regulation of protein Kinase C: A Tale of Lipids and Proteins. *Enzyme Protein*, 49:231-261.

Quest AF (2000) Multiple modes of protein kinase C regulation. *Recent Res Devel Biochem.* 171-190.

Quest AF, Leyton L, Párraga M (2004) Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem, Cell Biol.* 82: 129-144.

Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA (2008) Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 4. 1130-1150

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54:431-467.

Sargiacomo M, Scherer P, Tang Z, Kübler E, Song K, Sanders M, Lisanti M (1995) Oligomeric structure of caveolin: Implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:9407-9411.

Sasai K, Kakumoto K, Hanafusa H and Akagi T (2007) The Ras-MAPK pathway downregulates caveolin-1 in rodent fibroblast but not in human fibroblasts: implications in the resistance to oncogene-mediated transformation. *Oncogene*, 26:449-55.

Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP (1997) Cell-type and tissue-specific expression of

caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:29337-29346.

Shih-Lan HSU, Ya-Hui CHOU, Sui-Chu YIN and Jer-Yuh LIU (1998) Differential effects of phorbol ester on growth and protein kinase C isoenzyme regulation in human hepatoma Hep3B cells *Biochem. J.* 333:57-64

Smart E, Graf G, McNiven M, Sessa W, Engelman J, Scherer P, Okamoto T, Lisanti M (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol.Cell.Bio.* 19:7289-7304.

Song K, Tang Z, Li S, Lisanti M (1997) Mutational analysis of the properties of caveolin-1: A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interaction. *J. Biol. Chem.* 272:4398-4403.

Weston MC, Collins ME, Cunningham FM (2008) Role of intracellular kinases in the regulation of equine eosinophil migration and actin polymerization. *J. Vet. Pharmacol Ther* 31:31-8.

Zhang Q, Furukawa K, Chen HH, Fujinawa R, Kozutsumi Y, Suzuki A, Urano T, Furukawa K (2006) Down-regulation of caveolin-1 in mouse Lewis lung cancer P29 is a causal factor for the malignant properties in a high-metastatic subline. *Oncol Rep.* 16:289-294.