

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“La proteína pVHL suprime la proliferación celular mediada por
Akt/ β -catenina mediante la inhibición de la expresión de 14-3-3 ζ ”**

T E S I S

Que presenta

MARÍA AZUCENA CASTAÑEDA MONTES

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

**EN LA ESPECIALIDAD DE
FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de Tesis:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Ciudad de México

Enero, 2018

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 41 y bajo la tutoría del Dr. Porfirio Nava Domínguez, Investigador Cinvestav 3-C del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Se contó con la asesoría del Dr. Daniel Martínez Fong, Investigador Cinvestav 3-C; del Dr. José Luis Reyes Sánchez, Investigador Cinvestav 3-D y del Dr. José Víctor Segovia Vila, Investigador Cinvestav 3-E; todos ellos adscritos al Departamento e Institución citados anteriormente, quienes integraron mi comité tutorial.

El Dr. Juan Patricio Gariglio Vidal, Investigador Titular 3-E del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) y el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá Investigador Titular "C" e Investigador en Ciencias Médicas "F" de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y la División de Investigación del INCan, fungieron como sinodales en el examen de grado doctoral.

Agradecimientos a donativos

American Gastroenterological Association (Premio de Investigación Académica a Porfirio Nava).

Fundación Miguel Alemán Valdés (Premio de Investigación Clínica a Porfirio Nava).

Premio Lisker a Porfirio Nava.

Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal (ICyTDF),
Apoyo #ICYTDF/228/2010 (Daniel Martínez Fong).



Agence Nationale de la Recherche-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(ANR-CONACYT) Grant #142947 (Daniel Martínez Fong).



Agradecimientos

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca #317806 para la realización de mis estudios de Doctorado.

Agradecimientos especiales al Fondo Ricardo J. Zevada por otorgarme la beca de terminación de doctorado para poder concluir con este proceso.

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de Ayudante de Investigación SNI-III.

Agradezco al CINVESTAV por la oportunidad de pertenecer al programa de Doctorado en Ciencias e igualmente al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Porfirio Nava Domínguez por su dirección e invaluable apoyo, dedicación y conocimiento que me brindó durante el desarrollo de este proyecto y durante mi estancia en su laboratorio.

Asimismo, expreso mi gratitud al Dr. Daniel Martínez Fong por todo el apoyo, asesoría y conocimiento brindado, así como a mis asesores el Dr. José Luis Reyes Sánchez y la Dra. Irma Alicia Martínez Dávila por su apoyo y asesoría en el desarrollo de este proyecto. También agradezco al Dr. José Víctor Segovia Vila, al Dr. Patricio Gariglio Vidal y al Dr. Alejandro Manuel García Carrancá por sus acertados comentarios en la revisión de esta tesis y su evaluación como sinodales en la presentación de mi examen de grado doctoral.

Agradezco también a la Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, coordinadora del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, por todo el apoyo que me brindó durante mi doctorado.

También agradezco a todos los que integran el laboratorio 41 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, en especial a la M. en C Itzel Zenidel Gutiérrez Martínez, al M. en C José Antonio Hernández Trejo y a la M. en C. Carolina Serrano García por su apoyo durante la realización de mi proyecto de tesis.

Agradezco a la M. en C. Aurora Candelario Martínez por su apoyo en la experimentación del proyecto y a la C. D. Norma Trejo Estrada por todo el apoyo técnico que me brindó al tener lo necesario en la experimentación de este proyecto.

Dedicatorias

Dedico este trabajo de doctorado a quienes les debo todo lo que soy, a Dios y a mi familia. A Dios, porque sin él yo jamás hubiera logrado alcanzar esta meta. A mi mamá, Margarita Montes Herrera por su apoyo moral, económico y por todo el esfuerzo y todo lo que ha hecho por mí para sacarme adelante. A mi papá que está en el cielo, Dionicio Castañeda Martínez, por todo su apoyo moral, económico y por todo lo que hizo por mí para darme una carrera. A mis hermanos, Dionicio Castañeda Montes, Francisco Castañeda Montes y Lucía del Rosario Ramírez Montes, por estar siempre apoyándome y ayudándome. Y a mis abuelitos, David Montes Aguirre y Celia Herrera Zendejas (Yeyita), gracias por todo su apoyo. Dedico este trabajo a mi familia por estar siempre conmigo cuando más los he necesitado.

También dedico este trabajo a mis amigos, Sandra Bustamante, Brenda García Iglesias, Olivia García, Patricia Blancas, Lluvia Mondragón, Edna Adán, Vanesa Islas, Marycarmen Rivera, a mis pastores Javier Gaviño y Linda García, Alexis Gaviño y Laura Tinoco, Daniel Cárdenas y Gloria Tinoco, así como a mis demás amigos y amigas de La Roca a las Naciones, gracias por estar conmigo en todo momento y gracias por todo su apoyo.

CONTENIDO

CONTENIDO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. GENERALIDADES	1
1.1 Panorama Nacional e Internacional del Cáncer Renal	1
1.2 Características del ccRCC	2
1.3 Factores de riesgo de desarrollo de ccRCC	2
1.4 La ausencia de la proteína supresora de tumor von Hippel Lindau (pVHL) incrementa la expresión de múltiples oncogenes que contribuyen al desarrollo de ccRCC	3
1.5 Mecanismos que regulan negativamente la actividad transcripcional de β -catenina en el epitelio de túbulo proximal	5
1.5.1 El “complejo de destrucción” de β -catenina	5
1.5.2 El sistema Jade-1/pVHL	7
1.6 Participación de la vía PI3K/Akt en la regulación positiva de la actividad transcripcional de β -catenina	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Participación de las proteínas 14-3-3 en la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt/ β -catenina	10
2.1.1 Características y mecanismos de acción de las proteínas 14-3-3. 10	
2.1.2 14-3-3 ζ , 14-3-3 η y 14-3-3 θ regulan positiva o negativamente la activación de Akt	12
2.1.3 14-3-3 ζ potencia la actividad transcripcional de β -catenina fosforilada por Akt	13
2.2 El Receptor de Neurotensina de Alta Afinidad tipo-I (NTSR1) participa en la malignidad de diferentes tipos de cáncer	14

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo General	17
5.2 Objetivos Particulares	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Anticuerpos, reactivos y plásmidos	19
6.2 Cultivos celulares	22
6.3 Transfección de los diferentes plásmidos en las células 786-0, HK-2 y MDCK	23
6.4 Tratamientos en las células 786-0, HK-2 y MDCK	23
6.5 Ensayos de proliferación celular	23
6.6 Ensayo de Western-blotting	23
6.7 Microscopía de inmunofluorescencia	24
6.8 Ensayo de inmunoprecipitación	24
6.9 Fraccionamiento celular	25
6.10 Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS	26
7.1 La β -catenina media la proliferación celular en las células 786-0	26
7.2 Akt regula la localización intracelular, la señalización y los niveles de proteína de β -catenina en las células 786-0	30
7.3 La hiper-activación de Akt es mediada por las proteínas 14-3-3	34
7.4 Akt fosforila directamente a β -catenina y a GSK3 β	38
7.5 La inhibición de la actividad de Akt y de la función de las proteínas 14-3-3 inhibe la proliferación celular en las células 786-0	42
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	50
10. PERSPECTIVAS	50
11. REFERENCIAS	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia Global del cáncer de riñón	1
Figura 2. La proteína β -catenina forma parte de las uniones adherentes	5
Figura 3. Resumen esquemático de la vía de señalización Wnt/ β -catenina	6
Figura 4. La proteína VHL regula negativamente los niveles de β -catenina citosólica en el epitelio de túbulo proximal	7
Figura 5. Resumen esquemático de la regulación de la actividad transcripcional de β -catenina mediada por PI3K/Akt	9
Figura 6. Esquema de los sitios de fosforilación de β -catenina por distintas quinasas	9
Figura 7. Mecanismos de regulación de proteínas por las proteínas 14-3-3	11
Figura 8. Las proteínas 14-3-3 regulan la activación de la vía PI3K/Ak	12
Figura 9. 14-3-3 ζ aumenta la estabilidad y la transactivación de β -catenina fosforilada por Akt	13
Figura 10. Señalización activada por NTS/NTSR1	15
Figura 11. Representación esquemática de los efectos oncogénicos que resultan de la activación del NTSR1	15
Figura 12. Los niveles y la localización de población Active- β -catenin (ABC) sugiere que ésta participa en la sobre-expresión del NTSR1 en las células 786-0	27
Figura 13. La degradación inducida de β -catenina disminuye la proliferación celular en las células 786-0	28
Figura 14. La ausencia de la proteína VHL aumentó la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0	29
Figura 15. El incremento inducido de HIF2 α no afectó los niveles de Active- β - catenin (ABC) y los de β -catenina total en las células MDCK y HK-2	30
Figura 16. La inhibición de la activación de Akt disminuye los niveles de la población Active- β -catenin (ABC) y reduce la proliferación celular	31

Figura 17. La inhibición de la activación de Akt disminuye los niveles de proteína del NTSR1 en las células 786-0	31
Figura 18. La inhibición de la activación de Akt enriquece la localización de β -catenina total y de Active- β -catenin (ABC) en la membrana plasmática de las células 786-0	32
Figura 19. La sobre-expresión de Akt indujo la relocalización de β -catenina desde la membrana plasmática hacia el citosol y núcleo	33
Figura 20. Los niveles de la proteína 14-3-3 ζ y de sus blancos de regulación (pp85, pPDK1 y pAkt308) están incrementados en las células 786-0	35
Figura 21. La inhibición de la función de las proteínas 14-3-3 previno la activación de Akt en las células 786-0	36
Figura 22. Las proteínas 14-3-3 ϵ η y θ sobre-expresadas en las células 786-0 disminuyeron la activación de Akt	37
Figura 23. La inhibición de la función de las proteínas 14-3-3 incrementó la presencia de Active- β -catenin (ABC) en la membrana plasmática y redujo la proliferación celular en las células 786-0.....	38
Figura 24. β -catenina es fosforilada por Akt en el residuo de Serina 552 en las células 786-0	40
Figura 25. La inhibición de la función de Akt redujo la fosforilación de β -catenina en el residuo de Serina 552	41
Figura 26. Los niveles de Active- β -catenin (ABC) incrementan en las células HK-2 tratadas con LiCl	41
Figura 27. La inhibición de la activación de Akt y de la función de 14-3-3 redujo la proliferación celular de la línea celular 786-0	42
Figura 28. La inhibición de la activación de Akt y de la función de las proteínas 14-3-3 redujo la actividad transcripcional de β -catenina en la línea celular 786-0	43
Figura 29. La expresión exógena de la proteína VHL redujo la expresión de la proteína 14-3-3 ζ y esto previno la señalización del eje PI3K/Akt/ β -catenina en las células 786-0	44

Figura 30. Representación esquemática de la regulación de la señalización de PI3K/Akt/ β -catenina en las células 786-0 de cáncer renal 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados	19
Tabla 2. Anticuerpos secundarios usados para western blotting	20
Tabla 3. Anticuerpos secundarios usados para Inmunofluorescencia	20
Tabla 4. Reactivos utilizados	21
Tabla 5. Plásmidos utilizados	21

RESUMEN

El Carcinoma de Células Renales de células claras (ccRCC) se origina en el epitelio de túbulo proximal. Mutaciones en el gen Von Hippel-Lindau (*VHL*), el cual codifica para la proteína supresora de tumor pVHL desemboca en el desarrollo de este cáncer. La proteína pVHL regula negativamente al co-factor transcripcional β -catenina, que en ccRCC induce la sobre-expresión de diversos genes que contribuyen al inicio y progresión del mismo. Los mecanismos que controlan la degradación de la β -catenina citosólica son importantes para la regulación de su actividad co-transcripcional. Se ha demostrado que la pérdida de pVHL estabiliza a β -catenina, incrementa la transactivación de β -catenina y la proliferación celular mediada por β -catenina. Sin embargo, el papel de PI3K/Akt en la regulación de la señalización de β -catenina río abajo de pVHL hasta el momento no ha sido investigada. En este trabajo reportamos que la hiper-activación de PI3K/Akt en células que carecen de pVHL contribuye a la estabilización y acumulación nuclear de β -catenina activa. La hiper-activación de la vía PI3K/Akt es facilitada por la regulación positiva de 14-3-3 ζ y la regulación negativa de 14-3-3 ϵ , 14-3-3 η y 14-3-3 θ . La regulación positiva de 14-3-3 ζ en respuesta a la pérdida de pVHL es importante para el reclutamiento de PI3K hacia la membrana celular y para la estabilización de β -catenina soluble. En contraste 14-3-3 ϵ y 14-3-3 η inhibieron la señalización de PI3K/Akt mediante la inhibición de PI3K y PDK1 respectivamente. Por lo tanto, nuestros resultados demostraron que miembros de la familia de 14-3-3 potenciaron la señalización de la vía PI3K/Akt/ β -catenina a fin de incrementar la proliferación celular. La inhibición de la activación de Akt y/o de la función de 14-3-3 reduce fuertemente la señalización de β -catenina y disminuye la proliferación celular. Por lo tanto, la inhibición de Akt y de la función de 14-3-3 eficientemente reduce la proliferación celular en las células 786-0 caracterizadas por la hiper-activación de la señalización de β -catenina debido a la pérdida de pVHL.

Palabras clave: 14-3-3, p β -cat552, ABC, pVHL, Akt, β -catenin.

ABSTRACT

Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) originates in the proximal tubule epithelium. Mutations in Von Hippel-Lindau gene (VHL), which codes for the tumor suppressor protein pVHL leads to development of this cancer. The VHL protein negatively regulates the β -catenin transcriptional co-factor that in ccRCC induces the overexpression of several genes that contribute to its initiation and progression. Therefore, the mechanisms controlling degradation of cytosolic β -catenin are important for regulating β -catenin co-transcriptional activity. Loss of pVHL has been shown to stabilize β -catenin, increasing β -catenin transactivation and β -catenin mediated cell proliferation. However, the role of PI3K/Akt in the regulation of β -catenin signaling downstream of pVHL has been never addressed. Here we report that hyperactivation of PI3K/Akt in cells lacking pVHL contributes to the stabilization and nuclear accumulation of active β -catenin. PI3K/Akt hyperactivation is facilitated by the upregulation of 14-3-3 ζ and the downregulation of 14-3-3 ϵ , 14-3-3 η and 14-3-3 θ . Upregulation of 14-3-3 ζ in response to pVHL is important for the recruitment of PI3K to the cell membrane and for stabilization of soluble β -catenin. By contrast, 14-3-3 ϵ and 14-3-3 η inhibited PI3K/Akt signaling by inhibiting PI3K and PDK1, respectively. Thus our results demonstrated that 14-3-3 family members enhance PI3K/Akt/ β -catenin signaling in order to increase proliferation. Inhibition of Akt activation and/or 14-3-3 functions strongly reduces β -catenin signaling and decreases cell proliferation. Thus, a dual therapy aimed at inhibiting Akt and 14-3-3 functions may serve as treatment for renal cancers characterized by hyperactivation of β -catenin signaling due to pVHL loss.

Keywords: 14-3-3, p β -cat552, ABC, pVHL, Akt, β -catenin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Active β -catenin

ABC B1: Casete de Unión a ATP humano

APC: Poliposis Adenomatosa coli

BIRC5: Survivina ó Inhibidor Vacuolaviral de apoptosis que contiene repetidos-5

CAIX: Anhidrasa Carbónica

CCND1: Gen Ciclina D1

ccRCC: Carcinoma de Células Renales de células claras

DAG: Diacilglicerol

E-cad: E-cadherina

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GPCR: Receptor Acoplado a Proteínas G

GLUT-1: Transportador de Glucosa 1

GSK-3 β : Cinasa de glucógeno sintetasa 3 beta

HIF: Factor Inducible de Hipoxia

HSP90: Proteína 90 de Shock Térmico

ICM: Índice de Masa Corporal

LEF: Factor de Transcripción Potenciador Linfoide

MAPK: Vía de Cinasas de Proteínas Activadas por Mitógeno

MMP7: Metalopeptidasa de Matriz extracelular-7

MMP14: Metalopeptidas de Matriz extracelular-14

mTORC1: Complejo 1 del Blanco de rapamicina en mamíferos

mTORC2: Complejo 2 del Blanco de Rapamicina en mamíferos

NTSR1: Receptor de Neurotensina de Alta Afinidad tipo I

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PTEN: Homólogo de Tensina y Fosfatasa deletada en el cromosoma 10

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

VEGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

VHL: Gen supresor de tumor von Hippel-Lindau humano

Vhl: Gen supresor de tumor von Hippel-Lindau murino

VHL: Síndrome Von Hippel-Lindau

pVHL: proteína Von Hippel-Lindau

TCF: Factor de células T

β -TrCP: Proteína que contiene repetidos de transducción beta

RTK: Receptor de Tirosina Cinasa

PI3K: Cinasa de fosfatidil-inositol-3 ó fosfoinositol-3

PIP2: Fosfatidil-inositol di-fostato

PIP3: Fosfatidil-inositol tri-fostato

PDK1: Cinasa de Proteína Dependiente de Fosfoinositol-3

PKC: Proteína Cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

1. GENERALIDADES.

1.1 Panorama Nacional e Internacional del Cáncer Renal.

A nivel mundial, el cáncer de riñón es el noveno tipo de cáncer más común en hombres y el décimo cuarto en mujeres. Anualmente se diagnostican aproximadamente 337,860 nuevos casos de cáncer renal y se registran 143,406 decesos, lo que representa cerca del 2% de las muertes por esta causa en el mundo (Figura 1) (Ferlay, 2012).

En México, el Cáncer Renal también ocupa el octavo lugar en incidencia en hombres y el décimo cuarto en mujeres. En el 2012 se reportaron 3,851 nuevos casos de cáncer renal y 2,115 muertes. Tiene un índice de fatalidad de 0.52% lo que significa que al menos el 50% de los pacientes mueren a causa de este cáncer al año (RHNM, 2003).

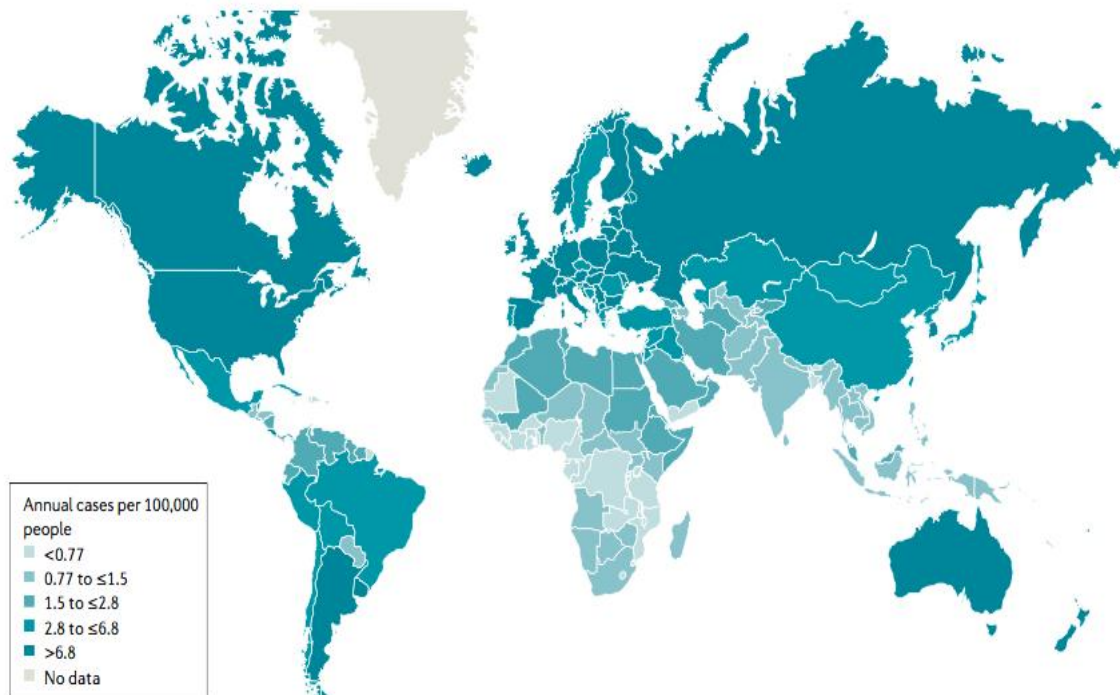


Figura 1. Incidencia Global de cáncer de riñón. Estimado de incidencia estandarizada por edad en hombres y mujeres por cada 100,000 habitantes (Hsieh et al., 2017; RHNM, 2003).

1.2 Características del ccRCC.

El cáncer renal es el conjunto de diferentes tipos de cáncer que ocurren en el riñón y se originan en el epitelio renal. Cada cáncer tiene diferente tipo histológico, curso clínico y respuesta a terapia, producto de las diferentes alteraciones genéticas que son causales de la enfermedad. Predominantemente el cáncer renal está conformado por el Carcinoma de Células Renales de células claras (ccRCC) (**Linehan et al., 2007**), debido a que este es el más común; a partir de este punto nos enfocaremos en este tipo en particular.

Microscópicamente, estas células tumorales se encuentran organizadas en forma de nidos o túbulos rodeados por una red vascular. En procedimientos rutinarios de tinción se observa la apariencia clara del citoplasma debido a la acumulación de glicógeno y lípidos, por esta razón se les denomina “células claras”. Aunque también puede presentar células con citoplasma eosinófilo (célula-clara eosinofílica) las cuales en algunos casos constituyen la masa total del tumor (**Thoenes et al., 1986**).

En promedio, este cáncer se presenta después de los 65 años de edad y es considerado un cáncer silencioso debido a que no se manifiestan síntomas en la etapa inicial sino hasta etapas tardías, por lo que el diagnóstico ocurre en una etapa tardía dificultando la atención oportuna. Se desarrolla en cuatro etapas de malignidad, clasificadas respecto al tamaño del tumor, invasividad y afectación de los ganglios linfáticos (**Hsieh et al., 2017**).

1.3 Factores de riesgo de desarrollo de ccRCC.

Los individuos con sobrepeso y obesidad tienen mayor riesgo de desarrollar ccRCC. Se estima que en hombres el riesgo aumenta en un 24% y en mujeres un 34% por cada 5 kg/m² en el índice de masa corporal (IMC). No obstante, hay poca

evidencia sobre los mecanismos que pueden influir en el desarrollo de este cáncer. Se ha asociado a la hipertensión con la obesidad; sin embargo, es un factor de riesgo independiente del desarrollo de ccRCC (**Chow et al., 2010**) aunque, los mecanismos biológicos no están claros. El humo del cigarro también es otro factor de riesgo importante. En fumadores, el riesgo aumenta alrededor del 50% en hombres y el 20% en mujeres. Estudios realizados en linfocitos de sangre periférica de pacientes con ccRCC mostraron mayor daño al DNA, así como mayor nivel de deleciones en el cromosoma 3p, el cual es el sitio donde se localiza el gen *VHL* (un importante supresor de tumor) (**Chow et al., 2010**).

La susceptibilidad al daño genómico también predispone al desarrollo de ccRCC, de manera que individuos que han heredado mutaciones en el gen *VHL*, son susceptibles de perder la heterocigocidad (LOH) en el alelo restante, debido a exposición a factores de riesgo, y a desarrollar el síndrome von Hippel-Lindau (VHL) y subsecuentemente ccRCC (**Chow et al., 2010**). Sin embargo, únicamente el 2-3% de éstos son resultado de mutaciones heredadas, por lo que se piensa que la mayoría de los pacientes con ccRCC adquieren mutaciones esporádicas en el gen *VHL* como resultado de exposición a factores de riesgo (**Rini et al., 2009**), tales como el humo de cigarro, hipertensión y obesidad aunque, los mecanismos patogénicos no son claros. Así como la exposición a acetaminofen, el uso de analgésicos, exposición a asbestos ó tricloroetileno aunque, éstos no han sido convincentemente asociados al desarrollo de éste carcinoma (**Rini et al., 2009**).

1.4 La ausencia de la proteína supresora de tumor von Hippel Lindau (pVHL) incrementa la expresión de múltiples genes que contribuyen al desarrollo de ccRCC.

Mutaciones en ambos alelos del gen *VHL* desembocan en el desarrollo de ccRCC. Este cáncer es el único tipo que presenta mutaciones en el gen *VHL* y su pérdida a través de mecanismos genéticos como mutaciones puntuales, inserciones

y deleciones o el silenciamiento debido a mecanismos epigenéticos (metilación promotora) constituye el evento más temprano que dirige a la oncogénesis (**Gnarra et al., 1994; Linehan et al., 2007**). La proteína VHL (ó pVHL) ejerce diversas funciones en la célula. Entre éstas, participa como “guardian” al reconocer oncoproteínas como la subunidad alfa del Factor Inducible de Hipoxia y β -catenina.

La proteína VHL reconoce a HIF α para que sea marcado con poliubiquitina para su degradación por proteosoma (**Cockman et al., 2000**). En las células de ccRCC, HIF induce la expresión de diversos genes como GLUT-1 (Transportador de glucosa 1) que incrementa el consumo de glucosa favoreciendo la supervivencia, proliferación y metástasis. También expresa al gen de CAIX (Anhidrasa Carbónica) que ayuda a mantener el ambiente hipóxico ácido que sostiene la progresión del tumor. Otros genes blanco son VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) y VEGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) que activan la vía PI3K/Akt/mTORC1 lo que conlleva a la inhibición de la apoptosis, progresión descontrolada del ciclo celular, proliferación celular, síntesis de proteínas (entre éstas a HIF) y angiogénesis que provee de nutrientes y oxígeno al tumor creando un ambiente propicio para su crecimiento (**Iliopoulos et al., 1996**). Debido al incremento de estos procesos mediados por HIF, los tumores de ccRCC son ricos en lípidos y glicógeno y altamente vascularizados. La pérdida de la proteína VHL resulta en la acumulación aberrante de HIF aún en condiciones adecuadas de oxígeno, lo que resulta en la activación descontrolada de sus genes blanco (**Cockman et al., 2000; Tanimoto et al., 2000**).

Además, pVHL juega un papel clave en la degradación de β -catenina, la cual es un importante efector oncogénico y desempeña un papel importante en la malignidad del ccRCC y confiere resistencia a quimioterapias (**Frew and Krek, 2008; Peruzzi et al., 2006**). La proteína β -catenina es el principal componente de las uniones adherentes y une el citoesqueleto de actina con la molécula transmembranal E-cadherina (**Figura 2**). Sin embargo, cuando β -catenina es liberada de esta interacción con E-cadherina en la membrana y se encuentra en el

citósol en su forma libre (conocida como β -catenina soluble), ésta se transloca al núcleo dónde funciona como cofactor transcripcional (**Figura 3**) (**Angst et al., 2001**). La proteína β -catenina soluble induce la expresión de múltiples genes que participan en diversos procesos celulares como proliferación celular (MYC, CCND1), migración (MMP7, MMP14), morfogénesis (Fgf8, Pax8 y Lhx1), angiogénesis (VEGF), supervivencia (BIRC5) entre otros (**Boivin et al., 2015; Brabletz et al., 1999; He et al., 1998; Kim et al., 2003; Tetsu and McCormick, 1999; Zhang et al., 2001**). La β -catenina desempeña un papel importante en la expresión de genes durante en el desarrollo embrionario (**Boivin et al., 2015**) y en el mantenimiento del tejido epitelial, pero, la desregulación de su actividad transcripcional contribuye al inicio y progresión del cáncer. Se ha demostrado que la pérdida de pVHL dirige a la acumulación de β -catenina y a la sobre-expresión de sus genes blanco (se explica más adelante) (**Chitalia et al., 2008; Peruzzi et al., 2006**). Sin embargo, los mecanismos que conllevan a la desregulación de la actividad transcripcional de β -catenina en ccRCC no han sido completamente esclarecidos.

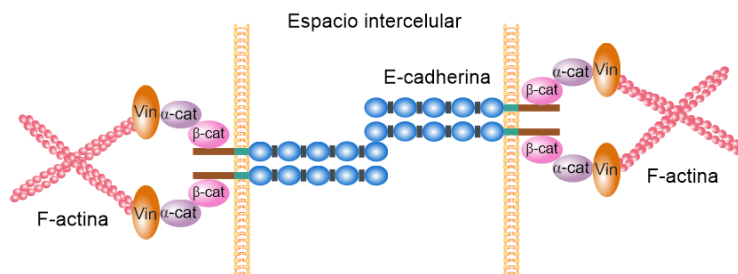


Figura 2. La proteína β -catenina forma parte de las uniones adherentes. Las cadherinas clásicas forman dímeros laterales y median la adhesión entre las células vecinas con la red de filamentos de actina a través de su unión con α -catenina, β -catenina y vinculina en el citoplasma. (Modificado de **Angst et al., 2001**).

1.5 Mecanismos que regulan negativamente la actividad transcripcional de β -catenina en el epitelio de túbulo proximal.

1.5.1 El “complejo de destrucción” de β -catenina.

La β -catenina citosólica se trasloca al núcleo dónde interactúa con TCF y el Factor de transcripción Potenciador Linfoide (LEF); esta interacción incrementa la actividad co-transcripcional de la molécula y lleva generalmente a un aumento en la

proliferación celular (**Bejsovec, 2005; Cadigan and Liu, 2006**). Por consiguiente, altos niveles de β -catenina citosólica por lo general resultan en la hiper-activación de la señalización TCF/ β -catenina y, consecuentemente, en el desarrollo de cáncer. Es por tal motivo que la reducción de los niveles de β -catenina libre en el citosol ha sido propuesta como una terapia para el tratamiento del cáncer (**Thakur and Mishra, 2013**). Para impedir que incrementen los niveles de β -catenina citoplásmica y que esto resulte en la expresión exacerbada de sus genes blanco, en las células sanas los niveles de β -catenina citoplásmica están finamente controlados por el llamado “complejo de destrucción”. Este complejo proteico está formado por las proteínas de andamiaje Axina y adenomatosis poliposis coli (APC), las cinasas caseína cinasa 1 (CK1) y la cinasa de glucógeno sintetasa 3 beta (GSK3 β), junto con la ligasa de ubiquitina E3 β -TrCP. La fosforilación del extremo amino terminal de β -catenina llevada a cabo por CK1 y GSK3 β resulta en la posterior poliubiquitinación de la molécula por β -TrCP y la subsecuente degradación proteosomal de β -catenina (**Figura 3**) (**Aberle et al., 1997; Boivin et al., 2015**).

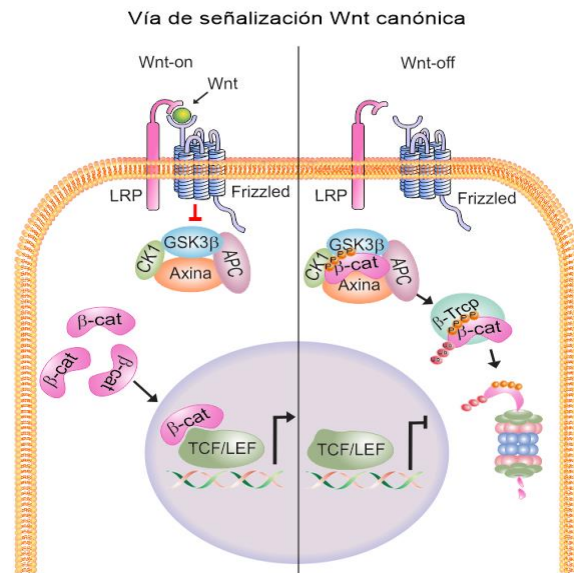


Figura 3. Resumen esquemático de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. En el estado activo (on), la función de GSK3 es inhibida y el “complejo de degradación” es reclutado hacia la membrana y β -catenina queda libre para llevar a cabo la expresión de genes blanco. En el estado inactivo (off), el complejo se encarga de la rápida destrucción por proteosoma de β -catenina soluble para mantener regulada negativamente su función de señalización (**Aberle et al., 1997; Boivin et al., 2015**).

1.5.2 El sistema Jade-1/pVHL.

En líneas celulares de cáncer caracterizadas por la hiper-activación de la señalización de β -catenina, fallas en la degradación de β -catenina citosólica no sólo han sido relacionadas con el mal funcionamiento del “complejo de destrucción” (Behrens, 2008; Fang et al., 2007). Por ejemplo, en líneas celulares de ccRCC, los altos niveles de β -catenina citosólica han sido asociados a la pérdida de la función de E-cadherina y/o a la pérdida de la función de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL). En el caso específico de la proteína VHL citosólica, se sabe que promueve la degradación de β -catenina a través de la estabilización de la proteína de homodominio de planta (PHD) Jade-1, la cual, es una ligasa de ubiquitina E3 que tiene como blanco a las formas fosforilada y no fosforilada de dicha molécula (Figura 4). Jade-1 reconoce el extremo amino terminal de β -catenina y lo marca con ubiquitina para su posterior degradación por proteosoma. Por lo tanto, en la célula renal, la ausencia de la proteína VHL resulta en la desestabilización de Jade-1 y por consiguiente en el incremento de los niveles de β -catenina, lo que a su vez dirige al aumento de su actividad transcripcional (Chitalia et al., 2008). Sin embargo, en ratones se ha observado que la pérdida del gen *Vhl* es incapaz de inducir ccRCC, esto sugiere que algunos mecanismos adicionales son necesarios para su desarrollo.

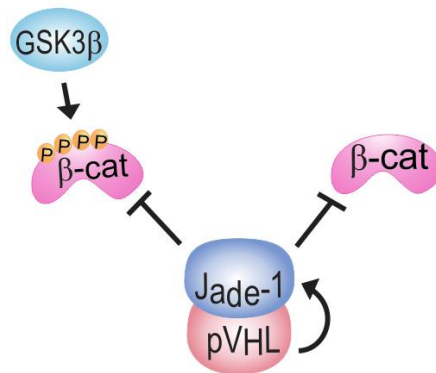


Figura 4. La proteína VHL regula negativamente los niveles de β -catenina citosólica en el epitelio de túbulo proximal (Chitalia et al., 2008).

1.6 Participación de la vía PI3K/Akt en la regulación positiva de la actividad transcripcional de β -catenina.

Además de *VHL*, las células de ccRCC tienen mutaciones que inactivan otros genes entre ellos el supresor de tumor PTEN/MMAC/TEP-1 (desde este punto referido como PTEN) (**Gnarra et al., 1994; Herman et al., 1994; Iliopoulos et al., 1995**). Esta es una fosfatasa de lípidos que comúnmente está ausente en diversos tipos de cáncer tal es el caso de cáncer de próstata, endometrial, glioblastoma y melanoma (**Song et al., 2012**).

La actividad de fosfatasa de lípido de PTEN le permite desfosforilar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3 ó PIP3), esto previene la activación de Akt en la membrana plasmática, es decir, impide la fosforilación de esta cinasa mediada por mTORC2 y PDK1 los residuos de Serina473 y Treonina308 respectivamente. Por lo tanto, la pérdida de la función de PTEN aumenta los niveles de PtdIns(3,4,5)P3 y estimula potentemente la señalización de PI3K/Akt (**Maehama and Dixon, 1998**).

La activación de la señalización de PI3K/Akt también ha sido ligada a la regulación positiva de la actividad transcripcional de β -catenina. Akt activada hiperactiva, es decir, aumenta la estabilidad y la señalización de β -catenina mediante dos mecanismos: 1) fosforila a GSK3 β en el residuo de Serina9 lo que impide la formación del “complejo de destrucción” y la fosforilación del extremo amino terminal (N-terminal) de β -catenina y, 2) fosforila a β -catenina en el residuo de Serina552, como consecuencia, estabiliza y aumenta los niveles nucleares de la molécula (**Figura 5, Figura 6 y Tabla 1**) (**Fang et al., 2007; Nava et al., 2014; Tian et al., 2004**).

Sin embargo, la contribución de la vía PI3K/Akt hacia la señalización de β -catenina en las células 786-0 de ccRCC permanece inexplorada.

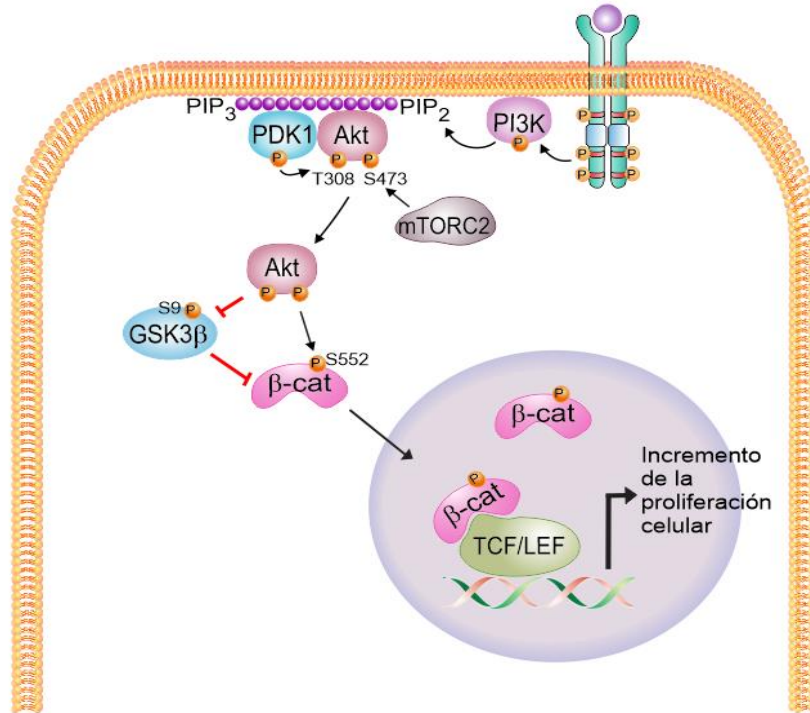


Figura 5. Resumen esquemático de la regulación de la actividad transcripcional de β-catenina mediada por PI3K/Akt. La ausencia de los mecanismos de degradación de β-catenina citosólica y la activación constitutiva de la vía PI3K/Akt potencialmente incrementa la actividad transcripcional de β-catenina en la célula de cáncer renal (Fang et al., 2007; Tian et al., 2004).

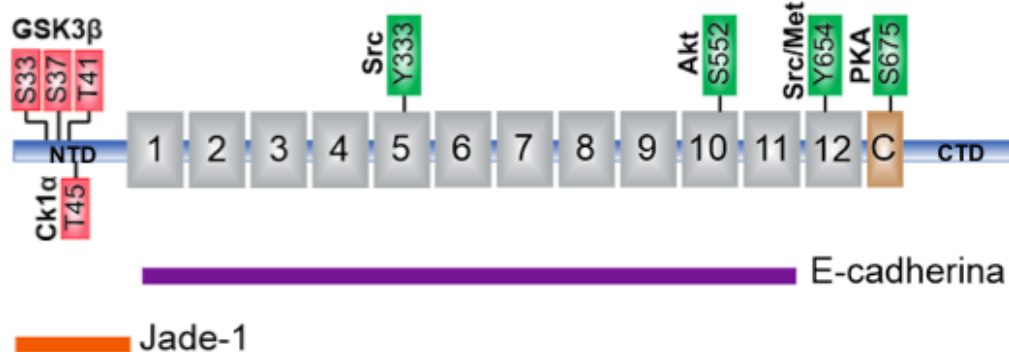


Figura 6. Esquema de los sitios de fosforilación de β-catenina por distintas cinasas. La proteína β-catenina consiste de una región central compuesta por 12 repetidos armadillo, flanqueados por un dominio amino terminal (NTD) y un dominio carboxilo terminal (CTD). Entre el repetido 12 y la parte flexible del CTD se encuentra la hélice-C (en café) conservada. La fosforilación de β-catenina en los sitios Y333, S552, Y654 y S675 (verde) incrementa la actividad transcripcional de β-catenina, por el contrario, la fosforilación de esta proteína en los sitios S33, S37 y T41 (rojo) promueven su degradación. Las barras en color púrpura y anaranjado muestran los sitios de unión, validados experimentalmente para E-cadherina y la proteína Jade-1. La E-cadherina interacciona con la región central de β-catenina que corresponde a los repetidos 1 al 11 y la proteína Jade-1 reconoce el extremo amino terminal (Chitalia et al., 2008; Valenta et al., 2012).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Participación de las proteínas 14-3-3 en la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt/ β -catenina.

2.1.1 Características y mecanismos de acción de las proteínas 14-3-3.

Las proteínas 14-3-3 son proteínas chaperonas que pueden regular ya sea positiva o negativamente diversas vías de señalización debido a su capacidad de asociarse a dominios con secuencias que contienen residuos de serina ó treonina fosforilados (**Aitken, 2006; Yaffe et al., 1997**). Entre éstas se encuentra la vía PI3K/Akt. Brevemente, estas proteínas tienen un peso molecular de aproximadamente 30 KDa y su nombre se deriva de su patrón de elución durante la cromatografía DEAE-celulosa (Dietilaminoetil-celulosa) debido a que se obtiene en la fracción 14, y por la posición de migración después de la electroforesis en gel de dos dimensiones (**Moore and Perez, 1967**). Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia de proteínas chaperonas capaces de unirse a múltiples proteínas blanco para regular su función, localización y actividad. En células humanas existen siete isotipos: beta (β), épsilon (ϵ), gama (γ), zeta (ζ), sigma (σ), eta (η) y tau (τ) (conocida también como theta (θ)), codificadas por siete genes diferentes (**Dougherty and Morrison, 2004**). Se ha demostrado que las isoformas η , θ y ϵ inhiben la proliferación celular, en cambio, la isoforma ζ tiene efecto oncogénico (**Neal et al., 2012; Sato et al., 2002**). Asimismo, los niveles de expresión de las proteínas 14-3-3 difieren entre los distintos tejidos (**Dougherty and Morrison, 2004**). Con excepción de 14-3-3 σ que únicamente forma homodímeros, las demás isoformas pueden formar homodímeros o heterodímeros, además, actúan en conformación monomérica ó dimérica, esto les proporciona una amplia versatilidad en el reconocimiento de proteínas (**Chaudhri et al., 2003; Gomez-Suarez et al., 2016**).

Las proteínas 14-3-3 ejercen su efecto sobre las proteínas blanco a través de distintos mecanismos (**Figura 7**): a) mediante la inducción de cambio conformacional que regule su función y hace más eficiente la interacción con la

proteína 14-3-3; b) mediante la oclusión física que enmascara las señales de localización celular presentes en la molécula, o que bloquea la interacción entre proteínas lo que resulta en la inhibición de la función de alguna de éstas, o enmascarando los sitios de interacción proteína-proteína o proteína-DNA; c) también funcionan como andamio que permite la interacción entre diferentes proteínas y ayuda a la formación de grandes complejos multiprotéicos (**Obsil and Obsilova, 2011**). La regulación mediada por las proteínas 14-3-3 depende de diversos factores tales como la dimerización entre éstas y la combinación que realicen entre los distintos isotipos, las diferentes afinidades por las proteínas blanco, la presencia de cinasas que regulan su actividad y los niveles de expresión de las proteínas 14-3-3. Además, un isotipo es capaz de regular positivamente una misma vía de señalización en dos diferentes puntos críticos, por el contrario, otro isotipo diferente puede inhibirla. Por esta razón, los niveles de proteína de las proteínas 14-3-3, son importantes para la regulación de las vías de señalización (**Nava et al., 2017**).

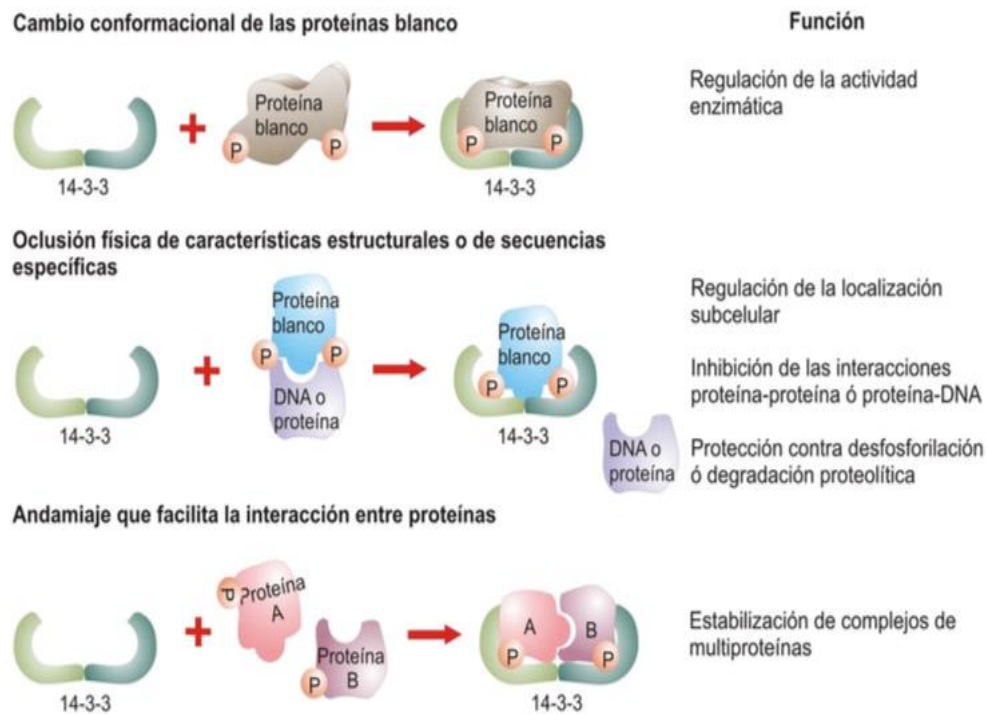


Figura 7. Mecanismos de regulación de proteínas por las proteínas 14-3-3. (Nava et al., 2017).

2.1.2 14-3-3 ζ , 14-3-3 η y 14-3-3 θ regulan positiva o negativamente la activación de Akt.

Se ha observado que los isotipos 14-3-3 η y 14-3-3 θ regulan negativamente la activación de Akt mediante la inhibición de la actividad cinasa de PDK1. Esta es una cinasa que activa a las proteínas cinasas (AGC), entre ellas a Akt y es capaz de autofosforilarse a sí misma en el residuo de Serina241 para su activación. Lo que genera un sitio de unión hacia las proteínas 14-3-3 η y 14-3-3 θ (**Figura 8**). Esta unión reduce la actividad cinasa de PDK1 para fosforilar a Akt en el residuo de Treonina308 necesaria para su completa activación (**Sato et al., 2002**). Por el contrario, la proteína 14-3-3 ζ regula positivamente la activación de la cinasa Akt debido a que reconoce a la cinasa PI3K fosforilada en el residuo de Serina83 localizado en la subunidad reguladora p85 (**Neal et al., 2012**). Esta interacción impide la degradación de PI3K y la recluta hacia la membrana plasmática celular donde es activada (**Neal et al., 2012**). Debido a que el silenciamiento de 14-3-3 ζ previene la activación de esta vía aún en presencia de suero, la unión de 14-3-3 ζ hacia PI3K es indispensable para la activación de la vía PI3K/Akt (**Neal et al., 2012**).

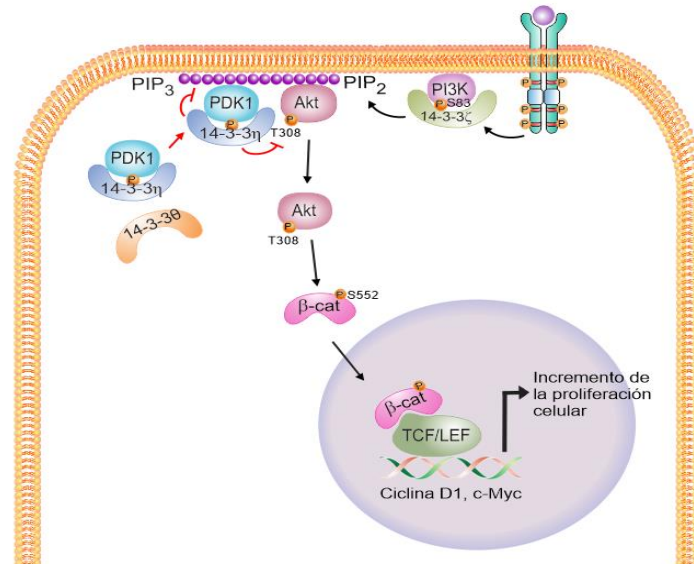


Figura 8. Las proteínas 14-3-3 regulan la activación de la vía PI3K/Akt. La activación de Akt es regulada diferencialmente por distintos isotipos de proteínas 14-3-3. 14-3-3 ζ es un regulador clave de la activación de PI3K mientras que 14-3-3 η y 14-3-3 θ inhiben la actividad cinasa de PDK1 (**Neal et al., 2012; Sato et al., 2002**).

2.1.3 14-3-3 ζ potencia la actividad transcripcional de β -catenina fosforilada por Akt.

La fosforilación de beta-catenina en el residuo de Serina 552 mediada por Akt genera un sitio de reconocimiento para 14-3-3 ζ . Esta asociación incrementa la estabilidad y la actividad transcripcional de β -catenina (Nava et al., 2014; Tian et al., 2004). Nava y colaboradores demostraron que la expresión exógena de β -catenina junto con la expresión exógena de cantidades crecientes de 14-3-3 ζ resultó en el incremento de los niveles de β -catenina total y de p β -catenina552 (Figura 9) así como en la disminución en los niveles de p β -catenina Serina33, el cuál es el sitio que reconoce la ligasa de ubiquitina β -Trcp quien marca con ubiquitina a la β -catenina soluble para la subsecuente degradación por proteosoma. A esta forma de β -catenina que no está fosforilada en el extremo N-terminal por GSK3 β se le conoce como *Active- β -catenin* (ABC), ésta se localiza principalmente en el núcleo de la célula cancerosa y ha sido asociada al incremento de la proliferación en células de cáncer de colon (Maher et al., 2010). Además, Nava y colaboradores también demostraron que en células SW480 (que poseen altos niveles de β -catenina) la sobre-expresión de 14-3-3 ζ incrementó la actividad transcripcional de β -catenina. Por el contrario, la inhibición de la expresión de 14-3-3 ζ mediante siRNA disminuyó su actividad transcripcional (Nava et al., 2014).

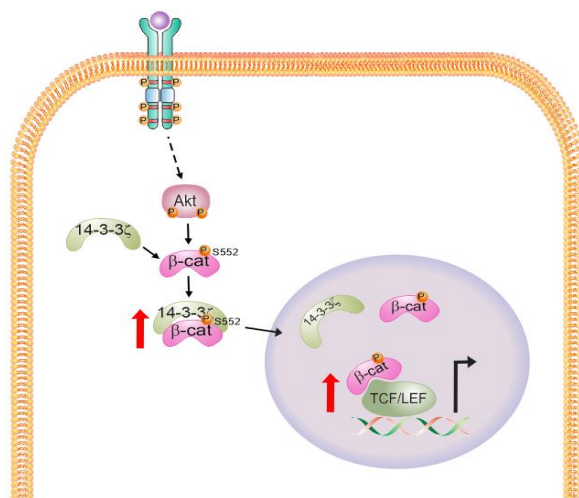


Figura 9. 14-3-3 ζ aumenta la estabilidad y la transactivación de β -catenina fosforilada por Akt. La fosforilación de β -catenina por Akt favorece la asociación de 14-3-3 ζ para formar el complejo 14-3-3 ζ : β -catenina que resulta en el incremento de la estabilidad y actividad transcripcional de β -catenina (Nava et al., 2014).

2.2 El Receptor de Neurotensina de Alta Afinidad tipo-I (NTSR1) participa en la malignidad de diferentes tipos de cáncer.

Uno de los genes blancos de β -catenina y que participa en la malignidad del cáncer es el que codifica para el NTSR1; este receptor se encuentra sobre-expresado o expresado *de novo* en diversos tipos de cáncer (**Bossard et al., 2007; Carraway and Plona, 2006; Reubi et al., 1998**). Es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G (GPCR) y es activado por la unión de su ligando la Neurotensina (NTS). En condiciones fisiológicas éste participa en la neurotransmisión y neuromodulación en el Sistema Nervioso Central (SNC) (**Ferraro et al., 2001; Jolas and Aghajanian, 1996**), y en el tracto gastrointestinal participa en la motilidad, proliferación y regeneración celular (**Thor and Rosell, 1986**).

Sin embargo, en cáncer, se ha demostrado que la hiperactivación del NTSR1 por su ligando desencadena a su vez la activación de diversas vías de señalización que aumentan la proliferación, supervivencia, migración, angiogénesis e invasividad (**Figura 10 y 11**) (**Wu et al., 2012**). Asimismo conlleva a la expresión de su ligando la NTS que ocurre a través de la activación de la proteína cinasa C (PKC) y subsecuentemente de la vía de las MAPKs, lo que resulta en la expresión de factores de transcripción como AP-1, el cual tiene como gen blanco al de NTS (**Dupouy et al., 2011; Ehlers et al., 2000; Evers, 2002; Souza et al., 2006**). Este es un evento clave en la progresión y malignidad del cáncer debido a que resulta en un mecanismo de retroalimentación autócrino del NTSR1 en la estimulación del crecimiento tumoral (**Evers, 2006; Wu et al., 2012**).

Por lo tanto el aumento de la actividad transcripcional de β -catenina desemboca en la sobre-expresión de NTSR1 y de NTS lo que dirige a la activación constitutiva del NTSR1 (**Figura 11**) (**Wu et al., 2012**).

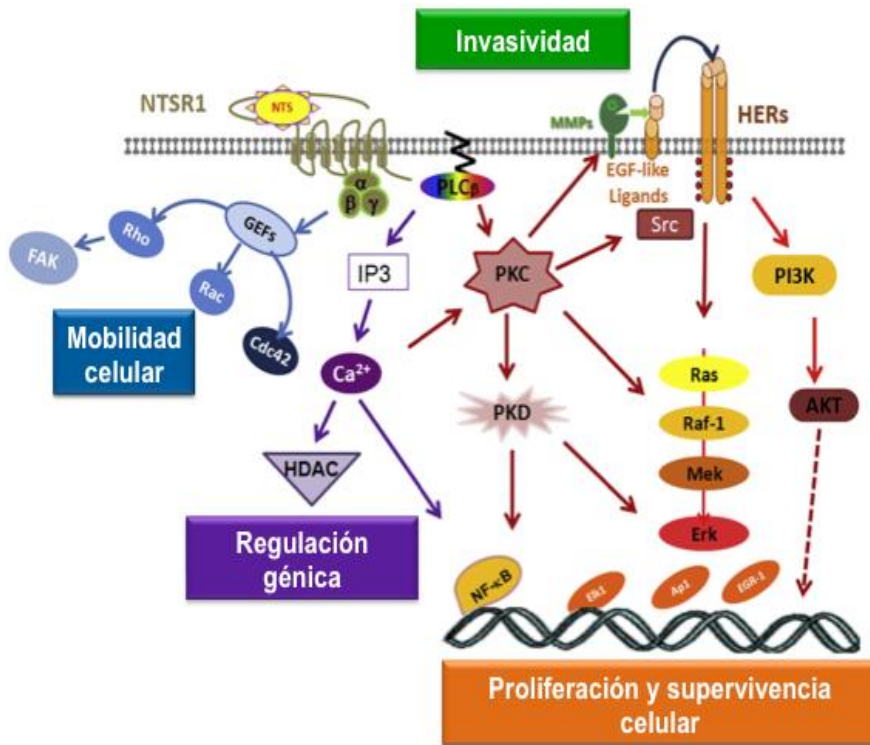


Figura 10. Señalización activada por NTS/NTSR1. Diversas vías contribuyen en la progresión de cáncer tras la activación del NTSR1 (Dupouy et al., 2011).

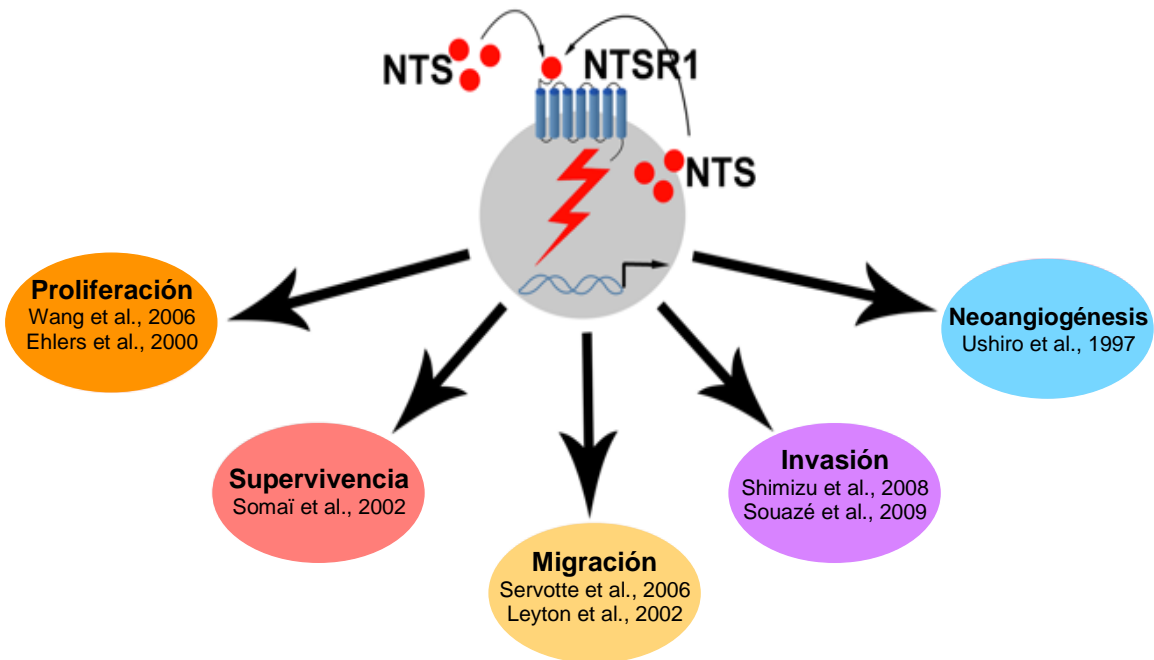


Figura 11. Representación esquemática de los efectos oncogénicos que resultan de la activación del NTSR1 (Wu et al., 2012).

En resumen, el aumento de la hiper-activación (aumento de la estabilidad y de la actividad transcripcional) de β -catenina en células 786-0 se ha atribuido principalmente al incremento de los niveles de β -catenina citosólica como respuesta a la ausencia del sistema pVHL/Jade-1. Además, en otras líneas celulares se ha observado que existen mecanismos tales como la hiper-activación de la vía PI3K/Akt y la participación de las proteínas chaperonas 14-3-3 tanto en la regulación de esta vía como en el incremento de la estabilidad y la actividad transcripcional de β -catenina lo que resulta en la expresión exacerbada de sus genes blanco, en parte responsables de la malignidad de otros cánceres. En ccRCC, la proteína β -catenina desempeña un papel importante en la malignidad, pero hasta el momento no se ha investigado ni la participación del eje PI3K/Akt/ β -catenina, ni el papel que desempeñan las proteínas 14-3-3 en la hiper-activación de la señalización de β -catenina en células de ccRCC.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En ccRCC, la pérdida de la función de la pVHL aumenta la proliferación celular debido a la sobre-expresión de genes blanco de β -catenina. En otros sistemas, se ha demostrado que la desregulación de la vía de señalización PI3K/Akt/ β -catenina es responsable del incremento de la proliferación celular. Sin embargo, tanto en ccRCC como en otros sistemas se desconoce el papel que desempeña la pVHL sobre la regulación del eje PI3K/Akt/ β -catenina.

4. HIPÓTESIS.

La pérdida de la función de pVHL conducirá a la hiper-activación de Akt provocando el aumento de la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0 de ccRCC.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General.

Investigar el mecanismo por el cual la pérdida de la función de pVHL conduce a la hiper-activación de Akt provocando el aumento de la proliferación celular mediada por β -catenina.

5.2 Objetivos Particulares.

- I. Demostrar que la proliferación celular en las células 786-0 de ccRCC depende de β -catenina.

- II. Demostrar que la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0 depende de Akt.

- III. Demostrar que el eje Akt/ β -catenina y la expresión del NTSR1 están controlados por las proteínas 14-3-3 en las células 786-0.

- IV. Demostrar que la expresión de la proteína VHL en las células 786-0 ocasiona la supresión de la vía PI3K/Akt/ β -catenina así como de los niveles del NTSR1 debido a la inhibición de 14-3-3 ζ .

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Anticuerpos, reactivos y plásmidos.

La información de los anticuerpos, reactivos y plásmidos utilizados se muestra en las siguientes tablas:

Anticuerpo primario	No. de Cat.	Uso	Compañía
14-3-3 β/α	9636	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
14-3-3 ϵ	9635	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
14-3-3 γ	5522	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
14-3-3 η	5521	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
14-3-3 θ	9638	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
14-3-3 σ	ab151504	WB 1:1000	abcam
14-3-3 ζ	sc-1019	WB 1:20000 IF 1:5000	Santa Cruz Biotechnology
p110 α	4249	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
p110 β	3011	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
p85	4257	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
pp85	4228	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
PDK1	13037	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
pPDK1	3061	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
Akt1 (C73H10)	2938	WB 1:2000	Cell Signaling Technology
Akt2 (5B5)	2664	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
pAkt473	4060	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
pAkt308	4056	WB 1:2000	Cell Signaling Technology
GSK3 β	610202	WB 1:2000	BD Transduction
pGSK3 β	5558	WB 1:2000	Cell Signaling Technology
Active- β -catenin (BD1480)	sc-59893	WB 1:1000 IF 1:500	Santa Cruz Biotechnology
Total β -catenin	sc-1496	WB 1:1000	

(C-18)		IF 1:500	Santa Cruz Biotechnology
<i>pβ-catenin ser 552</i>	9566	WB 1:2000	Cell Signaling Technology
<i>NTSR1</i>	ANT-015	WB 1:1000	Alomone Labs
<i>pHis H3</i>	ab32107	WB 1:1000	abcam
		IF 1:1000	
<i>PCNA</i>	13110	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
<i>Snail</i>	ab82846	WB 1:1000	abcam
<i>Survinina</i>	2808	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
<i>Jade-1</i>	ab155215	WB 1:1000	abcam
<i>pVHL</i>	2738	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
<i>HIF2α</i>	ab149	WB 1:750	abcam
<i>E-cadherin</i>	sc-59778	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
<i>HA</i>	sc-7342	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Oct-A (anti-FLAG®-tag)</i>	Sc-807	WB 1:2000	Santa Cruz Biotechnology
<i>C-Myc (C-8)</i>	Sc-41	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<i>GAPDH</i>	sc-32233	WB 1:30000	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa	No. de Cat.	Uso	Compañía
<i>Burro anti ratón IgG</i>	715035151	1:1000	Jackson Immuno Reseach
<i>Burro anti cabra IgG</i>	705035147	1:1000	Jackson Immuno Reseach
<i>Cabra anti conejo (Fc Fragment)</i>	111036047	1:1000	Jackson Immuno Reseach

Tabla 3. Anticuerpos secundarios usados para western blotting.

Anticuerpo Fluoresceinado	No. de Cat.	Uso	Compañía
<i>Alexa Fluor 488 cabra anti conejo</i>	A11008	1:1000	Invitrogen
<i>Alexa Fluor 488 cabra anti ratón</i>	A11001	1:1000	Invitrogen
<i>Alexa Fluor 594 cabra anti conejo</i>	A11012	1:1000	Invitrogen
<i>DAPI</i>	D9542	1:2000	Sigma Aldrich

Tabla 4. Anticuerpos secundarios usados para Inmunofluorescencia.

Reactivo	No. de Cat.	Uso	Compañía
XAV939	D2650	1 μ M	Sigma Aldrich
CoCl ₂	C8661-25G	200 μ M	Sigma Aldrich
LY-294002	<u>934389-88-5</u>	1 mM	Sigma Aldrich
AKT VIII	124018	2.12 μ M	Calbiochem (Darmstadt, Germany)
NTS	022912-3	3 nM	RS Synthesis
Cycloheximide	C0934	20 μ g/mL	Sigma Aldrich
BV02	100082	5 μ M	Sigma Aldrich
AZD5363	-----	3 μ M	Generosamente donado por AstraZeneca
AZD8186	-----	500 nM	Generosamente donado por AstraZeneca
LiCl	7447418	5 μ M	Sigma Aldrich
H-89	371963-M	133 nM	Sigma Aldrich

Tabla 5. Reactivos utilizados.

Construcción	No. de Cat.	Vector (tag)	Compañía
<i>E-cadherina</i>		pcDNA3	Obtenido de (Gottardi et al., 2001)
<i>pVHL</i>	19234	pBabe-puro-HA-VHL	Addgene

<i>pVHL</i>	19999	pRc-CMV-HA-VHL	Addgene
<i>HA-Akt1</i>	14549	pcDNA3.1 (HA)	Addgene
<i>14-3-3 ε</i>	RC200245	pcDNA3 (Flag)	Origene Technologies
<i>14-3-3 η</i>	RC200013	pcDNA3 (Flag)	Origene Technologies
<i>14-3-3 θ</i>	RC208646	pcDNA3 (Flag)	Origene Technologies
<i>14-3-3 ζ</i>	RC209909	pcDNA3 (Flag)	Origene Technologies

Tabla 6. Plásmidos utilizados.

6.2 Cultivos celulares.

Las células 786-0 fueron obtenidas de ATCC y se cultivaron en medio RPMI-1640 al 10% de suero fetal bovino, GlutaMax 2 mM y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. Se mantuvieron en incubadora húmeda al 5% de CO₂

Las células HK-2 fueron obtenidas en ATCC y se cultivaron en medio libre de suero para queratinocitos *Keratinocyte Serum Free Medium* (K-SFM), (No. 17005-042 Invitrogen, GIBCO) suplementado con 0.05 mg/ml de extracto de pituitaria bovina (BPE) y 5 ng/ml de factor de crecimiento epidermal recombinante humano (EGF). Se mantuvieron en incubadora húmeda al 5% de CO₂ (**Jenkinson et al., 2012**).

Las células MDCK fueron cultivadas como ya se ha reportado (**Nava et al., 2004**). Las células se mantuvieron en incubadora húmeda al 5% de CO₂.

Las células se sembraron en cajas de cultivo para ser tratadas con inhibidores y para ser transfectadas. Para los experimentos de inmunofluorescencia, se sembraron en cubreobjetos cubiertos con colágena.

6.3 Transfección de los diferentes plásmidos en las células 786-0, HK-2 y MDCK.

Las células se sembraron a confluencia y se mantuvieron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente y fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, San Diego, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.4 Tratamientos en las células 786-0, HK-2 y MDCK.

Las células se sembraron y se mantuvieron siguiendo los procedimientos previamente descritos (**Jenkinson et al., 2012; Nava et al., 2004**) y se trataron con los diferentes inhibidores a las concentraciones descritas en la **Tabla 4**. Las células fueron tratadas con los inhibidores 12 horas después de haberlas sembrado.

6.5 Ensayos de proliferación celular.

La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de Bromuro de 3-(4, 5- dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proliferación fue calculada mediante la medición de la absorbancia a 562 nm usando un lector de microplaca (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

6.6 Ensayo de Western-blotting.

Las muestras fueron recolectadas en solución amortiguadora de lisis RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, Tris 50 mM [pH 8.0]) suplementada con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma; St. Louis MO). Enseguida las muestras se sonicaron y clarificaron por centrifugación. La concentración de proteínas fue determinada mediante el sistema BCA (Pierce; Rockford, IL) y las muestras se hirvieron en solución amortiguadora de carga SDS con 50 mM de ditiotreitol (Sigma; St. Louis, MO). Cantidades iguales de proteína se separaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron hacia membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en solución

amortiguadora de bloqueo que contiene leche descremada al 2% wt/vol o BSA (Sigma; St. Louis, MO) disuelta en solución amortiguadora de Tris (Sigma; St. Louis, MO) que contiene 0.1% de Tween-20 (Sigma; St. Louis, MO), y se incubaron con anticuerpos primarios en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, en agitación constante.

6.7 Microscopía de inmunofluorescencia.

Las células fueron fijadas durante 15 minutos con paraformaldehído (Sigma; St. Louis, MO) al 4% (PFA en PBS 1X) y se realizaron 2 lavados con PBS 1X, después se permeabilizaron con metanol (Sigma; St. Louis, MO) al 100% por 20 minutos y se hicieron 2 lavados con PBS 1X. Posteriormente las muestras fueron bloqueadas durante 1 hora con BSA (libre de IgG) (Sigma; St. Louis, MO) al 2% wt/vol disuelta en PBS 1X y enseguida se incubaron con anticuerpos primarios disueltos en BSA al 2% durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación de las preparaciones se lavaron 2 veces con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Después de la incubación, se realizaron varios lavados con PBS 1X y los núcleos fueron teñidos con DAPI (Sigma; St. Louis, MO), los cubre-objetos fueron montados con p-fenilen. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal LSM 710 (Zeis; Jena, Germany), se usaron los objetivos de aceite Plan-NEOFLUAR 1003/1.3 oil, 403/1.3 oil y el objetivo seco 203/0.5, las imágenes se editaron con el programa provisto por el vendedor (ZEN lite, Zeiss; Jena, Alemania).

6.8 Ensayo de inmunoprecipitación.

Durante todo el ensayo, las células se mantuvieron en hielo a 4°C. Las células fueron recolectadas en solución de lisis (PBS-Tritón al 0.1%) suplementada con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma; St. Louis MO). A los lisados celulares

se les agregó DNAsa y se dejaron incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Después se incubaron con perlas de sefarosa 4B (Sigma; St. Louis, MO) previamente equilibradas con PBS-Tritón al 0.1% y se dejaron en agitación constante durante 3 horas a 4°C para aclarar las muestras. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y la concentración de proteínas fue determinada mediante el sistema BCA (Pierce; Rockford, IL). Cantidades iguales de proteína fueron incubadas con anticuerpo primario Oct-A (anti-FLAG®-tag; Santa Cruz Biotechnology) y con el control de isotipo durante toda la noche a 4°C en agitación constante. A cada muestra se les agregó perlas de proteína G (Amersham Fast-flow Sepharose) previamente equilibradas con PBS-Tritón 0.1% y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las muestras se hirvieron en solución amortiguadora de carga SDS con 50 mM de ditiotreitól (Sigma; St. Louis, MO), se centrifugaron a 13,200 rpm durante 10 minutos a 4°C y las proteínas del sobrenadante se separaron en geles de SDS-PAGE para realizar el Western-blotting como se detalló previamente.

6.9 Fraccionamiento celular.

El fraccionamiento celular fue realizado mediante el uso del Kit “Subcellular Protein Fractionation” (Thermo Scientific; Waltham, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

6.10 Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La prueba de Dunnett, después de ANOVA unidireccional o la prueba de t de Student de dos colas, fueron utilizadas para analizar los datos (GraphPad Software; La Jolla, CA). $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS.

7.1 La β -catenina media la proliferación celular en las células 786-0.

Primero analizamos los niveles de la proteína β -catenina en las células 786-0 y en las líneas celulares inmortalizadas HK-2 (de túbulo proximal humano) (Jenkinson et al., 2012; Ryan et al., 1994) y MDCK (línea celular de epitelio canino) (Gaush et al., 1966). Usando un anticuerpo que reconoce todas las formas de β -catenina, observamos niveles similares de la proteína en todas las líneas celulares (Figura 12A). La forma de β -catenina que no está fosforilada en la región N-terminal es conocida como β -catenina Activa (referida como ABC por *Active β -catenin*) y se ha asociado con la hiper-activación de la señalización mediada por β -catenina. Entonces, analizamos la presencia de ABC en aquellas líneas celulares. Como se observó en la figura 12A, se detectaron niveles altos de ABC en las células 786-0 y MDCK, y niveles muy bajos de ABC estuvieron presentes en las células HK-2. ABC y β -catenina total son secuestradas por E-cadherina en la membrana plasmática de las células epiteliales (Gottardi and Gumbiner, 2004; Maher et al., 2010). Por lo tanto, analizamos la presencia de E-cadherina en aquellas líneas celulares. Como se mostró en la figura 12A, se detectaron niveles altos de E-cadherina en las células MDCK no así en las otras líneas celulares. Después, investigamos la localización celular de β -catenina total y de ABC en esas líneas celulares mediante inmunofluorescencia (IF). ABC se observó enriquecida en el núcleo de las células 786-0 pero β -catenina total fue detectada tanto en citosol y en el núcleo (Figura 12B). En las células HK-2, no se detectó señal de ABC, pero la señal para β -catenina total tanto citosólica y unida a membrana fue claramente percibida. Además, ABC y β -catenina total solo fueron detectadas en la membrana plasmática celular de las células MDCK (Figura 12B y datos no mostrados). También, observamos que los niveles del NTSR1 un blanco río abajo de β -catenina, están incrementados en las células 786-0 cuando se compararon con las líneas celulares HK-2 y MDCK (Figura 12C). Por lo tanto, el incremento de la población Active- β -catenin (ABC) y su localización nuclear en las células 786-0 sugieren que ésta es responsable de la sobre-expresión del NTSR1.

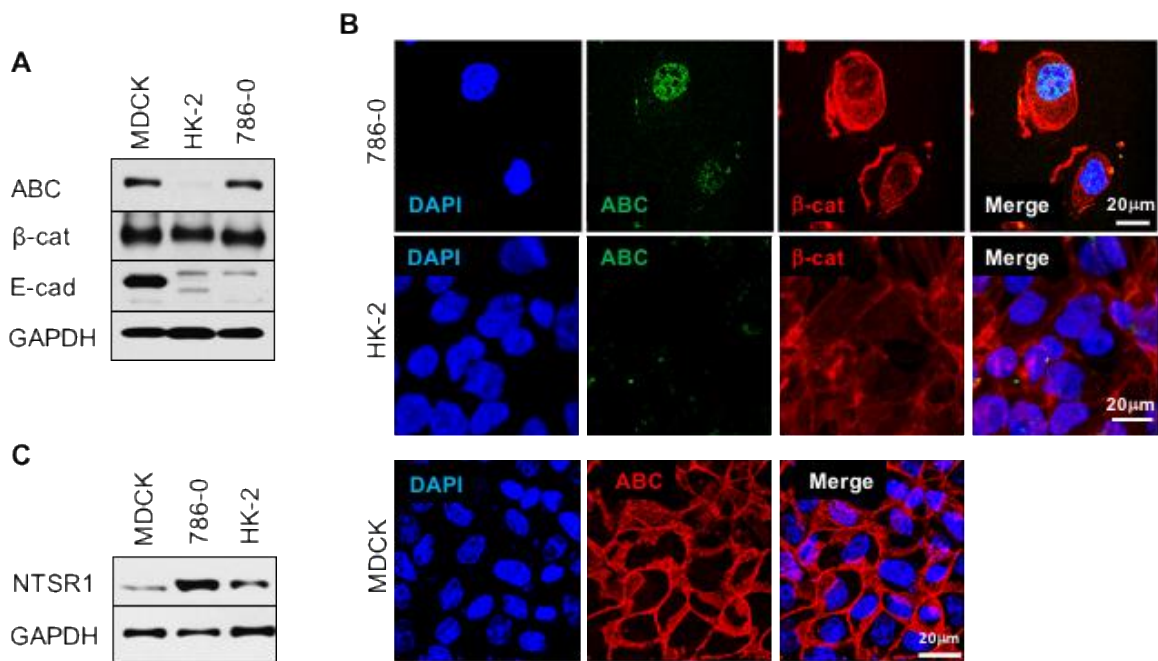


Figura 12. Los niveles y la localización de población Active-β-catenin (ABC) sugiere que ésta participa en la sobre-expresión del NTSR1 en las células 786-0. (A) Los niveles de ABC, β-catenina y E-cadherina fueron analizados mediante western blotting de los lisados celulares de MDCK, HK-2 y 786-0. GAPDH fue usado como control. (B) La distribución de ABC (en verde) y de β-catenina (en rojo) fue analizada mediante inmunofluorescencia en las células HK-2 y 786-0. La localización de ABC (rojo) fue investigada en las células MDCK mediante inmunofluorescencia indirecta. Los núcleos están en azul (DAPI). Barra de calibración 20 μm. (C) Los niveles de NTSR1 fueron analizados por western blotting de los lisados celulares de MDCK, HK-2 Y 786-0. GAPDH fue usado como control de carga.

Posteriormente investigamos el efecto de la inhibición de la señalización de β-catenina sobre la proliferación celular en las células 786-0 tratadas con el inhibidor de tanquirasa XAV939 (Huang et al., 2009). Este inhibe selectivamente la transcripción mediada por β-catenina a través de la estimulación de la degradación mediante proteosoma de las enzimas tanquirasas, la cuales interactúan con la proteína de andamiaje Axina que forma parte del complejo de destrucción de β-catenina (Huang et al., 2009).

El tratamiento con el inhibidor XAV939 disminuyó los niveles de la población ABC y de β-catenina total en una manera dependiente a la dosis (Figura 13A).

Además, este tratamiento disminuyó la fosforilación en la Histona H3 (pHist3) y los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés), los cuáles son dos conocidos fidedignos marcadores de proliferación celular, y también disminuyó la reducción de sales de tetrazolio (MTT), es decir, la proliferación celular (**Figura 13B**).

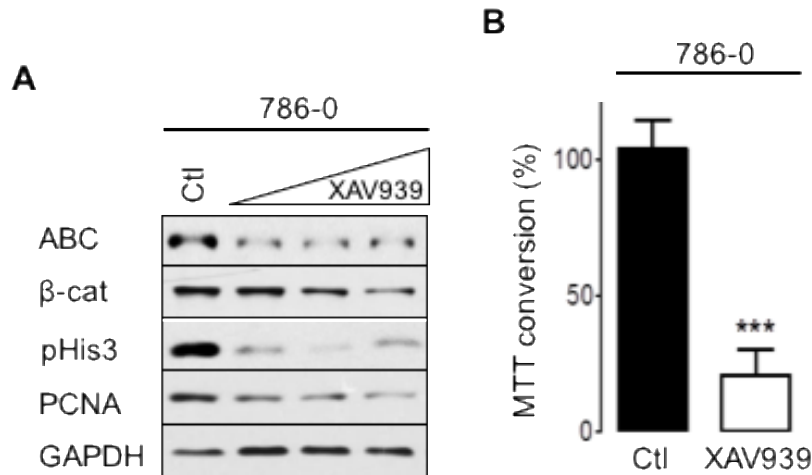


Figura 13. La degradación inducida de β-catenina disminuye la proliferación celular en las células 786-0. (A) ABC, β-catenina, pHist3 y PCNA fueron analizados en los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con concentraciones crecientes (1, 2 y 4 μM) de XAV939 o sin tratamiento (Ctl). GAPDH fue usado como control. (B) La conversión a MTT fue analizada en las células 786-0 tratadas con XAV939 (1 μM) durante 12 horas. Las células control fueron tratadas con vehículo solo. Después de 30 minutos de tratamiento las células se sometieron a estimulación con suero por 2 horas. *** P<0.001.

La proteína E-cadherina y la proteína VHL son inhibidores de la señalización de β-catenina y en las células 786-0 hay poca y nula expresión de estas moléculas respectivamente (**Figura 12A y 14A**). Por tal motivo analizamos el efecto de la sobre-expresión de la proteína E-cadherina completa o de la proteína VHL en la regulación de la proliferación celular mediada por β-catenina. Como se muestra en la **figura 14B**, se detectó una reducción en los marcadores de proliferación celular pHist3 y PCNA de las células 786-0 que sobre-expresan E-cadherina. Debido a que E-cadherina inhibe la señalización de β-catenina mediante el secuestro de la molécula en la membrana plasmática celular (**Gottardi and Gumbiner, 2004; Gottardi et al., 2001**), notamos que la sobre-expresión de la E-cadherina no afecta

los niveles de β -catenina total o de ABC. Sin embargo, la sobre-expresión del supresor de tumor pVHL redujo los marcadores de proliferación celular y disminuyó los niveles de la proteína β -catenina y de ABC (**Figura 14C**).

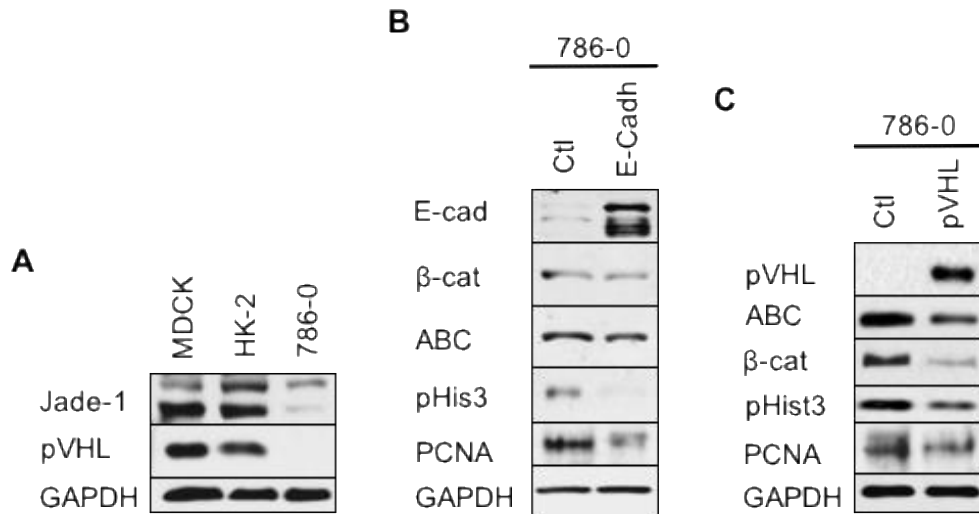


Figura 14. La ausencia de la proteína VHL aumentó la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0. (A) Jade-1 y pVHL fueron analizadas mediante western blotting de los lisados celulares de las células MDCK, HK-2 and 786-0. GAPDH fue usado como control. (B) E-cadherina, ABC, β -catenina, pHist3 y PCNA fueron analizados en los lisados celulares de las células 786-0 transfectadas transitoriamente con el vector vacío (Ctl) o con el vector que expresa E-cadherina. GAPDH fue usado como control. (C) Las proteínas VHL, ABC, β -catenina, pHist3 y PCNA fueron analizadas en los lisados celulares de las células 786-0 transfectadas transitoriamente con el vector vacío (Ctl) o con el vector que expresa pVHL-myc. GAPDH fue usado como control.

Además, la inducción de hipoxia mediante CoCl_2 (Piret et al., 2002) disminuyó los niveles del marcador de proliferación celular pHistona-3 en las células HK-2 y MDCK (**Figura 15**). Interesantemente, la inducción de hipoxia no afectó los niveles de ABC y de β -catenina total en esas líneas celulares, sugiriendo que la ausencia de pVHL fue necesaria para incrementar la proliferación celular en las células 786-0 (**Figura 14C**).

En resumen, estos resultados sugieren que ABC nuclear pudiera ser la responsable del incremento de la señalización de β -catenina y de la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0 debido a la ausencia de pVHL.

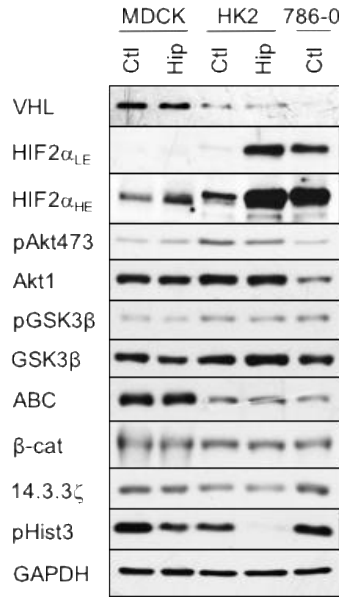


Figura 15. El incremento inducido de HIF2 α no afectó los niveles de Active- β -catenin (ABC) y los de β -catenina total en las células MDCK y HK-2. La señalización Akt/ β -catenina fue analizada mediante western blotting de lisados celulares de las células MDCK, HK-2 y 786-0. Las células MDCK y HK-2 fueron tratadas durante 24 horas con el acarreador solo o con 200 mM del inductor de hipoxia CoCl₂. La presencia de HIF2 α fue monitoreada como marcador de la inducción de hipoxia. GAPDH fue usado como control. LE = baja exposición (Low exposure), HE = alta exposición (High Exposure).

7.2 Akt regula la localización intracelular, la señalización y los niveles de proteína de β -catenina en las células 786-0.

Enseguida investigamos la contribución de la señalización de Akt en el mantenimiento de los niveles de la proteína ABC en las células 786-0. Para este propósito analizamos los niveles de pAkt473 en los lisados celulares de las células MDCK, 786-0 y HK-2. Como se muestra en la **figura 16A**, las células 786-0 presentaron una activación mayor de Akt en comparación con las células HK-2 y MDCK (pAkt473), aunque, los niveles de proteína de Akt1 fueron menores en las células 786-0 en comparación con las células HK-2 y MDCK. De manera interesante los niveles de Akt2 fueron similares entre las células HK-2 y 786-0 y Akt2 estuvo casi ausente en las células MDCK (**Figura 16A**). Además, como se muestra en la **figura 16B** existe una clara reducción en ABC en las células 786-0 expuestas por 12 horas a *Akt inhibitor VIII* o al inhibidor de PI3K LY294002, pero estos tratamientos no afectan los niveles de β -catenina total. La reducción de pAkt473 en las células

expuestas a los inhibidores demostró la eficiencia y especificidad de los tratamientos. Además, el tratamiento con *Akt inhibitor VIII* o LY294002 redujo la conversión de MTT y la expresión de NTSR1 en las células 786-0 (**Figura 16C, 17A y 17B**) demostrando que la inhibición de Akt reduce no solo la transactivación de β -catenina, sino también la proliferación celular mediada por dicha molécula en estas células.

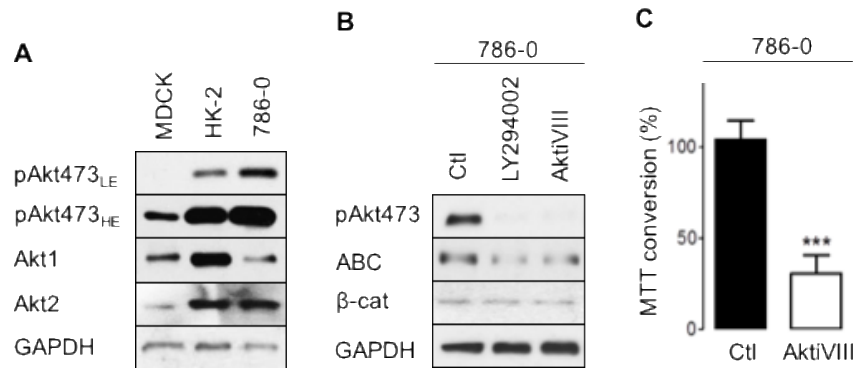


Figura 16. La inhibición de la activación de Akt disminuye los niveles de la población Active- β -catenin (ABC) y reduce la proliferación celular. (A) pAkt473, Akt1 y Akt2 fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células MDCK, HK-2 y 786-0. pAkt473_{LE}=Baja Exposición y pAkt473_{HE}=Alta Exposición. GAPDH fue usado como control. (B) pAkt473, ABC y β -catenina fueron analizados por western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002 (1 mM) o con el inhibidor *Akt inhibitor VIII* (2.12 μ M). 12 horas después de haberlas sembrado, las células 786-0 fueron tratadas con los inhibidores durante 30 minutos antes de la estimulación con suero durante 2 horas. Ctl = sin tratamiento, GAPDH fue usado como control (C). La conversión a MTT fue analizada en las células 786-0 tratadas con *Akt inhibitor VIII* (2.12 μ M) durante 12 horas. Las células control (Ctl) fueron tratadas con vehículo solo. Las células 786-0 fueron tratadas con los inhibidores 30 minutos antes de la estimulación con suero durante 2 horas. *** P < 0.001.

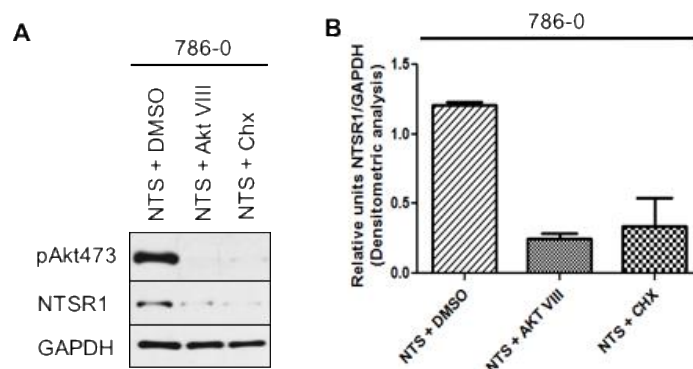


Figura 17. La inhibición de la activación de Akt disminuye los niveles de proteína del NTSR1 en las células 786-0. (A) pAkt473 y NTSR1 fueron analizados mediante western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con Akt inhibitor VIII (2.12 μ M) ó con Cicloheximida (20 μ g/ml), GAPDH fue usado como control. (B) Gráfica del análisis densitométrico relativo a GAPDH.

De manera interesante también podemos decir que la población ABC se enriquece en el núcleo de las células no tratadas con *Akt inhibitor VIII* y que la presencia de dicho compuesto induce la acumulación de la molécula en la membrana plasmática como lo muestran los análisis de IF de la **figura 18A y 18B**. Aunado a esto, también detectamos enriquecimiento de β -catenina total en la membrana celular plasmática de las células 786-0 tratadas con el inhibidor de Akt (**Figura 18A**). Es importante mencionar que no se detectaron cambios en la activación de Akt en las células HK-2 o MDCK que fueron sometidas a hipoxia (**Figura 15**) por lo que hipotetizamos que en las células 786-0 la pérdida de pVHL juega un papel importante en el incremento de la señalización de Akt y que esto a su vez potencia la transactivación de β -catenina.

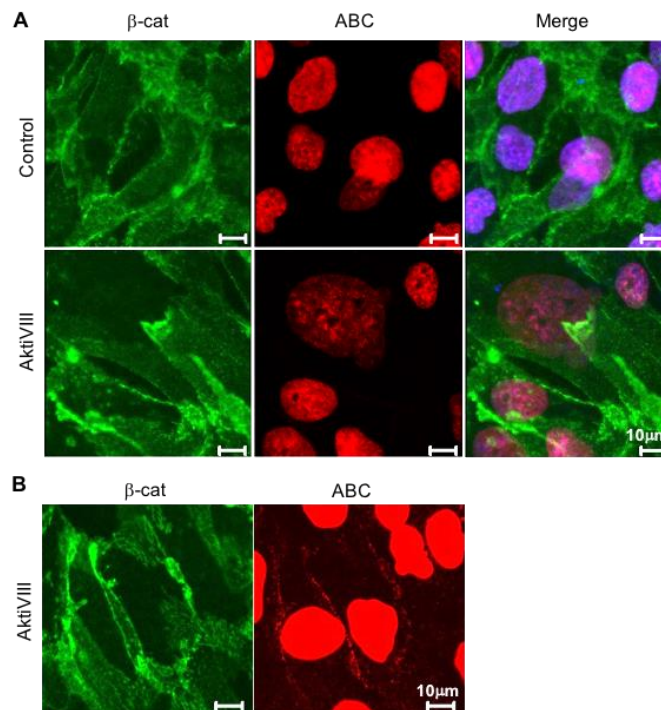


Figura 18. La inhibición de la activación de Akt enriquece la localización de β -catenina total y de Active- β -catenin (ABC) en la membrana plasmática de las células 786-0. (A) La localización de ABC fue analizada por inmunofluorescencia en las células 786-0 tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002 (1 mM) o con el inhibidor de Akt *Akt inhibitor VIII* (2.12 μ M). 12 horas después de haberlas sembrado, las células 786-0 fueron tratadas con los inhibidores 30 minutos antes de la estimulación con suero durante 2 horas. Las células control (Ct) fueron tratadas con vehículo solo. Los núcleos están en azul. Barra de calibración = 10 μ m. (B) β -catenina total (verde) y ABC (rojo) fueron analizados por inmunofluorescencia en las células 786-0 tratadas con el inhibidor *Akt inhibitor VIII* (2.12 μ M). La ganancia del canal rojo fue incrementada un 50% con respecto a la señal en la **figura 15A**, a fin de detectar la señal para ABC en la membrana celular plasmática Barra de calibración = 10 μ m.

Enseguida analizamos el efecto de sobre-expresar una forma constitutivamente activa de Akt en la generación de ABC en las células MDCK y HK-2. Como se muestra por IF, la sobre-expresión transitoria de Akt1 aumentó a β -catenina nuclear y citosólica en las células MDCK (**Figura 19A**). Sin embargo, la población ABC de β -catenina no fue afectada de manera importante a pesar de que pAkt473 aumenta claramente (**Figura 19B**). Resultados similares fueron observados en la línea celular HK-2 (**Figura 19B**). Asimismo, los niveles de proteína β -catenina total no fueron afectados en las dos líneas celulares. Por lo tanto, todos estos resultados en conjunto nos sugieren fuertemente que aunado a la hiperactivación de Akt otros mecanismos son requeridos para incrementar la formación de ABC en líneas celulares renales.

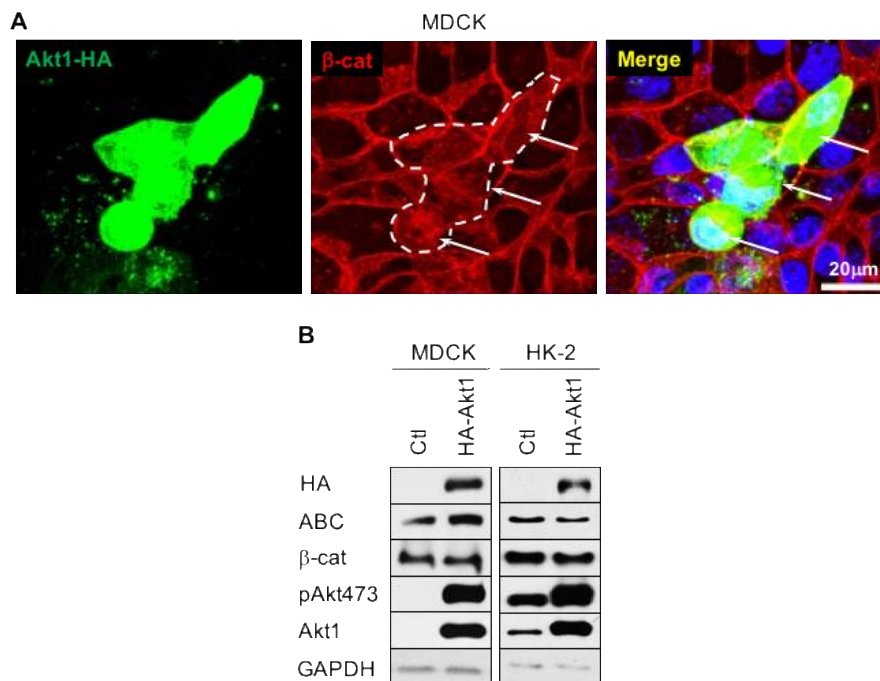


Figura 19. La sobre-expresión de Akt indujo la relocalización de β -catenina desde la membrana plasmática hacia el citosol y núcleo. (A) La distribución de HA-Akt (HA = hemaglutinina; verde) y de β -catenina (rojo) fue examinada mediante inmunofluorescencia en las células MDCK que sobre-expresan Akt-HA. 12 horas después de la transfección, las células MDCK fueron procesadas para tinción por inmunofluorescencia. Las flechas blancas señalan las células que expresan Akt1 con β -catenina citosólica. Los núcleos están en azul. Barra de calibración = 20 μ m. **(B)** HA, ABC, β -catenina, pAkt473 y Akt1 fueron analizadas en los lisados celulares de las células HK-2 y MDCK transfectadas transitoriamente con el vector vacío o con el vector que expresa Akt1-HA. 24 horas después de la transfección, las células MDCK fueron procesadas para tinción por inmunofluorescencia. GAPDH fue usado como control.

7.3 La hiper-activación de Akt es mediada por las proteínas 14-3-3.

Las proteínas 14-3-3 juegan un papel importante en la activación de la señalización de Akt (**Figura 20A** y (**Gomez-Suarez et al., 2016; Hernandez-Trejo et al., 2016; Neal et al., 2012; Sato et al., 2002**)). Por consiguiente, analizamos la presencia de las proteínas 14-3-3 en las células MDCK, HK-2 y 786-0. Como se observa en la **figura 20B**, los siete isotipos de 14-3-3 fueron detectados en las líneas celulares de riñón. Sin embargo, las células 786-0 presentaron niveles bajos de 14-3-3 η , 14-3-3 θ y 14-3-3 ϵ en comparación con las células MDCK y HK-2. Además, existe un incremento ligero pero significativo de 14-3-3 ζ en la línea celular 786-0 en comparación con los niveles de la 14-3-3 ζ presente en las células MDCK y HK-2 (MDCK 1 contra HK2 1.75 \pm 0.05 contra 786-0 2.28 \pm 0.037). No se observaron cambios claros en los niveles de proteína de 14-3-3 γ , 14-3-3 σ y 14-3-3 α/β .

Debido a que las proteínas 14-3-3 regulan la señalización de PI3K/Akt en diferentes puntos de la vía (**Figura 20A**), especulamos que las proteínas 14-3-3 pudieran estar afectando la maquinaria que controla la señalización de PI3K/Akt. Para investigar esta teoría, analizamos los componentes de la vía de señalización PI3K/Akt que son controlados por las proteínas 14-3-3.

Como se mostró en la **figura 20C** la fosforilación incrementada de p85, PDK1 y pAkt308 fueron detectados en las células 786-0 en comparación con las células MDCK o HK-2. Además, niveles altos de p110 α y p110 β fueron detectados en 786-0 y HK-2 cuando se compararon con las células MDCK. Aunado a esto, niveles altos de p85 fueron detectados en la línea celular HK-2. No se observaron cambios claros en PDK1 total.

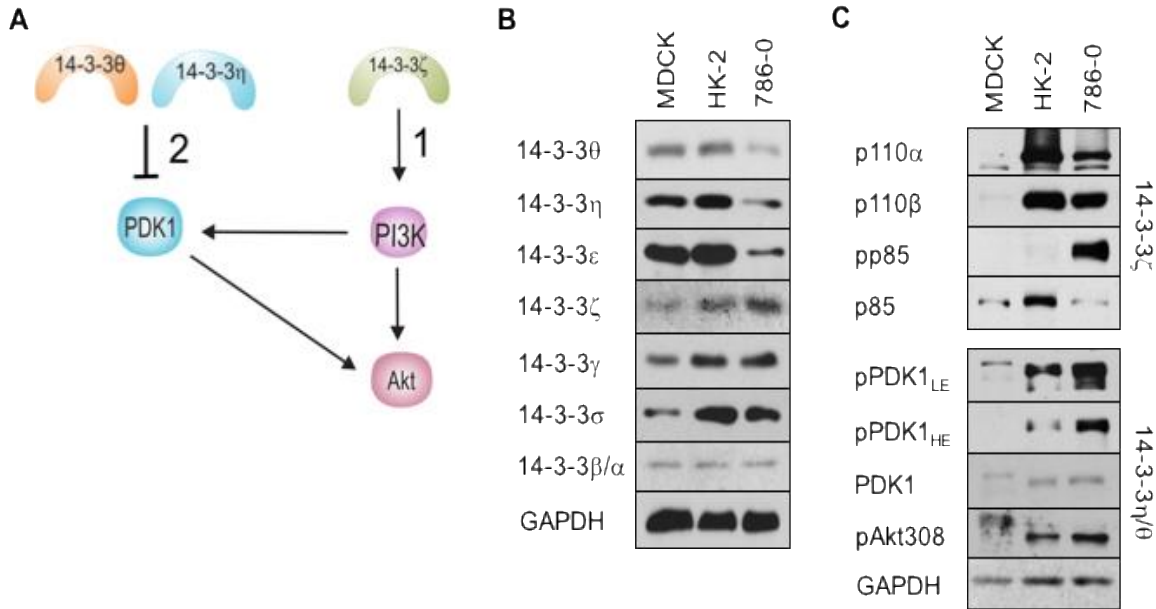


Figura 20. Los niveles de la proteína 14-3-3 ζ y de sus blancos de regulación (pp85, pPDK1 y pAkt308) están incrementados en las células 786-0. (A) Representación esquemática de la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt por las proteínas 14-3-3. (1) 14-3-3 ζ se une a la subunidad p85 de PI3K para reclutar la molécula hacia la membrana celular plasmática y dirige a la activación de la vía de señalización PI3K/Akt; (2) 14-3-3 η y θ se unen a PDK1 y previenen su autofosforilación y activación inhibiendo la completa activación de Akt. (B) 14-3-3 θ , 14-3-3 η , 14-3-3 ϵ , 14-3-3 ζ , 14-3-3 γ , 14-3-3 σ y 14-3-3 β/α fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células MDCK, HK-2 y 786-0. GAPDH fue usado como control. (C) p110 α , p110 β , pp85, p85, pPDK1, PDK1 y pAkt308 fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células MDCK, HK-2 y 786-0. pPDK1_{LE} = Baja Exposición, pPDK1_{HE} = Alta exposición. Las proteínas fueron agrupadas de acuerdo con la isoforma de la proteína 14-3-3 que regula su actividad. GAPDH fue usado como control.

Enseguida investigamos si las proteínas 14-3-3 aumentan la activación de la señalización PI3K/Akt y, por tanto, la generación de la población Active- β -catenin. Para este propósito, las células 786-0 fueron expuestas a BV02, un inhibidor de los sitios de unión para todas las isoformas de las proteínas 14-3-3. El estado de los componentes de la señalización de PI3K/Akt junto con la población ABC y β -catenina total fueron analizados mediante Western-blot. Como se observó en la **figura 21A**, la inhibición de la función de 14-3-3 disminuyó los niveles de proteína de p85, p110 α , pPDK1, ABC y NTSR1. En contraste, la presencia de BV02 incrementó ligeramente los niveles de pp85, pAkt473 y pAkt308. No se detectaron cambios en Akt1, p110 β y 14-3-3 ζ .

Aunado a esto, el tratamiento con BV02 disminuyó la presencia de p110 α , PDK1 y 14-3-3 ζ en la membrana plasmática celular de las células 786-0, pero sin afectar a p85 y a HSP90 que es una proteína no relacionada (**Figura 21B**).

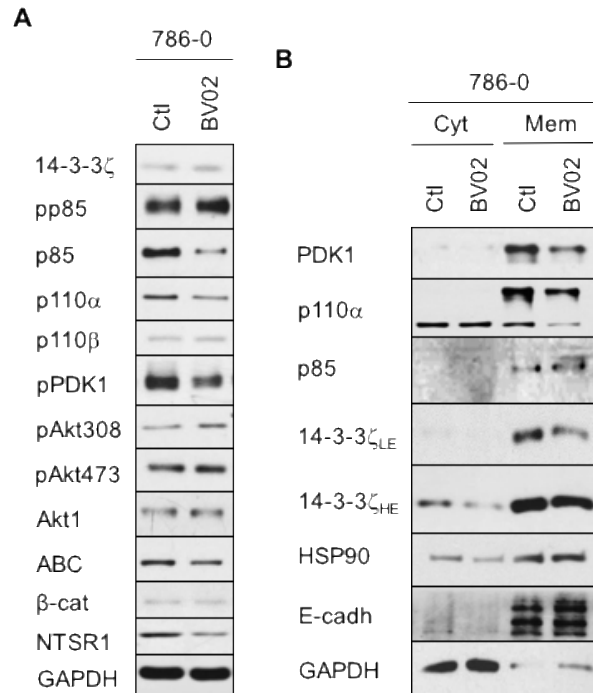


Figura 21. La inhibición de la función de las proteínas 14-3-3 previno la activación Akt en las células 786-0. (A) 14-3-3 ζ , pp85, p85, p110 α , p110 β , pPDK1, pAkt308, pAkt473, Akt1, ABC, β -catenina y NTSR1 fueron analizados mediante western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con el vehículo solo o con BV02 (5 μ M). El tratamiento fue llevado a cabo durante 12 horas antes de la estimulación con suero por 2 horas. GAPDH fue usado como control. (B) Las proteínas 14-3-3 ζ , PDK1, p110 α , p110 β , p85 y HSP90 fueron analizadas por western blotting de las fracciones citoplásmica y membranal de células 786-0 tratadas con vehículo solo o con el inhibidor de todas las proteínas 14-3-3, BV02 (5 μ M). El tratamiento fue llevado a cabo durante 12 horas antes de la estimulación con suero por 2 horas. E-cadherina y GAPDH fueron usados como marcadores citoplásmico y membranal respectivamente.

Para investigar el papel de las proteínas 14-3-3 en la regulación de la señalización PI3K/Akt en las células 786-0, utilizamos un enfoque de “ganancia de función” mediante la sobre-expresión de 14-3-3 ϵ , 14-3-3 θ y 14-3-3 η en las células 786-0. Como se mostró en la **figura 22**, 14-3-3 ϵ aumentó la fosforilación de p85 pero redujo la presencia de las proteínas pAkt473, pAkt308 y ABC. En pPDK1, p110 α o en β -catenina total no se observaron cambios después de la sobre-

expresión de 14-3-3 ϵ . En contraste, la sobreexpresión de 14-3-3 θ incrementó los niveles de pp85 y de pAkt473 mientras que redujo la fosforilación de PDK1. Los cambios inducidos por 14-3-3 θ en los componentes de la vía de señalización Akt no afectaron a ABC, β -catenina total ó a p110 α . Por otra parte, la inhibición de pPDK1 inducida por la sobre-expresión de 14-3-3 η resultó en la reducción de pAkt308 sin afectar a la población ABC, p110 α , pp85, pAkt473 ó a β -catenina total (**Figura 22**).

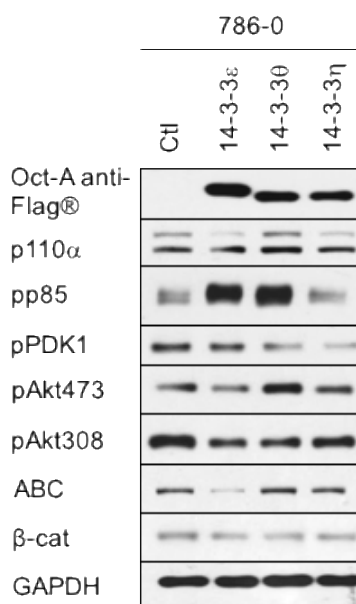


Figura 22. Las proteínas 14-3-3 ϵ η y θ sobre-expresadas en las células 786-0 disminuyeron la activación de Akt. Flag, p110 α , pp85, pPDK1, pAkt473, pAkt308, ABC y β -catenina fueron analizadas por western blotting de lisados celulares de las células 786-0 que expresan transitoriamente 14-3-3 ϵ , 14-3-3 θ ó 14-3-3 η . Las proteínas 14-3-3 están marcadas con FLAG® (DYKDDDDK). Después de la transfección las células fueron mantenidas en medio normal por 12 horas y después se sometieron a estimulación con suero durante 2 horas. GAPDH fue usado como control.

Los cambios en los componentes de la señalización de PI3K/Akt inducidos por BV02 estuvieron acompañados por un enriquecimiento de ABC y de β -catenina total en la membrana plasmática celular y también por la reducción de la conversión de MTT (**Figura 23A, 23B y 23C**), sugiriendo que la inhibición de la función de 14-3-3 en las células 786-0 previno la proliferación celular mediada por β -catenina. Además, el tratamiento con BV02 disminuyó la presencia de 14-3-3 en el citosol (**Figura 23D**).

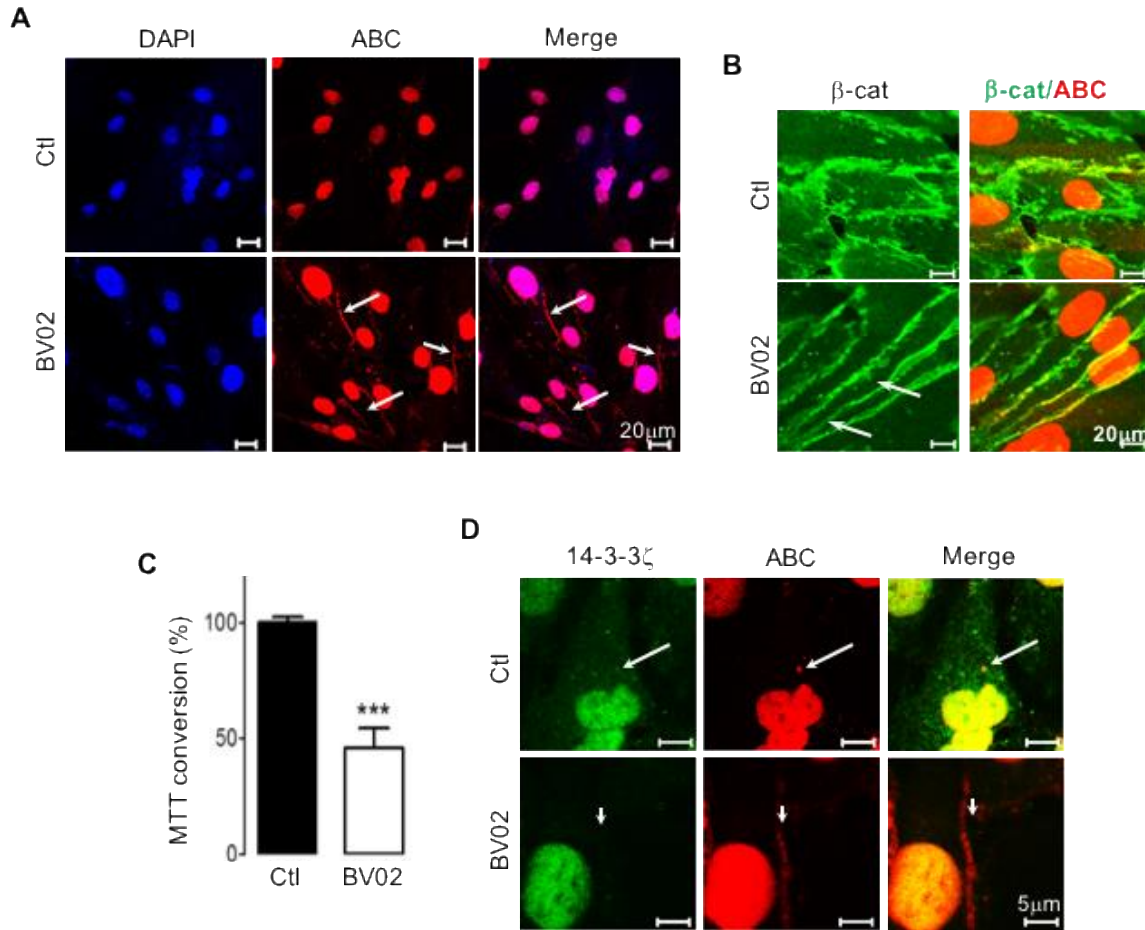


Figura 23. La inhibición de la función de las proteínas 14-3-3 incrementó la presencia de Active-β-catenin (ABC) en la membrana plasmática y redujo la proliferación celular en las células 786-0. (A) La localización de ABC fue analizada por inmunofluorescencia en células 786-0 tratadas con vehículo solo o con el inhibidor de las proteínas 14-3-3 (BV02; 5 μM). El tratamiento fue realizado durante 12 horas antes de la estimulación con suero por 2 horas. Active-β-catenin (ABC) está en rojo y los núcleos en azul. Barra de calibración = 20 μm. (B) β-catenina (verde) y Active-β-catenin (ABC; rojo) fueron analizadas por IF en las células 786-0 tratadas con BV02 (5 μM). Las flechas blancas marcan los bordes celulares. Barra de calibración = 20 μm. (C) La conversión a MTT fue analizada en las células 786-0 tratadas con BV02 (5 μM) durante 12 horas. Las células control fueron tratadas con el vehículo solo. Después de 30 minutos de tratamiento, las células se sometieron a estimulación con suero por 2 horas. *P < 0.05, **P < 0.01 and *** P < 0.001. (D) 14-3-3ζ (verde) y Active-β-catenin (ABC; rojo) fueron analizadas por IF en las células 786-0 tratadas con el inhibidor genérico (inhibe la actividad de todas las isoformas) de las proteínas 14-3-3 (BV02; 5 μM). Las flechas blancas definen la colocalización de ambas moléculas. Las cabezas de flecha marcan la señal de la membrana plasmática celular. Barra de calibración = 5 μm.

7.4 Akt fosforila directamente a β-catenina y a GSK3β.

Akt potencia la señalización de β-catenina mediante la fosforilación e inactivación de GSK3β o mediante la fosforilación directa de β-catenina en el

dominio C-terminal (**Figura 24A** y (**Delcomenne et al., 1998; Fang et al., 2007; He et al., 2007**). Ambos mecanismos incrementan los niveles de β -catenina y es bien conocido que la inhibición de GSK3 β es importante para la generación y localización nuclear de la población *Active- β -catenin* (ABC) (**Figura 26A, 26B y 26C**). Por lo tanto, evaluamos el estado de fosforilación de GSK3 β en el residuo de serina 9 (GSK3 β ser9) y de β -catenina en el residuo de serina 552 (p β -cat552) en los lisados celulares obtenidos de las células MDCK, HK-2 y 786-0. Como se observa en la **figura 24B**, no se detectaron cambios consistentes en la fosforilación de GSK3 β ser9. En contraste, la hiper-activación de Akt resultó en un incremento en los niveles de p β -cat552 en las células 786-0 y MDCK cuando se compararon con HK-2 (**Figura 24B**). De manera interesante, p β -cat552 se encontró más enriquecida en las células MDCK que en las líneas transformadas, posiblemente debido a la presencia de niveles altos de E-cadherina que están presentes en esta línea celular tal y como se sugirió anteriormente (**Figura 12A** y (**Maier et al., 2010**)). Además, dado que β -catenina ser552 se asocia directamente con 14-3-3 ζ y esto afecta su localización intracelular (**Figura 24C, figura 23D** y (**Nava et al., 2014**)), nuestros resultados sugieren fuertemente que el eje PI3K/Akt/ β -catenina/14-3-3 ζ es importante en la generación de la población ABC en las células 786-0. Por tanto, enseguida investigamos la presencia de p β -cat552 y de ABC en las células 786-0 tratadas con los inhibidores de Akt (*Akt inhibitor VIII* y AZD5363). Como se mostró en la **figura 25A**, la inhibición de la función de Akt redujo los niveles de p β -cat552, de la población ABC y de pGSK3 β , sin afectar a β -catenina total ó a GSK3 β . El inhibidor AZD5363 compite por el sitio de unión a ATP de la cinasa Akt. Se ha demostrado que este tipo de inhibidores previenen la actividad cinasa de Akt aunque también promueven la activación de esta mediada por PDK1 y mTORC2 en la membrana plasmática celular, esto a través de un mecanismo intrínseco en el cual solo la unión del inhibidor hacia Akt transloca a esta cinasa a la membrana plasmática para que sea fosforilada en los residuos de activación (Serina 473 y Treonina 308). Como resultado, la cinasa Akt es estabilizada en una forma inactiva hiperfosforilada (**Marques et al., 2015; Okuzumi et al., 2009**). Es por esta razón que observamos aumento de la fosforilación de pAkt473 pero la reducción en la

fosforilación de los blancos río debajo de Akt, demuestra la especificidad y la efectividad del tratamiento (**Figura 25A y figura 25C**). Además, como se esperaba, la sobre-expresión de 14-3-3 ϵ y 14-3-3 η disminuyeron los niveles de p β -cat552, pero no se detectaron cambios de p β -cat552 en las células transfectadas con 14-3-3 θ (**Figura 25B**). Ningún cambio en β -catenina fue observado. Además, como se mostró en la **figura 25C**, niveles bajos de p β -cat552 fueron detectados en las monocapas expuestas a los inhibidores de Akt (AktiVIII y AZD5363) y al inhibidor de PI3K (AZD8186). En contraste, la inhibición de las proteínas 14-3-3 con BV02 no afectó los niveles de p β -cat552, demostrando que la activación de Akt es importante para la generación de p β -cat552 en las células 786-0. No se observaron cambios en β -catenina total con cualquier tratamiento. La presencia o la ausencia de pAkt308 y de pAkt473 demostraron la eficacia y selectividad de nuestros tratamientos.

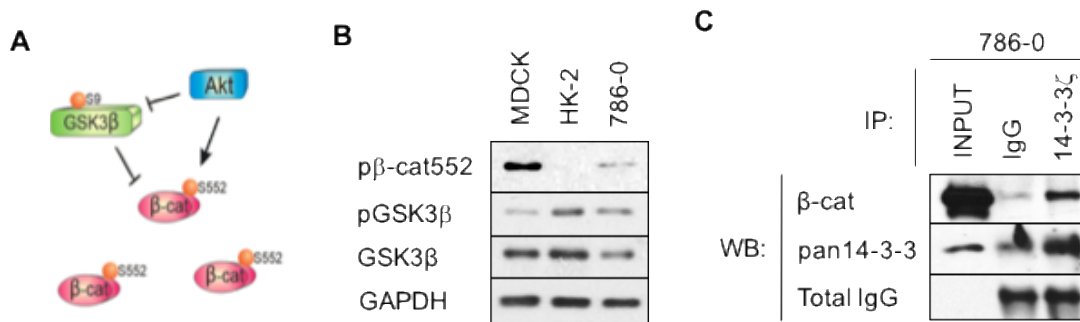


Figura 24. β -catenina es fosforilada por Akt en el residuo de Serina 552 en las células 786-0. (A) Representación esquemática de la regulación de β -catenina por Akt. Akt potencia la actividad co-transcripcional de β -catenina mediante la fosforilación e inactivación de GSK3 β o del dominio C-terminal (Serina 552) de β -catenina. (B) pGSK3 β , GSK3 β y p β -catenina-ser552 fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células MDCK, HK-2 y 786-0. GAPDH fue usado como control. (C) La inmunoprecipitación de 14-3-3 ζ fue realizada de los extractos celulares de las células 786-0 tal como se indica en la sección de Materiales y métodos. Los controles para la inmunoprecipitación especifican dónde se realizó con IgG no-inmune de conejo. La proteína β -catenina y 14-3-3 ζ fueron analizados por western blotting. La cadena pesada fue usada como control de carga.

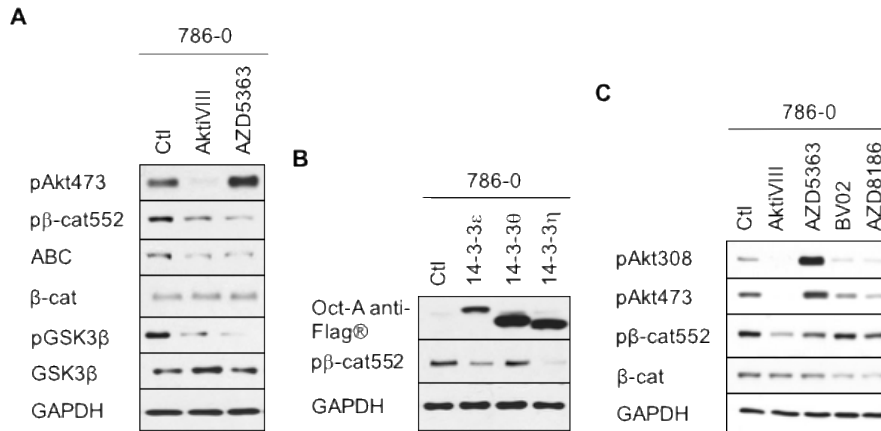


Figura 25. La inhibición de la función de Akt redujo la fosforilación de β-catenina en el residuo de Serina 552. (A) pAkt473, pβ-catenina-552, ABC, β-catenina total, pGSK3β y GSK3β fueron analizados por western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con vehículo solo, Akt inh VIII (2.12 μM) o AZD5363 (3 μM). Los tratamientos fueron realizados durante 12 horas antes de la estimulación con suero por 2 horas. GAPDH fue usado como control. (B) pβ-catenina-552 fue analizada en las células 786-0 que sobre-expresaron transitoriamente a 14-3-3ε, 14-3-3θ o 14-3-3η. Las proteínas 14-3-3 están marcadas con FLAG® (DYKDDDDK). 24 horas después de la transfección las células fueron lisadas. GAPDH fue usado como control. (C) pAkt308, pAkt473, pβ-catenina-552 y β-catenina fueron analizadas mediante western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con vehículo solo, *Akt inh VIII* (2.12 μM) o AZD5363 (3 μM), BV02 (5 μM) o AZD8186 (12 nM). 30 minutos después del tratamiento con los inhibidores, las células fueron sometidas a estimulación con suero por 2 horas.

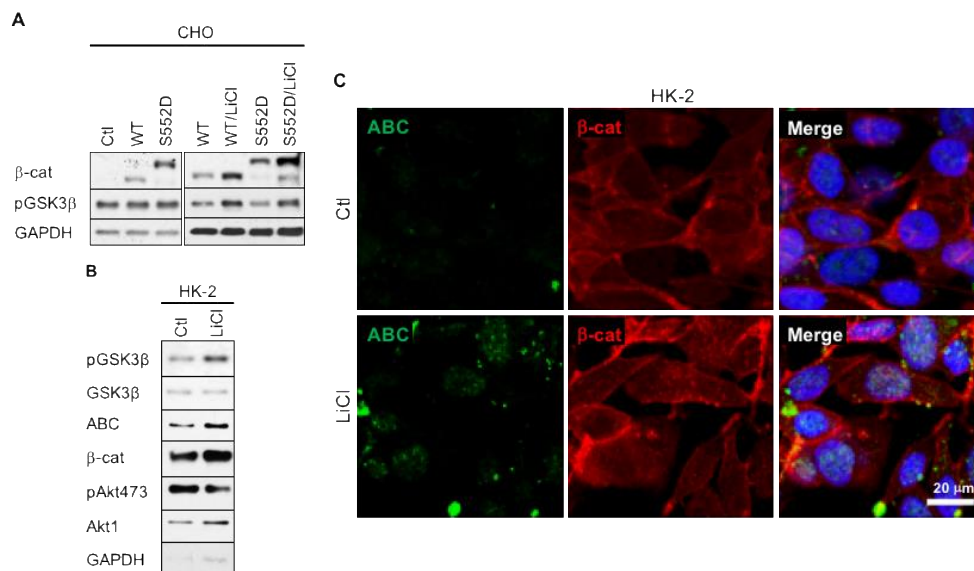


Figura 26. Los niveles de Active-β-catenin (ABC) incrementan en las células HK-2 tratadas con LiCl. (A) β-catenina y pGSK3β fueron analizados por western blotting en lisados celulares de células CHO transitoriamente transfectadas con β-catenina o con β-catenina S552D que fueron tratadas con el acarreador solo ó con LiCl (5 μM). (B) pGSK3β, GSK3β, Active-β-catenin (ABC), β-catenina total, pAkt473 y Akt1 fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células HK-2 tratadas con el acarreador solo ó con LiCl (5 μM). GAPDH fue usado como control de carga. (C) Active-β-catenin (ABC; verde) y β-catenina (rojo) fueron analizadas por IF en las células HK-2 tratadas con LiCl (10 mM). Los núcleos están en azul. Barra de calibración = 5μm.

7.5 La inhibición de la actividad de Akt y de la función de las proteínas 14-3-3 inhibe la proliferación celular en las células 786-0.

Enseguida analizamos el efecto de la inhibición de Akt y de la función de 14-3-3 sobre la proliferación de las células 786-0. Como se muestra en la **figura 27A**, una reducción en el intervalo de conversión de MTT fue detectada en las células 786-0 tratadas con el inhibidor de Akt o con el inhibidor de 14-3-3 (AZD5363, Akt inhibitor VIII ó BV02) y se detectó un efecto sinérgico con los inhibidores de Akt mas el inhibidor de 14-3-3 (AZD5363 mas BV02 y Akt inhibitor VIII mas BV02). Se obtuvieron resultados similares cuando las células 786-0 fueron tratadas con el inhibidor de PI3K AZD8186 y BV02 (**Figura 27B**). El análisis por Western blot mostró una reducción de los niveles de ABC y esta reducción estuvo acompañada con una disminución de la expresión de blancos río abajo de *Active- β -catenin* como son Survinina y Snail (**Figura 28A y 28B**). La inhibición de Akt mas la inhibición de la función de 14-3-3 potenciaron este efecto (**Figura 28A y 28B**). No se detectaron cambios en Akt1 o en β -catenina total en ninguna condición, pero una pequeña reducción de 14-3-3 ζ fue observada en las monocapas expuestas a los inhibidores de Akt mas BV02. Además, no se detectaron cambios en la proliferación celular cuando las células 786-0 fueron expuestas al inhibidor de PKA (H89) demostrando que PKA no juega un papel en la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0 (**Figura 28C**).

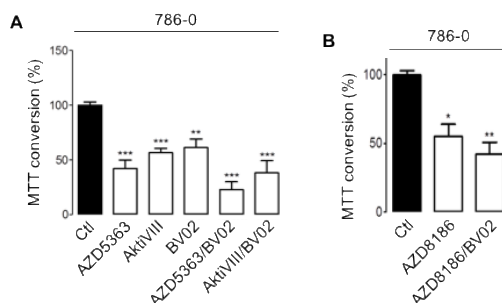


Figura 27. La inhibición de la activación de Akt y de la función de 14-3-3 redujo la proliferación celular de la línea celular 786-0. (A) La conversión a MTT fue analizada en las células 786-0 tratadas con AZD5363 (3 μ M), Akt inh VIII (2.12 μ M), BV02 (5 μ M), AZD5363/BV02 ó Akt inh VIII/BV02 por 12 horas. Las células control fueron tratadas con vehículo solo. 30 minutos después de haber finalizado el tratamiento con los inhibidores, las células fueron sometidas a estimulación con suero durante 2 horas. *P < 0.05, **P < 0.01 y *** P < 0.001. **(B)** La conversión a MTT fue analizada en las células 786-0 expuestas al inhibidor de PI3K (AZD8186; 12 nM) ó AZD8186 más BV02 (5 μ M). *P < 0.05, **P < 0.01.

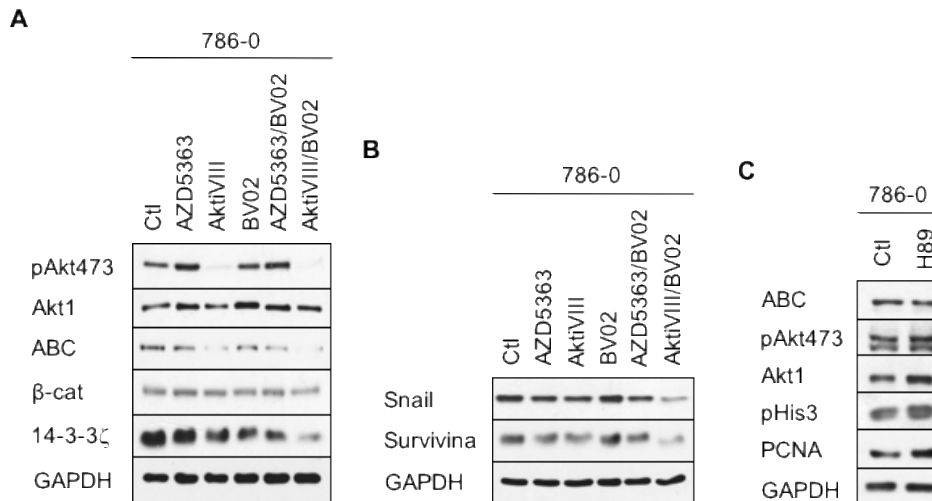


Figura 28. La inhibición de la activación de Akt y de la función de las proteínas 14-3-3 redujo la actividad transcripcional de β-catenina en la línea celular 786-0. (A) ABC, β-catenina total, pAkt473, Akt1 y 14-3-3ζ fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con AZD5363 (3 μM), Akt inh VIII (2.12 μM), BV02 (5 μM), AZD5363/BV02 ó *Akt inh VIII/BV02* durante 12 horas. Las células control fueron tratadas con vehículo solo. Células recién sembradas fueron tratadas con los inhibidores durante 12 horas. GAPDH fue usado como control de carga. (B) Snail y Survivina fueron analizadas mediante western blotting de lisados celulares de las células 786-0 tratadas con AZD5363 (3 μM), AktiVIII (2.12 μM), BV02 (5 μM), AZD5363/BV02 y AktiVIII/BV02 durante 12 horas. Las células control fueron tratadas con vehículo solo. GAPDH fue usado como control de carga. (C) ABC, pAkt473, Akt1, pHist3 y PCNA fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas con el inhibidor H89 (135 nM) durante 12 horas. Las células control fueron tratadas con vehículo solo. GAPDH fue usado como control de carga.

Finalmente, investigamos si pVHL afecta el eje PI3K/Akt/β-catenina mediante la alteración de la expresión de las proteínas 14-3-3 en las células 786-0. Como se observó en la **figura 29A**, la sobre-expresión de pVHL reduce los niveles de ABC y los niveles de β-catenina ser552 junto con claras reducciones en los niveles de pAkt473. Estos cambios estuvieron acompañados por incrementos en 14-3-3η, 14-3-3ε y una pequeña pero constante reducción de 14-3-3ζ. Datos no publicados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que la expresión de 14-3-3ζ es controlada por β-catenina. Por consiguiente, especulamos que pVHL pudiera estar disminuyendo los niveles de 14-3-3ζ en las células 786-0 mediante β-catenina, por esta razón los niveles de proteína de 14-3-3ζ fueron analizados en las células 786-0 tratadas con el inhibidor XAV939 por 24 horas. Como se mostró en la **figura 29B** una reducción clara de β-catenina y de 14-3-3ζ fueron detectados en las células

tratadas con el inhibidor de β -catenina y esta disminución estuvo acompañada de la reducción de pAkt473 y de pAkt308. No se detectaron cambios en Akt1.

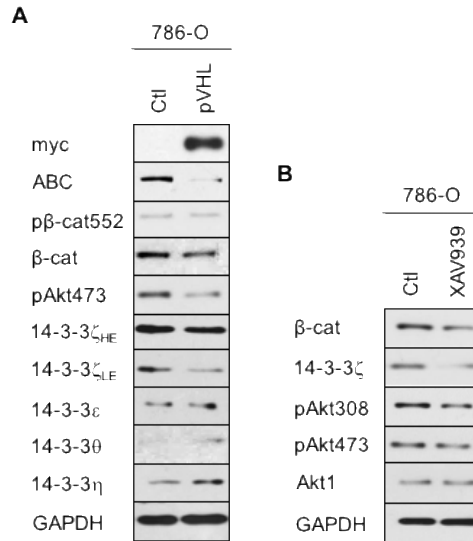


Figura 29. La expresión exógena de la proteína VHL redujo la expresión de la proteína 14-3-3 ζ y esto previno la señalización del eje PI3K/Akt/ β -catenina en las células 786-0. (A) myc, ABC, p β -cat552, β -catenina, pAkt473, Akt1, 14-3-3 ζ , 14-3-3 ϵ , 14-3-3 θ y 14-3-3 η fueron analizados por western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 transfectadas transitoriamente con el vector VHL-myc o con vector vacío. GAPDH fue usado como control. **(B)** β -catenina, 14-3-3 ζ , pAkt308, pAkt473 y Akt1 fueron analizadas por western blotting de los lisados celulares de las células 786-0 tratadas durante 24 horas con DMSO ó con XAV939 (15 nM). GAPDH fue usado como control.

8. DISCUSIÓN.

En este trabajo reportamos que Akt y las proteínas 14-3-3 son esenciales en la regulación de la proliferación celular mediada por β -catenina en las células 786-0 de ccRCC. Además nuestros resultados destacan la existencia de una relación directa entre la pVHL y la señalización de la vía PI3K/Akt/ β -catenina. Por lo tanto, nuestros hallazgos descubren un nuevo papel para la pVHL como regulador maestro que controla la proliferación y supervivencia celular en las células 786-0 a través de la activación de la señalización de PI3K/Akt mediante las proteínas 14-3-3 (**Figura 23**).

La pVHL es una parte esencial del sistema de proteólisis de ubiquitina y regula la estabilidad y el recambio de distintas proteínas (**Gossage et al., 2015**). La pérdida de pVHL ha sido reportada en ~80% de los casos de cáncer de riñón (ccRCC) y la ausencia de ésta ha sido ligada al incremento de la transactivación de β -catenina debido a que existe un decremento en la degradación proteosomal de β -catenina. Sin embargo, un mecanismo de retroalimentación cruzada más complejo entre pVHL y la señalización de β -catenina ha sido previsto (**Behrens, 2008; Gossage et al., 2015**). Los resultados presentados en este trabajo apoyan fuertemente esta hipótesis y sugieren que la señalización de Akt juega un papel importante en este proceso. De hecho, los resultados mostrados aquí sugieren que la hiperactivación de Akt mediada por las proteínas 14-3-3 es responsable de tales cambios. Observamos que en las células 786-0 los inhibidores de PDK1 (14-3-3 η y 14-3-3 θ) se reducen, mientras que el activador de PI3K (14-3-3 ζ) está incrementado (**Figura 20B**) como se ha reportado previamente (**Gomez-Suarez et al., 2016; Neal et al., 2012; Sato et al., 2002**). Nuestros resultados muestran que estas variaciones de los niveles de proteínas 14-3-3 contribuyen directamente a la completa activación de Akt y consecuentemente a la formación de Active- β -catenin. La inhibición farmacológica de la función de 14-3-3 previno la activación de Akt y redujo los niveles de ABC y también promovió la acumulación de ABC en la membrana celular plasmática. De manera interesante, también observamos que pVHL controla la

actividad co-transcripcional de β -catenina mediante la regulación de los niveles de 14-3-3 ζ ; un mecanismo que pudiera estar relacionado a la función de ésta como parte de la maquinaria del sistema de proteólisis por ubiquitina. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser investigada más adelante.

Nuestros resultados confirman que p110 α , un componente crucial de la señalización de PI3K que ha sido asociado con el crecimiento celular, es dirigida hacia la membrana plasmática por 14-3-3 ζ como previamente se reportó (**Foukas et al., 2006; Neal et al., 2012**). Sin embargo, también demostramos que el incremento de los niveles de proteína de 14-3-3 ϵ , una isoforma que forma preferencialmente heterodímeros con otras isoformas de las proteínas 14-3-3 inhibe la activación de PI3K/Akt. Por lo tanto, especulamos que los homodímeros de 14-3-3 ζ son responsables de la activación de PI3K/Akt, y los heterodímeros de 14-3-3 ζ /14-3-3 ϵ (**Sluchanko and Gusev, 2012**) pudieran prevenir la activación de PI3K. Esta hipótesis concuerda con hallazgos previos que demuestran que la interrupción de interacciones homotípicas de 14-3-3 ζ durante la inflamación interrumpe directamente la señalización de PI3K/Akt (**Gomez-Suarez et al., 2016**). Sin embargo, el papel de las proteínas 14-3-3 en la regulación de la señalización de PI3K/Akt es fuertemente influenciada por la presencia simultánea de varias isoformas y que es plausible que una amplia variedad de homo y heterodímeros formados por las proteínas 14-3-3 puedan influenciar la señalización PI3K/Akt. Tal teoría es apoyada por los resultados observados en este trabajo y demuestra que las proteínas 14-3-3 son una parte esencial de la maquinaria que interviene en la activación de la vía PI3K/Akt/ β -catenina.

La formación de Active- β -catenin río abajo de Akt ha sido ligada principalmente a la inactivación de GSK3 β y del así llamado “complejo de destrucción” (**MacDonald et al., 2009**). Aunque, en las células 786-0 pensamos que esta molécula no está jugando un papel importante en este proceso. De hecho, nuestros resultados sugieren que la formación de ABC en esas células recae en la fosforilación de β -

catenina en el residuo de serina 552 por Akt. Experimentos donde se usa una fosfomimética y una fosfomutante de β -catenina demostraron que la fosforilación de β -catenina en serina 552 pudiera ser importante para la formación de ABC y para la actividad co-transcripcional de β -catenina. Por ello asumimos que la fosforilación de β -catenina por Akt incrementa la asociación de β -catenina con 14-3-3 ζ y que esta interacción previene la fosforilación de β -catenina en su dominio N-terminal. La inhibición de la función de 14-3-3 ζ o de la activación de Akt por lo tanto redujo los niveles de proteína de p β -cat552 y de ABC, un resultado que apoya nuestra teoría.

En este trabajo demostramos que la inhibición de Akt o de la función de 14-3-3 redujo la actividad co-transcripcional de β -catenina y disminuyó la proliferación celular mediada por β -catenina. Por tanto, proponemos que un tratamiento dual dirigido a la activación de Akt y a la función de 14-3-3 pudiera inhibir efectivamente el crecimiento de una variedad de líneas celulares de cáncer renal y de otras células de cáncer con β -catenina hiperactivada debido a la pérdida de pVHL. Para los experimentos de inhibición de la proliferación celular, utilizamos concentraciones previamente reportadas con las que se ha demostrado que las células continúan viables.

Se ha demostrado que el incremento de HIF2 α como consecuencia de condiciones de hipoxia, resulta en el aumento de la proliferación celular mediante la expresión de genes que expresan diversos factores de crecimiento que participan en mecanismos tales como angiogénesis, lo que provee de oxígeno y nutrientes a la célula, así como el incremento de la síntesis de proteínas. Interesantemente (**Hsieh et al., 2017**), en las células epiteliales MDCK y HK-2 sometidas a condiciones de hipoxia observamos disminución en los niveles de pHist3 pero no observamos cambios en el eje PI3K/Akt/ β -catenina (**Figura 15**). Además, nuestros resultados demostraron que en las células 786-0 la proliferación celular mediada por β -catenina depende de 14-3-3 ζ y de Akt.

La fosforilación de catenina por PKA (Proteína Kinasa dependiente de AMPc) en el residuo de Serina675 resulta en la estabilización de β -catenina debido a que inhibe su ubiquitinación y degradación proteosomal, consecuentemente, incrementa la asociación de β -catenina con TCF y la expresión de genes implicados en proliferación celular (**Hino et al., 2005**). Sin embargo, en las células 786-0 la inhibición de PKA mediante el uso del inhibidor H-89 no disminuyó los niveles de ABC, pHist3 y PCNA (**Figura 28C**). Esto sugiere que PKA no está participando en la formación de ABC o en la proliferación celular mediada por β -catenina, nuestros resultados concuerdan con hallazgos previos que demuestran que la formación de ABC es consecuencia de la activación de Akt (**Fang et al., 2007; Nava et al., 2014**).

Las proteínas 14-3-3 tienen una vida media relativamente corta por lo que el aumento de aproximadamente el doble en los niveles de 14-3-3 ζ en las células 786-0 con respecto a las células HK-2 y MDCK refleja la expresión constitutiva de esta isoforma debido a la estabilización de β -catenina como resultado de la carencia pVHL (**Figura 20B**). Consecuentemente, el aumento de 14-3-3 ζ incrementa la señalización del eje PI3K/Akt/ β -catenina y por ende de los genes blanco de β -catenina como son CD1 y C-Myc que participan en proliferación celular, Snail el cual es un represor de la expresión de E-cadherina, NTSR1 y 14-3-3 ζ . Esto genera un circuito de activación constitutiva de PI3K/Akt/ β -catenina mediado por 14-3-3 ζ (**Figura 30**).

Finalmente, la sobre-expresión del NTSR1 dirige a la hiperactivación de PKC lo que desencadena la activación de diferentes vías de señalización que contribuyen a la malignidad del cáncer y a la sobre-expresión de NTS, resultando en un mecanismo de auto-activación constitutiva (**Wu et al., 2012**). Por lo tanto, la ausencia de pVHL también resulta en la sobre-expresión del NTSR1 a través de la hiperactivación de PI3K/Akt/ β -catenina mediada por el incremento de 14-3-3 ζ . Aunque, es necesario analizar la activación del receptor y la expresión de NTS en las células 786-0.

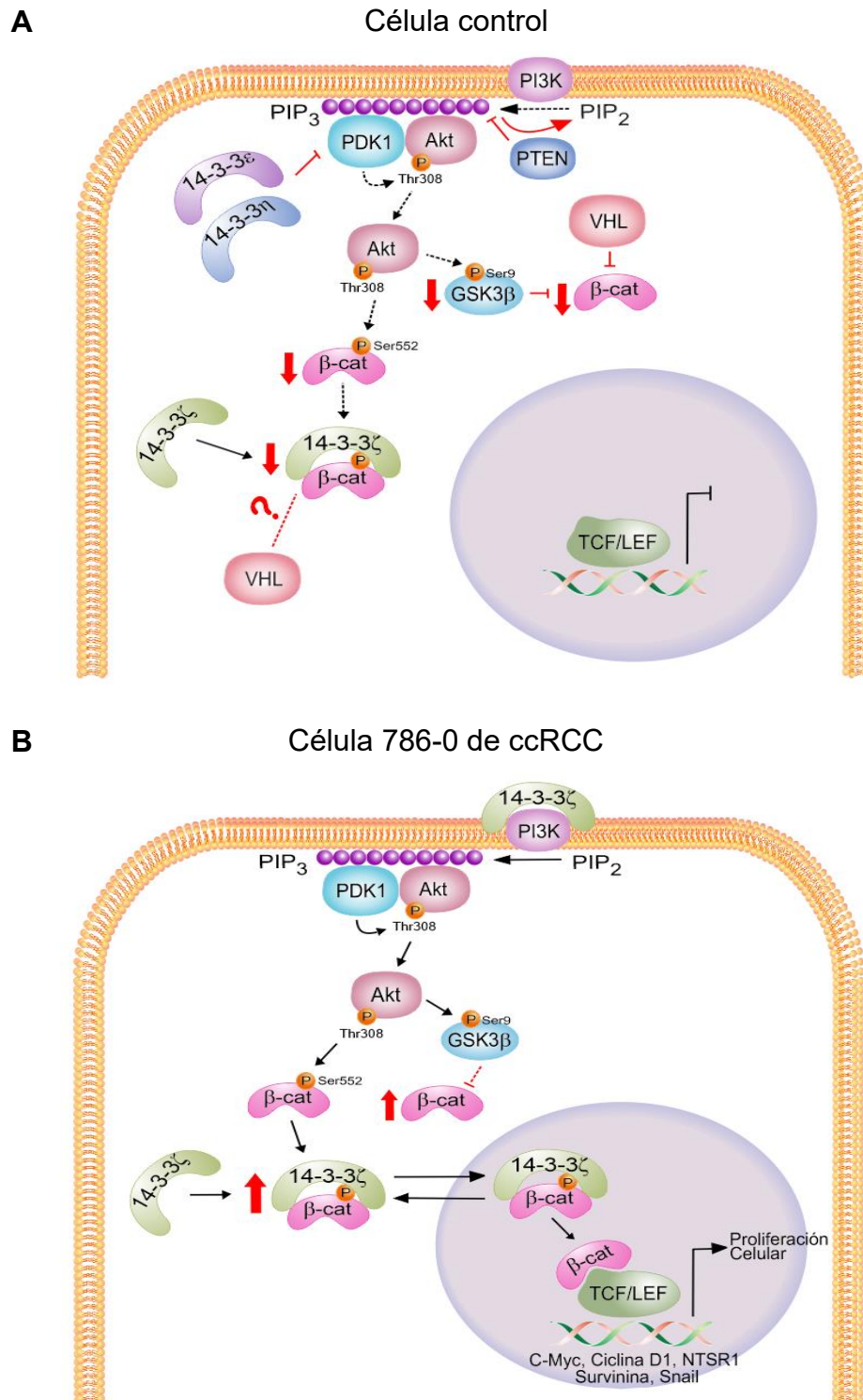


Figura 30. Representación esquemática de la regulación de la señalización de PI3K/Akt/ β -catenina en las células 786-0 de cáncer renal. (A) célula control y (B) células 786-0. En las células 786-0, 14-3-3 ζ incrementa la actividad co-transcripcional de Akt/ β -catenina, por medio de la inducción de la hiper-activación de la vía PI3K/Akt, lo que resulta en el aumentando de la fosforilación de β -catenina en el dominio C-terminal.

9. CONCLUSIONES.

- ❖ La β -catenina nuclear media la proliferación celular en las células 786-0.
- ❖ Akt regula los niveles de proteína de β -catenina en las células 786-0 mediante la fosforilación directa del residuo serina 552 localizado en el dominio C-terminal de la molécula.
- ❖ La señalización de Akt en las células 786-0 está regulada positivamente por la proteína 14-3-3 ζ .
- ❖ La inhibición de la actividad de Akt y de la función de 14-3-3 reduce la proliferación celular en las células 786-0.

10. PERSPECTIVAS.

- ❖ Demostrar que 14-3-3 ζ regula positivamente la formación de p β -catenina552 en las células HK-2, mediante la transfección del plásmido de 14-3-3 ζ .
- ❖ Demostrar que el silenciamiento de la expresión de pVHL en las células HK-2 ocasiona el incremento de la señalización PI3K/Akt/ β -catenina debido al consecuente aumento de la expresión de 14-3-3 ζ .
- ❖ Demostrar el efecto de la expresión exógena de 14-3-3 ζ sobre la formación de tumor a través del implante de células 786-0, transfectadas con 14-3-3 ζ , en la capa subcutánea de ratones atímicos.

11. REFERENCIAS.

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. The EMBO journal* 16, 3797-3804.

Aitken, A. (2006). *14-3-3 proteins: a historic overview. Seminars in cancer biology* 16, 162-172.

Angst, B. D., Marcozzi, C., and Magee, A. I. (2001). *The cadherin superfamily. Journal of cell science* 114, 625-626.

Behrens, J. (2008). *One hit, two outcomes for VHL-mediated tumorigenesis. Nature cell biology* 10, 1127-1128.

Bejsovec, A. (2005). *Wnt pathway activation: new relations and locations. Cell* 120, 11-14.

Boivin, F. J., Sarin, S., Evans, J. C., and Bridgewater, D. (2015). *The Good and Bad of beta-Catenin in Kidney Development and Renal Dysplasia. Frontiers in cell and developmental biology* 3, 81.

Bossard, C., Souaze, F., Jarry, A., Bezieau, S., Mosnier, J. F., Forgez, P., and Laboisie, C. L. (2007). *Over-expression of neurotensin high-affinity receptor 1 (NTS1) in relation with its ligand neurotensin (NT) and nuclear beta-catenin in inflammatory bowel disease-related oncogenesis. Peptides* 28, 2030-2035.

Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999). *beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. The American journal of pathology* 155, 1033-1038.

Cadigan, K. M., and Liu, Y. I. (2006). *Wnt signaling: complexity at the surface. Journal of cell science* 119, 395-402.

Carraway, R. E., and Plona, A. M. (2006). *Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. Peptides* 27, 2445-2460.

Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry* 275, 25733-25741.

Chaudhri, M., Scarabel, M., and Aitken, A. (2003). Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 300, 679-685.

Chitalia, V. C., Foy, R. L., Bachschmid, M. M., Zeng, L., Panchenko, M. V., Zhou, M. I., Bharti, A., Seldin, D. C., Lecker, S. H., Dominguez, I., and Cohen, H. T. (2008). Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nature cell biology* 10, 1208-1216.

Chow, W. H., Dong, L. M., and Devesa, S. S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nature reviews Urology* 7, 245-257.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11211-11216.

Dougherty, M. K., and Morrison, D. K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of cell science* 117, 1875-1884.

Dupouy, S., Mourra, N., Doan, V. K., Gompel, A., Alifano, M., and Forgez, P. (2011). The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 93, 1369-1378.

Ehlers, R. A., Zhang, Y., Hellmich, M. R., and Evers, B. M. (2000). Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochemical and biophysical research communications* 269, 704-708.

Evers, B. M. (2002). *Endocrine gene neurotensin: molecular mechanisms and a model of intestinal differentiation. World journal of surgery* 26, 799-805.

Evers, B. M. (2006). *Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. Peptides* 27, 2424-2433.

Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). *Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. The Journal of biological chemistry* 282, 11221-11229.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., GLOBOCAN 2012 v1.0 (2012). *Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. IARK.*

Ferraro, L., Tomasini, M. C., Fernandez, M., Bebe, B. W., O'Connor, W. T., Fuxe, K., Glennon, J. C., Tanganelli, S., and Antonelli, T. (2001). *Nigral neurotensin receptor regulation of nigral glutamate and nigroventral thalamic GABA transmission: a dual-probe microdialysis study in intact conscious rat brain. Neuroscience* 102, 113-120.

Foukas, L. C., Claret, M., Pearce, W., Okkenhaug, K., Meek, S., Peskett, E., Sancho, S., Smith, A. J., Withers, D. J., and Vanhaesebroeck, B. (2006). *Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. Nature* 441, 366-370.

Frew, I. J., and Krek, W. (2008). *pVHL: a multipurpose adaptor protein. Science signaling* 1, pe30.

Gaush, C. R., Hard, W. L., and Smith, T. F. (1966). *Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 122, 931-935.

Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M., and et al. (1994). *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. Nature genetics* 7, 85-90.

Gomez-Suarez, M., Gutierrez-Martinez, I. Z., Hernandez-Trejo, J. A., Hernandez-Ruiz, M., Suarez-Perez, D., Candelario, A., Kamekura, R., Medina-Contreras, O., Schnoor, M., Ortiz-Navarrete, V., et al. (2016). 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells. *Cell death and differentiation* 23, 1060-1072.

Gossage, L., Eisen, T., and Maher, E. R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature reviews Cancer* 15, 55-64.

Gottardi, C. J., and Gumbiner, B. M. (2004). Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *The Journal of cell biology* 167, 339-349.

Gottardi, C. J., Wong, E., and Gumbiner, B. M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *The Journal of cell biology* 153, 1049-1060.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

He, X. C., Yin, T., Grindley, J. C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W. A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K. S., Hembree, M., Johnson, T., et al. (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature genetics* 39, 189-198.

Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M., and et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9700-9704.

Hernandez-Trejo, J. A., Suarez-Perez, D., Gutierrez-Martinez, I. Z., Fernandez-Vargas, O. E., Serrano, C., Candelario-Martinez, A. A., Meraz-Rios, M. A., Citalan-Madrid, A. F., Hernandez-Ruiz, M., Reyes-Maldonado, E., et al. (2016). The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase

chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium. *The Biochemical journal* 473, 3805-3818.

Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I., and Kikuchi, A. (2005). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Molecular and cellular biology* 25, 9063-9072.

Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D. Y., Larkin, J., and Ficarra, V. (2017). Renal cell carcinoma. *Nature reviews Disease primers* 3, 17009.

Huang, S. M., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., et al. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620.

Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W. G., Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature medicine* 1, 822-826.

Iliopoulos, O., Levy, A. P., Jiang, C., Kaelin, W. G., Jr., and Goldberg, M. A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10595-10599.

Jenkinson, S. E., Chung, G. W., van Loon, E., Bakar, N. S., Dalzell, A. M., and Brown, C. D. (2012). The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 464, 601-611.

Jolas, T., and Aghajanian, G. K. (1996). Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *The European journal of neuroscience* 8, 153-161.

Kim, P. J., Plescia, J., Clevers, H., Fearon, E. R., and Altieri, D. C. (2003). Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 362, 205-209.

Linehan, W. M., Pinto, P. A., Srinivasan, R., Merino, M., Choyke, P., Choyke, L., Coleman, J., Toro, J., Glenn, G., Vocke, C., et al. (2007). Identification of the genes for kidney cancer: opportunity for disease-specific targeted therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 671s-679s.

MacDonald, B. T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17, 9-26.

Maehama, T., and Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273, 13375-13378.

Maher, M. T., Mo, R., Flozak, A. S., Peled, O. N., and Gottardi, C. J. (2010). Beta-catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from beta-catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS one* 5, e10184.

Marques, R. B., Aghai, A., de Ridder, C. M. A., Stuurman, D., Hoeben, S., Boer, A., Ellston, R. P., Barry, S. T., Davies, B. R., Trapman, J., and van Weerden, W. M. (2015). High Efficacy of Combination Therapy Using PI3K/AKT Inhibitors with Androgen Deprivation in Prostate Cancer Preclinical Models. *European urology* 67, 1177-1185.

Moore, B. W., and Perez, V. J. (1967). *Specific Acid Proteins in the Nervous System* Prentice-Hall, 343-359.

Nava, P., Castañeda, A., and Gómez-Suárez, M. (2017). 14-3-3 proteins regulate cellular processes involved in bowel inflammation and cancer malignancy. *Mens Bioquim* 41, 65-75.

Nava, P., Kamekura, R., Quiros, M., Medina-Contreras, O., Hamilton, R. W., Kolegraff, K. N., Koch, S., Candelario, A., Romo-Parra, H., Laur, O., et al. (2014). IFN γ -induced suppression of beta-catenin signaling: evidence for roles of Akt and 14.3.3zeta. *Molecular biology of the cell* 25, 2894-2904.

Nava, P., Lopez, S., Arias, C. F., Islas, S., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). *The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. Journal of cell science* 117, 5509-5519.

Neal, C. L., Xu, J., Li, P., Mori, S., Yang, J., Neal, N. N., Zhou, X., Wyszomierski, S. L., and Yu, D. (2012). *Overexpression of 14-3-3zeta in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. Oncogene* 31, 897-906.

Obsil, T., and Obsilova, V. (2011). *Structural basis of 14-3-3 protein functions. Seminars in cell & developmental biology* 22, 663-672.

Okuzumi, T., Fiedler, D., Zhang, C., Gray, D. C., Aizenstein, B., Hoffman, R., and Shokat, K. M. (2009). *Inhibitor hijacking of Akt activation. Nature chemical biology* 5, 484-493.

Peruzzi, B., Athauda, G., and Bottaro, D. P. (2006). *The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14531-14536.

Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M., and Michiels, C. (2002). *CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. Annals of the New York Academy of Sciences* 973, 443-447.

Reubi, J. C., Waser, B., Friess, H., Buchler, M., and Laissue, J. (1998). *Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. Gut* 42, 546-550.

RHNM (2003). *Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas México.*

Rini, B. I., Campbell, S. C., and Escudier, B. (2009). *Renal cell carcinoma. Lancet* 373, 1119-1132.

Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., and Torok-Storb, B. (1994). *HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. Kidney international* 45, 48-57.

Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2002). Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. *The Journal of biological chemistry* 277, 39360-39367.

Sluchanko, N. N., and Gusev, N. B. (2012). Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers? *FEBS letters* 586, 4249-4256.

Song, M. S., Salmena, L., and Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 283-296.

Souaze, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A., and Forgez, P. (2006). Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer research* 66, 6243-6249.

Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *The EMBO journal* 19, 4298-4309.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

Thakur, R., and Mishra, D. P. (2013). Pharmacological modulation of beta-catenin and its applications in cancer therapy. *Journal of cellular and molecular medicine* 17, 449-456.

Thoenes, W., Storkel, S., and Rumpelt, H. J. (1986). Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). *The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. Pathology, research and practice* 181, 125-143.

Thor, K., and Rosell, S. (1986). Neurotensin increases colonic motility. *Gastroenterology* 90, 27-31.

Tian, Q., Feetham, M. C., Tao, W. A., He, X. C., Li, L., Aebersold, R., and Hood, L. (2004). Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15370-15375.

Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal* 31, 2714-2736.

Wu, Z., Martinez-Fong, D., Tredaniel, J., and Forgez, P. (2012). Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Frontiers in endocrinology* 3, 184.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.

Zhang, X., Gaspard, J. P., and Chung, D. C. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research* 61, 6050-6054.