



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia**

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE CASEÍNA QUINASA 2 EN
LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE SALL2 EN LA
LÍNEA CELULAR SW480 DE CÁNCER COLORRECTAL**

PAULINA ANDREA SEPÚLVEDA VILLARROEL

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesora guía y patrocinante: Dra. Roxana Jacqueline Pincheira Barrera
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Mayo, 2021
Concepción-Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesora tutora

Dra. Roxana Pincheira Barrera.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

Comisión Evaluadora:



Dr. Jorge Toledo Alonso.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

Dr. Iván Gonzalez Chavarria.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Factores de transcripción SALL/ <i>Spalt-like</i>	10
1.2. SALL2.....	12
1.3. Roles funcionales de SALL2.....	13
1.4. Blancos transcripcionales y roles de SALL2 a nivel celular.....	13
1.5. SALL2 en cáncer.....	16
1.6. SALL2 y cáncer colorrectal.....	18
1.7. Mecanismos de regulación de SALL2.....	20
1.8. Caseína quinasa II (CK2).....	24
2. HIPÓTESIS.....	29
3. OBJETIVO GENERAL.....	30
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. Cultivo celular.....	32
5.2 Preparación de lisados celulares.....	33
5.3. Cuantificación de proteínas.....	33
5.4. Inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i>	34
5.5. Análisis de expresión de proteínas a partir de <i>western blot</i>	35
5.6. Ensayo de exclusión de azul de tripán.....	35
5.7. Ensayo de Cristal Violeta.....	36
5.8. Ensayo XTT.....	37
5.9. Microscopía y análisis.....	37

6. RESULTADOS.....	38
6.1. Objetivo específico 1. Determinar el efecto de la inhibición de caseína quinasa II con CX-4945 en la expresión de SALL2 en la línea celular SW480.....	38
6.1.1. Efecto de la inhibición de CK2 en la restitución de SALL2 en línea celular CCR.....	39
6.1.2. Restitución de los niveles de SALL2 en el tiempo.....	40
6.2. Objetivo específico 2. Evaluar la viabilidad celular luego del restablecimiento de los niveles de SALL2 con CX-4945 en línea celular SW480 con SALL2-WT y SALL2KO.....	43
6.2.1. Ensayos de viabilidad celular.....	44
6.3. Objetivo Específico 3. Determinar si el restablecimiento de SALL2 es requerido para la respuesta de muerte inducida por CX-4945 en modelo SW480 con y sin SALL2.....	50
7. DISCUSIÓN.....	53
8. CONCLUSIÓN.....	60
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Expresión de SALL2 disminuida en cáncer de colon..... 20

Figura 2. La inhibición de la actividad de CK2 aumenta los niveles de SALL2 en línea celular HEK293..... 23

Figura 3. Esquema general de acción de SALL2.....27



RESUMEN

SALL2 es un factor de transcripción que tiene como blancos transcripcionales genes asociados con la inducción de apoptosis y la detención del ciclo celular. Las funciones descritas a la fecha lo asocian con un rol supresor tumoral y consecuente con este rol, su expresión se encuentra disminuida en varios tipos de cáncer humano. Análisis de bases de datos en cáncer indican que su expresión se encuentra significativamente disminuida en cáncer colorrectal (CCR) respecto al tejido normal, sin embargo, el/los mecanismo(s) asociado(s) a la disminución de expresión de SALL2 en CCR es a la fecha desconocido. Recientemente el laboratorio de la Dra. Pincheira identificó un nuevo mecanismo de regulación de SALL2, el cual es mediado por caseína quinasa 2 (CK2), una quinasa que se encuentra hiperactivada en cáncer. La fosforilación de SALL2 por CK2 conduce a su degradación proteosomal en células HEK293, por lo que se sugiere como un mecanismo adicional de pérdida de función de SALL2 en cáncer. Considerando que la expresión y actividad de CK2 está aumentada en CCR, se evaluó la posible pérdida de SALL2 en CCR mediada por CK2, estableciendo como hipótesis que la inhibición de CK2 restituye los niveles de SALL2 en células de CCR, favoreciendo su rol como supresor tumoral. Se confirmó mediante *western blot* que en células SW480 la inhibición de CK2 por CX-4945 es capaz de estabilizar los niveles de SALL2, sin embargo, al evaluar viabilidad celular, no se observaron diferencias significativas atribuidas al

restablecimiento de SALL2. De manera interesante se observó que SALL2 podría estar involucrada en un mecanismo de muerte celular-dependiente de CX-4945 descrito recientemente como methuosis.



ABSTRACT

SALL2 is a transcription factor whose transcriptional targets are genes associated with apoptosis and cell cycle arrest. The functions described to date associate it with a tumor suppressor role and consequently, its expression is decreased in various types of human cancer. Cancer database analysis indicates that SALL2 expression is significantly decreased in colorectal cancer (CRC) compared to normal tissue, however, the mechanisms associated with decreased expression of SALL2 in CRC are to date unknown. Recently the laboratory of Dr. Pincheira identified a new regulatory mechanism of SALL2, which is mediated by casein kinase 2 (CK2), a kinase that is hyperactivated in cancer. The phosphorylation of SALL2 by CK2 leads to its proteasomal degradation in HEK293 cells, therefore it is suggested as an additional mechanism for the loss of SALL2 function in certain cancer. Considering that CK2 expression and activity are increased in CRC, we evaluated the CK2 dependent loss of SALL2 expression in CRC cells and hypothesize that CK2 inhibition restores SALL2 levels in CRC cells, favoring the SALL2 tumor suppressor role. Western blot analysis of SW480 CRC cells treated with specific CX-4945 inhibitor indicates that CK2 inhibition restores SALL2 levels. No significant differences in cell viability were observed between SALL2 wild type and SALL2 knockout SW480 cells treated with CX-4945. Interestingly, our data suggest that SALL2 is involved in the CX-4945-dependent cell death mechanism recently described as methuosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Factores de transcripción SALL/*Spalt-like*

El factor de transcripción SALL2 pertenece a la familia de proteínas *spalt-like* (SALL), las cuales se han visto involucradas en etapas tempranas del desarrollo embrionario, y en la diferenciación celular, principalmente a nivel neuronal (De Celis & Barrio, 2009; Kühnlein et al., 1994).

Esta familia de proteínas es altamente conservada, encontrándose presente en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (Basson & Horvitz, 1996), peces (*Medaka sal*) (Köster, Stick, Loosli, & Wittbrodt, 1997), bilaterales (Lorente-Sorolla, Truchado-Garcia, Perry, Henry, & Grande, 2018), xenopus (*Xsal-1*) (Holleman, T., Schuh, R., Pieler, T., and Stick, 1996), ratón (*Msal*) (Ott, Kaestner, Monaghan, & Schütz, 1996) y humanos (*SALL1*, *SALL2*, *SALL3*, *SALL4*). En general se expresan tanto en etapas de desarrollo embrionario temprano como en ciertos tejidos adultos (De Celis & Barrio, 2009; Kühnlein et al., 1994), y cumplen roles esenciales durante el proceso de embriogénesis temprana y tardía.

En vertebrados se han identificado cuatro genes, los cuales codifican a los factores de transcripción SALL1 a SALL4, que se caracterizan por presentar en su estructura varios dominios de dedos de zinc del tipo C2H2 distribuidos

uniformemente a lo largo de su secuencia. Se caracterizan además por poseer dominios ricos en alanina y glutamina, comúnmente encontrados en factores de transcripción. Entre estos miembros de la familia, SALL2 es el que presenta menor homología estructural, específicamente hacia la región C-terminal de la proteína (D Li, Dower, Ma, Tian, & Benjamin, 2001; Y. Ma et al., 2001).

En humanos, mutaciones de genes *SALL* se han asociado con el desarrollo de algunas enfermedades y trastornos congénitos, lo que destaca su importancia funcional durante el desarrollo embrionario. También han sido relacionados con el desarrollo de cáncer, de los cuales el miembro más estudiado es SALL4. Estudios indican que SALL4 favorece el proceso cancerígeno y se correlaciona con un mal pronóstico de la enfermedad (Cheng et al., 2015; Dirican & Akkiprik, 2016; Nicolè et al., 2017; Oikawa et al., 2013; Zhang, Yuan, Zhu, Qian, & Xu, 2015). Otros miembros de la familia SALL han sido menos estudiados y por el contrario, se les han atribuido funciones como supresor tumoral, específicamente es el caso de SALL1 en cáncer de mama (C. Ma et al., 2018; Wolf et al., 2014) y glioma (Chi, Zhang, Jia, Cong, & Hu, 2019) y de SALL3 en cáncer cervical (Wei et al., 2015).

SALL2 por su lado, se ha encontrado significativamente desregulado en varios tipos de cáncer, donde por un lado sus niveles se ven aumentados en sarcoma sinovial (Nielsen et al., 2003), cáncer testicular (Alagaratnam et al., 2011), glioblastoma (Suvà et al., 2014) y disminuidos respecto a sus tejidos normales en

cáncer de ovario (Chang K. Sung et al., 2013), de esófago (Luo et al., 2017), renal (Chatterjee et al., 2013), colorrectal, carcinoma escamoso oral (Imai et al., 2019), entre otros. Pese a esto, estudios funcionales de SALL2 en cáncer y en contexto normal le atribuyen funciones asociadas mayoritariamente a un rol supresor tumoral (Hermosilla et al., 2017).

1.2. SALL2

El gen *SALL2* posee dos exones 5' alternativos, correspondientes al exón 1 (E1) y al exón 1A (E1A) (Kohlhase, Altmann, Archangelo, Dixkens, & Engel, 2000), para los cuales, a la fecha se han identificado un promotor proximal (P1), río arriba de E1 y un promotor distal (P2), corriente arriba de E1A, responsables de controlar su uso alternativo (Y. Ma et al., 2001). A estos dos exones les sigue un exón 2 común que codifica para todos los dedos de Zinc presentes en la proteína (Kohlhase et al., 1996). Por lo tanto, mediante uso selectivo de promotores se obtienen dos ARNm distintos (Y. Ma et al., 2001), dando origen a dos isoformas; SALL2E1 y SALL2E1A de 1007 y 1005 aminoácidos, respectivamente. Estas isoformas son casi idénticas, difieren solo en 25 aminoácidos en el extremo N-terminal (Y. Ma et al., 2001). SALL2E1 pero no SALL2E1A, contiene un motivo conservado de 12 aminoácidos, importante para su actividad represora de la transcripción. Por otra parte, SALL2E1 se expresa de manera tejido-específica e

incluye a tejidos como pulmón, timo y testículos mientras que SALL2 se expresa de manera ubicua (Y. Ma et al., 2001).

1.3. Roles funcionales de SALL2

A nivel embrionario, estudios han asociado a *Sall2* con neurogénesis y diferenciación neuronal. La delección de *Sall2* en modelos murinos se relaciona con un cierre anormal del tubo neural y de la fisura óptica lo que sugiere un rol en neurogénesis y en el desarrollo del ojo (Böhm *et al.*, 2008, Kelberman *et al.*, 2014). Consecuente con esto último, la pérdida de función de *Sall2* tanto en ratones como en humanos, ha sido implicada en un síndrome congénito que afecta el desarrollo de los ojos conocido como Coloboma ocular, el que conduce a ceguera (Kelberman *et al.*, 2014). Además, mutaciones deletéreas de *Sall2* también se han asociado con malformaciones renales, como es el caso del síndrome de Alport (Chatterjee *et al.*, 2013). En contexto neuronal, SALL2 es capaz de unirse al receptor de neurotrofina p75NTR y frente a la activación con NGF participaría en la diferenciación neuronal (Böhm *et al.*, 2008; Pincheira, Baerwald, Dunbar, & Donner, 2009).

1.4. Blancos transcripcionales y roles de SALL2 a nivel celular.

Estudios en fibroblastos humanos indican que la expresión de SALL2 está asociada a la inducción de quiescencia celular. Sus niveles aumentan

rápidamente bajo condiciones de estrés nutricional causado por privación de suero y el silenciamiento de SALL2 en estas condiciones previene el arresto del ciclo celular en fase G1, demostrando así, que su expresión es necesaria para que fibroblastos salgan del ciclo celular y entren a un estado de quiescencia celular (Liu, Adler, Segal, & Chang, 2007). Otros estudios, en células de epitelio ovárico normal confirmaron que frente a condiciones de privación de suero la expresión de SALL2 aumenta, e indican que, al restablecer el suero en el medio de cultivo, la expresión de SALL2 disminuye por un mecanismo dependiente de la degradación proteosomal. Se identificó que la ligasa CUL4/DDB1 E3 contiene RBBP7 como receptor de SALL2 y de esta manera media su degradación, a medida que las células pasan de un estado inactivo de quiescencia a un estado de crecimiento activo (Chang K. Sung, Dahl, Yim, Rodig, & Benjamin, 2011). Además de su rol en quiescencia, SALL2 se ha asociado a la regulación negativa de la progresión del ciclo celular en etapa G1-S mediante la represión transcripcional de las ciclinas D1 (*CCND1*) y E1 (*CCNE1*), responsables de la transición de la fase G1-S (E. Hermosilla et al., 2018).

En condiciones de estrés genotóxico, inducido por drogas quimioterapéuticas, SALL2 muestra una regulación dinámica, en la que a tiempos tempranos de exposición a la droga los niveles de expresión de SALL2 disminuyen por un mecanismo transcripcional dependiente de p53. Sin embargo, a tiempos largos de exposición sus niveles de expresión se restituyen y aumentan de manera independiente a p53 (Escobar et al., 2015; Farkas et al., 2013). La inducción de

SALL2 frente a estrés genotóxico se asocia con la apoptosis celular, mediada en parte por la regulación positiva de los genes pro-apoptóticos Bax y Noxa (Escobar et al., 2015).

Otros estudios han demostrado que la expresión ectópica de SALL2 en células de cáncer de ovario, en las cuales no se expresa la proteína, genera una inhibición de la síntesis de ADN, inhibe formación de colonias en agar blando, y reduce significativamente la tasa de crecimiento tumoral, siendo suficiente para inhibir el crecimiento de un xeroinjerto tumoral *in vivo* e inducir apoptosis (Dawei Li, Tian, Ma, & Benjamin, 2004). Específicamente, SALL2 aumenta la expresión de p21, un regulador negativo de la proliferación que inhibe la formación del complejo ciclina-Cdk, y coincidente con otros estudios, aumenta la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX (Escobar et al., 2015; Gu et al., 2011; Dawei Li et al., 2004). En el mismo contexto celular, se ha demostrado que SALL2 reprime transcripcionalmente a la proteína oncogénica c-MYC (Chang Kyoo Sung et al., 2012; Wu et al., 2015) y regula positivamente la expresión del inhibidor del ciclo celular p16 (Wu et al., 2015). Por el contrario, el silenciamiento de SALL2 en la línea celular de cáncer de ovario A-2780 que expresa la proteína, promovió el crecimiento tumoral celular, así como un aumento en la migración e invasión de estas células (Miao, Zhang, Cao, Wang, & Zhang, 2017).

En resumen, los blancos de SALL2 identificados a la fecha y datos de múltiples estudios sugieren un rol como inductor de la apoptosis celular, así como también regulador negativo de la progresión del ciclo celular, propiedades que frecuentemente se encuentran desreguladas en células cancerígenas. Esto ha generado un foco de interés en SALL2, al cual por las funciones que regula, se le asocia un importante rol supresor tumoral (E. Hermosilla et al., 2018; Chang K. Sung & Yim, 2017). Consecuente con este rol supresor tumoral, los niveles de SALL2 se ven disminuidos en varios tipos de cáncer.

1.5. SALL2 en cáncer

La función de SALL2 en cáncer ha sido principalmente investigada en cáncer de ovario donde estudios han demostrado que SALL2 se encuentra disminuido en parte por mecanismos epigenéticos. Se ha reportado pérdida de heterocigocidad en la región donde se ubica el gen *sall2* (14q11.1-13) en cáncer ovárico, lo que también apoya su rol de supresor tumoral en este tipo de cáncer (Bandera et al., 1997). Relacionado a estudios descritos en cáncer ovárico, los niveles de SALL2 también se han reportado disminuidos en cáncer de mama (Ye et al., 2019), carcinoma esofágico (Luo et al., 2017), y en líneas celulares de carcinoma de células escamosas (Imai et al., 2019), donde también se han demostrado propiedades supresoras tumorales de SALL2.

En carcinoma esofágico se comprobó que un fenotipo radiorresistente de este tipo de células estaría asociado a un silenciamiento epigenético por hipermetilación del promotor de SALL2, lo que llevaría a una disminución en sus niveles de RNAm y su restitución es suficiente para mejorar la respuesta al tratamiento con radiación ionizante, cisplatino y generar un aumento en la tasa apoptótica de líneas celulares de carcinoma esofágico (Luo et al., 2017). En cáncer de cabeza y cuello, la metilación del promotor de SALL2 se asoció también con su inhibición transcripcional y pacientes con una menor supervivencia libre de enfermedad (Disease-free survival, DFS) (Imai et al., 2019).

En conjunto, diferentes estudios han demostrado un rol supresor tumoral para SALL2 en cáncer, en los cuales su expresión se encuentra disminuida. Contradictorio a este rol predominante, hay otros tipos de cáncer donde su perfil de expresión se encuentra elevado y en los cuales se sugiere un rol oncogénico. Estos incluyen sarcoma sinovial (Nielsen et al., 2003), tumor de Wilms (C. M. Li et al., 2002), cáncer oral (Estilo et al., 2009), glioblastoma (Suvà et al., 2014) y cáncer testicular (Alagaratnam et al., 2011), donde se destaca como posible marcador tumoral. Sin embargo, estos son solo estudios de correlación donde se indica que la presencia de SALL2 podría ser desfavorable y hasta el momento solo en glioblastoma se ha comprobado que SALL2 cumple un rol oncogénico al formar parte de un grupo de proteínas necesarias para mantener un estado celular indiferenciado y, por lo tanto, favorecer un fenotipo agresivo de la enfermedad en este contexto específico (Suvà et al., 2014). Estos estudios

generan la **necesidad de profundizar respecto al rol que tendría SALL2 en cáncer.**

Al evaluar la expresión de SALL2 desde tejidos normales y cancerosos, estudios indican que SALL2 E1A es la isoforma predominantemente desregulada en cáncer (Y. Ma et al., 2001). Con la excepción de glioblastoma, cáncer testicular y adrenal donde SALL2E1A está aumentado respecto al tejido normal, análisis bioinformáticos desarrollados por el laboratorio, indican que la expresión de SALL2E1A se encuentra significativamente disminuida en 14 tipos diferentes de cáncer. Respecto a la disminución de sus niveles, **la mayor significancia en cambios de expresión de SALL2E1A fue en cáncer colorrectal** (p-value 1.72e-90) (Farkas et al., 2021) **y a la fecha, la regulación de SALL2 y su función en contexto de cáncer colorrectal es desconocida.**

1.6. SALL2 y cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal representa la tercera causa de muerte por tumores malignos a nivel mundial y en Chile es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia. Una de las mayores problemáticas es el diagnóstico tardío de la enfermedad o la falla en las terapias propuestas y en estos últimos años, de acuerdo con el Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) 2014, del Ministerio de Salud de Chile, se ha observado un aumento en la incidencia y tasa de

mortalidad por este tipo de cáncer debido al incremento de la expectativa de vida y al cambio en la dieta de la población chilena (Zarate et al., 2013). Se ha relacionado además, un alto componente hereditario con el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Taylor, Burt, Williams, Haug, & Cannon-Albright, 2011). Considerando la alta incidencia y mortalidad del CCR, **un desafío importante a abordar en esta patología es el estudio de la función de genes específicos que se encuentran desregulados en CCR, como es el caso de SALL2.**

Estudios previos del laboratorio indican que SALL2, en contexto normal, actúa como supresor tumoral al regular negativamente la proliferación y promover la apoptosis frente a estrés genotóxico. Además de los datos bioinformáticos mencionados arriba que indican que SALL2 E1A se encuentra significativamente disminuida en cáncer colorrectal (p-value 1.72e-90)(Farkas et al., 2021), análisis de la base de datos online *Gene Expression Omnibus* (GEO), confirman que la expresión de mRNA de SALL2 está significativamente disminuida en tejido tumoral microdisectado respecto al tejido de colon normal. Sumado a estos análisis, estudios preliminares del laboratorio demuestran una disminución en la expresión de SALL2 en las distintas líneas celulares de cáncer de colon a nivel de proteína (Figura 1). A la fecha, **se desconocen los mecanismos asociados a la pérdida o disminución de la expresión de SALL2 en CCR.**

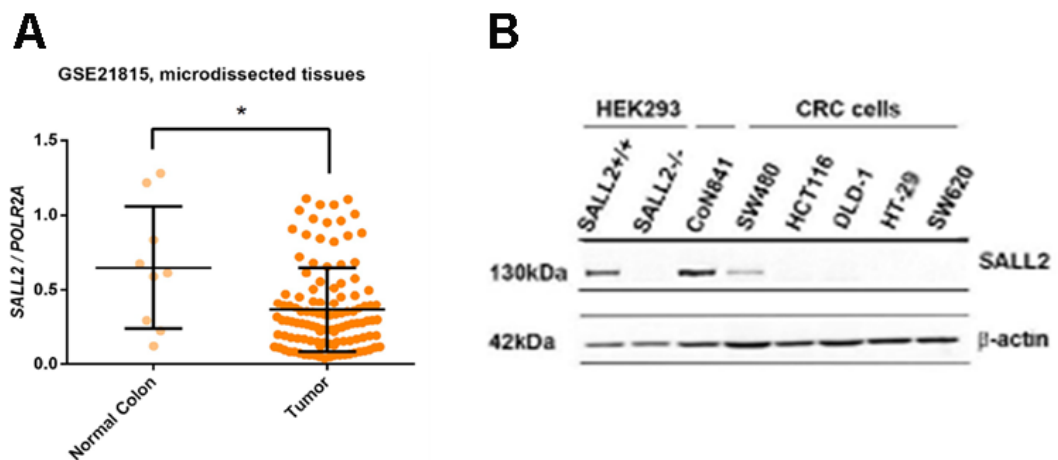


Figura 1. Expresión de SALL2 disminuida en cáncer de colon. (A) Estudio del perfil de expresión génica de SALL2 GSE21815 en 132 tejidos de cáncer colorrectal humano microdisectados comparados con epitelios de colon normal. (B) Análisis de los niveles de SALL2 mediante *western blot* en distintas líneas celulares de CCR. Las líneas celulares HEK293 y CoN841 fueron utilizados como control positivo y HEK293 con SALL2 nulo como control negativo.

1.7. Mecanismos de regulación de SALL2

Aún existe escasa información relacionada a la regulación de SALL2 en cáncer, donde sus niveles se encuentran desregulados. Los mecanismos identificados a la fecha incluyen mecanismos transcripcionales mediados por factores de transcripción específicos, mecanismos epigenéticos que conllevan a su silenciamiento y mecanismos posttransduccionales asociados a su degradación proteica.

Entre los factores de transcripción específicos se ha identificado que la sobreexpresión del factor de transcripción WT1(*Wilms Tumor-1*) suprime la actividad del promotor de ambas isoformas de SALL2(C. M. Li et al., 2002; Y. Ma

et al., 2001). El factor de transcripción AP4 (*Activating Enhancer-Binding Protein 4*) aumenta la actividad del promotor P2, que da lugar a la isoforma E1A de SALL2 (Chang K. Sung et al., 2011). También se han identificado a los factores p53 y Sp1 como reguladores transcripcionales directos, los que a través de su unión al promotor P2 de SALL2, regulan negativa y positivamente la expresión de la isoforma E1A, respectivamente (Escobar et al., 2015; Farkas et al., 2013).

A nivel epigenético, la disminución de la expresión de SALL2 en líneas celulares de carcinoma ovárico (OVCA) se ha asociado al silenciamiento del promotor P2 de SALL2. Una comparación de las secuencias de promotores P1 y P2 reveló la presencia de una isla CpG en P2, indicando que la pérdida de expresión de SALL2 se debe en parte al silenciamiento por metilación de ADN. Esta modificación fue confirmada en líneas celulares derivadas de OVCA y en tumores primarios, lo que respalda el papel de SALL2 como supresor de cáncer de ovario (Chang K. Sung et al., 2013).

Estudios más recientes demuestran que en células de cáncer de mama resistentes a Tamoxifeno, los niveles de SALL2 también disminuyen a través de un mecanismo epigenético y el restablecimiento de los niveles de SALL2 en cáncer de mama resistente a tamoxifeno, mejora la respuesta a esta terapia, aumentando su sensibilidad y la sobrevida de pacientes ER+. En este estudio, se demuestra que SALL2 se une directamente a los promotores de PTEN y el receptor de estrógeno

α (ER α) regulando positivamente su transcripción. La inducción de PTEN por SALL2 conlleva a la disminución de los niveles de fosforilación de Akt y, por lo tanto, de la activación de esta vía (Ye et al., 2019). La pérdida de SALL2 en cáncer de mama promueve la activación de la vía Akt/mTOR y contribuye con la resistencia a este tratamiento. (Ye et al., 2019).

Recientemente el laboratorio de la Dra. Pincheira identificó un nuevo mecanismo de regulación de SALL2, el cual es mediado por Caseína Quinasa II (CK2) y podría estar involucrado en la modulación de los niveles de SALL2 en algunos tipos de cáncer (Hermosilla V. Manuscrito en preparación). Mediante análisis bioinformáticos se determinó que SALL2 posee sitios putativos de fosforilación por CK2, los cuales se localizan en una secuencia de degradación PEST, secuencia rica en residuos de prolina, ácido glutámico, serina, y treonina que actúa como señal de degradación proteolítica (Rogers, Wells, & Rechsteiner, 1986). Mediante ensayos de inmunoprecipitación y *GST Pull-down* se comprobó en células HEK-293 la interacción directa entre estas dos proteínas y la fosforilación *in vitro* de SALL2 mediada por CK2. Esto llevó a identificar a SALL2 como sustrato directo de CK2, cuya fosforilación gatilla la siguiente ubiquitinación y degradación proteosomal de SALL2 regulando así negativamente sus niveles (Hermosilla, 2017). Se demostró además que en presencia de una dominante negativa de CK2, así como también luego de inhibir farmacológicamente la actividad de CK2, se produce un restablecimiento de los niveles de SALL2 (Figura

2), identificando así un nuevo mecanismo de regulación post-transcripcional de SALL2 en estas células (Hermosilla, 2017).

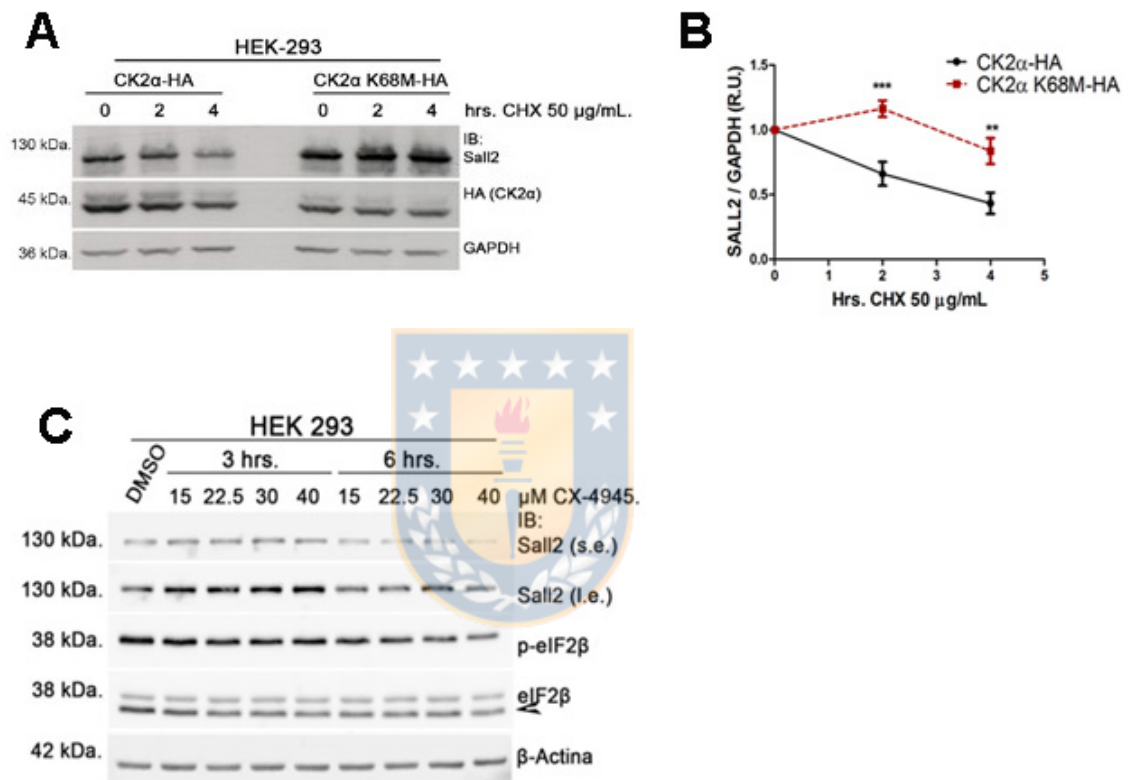


Figura 2. La inhibición de la actividad de CK2 aumenta los niveles de SALL2 en línea celular HEK293. (A) Ensayo de estabilidad en presencia de CK2 en fusión a epítoto HA (CK2α-HA) y una dominante negativa de CK2 (CK2α K68M-HA) tratadas con 50 µg/mL de cicloheximida (CHX) durante el tiempo indicado. Se analizaron los niveles de SALL2 mediante *western blot* (B) Cuantificación de los niveles de SALL2 con respecto a GAPDH. R.U.: unidades relativas. (C) Se trataron células HEK 293 con el inhibidor de CK2 (CX-4945) a distintas concentraciones durante 3 y 6 horas. Se evaluaron los niveles de SALL2 y del marcador de actividad de CK2 eIF2β. s.e.: exposición corta (*short exposure*); l.e.: exposición prolongada (*long exposure*). Fuente: Tesis de Doctorado Viviana Hermosilla.

1.8. Caseína Quinasa II (CK2)

CK2 es una serina treonina quinasa constitutivamente activa, que se expresa de manera ubicua y ha sido involucrada en el crecimiento, proliferación celular y apoptosis (Lebrin, Chambaz, & Bianchini, 2001), lo que hace que regule procesos celulares esenciales, muchos de los cuales se encuentran desregulados en células cancerosas. Se le han descrito como blanco un gran número de sustratos, muchos de los cuales están implicados en proliferación, supervivencia y crecimiento celular (Trembley, Wang, Unger, Slaton, & Ahmed, 2009), lo que lo convierte en un gran área de interés en cáncer. Se conoce además que CK2 está involucrada en la fosforilación y posterior degradación de algunos supresores tumorales como PTEN (Torres & Pulido, 2001) y PML (Scaglioni et al., 2006).

CK2 ha sido ampliamente estudiada y relacionada al proceso cancerígeno, donde su expresión y actividad se encuentran aumentadas. Se ha demostrado que CK2 favorece la propagación de células cancerígenas por las propiedades pro-supervivencia y antiapoptóticas que regula promoviendo un microambiente tumoral óptimo. **En el caso de cáncer colorrectal, esta quinasa se encuentra hiperactivada y se ha correlacionado con un mal pronóstico de esta enfermedad.** CK2 regula la proliferación, crecimiento y senescencia de líneas celulares de CCR, y altos niveles de CK2 se correlacionan positivamente con la migración y capacidad invasiva de líneas celulares de CCR (Zou et al., 2011).

Recientemente se encontró que la fosforilación mediada por CK2, estabiliza la actividad de la enzima convertidora de endotelina 1c, lo cual aumenta la capacidad invasora y migratoria de un linaje de células de CCR, ubicando a CK2 como posible blanco terapéutico en CCR (Niechi et al., 2015).

La expresión de CK2 es mucho más alta en el CCR que en adenoma colorrectal, lo que sugiere que CK2 puede estar involucrada en la progresión de adenoma a carcinoma colorrectal (Zou et al., 2011). Además, estudios preclínicos muestran que un aumento en los niveles de CK2 nuclear se correlacionan con un mal pronóstico en pacientes con CCR (Lin et al., 2011; Nuñez de Villavicencio-Díaz, Rabalski, & Litchfield, 2017).

Por las funciones arriba descritas, y además considerando que se encuentra sobreexpresada en cáncer, CK2 ha sido uno de los principales blancos para el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Sus propiedades biológicas, así como la idoneidad del pequeño sitio de unión a ATP de CK2, han llevado al diseño de inhibidores altamente selectivos. En los últimos 20 años, se han diseñado varios inhibidores para CK2, sin embargo, solo *Silmitasertib*, cuyo nombre en código es CX-4945 (Cylene Pharmaceuticals, San Diego, USA) (Pierre et al., 2011) ha entrado en ensayos clínicos de Fase II como posible fármaco contra el cáncer. CX-4945 ha probado ser un potente inhibidor ATP competitivo y ha mostrado ser altamente selectivo para CK2 respecto a otras quinasas (Siddiqui-Jain et al., 2010).

La FDA otorgó en 2017 la designación de medicamento huérfano a CX-4945 para el tratamiento de colangiocarcinoma, donde ha demostrado características favorables de seguridad, farmacocinética y farmacodinámica en el tratamiento avanzado de este tipo de cáncer, para el cual existen terapias eficaces limitadas (“CX-4945 Granted Orphan Drug Designation,” 2017) y en estudios clínicos en adultos, *Silmitasertib* está en desarrollo como agente terapéutico para tumores sólidos avanzados y malignidades hematológicas (Marschke et al., 2011).

Considerando que:



- 1.- El laboratorio identificó recientemente un mecanismo de regulación negativa de SALL2 mediado por CK2.
- 2.- La inhibición específica de CK2 restituye los niveles de SALL2 en células HEK-293, lo que podría explicar la disminución de sus niveles en algunos tipos de cáncer donde esta quinasa se encuentra hiperactivada.
- 3.- La actividad quinasa de CK2 se encuentra hiperactivada en CCR, donde se destaca como un marcador de mal pronóstico de la enfermedad.
4. - SALL2 se encuentra disminuida en CCR y no existe información respecto a los mecanismos que llevan a la disminución de sus niveles en CCR.
- 5.- Se ha demostrado que SALL2 es requerida para promover una respuesta apoptótica frente al tratamiento con quimioterapéuticos.

Nos preguntamos si la inhibición farmacológica de CK2 podría anular la degradación aberrante de la proteína SALL2 y potenciar sus propiedades supresoras tumorales en un contexto cancerígeno (Figura 3).

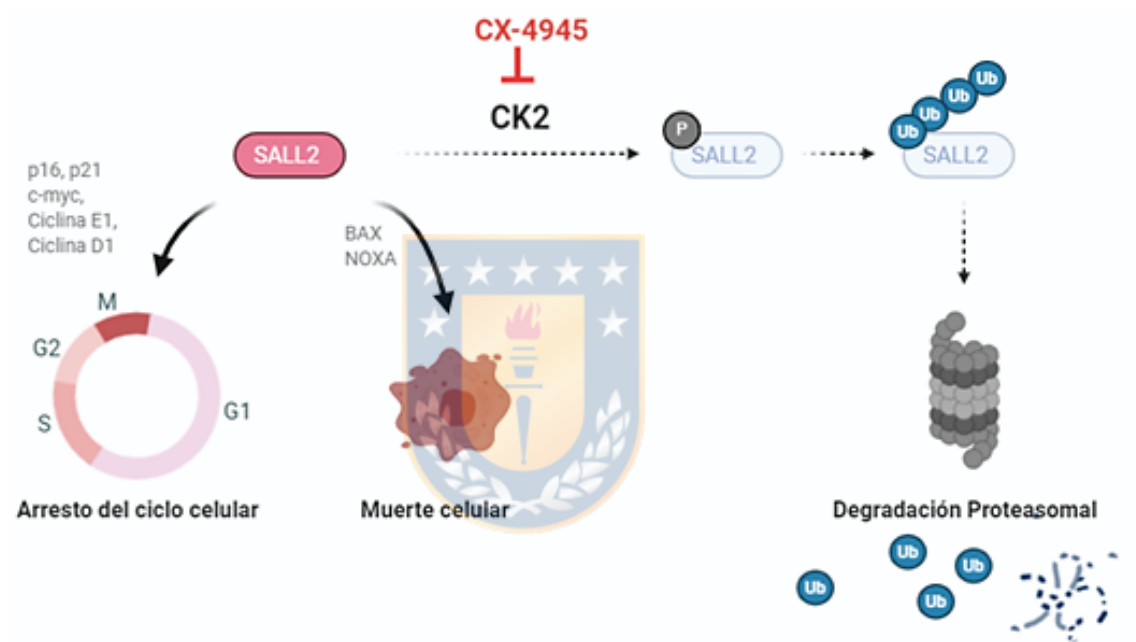


Figura 3. Esquema general de acción de SALL2. La inhibición de CK2 con CX-4945 previene la degradación proteosómica de SALL2, aumentando sus niveles y favoreciendo funciones supresoras tumorales descritas para SALL2.

En esta tesis, fue de particular interés evaluar si el mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por CK2 es responsable de la disminución de SALL2 en líneas de CCR. Se evaluó si el uso del inhibidor Silmitasertib, CX-4945, es capaz de restituir los niveles de SALL2 en la línea de CCR SW480, y si el restablecimiento de SALL2 activa su rol como supresor tumoral, específicamente si genera un

aumento en la muerte celular, y disminuye la viabilidad, frente al tratamiento con este inhibidor de CK2.



2. HIPÓTESIS

La inhibición farmacológica de CK2 con CX-4945 lleva a una restitución de la expresión y funciones de SALL2 en CCR, aumentando la muerte celular y disminuyendo viabilidad en la línea celular de cáncer colorrectal SW480.



3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la disminución de SALL2 en línea celular de CCR SW480 es en parte regulada por CK2, y la significancia funcional de la restitución de SALL2 vía CX-4945.



4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la inhibición de CK2 con CX-4945 en el restablecimiento de la expresión de SALL2 en la línea de cáncer colorrectal SW480.
2. Evaluar la viabilidad celular luego del restablecimiento de los niveles de SALL2 con CX-4945 en línea celular SW480 silvestre (SALL2 *Wild Type*) y SW480 nula (SALL2 *Knock Out*).
3. Determinar si el restablecimiento de SALL2 es requerido para la respuesta de muerte inducida por CX-4945 en modelo celular de CCR con y sin SALL2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo Celular

Las líneas celulares de adenocarcinoma primario de colon SW480, y su modelo SALL2 nulo (SW480-KO) generadas previamente en el laboratorio, se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Hyclone) suplementado con suero bovino fetal (FBS; BI) al 10% v/v, L-glutamina 2mM (Invitrogen) y 1% penicillina/streptomina (Invitrogen). Las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal HT-29, SW48, DLD-1, SW620 y de epitelio de colon normal CCD 841 (CoN) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute; HyClone) suplementado con 10% v/v de Suero Bovino Fetal (FBS; BI) y 1% penicillina/streptomina (Invitrogen). Para el mantenimiento celular, las células se disgregaron con tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C para distribuir las a una densidad menor. Los cultivos celulares se incubaron en atmósfera humidificada a 37° C con 5% de CO₂ y se realizó test de micoplasma a todas las líneas celulares con las que se trabajaron.

Para los tratamientos con el inhibidor de CK2, se utilizó CX-4945 (Silmitasertib, BioVision) disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO) (Santa Cruz Biotechnology) a las concentraciones indicadas.

5.2. Preparación de Lisados celulares

Los extractos totales de proteínas procedentes de las células en cultivo se obtuvieron luego de sus respectivos tratamientos con CX-4945 o DMSO. Para tal efecto, se les extrajo el medio de cultivo celular y se lavaron con Tampón Fosfato Salino (PBS) 1X pH 7.4. Las células se colectaron y centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se congeló en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C. El extracto proteico se obtuvo mediante la homogenización del pellet en buffer de lisis pH 7.4 con Tris/HCl 50 mM, 200 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 y 10% de glicerol, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Luego de resuspender y realizar vórtex cada 10 minutos por 30 minutos a la solución, se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

5.3. Cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas totales presentes en cada lisado celular mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). A partir de la medición de absorbancia en espectrofotómetro (OPTIZEN POP), se realizó una curva de calibrado entre 0-10 µg/µl con Albúmina de suero Bovino (BSA) y se interpoló la concentración de cada muestra en la curva. La concentración fue llevada al mismo volumen final añadiendo buffer de lisis y buffer de carga 6X (Tris/HCl pH 6.8,

glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, SDS). Las proteínas fueron denaturadas a 100°C por 5 minutos.

5.4. Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot*.

Las proteínas obtenidas del lisado celular (50–70 μ g de proteínas totales) se cargaron en un gel de poliacrilamida al 8% para su fraccionamiento a 80 Volts por aproximadamente 3 horas. Posterior a ello, se realizó una transferencia a membrana de Fluoruro de polivinidileno (PVDF) previamente sumergida en metanol para su activación y se dejó a 30 Volts durante 16-18 horas en un sistema Mini ProteanTetra System de BioRad, con buffer de transferencia frío (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol al 20% v/v, SDS al 0.004% p/v). Para verificar la adecuada transferencia de proteínas se utilizó una solución de rojo Ponceau 1X (Ponceau S al 0.1% p/v; ácido acético al 5% v/v). Las membranas PVDF se decoloraron con agua destilada y se bloquearon a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora en agitación constante con leche descremada al 5% p/v en tampón tris salino (TBS) 1X-Tween 0.05%. Luego del tiempo de incubación, las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos con TBS 1X-Tween 0.05% en agitación constante, tras lo cual se incubó con su respectivo anticuerpo primario: SALL2 anti-rabbit (1:500, Sigma- Aldrich), PARP-clivado (1:500 Cell Signaling), p-eIF2 β (1:2000 Santa Cruz), eIF2 β (1:1000 Genetex), β -actina (1:10000, Santa Cruz Biotechnology), diluido en TBS 1X-Tween 0.05% toda la noche a 4° C en agitación constante. Después de lavar nuevamente con TBS 1X-Tween 0.05% tres veces durante 5 minutos en

agitación, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario IgG-HRP anti-rabbit (1:2000) o IgG-HRP anti-mouse (1:1000) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido en medio de bloqueo, durante 1 hora a TA. Las membranas se lavaron nuevamente con TBS 1X-Tween 0.05% tres veces durante 5 minutos. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante un sistema de quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence detection system*, ECL) en equipo de quimioluminiscencia Syngene.

5.5. Análisis de expresión de proteínas a partir de *Western blot*.

La cuantificación de niveles de proteínas específicas a partir del *western blot* se realizó a través de densitometría de bandas utilizando el programa *ImageJ*, donde los valores obtenidos de SALL2 se normalizaron con respecto a los valores de β -actina, para así corregir cualquier desviación en las cantidades de proteínas cargadas. Para análisis estadístico se utilizó ANOVA con medidas repetidas y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias entre datos se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

5.6. Ensayos de exclusión de azul de tripán.

Para evaluar viabilidad celular, las células se incubaron por 24 horas en placas de cultivo celular de 24 pocillos con medio DMEM y posteriormente se expusieron a sus respectivos tratamientos con el inhibidor CX-4945. Concluido el tratamiento,

las células fueron colectadas por tripsinización en medio DMEM, se tomaron 100 μ L de la suspensión en cada condición y se les añadió 100 μ L una solución de tinción de azul de tripán al 0.4%. Se incubaron por 15 minutos a TA y luego se contó en cámara de Neubauer el número de células muertas marcadas de azul oscuro y el número de células viables.

5.7. Ensayo de cristal violeta

Células se incubaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos con medio DMEM a la concentración de CX-4945 correspondiente. Al término de cada tratamiento, se eliminó todo el medio de cultivo y las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X pH 7.4 a TA. Se añadieron 400 μ l de solución de tinción con cristal violeta al 0.5% y se incubaron por 20 minutos a TA en agitación constante. Una vez cumplido el tiempo, la solución de cristal violeta fue eliminada y se lavó 4 veces con solución PBS 1X pH 7.4. Se retiró la solución de lavado y se dejó secando a TA durante toda la noche (16 horas). Al día siguiente se les añadió 400 μ l de metanol a cada pocillo y se dejó incubar por 20 minutos en agitación constante a TA. Transcurrido el tiempo, 100 μ L de la resuspensión con metanol de cada condición fue puesta en una placa de 96 pocillos y se determinó la intensidad óptica en lector de microplacas TECAN NanoQuant (Infinite M200) a una longitud de onda de 570 nm.

5.8. Ensayo XTT

Las células SW480 SALL2 *wild type* y SALL2-KO fueron sembradas en placas de cultivo celular de 96 pocillos con 100 μ l de medio DMEM sin rojo fenol, luego de 48 horas se les añadió el tratamiento con el inhibidor CX-4945 y DMSO como condición control. Se utilizó el kit colorimétrico XTT Cell Proliferation Kit (XTT based, Biological Industries) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, mezclando 1000 μ l de XTT a 37°C y 20 μ l del activador XTT. Se le añadió 25 μ l de este reactivo XTT a cada condición. Luego de 2 horas de incubación a 37°C se determinó la intensidad óptica en lector de microplacas TECAN NanoQuant (Infinite M200) a una longitud de onda de 450 nm por 1 segundo.



5.9. Microscopía y análisis.

Al término de incubación del tratamiento con CX-4945 a 0, 2, 24 y 32 horas, se fotografiaron todas las condiciones en campo claro utilizando microscopio óptico invertido Olympus CKX41SF5.

Para el conteo de vesículas se analizaron las fotografías tomadas en objetivo 20X utilizando las herramientas de conteo disponibles en *ImageJ*. Los gráficos obtenidos del conteo de vesículas fueron generados mediante el programa GraphPad Prism.

6. RESULTADOS

6.1. **Objetivo Específico 1: Determinar el efecto de la inhibición de caseína quinasa 2 (CK2) con CX-4945 en la expresión de SALL2 en la línea de cáncer colorrectal SW480**

Recientemente se ha examinado el efecto de CK2 sobre SALL2, estableciendo que CK2 tiene un efecto directo sobre la estabilidad de SALL2 en células HEK-293 (Figura 2, Hermosilla, 2017), favoreciendo la disminución de sus niveles. Para evaluar si este mecanismo de regulación de SALL2 ocurre en células de CCR, donde además se ha comprobado que CK2 se encuentra hiperactiva (Lin et al., 2011; Zou et al., 2011), se evaluaron los niveles proteicos de SALL2 mediante *western blot* luego del uso del inhibidor CX-4945.

6.1.1. Efecto de la inhibición de CK2 en la restitución de SALL2 en línea celular de CCR.

Para determinar si CK2 tiene efecto sobre los niveles de SALL2 en cáncer de colon, **se utilizaron las células SW480 derivadas de adenocarcinoma primario de colon, las cuales de acuerdo a estudios previos se ha identificado como una línea de CCR que presenta elevados niveles de CK2 endógeno** (Zou et al., 2011). Para la inhibición de CK2 se utilizó el inhibidor específico CX-4945 y se analizaron los niveles endógenos de SALL2 post tratamiento mediante *Western blot*. Como condición control se utilizaron células sin inhibidor, a las cuales se les añadió sólo el solvente de la droga, DMSO. Además, para determinar si el efecto celular observado se debe a la concentración de inhibidor usada y no a un efecto del solvente, las concentraciones añadidas se igualaron en volumen con DMSO.

Como primera aproximación, se estimó la concentración a la que el inhibidor específico de CK2 genera un efecto positivo en la restitución de los niveles de SALL2 tratando las células SW-480 con concentraciones crecientes del inhibidor CX-4945 (15; 22,5; 30 y 40 μM) de acuerdo con rangos de concentración observadas en bibliografía (Niechi et al., 2015; Silva-Pavez et al., 2019). Las células se mantuvieron en cultivo durante 2 y 6 horas en medio DMEM completo, al que se le añadió el inhibidor a 15; 22,5; 30 y 40 μM y como condición control se les añadió DMSO. Los resultados demostraron que, al inhibir específicamente la actividad quinasa de CK2, los niveles de SALL2, basalmente bajos, comenzaron a

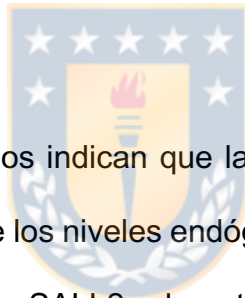
experimentar un leve aumento desde concentración de 15 μM CX-4945 (Figura 4A). Análisis densitométrico de 3 experimentos independientes indicaron que los niveles máximos de SALL2 se alcanzaron a las 2 horas de tratamiento con concentraciones de CX-4945 de 30 y 40 μM , sin embargo, a estas mismas concentraciones, a las 6 horas de tratamiento los niveles de SALL2 comenzaban a descender (Figura 4B). Basado en estos resultados se estableció una concentración de **25 μM de CX-4945** para experimentos posteriores.

6.1.2. Restitución de los niveles de SALL2 en el tiempo

Una vez establecida la concentración de CX-4945 a la cual trabajar, se probaron distintos períodos de tiempo de incubación, estableciendo una cinética de inhibición de SALL2 entre las 0 y 48 horas de tratamiento. La actividad quinasa de CK2 se evaluó en base a los niveles de fosforilación del factor de iniciación de la traducción eucariota eIF2 β (*eukaryotic initiation factor 2 β*), descrito como sustrato de CK2 (Llorens et al., 2003; Welsh, Price, Bladergroen, Bloomberg, & Proud, 1994). Como se esperaba, CX-4945 inhibió la actividad de CK2. A partir de las primeras horas de iniciar el tratamiento con CX-4945, se comenzó a presentar una disminución en la actividad quinasa de CK2, determinada por una disminución de los niveles de fosforilación de eIF2 β (p-eIF2 β), mientras que los niveles de eIF2 β total permanecieron constantes. Esta disminución en la actividad de CK2 se correlacionó con un restablecimiento de los niveles de SALL2 (Figura 4C), los cuales

presentaron diferencias significativas, respecto al tiempo cero, durante la primera y segunda hora de iniciado el tratamiento (Figura 4D).

Para determinar el tiempo en el que comenzaba a verse un efecto de muerte celular frente al tratamiento con CX-4945, se evaluó también el marcador de muerte PARP clivado (Chaitanya, Alexander, & Babu, 2010). Como se observa en la Figura 4E, PARP clivado se comienza a detectar desde las 16 horas hasta las 48 horas post tratamiento, estos periodos fueron considerados para estudios de viabilidad posteriores.



En conjunto, estos resultados indican que la inhibición selectiva de CK2 por CX-4945 genera un aumento de los niveles endógenos de SALL2, estableciendo cierta relación entre los niveles de SALL2 y la actividad quinasa de CK2 en esta línea celular de cáncer colorrectal.

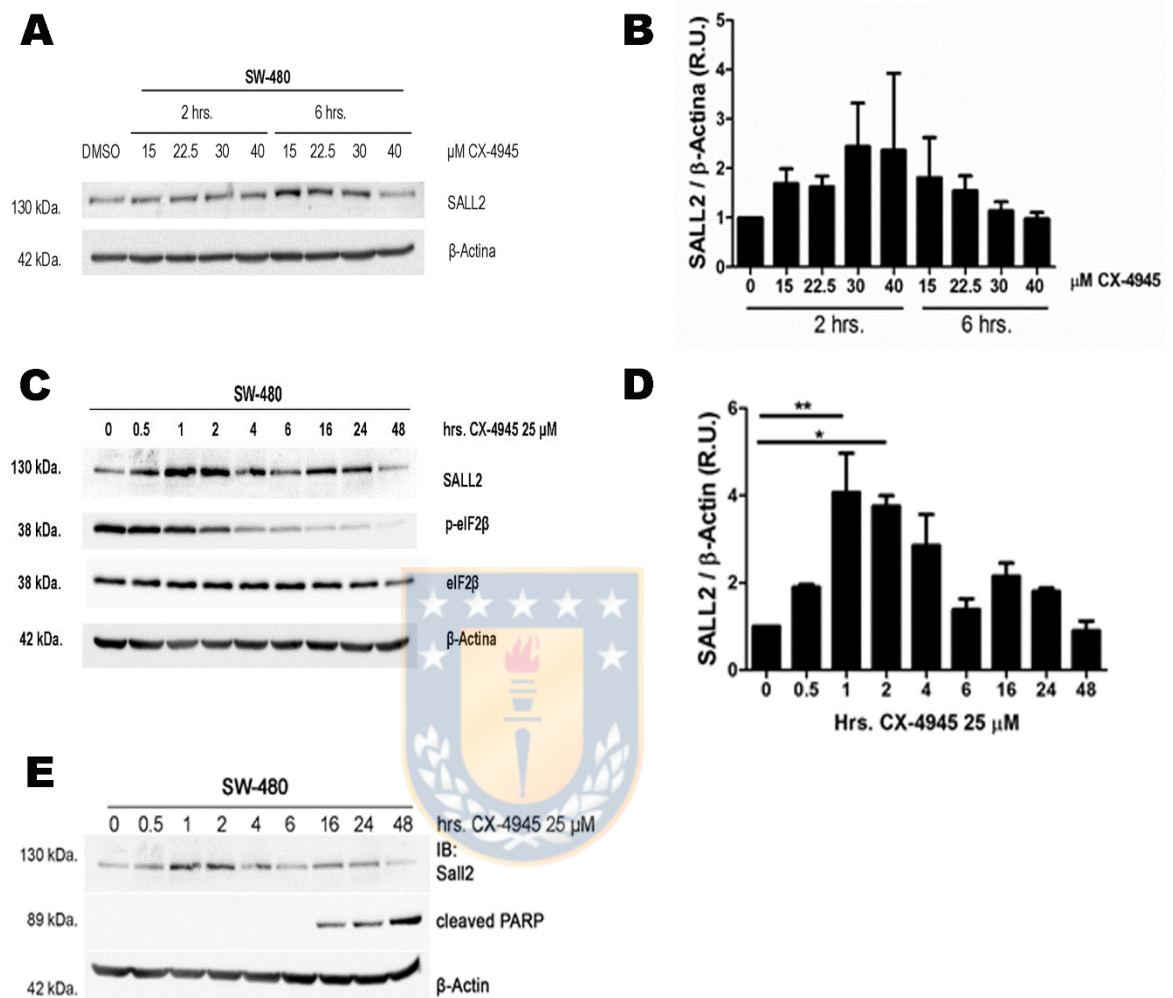
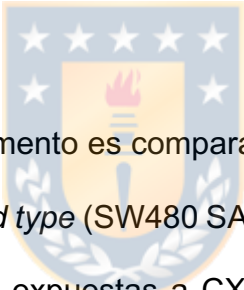


Figura 4. La inhibición farmacológica de CK2 aumenta los niveles proteicos de SALL2 en la línea celular SW480. (A) Niveles endógenos de SALL2 detectados mediante *western blot* en células SW-480 tratados a distintas concentraciones de CX-4945 y DMSO durante 2 y 6 horas de tratamiento. (B) Cuantificación de los niveles de SALL2 normalizados con β -actina en células SW480. R.U.: unidades relativas. n=3. (C) Restitución de los niveles de SALL2 en células SW-480 luego de inhibir CK2 con 25 μM del inhibidor CX-4945, detectados mediante *western blot*. (D) Representación gráfica de la cuantificación de bandas por densitometría de los niveles de SALL2 respecto al control de carga β -actina. (E) Niveles de SALL2 y PARP clivado de SW-480 tratadas a distintos tiempos con CX-4945. Las barras de error equivalen al error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico se realizaron con one-way ANOVA más la prueba de comparación múltiple de Tukey; * p < 0,05, ** p < 0,01.

6.2. Objetivo específico 2: Evaluar la viabilidad celular luego del restablecimiento de los niveles de SALL2 con CX-4945 en línea celular SW-480 con SALL2 WT y SW-480 SALL2 KO.

Para determinar si la restitución de los niveles de SALL2 observada luego del tratamiento con CX-4945 tiene un efecto supresor tumoral en CCR, se evaluó viabilidad celular utilizando como modelo de estudio la línea celular SW480 con SALL2 deletado mediante estrategias CRISPR-Cas9, previamente generada y disponible en el laboratorio.



El propósito de este experimento es comparar la viabilidad en clones celulares de este modelo con SALL2 *wild type* (SW480 SALL2WT) y en clones que no expresen SALL2 (SW480 SALL2KO) expuestas a CX-4945. Esto permite determinar si el restablecimiento de SALL2 por CX-4945 en la línea *wild type* posee ventajas sobre células en las cuales SALL2 no se expresa. Los clones celulares G4 y G8 corresponden a células SW480 con SALL2 nulo (SALL2KO) y A11 corresponde a células SW480 con SALL2 *wild type* (control) (Figura 5A).

En el caso particular de CK2, estudios previos han demostrado que se encuentra hiperactivada en tejidos y líneas celulares de CCR, dentro de las cuales se incluye la línea SW480 (Liang, Qu, & Ding, 2007).

Se evaluaron los niveles de SALL2 mediante *western blot* luego de la inhibición de CK2 con CX-4945 25 μ M en los clones A11 y G8. La figura 5B muestra el restablecimiento temprano de SALL2 en las células A11 luego del tratamiento con el inhibidor y en G8 la ausencia de la proteína.

6.2.1. Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar el efecto de la restitución de SALL2 sobre la viabilidad celular, se realizó como primera aproximación experimental el ensayo de XTT. Este ensayo mide la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular en base a la reducción de la sal de tetrazolio XTT. Se trataron los clones G8 y G4 (SALL2KO), y A11 (SALL2 WT) con CX-4945 (25 μ M) durante 0, 2, 24 y 32 horas. Como condición control, se trataron las células durante los mismos periodos de tiempo con DMSO (Figura 5C). Los resultados de viabilidad celular obtenidos fueron graficados normalizando los valores respecto a tiempo 0. La representación gráfica muestra una disminución de la viabilidad celular a medida que aumenta el tiempo de incubación con CX-4945 (Figura 5D), lo cual era esperado y se atribuye al correcto funcionamiento de CX-4945, sin embargo, no se observaron diferencias entre células con SALL2 restituido luego del tratamiento (A11) y células con SALL2KO (G4 y G8).

Al no observar diferencias en viabilidad celular luego de restituir los niveles de SALL2 con CX-4945, se evaluaron tiempos más tardíos, tratando los clones durante 24 y 48 horas con DMSO y CX-4945. Para ello se utilizaron los clones A11 (SALL2 WT) como control y G8 como SALL2KO. Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al tiempo 0 y, al igual que el ensayo anterior, el tratamiento con CX-4945 genera una disminución de viabilidad celular, sin embargo, luego de 48 horas de tratamiento con CX-4945 tampoco se observaron diferencias significativas entre clones SALL2 WT y SALL2KO (Figura 5E).

En ambos ensayos independientes cada condición experimental fue realizada en triplicado.



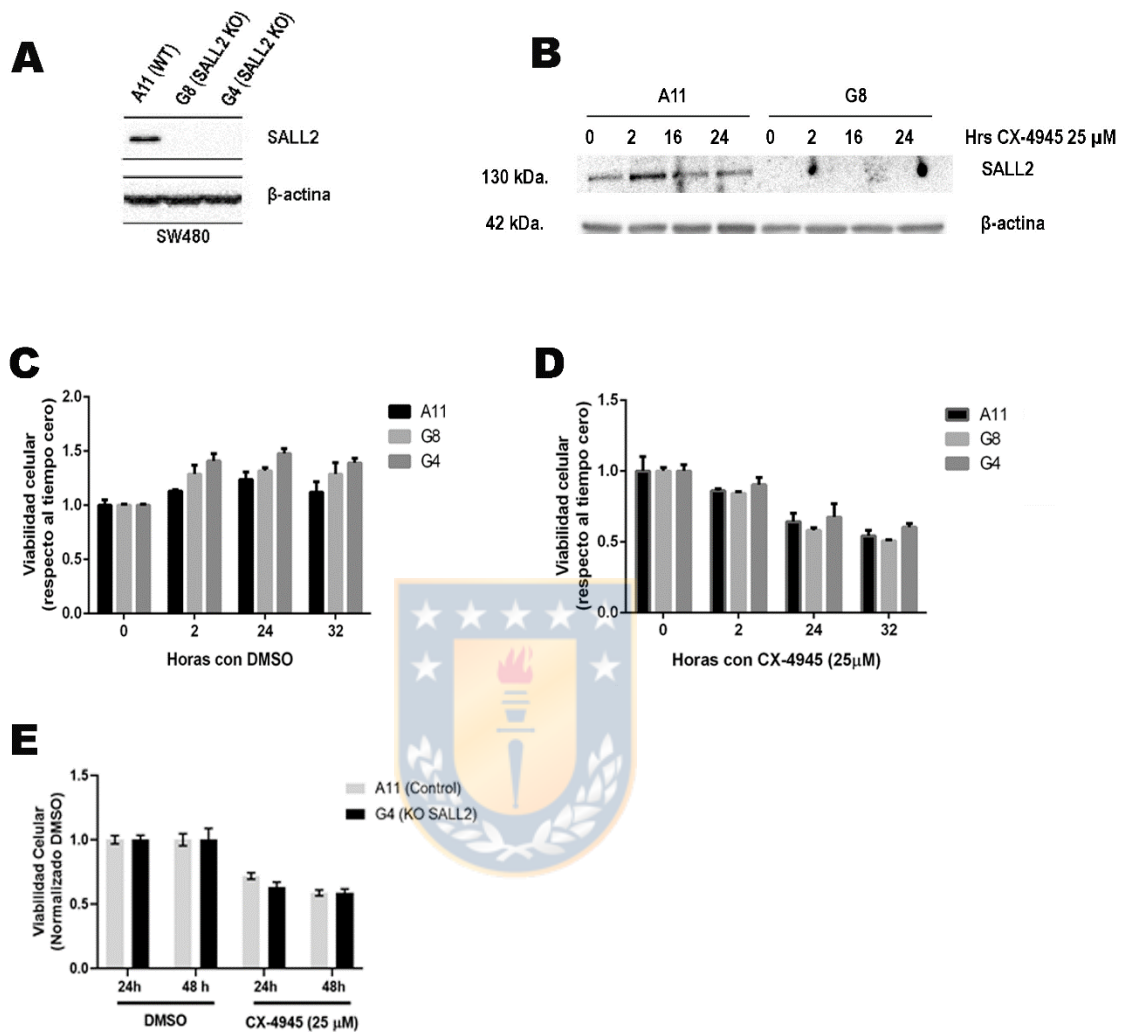


Figura 5. Efecto del restablecimiento de SALL2 en viabilidad celular. (A) *Western blot* del modelo celular generado por el laboratorio mediante estrategias CRISPR-Cas9. Expresión de SALL2 en clones celulares SW480 SALL2 WT (A11) y SALL2KO (G8, G4) (B) *Western blot* del tratamiento con CX-4945 25 μM de los clones A11 y G8. β-actina fue utilizado como control de carga. (C) Ensayo XTT de la condición control, clones SW480 A11, G8 y G4 tratados por 0, 2, 24 y 32 horas con DMSO. Valores normalizados respecto al tiempo 0. (D) Representación gráfica del ensayo XTT de los clones celulares tratados con CX-4945 25 μM hasta 32 horas. Valores normalizados respecto a tiempo 0. N=1 (E) Representación gráfica del ensayo XTT utilizando CX-4945 25 μM y DMSO durante 24 y 48 horas. Valores normalizados respecto al tiempo cero. N=1 en triplicado.

Para corroborar los resultados obtenidos por el ensayo XTT se realizaron estudios complementarios incluyendo el ensayo de exclusión con azul de tripán y el ensayo de cristal violeta. El azul de tripán es un colorante que permite distinguir células viables de células muertas debido a que solo puede marcar de azul a células muertas. Esta capacidad del azul de tripán se debe a que la membrana plasmática en las células muertas está dañada y, por ende, permite el paso de compuestos que las células con su membrana intacta (células vivas) no dejan pasar. Esto permite evaluar la integridad de la membrana celular y diferenciar a células vivas (no teñidas) de células muertas (células azules), a las cuales el colorante azul de tripán ha podido ingresar. Para este ensayo, y tal como se muestra en la figura 6A, se utilizaron los clones A11 y G8, y como condición control se utilizaron células a las cuales no se les añadió el inhibidor, sino que fueron tratadas con DMSO (25 μ M) por 48 horas.

La viabilidad celular se expresó como porcentaje respecto a la viabilidad celular de la condición control. Transcurridas 48 horas de tratamiento, no se observaron diferencias en la densidad o morfología celular entre células SW480 SALL2WT y SALL2KO. Al comparar el porcentaje de muerte celular entre la condición control y el tratamiento con el inhibidor, se observó que tal como se esperaba, el porcentaje de células muertas aumenta en presencia de CX-4945. En presencia de SALL2 (A11) se observó un leve aumento en el porcentaje de células muertas y una leve

disminución en el porcentaje de células viables en comparación al clon SALL2KO (G8), sin embargo, este experimento se realizó solo una vez (Figura 6A y B).

El ensayo cristal violeta, permite la tinción de células adheridas a la superficie de la placa de cultivo. El marcaje violeta de los pocillos es indicativo de la presencia de células adheridas en la superficie de la placa, las cuales se consideran como células viables, por lo cual, a mayor intensidad en la coloración, mayor es la cantidad de células que hay en dicha condición. A partir de la elución de la tinción del cristal violeta desde cada condición, se midió la absorbancia de las muestras y se calculó el porcentaje de células viables por condición, considerando la absorbancia en la condición control como el 100% de células viables (adheridas a la superficie de la placa de cultivo). En este caso, luego de las 48 horas de tratamiento con CX-4945 se observó una fuerte coloración violeta tanto en condiciones en las cuales los niveles de SALL2 se han restituido (A11), así como también en condiciones en las cuales SALL2 se encuentra nulo (G4) (Figura 6C). Como se muestra en la figura 6D, se observaron diferencias entre las células tratadas y la condición control, sin embargo, concordante con los resultados obtenidos en XTT, no se observaron diferencias en los niveles de absorbancia luego de comparar la viabilidad celular de SW480 SALL2WT y SALL2KO. Por lo tanto, como se había mostrado anteriormente, la droga tiene un efecto sobre la viabilidad celular de la línea celular SW480, pero no se ve un efecto asociado a la restitución de SALL2. La absorbancia obtenida en la condición control (DMSO) se

consideró como el 100% de las células viables y porcentaje de células en los distintos tratamientos fue calculado respecto a la absorbancia de la condición control.

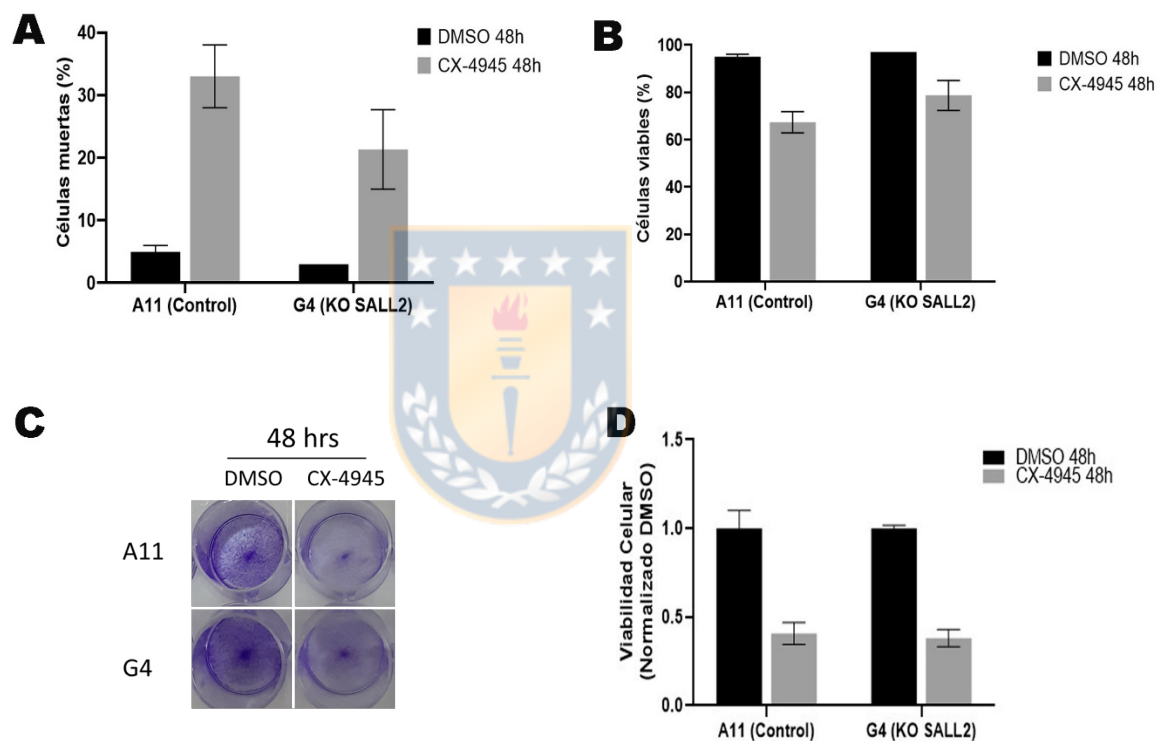


Figura 6. Ensayos de viabilidad celular. (A) Representación gráfica del porcentaje de células muertas respecto al total de células contadas determinado mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán. (B) Porcentaje de células viables determinadas con azul de tripán. Las células marcadas de azul se contabilizaron como células muertas y las células no marcadas fueron contadas como células viables, respecto al total de células por cuadrante. N=1 (C) Fotografía del ensayo de cristal violeta de células SW480 SALL2 WT y SALL2KO a 48 horas de tratamiento con CX-4945. (D) Representación gráfica de la viabilidad celular determinada por tinción con cristal violeta. Valores normalizados respecto a la condición control con DMSO. N=1 en triplicado.

6.3. Objetivo Específico 3. Determinar si el restablecimiento de SALL2 es requerido para la respuesta de muerte inducida por CX-4945 en modelo SW480 con y sin SALL2.

Para determinar si la restitución de SALL2 es capaz de mediar la muerte celular, se determinaron los niveles de PARP clivado mediante *western blot* luego de que las células fueran tratadas con CX-4945. Luego del tratamiento con CX-4945 25 μ M por 48 horas, se observó la restitución transiente de SALL2 en las células SALL2 *wild type* (A11), y su ausencia en clones SALL2KO (G8 y G4) mediante *western blot*. Los niveles de PARP clivado, en todos los clones fue detectable a las 48 horas y no se observaron diferencias entre células SALL2WT y SALL2KO luego del tratamiento con CX-4945 (Figura 7A).

En conjunto, estos resultados indican que no hubo una diferencia mayor en la viabilidad y muerte celular asociada a la restitución de SALL2 por este mecanismo de regulación postraduccional mediado por inhibición de CK2. Sin embargo, en todos los experimentos en los cuales se utilizó CX-4945, se observó que estas **células presentaban una vacuolización citoplasmática masiva, la cual fue más evidente en presencia de SALL2.**

Estudios previos con CX-4945 han descrito este tipo de vacuolización masiva, asociándola a un tipo de muerte celular no apoptótica descrito como methuosis.

Mediante observaciones microscópicas, se observó que los clones SALL2KO (G8 y G4) presentaron una menor formación de vesículas refringentes que clones donde se restituyó SALL2 (A11) (Figura 7B). Al cuantificar el porcentaje de células con vesículas, se observó que las células A11 presentaron un aumento significativo en porcentaje respecto a células que no expresan SALL2 (Figura 7C). Células A11 presentaron además un aumento significativo en cuanto al número y tamaño de vesículas luego del tratamiento con CX-4945 (Figura 7D y E). Sin embargo, esta diferencia significativa en número y tamaño de vesículas observada frente al tratamiento con CX-4945 entre células con y sin SALL2 no se correlacionó con efectos en la viabilidad/muerte celular de los experimentos anteriores.



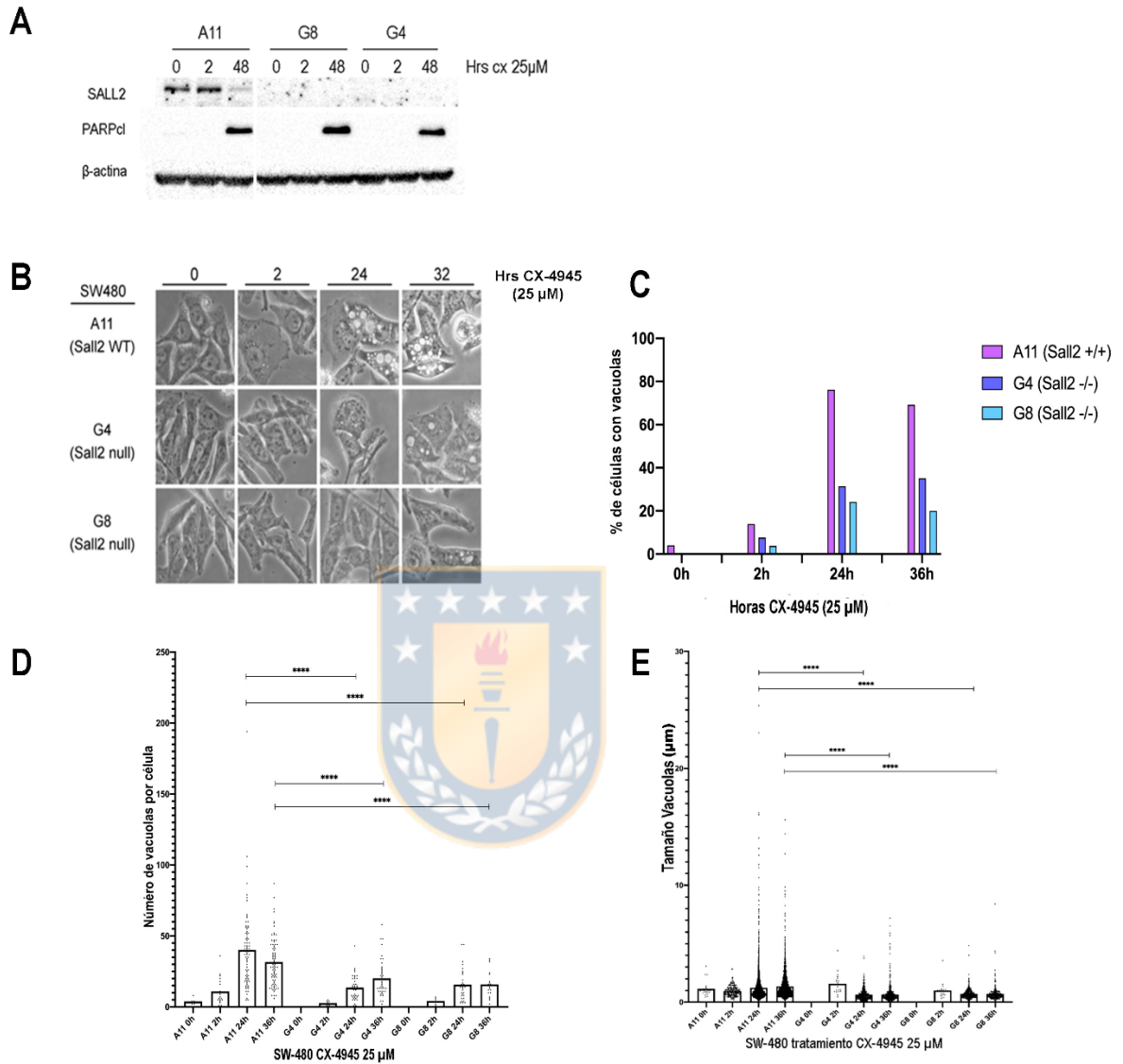


Figura 7. Evaluación de muerte celular frente a tratamiento con CX-4945 (A) Evaluación de los niveles de PARP clivado mediante *western blot* (B) Fotografía en campo claro de células SW480 SALL2WT(A11) and SALL2KO (G4 y G8), objetivo 40X. Se muestra la formación de vesículas luego del tratamiento con CX-4945. (C) Cuantificación del porcentaje de células con vesículas luego del tratamiento con CX-4945 (D) Representación gráfica del número de vacuolas por célula en los clones A11, G4 y G8 luego del tratamiento con CX-4945 25 μ M. (E) Tamaño de las vacuolas generadas (μ m) luego del tratamiento con CX-4945 25 μ M en clones A11, G4 y G8.

7. DISCUSIÓN

El factor de transcripción SALL2 está involucrado en importantes funciones celulares en respuesta a condiciones celulares adversas, dentro de las cuales se encuentra la inducción de quiescencia, la regulación negativa de la progresión del ciclo celular y la inducción de apoptosis frente a estrés genotóxico. En base a estas funciones, sus estudios se han enfocado en cáncer, donde mayoritariamente presenta niveles disminuidos, y su restitución se asocia con un rol supresor tumoral. Este rol ha sido demostrado principalmente en cáncer de ovario, sin embargo, un estudio en glioblastoma sugiere un rol oncogénico de SALL2, generando la posibilidad de un rol dual para SALL2, dependiendo del contexto en el que se encuentre. Esto hace necesario el profundizar los estudios del rol que cumple SALL2 en cáncer, donde sus niveles además se encuentran desregulados, existiendo escasa información sobre su regulación.

Estudios previos realizados por el laboratorio de la Dra. Pincheira demostraron el efecto que tiene la inhibición de CK2 con CX-4945 sobre los niveles de SALL2 en líneas celulares de leucemia, cáncer de ovario, de mama y de pulmón, observando que sólo en cáncer de pulmón y mama la inhibición específica de CK2 fue capaz de restablecer los niveles de SALL2. Esto indica que este evento post-transcripcional está involucrado en la disminución de SALL2 sólo en algunos tipos o contextos de cáncer a pesar de que CK2 se encuentre activa de manera

constitutiva, lo que sugiere que la disminución de SALL2 en otros tipos de cáncer o contextos celulares se debe a otros mecanismos de regulación, epigenéticos o transcripcionales. En esta tesis, se evaluó si el mecanismo de degradación postranscripcional mediado por CK2 se asocia a los bajos niveles de SALL2 observados en cáncer de colon.

Para ello se determinó el efecto que tiene la inhibición farmacológica de CK2 con el inhibidor CX-4945 en la línea celular de cáncer de colon SW-480. Los resultados indican que esta línea celular presenta basalmente bajos niveles de SALL2 comparado a la línea de epitelio de colon normal CoN-841. Sin embargo, al someterlas a tratamiento con CX-4945, los niveles de SALL2 aumentan mayoritariamente a tiempos tempranos y de manera transiente (Figura 4D). Esta restauración se obtuvo en condiciones en las que específicamente se alteró la actividad de CK2, por lo cual se puede establecer cierta relación entre la actividad de esta quinasa y los niveles endógenos de SALL2 en este tipo de cáncer. Nuestros resultados sugieren que la actividad de CK2 afecta negativamente la estabilidad de SALL2 en líneas de cáncer de colon y la inhibición farmacológica de CK2 es suficiente para restituir los niveles de SALL2. Sería relevante estudiar el efecto de CX-4945 en un panel de líneas de CCR para entender si es un mecanismo común, o si depende del contexto genético.

Este restablecimiento adquiere importancia dadas las funciones pro-apoptóticas y supresoras del crecimiento tumoral que se le han descrito a SALL2.

Estudios previos han determinado que el silenciamiento de SALL2 en líneas celulares de cáncer de ovario es suficiente para aumentar significativamente la viabilidad celular en comparación a condiciones control, donde se expresa SALL2 (Miao et al., 2017). Sin embargo, al evaluar viabilidad celular en los clones SALL2WT y SALL2KO, nuestros experimentos mostraron que no hay cambios en la viabilidad celular asociados a la presencia o ausencia de SALL2 luego del uso de CX-4945. Esto se determinó mediante XTT a períodos de tiempo tempranos y tardíos de tratamiento, no observándose diferencias entre células SALL2WT y SALL2KO. El ensayo cristal violeta tampoco mostró diferencias en viabilidad celular asociadas a la presencia o ausencia de SALL2 luego del uso de la droga. Finalmente, en el ensayo de exclusión de azul de tripán, el cual evalúa la integridad de la membrana celular, se observó una tendencia a la disminución en el porcentaje de muerte celular en ausencia de SALL2 coincidente con estudios en otros contextos celulares de muerte (Escobar D, 2015). Sin embargo, se requieren otras repeticiones para confirmar este último resultado.

En conjunto, el análisis de los experimentos de viabilidad realizados, demuestran que el inhibidor de CK2, CX-4945, disminuye la viabilidad de la línea celular SW480, pero este efecto no es significativamente afectado por la restitución de

SALL2, lo que sugiere que la respuesta de muerte mediada por CX-4945 no es dependiente de SALL2, como se esperaba.

Investigaciones previas han demostrado la importancia de una restitución de SALL2 para generar una respuesta apoptótica. En células MEFs, SALL2 induce apoptosis en condiciones de estrés genotóxico inducido por doxorubicina (Escobar et al., 2015; Farkas et al., 2013), en líneas celulares de carcinoma ovárico SKOV-3 una expresión exógena estable de SALL2 aumenta el porcentaje de células apoptóticas (D Li et al., 2001) y su silenciamiento en líneas celulares de cáncer de ovario A-2780 disminuye significativamente el porcentaje de células apoptóticas (Miao et al., 2017). En líneas celulares de carcinoma esofágico el restablecimiento de SALL2 favorece la respuesta a muerte frente a radioterapia y a cisplatino, mejorando la sensibilidad a tratamiento (Luo et al., 2017) y en cáncer de mama la presencia de SALL2 mejora la respuesta a tratamiento con tamoxifeno (Ye et al., 2019). En células MEFs, SALL2 induce de manera temprana la expresión de genes asociados a muerte celular como BAX y NOXA, mientras que la muerte celular se evidencia a períodos más tardíos (16-24 horas) (Escobar et al., 2015). Considerando estos antecedentes, se evaluó si la restitución de SALL2 luego del tratamiento con CX-4945 genera ventaja en muerte celular sobre células SW480 que no la expresan. De acuerdo con lo demostrado en estudios previos, se esperaba que células SALL2 KO fueran más resistentes a muerte que células en las cuales la inhibición de CK2 había restablecido los niveles de SALL2.

Sin embargo, al evaluar los niveles de PARP clivado en los clones SALL2 WT y SALL2 KO, no se observaron diferencias en la inducción de muerte celular entre ambas condiciones.

Nuestros estudios indican que la restitución de SALL2 ocurre de manera temprana luego de inhibir a CK2, es probable que a esos períodos tempranos su restablecimiento no se correlacione con muerte celular y se relacione a otros procesos celulares tales como senescencia o detención de ciclo celular, esto no fue evaluado en esta tesis y quedaría por determinar en estudios futuros. En conjunto, los resultados sugieren que la restitución de SALL2 no es suficiente para generar ventaja en la respuesta apoptótica frente a terapia con CX-4945 en células SW480, contrario a lo observado en contextos como en cáncer de ovario (D Li et al., 2001), esófago (Luo et al., 2017) y mama (Ye et al., 2019), donde su restitución es suficiente para disminuir la agresividad de estos fenotipos tumorales

Al momento de realizar estos experimentos se tomaron consideraciones como no usar células que tuvieran más de 3 pasajes, siempre se mantuvieron a baja confluencia. Todas las líneas celulares que se utilizaron se encontraban previamente testeadas y libres de micoplasma, de manera que estos factores no interfirieran con los resultados esperados.

Un resultado interesante y no anticipado fue la masiva aparición de vacuolas citoplasmáticas en todos los experimentos realizados con el inhibidor de CK2, y la posible relación de SALL2 con un tipo de muerte celular descrita como methuosis. Durante todos los experimentos en los que se utilizó CX-4945, se produjo a partir de las 24 horas una vacuolización masiva en el citoplasma de las células tratadas, lo que fue más evidente en los clones SALL2 WT. Este tipo de muerte ha sido catalogada como muerte celular no apoptótica, caracterizada por el desplazamiento de vacuolas provenientes de una macropinocitosis masiva (Overmeyer, Kaul, Johnson, & Maltese, 2008). Nuestros resultados son consistentes con datos obtenidos recientemente por otros grupos de investigación en líneas celulares de CCR, donde CX-4945 promueve esta forma distinta de muerte celular caracterizada por el desplazamiento de grandes vacuolas citosólicas refringentes, derivadas de macropinocitosis masiva y llenas de líquido, lo cual fue observado utilizando la misma concentración de CX-4945 (25 μM) (Silva-Pavez et al., 2019) evaluada en los ensayos de esta tesis. Cabe mencionar que CX-4945 ha sido recientemente caracterizado como inductor de methuosis cuando se utiliza en concentraciones micromolares altas, que van de 10 a 50 μM , similares a las utilizadas en este estudio (D'Amore, Borgo, Sarno, & Salvi, 2020; D'Amore, Moro, et al., 2020; Lertsuwan et al., 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos, en ausencia de SALL2 se produjo una disminución significativa en la formación de vesículas, menor en número y tamaño que en los clones SALL2 WT, sugiriendo que SALL2 estaría participando y favoreciendo este tipo de muerte celular no apoptótica, lo que abre paso a futuras investigaciones. Durante el proceso de methuosis, la desaparición celular se asemeja al proceso necrótico en cuanto a la pérdida de la capacidad metabólica y pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Maltese & Overmeyer, 2014, 2015), sin embargo, esto no se vio reflejado en los ensayos de azul de tripán ni en el ensayo XTT, a pesar de observarse diferencias significativas asociadas a la presencia y ausencia de SALL2.

El hallazgo de que CX-4945 promueve este mecanismo no canónico de muerte celular podría representar un valor agregado en la terapia combinada anticancerosa. La inducción de methuosis ha sido propuesta como nueva estrategia contra células cancerosas y podría representar un enfoque antitumoral factible para aquellos tumores que adquirieron la capacidad de escapar de la apoptosis o que desarrollaron resistencia a agentes inductores de apoptosis clásicos. Potenciando la macropinocitosis, CX-4945 podría favorecer la captación de fármacos adicionales, lo que representa una condición ideal para una terapia farmacológica que implica el uso múltiples de fármacos (Zanin et al., 2012).

8. CONCLUSIÓN

La inhibición de CK2 por CK-4945 aumentó de manera transiente los niveles de SALL2 en la línea SW480, por lo que un mecanismo regulatorio de SALL2 en este tipo de cáncer se podría asociar a la degradación postraduccional mediado por CK2.

En contexto de CCR, la expresión de SALL2 parece no ser requerida para la respuesta de muerte de células SW480 expuestas a CX-4945, sin embargo, SALL2 parece ser requerido para la muerte no apoptótica llamada methousis. Se requieren estudios adicionales para dilucidar el rol de SALL2 en CCR.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alagaratnam, S., Lind, G. E., Kraggerud, S. M., Lothe, R. A., & Skotheim, R. I. (2011, August). The testicular germ cell tumour transcriptome. *International Journal of Andrology*, Vol. 34.
- Bandera, C. A., Takahashi, H., Behbakht, K., Liu, P. C., Livolsi, V. A., Benjamin, I., Boyd, J. (1997). Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 57(3), 513–515.
- Basson, M., & Horvitz, H. R. (1996). *The Caenorhabditis elegans gene sem-4 controls neuronal and mesodermal cell development and encodes a zmc finger protein. 4*, 1953–1965.
- Böhm, J., Buck, A., Borozdin, W., Mannan, A. U., Matysiak-Scholze, U., Adham, I., Barrionuevo, F. (2008). Sall1, Sall2, and Sall4 are required for neural tube closure in mice. *American Journal of Pathology*, 173(5), 1455–1463.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Chaitanya, G., Alexander, J. S., & Babu, P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8(1), 31.
- Chatterjee, R., Hoffman, M., Cliften, P., Seshan, S., Liapis, H., & Jain, S. (2013). Targeted Exome Sequencing Integrated with Clinicopathological Information Reveals Novel and Rare Mutations in Atypical, Suspected and Unknown Cases of Alport Syndrome or Proteinuria. *PLoS ONE*, 8(10), e76360.
- Cheng, J., Deng, R., Wu, C., Zhang, P., Wu, K., Shi, L., Tao, K. (2015). Inhibition of SALL4 suppresses carcinogenesis of colorectal cancer via regulating Gli1 expression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 10092–10101.
- Chi, D., Zhang, W., Jia, Y., Cong, D., & Hu, S. (2019). Spalt-Like Transcription Factor 1 (SALL1) Gene Expression Inhibits Cell Proliferation and Cell Migration of Human Glioma Cells Through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Medical Science Monitor Basic Research*, 25, 128–138.
- CX-4945 Granted Orphan Drug Designation. (2017). In *Oncology Times* (Vol. 39).
- D'Amore, C., Borgo, C., Sarno, S., & Salvi, M. (2020). Role of CK2 inhibitor CX-4945 in anti-cancer combination therapy – potential clinical relevance.

Cellular Oncology, 43(6), 1003–1016.

- D'Amore, C., Moro, E., Borgo, C., Itami, K., Hirota, T., Pinna, L. A., & Salvi, M. (2020). "Janus" efficacy of CX-5011: CK2 inhibition and methuosis induction by independent mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(11), 118807.
- De Celis, J. F., & Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1385–1398.
- Dirican, E., & Akkiprik, M. (2016, September 1). Functional and clinical significance of SALL4 in breast cancer. *Tumor Biology*, Vol. 37, pp. 11701–11709.
- E. Hermosilla, V., Salgado, G., Riffo, E., Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Pincheira, R. (2018). SALL2 represses cyclins D1 and E1 expression and restrains G1/S cell cycle transition and cancer-related phenotypes. *Molecular Oncology*, 12(7), 1026–1046.
- Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Campos, T., Sodir, N. M., Morales, M., Pincheira, R. (2015). Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death and Disease*, 6(7), 1–14.
- Estilo, C. L., O-Charoenrat, P., Talbot, S., Socci, N. D., Carlson, D. L., Ghossein, R., Singh, B. (2009). Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer*, 9(1), 11.
- Farkas, C., Martins, C. P., Escobar, D., Hepp, M. I., Donner, D. B., Castro, A. F., Pincheira, R. (2013). Wild Type p53 Transcriptionally Represses the SALL2 Transcription Factor under Genotoxic Stress. *PLoS ONE*, 8(9), 1–16.
- Farkas, C., Quiroz, A., Alvarez, C., Hermosilla, V., Aylwin, C. F., Lomniczi, A., Pincheira, R. (2021). Characterization of SALL2 Gene Isoforms and Targets Across Cell Types Reveals Highly Conserved Networks. *Frontiers in Genetics*, 12(613808).
- Gu, H., Li, D., Sung, C. K., Yim, H., Troke, P., & Benjamin, T. (2011). DNA-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor p150Sal2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809(4–6), 276–283.
- Hermosilla, V. E. (2017). *REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SALL2 POR CASEINA QUINASA II*. Universidad de Concepción.
- Hermosilla, V. E., Hepp, M. I., Escobar, D., Farkas, C., Riffo, E. N., Castro, A. F.,

- & Pincheira, R. (2017). Developmental SALL2 transcription factor: A new player in cancer. *Carcinogenesis*, 38(7), 680–690.
- Holleman, T., Schuh, R., Pieler, T., and Stick, R. (1996). *Xenopus Xsal-1*, a vertebrate homolog of the region specific homeotic gene spalt of *Drosophila*. 55, 19–32.
- Imai, A., Mochizuki, D., Misawa, Y., Nakagawa, T., Endo, S., Mima, M., Misawa, K. (2019). SALL2 Is a Novel Prognostic Methylation Marker in Patients with Oral Squamous Carcinomas: Associations with SALL1 and SALL3 Methylation Status. *DNA and Cell Biology*, 38(7), 678–687.
- Kelberman, D., Islam, L., Lakowski, J., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Sowden, J. C. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2511–2526.
- Kohlhase, J., Altmann, M., Archangelo, L., Dixkens, C., & Engel, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of Msal-2. *Mammalian Genome*, 11(1), 64–68.
- Kohlhase, J., Schuh, R., Dowe, G., Kühnlein, R. P., Jäckle, H., Schroeder, B., Stick, R. (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the *Drosophila* gene spalt. *Genomics*, 38, 291–298.
- Köster, R., Stick, R., Loosli, F., & Wittbrodt, J. (1997). Medaka spalt acts as a target gene of hedgehog signaling. *Development*, 124(16), 3147–3156.
- Kühnlein, R. P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J. F., Schuh, R. (1994). spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *The EMBO Journal*, 13(1), 168–179.
- Lebrin, F., Chambaz, E. M., & Bianchini, L. (2001). A role for protein kinase CK2 in cell proliferation: Evidence using a kinase-inactive mutant of CK2 catalytic subunit α . *Oncogene*, 20(16), 2010–2022.
- Lertsuwan, J., Lertsuwan, K., Sawasdichai, A., Tasnawijitwong, N., Lee, K., Kitchen, P., Satayavivad, J. (2018). CX-4945 Induces Methuosis in Cholangiocarcinoma Cell Lines by a CK2-Independent Mechanism. *Cancers*, 10(9), 283.
- Li, C. M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. A., Wei, M., Thaker, H. M., Tycko, B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *American Journal of Pathology*, 160(6), 2181–2190.

- Li, D., Dower, K., Ma, Y., Tian, Y., & Benjamin, T. L. (2001). A tumor host range selection procedure identifies p150(sal2) as a target of polyoma virus large T antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14619–14624.
- Li, Dawei, Tian, Y., Ma, Y., & Benjamin, T. (2004). p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3885–3893.
- Liang, L., Qu, L., & Ding, Y. (2007). Protein and mRNA characterization in human colorectal carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Cancer Investigation*, 25(6), 427–434.
- Lin, K.-Y., Tai, C., Hsu, J.-C., Li, C.-F., Fang, C.-L., Lai, H.-C., Uen, Y.-H. (2011). Overexpression of Nuclear Protein Kinase CK2 α Catalytic Subunit (CK2 α) as a Poor Prognosticator in Human Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 6(2), e17193.
- Liu, H., Adler, A. S., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. *PLoS Genetics*, 3(6), 0996–1008.
- Llorens, F., Roher, N., Miró, F. A., Sarno, S., Ruiz, F. X., Meggio, F., Itarte, E. (2003). Eukaryotic translation-initiation factor eIF2 β binds to protein kinase CK2: Effects on CK2 α activity. *Biochemical Journal*, 375(3), 623–631.
- Lorente-Sorolla, J., Truchado-Garcia, M., Perry, K. J., Henry, J. Q., & Grande, C. (2018). Molecular, phylogenetic and developmental analyses of Sall proteins in bilaterians. *EvoDevo*, 9(1), 1–13.
- Luo, J., Wang, W., Tang, Y., Zhou, D., Gao, Y., Zhang, Q., Yu, J. (2017). mRNA and methylation profiling of radioresistant esophageal cancer cells: The involvement of Sall2 in acquired aggressive phenotypes. *Journal of Cancer*, 8(4), 646–656.
- Ma, C., Wang, F., Han, B., Zhong, X., Si, F., Ye, J., Peng, G. (2018). SALL1 functions as a tumor suppressor in breast cancer by regulating cancer cell senescence and metastasis through the NuRD complex. *Molecular Cancer*, 17(1), 1–21.
- Ma, Y., Li, D., Chai, L., Luciani, A. M., Ford, D., Morgan, J., & Maizel, A. L. (2001). Cloning and Characterization of Two Promoters for the Human HSAL2 Gene and Their Transcriptional Repression by the Wilms Tumor Suppressor Gene Product. 276(51), 48223–48230.
- Maltese, W. A., & Overmeyer, J. H. (2014). Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *American Journal of Pathology*, 184(6), 1630–1642.

- Maltese, W. A., & Overmeyer, J. H. (2015). Non-apoptotic cell death associated with perturbations of macropinocytosis. *Frontiers in Physiology*, 6(FEB), 1–10.
- Marschke, R. F., Borad, M. J., McFarland, R. W., Alvarez, R. H., Lim, J. K., Padgett, C. S., Northfelt, D. W. (2011). Findings from the phase I clinical trials of CX-4945, an orally available inhibitor of CK2. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15_suppl), 3087–3087.
- Miao, F., Zhang, X., Cao, Y., Wang, Y., & Zhang, X. (2017). Effect of siRNA-silencing of SALL2 gene on growth, migration and invasion of human ovarian carcinoma A2780 cells. *BMC Cancer*, 17(1), 838.
- Nicolè, L., Sanavia, T., Veronese, N., Cappellesso, R., Luchini, C., Dabrilii, P., & Fassina, A. (2017). Oncofetal gene SALL4 and prognosis in cancer: A systematic review with meta-analysis. *Oncotarget*, 8(14), 22968–22979.
- Niechi, I., Silva, E., Cabello, P., Huerta, H., Carrasco, V., Villar, P., Tapia, J. C. (2015). Colon cancer cell invasion is promoted by protein kinase CK2 through increase of endothelin-converting enzyme-1c protein stability. *Oncotarget*, 6(40), 42749–42760.
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., O'Connell, J. X., Gilks, C. B., Sorensen, P. H. B., Linn, S., Van de Rijn, M. (2003). Tissue microarray validation of epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *American Journal of Pathology*, 163(4), 1449–1456.
- Nuñez de Villavicencio-Diaz, T., Rabalski, A., & Litchfield, D. (2017). Protein Kinase CK2: Intricate Relationships within Regulatory Cellular Networks. *Pharmaceuticals*, 10(4), 27.
- Oikawa, T., Kamiya, A., Zeniya, M., Chikada, H., Hyuck, A. D., Yamazaki, Y., Nakauchi, H. (2013). Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. *Hepatology*, 57(4), 1469–1483.
- Ott, T., Kaestner, K. H., Monaghan, A. P., & Schütz, G. (1996). The mouse homolog of the region specific homeotic gene spalt of Drosophila is expressed in the developing nervous system and in mesoderm-derived structures. *Mechanisms of Development*, 56(1–2), 117–128.
- Overmeyer, J. H., Kaul, A., Johnson, E. E., & Maltese, W. A. (2008). Active Ras triggers death in glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis. *Molecular Cancer Research*, 6(6), 965–977.
- Pierre, F., Chua, P. C., O'Brien, S. E., Siddiqui-Jain, A., Bourbon, P., Haddach, M., Ryckman, D. M. (2011). Discovery and SAR of 5-(3-Chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic Acid (CX-4945), the First Clinical Stage Inhibitor of Protein Kinase CK2 for the Treatment of

- Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(2), 635–654.
- Pincheira, R., Baerwald, M., Dunbar, J. D., & Donner, D. B. (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO Journal*, 28(3), 261–273.
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. *Science*, 234(4774), 364–368.
- Scaglioni, P. P., Yung, T. M., Cai, L. F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A. J., Singh, B., Pandolfi, P. P. (2006). A CK2-Dependent Mechanism for Degradation of the PML Tumor Suppressor. *Cell*, 126(2), 269–283.
- Siddiqui-Jain, A., Drygin, D., Streiner, N., Chua, P., Pierre, F., O'Brien, S. E., Anderes, K. (2010). CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Research*, 70(24), 10288–10298.
- Silva-Pavez, E., Villar, P., Trigo, C., Caamaño, E., Niechi, I., Pérez, P., Tapia, J. C. (2019). CK2 inhibition with silmitasertib promotes methuosis-like cell death associated to catastrophic massive vacuolization of colorectal cancer cells. *Cell Death and Disease*, 10(2), 73.
- Sung, Chang K., Dahl, J., Yim, H., Rodig, S., & Benjamin, T. L. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150 Sal2. *The FASEB Journal*, 25(4), 1275–1283.
- Sung, Chang K., Li, D., Andrews, E., Drapkin, R., & Benjamin, T. (2013). Promoter methylation of the SALL2 tumor suppressor gene in ovarian cancers. *Molecular Oncology*, 7(3), 419–427.
- Sung, Chang K., & Yim, H. (2017). Roles of SALL2 in tumorigenesis. *Archives of Pharmacal Research*, 40(2), 146–151.
- Sung, Chang Kyoo, Yim, H., Gu, H., Li, D., Andrews, E., Duraisamy, S., Benjamin, T. (2012). The Polyoma Virus Large T Binding Protein p150 Is a Transcriptional Repressor of c-MYC. *PLoS ONE*, 7(9), 1–7.
- Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., Bernstein, B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580–594.
- Taylor, D. P., Burt, R. W., Williams, M. S., Haug, P. J., & Cannon-Albright, L. A. (2011). Population-based family-history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology*, 138(3), 877–885.
- Torres, J., & Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by

- the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 993–998.
- Trembley, J. H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., & Ahmed, K. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(11–12), 1858–1867.
- Wei, X., Zhang, S., Cao, D., Zhao, M., Zhang, Q., Zhao, J., Yang, X. (2015). Aberrant Hypermethylation of SALL3 with HPV Involvement Contributes to the Carcinogenesis of Cervical Cancer. *PLoS ONE*, 10(12), 145700.
- Welsh, G., Price, N., Bladergroen, B., Bloomberg, G., & Proud, C. (1994). Identification of novel phosphorylation sites in the b-subunit of translation initiation factor eIF-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(3), 1279–1288.
- Wolf, J., Müller-Decker, K., Flechtenmacher, C., Zhang, F., Shahmoradgoli, M., Mills, G. B., Boettcher, M. (2014). An in vivo RNAi screen identifies SALL1 as a tumor suppressor in human breast cancer with a role in CDH1 regulation. *Oncogene*, 33(33), 4273–4278.
- Wu, Z., Cheng, K., Shi, L., Li, Z., Negi, H., Gao, G., Li, D. (2015). Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element. *Cancer Science*, 106(3), 253–261.
- Ye, L., Lin, C., Wang, X., Li, Q., Li, Y., Wang, M., Song, L. (2019). Epigenetic silencing of SALL2 confers tamoxifen resistance in breast cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 11(12), e10638.
- Zanin, S., Borgo, C., Girardi, C., O'Brien, S. E., Miyata, Y., Pinna, L. A., Ruzzene, M. (2012). Effects of the CK2 Inhibitors CX-4945 and CX-5011 on Drug-Resistant Cells. *PLoS ONE*, 7(11), 49193.
- Zarate, A. J., Alonso, F. T., Garmendia, M. L., & López-Köstner, F. (2013). Increasing crude and adjusted mortality rates for colorectal cancer in a developing South American country. *Colorectal Disease*, 15(1), 47–51.
- Zhang, X., Yuan, X., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2015, February 1). SALL4: An emerging cancer biomarker and target. *Cancer Letters*, Vol. 357, pp. 55–62.
- Zou, J., Luo, H., Zeng, Q., Dong, Z., Wu, D., & Liu, L. (2011). Protein kinase CK2 α is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 97.