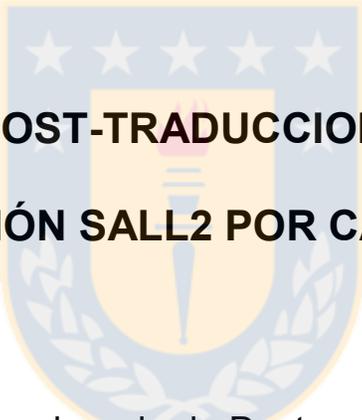




Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias  
Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular



# **REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SALL2 POR CASEINA QUINASA II**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

VIVIANA ESTEFANÍA HERMOSILLA AGUAYO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2017

Profesor Guía: Roxana Jacqueline Pincheira Barrera.  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular,  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

© 2017. Viviana Estefanía Herмосilla Aguayo.

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.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dra. Roxana Pincheira Barrera  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dr. Maximiliano Figueroa Yévenes.  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Andrew Quest  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Chile

---

Dr. Luis Aguayo Hernández  
Director (S)  
Programa Doctorado en Ciencias  
Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral contó con el apoyo de CONICYT mediante las siguientes Becas:

- Beca Doctorado, año 2012 a 2016 (incluye extensión), folio 21120760.
- Beca de Apoyo a la Realización de Tesis de Doctorado, año 2015-2016 folio 21120760.
- Beca de Apoyo Complementario de Asistencia a Eventos y cursos cortos, año 2012, folio 81120544.
- Beca de Apoyo complementario de Pasantías Doctorales en el Extranjero.

Esta Tesis Doctoral se realizó con el financiamiento de:

- Proyecto FONDECYT Regular 1151031, Investigador Principal: Dra. Roxana Pincheira Barrera.
- Proyecto FONDECYT Regular 1110821, Investigador Principal: Dra. Roxana Pincheira Barrera.
- Canadian Institutes of Health Research, CIHR, Investigador Principal: Dr. David Litchfield.
- Programa de Becas para Líderes Emergentes en las Américas (ELAP).
- Beca de estipendio y arancel para décimo semestre, otorgada por la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xxi
<b>ABSTRACT</b> .....	xxiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1.- Factores de Transcripción Spalt- <i>like</i> .....	2
1.2.- SALL2 .....	7
1.3.- SALL2: el gen y su expresión .....	8
1.4.- SALL2: blancos transcripcionales .....	10
1.4.1.- Blancos transcripcionales en proliferación celular .....	11
1.4.2.- Blancos transcripcionales involucrados en apoptosis .....	17
1.5.- SALL2 en Desarrollo .....	19
1.5.1.- SALL2 en Desarrollo del Sistema Nervioso .....	20
1.5.2.- SALL2 en el Desarrollo de otros Órganos .....	26
1.6.- SALL2 en Cáncer .....	28
1.6.1.- SALL2 como supresor tumoral .....	29
1.6.2.- SALL2 como oncogén .....	37
1.7.- SALL2: Regulación .....	40
1.7.1.- Proteínas interactoras y localización subcelular .....	41
1.7.2.- Regulación Transcripcional .....	45
1.7.3.- Regulación post-traducciona l .....	53
1.8.- Caseína Quinasa II (CK2) .....	60
<b>2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	69
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	71
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	72
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	72
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b> .....	73

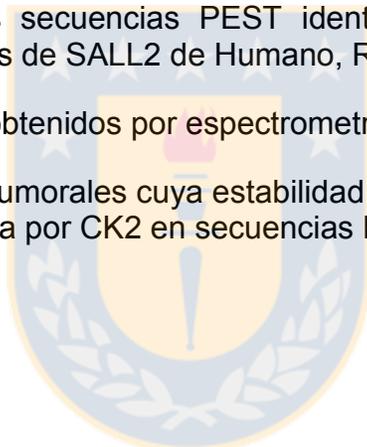
6.1.- Reactivos .....	73
6.2.- Cultivo Celular .....	73
6.3.- Plásmidos.....	75
6.4.- Transformación bacteriana y purificación de plásmidos.....	77
6.4.1.- Purificación de plásmidos a pequeña escala para identificación de colonias: .....	78
6.4.2.- Purificación de plásmidos a pequeña escala con Kit:.....	79
6.4.3.- Purificación plasmidial a gran escala .....	79
6.5.- Digestión de plásmidos .....	80
6.6.- Desfosforilación preparativa de vectores digeridos .....	81
6.7.- Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa .....	82
6.8.- Ligación de fragmentos de ADN .....	82
6.9.- Clonamiento y generación de constructos .....	83
6.9.1- pQE81-L/hSall2 FL-His .....	83
6.9.2.- pQE81-L/hSall2 C-ter-His.....	85
6.9.3.- pQE81-L/hSall2 PEST-His .....	86
6.9.4.- pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag: .....	89
6.10.- Mutación sitio-dirigida.....	92
6.11.- Secuenciación de plásmidos .....	99
6.12.- Lisis celular .....	99
6.13.- Cuantificación de proteínas totales .....	100
6.14.- Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	101
6.15.- Tinción de proteínas en gel .....	102
6.16.- <i>Western Blot</i> .....	102
6.17.- Transfección transiente .....	105
6.17.1.- Transfección por Fosfato de Calcio.....	105
6.17.2.- Transfección con lipofectamina .....	106
6.18.- Inmunofluorescencia .....	108
6.19.- Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	109
6.20.- <i>GST-Pulldown</i> .....	114
6.21.- Inmunoprecipitación .....	116

6.21.1.- Inmunoprecipitación para ensayos de interacción y ubiquitinación .....	116
6.21.2.- Inmunoprecipitación para ensayos de incorporación de [ $\gamma^{32}$ ]-ATP y espectrometría de masas .....	117
6.22.- Fosforilación <i>in vitro</i> .....	119
6.23.- Espectrometría de Masas .....	125
6.24.- Ensayos de estabilidad .....	126
6.25.- Análisis Bioinformáticos .....	126
6.26.- Análisis estadísticos .....	128
<b>7. RESULTADOS</b> .....	129
<b>7.1.- Objetivo específico I: Validar a SALL2 como sustrato de CK2.</b> ....	129
7.1.1.- La secuencia proteica de SALL2 contiene múltiples sitios putativos de fosforilación por CK2. ....	129
7.1.2.- SALL2 y CK2 interactúan de forma directa.....	141
7.1.3.- SALL2 es fosforilado por CK2 <i>in vitro</i> .....	144
7.1.4.- El extremo C-terminal de SALL2 es fosforilado de forma dependiente de CK2. ....	152
<b>7.2.- Objetivo específico II: Determinar la relevancia fisiológica de la fosforilación de SALL2 mediada por CK2.</b> .....	174
7.2.1.- La actividad de CK2 afecta negativamente la estabilidad de SALL2. ....	174
7.2.2.- La inhibición farmacológica de CK2 restituye a SALL2 en células H1299 de cáncer de pulmón. ....	183
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	190
8.1.- Objetivo específico I: Validar a SALL2 como sustrato de CK2.....	190
8.2.- Objetivo específico II: Determinar la relevancia fisiológica de la fosforilación de SALL2 mediada por CK2.....	206
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	227
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	228
<b>11. ANEXOS</b> .....	256
<b>Anexo 1.-</b> Partidores para mutagénesis sitio-dirigida. ....	256
<b>Anexo 2.-</b> Partidores para secuenciación de constructos generados. ....	258
<b>Anexo 3.-</b> Anticuerpos primarios usados para <i>western blot</i> .....	259

<b>Anexo 4.-</b> Anticuerpos secundarios usados para <i>western blot</i> . .....	261
<b>Anexo 5.-</b> Anticuerpos utilizados para Inmunofluorescencia. ....	262
<b>Anexo 6.-</b> Anticuerpo utilizados para Inmunoprecipitación. ....	263
<b>Anexo 7.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en S806, obtenido por fosforilación de $\Delta$ NSALL2-Flag <i>in vitro</i> , sin enzima (basal). ....	264
<b>Anexo 8.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en S802 y S806, obtenido por fosforilación de $\Delta$ NSALL2-Flag <i>in vitro</i> con CK2 $\alpha$ . ....	265
<b>Anexo 9.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en S763, obtenido de proteína $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO. ....	266
<b>Anexo 10.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en T778, obtenido de proteína $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO. ....	267
<b>Anexo 11.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en S802 y S806, obtenido de proteína $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO. ....	268
<b>Anexo 12.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en T467, obtenido de proteína $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO. ....	269
<b>Anexo 13.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en S806, obtenido de proteína $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con CX-4945. ....	270
<b>Anexo 14.-</b> Espectro de péptido con fosforilación en T467, obtenido de proteína $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con CX-4945. ....	271
<b>Anexo 15.-</b> Espectros de péptidos fosforilados en S802 y S806, obtenidos desde proteína $\Delta$ NSALL2-Flag, fragmentados por disociación por colisión de alta energía (HCD). ....	272
<b>Anexo 16.-</b> Espectros de péptidos fosforilados en S585 y T880, obtenidos desde proteína $\Delta$ NSALL2-Flag, fragmentados por disociación por colisión de alta energía (HCD). ....	273
<b>Anexo 17.-</b> Identificación de sitios putativos de ubiquitinación cercanos a secuencia PEST carboxilo terminal. ....	274
<b>Anexo 18.-</b> Mutaciones reportadas en SALL2 en algunos tipos de cáncer, y que generan sustituciones de aminoácidos cercanos a sitios de fosforilación dependiente de CK2. ....	276

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Tumores que presentan pérdida de heterocigocidad (LOH) en región cromosomal 14q donde se ubica el gen de SALL2.....	34
<b>Tabla 2.-</b> Estímulos y potenciales reguladores de la expresión de SALL2. ....	50
<b>Tabla 3.-</b> Plásmidos.....	77
<b>Tabla 4.-</b> Sitios putativos de fosforilación identificados en las secuencias de SALL2 de Humano, Ratón y Rata.....	132
<b>Tabla 5.-</b> Potenciales secuencias PEST identificadas con epestfind en las secuencias proteicas de SALL2 de Humano, Ratón y Rata.....	136
<b>Tabla 6.-</b> Resultados obtenidos por espectrometría de masas.....	169
<b>Tabla 7.-</b> Supresores tumorales cuya estabilidad es regulada negativamente por fosforilación mediada por CK2 en secuencias PEST.....	213



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Representación esquemática de las principales regiones conservadas en proteínas Spalt-like. ....	5
<b>Figura 2.-</b> Análisis filogenético de proteínas Spalt-like. ....	6
<b>Figura 3.-</b> Representación esquemática de exones y promotores alternativos de gen SALL2. ....	9
<b>Figura 4.-</b> Blancos transcripcionales de SALL2 en G1-S. ....	16
<b>Figura 5.-</b> Rol de SALL2 en el desarrollo de Sistema Nervioso. ....	24
<b>Figura 6.-</b> SALL2 contiene sitios putativos para fosforilación mediada por CK2. ....	59
<b>Figura 7.-</b> Estructura de holoenzima Caseina Kinasa II. ....	61
<b>Figura 8.-</b> Esquema de propuesta de regulación post-traducciona l de SALL2 mediada por CK2. ....	70
<b>Figura 9.-</b> Proteínas recombinantes con epít ope de histidina, generadas a partir de constructos pQE81-L/ hSall2 FL-His, pQE81-L/hSall2 C-ter-His o pQE81-L/hSall2 PEST-His. ....	87
<b>Figura 10.-</b> Generación de los constructos pQE81-L/ hSall2 FL-His, pQE81-L/hSall2 C-ter- His o pQE81-L/hSall2 PEST-His. ....	88
<b>Figura 11.-</b> Generación de constructo pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag. ....	91
<b>Figura 12.-</b> Estrategia para mutagénesis sitio dirigida. ....	96
<b>Figura 13.-</b> Obtención de mutantes no fosforilables de SALL2. ....	97
<b>Figura 14.-</b> Obtención de mutante fosfomimética de SALL2. ....	98
<b>Figura 15.-</b> Inducción de expresión de las proteínas recombinantes hSALL2 FL-His, hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His. ....	112
<b>Figura 16.-</b> Purificación de las proteínas recombinantes hSALL2 FL-His, hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His. ....	113

<b>Figura 17.-</b> Determinación de actividad específica de CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2 y CK2 $\alpha'$ 2 $\beta$ 2 recombinantes.....	124
<b>Figura 18.-</b> Identificación de potenciales secuencias de degradación PEST y sitios de fosforilación mediada por GSK-3 y CK2. ....	137
<b>Figura 19.-</b> Sitios putativos para fosforilación mediada por CK2 y potencial secuencia PEST en extremo carboxilo terminal de SALL2. ....	140
<b>Figura 20.-</b> SALL2 y CK2 interaccionan en células HEK 293.....	143
<b>Figura 21.-</b> Estandarización de transfección de pCMV2(NH)/Sall2-Flag y de inmunoprecipitación de SALL2-Flag con anticuerpo anti-Flag.....	148
<b>Figura 22.-</b> SALL2 es fosforilado por CK2 <i>in vitro</i> .....	149
<b>Figura 23.-</b> Cuantificación de la cantidad de proteína inmunoprecipitada para ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .....	151
<b>Figura 24.-</b> Estandarización de transfección de pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag para espectrometría de masas.....	154
<b>Figura 25.-</b> Comparación de niveles de proteína SALL2-Flag versus $\Delta$ NSALL2-Flag obtenidas por inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag.....	155
<b>Figura 26.-</b> Fosforilación <i>in vitro</i> de $\Delta$ NSALL2-Flag por CK2 recombinante ....	158
<b>Figura 27.-</b> Localización subcelular de SALL2-Flag y $\Delta$ NSALL2-Flag. ....	160
<b>Figura 28.-</b> Estandarización de concentración y tiempo de tratamiento de CX-4945 en células U2OS.....	163
<b>Figura 29.-</b> Preparación de muestras para espectrometría de masas. ....	168
<b>Figura 30.-</b> Resultados obtenidos por espectrometría de masas.....	170
<b>Figura 31.-</b> Fosforilación <i>in vitro</i> de mutantes SALL2-Flag S802A y S806A. ....	172
<b>Figura 32.-</b> La inhibición farmacológica de CK2 promueve un aumento de los niveles proteicos de SALL2 en células HEK 293. ....	176
<b>Figura 33.-</b> La forma dominante negativa de CK2 $\alpha$ aumenta la estabilidad de la proteína SALL2-Flag.....	180
<b>Figura 34.-</b> La actividad de CK2 promueve la ubiquitinación y degradación proteosomal de SALL2 en células HEK 293. ....	181

**Figura 35.-** La inhibición farmacológica de CK2 restituye a SALL2 en la línea celular de cáncer de pulmón H1299..... 186

**Figura 36.-** Mutante no fosforilable de SALL2 presenta mayor estabilidad que su contraparte *wild type*..... 188

**Figura 37.-** Mutaciones en sitios fosfoaceptores de SALL2 no alteran la localización nuclear de la proteína. .... 189

**Figura 38.-** Modelo propuesto para la regulación de SALL2 dependiente de CK2..... 212

**Figura 39.-** Modelo de acción de la terapia combinada con CX-4945 y Cisplatino o Gemcitabina.. .... 222

**Figura 40.-** Residuos cercanos a sitios de fosforilación dependiente de CK2 pueden encontrarse mutados en algunos tipos de cáncer..... 224



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN copia.

**AML:** *Acute Myeloid Leukemia* (Leucemia Mieloide Aguda).

**ANOVA:** *Analysis of Variance* (Análisis de Varianza).

**AP4:** *Activating Enhancer-Binding Protein 4.*

**APAF:** *Apoptotic Protease-Activating Factor-1.*

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNc:** ARN copia.

**ARNt:** ARN de transferencia.

**ATP:** Adenosina trifosfato.

**B-ALL:** *B-cell Acute Lymphocytic Leukemia* (Leucemia Linfocítica Aguda de células B).

**BAX:** *BCL2 Associated X Protein.*

**BCL-2:** *B-cell lymphoma-2.*

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino.

**CAD/CID:** Disociación Activada/Inducida por Colisión.

**CDC25A:** *Cell Division Cycle 25A.*

**CDK:** *Cyclin-dependent Kinase* (Quinasa dependiente de Ciclina).

**CDKN2A:** *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A.*

**CDKN1A:** *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A.*

**ChIP:** Inmunoprecipitación de Cromatina.

**CHX:** Cicloheximida.

**CK1:** *Casein Kinase I* (Caseína Quinasa I)

**CK2:** *Casein Kinase II* (Caseína Quinasa II).

**CMV:** Citomegalovirus.

**COL4A3:** Colágeno Tipo IV, Cadena  $\alpha$ 3.

**COSMIC:** *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer).

**CRLs:** *Cullin-RING ligases*.

**CSNK2A1:** *Casein Kinase 2 alpha 1*.

**CUL4B:** Culina 4B.

**DDB1:** *Damage Specific DNA Binding Protein 1* (Proteína de unión a DNA dañado 1).

**DMEM:** *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**Dnmt3A/B:** ADN Metiltransferasa 3A/B.

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato.

**d.p.c.:** días post coito.

**DRRS:** *Duane Radial Ray Syndrome*.

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético.

**eEF1 $\delta$ :** *Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta* (Factor de Elongación Eucariótico 1, subunidad delta).

**EGF:** *Epidermal Growth Factor* (Factor de crecimiento Epidermal).

**EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal.

**eIF2 $\beta$ :** *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Beta* (Factor de Iniciación Eucariótico 2, subunidad beta).

**EMSA:** *Electrophoretic Mobility Shift Assay*.

**ERK1/2:** *Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2*.

**ESCC:** *Esophageal Squamous Cell Carcinoma* (Carcinoma Esofágico de Células Escamosas).

**ESCs:** *Embryonic Stem Cells* (Células Madre Embrionarias).

**ESI:** Ionización por Electrospray.

**EVI-1:** *Ecotropic Viral Integration Site-1*.

**FBS:** Suero Bovino Fetal.

**FDR:** *False Discovery Rate*.

**G1:** *Gap 1*.

**G2:** *Gap 2*.

**GAPDH:** *Glyceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa*.

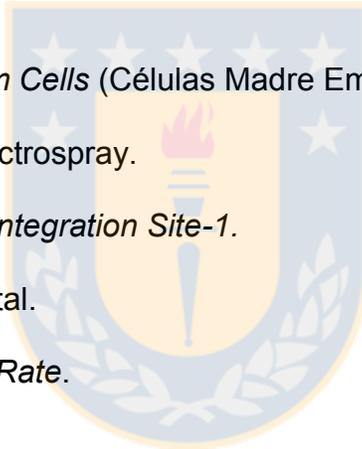
**GBM:** Glioblastoma.

**GEF:** *Guanine Nucleotide Exchange Factor* (Factor Intercambiador de Nucleótido de Guanina).

**GEO:** *Gene Expression Omnibus*.

**GSK-3:** *Glycogen Synthase Kinase 3* (Glucógeno Sintasa Quinasa 3).

**GST:** *Glutathión S-Transferasa*.



**GTP:** Guanosina Trifosfato.

**HA:** Epítotope de Hemaglutinina, derivado de virus de la influenza humana.

**HBS:** Tampón HEPES Salino.

**HCD:** *High-energy Collision Dissociation* (Disociación por Colisión de Alta Energía).

**HECT:** *Homologous to E6-AP Carboxy Terminus*.

**HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico.

**hESCs:** *human Embryonic Stem Cells* (Células Madre Embrionarias humanas).

**HIF-1 $\alpha$ :** Factor Inducible por Hipoxia 1, subunidad alfa.

**HNSCC:** *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* (Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello).

**HPRD:** *Human Protein Reference Database*.

**HRP:** Peroxidasa de Rábano.

**HPV16:** Virus de Papiloma Humano tipo 16.

**HSCs:** *Hematopoietic Stem Cells* (Células Madre Hematopoyéticas).

**I $\kappa$ B $\alpha$ :** *NF- $\kappa$ B Inhibitor  $\alpha$*  (Inhibidor  $\alpha$  de NF- $\kappa$ B).

**IKK:** *Inhibitor of Nuclear Factor kappa-B (I $\kappa$ B) Kinase Complex* (Complejo Quinasa del inhibidor del Factor Nuclear kappa B).

**IKZF1:** *IKAROS Family Zinc Finger 1*.

**IMAC:** Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.

**IP:** Inmunoprecipitación.

**IPSCs:** *Induced Pluripotent Stem Cells* (Células Madre Pluripotentes Inducidas).

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

**IRF-3:** *Interferon Regulatory Factor 3*.

**Ki:** Constante de Inhibición (Constante de disociación de complejo enzima-inhibidor).

**LB:** *Luria Broth*.

**LOH:** *Loss of Heterozygosity* (Pérdida de Heterocigocidad).

**MALDI:** *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*.

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*.

**MCL-1:** *Myeloid Cell Factor 1*.

**MDC1:** *Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*.

**MEFs:** *Mouse Embryonic Fibroblasts* (Fibroblastos Embrionarios de Ratón).

**mESCs:** *mouse Embryonic Stem Cells* (Células Madre Embrionarias de ratón).

**MOPS:** Acido 3-n-morfolino-propanosulfonico.

**MYH9:** *Myosin Heavy Chain 9* (Cadena Pesada de la Miosina 9)

**MWCO:** *Molecular Weight Cut-Off*.

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*.

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear Factor Kappa B*.

**NGF:** *Nerve Growth Factor* (Factor de Crecimiento Nervioso).

**NLS:** *Nuclear Localization Signal* (Señal de Localización Nuclear).

**NSCLC:** *Non-Small Cell Lung Cancer* (Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas).

**NuRD:** *Nucleosome Remodeling Deacetylase*.

**OCT-4:** *Octamer-Binding Transcription Factor 4.*

**OCT-7:** *Octamer-Binding Transcription Factor 7.*

**OMIM:** *Online Mendelian Inheritance in Man.*

**p75NTR:** *p75 Neurotrophin Receptor.*

**PARP:** Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1.

**PBS:** Tampón Fosfato Salino.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PEG:** Polietilenglicol.

**PFA:** Paraformaldehído.

**PKA:** Proteína Quinasa A.

**PKC:** Proteína Quinasa C.

**PMAIP1:** *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1.*

**PML:** *Promyelocytic Leukemia* (Leucemia Promielocítica).

**PMSF:** Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.

**PVDF:** Fluoruro de Polivinidileno.

**RAR $\alpha$ :** Receptor de Ácido Retinoico alfa.

**RBBP7:** *Retinoblastoma Binding Protein 7* (Proteína de unión a Retinoblastoma 7).

**RCF:** Fuerza centrífuga relativa.

**RING:** *Really Interesting New Gene.*

**ROCK II:** *Rho-Kinase II.*

**RPM:** Revoluciones por Minuto.

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute.*

**RT:** Transcripción Reversa.

**SALL:** *Spalt-like.*

**SCID:** *Severe Combined Immunodeficiency* (Inmunodeficiencia Combinada Severa).

**SCLC:** *Small Cell Lung Cancer* (Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas).

**SDS:** Dodecilsulfato de Sodio.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones denaturantes.

**SEM:** Error Estándar de la Media.

**SOX2:** *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2.*

**Sp1:** *Specificity protein 1.*

**SSB:** *Single-strand Breaks.*

**SV40:** *Simian Virus 40.*

**TAE:** Tris-Ácido acético-EDTA.

**TAL-1:** *T-cell Acute Lymphocytic Leukemia 1.*

**TBB:** 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol.

**TBS:** Tampón Tris Salino

**TBS:** *Townes- Brock Syndrome.*

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

**TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ .

**TK1:** *Thymidine Kinase 1* (Timidina Quinasa 1).

**TLB:** Tampón de Lisis Tris.

**TMP:** Timidina Monofosfato.

**TMZ:** Temozolomida.

**TNF $\alpha$ :** *Tumor Necrosis Factor alpha.*

**TPCs:** *Tumor Propagating Cells.*

**TR $\alpha$ 1- $\beta$ 1:** Receptor de Hormona Tiroidea  $\alpha$ 1 o  $\beta$ 1.

**TRAIL:** *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.*

**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano.

**TrkA:** *Tropomyosin Kinase Receptor A.*

**TSA:** Tricostatina A.

**TTP:** Timidina Trifosfato.

**UV:** Ultravioleta.

**VHL:** *Von Hippel-Lindau.*

**VPA:** Ácido Valproico.

**WT1:** *Wilms Tumor 1.*

**XRCC1:** *X-Ray Repair Cross Complementing 1.*



## RESUMEN

Las proteínas *Spalt-like* son factores de transcripción con funciones críticas durante el desarrollo. En vertebrados se han identificado cuatro parálogos (SALL1-4), de los cuales SALL2 es el miembro más distante de la familia. SALL2 es requerido para el desarrollo cerebral y ocular, y es el único miembro que ha sido descrito como supresor tumoral. SALL2 promueve el arresto del ciclo celular y la apoptosis, y su expresión se encuentra disminuída en algunos tipos de cáncer. A pesar de lo anteriormente señalado, existe escasa información sobre la regulación de SALL2. Resultados de análisis masivos públicamente disponibles indican que SALL2 se encuentra ubiquitinada y fosforilada en varios residuos distribuidos a lo largo de su secuencia. Sin embargo, los mecanismos y las enzimas involucradas en estas modificaciones no han sido identificadas a la fecha. Análisis bioinformáticos preliminares a esta tesis llevaron a la identificación de varios sitios putativos de fosforilación para la quinasa CK2 (Caseína Quinasa II). Estos sitios se localizan en una potencial secuencia de degradación PEST C-terminal de SALL2, la cual se encuentra altamente conservada.

CK2 es una serina/treonina quinasa que promueve la proliferación y sobrevivencia celular, y cuya actividad se encuentra elevada en cáncer. Con el objetivo de definir si SALL2 es regulado por CK2, se utilizaron diversas

aproximaciones experimentales como inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, fosforilación *in vitro*, espectrometría de masas y mutagénesis sitio-dirigida.

Nuestros resultados demuestran que SALL2 es un sustrato de CK2 *in vitro* y es fosforilado de forma dependiente de CK2 en los residuos S763, T778, S802 y S806 en células en cultivo. La actividad de CK2 gatilla la ubiquitinación de SALL2, disminuyendo su estabilidad por degradación proteosomal. De forma consistente, la mutante no fosforilable de SALL2 es más estable que su contraparte *wild type*, tanto en condiciones basales como al salir de mitosis, sugiriendo que SALL2 es regulada por CK2 durante el ciclo celular. La inhibición farmacológica de CK2 restituye los niveles endógenos de SALL2 en la línea celular de cáncer de pulmón deficiente de SALL2, H1299, respaldando el uso de inhibidores de CK2 como terapia en cáncer. Los resultados obtenidos permiten proponer un modelo de regulación en el que la fosforilación mediada por CK2 promueve la ubiquitinación y posterior degradación proteosomal de SALL2.

En conclusión, la proteína SALL2 ha sido validada como un nuevo sustrato de CK2. Nuestros resultados identifican un nuevo mecanismo de regulación de SALL2 mediado por CK2, proporcionando evidencias sobre la relación entre ambas proteínas y su función en sobrevivencia y proliferación.

## ABSTRACT

Spalt-like proteins are Zinc finger transcription factors present from *C. elegans* to vertebrates, with critical roles in development. In vertebrates, four paralogues have been identified (SALL1-4), being SALL2 the most dissimilar member of the family. SALL2 is required during brain and eye development. Importantly, SALL2 is the only member of the family that has been proposed as a tumor suppressor. Accordingly, SALL2 promotes cell cycle arrest and cell death, and is downregulated in certain types of cancer. Despite the aforementioned, there is scarce information about SALL2 regulation. In this regard, available public data indicates that SALL2 is ubiquitinated and phosphorylated in several residues along the protein. The mechanisms and enzymes responsible for these modifications remain unknown.

Preliminary bioinformatic analyses led to the identification of several putative phosphorylation sites corresponding to the CK2 (Casein Kinase II) consensus sequence. These sites are located within a potential and highly conserved C-terminal PEST degradation motif.

CK2 is a serine/threonine kinase that promotes cell proliferation and survival, and is hyperactivated in cancer. Aiming to determine whether SALL2 is regulated by CK2, experimental approaches such as immunofluorescence,

immunoprecipitation, mass spectrometry and site directed mutagenesis were used.

Our results indicate that SALL2 is a CK2 substrate *in vivo*. Residues S763, T778, S802 and S806 were phosphorylated in a CK2-dependent manner in cultured cells. CK2 activity promoted ubiquitination of SALL2, decreasing its stability in a proteasome-mediated fashion. Non-phosphorylatable SALL2 mutant protein exhibited increased stability not only in basal conditions but also at the exit of mitosis, suggesting that SALL2 is regulated by CK2 during cell cycle. Pharmacological inhibition of CK2 restored endogenous SALL2 protein levels in H1299 SALL2-deficient cancer cells, supporting the use of CK2 inhibitors for cancer treatment. We proposed a model in which CK2 phosphorylation triggers SALL2 ubiquitination and its subsequent proteasome-mediated degradation.

In conclusion, we have validated SALL2 as a new CK2 substrate. Our data support a novel CK2-dependent mechanism for SALL2 regulation, and provide new insights for the interplay between these two proteins and their role in cell survival and proliferation.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los diferentes tipos celulares que conforman un organismo, se encuentran diseñados para ejecutar roles específicos que contribuyen al correcto funcionamiento del mismo. Cada una de las células contiene la misma cantidad de genes, sin embargo, la diversidad celular se alcanza a través de la expresión y regulación altamente controlada de genes específicos en cada tipo celular.

La regulación de la expresión de estos productos génicos puede ocurrir en distintas etapas en el proceso desde ADN a proteína: a nivel de transcripción, estabilidad y exporte del ARN mensajero, a nivel de traducción, modificaciones post-traduccionales, plegamiento de la proteína, etc. Sin embargo, para la mayoría de los genes, el principal punto de regulación es transcripcional (Wright y Hastie, 2007).

Las vías de control de expresión génica comienzan con una señal inicial, ya sea de estimulación hormonal, diferenciación, factores de crecimiento, etc., la cual gatilla la expresión y/o activación de factores de transcripción específicos. Estos factores de transcripción reconocen secuencias específicas de ADN en las regiones promotoras de determinados genes. Una vez unidos, promueven o restringen el acceso a la cromatina por parte de la maquinaria

transcripcional. De este modo, las células puedan responder correctamente a distintos contextos fisiológicos y ambientales. (Wright y Hastie, 2007).

### 1.1.- Factores de Transcripción Spalt-like

Los miembros de la familia Spalt-like son factores de transcripción específicos que se encuentran conservados desde *Caenorhabditis elegans* a vertebrados. En este último caso, la familia se compone de cuatro miembros, denominados *Sall1*, 2, 3 y 4 (de Celis y Barrio, 2009).

El genoma de *Drosophila* codifica dos parálogos: *spalt major (salm)* y *spalt-related (salr)*, los cuales participan en la especificación y/o diferenciación de segmentos antero-posteriores (Jürgens, 1988; Wagner-Bernholz y col., 1991), sistema nervioso (Cantera y col., 2002), sistema traqueal (Kühnlein y col., 1996), patrón de la formación de las alas (de Celis y col., 1996), fibras musculares (Schönbauer y col., 2011), oenocitos (Elstob y col., 2001; Rusten y col., 2001) y fotoreceptores (Domingos y col., 2004; Mollereau y col., 2001). El genoma de *C. elegans*, codifica para un solo miembro, *sem-4* (Desai y col., 1988). Al igual que los ortólogos de *Drosophila*, *sem-4* participa en la determinación de distintos tipos celulares, incluyendo células neuronales, mesodermales y de la vulva (Basson y Horvitz, 1996; Grant y col., 2000). Del mismo modo, los homólogos presentes en vertebrados desempeñan un rol fundamental durante el desarrollo en una variedad de procesos que incluyen

organogénesis, formación de extremidades y destino celular durante el desarrollo neural (Sweetman y Munsterberg, 2006). Mutaciones en los genes que codifican estos factores de transcripción se relacionan con la presencia de síndromes autosómicos dominantes congénitos que afectan el desarrollo de las extremidades, oído, riñón y corazón, como lo son el síndrome de Townes-Brock (TBS, OMIM 107480), asociado a mutaciones en *SALL1* (Kohlhase, 2000), y los síndromes de Okihira (OMIM 607323) -también conocido como *Duane Radial Ray Syndrome* (DRRS)- y el síndrome de IVIC (OMIM 147750), ambos asociados a mutaciones en el gen *SALL4* (Borozdin y col., 2004; Paradisi y Arias, 2007). Adicionalmente, se ha propuesto que *SALL3*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q.23), podría ser uno de los genes deletados en el síndrome de delección del cromosoma 18 (OMIM 601808), caracterizado por retardo mental, baja estatura, hipotonía, sordera y malformaciones de extremidades y boca (Kohlhase y col., 1999). Mutaciones en *SALL2* han sido relacionadas con coloboma ocular recesivo (OMIM 216820), caracterizado por un cierre aberrante de la fisura óptica (Kelberman y col., 2014).

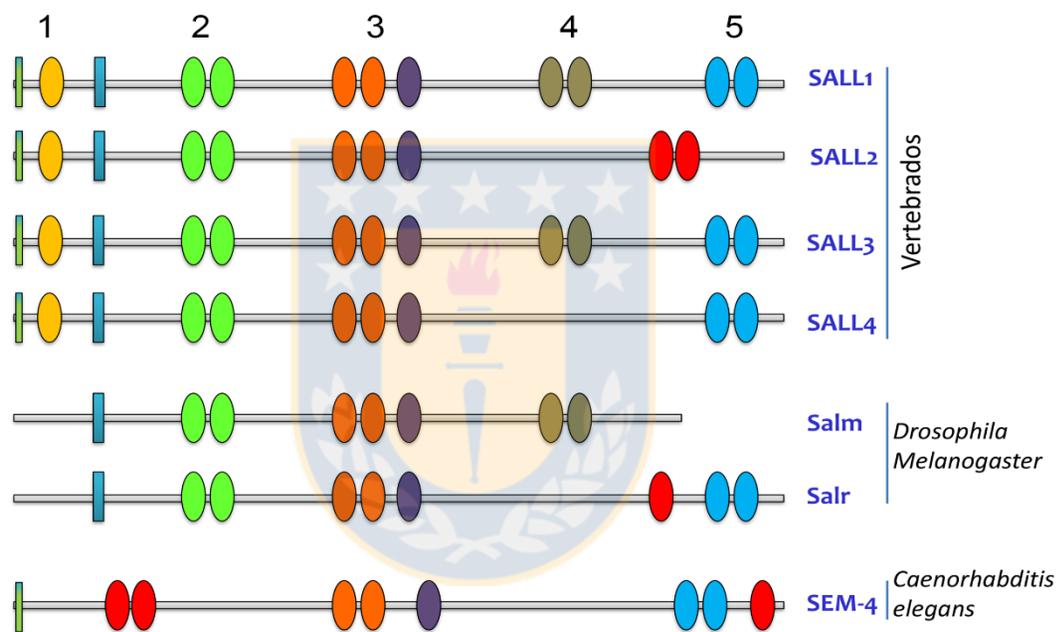
Con un tamaño que varía entre los 105 y 140 kDa., los miembros de la familia Spalt-*like* se caracterizan por poseer múltiples dedos de Zinc distribuidos a lo largo de su secuencia (Figura 1). El primer motivo, en el extremo amino terminal, corresponde a la clase de dedos de Zinc C2HC (InterPro IPR002515) y sólo se encuentra presente en vertebrados. El resto de los motivos de dedos

de Zinc corresponden al tipo C2H2 (IntePro IPR013087). Los motivos C2H2 se agrupan en pares, excepto el segundo par C2H2, que contiene un dedo de Zinc adicional (de Celis y Barrio, 2009). El segundo dedo de Zinc de cada par C2H2 contiene un motivo característico de 8 residuos, conocido como "*Sall-box*" (Kuhnlein y col., 1994). Los cuatro parálogos en vertebrados difieren en cuanto a la distribución de los dedos de zinc, siendo SALL2 el miembro más distante de la familia (Figura 2; (de Celis y Barrio, 2009)).

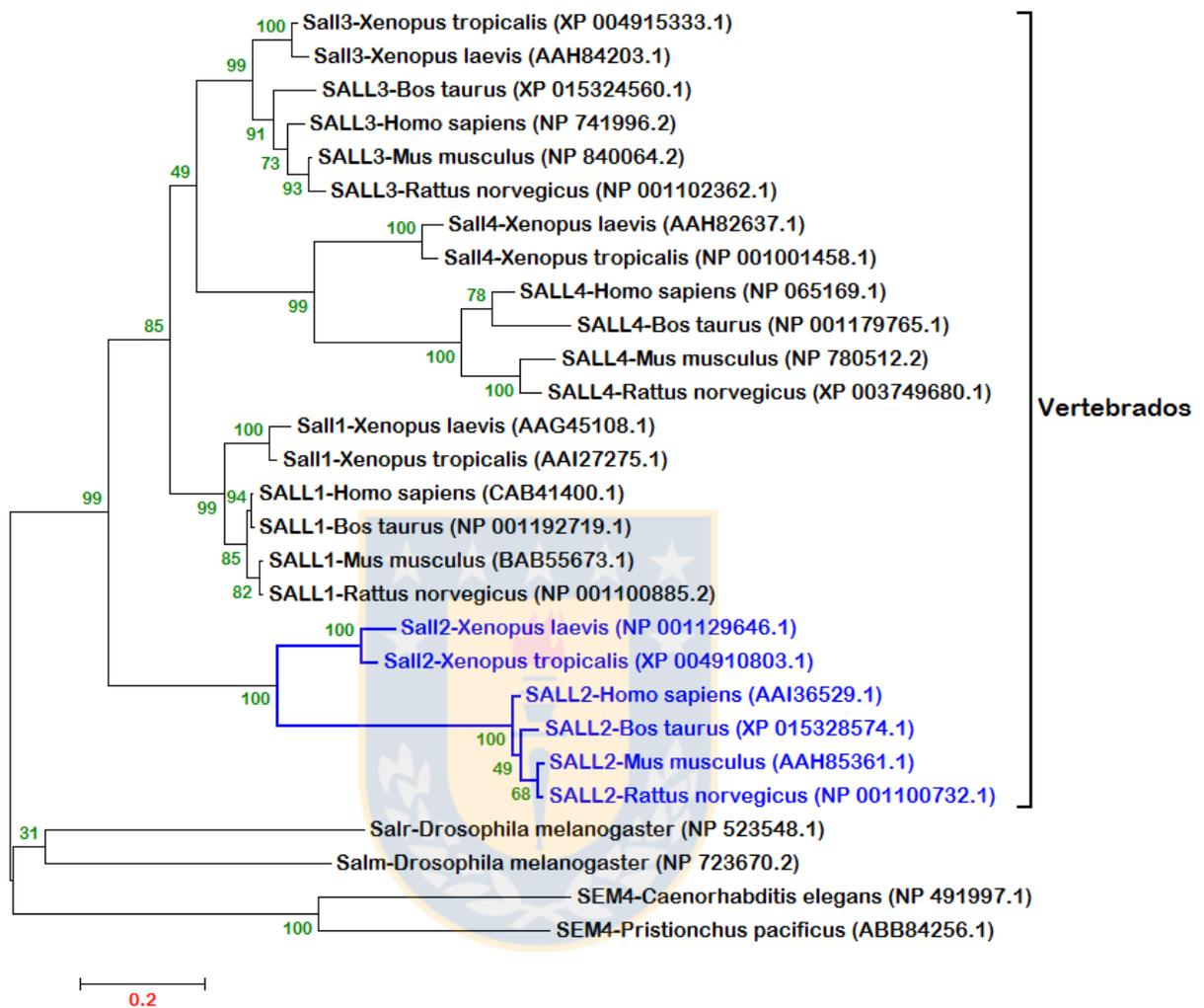
Otra característica de las proteínas *Spalt-like* es la presencia de una región rica en glutamina o Poli-Q, la que es necesaria para mediar la interacción entre CSALL1 y CSALL3 de pollo (Sweetman y col., 2003), sugiriendo que esta región podría participar en otras interacciones proteína-proteína. Si bien la interacción entre parálogos ha sido descrita por varios autores (van den Berg y col., 2010; Kiefer y col., 2003; Parrish y col., 2004; Sakaki-Yumoto y col., 2006), se desconoce si todas estas interacciones ocurren a través de la región poli-Q. Adicionalmente, los miembros de esta familia de proteínas contienen regiones ricas en residuos ácidos y serina (Kuhnlein y col., 1994).

En el extremo amino terminal, entre los residuos 2-8 de las proteínas de vertebrados y *C. elegans*, se encuentra un motivo conservado capaz de unir al complejo represor NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*), necesario para la actividad represora de SALL1 (Lauberth y Rauchman, 2006). El complejo represor NuRD, con actividad remodeladora de cromatina

dependiente de ATP y actividad histona-deacetilasa, ha sido relacionado con procesos del desarrollo en diferentes organismos (McDonel y col., 2009; Torchy y col., 2015).



**Figura 1.- Representación esquemática de las principales regiones conservadas en proteínas Spalt-like.** Los óvalos coloreados enumerados de 1 a 5, corresponden a motivos de dedos de Zinc en homólogos de *C. elegans* (SEM-4), *D. melanogaster* (Salm: “Spalt major” y Salr: “Spalt-related”) y los cuatro parálogos presentes en vertebrados (SALL1-4). El rectángulo verde del extremo amino terminal corresponde al dominio represor, de interacción con el complejo NuRD. Los rectángulos celestes representan regiones ricas en glutamina (poli-Q). Fuente: modificado por Marcela Morales desde de Celis y Barrio, 2009.



**Figura 2.- Análisis filogenético de proteínas Spalt-like.** Se alinearon 28 secuencias proteicas cuyos números de acceso se indican entre paréntesis, utilizando el algoritmo de MUSCLE (Edgar, 2004). El análisis evolutivo se realizó utilizando el método de máxima verosimilitud, con una matriz de distancia basada en el modelo de sustitución de aminoácidos de JTT (Jones, Taylor y Thornton (Jones y col., 1992)) en el programa Mega7 (Kumar y col., 2016). Se muestra el árbol que mejor se ajusta a los datos obtenidos de un total de 1000 réplicas (1000 bootstrap (Felsenstein, 1985)). En verde se indica el porcentaje de árboles en los cuales los taxones se agruparon juntos. El largo de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. En azul se destaca el clado de SALL2. Fuente: modificado desde Hermosilla y col., 2017a.

## 1.2.- SALL2

Como se mencionó anteriormente, SALL2 es el miembro más distante de la familia Spalt-*like*, lo cual se confirmó mediante análisis filogenéticos de las secuencias proteicas de todos los miembros de la familia, identificados en distintas especies (Figura 2; (Hermosilla y col., 2017a)). Los motivos de dedos de Zinc del extremo carboxilo terminal de SALL2 comparten poca similitud con los de otras proteínas Spalt y carecen de la distintiva "*Sall-box*", presente en el segundo dedo de Zinc de cada par (Kohlhase y col., 2000; Sánchez y col., 2011; Sweetman y Munsterberg, 2006). Se ha descrito que este par de dedos de Zinc en SALL2 es necesario para la transactivación del promotor del gen *CDKN1A* (Li y col., 2004), el cual codifica para el inhibidor de complejos Ciclina-CDK de fase G1-S, p21 (Harper y col., 1993; Xiong y col., 1993). Como se discutirá más adelante, también a través de este par de dedos de Zinc, SALL2 interacciona con el antígeno T-largo del virus oncogénico poliomavirus, como requisito para que ocurra la replicación del ADN viral (Li y col., 2001).

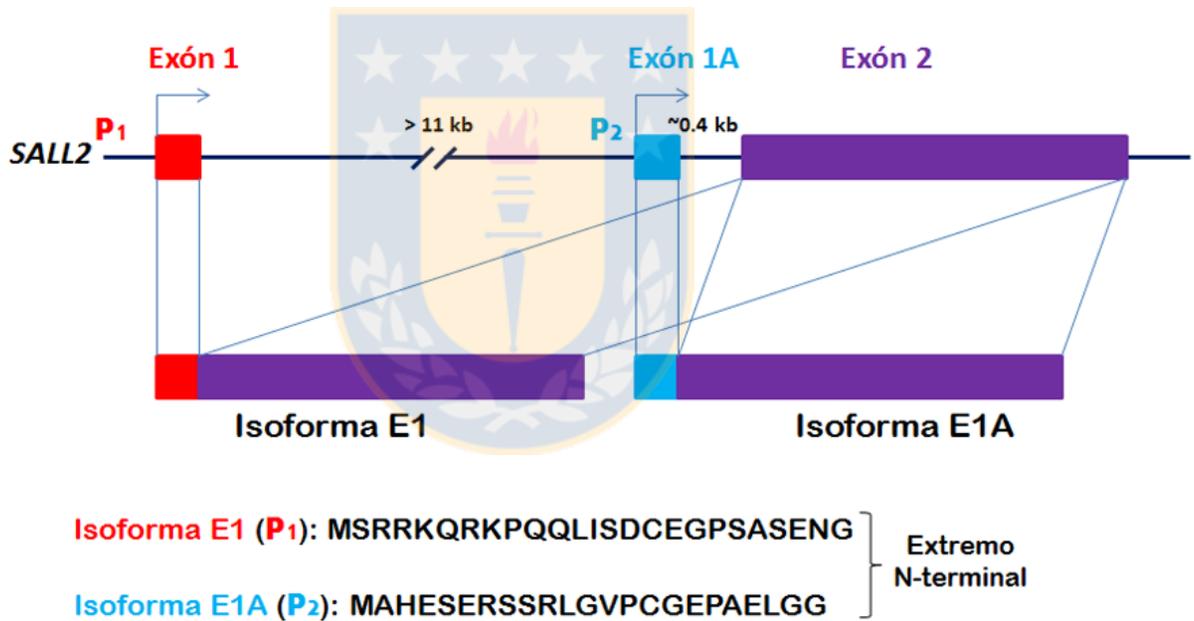
Interesantemente, SALL2 es el único miembro de la familia que se ha sugerido como supresor tumoral (de Celis y Barrio, 2009). Sin embargo, aún se encuentra pobremente caracterizado.

### 1.3.- SALL2: el gen y su expresión

*SALL2* se expresa mayormente en cerebro y en menor medida en riñón, pulmón, ovario, testículos y timo en humanos y ratones adultos (Kohlhase y col., 1996, 2000; Li y col., 2001; Ma y col., 2001). Durante el desarrollo embrionario en ratón, *Sall2* ha sido detectado a nivel de neuroectodermo -que dará lugar al tubo neural- desde estadio E7.5 (edad gestacional correspondiente a 7.5 días post coito o d.p.c.), en la cabeza (E8.5) y más tardíamente en vesícula óptica (E9.5), plácoda del cristalino del ojo (E10.5), médula espinal, copas ópticas (E11.5) y riñón (E13.5) (Böhm y col., 2008).

El gen *SALL2* en humanos se encuentra localizado en el cromosoma 14q11.1-q12.1, y en una región sinténica del cromosoma 14 en ratón (Kohlhase y col., 1996, 2000). El transcrito maduro se compone del empalme de dos exones, siendo el segundo exón el que codifica para todos los dedos de Zinc presentes en la proteína (Kohlhase y col., 1996, 2000). En humanos se han identificado dos promotores, P1 y P2, separados entre sí por 11 kb. Estos promotores dan lugar a dos isoformas, E1 y E1A, respectivamente, las que difieren sólo en el primer exón (Figura 2) y, en consecuencia, codifican para proteínas que difieren en la composición y número de aminoácidos del extremo amino terminal. Sólo la isoforma E1 posee el dominio represor de unión al complejo NuRD (Lauberth y Rauchman, 2006), el cual contiene además una potencial secuencia de localización nuclear RRKQRK, sugiriendo roles

específicos para cada isoforma. La expresión de la isoforma E1 se encuentra restringida a ciertos tejidos como timo, testículos y colon (Ma y col., 2001). La isoforma E1A, por otro lado, carece del dominio represor y su expresión es ubicua (Ma y col., 2001). En ratón, la isoforma E1 se expresa a partir de E9.5, mientras que la isoforma E1A se expresa desde estadíos más tempranos (Kohlhase y col., 2000).



**Figura 3.- Representación esquemática de exones y promotores alternativos de gen SALL2.** Se han descrito dos promotores, P1 y P2, separados por aproximadamente 11 Kb, los cuales dan lugar a dos transcritos que difieren en el primer exón. El promotor P1 se encuentra corriente arriba del exón E1 (rojo), mientras que el promotor P2 se localiza corriente arriba del exón E1A (celeste), y no contiene caja TATA. Ambos exones, E1 y E1A, se empalman con el exón E2 (morado), el cual codifica para todos los motivos de dedos de Zinc de la proteína. Las proteínas generadas a partir de estos dos transcritos, difieren en la composición aminoacídica y

longitud de su extremo amino terminal. Sólo la isoforma E1, generada por el empalme de los exones 1 y 2, posee el dominio de unión al complejo represor NuRD, SRRKQRKPQQL (Lauberth y Rauchman, 2006), el que a su vez contiene una potencial secuencia de localización nuclear RRKQRK. La expresión de E1 se encuentra restringida a timo, testículos y próstata, mientras que la isoforma E1A presenta una expresión ubicua. Fuente: modificado desde Ma y col., 2001.

#### **1.4.- SALL2: blancos transcripcionales**

SALL2 se perfila como una proteína de unión a cajas GC, reconociendo selectivamente a secuencias GGG(T/C)GGG (Gu y col., 2011), para lo cual es esencial el triple dedo de Zinc ubicado al centro de la secuencia de SALL2 (Gu y col., 2011; Li y col., 2004). La secuencia consenso de ADN a la cual se une SALL2, se encuentra contenida dentro de la secuencia reconocida por otro factor de transcripción, Sp1 (*Specificity Protein 1*) (Letovsky y Dynan, 1989). Sp1 reprime o activa la expresión de genes relacionados con procesos como diferenciación, proliferación y muerte celular. Su expresión es ubicua y, al igual que SALL2, su dominio de unión a ADN se compone de tres motivos de dedos de Zinc C2H2 adyacentes entre sí (Li y Davie, 2010). Ambos factores de transcripción, SALL2 y Sp1, se unen de forma sinérgica al ADN *in vitro* e interaccionan de forma indirecta *in vivo*, al reconocer secuencias de ADN en común (Gu y col., 2011). De forma interesante, estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que Sp1 regula positivamente a SALL2 (Escobar y

col., 2017), mientras que SALL2 reprime la actividad del promotor de *SP1* (Wu y col., 2015).

A la fecha, sólo cinco blancos transcripcionales han sido descritos, indicando que SALL2 puede actuar como activador y como represor transcripcional. Los genes identificados se relacionan con dos procesos celulares específicos: proliferación celular y apoptosis.

#### **1.4.1.- Blancos transcripcionales en proliferación celular:**

El ciclo celular se compone de cuatro etapas o fases: G1 (Gap1), S (Síntesis de ADN), G2 (Gap2) y Mitosis. Existe también un estado no proliferativo reversible, conocido como quiescencia o fase G0. La progresión del ciclo celular debe ser controlada de forma estricta en distintos puntos, para asegurar que el material genético sea replicado sólo una vez durante la fase S y que se segregue en dos células hijas idénticas durante Mitosis (Sherr, 1996; Suryadinata y col., 2010). Adicionalmente, el compromiso irreversible con la división celular es regulado en un punto de restricción en la fase G1, en respuesta a factores de crecimiento. Después de este punto, la división celular es independiente de señales proliferativas externas (Bertoli y col., 2013; Sherr, 1996).

La progresión del ciclo celular se encuentra regulada por complejos proteicos, constituidos por quinasas dependientes de Ciclinas, o CDKs, unidas a subunidades regulatorias, llamadas Ciclinas D, E, A, y B, las cuales otorgan la especificidad de sustrato al complejo (Suryadinata y col., 2010). Los niveles de Ciclinas fluctúan a lo largo del ciclo celular, ya que su expresión/degradación es controlada de forma temporal. Así, cada etapa del ciclo es gobernada por complejos Ciclina/CDK específicos: Ciclina D/CDK4-6 en G1, Ciclina E/CDK2 en la transición G1/S, Ciclina A/CDK2 en fase S, Ciclina A/CDK1 en G2 y Ciclina B/CDK1 en mitosis. Como mecanismos adicionales de control, además de la unión a Ciclinas, las CDK deben ser fosforiladas/desfosforiladas en residuos críticos para su activación. Por otro lado, los complejos Ciclina-CDK pueden ser inhibidos en presencia de proteínas inhibitoras como p21 o p16 (Suryadinata y col., 2010).

Diversos estudios apuntan a que *SALL2* regula negativamente la proliferación celular: *SALL2* constituye un gen de respuesta temprana ante la privación de suero en fibroblastos humanos y es necesario para gatillar el estado de quiescencia (G0). En este estudio, el silenciamiento de *SALL2* conlleva a una inapropiada progresión del ciclo celular ante la carencia de factores de crecimiento presentes en el suero (Liu y col., 2007). De forma similar, el silenciamiento de *SALL2* en la línea celular epitelial ovárica HOSE, gatilla un aumento de la síntesis de ADN (Li y col., 2004). *SALL2* regula la expresión de distintos genes involucrados con la progresión del ciclo celular,

específicamente aquellos que participan el punto de restricción de G1 (Figura 4), el cual marca la irreversibilidad del ciclo. En respuesta a factores de crecimiento, se gatilla la expresión de Ciclina D y su asociación con CDK4/6. La acumulación de estos complejos inicia la señalización por fosforilación que dará paso primero, a la expresión de la Ciclina de transición G1/S, Ciclina E, y luego, a la salida de G1 y la expresión de genes de fases S necesarios para la replicación del material genético (Sherr, 1996). En este contexto, SALL2 se une a los promotores y activa la expresión de los genes *CDKN1A* y *CDKN2A*, los cuales codifican para los inhibidores de complejos Ciclina-CDK, p21 y p16, respectivamente (Li y col., 2004; Wu y col., 2015). p21 inhibe la actividad de los complejos de fase G1-S: Ciclina D/CDK4, Ciclina E/CDK2 y Ciclina A/CDK2 (Harper y col., 1993; Xiong y col., 1993), mientras que p16 inhibe al complejo de fase G1, Ciclina D1/CDK4 (Serrano y col., 1993).

Otro blanco transcripcional de SALL2 es el proto-oncogén *c-MYC*. SALL2 se une al promotor y reprime la expresión de este proto-oncogén (Sung y col., 2012). *c-MYC* es un factor de transcripción que, al contrario de SALL2, favorece la progresión del ciclo celular en G1-S, a través de mecanismos como la represión de *CDKN1A* (Coller y col., 2000; Gartel y col., 2001), y la inducción del gen *CDC25A* (Galaktionov y col., 1996). Este último gen codifica para una fosfatasa que activa a los complejos Ciclina/CDK2 que participan en G1-S, al remover grupos fosfato que inhiben la actividad de CDK2 (Busino y col., 2004).

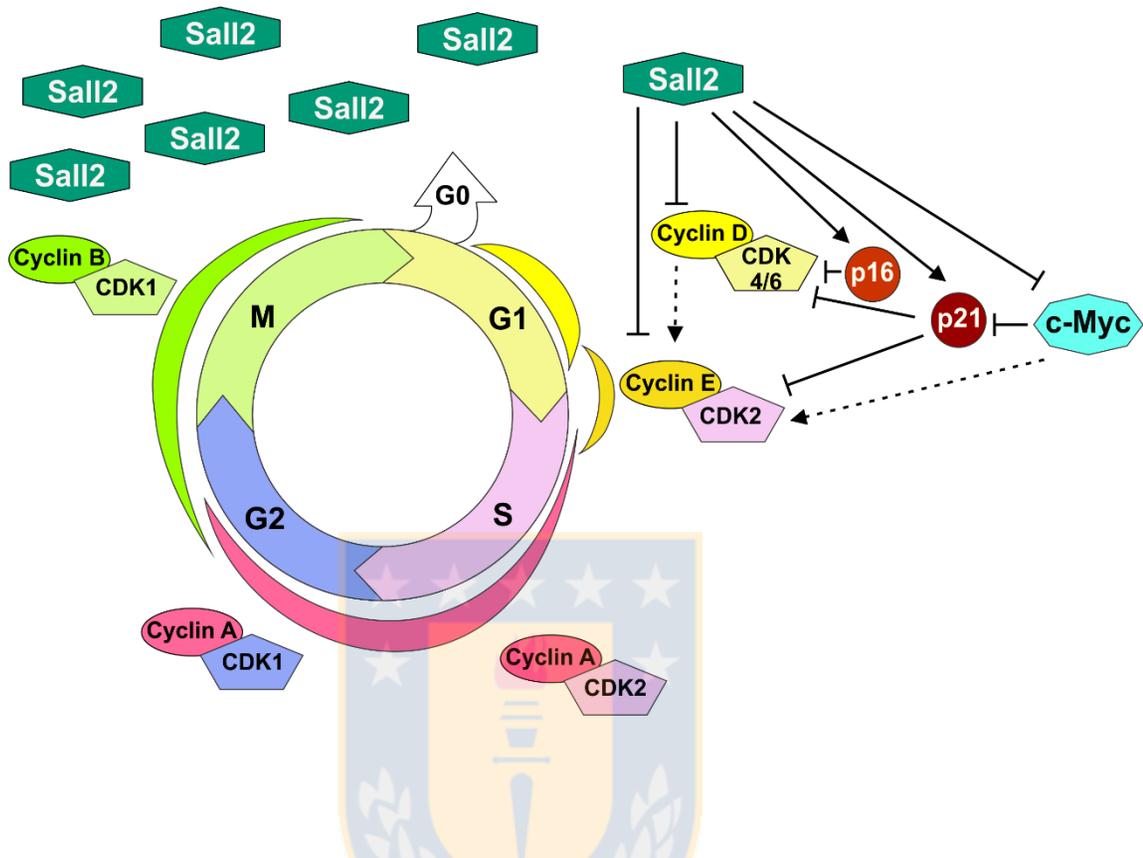
Estudios no publicados de nuestro laboratorio nos han llevado a identificar dos nuevos blancos transcripcionales de SALL2: los genes *CCND1* y *CCNE1*, que codifican para Ciclina D1 y E1, respectivamente. La represión de estos genes, ejercida por SALL2, constituiría otro mecanismo a través del cual SALL2 regula negativamente la proliferación celular, específicamente en G1-S (Hermosilla y col., 2017b).

En conclusión, SALL2 regula negativamente las fases del ciclo G1-S, al inducir la expresión de genes que codifican para inhibidores de complejos Ciclina-CDK, al mismo tiempo que reprime a genes que codifican para ciclinas de G1-S y al proto-oncogén *c-MYC*. Finalmente, estudios no publicados por nuestro laboratorio señalan que SALL2 es regulado de forma dependiente del ciclo celular: sus niveles son altos en mitosis y decaen conforme el ciclo celular progresa hacia G1-S (Hermosilla y col., 2017b). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de SALL2 durante G1 permitiría aliviar el bloqueo proliferativo impuesto por SALL2 en esta etapa del ciclo. Cabe destacar que el gen *CDKN1A* también es un blanco transcripcional del supresor tumoral p53 (Beckerman y Prives, 2010), sin embargo, es regulado por SALL2 de forma independiente de p53 (Li y col., 2004).

Adicionalmente, ensayos de reportero indican que SALL2 reprime a los promotores de los genes *hTERT* y *TK1*, que codifican para las enzimas Telomerasa y Timidina Quinasa 1, respectivamente (Wu y col., 2015). La

ribonucleoproteína Telomerasa corresponde a una polimerasa encargada de la mantención de la longitud de los telómeros (Ramlee y col., 2016). La enzima Timidina Quinasa 1 participa en la síntesis de timidina monofosfato (TMP), regulando la disponibilidad de timidina trifosfato (TTP) durante el ciclo celular (Topolcan y Holubec, 2008). La unión directa de SALL2 a los promotores de *TK1* y *hTERT* no han sido demostrada, existiendo la posibilidad de que el efecto de SALL2 sobre estos promotores ocurra de manera indirecta.





**Figura 4.- Blancos transcripcionales de SALL2 en G1-S.** Las distintas etapas del ciclo celular se encuentran reguladas por complejos Ciclina-CDK específicos: Ciclina D/CDK4-6 en G1, Ciclina E/CDK2 en la transición G1/S, Ciclina A/CDK2 en fase S, Ciclina A/CDK1 en G2 y Ciclina B/CDK1 en mitosis. La etapa G0 corresponde a un estado no proliferativo reversible. Los complejos de Ciclina D/CDK4-6 son indispensables para traspasar el punto de restricción en G1, ya que indirectamente inducen la expresión de las Ciclinas E y A, y de genes que intervienen en fase de replicación. Los niveles de SALL2 decaen al salir de Mitosis. En G1, SALL2 controla distintos genes: reprime la expresión de las Ciclinas D1 y E1 (genes *CCND1* y *CCNE1*, respectivamente), a la vez que induce la expresión de p21 y p16 (genes *CDKN1A* y *CDKN2A*, respectivamente). p21 y p16 son inhibidores de complejos Ciclina/CDK de fase G1. La expresión de p21 se encuentra reprimida por el factor de transcripción c-MYC, cuya expresión es a su vez reprimida por SALL2. c-MYC también promueve indirectamente la activación de CDK2. Las líneas discontinuas representan efecto indirecto. Fuente: Hermsilla y col., 2017b.

#### 1.4.2.- Blancos transcripcionales involucrados en apoptosis:

La apoptosis constituye un programa evolutivamente conservado de muerte celular controlada, ejecutado tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Morfológicamente, se caracteriza por la contracción o recogimiento celular, la fragmentación del ADN y la formación de protuberancias de membrana o “*blebbing*” (Fulda y Debatin, 2006). La ejecución de este programa se encuentra a cargo de proteasas cisteíno-aspartasas, llamadas caspasas, las cuales se encuentran normalmente presentes como precursores inactivos. Ante estímulos apoptóticos, estas proteasas se activan por clivaje proteolítico, pudiendo ejercer su actividad sobre diversos sustratos, tales como componentes del citoesqueleto, envoltura nuclear y adhesiones focales (Taylor y col., 2008).

Estudios de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación han establecido un rol de SALL2 en la apoptosis: ratones deficientes de *Sall2* presentan una menor tasa apoptótica en tejidos radiosensibles al ser sometidos a radiación gama, en relación a su contraparte *wild type* (Marcela Morales, Tesis de pregrado). Del mismo modo, fibroblastos embrionarios aislados desde animales *Sall2*<sup>-/-</sup>, son menos susceptibles a la apoptosis en respuesta al agente genotóxico doxorubicina que fibroblastos *wild type*, (Escobar y col., 2015). De forma consistente, la sobreexpresión de SALL2 en células de adenocarcinoma ovárico SKOV-3, aumenta la muerte celular por apoptosis, tanto en células en

cultivo como en *xenograft* generados en un modelo murino con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Li y col., 2004).

Una de las características de la apoptosis es la pérdida de la integridad mitocondrial, que conlleva a la liberación citoplasmática de citocromo C y otros factores apoptogénicos desde el espacio intermembrana mitocondrial. Citocromo C gatilla la activación de caspasa 3 en el citosol y la propagación de la cascada proteolítica, a través de la formación del apoptosoma, un complejo proteico compuesto por el citocromo C, la proteína APAF1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) y caspasa 9 (Fulda y Debatin, 2006; Taylor y col., 2008). La liberación de citocromo C es un paso fundamental en la cascada apoptótica, y se encuentra regulado por proteínas de la familia BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*). Los miembros de esta familia pueden ejercer un rol anti-apoptótico o pro-apoptótico. Ejemplos del último caso son las proteínas BAX y NOXA (Taylor y col., 2008). BAX oligomeriza en la membrana mitocondrial externa, aumentando su permeabilidad y con ello, la liberación de citocromo C, mientras que NOXA promueve la degradación de la proteína anti-apoptótica de la familia BCL-2, MCL-1 (*Myeloid Cell Factor 1*) (Willis y Adams, 2005). SALL2 se une al promotor y activa la expresión de *BAX* y del gen que codifica para NOXA, *PMAIP1* (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*). Tanto la unión de SALL2 a los promotores como la inducción de la expresión de estos genes se ven aumentados en respuesta a agentes genotóxicos (Escobar y col., 2015; Gu y col., 2011). *PMAIP1* (NOXA) y *BAX* también son regulado por el supresor

tumoral p53 (Beckerman y Prives, 2010), Sin embargo, la inducción de estos genes se observa incluso en modelos donde p53 se encuentra deletado o no es funcional, siendo dependiente de SALL2 (Escobar y col., 2015; Li y col., 2004).

Por otro lado, uno de los blancos transcripcionales de SALL2 mencionados anteriormente, *c-MYC*, promueve no sólo la proliferación celular, sino también la apoptosis (Hoffman y Liebermann, 2008; McMahon, 2014). SALL2 se une al promotor del proto-oncogén *c-MYC*, regulando negativamente la expresión del mismo. La unión de SALL2 al promotor de *c-MYC* aumenta en condiciones de apoptosis inducida por el agente genotóxico etopósido en células de epitelio ovárico, HOSE, sugiriendo que este proceso es parte de la respuesta frente a estímulos apoptóticos (Sung y col., 2012).

### **1.5.- SALL2 en Desarrollo**

Dos grupos independientes han generado modelos murinos *Sall2*<sup>-/-</sup>, los cuales son fértiles y no manifiestan alteraciones físicas visibles, posiblemente debido a una función redundante ejercida por los parálogos (Böhm y col., 2008; Sato y col., 2003). Sin embargo, análisis exhaustivos de los fenotipos de los animales, sumado a evidencia generada con otros modelos de estudio, han permitido relacionar a SALL2 principalmente con desarrollo del sistema nervioso y, en menor medida, con el desarrollo de otros órganos y sistemas.

### 1.5.1.- SALL2 en Desarrollo del Sistema Nervioso:

A pesar de que los animales *Sall2*<sup>-/-</sup> son viables, fértiles y no presentan anomalías físicas, se ha descrito que la ausencia de *Sall2* causa defectos en el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario, de forma dependiente del trasfondo genético de los animales, es decir, de las líneas consanguíneas o híbridos de líneas consanguíneas de las cuales derivan los ratones en estudio (Figura 5.A). El porcentaje de animales *Sall2*<sup>-/-</sup> con defectos en el cierre del tubo neural fluctúa entre 11.5 y 17.1%, dependiendo del trasfondo genético (Böhm y col., 2008). Los autores atribuyen estas diferencias fenotípicas causadas por la delección de *Sall2* en distintos trasfondos genéticos, a la diferencia en la ubicación del segundo de cierre del tubo neural en distintas cepas. Este cierre se encuentra localizado en la unión entre el cerebro anterior y medio, y puede tomar una ubicación más rostral (hacia el cerebro anterior) o caudal (hacia el cerebro medio), dependiendo de la cepa. Un punto de cierre más rostral se relaciona con una mayor predisposición a exencefalia (Copp y col., 2003). Cabe destacar que la penetrancia del fenotipo es total en ratones *Sall2*<sup>-/-</sup> en presencia de un alelo hipomórfico para *Sall4*, validando la función redundante de ambos parálogos en el cierre del tubo neural (Böhm y col., 2008). De forma interesante, se ha descrito la interacción entre SALL2 y SALL4 en células madre embrionarias de ratón (mESCs) (van den Berg y col., 2010), sugiriendo

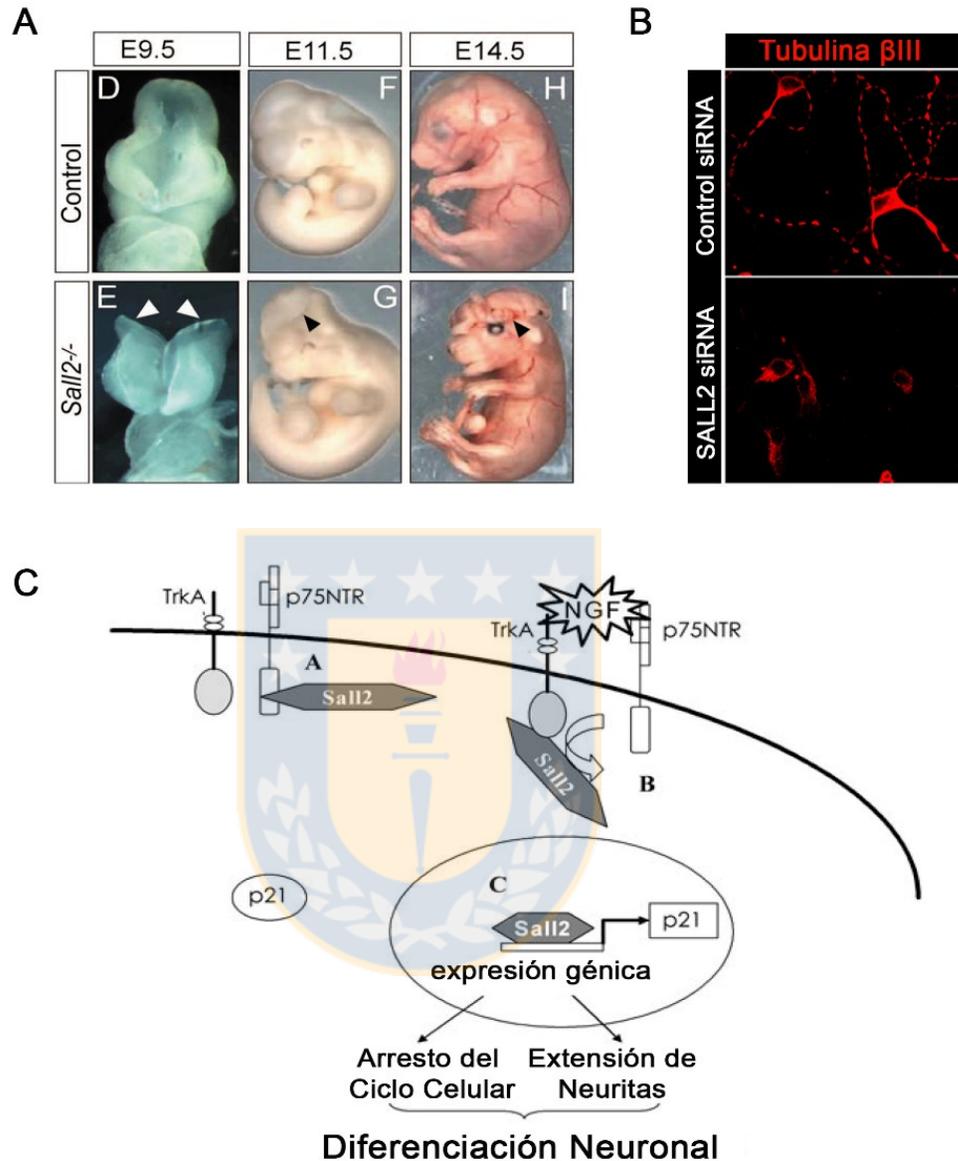
que ambos parálogos podrían participar en los mismos procesos durante el desarrollo.

En el trabajo antes mencionado y otros, se corrobora que *Sall2* se expresa a nivel de estructuras neurales desde estadios tempranos del desarrollo (Böhm y col., 2008; Finger y col., 2017; Lein y col., 2007). Otros estudios en *Xenopus laevis* también han relacionado a *Xsall2* con desarrollo cerebral, específicamente en la regionalización del cerebro anterior y medio con respecto al cerebro posterior (Onai y col., 2004). En este modelo, *xsall2* se expresa predominantemente en la región presuntiva anterior del sistema nervioso central en estadios de gástrula y neurula, cuando las regiones cerebrales se encuentran en proceso de especificación. A través de la inyección de morfolino o ARNm de *xsall2* en estadio de 8 células, se estudió el fenotipo relacionado a la pérdida y ganancia de función de *Xsall2*, respectivamente. Los resultados demuestran que *Xsall2* es esencial para la expresión de genes del cerebro anterior y medio y la determinación de esta región, antagonizando el efecto posteriorizante de la molécula de señalización *Wnt1* (Onai y col., 2004). En este punto, es necesario mencionar que en este artículo se consideró la secuencia codificante de *xsall2* con número de acceso AY508953 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) para la síntesis de morfolino y ARNm. La proteína generada a partir de esta secuencia, al igual que la secuencia de *Xsall2* de *X. laevis* evaluada en la Figura 2 (NP\_001129646.1), comparte sólo un 51.03% de identidad con la proteína humana (NP\_005398.2)

y 50.06% con la proteína de ratón (NP\_056587.2). En virtud de lo anterior, se requieren estudios adicionales para determinar si SALL2 cumple una función similar en mamíferos.

Otro rol atribuido a SALL2 en el desarrollo del sistema nervioso central - compuesto por el encéfalo y la médula espinal- es la diferenciación morfológica de neuronas hipocampales en respuesta a la neurotrofina NGF, o factor de crecimiento nervioso (Pincheira y col., 2009). Las neurotrofinas son una familia de proteínas secretadas, con roles en la maduración, sobrevivencia y migración neuronal, crecimiento axonal, conectividad sináptica y respuesta a daño (Ibáñez y Simi, 2012). NGF es esencial para el desarrollo y mantención fenotípica de las neuronas del sistema nervioso periférico y para la integridad funcional de neuronas colinérgicas del sistema nervioso central (Aloe y col., 2012). NGF se une al receptor tirosina-quinasa específico TrkA (*Tropomyosin kinase receptor A*), y también al receptor no selectivo y de baja afinidad, p75NTR (*p75 Neurotrophin receptor*). Este último corresponde a una glicoproteína transmembrana que une a todas las neurotrofinas con similar afinidad (Aloe y col., 2012). Aunque carece de actividad catalítica intrínseca, p75NTR activa vías de señalización a través de la interacción con adaptadores citosólicos. Adicionalmente, p75NTR puede aumentar la estabilidad, afinidad y activación de TrkA en respuesta a NGF (Skaper, 2008). Cabe destacar que ambos receptores pueden actuar de forma sinérgica, antagónica o independiente en distintos tipos celulares (Ibáñez y Simi, 2012).

SALL2 se ha identificado como un interactor del receptor p75NTR en cerebro de ratones, principalmente en el citoplasma neuronal. Esta interacción ocurre a través del extremo amino terminal de SALL2 y es interrumpida en respuesta a NGF. En la línea celular derivada de feocromocitoma de rata PC12, utilizada como modelo de diferenciación neuronal, el tratamiento con NGF induce un aumento de los niveles de SALL2 a través de p75NTR. Adicionalmente, la activación del receptor TrkA gatilla la relocalización de SALL2 en el núcleo, efecto que es dependiente de la quinasa ERK1/2 (*Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2*). Una vez en el núcleo, SALL2 activa al promotor *Cdkn1a* e induce la expresión de p21, y con ello el arresto del ciclo celular (Figura 5.B). Finalmente, mediante estudios de pérdida y ganancia de función, se determinó que SALL2 es necesario para la extensión de neuritas en células PC12 y neuronas hipocámpales (Pincheira y col., 2009).



**Figura 5.- Rol de SALL2 en el desarrollo de Sistema Nervioso. A.-** Morfología de embriones *wild type* (Control, panel superior) y *Sall2*<sup>-/-</sup> (panel inferior) en estadíos E9.5, E11.5 y E14.5. En estadío 9.5, el tubo neural ya se encuentra cerrado en animales *wild type*, mientras que los pliegues neurales aún permanecen sin fusionar en algunos animales *Sall2*<sup>-/-</sup> (flechas). En E11.5 y E14.5, algunos animales *Sall2*<sup>-/-</sup> exhiben exencefalia (cerebro fuera del cráneo, flechas). Fuente: modificado desde Böhm y col., 2008. **B.-** Inmunofluorescencia de Tubulina  $\beta$ III en neuronas hipocámpales de ratón, previamente transfectadas con siRNA control o siRNA específico para *SALL2* y tratadas con NGF por 16 horas. Fuente: modificado desde Pincheira y

col., 2009. **C.-** Modelo de SALL2 como mediador de la señalización por NGF: SALL2 se encuentra unido constitutivamente al receptor p75NTR. En respuesta a NGF, SALL2 se disocia de p75NTR y, en un proceso dependiente del receptor TrkA, trasloca al núcleo, donde induce la expresión de p21 y el arresto del ciclo celular. A través de este mecanismo, SALL2 promovería la extensión de neuritas y con ello, la diferenciación neuronal. Fuente: modificado desde Pincheira y Donner, 2008.

Diversas líneas de investigación indican que la señalización por NGF se encuentra alterada en la enfermedad de Alzheimer, una forma de demencia que afecta la memoria, el pensamiento y el comportamiento (Allen y Dawbarn, 2006; Counts y Mufson, 2005). Interesantemente, se ha reportado que *SALL2* se expresa en menores niveles en cerebros de pacientes con esta patología, con respecto a individuos sanos (Brown y col., 2002). Estos antecedentes plantean la posibilidad de que *SALL2* participe en la respuesta a neurotrofinas en grupos neuronales específicos, cuya función sea esencial para la mantención de las capacidades cognitivas y de memoria. A este respecto, se sabe que los mayores niveles de producción de NGF en el sistema nervioso central se localizan en la corteza, hipocampo y glándula pituitaria (Aloe y col., 2012). Tanto la corteza como el hipocampo se encuentran inervados por neuronas colinérgicas provenientes de núcleos neuronales ubicados en la región basal del cerebro anterior, como lo es el Núcleo Basal de Meynert (Liu y col., 2015; Mesulam, 2013). La sobrevivencia y función de estos grupos neuronales es regulada por NGF. Estas neuronas expresan los receptores para NGF, TrkA y

p75NTR, y desempeñan un rol fundamental en aprendizaje y memoria (Aloe y col., 2012; Counts y Mufson, 2005). Tanto la sinapsis colinérgica en corteza e hipocampo como la señalización por NGF en las neuronas del Núcleo Basal, se encuentran alteradas en la enfermedad de Alzheimer (Allen y Dawbarn, 2006; Counts y Mufson, 2005; Liu y col., 2015). Los antecedentes antes mencionados sugieren un rol para SALL2 en respuesta a NGF, en este grupo particular de neuronas colinérgicas, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas

### **1.5.2.- SALL2 en el Desarrollo de otros Órganos:**

Otros estudios también señalan que SALL2 participaría en procesos del desarrollo, específicamente en hematopoyesis, desarrollo del ojo y posiblemente también en riñón. Análisis exhaustivos del fenotipo de los animales *Sall2*<sup>-/-</sup> han llevado a determinar que éstos presentan defectos en la maduración mieloide, acompañada de una disminución en los niveles de p21 en timo y médula ósea (Chai, 2011). Estudios posteriores demostraron además que la deficiencia de *Sall2* se relaciona con defectos en el cierre de la fisura óptica en ratones. Este fenotipo es consistente con el observado en pacientes con coloboma ocular (OMIM 216820), quienes presentan una mutación sin sentido que da lugar a una proteína SALL2 trunca, de 28 residuos, p.Glu29\* (Kelberman y col., 2014).

La proteína SALL2 ha sido detectada en el riñón en desarrollo en humanos, específicamente en el mesénquima y en menor medida en algunas estructuras epiteliales (Li y col., 2002). Altos niveles de *Sall2* también se expresan en el órgano precursor de riñón, el metanefros, durante el desarrollo embrionario de ratón (Sato y col., 2003). A pesar de lo anterior, la delección de *Sall2* no se relaciona con anomalías renales en ratón, lo cual si ocurre con la delección del parólogo *Sall1* (Sato y col., 2003). Sin embargo, se ha reportado el caso de una mutación en *SALL2* que da lugar a una sustitución del residuo de glicina 792 por arginina (p.G792R) en un paciente con síndrome de Alport (Chatterjee y col., 2013). Esta patología se presenta con falla glomerular en los riñones y pérdida de audición (OMIM 203780), y es causada por mutaciones en los genes que dan lugar a la fibra de colágeno tipo IV (Longo y col., 2002). En el caso del paciente afectado, la mutación de *SALL2* es homocigota y está acompañada de mutaciones en los genes *COL4A3* (Colágeno tipo IV cadena  $\alpha 3$ ) y *MYH9* (cadena pesada de la Miosina 9), sugiriendo que la mutación en *SALL2* constituiría un factor que contribuye al fenotipo del paciente (Chatterjee y col., 2013), y no la causa de la patología. Un aspecto importante a considerar es que el efecto de esta mutación en *SALL2* no ha sido estudiado, y no se han reportado mutaciones similares en otros pacientes con síndrome de Alport.

## 1.6.- SALL2 en Cáncer

El cáncer corresponde a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular descontrolado y la diseminación de células anormales en el organismo. Constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial, atribuida a 8.2 millones de defunciones sólo durante el año 2012 (Ferlay y col., 2015; Torre y col., 2015). En Chile, la tasa de mortalidad registrada el mismo año fue de 146.08 por cada 100.000 habitantes, correspondientes a 25.421 defunciones, que dan cuenta de un 25.75% de las muertes ocurridas durante el año 2012 (Departamento de Estadística e Información en Salud (DEIS), 2014). A nivel mundial, el año 2012 se diagnosticaron 14 millones de nuevo casos de cáncer, los cuales se estima aumenten a 17 millones el año 2020, y a 22 millones el año 2030 (Ferlay y col., 2015).

El paso desde una célula normal hacia una célula tumoral comprende múltiples cambios genéticos que alteran diversas propiedades celulares fundamentales. Las mutaciones que subyacen al proceso de carcinogénesis afectan a genes comprendidos dentro de dos grandes grupos: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Estos genes codifican proteínas que regulan positiva o negativamente el crecimiento y la proliferación celular, respectivamente. Un tercer grupo de genes, involucrados en la reparación de ADN, también se encuentran desregulados en cáncer (Lodish y col., 2013). A través de estas mutaciones, la célula tumoral adquiere características que le

otorgan ventaja por sobre las células normales del organismo, como por ejemplo la capacidad de replicarse ilimitadamente y de evadir la apoptosis entre otras (Hanahan y Weinberg, 2011).

La función de SALL2 se relaciona con una disminución de la proliferación celular y a un aumento de la apoptosis, dos procesos desregulados en las células tumorales. En este contexto, múltiples estudios han sugerido que *SALL2* es relevante en cáncer, sin embargo, su contribución a la patología es controversial. La mayoría de los estudios han descrito a *SALL2* como un supresor tumoral, sin embargo, otros indican que *SALL2* se encuentra altamente expresado en ciertos tipos de tumores.

#### **1.6.1.- SALL2 como supresor tumoral:**

Como se mencionó anteriormente, los blancos transcripcionales de *SALL2* corresponden a genes pro-apoptóticos o a genes que están involucrados en la proliferación celular (Hermosilla y col., 2017a). Las células tumorales presentan ciertas propiedades que les permiten, por ejemplo, proliferar desmedidamente y evadir la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011), a través de la desregulación de genes que controlan estos procesos, como es el caso de *SALL2*. En virtud de los antecedentes expuestos, se esperaría que *SALL2*, al promover el arresto del ciclo celular y la apoptosis, actuara como un

supresor tumoral. Sin embargo, animales *Sall2*<sup>-/-</sup> no generan tumores de forma espontánea (Sato y col., 2003), como si ocurre con la delección de otros supresores tumorales (Donehower y col., 1992; Taneja y col., 2011). A pesar de lo anterior, otros antecedentes sustentan el rol de *SALL2* como un supresor tumoral, los cuales se detallan a continuación.

*SALL2* es blanco de proteínas producidas por virus oncogénicos. *SALL2* se une al antígeno T largo del virus de poliooma -un virus de ADN con la capacidad de inducir tumores en huéspedes murinos. *SALL2* impone un bloqueo a la replicación del ADN viral, efecto que es revertido al interaccionar con el antígeno T largo. Esta interacción es necesaria para la replicación del ADN viral y ocurre a través del par de dedos de Zinc del extremo carboxilo terminal de *SALL2* (Li y col., 2001). Otra proteína viral que interacciona con *SALL2* es la proteína HPV16 E6 del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16), asociado a cáncer cérvico-uterino. Esta interacción estabiliza a *SALL2* en una forma transcripcionalmente inactiva, incapacitándola para unirse al promotor de p21 (Parroche y col., 2011). Ambas proteínas virales, el antígeno T largo del virus de poliooma y la proteína E6 del virus de papiloma, inducen la transición desde G1 a fase S del ciclo celular (Freund y col., 1994; Malanchi y col., 2002), sugiriendo que la inactivación de *SALL2* por parte de estas proteínas virales podría constituir un mecanismo para promover la proliferación celular.

Estudios preliminares a través de PCR, llevaron a determinar que *SALL2*, específicamente la isoforma E1A, no es detectable en muestras de cáncer de pulmón, próstata, colon (Ma y col., 2001). Adicionalmente, a través de análisis de correlación de expresión, se ha descrito una correlación negativa entre *SALL2* y su blanco transcripcional, el proto-oncogén *c-MYC*, en adenocarcinoma de ovario seroso, glioblastoma (GBM), carcinoma invasivo de mama y carcinoma de pulmón de células escamosas (Sung y col., 2012). Resultados similares en distintos tipos de tumores han sido obtenidos al correlacionar los patrones y expresión de *SALL2* y sus blancos transcripcionales *CCND1* (Ciclina D1) o *CCNE1* (Ciclina E1) (Hermosilla y col., 2017b).

En humanos, el gen *SALL2* se localiza en el cromosoma 14q11.1-q12.1 (Kohlhase y col., 1996), en o adyacente a regiones que presentan pérdida de heterocigocidad (LOH, pérdida de una copia parental) en distintos tipos de cáncer, sugiriendo que en esta zona se mapean genes supresores de tumores. La pérdida de heterocigocidad se detectó en muestras de pacientes a través de PCR de microsatélites polimórficos, en distintas regiones del brazo 14q. Dentro de los marcadores polimórficos utilizados, se incluyen los que se localizan en o se superponen al locus de *SALL2*, señalados en la Tabla 1. Los porcentajes de LOH en los distintos estudios, corresponden al porcentaje de muestras con pérdida de heterocigocidad en al menos una de las distintas regiones del brazo 14q estudiadas, con respecto al número total de casos informativos (muestras

cuyo tejido normal presenta heterocigocidad alélica para al menos uno de los marcadores en estudio). Estas deleciones han sido asociadas a mal pronóstico en cáncer endometrial, colorectal y de cabeza y cuello (Al-Mulla y col., 2006; Fujino y col., 1994; Lee y col., 1997; Pehlivan y col., 2008). En algunos estudios, se señala el porcentaje de LOH detectado específicamente con los marcadores de regiones donde se localiza el gen de *SALL2*, con respecto al número de casos informativos para estas regiones en particular. Sin embargo, esta información no se encuentra disponible en todos los artículos revisados.



<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Ubicación (Marcador)</b>	<b>% LOH 14q</b>	<b>Ref.</b>
<b>Carcinoma endometrial</b>	79 muestras (47 casos informativos para el cromosoma 14).	14q11.2 ( <i>TCRD</i> ) 14q11.2-q13 ( <i>MYH6</i> )	19.1% (asociado a mal pronóstico) (19% para <i>TCRD</i> y 11% para <i>MYH6</i> )	(Fujino y col., 1994)
<b>Meningioma</b>	44 muestras de distinto grado histológico.	14q12 ( <i>D14S80</i> ) 14q12-q13 ( <i>D14S54</i> ) 14q12-q13 ( <i>D14S70</i> )	29.5%	(Simon y col., 1995)
	41 muestras de distinto grado histológico.	14q11.1-11.2 ( <i>D14S72</i> )	37% (17.2% para <i>D14S72</i> )	(Tse y col., 1997)
<b>Carcinoma de Vejiga</b>	285 muestras de distinto grado histológico y estadio.	14q11.2 ( <i>D14S283</i> ) 14q12 ( <i>D14S80</i> ) 14q12-q13 ( <i>D14S75</i> )	25.3% (asociado a estadios tardíos)	(Chang y col., 1995)
<b>Carcinoma de Ovario</b>	76 muestras de distinto grado histológico y estadio.	14q12 ( <i>D14S80</i> ) 14q12-q13 ( <i>D14S70</i> , <i>D14S75</i> )	49%	(Bandera y col., 1997)
	25 muestras de tumores epiteliales malignos.	14q11.2 ( <i>D14S50</i> )	46% (30% para <i>D14S50</i> )	(Osborne y Leech, 1994)
<b>Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)</b>	73 muestras.	14q12-q13 ( <i>D14S75</i> ) 14q12-q22 ( <i>D14S47</i> )	40% (asociado a mal pronóstico)	(Lee y col., 1997)
	22 muestras.	14q11-q13 ( <i>D14S608</i> , <i>D14S306</i> )	~26% (13% para <i>D14S742</i> , 37.5% para <i>D14S680</i> y 31.3% para <i>D14S306</i> )	(Beder y col., 2003)
	50 muestras.	14q11.2 ( <i>D14S990</i> )	88% (asociado a mal pronóstico) (22.9% para <i>D14S990</i> )	(Pehlivan y col., 2008)
<b>Carcinoma Esofágico</b>	23 muestras de adenocarcinoma de esófago.	14q11.2-q22 ( <i>D14S47</i> )	23% para <i>D14S47</i>	(Dolan y col., 1998)

Tipo de Cáncer	Número de muestras	Ubicación (Marcador)	% LOH 14q	Ref.
<b>Carcinoma de Pulmón</b>	30 muestras de adenocarcinoma, 25 muestras de carcinoma de células escamosas y 24 de células pequeñas (SCLC).	14q11.1-q11.2 ( <i>D14S261</i> )	32, 30 y 42% para <i>D14S261</i> en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y SCLC, respectivamente.	(Abujiang y col., 1998)
<b>Mesotelioma</b>	18 muestras.	14q11.1-q12 ( <i>D14S283</i> , <i>D14S972</i> , <i>D14S64</i> )	56% (31.3% para <i>D14S283</i> , 50% para <i>D14S972</i> y 45.5% para <i>D14S64</i> )	(Björkqvist y col., 1999)
<b>Cáncer Colorectal</b>	70 muestras (61 casos informativos) de cancer colorectal esporádico	14q11.1-q12 ( <i>D14S283</i> ) 14q12 ( <i>D14S275</i> )	24.6% (asociado a mal pronóstico) (32.5% para <i>D14S283</i> y 33% para <i>D14S275</i> )	(Al-Mulla y col., 2006a, 2006)

**Tabla 1.- Tumores que presentan pérdida de heterocigidad (LOH) en región cromosomal 14q donde se ubica el gen de *SALL2*.** Se indica el número de muestras y el número de casos informativos, si es que este último difiere demasiado del número inicial de muestras (análisis de más de un cromosoma). Se consideran como casos informativos, aquellos que presentan heterocigidad para al menos uno de los marcadores analizados en el estudio (no necesariamente en el locus de *SALL2*). En la tercera columna se indican sólo los marcadores polimórficos (microsatélites) que se localizan en, o se superponen al locus de *SALL2* (14q11.1-q12), y no representan todos los marcadores utilizados en cada estudio. El porcentaje de LOH hace referencia a pérdida de heterocigidad en al menos una ubicación informativa, es decir, LOH de cualquier región del brazo 14q en casos informativos, siendo 14q11-12, 14q21-q24 y 14q31-q32 las más frecuentes. En algunos artículos, se entrega además la información detallada sobre el porcentaje de LOH para los marcadores que se localizan en, o se superponen al locus de *SALL2*. Ref.: referencia bibliográfica. Fuente: propia.

La expresión de *SALL2* también se encuentra disminuida o nula en líneas celulares y muestras de leucemia mieloide aguda (AML) (Chai, 2011). Adicionalmente, la delección de *Sall2* en ratones nulos para el supresor de tumores *p53*, aumenta la tumorigénesis y mortalidad del fenotipo. Los ratones *Sall2<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>* o *Sall2<sup>+/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>* exhiben una mayor progresión de linfoma de células T con metástasis en hígado, riñón, médula ósea, sangre periférica y sistema nervioso central, mientras que en los ratones *Sall2<sup>+/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>*, el linfoma se limita a timo y órganos adyacentes como pulmón (Chai, 2011).

En líneas celulares derivadas de carcinoma esofágico de células escamosas (ESCC), la adquisición de un fenotipo radio-resistente está acompañado de un aumento en la metilación del promotor P1 y la concordante disminución en la expresión de *SALL2*. La expresión ectópica de *SALL2* en estas células disminuye la agresividad del fenotipo, al reducir la migración celular y aumentar la tasa apoptótica en respuesta a radiación X y a cisplatino (Luo y col., 2017).

Un número importante de estudios han sido realizados en muestras o líneas celulares de cáncer de ovario, reafirmando el rol de *SALL2* como supresor tumoral en esta patología. Como se señala en la Tabla 1, la región cromosómica donde se localiza el locus de *SALL2* se encuentra sujeta a pérdida de heterocigocidad en cáncer de ovario (Bandera y col., 1997; Osborne y Leech, 1994). *SALL2* es altamente expresado en epitelio ovárico normal, pero

la proteína no es detectable en un 90% de un total de 210 muestras de cáncer de ovario de distintos subtipos histológicos (Sung y col., 2013). Estudios en líneas celulares permitieron determinar que la isoforma E1A se encuentra altamente expresada en células de epitelio ovárico HOSE, no así en líneas celulares de cáncer de ovario, SKOV-3 y RMUGS, donde la expresión de esta isoforma es muy baja o nula. En estas líneas celulares, así como también en 18 de 26 muestras de tumores de cáncer (69%), el promotor P2 se encuentra silenciado por hipermetilación (Sung y col., 2013). Por otro lado, la expresión ectópica de *SALL2* en células SKOV-3 disminuye la capacidad tumorigénica de esta línea celular, al ser inoculadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, SCID. Los tumores generados por las células de la condición control (con bajos niveles de *SALL2*), alcanzaron un tamaño promedio tres veces mayor al tamaño de los tumores generados por células SKOV-3 que expresan *SALL2* de forma estable. En este último caso, los tumores presentaron un menor índice mitótico y un mayor índice apoptótico con respecto al control (Li y col., 2004). Asimismo, la expresión estable de *SALL2* en células SKOV-3 en cultivo, reduce el crecimiento independiente de anclaje, induce la expresión de p21 y la muerte celular, a la vez que reduce la síntesis de ADN (Li y col., 2004). De forma consistente, el silenciamiento de *SALL2* en células de epitelio ovárico HOSE y fibroblastos humanos, produce un aumento en la síntesis de ADN (Li y col., 2004; Liu y col., 2007).

En fibroblastos, *SALL2* es necesario para mantener el estado de quiescencia ante la privación de suero. *SALL2* forma parte de un grupo de genes de respuesta temprana ante la privación de suero, cuya expresión está disminuída en cáncer de próstata y mama. En este último caso, la reducción de la expresión de estos genes, incluyendo *SALL2*, ha sido asociado a mal pronóstico (Liu y col., 2007). De forma congruente, análisis de microarreglos de ADNc posicionan a *SALL2* como parte de un grupo de genes que atenuarían el aumento del grado histológico y la progresión tumoral en cáncer de mama. En este mismo estudio, se predice que *SALL2* suprime la transición epitelio mesénquima (Liu y col., 2014). Adicionalmente, *SALL2* ha sido propuesto como un marcador de pronóstico favorable en cáncer de mama (Liu y col., 2014; Zuo y col., 2017).

#### **1.6.2.- *SALL2* como oncogén:**

En contraste con los antecedentes que avalan a *SALL2* como un indicador de buen pronóstico en cáncer de mama, otro estudio estudio de microarreglos de ARNc sugiere que *SALL2* constituye un predictor de metástasis a nodos linfáticos en este mismo tipo de cáncer (Huang y col., 2003). Por otro lado, a través de microarreglos de tejido, se detectó una alta inmunodetección nuclear de *SALL2* en un 43% de muestras de sarcoma

sinovial, y una inmunodetección leve en un 45%, en un total de 42 casos evaluados (Nielsen y col., 2003).

Microarreglos de ARNc y RT-PCR cuantitativo, indican que la expresión de *SALL2* es elevada en un 25% de un total de 49 casos de carcinoma oral de células escamosas, relacionando la expresión de *SALL2* con invasión y estadios avanzados del tumor (Estilo y col., 2009). También a través de microarreglos de ARNc, se determinó que *SALL2* es parte de un grupo de 10 factores de transcripción de expresión específica en linfoma de células de manto (MCL), un tipo agresivo y poco común de linfoma que afecta a los linfocitos B (Andréasson y col., 2010). La expresión de *SALL2* también se encuentra elevada en tumor de Wilms (Li y col., 2002), el tipo más común de tumor pediátrico, derivado de precursores pluripotentes renales embrionarios y que recapitula características histológicas y moleculares del riñón en desarrollo (Rivera y Haber, 2005).

Un estudio bioinformático en base a información públicamente disponible, determinó que *SALL2* es un gen cuya expresión se encuentra aumentada en tumores testiculares de células germinales (Alagaratnam y col., 2011). Este tipo de tumores es particular, ya que las células que lo componen retienen características pluripotentes y comparten perfiles de expresión similares con células madre (Alagaratnam y col., 2011; Bustamante-Marín y col., 2013; Sperger y col., 2003). En este contexto, *SALL2* ha sido ampliamente

relacionado al estado pluripotente en células madre embrionarias (ESCs) e inducidas (iPSCs). *SALL2* es uno de los genes significativamente expresados en células madre embrionarias humanas (hESCs) con respecto a tejido normal y células diferenciadas (Sperger y col., 2003). A través de análisis de microarreglos de ARNc, se determinó que *SALL2* se encuentra dentro de un grupo de genes relacionados a pluripotencia en hESCs, y es co-expresado junto a reguladores maestros de este estado, *NANOG*, *POU5F1* (OCT-4) y *SOX2* (Nie y col., 2011). Asimismo, la inducción de pluripotencia en células somáticas se encuentra acompañada de un aumento en los niveles de *SALL2* ((Giorgetti y col., 2009; Saito y col., 2011); base de datos GEO # GSE33298 (Liu y col., 2012) y # GSE20750 (Nishino y col., 2011)). Estos antecedentes sugieren que *SALL2* sería relevante para la mantención del estado pluripotente, al igual que su parálogo *SALL4* (Nishino y col., 2011; Sakaki-Yumoto y col., 2006; Xiong, 2014).

Hasta ahora, se desconocen los mecanismos moleculares relacionados a pluripotencia en los que participaría *SALL2*. Sin embargo, un estudio realizado en glioblastoma (GBM), demuestra que *SALL2*, en conjunto con los factores de transcripción asociados a pluripotencia, *POU3F2* (OCT-7), *OLIG2* y *SOX2*, son esenciales para la reprogramación de células diferenciadas de GBM en células de tumor con características tipo células madre -llamadas TPCs (*Tumor Propagating Cells*)- capaces de inducir tumores *in vivo* (Suvà y col., 2014). En este estudio, se demostró que *SALL2* interacciona con el factor de transcripción

SOX2, y reconoce una secuencia de ADN consenso ATTCAT, relacionada a la familia de factores de transcripción SOX (Suvà y col., 2014). Esta secuencia difiere de la secuencia consenso de unión a ADN descrita para SALL2, GGG(T/C)GGG (Gu y col., 2011), sugiriendo que en presencia de SOX2, las funciones transcripcionales de SALL2 podrían verse alteradas. De forma interesante, SOX2 se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de cáncer, incluyendo GBM y cáncer testicular de células germinales (Wuebben y Rizzino, 2015), los cuales también expresan altos niveles de SALL2 ((Alagaratnam y col., 2011); cBioPortal for Cancer Genomics (Cerami y col., 2012; Gao y col., 2013)).

Finalmente, cabe destacar que en ninguno de los estudios que sugieren que SALL2 actúa como oncogen, se ha evaluado si existen mutaciones en el gen. Mutaciones inactivantes o incluso oncogénicas han sido reportadas para otros supresores tumorales como p53 en distintos tipos de cáncer (Olivier y col., 2010), por lo que no es posible descartar que mecanismos similares tengan lugar en el gen de SALL2.

### **1.7.- SALL2: Regulación**

Dada la relevancia de SALL2 tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, se hace necesario conocer los mecanismos que participan en

su regulación. Actualmente, es muy poca la información disponible con respecto a este punto. Los antecedentes existentes provienen, en su mayoría, de análisis masivos y, en consecuencia, no entregan mayor detalle sobre los mecanismos moleculares que intervienen en la expresión del gen o la regulación de la función proteica.

#### **1.7.1.- Proteínas interactoras y localización subcelular:**

Algunos interactores de SALL2 han sido mencionados previamente, dentro de los cuales se encuentran las proteínas antígeno T largo del virus de polioma (Li y col., 2001) y la proteína HPV16 E6 del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16), asociado a cáncer cérvico-uterino (Parroche y col., 2011). Otra interacción previamente detallada es la de SALL2 con el receptor de neurotrofinas de baja afinidad, p75NTR. Esta interacción ocurre a través de una región de la proteína ubicada entre los residuos 119-144, la cual contiene un dominio de poli-glicina (Pincheira y col., 2009). Esta secuencia se encuentra conservada sólo en SALL2 de mamíferos y no en otros miembros de la familia.

A través de inmunoprecipitación y espectrometría de masas, se ha demostrado que SALL2 interacciona con los factores de transcripción relacionados con pluripotencia SOX2 en células madre neurales (Engelen y col., 2011), y SALL4 en células madre embrionarias de ratón (mESCs) (van den

Berg y col., 2010). En células madre embrionarias humanas (hESCs), SALL2 también interacciona con Dnmt3A y B (Rigbolt y col., 2011). Estas proteínas corresponden a enzimas ADN metiltransferasas *de novo*, asociadas a pluripotencia y desarrollo (Chédin, 2011; Sperger y col., 2003).

Por otro lado, IRF-3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) es un factor de transcripción asociado a la inmunidad innata (Honda y Taniguchi, 2006), que también interacciona con SALL2. Para identificar esta interacción, se sobre-expresó IRF-3 en células HEK 293T y posteriormente se sometió la muestra a purificación en tándem y espectrometría de masas (Li y col., 2015).

En todos los análisis por espectrometría de masas anteriormente señalados, las muestras se trataron previamente con benzonasa u otra nucleasa, con el objetivo de reducir las interacciones inespecíficas que puedan ocurrir a través del ADN y no través de complejos proteicos. La relevancia de la interacción de SALL2 con SOX2, SALL4, Dnmt3A/B o IRF-3 no ha sido dilucidada aún.

Otra proteína de unión a ADN con la que interacciona SALL2, corresponde al factor de transcripción Sp1 (*Specificity Protein 1*). Ambas proteínas reconocen secuencias en común, uniéndose de forma sinérgica al ADN *in vitro*. SALL2 y Sp1 interaccionan *in vivo*, pero al contrario de los estudios antes mencionados, el uso de la nucleasa benzonasa ha permitido demostrar que esta interacción es mediada por el ADN, es decir, ocurre de

forma indirecta a través del ADN, sin contacto físico entre las proteínas (Gu y col., 2011).

Con respecto a la actividad transcripcional de SALL2, la isoforma E1, pero no la isoforma E1A, contiene el dominio represor presente en todos los parálogos e interacciona con componentes del complejo NuRD, lo cual ha sido corroborado en células de riñón de mono, COS-1 (Lauberth y Rauchman, 2006). A pesar de lo anterior, se ha demostrado a través de ensayos de reportero que ambas isoformas son capaces de activar al promotor de *CDKN2A* (p16) y de reprimir a los promotores de *CCND1* (Ciclina D1), *CCNE1* (Ciclina E1) y *c-MYC* (Hermosilla y col., 2017b; Wu y col., 2015), sugiriendo que otras regiones de la proteína también podrían participar en el reclutamiento de remodeladores de cromatina.

En el parálogo SALL1, la unión con el complejo represor NuRD es inhibida por fosforilación mediada por PKC (Proteína Quinasa C) en el residuo de serina 2, el cual se encuentra conservado en todos los parálogos (Lauberth y col., 2007). Lo anterior sugiere que la interacción entre SALL2 y el complejo NuRD podría ser regulado de igual forma, aunque no existen reportes que indiquen que el residuo de serina 2 se encuentra fosforilado en SALL2 (base de datos PhosphoSite Plus (Hornbeck y col., 2015)).

También en células COS-1, se ha reportado la interacción entre SALL1 y SALL2, de forma independiente del dominio represor (Kiefer y col., 2003).

Adicionalmente, células de riñón de mono COS-7 transfectadas con vectores que codifican para SALL1, SALL2 y SALL4, muestran una colocalización de los tres parálogos en dominios nucleares discretos (Böhm y col., 2008), los que han sido definidos como regiones de heterocromatina (Netzer y col., 2001). SALL1 y SALL4 adquieren esta disposición nuclear específica a través del último o últimos dos pares de dedos de Zinc del extremo carboxilo terminal, respectivamente (Sakaki-Yumoto y col., 2006). El último par de dedos de Zinc en el extremo carboxilo terminal de SALL2 no es homólogo a los de SALL1 y SALL4 (Kohlhase y col., 2000; Sánchez y col., 2011; Sweetman y Munsterberg, 2006), y se desconoce si interviene en la localización de la proteína.

Como se mencionó anteriormente, el dominio represor presente en la isoforma E1 contiene una potencial secuencia de localización nuclear (NLS) entre los residuos 3-8, determinada con las herramientas NucPred y NLStradamus (Brameier y col., 2007; Nguyen Ba y col., 2009). La isoforma E1A no contiene esta secuencia, sin embargo, estudios de nuestro laboratorio determinaron que en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), la proteína SALL2 se localiza exclusivamente en el núcleo (Escobar y col., 2015). Este modelo celular expresa predominantemente la isoforma E1A (Hermosilla y col., 2017b). De forma consistente, SALL2 E1A de ratón en fusión a GFP, también se localiza a nivel nuclear al ser sobreexpresada en células HEK 293 (Escobar y col., 2015), sugiriendo que para el importe nuclear intervienen otras regiones de la proteína, al menos en esta isoforma. A este respecto, análisis

bioinformáticos con la herramienta cNLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) predice potenciales secuencias de localización nuclear en regiones internas de la proteína. Estas NLS son del tipo bipartitas, caracterizadas por dos regiones o *clusters* de residuos básicos, separados por 10 a 12 residuos de cualquier tipo (Kosugi y col., 2009). Por ahora, se desconocen los mecanismos de importe nuclear para ambas isoformas, puesto que la funcionalidad de las regiones identificadas por las distintas herramientas bioinformáticas no ha sido determinada.

### 1.7.2.- Regulación Transcripcional:

La expresión de *SALL2* se ve afectada ante una gran variedad de contextos celulares, obteniéndose, en algunos casos, resultados opuestos dependiendo del modelo experimental, sugiriendo que *SALL2* es un gen de regulación compleja. Los niveles de *SALL2* varían en condiciones que incluyen la privación de suero (Liu y col., 2007; Sung y col., 2011), el tratamiento con drogas quimioterapéuticas como etopósido (Gu y col., 2011; Sung y col., 2012), doxorubicina (Escobar y col., 2015) y temozolomida (TMZ) (Di Cristofori y col., 2015), o radiación utilizada en radioterapia contra el cáncer, del tipo X (Luo y col., 2017) o  $\gamma$  (Baulch y col., 2015). El detalle de estos y otros estudios se resume en la Tabla 2.

Algunos estudios han relacionado la expresión de *SALL2* con factores de transcripción indispensables para la pluripotencia, como *NANOG* y *POU5F1* (OCT-4). En el primer caso, se detectó un sitio de unión para *NANOG*, ubicado a 6347 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción en células madre embrionarias humanas, hESCs (Boyer y col., 2005). Sin embargo, en células madre embrionarias de ratón, mESCs, no se han identificado sitios de unión para *NANOG*. Más aún, el silenciamiento de *Nanog* en estas células no se asocia a variaciones en la expresión de *Sall2* (Loh y col., 2006). En este mismo trabajo, el silenciamiento de otro factor de transcripción pluripotente, *Pou5f1* (OCT-4), si conlleva a una disminución en los niveles de *Sall2* (base de datos GEO # GSE4189 (Loh y col., 2006)), aunque este gen no es incluido en la lista de genes diferencialmente expresados en esta condición. Ante estos antecedentes, la interrogante de si *SALL2* es regulado por *NANOG* o *SOX2* permanece abierta.

La delección del gen del inhibidor de apoptosis, Survivina (*Birc5*), se ve acompañada de una hematopoyesis defectuosa y una reducción en la expresión de *Sall2* en células madre hematopoyéticas (HSCs) de ratón. Este fenotipo es atribuido, al menos en parte, a la disminución de la expresión del factor de transcripción *Evi-1* (*Ecotropic Viral Integration Site-1*) (Fukuda y col., 2015). Consistentemente, HSCs deletadas para *Evi-1* presentan un fenotipo similar al de HSCs deletadas para *Birc5*, y también manifiestan una reducida expresión

de *Sal/2* (Goyama y col., 2008), sugiriendo que *Sal/2* sería regulado de forma indirecta por Survivina, a través de Evi-1.



Regulador/ Estímulo	Efecto	Contexto celular	Aproximación experimental	Ref.
<b>Deprivación de Suero</b>	Aumento de expresión	Se cultivaron fibroblastos humanos primarios en ausencia de suero para inducir quiescencia.	Microarreglos de ARNc	(Liu y col., 2007)
			RT-PCR cuantitativo	(Sung y col., 2011)
<b>Etopósido</b>	Aumento de expresión	Se trataron células de epitelio ovárico HOSE con etopósido. Incremento de <i>SALL2</i> relacionado a un aumento en la unión a los promotores de <i>BAX</i> y <i>c-MYC</i> . Acompañado de apoptosis.	RT-PCR cuantitativo	(Gu y col., 2011; Sung y col., 2012)
<b>Doxorubicina</b>	Disminución y luego aumento de expresión	MEFs tratadas con doxorubicina por distintos periodos de tiempo y células de leucemia linfocítica aguda Jurkat tratadas por varios tiempos. Acompañado de muerte celular.	RT-PCR cuantitativo	(Escobar y col., 2015)
<b>Temozolomi- da (TMZ)</b>	Aumento de expresión	Cultivos de muestras de GBM tratados con el alquilante TMZ. Acompañado de una disminución en la proliferación.	RT-PCR cuantitativo	(Di Cristofori y col., 2015)
<b>Radiación y aguda</b>	Aumento de expresión	Se irradiaron células primarias de GBM. La tasa proliferativa disminuyó a los 7 días, y una de tres líneas celulares presentó aumento en los niveles de <i>SALL2</i> .	RT-PCR cuantitativo	(Baulch y col., 2015)
	Disminución de expresión (proteína)	Se irradiaron ratones <i>Tp53<sup>ER/ER</sup></i> previamente tratados con 4-hidroxitamoxifeno para restituir p53. Luego, se aislaron los tejidos radiosensibles (timo e intestino).	<i>Western blot</i>	(Farkas y col., 2013)

Regulador/ Estímulo	Efecto	Contexto celular	Aproximación experimental	Ref.
<b>Radiación X</b>	Cambios en patrones de metilación de promotor P1	Líneas celulares de cáncer esofágico TE-1 y Eca-109 se irradiaron con radiación X. Asociado a disminución en los niveles de SALL2 y fenotipo agresivo en células radioresistentes.	Secuenciación por bisulfito	(Luo y col., 2017)
<b>Ácido Retinoico</b>	Aumento de expresión (sólo isoforma E1)	Se les suministró ácido retinoico en concentraciones teratogénicas a hembras C57BL/6, 10.5 días d.p.c. Las hembras se sacrificaron 6 horas después y se analizaron embriones.	RT-PCR cuantitativo	(Kojima y col., 2013)
<b>Ácido Valproico (VPA)</b>	Disminución de expresión (sólo isoforma E1)	Se les suministró VPA en concentraciones teratogénicas a hembras NMRI, 8 días d.p.c. Las hembras se sacrificaron para colectar embriones. También se utilizaron células de carcinoma embrionario de ratón, P19.	Microarreglos de ARNc y validación por RT-PCR cuantitativo	(Kultima y col., 2010)
<b>miR-302/307 (cluster de 5 micro ARN)</b>	Disminución de expresión	Se infectaron células de glioblastoma U87-MG y SKMG3, para expresar establemente el <i>cluster</i> de miR 302-307. Acompañado de una disminución del potencial tumorigénico.	RT-PCR cuantitativo	(Yang y col., 2015)
<b>Receptores TR<math>\alpha</math>1-TR<math>\beta</math>1/hormona tiroidea T3</b>	Aumento de expresión	Células de hepatocarcinoma Hep G2 que expresan de forma estable el receptor nuclear de hormona tiroidea TR $\alpha$ 1 o TR $\beta$ 1, se trataron con hormona tiroidea T3 durante 6 horas.	Microarreglos de ADNc y validación por RT-PCR	(Chan y Privalsky, 2009)

Regulador/ Estímulo	Efecto	Contexto celular	Aproximación experimental	Ref.
<b>NANOG (FT)</b>	Identificación de sitio de unión	hESCs. Unión de Nanog ubicado a 6347 pb corriente arriba de sitio de inicio de transcripción.	ChIP y microarreglos de ADN	(Boyer y col., 2005)
<b>CHD7 (ATPasa remodeladora de cromatina)</b>	Identificación de sitio de unión	hESCs. Unión de CDH7 ubicado a 1099 pb corriente abajo de sitio de inicio de transcripción.	ChIP-Seq	(Engelen y col., 2011)
<b>SOX5, SOX6, SOX9 (FT)</b>	Aumento de expresión	Se sobreexpresó SOX5, SOX6 o SOX9 (cada uno individualmente) de forma transiente en células HEK 293.	Microarreglos de ARNc	(Sha y col., 2012)
<b>EVI-1 (FT)</b>	Aumento de expresión	Se compararon niveles de expresión en HSCs de ratones <i>Evi-1<sup>ff</sup></i> transducidas con GFP v/s Cre-GFP. <i>Sall2</i> disminuyó en el último caso. <i>Evi-1</i> y <i>SALL2</i> exhiben un patrón de expresión similar en muestras de leucemia mieloide aguda (AML).	Microarreglos de ADNc y base de datos GEO # GSE1159 (Valk y col., 2004)	(Goyama y col., 2008)
<b>Survivina (Inhibidor de apoptosis, gen <i>Birc5</i>)</b>	Aumento de expresión	Se compararon niveles de expresión en HSCs de ratones <i>Birc<sup>ff</sup></i> v/s <i>Birc5<sup>ff</sup>-Cre<sup>ER</sup></i> , tratados con tamoxifeno. HSCs deletadas de <i>Birc5</i> (Survivina), exhiben una disminuída expresión de <i>Sall2</i> y <i>Evi-1</i> . <i>Birc5</i> regula la función/ mantención de HSCs, en parte a través de <i>Evi-1</i> .	Microarreglos de ADNc y validación por RT-PCR	(Fukuda y col., 2015)

**Tabla 2.- Estímulos y potenciales reguladores de la expresión de *SALL2*.** La mayor parte de los antecedentes provienen de análisis de secuenciación masiva en distintos contextos celulares. Ref.: referencia bibliográfica. FT: Factor de transcripción. Fuente: propia.

Al margen de los análisis masivos, otros estudios han permitido recabar información más detallada con respecto a la regulación transcripcional de *SALL2*. Ensayos de reportero han demostrado que tanto el promotor P1 como el promotor P2 de *SALL2* son reprimidos por el supresor tumoral WT1 (*Wilms Tumor 1*; (Ma y col., 2001)). El gen *WT1* es esencial para el desarrollo renal y se encuentra mutado en tumor de Wilms, el tipo más común de tumor pediátrico, de características histológicas y moleculares similares a las del riñón en desarrollo (Rivera y Haber, 2005). Como se indicó anteriormente, la expresión de *SALL2* se encuentra elevada en este tipo de tumores, con respecto a tejido de riñón fetal (Li y col., 2002). Sin embargo, aún se desconoce si el aumento en la expresión de *SALL2* en tumor de Wilms es causado por una disminución de la represión transcripcional ejercida por WT1, en virtud de las mutaciones descritas para este factor de transcripción en esta patología.

El análisis bioinformático de la secuencia del promotor P2, desde el cual se origina la isoforma E1A, identificó múltiples sitios de unión para el factor de transcripción AP4 (*Activating Enhancer-Binding Protein 4*) (Ma y col., 2001). En fibroblastos humanos en estado de quiescencia por privación de suero, tanto los niveles de *SALL2* como de *TFAP4* se encuentran elevados con respecto a condiciones de cultivo estándar. Al añadir TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) como estímulo mitogénico, la expresión de ambos factores de transcripción decae. Adicionalmente, ensayos de reportero indican que AP4 activa al promotor P2 de *SALL2*. De forma consistente, la sobreexpresión o

silenciamiento de *TFAP4* afecta de manera positiva o negativa la actividad del promotor de *SALL2*, respectivamente (Sung y col., 2011). Estos resultados sugieren que AP4 regula la expresión de *SALL2* en las condiciones antes mencionadas. Sin embargo, no se ha determinado si AP4 se une directamente al promotor P2.

De los estudios publicados a la fecha, sólo se ha demostrado que el supresor tumoral p53 regula directamente a *SALL2*. Mediante ensayos de reportero, se determinó que p53 reprime al promotor P2 en distintos modelos celulares. La unión de p53 al promotor *in vitro* e *in vivo*, se confirmó por EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), respectivamente. Tanto la represión como la unión de p53 al promotor aumentan en respuesta al agente genotóxico Doxorubicina. De manera importante, la represión de la actividad del promotor P2 es ejercida sólo por p53 en estado *wild type* y no por las formas mutantes frecuentemente encontradas en cáncer. Los autores de este trabajo discuten sobre la posibilidad de que los niveles de *SALL2* en pacientes de cáncer sean dependientes del estado de p53 (Farkas y col., 2013).

Finalmente, estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que Sp1 regula positivamente a *SALL2*. Sp1 activa al promotor P2 y se une a éste *in vitro* y en células en cultivo. La unión de Sp1 y del co-activador transcripcional p300 se ve favorecida en respuesta al inhibidor de histonas deacetilasas,

tricostatina A (TSA), lo cual se correlaciona con un aumento en los niveles de *SALL2* E1A y con una disminución de la viabilidad en células de leucemia linfocítica aguda, Jurkat (Escobar y col., 2017). Esta regulación podría formar parte de un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que que ambas isoformas de *SALL2* reprimen la actividad del promotor de *SP1* en células de cáncer de ovario, SKOV-3 (Wu y col., 2015).

En síntesis, a la fecha se han identificado distintos estímulos y posibles reguladores transcripcionales de *SALL2*. WT1 reprime la actividad de los promotores P1 y P2 (Ma y col., 2001) y AP4 aumenta la actividad del promotor P2, que da lugar a la isoforma E1A (Sung y col., 2011). Hasta ahora, los únicos reguladores transcripcionales directos de *SALL2* corresponden a los factores de transcripción p53 y Sp1, los cuales regulan negativa y positivamente la expresión de la isoforma E1A, respectivamente (Escobar y col., 2017; Farkas y col., 2013).

### **1.7.3- Regulación post-traducciona:**

Las modificaciones post-traduccionales pueden influir directa o indirectamente sobre la función de los factores de transcripción, al modular, por ejemplo, la localización subcelular, estructura, interacciones con factores co-reguladores, afinidad por el ADN, actividad o estabilidad de la proteína,

impactando así sobre la expresión génica. Las principales modificaciones post-traduccionales que afectan a factores de transcripción incluyen fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, acetilación, glicosilación y metilación (Filtz y col., 2014). La fosforilación y la ubiquitinación son relevantes para el desarrollo de esta tesis y de detallan a continuación.

- **Fosforilación:** modificación post-traducciona l rápidamente reversible, ampliamente utilizada por la célula para transducir señales extracelulares hacia el núcleo (Filtz y col., 2014; Whitmarsh y Davis, 2000). Para ello, enzimas denominadas quinasas catalizan la transferencia del grupo fosfato desde la posición  $\gamma$  de una molécula de ATP a un grupo hidroxilo en residuos específicos de serina, treonina o tirosina (Adams, 2001).

- **Ubiquitinación:** Ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Swatek y Komander, 2016). Esta proteína se une de forma covalente al sustrato, a través de un enlace isopeptídico -un tipo de enlace amida que no involucra solamente átomos de la cadena principal- entre un residuo de glicina carboxilo terminal de la ubiquitina y el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina en el sustrato (Bhat y Greer, 2011). Una molécula de ubiquitina contiene además siete residuos de lisina, cada uno de los cuales puede ser ubiquitinado para dar lugar a cadenas de poliubiquitinación. La extensión

más común de la cadena de ubiquitina es a partir del residuo de lisina 48, y se relaciona con la degradación de los sustratos por el proteosoma 26S (Swatek y Komander, 2016), un complejo multiproteico de 2.5 MDa., localizado en el núcleo y citoplasma de células eucariontes (Chen y col., 2011). El proteosoma 26S se constituye de un *core* catalítico 20S y uno o dos *core* regulatorios 19S. Estos últimos son responsables del reconocimiento de proteínas poliubiquitinadas, de su deubiquitinación para el reciclaje de moléculas de ubiquitina, y del desplegamiento y traspaso de sustratos al *core* catalítico para ser degradadas a péptidos de cuatro a 14 residuos (Voutsadakis, 2017). La adición de ubiquitina a un sustrato es un proceso dependiente de ATP que ocurre en tres pasos e involucra a una enzima activadora de ubiquitina (E1) que cataliza la formación de un intermediario ubiquitina-adenilato (unido por un enlace tioéster a un residuo de cisteína), el cual es traspasado a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2), y posteriormente transferido desde la enzima E2 al sustrato por una enzima ubiquitina-ligasa E3; (Bhat y Greer, 2011).

De acuerdo a la información disponible en la base de datos Phosphosite Plus (Hornbeck y col., 2015), SALL2 es una proteína que se encuentra fosforilada a lo largo de toda su secuencia (Figura 6.A), bajo distintas condiciones experimentales. A pesar de que se han identificado múltiples sitios de fosforilación a través de análisis masivos por espectrometría de masas, aún no se tiene información sobre las quinasas que incorporan estos grupos fosfato,

en qué circunstancias se favorecen estas modificaciones y cuál sería la relevancia de las mismas.

SALL2 también es blanco de ubiquitinación en los residuos de lisina 246, 515, 598 y 911 (Figura 6.A) (Mertins y col., 2013; Tan y col., 2008; Wagner y col., 2011). Sin embargo, se desconocen las condiciones en las que ocurren estas modificaciones, así como también las enzimas ubiquitinas ligasas que incorporan las moléculas de ubiquitina en los residuos antes mencionados.

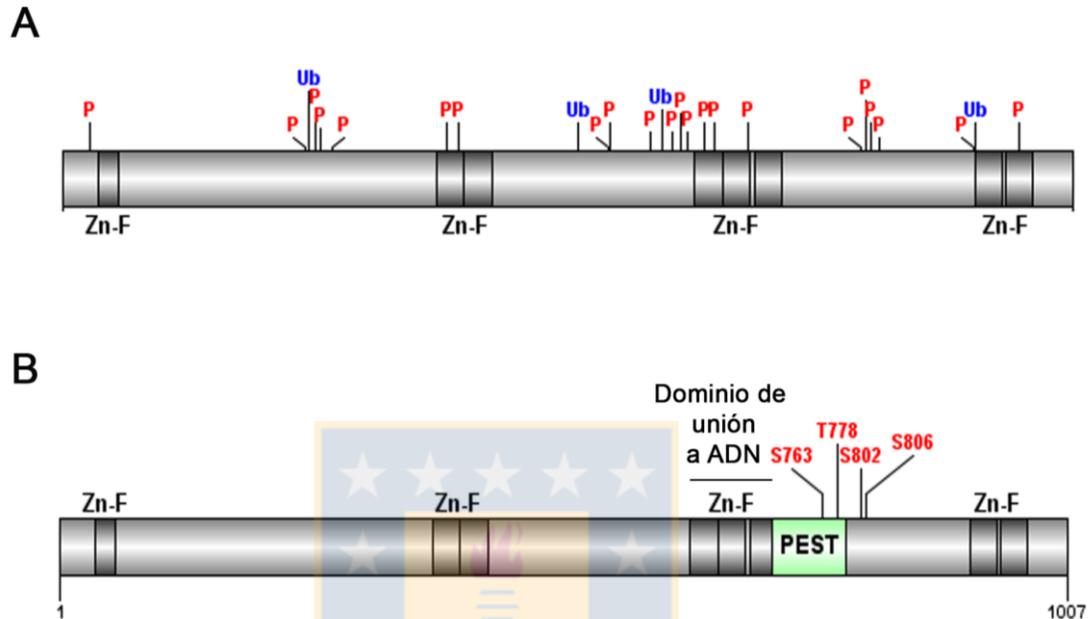
A la fecha, sólo existe un estudio que plantea un mecanismo de regulación de SALL2 a través de modificaciones post-traduccionales (Sung y col., 2011). En dicho trabajo, se señala que la restitución de suero como estímulo proliferativo en fibroblastos en estado de quiescencia, provoca una disminución de los niveles de la proteína SALL2, a través de su ubiquitinación y posterior degradación mediada por proteasoma. Este evento es dependiente de un complejo proteico compuesto por la ubiquitina-ligasa CUL4B (Culina 4B) en conjunto con DDB1 (proteína de unión a DNA dañado 1) y RBBP7 (proteína de unión a Retinoblastoma 7). Esta última actuaría como receptor de SALL2, mediando su unión al complejo ubiquitina-ligasa (Sung y col., 2011). De forma interesante, RBBP7, también conocida como RbAp46, forma parte del complejo represor NuRD (Torchy y col., 2015), con el que interacciona SALL2 (Lauberth y Rauchman, 2006)

Considerando que 1) la fosforilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes, y aun así, específica (Ubersax y Ferrell Jr, 2007), sumado al hecho de que 2) a la fecha se han identificado cerca de 18 sitios de fosforilación en la secuencia de SALL2, conservados entre humano y ratón (Figura 6.A), y que 3) las quinasas responsables de dichas fosforilaciones aún no han sido identificadas (Hornbeck y col., 2015), se realizó una búsqueda bioinformática preliminar con el objetivo de identificar quinasas que pudieran reconocer los sitios de fosforilación señalados en Phosphosite Plus, y regular de esta forma a SALL2. Adicionalmente, tomando en cuenta que 1) se han identificado cuatro sitios de ubiquitinación en SALL2 (Mertins y col., 2013; Tan y col., 2008; Wagner y col., 2011), los cuales también se encuentran conservados entre humano y ratón (Figura 6.A), y que 2) SALL2 es blanco de una ubiquitinasa de la familia de las Culinas, las cuales reconocen sustratos previamente fosforilados (Teixeira y Reed, 2013), se realizó una búsqueda bioinformática para identificar secuencias putativas de degradación PEST. Estas secuencias corresponden a regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T) y, en menor medida, ácido aspártico (D), flanqueadas por residuos básicos, y se encuentran presentes en proteínas de vida media corta por degradación intracelular (Rogers y col., 1986). En conjunto, este análisis preliminar permitió detectar cuatro sitios potenciales de fosforilación mediada por una quinasa llamada Caseína Quinasa II (CK2). Estos sitios corresponden a los residuos S763, T778, S802 y S806, y se ubican en o adyacentes a una

potencial secuencia de degradación PEST, localizada en el extremo carboxilo terminal de SALL2, (Figura 6.B).

Estos antecedentes son relevantes, ya que CK2 regula la estabilidad de proteínas a partir de la fosforilación en secuencias PEST, como es el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibidor  $\alpha$  de NF- $\kappa$ B) en mamíferos (Lin y col., 1996) y su homólogo en *Drosophila melanogaster*, Cactus (Liu y col., 1997). Adicionalmente, existe evidencia que indica que el ortólogo de SALL2 en *D. melanogaster*, Salm, interacciona con CK2 (Trott y col., 2001), y que el parólogo SALL3 también es fosforilado *in vitro* por CK2 (Tarrant y col., 2012), sugiriendo que, de existir un eje de regulación SALL2-CK2, podría tratarse de un mecanismo conservado.

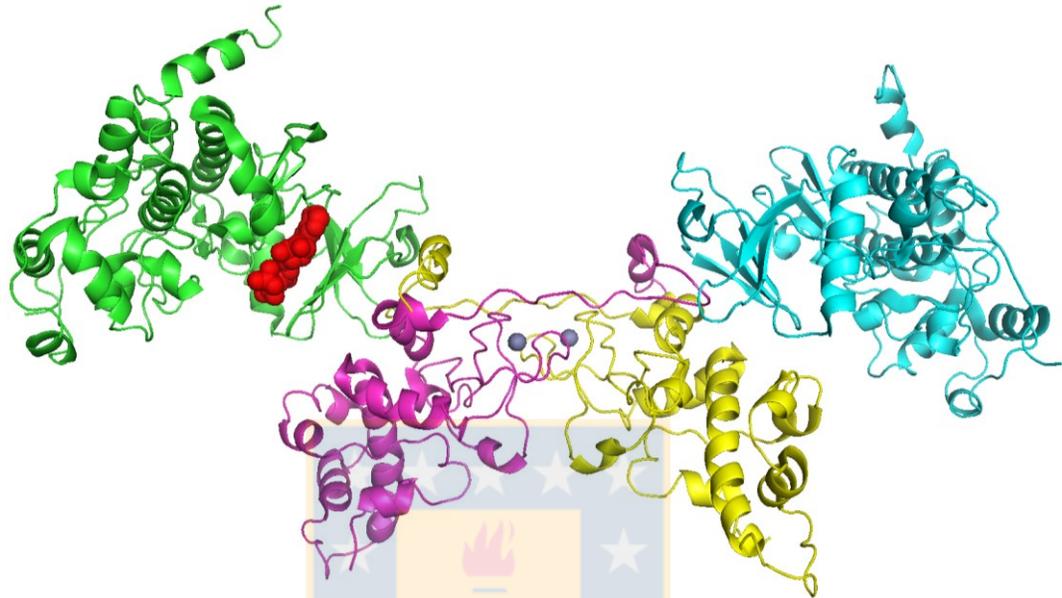




**Figura 6.- SALL2 contiene sitios putativos para fosforilación mediada por CK2. A.-** Representación esquemática de la proteína SALL2 humana con sitios de modificaciones post-traduccionales reportados en literatura. Los sitios que se han identificado como fosforesiduos por análisis masivos -de acuerdo a la información contenida en Phosphosite (Hornbeck y col., 2015)- se indican con la letra “P” en rojo. Los residuos de lisina que se han identificado como sitios de ubiquitinación, se muestran como “Ub”, en azul (Mertins y col., 2013; Tan y col., 2008; Wagner y col., 2011). Los motivos de dedos de Zinc (Zn-F) se representan en gris oscuro. **B.-** Representación esquemática de la proteína SALL2 humana con sitios putativos de fosforilación mediada por CK2 (S763, T778, S802, S806), indicados en rojo. Los residuos S802 y S806 se encuentran fosforilados en células en cultivo, por quinasas aún no identificadas. En verde se destaca la potencial secuencia de degradación PEST, ubicada entre los residuos 713-786, adyacente al dominio de unión a ADN. Fuente: propia.

## 1.8.- Caseína Quinasa II (CK2)

Caseína quinasa II (CK2) es una serina-treonina quinasa altamente conservada y de expresión ubicua, con roles en una variedad de procesos celulares que incluyen diferenciación, apoptosis, transcripción, reorganización del citoesqueleto, proliferación e infección viral (Kramerov y Ljubimov, 2012; St-Denis y Litchfield, 2009). Frecuentemente se presenta como un tetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas,  $\alpha$  y/o  $\alpha'$ , y dos subunidades regulatorias  $\beta$  (Figura 7). Las dos subunidades catalíticas, CK2 $\alpha$  (42-44 kDa.) y CK2 $\alpha'$  (38 kDa.) son producto de genes individuales con más de un 90% de identidad de secuencia, difiriendo en sus extremos carboxilo terminal (St-Denis y Litchfield, 2009). La subunidad regulatoria CK2 $\beta$  (25 kDa.) regula la actividad, estabilidad y especificidad de la enzima y no presenta similitud con las subunidades catalíticas (Blanquet, 2000). Tanto la holoenzima como sus subunidades catalíticas aisladas son constitutivamente activas, con capacidad de usar tanto GTP como ATP (Allende y Allende, 1995). El motivo de fosforilación reconocido por CK2 es S/T-X-X-E/D, donde el residuo ácido puede corresponder a un residuo de serina, treonina o tirosina fosforilado (Allende y Allende, 1995; Kuenzel y col., 1987). Si bien CK2 se encuentra como holoenzima, algunos sustratos sólo pueden ser fosforilados por las subunidades catalíticas en estado monomérico (St-Denis y Litchfield, 2009). A la fecha, se han identificado más de 300 sustratos para CK2 (Bian y col., 2013; Meggio y Pinna, 2003), que darían cuenta del rol pleiotrópico de CK2.



**Figura 7.- Estructura de holoenzima Caseina Kinasa II.** La estructura tridimensional de holoenzima (PDB: 1JWH visualizada en PyMOL) contiene dos subunidades catalíticas alfa, representadas en verde y cian, y dos subunidades regulatorias beta, mostradas en amarillo y morado. En rojo se aprecia una molécula del análogo no hidrolizable de ATP, adenil-5-imido difosfato (AMP-PNP). En azul se observan iones de Zinc. Fuente: modificado de Niefind y col., 2001. Fuente: propia.

Al igual que SALL2, CK2 es importante para el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo de *X. laevis*, la actividad la holoenzima CK2 es necesaria para la formación del eje dorsal, a través de la regulación positiva de la vía Wnt en estadíos tempranos (Dominguez y col., 2005, 2004). CK2 regula positivamente a la vía Wnt canónica en distintos niveles, lo cual se ha propuesto también como un mecanismo que favorecería procesos neoplásicos (Dominguez y col., 2009).

Los modelos murinos *knock-out* para la subunidad CK2 $\beta$  o la subunidad CK2 $\alpha$  no son viables, mientras que los animales *knock-out* para CK2 $\alpha'$  si lo son, sin embargo, los machos son estériles. Estos antecedentes indican que ambas subunidades catalíticas cumplen roles fisiológicos distintos (St-Denis y Litchfield, 2009; Xu y col., 1999). El estudio del modelo murino *knock-out* para CK2 $\alpha$  permitió determinar que estos animales presentan defectos en la formación del corazón, así como también defectos en el cierre del tubo neural y un neuroepitelio más delgado, vesícula ótica anormal, arcos branquiales reducidos, y somitos y extremidades hipoplásicos. Estos animales son incapaces de progresar en el desarrollo más allá del estadio E11, indicando que CK2 $\alpha$  es importante para el correcto desarrollo embrionario (Dominguez y col., 2011; Lou y col., 2008; Seldin y col., 2008).

Al igual que SALL2, CK2 se expresa altamente en cerebro. Un análisis de expresión en pollo, determinó que CK2 es mucho más abundante en cerebro

que en otros tejidos (Maridor y col., 1991). Estos resultados son consistentes con otros estudios que indican que, durante el desarrollo cerebral en ratas, la subunidad  $\alpha$  se expresa tempranamente, antes que la isoforma  $\alpha'$ , y que, en ratas adultas, cerebro y testículos son los tejidos que presentan mayor actividad de CK2 (Blanquet, 2000). A nivel celular, CK2 participa en la inducción de crecimiento axonal en respuesta a NGF y su receptor p75NTR en neuronas hipocámpales (Arevalo y Rodríguez-Tébar, 2006).

Los niveles de expresión de CK2 tienden a ser relativamente estables, y pequeños cambios pueden tener un gran impacto en la homeostasis celular, puesto que su actividad promueve la proliferación y supervivencia (Trembley y col., 2009). En este contexto, se ha descrito que la actividad y/o expresión de CK2 se encuentra elevada en tejidos con alto índice proliferativo y en una variedad de tipos de cáncer que incluyen leucemia, cabeza y cuello, próstata, riñón, glándula mamaria y pulmón. (Duncan y Litchfield, 2008; Gowda y col., 2017). En este contexto, existen diversas evidencias a la fecha, que relacionan la expresión de CK2 con procesos neoplásicos. Un ejemplo de ello proviene de estudios en donde la sobre-expresión de cualquiera de las subunidades catalíticas de CK2 coopera con la proteína oncogénica HA-Ras para la transformación de fibroblastos primarios de rata (Orlandini y col., 1998). En animales transgénicos que sobre-expresan CK2 $\alpha$  en compartimentos linfoides, la quinasa exhibe una actividad oncogénica que se manifiesta con la generación de linfomas en la población adulta. De manera consistente, la cruza entre ésta y

otras líneas transgénicas de ratón ha demostrado una cooperación entre la expresión desregulada de CK2 y de los oncogenes c-MYC y TAL-1 (T-cell acute lymphocytic leukemia 1) en el desarrollo de linfoma/leucemia (Olsten y Litchfield, 2004). Este efecto también se observa al cruzar ratones transgénicos que sobre-expresan CK2 en linfocitos T, con ratones  $p53^{-/-}$  o  $p53^{+/-}$  (Landesman-Bollag y col., 1998). De forma interesante, el efecto aditivo de la sobre-expresión de CK2 en la supervivencia de ratones  $p53^{-/-}$  es similar al observado en ratones  $Sall2^{-/-}/p53^{-/-}$  (Chai, 2011).

Todos los antecedentes planteados anteriormente indican que CK2 actúa como un factor positivo para el desarrollo del cáncer. Este efecto puede ser mediado a través de la regulación de los procesos de crecimiento y proliferación, supervivencia y/o angiogénesis (Duncan y Litchfield, 2008; Kramerov y Ljubimov, 2012). A este respecto, el rol de CK2 en proliferación celular ha sido ampliamente estudiado. La inhibición farmacológica de CK2 en células de epitelio mamario murino, que sobre-expresan Wnt1, se arrestan en fase G2/M del ciclo celular (Song y col., 2000), consistente con lo observado por inhibición farmacológica de CK2 en la línea celular de cáncer de ovario, A2780 (Siddiqui-Jain y col., 2012). Este efecto parece ser dependiente del tipo celular, puesto que el arresto del ciclo puede ocurrir también en G1 (Siddiqui-Jain y col., 2010). Adicionalmente, la inhibición de las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  con oligonucleótidos antisentido impide la proliferación celular inducida por el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y por la adición de suero en fibroblastos

humanos IMR-90 en quiescencia (Pepperkok y col., 1991). En este mismo contexto, la adición de suero como estímulo mitogénico a fibroblastos de ratón NIH 3T3 en estado de quiescencia, incrementa la actividad de CK2 (Orlandini y col., 1998).

Además del su rol en proliferación, CK2 también ejerce funciones clave en la sobrevivencia celular. La sobre-expresión de CK2 protege contra la inducción de apoptosis por etoposido y por la forma sintética de estrógeno, dietilestilbestrol, en líneas celulares de cáncer de próstata (Guo y col., 2001). De forma consistente, la actividad de CK2 es alta en líneas celulares de cáncer que son resistentes a apoptosis inducida por la citoquina TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), en comparación con líneas celulares sensibles a esta condición. Sin embargo, el silenciamiento o inhibición farmacológica de CK2 en células resistentes, induce un incremento significativo de la muerte celular en respuesta a la citoquina (Shin y col., 2005). La inhibición farmacológica de CK2 promueve la muerte celular en diferentes modelos en cultivo, en presencia o ausencia de estímulos apoptóticos, y ejerce un efecto antitumoral *in vivo* (Bian y col., 2015; Pierre y col., 2011; Siddiqui-Jain y col., 2012; Song y col., 2015). Favorablemente, la inhibición de CK2 en células no tumorales no induce apoptosis (Siddiqui-Jain y col., 2010).

Los mecanismos moleculares a través de los cuales CK2 promueve la proliferación y sobrevivencia celular son variados. La fosforilación mediada por

CK2 puede modificar la estabilidad, actividad y/o localización subcelular de sus sustratos, regulando positivamente a oncogenes y negativamente a supresores tumorales (Duncan y Litchfield, 2008; Plotnikov y col., 2011). Adicionalmente, CK2 promueve la sobrevivencia celular al impedir la activación por clivaje de proteínas pro-apoptóticas. Esto se debe a que los sitios de fosforilación por CK2 se encuentran cercanos a, ó en los sitios reconocidos por caspasas (Desagher y col., 2001; Shin y col., 2005; Turowec y col., 2013).

A pesar de ser considerada como una quinasa constitutivamente activa, la actividad de CK2 puede verse incrementada en presencia de poliaminas como la espermina, y disminuída en presencia de polianiones como la heparina (Allende y Allende, 1995; Blanquet, 2000). La actividad de CK2 también se ve aumentada en condiciones de estrés como tratamiento con el inhibidor de oxidación mitocondrial arsenito, la citoquina inflamatoria TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), radiación UV, *shock* osmótico o inhibición de síntesis proteica por anisomicina, en un efecto que es dependiente de la quinasa activada por mitógeno, p38 (p38 MAPK) (Kato y col., 2003; Sayed y col., 2000; Scaglioni y col., 2006). Incrementos en la actividad de CK2 también han sido registrados en respuesta a hipoxia y etopósido. En este último caso, el aumento de actividad ocurre a nivel nuclear (Guo y col., 2001; Mottet y col., 2005). Otros estímulos que también promueven un aumento de la actividad de CK2 son NGF o al factor de crecimiento epidermal, EGF, en células de feocromocitoma de rata, PC12 (Kleijn y col., 1998). De manera interesante, la inducción de la proliferación por

adición de suero a fibroblastos de ratón NIH3T3 en estado de quiescencia, también gatilla un aumento en la actividad de CK2 (Orlandini y col., 1998). Este efecto es opuesto al descrito para SALL2, en donde la restitución de suero como estímulo proliferativo en fibroblastos humanos en estado de quiescencia, gatilla la degradación proteosomal del factor de transcripción (Sung y col., 2011).

En cuanto a las modificaciones post-traduccionales que regulan a CK2, se ha descrito que, en respuesta a EGF, CK2 es fosforilado por ERK2 (*Extracellular Signal-regulated Kinase 2*) en los residuos T360 y S362. Esta fosforilación aumenta la actividad de CK2 y con ello, también la trans-activación del co-activador transcripcional  $\beta$ -catenina y la capacidad invasiva en células de carcinoma epidermoide, A431 (Ji y col., 2009).

Finalmente, al igual que SALL2, CK2 es regulado de forma dependiente del ciclo celular. CK2 $\alpha$ , pero no CK2 $\alpha'$ , es fosforilado al comienzo de mitosis en los residuos T344, T360, S362 y S370 por la quinasa CDK1. La fosforilación/desfosforilación de estos residuos regula la localización de CK2 en el huso mitótico y es clave para la progresión del ciclo a través de esta etapa (Bosc y col., 1995; St-Denis y col., 2011, 2009). La subunidad regulatoria  $\beta$  también es fosforilada por CDK1 en el residuo de serina 209 (Litchfield y col., 1992). Estas fosforilaciones aumentan la actividad de la holoenzima CK2 *in vitro*

(Mulner-Lorillon y col., 1990) y la estabilidad de la subunidad  $\alpha$  en cultivo (Tarrant y col., 2012)

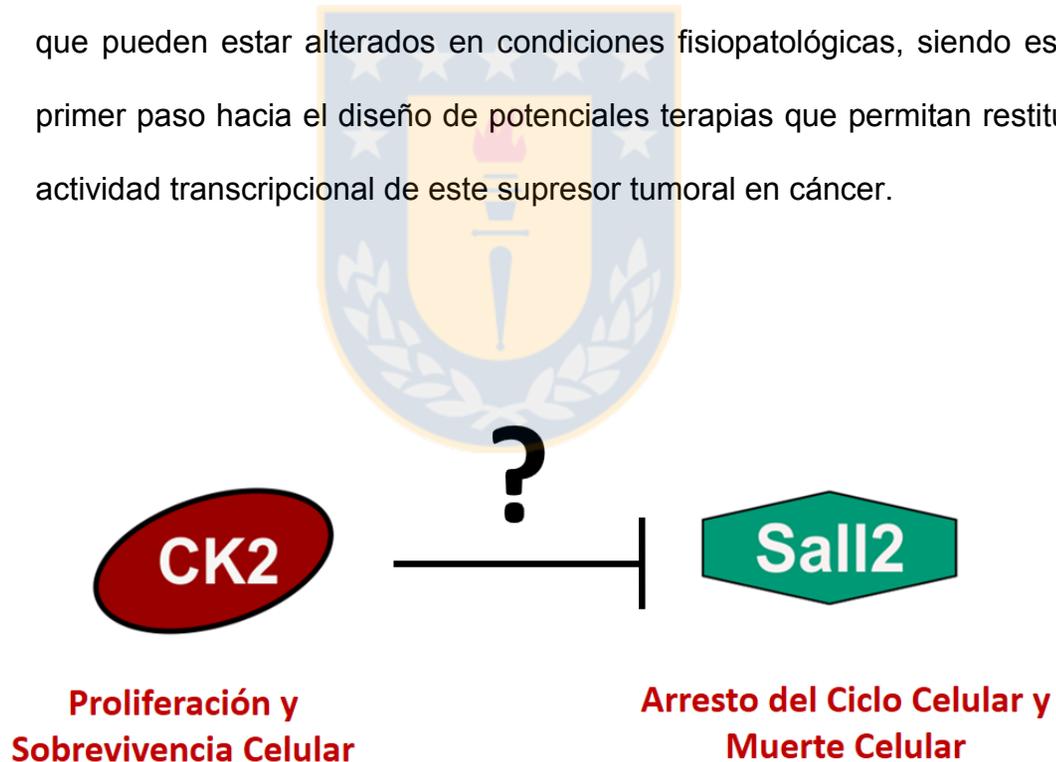
Los estudios previamente mencionados, indican que tanto *SALL2* como CK2 se expresan altamente en cerebro desde estadios tempranos y participan en procesos del desarrollo embrionario. Ambos genes se encuentran desregulados de forma opuesta en cáncer: la expresión de *SALL2* se encuentra disminuida en distintos tumores, mientras que la expresión o actividad de CK2 es elevada en tejidos tumorales, lo cual es consistente con los roles de cada proteína: *SALL2* gatilla el arresto del ciclo celular y la apoptosis, mientras que CK2 promueve la proliferación y la sobrevivencia celular. Adicionalmente, la actividad de CK2 aumenta ante el estímulo proliferativo en fibroblastos quiescentes, mientras que, en similares condiciones, la proteína *SALL2* es degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma. Durante el ciclo celular, ambas proteínas son reguladas de forma opuesta: CK2 se activa por fosforilación durante mitosis y la inhibición de su actividad conlleva a un arresto del ciclo celular, mientras que *SALL2* promueve la detención del ciclo celular y su silenciamiento conlleva a una inapropiada proliferación en ausencia de señales proliferativas (Liu y col., 2007). Finalmente, CK2 fosforila a supresores tumorales, disminuyendo su estabilidad, modificando su actividad o localización subcelular.

## 2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

En base a la evidencia disponible, SALL2 ejerce un rol como supresor tumoral al promover el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Hermosilla y col., 2017a). A pesar de lo anterior y de que SALL2 es relevante en procesos del desarrollo, existe un escaso conocimiento de los mecanismos de regulación transcripcional y post-traducciona l de SALL2. A través de análisis bioinformáticos, se detectaron sitios putativos de fosforilación mediada por CK2 en la secuencia proteica de SALL2, ubicados en, o adyacentes a una potencial secuencia de degradación PEST. CK2 es una serina-treonina quinasa, cuya actividad promueve la proliferación y sobrevivencia celular (St-Denis y Litchfield, 2009), a través de la regulación positiva de oncogenes y negativa de supresores tumorales (Duncan y Litchfield, 2008). Siendo SALL2 un supresor tumoral, cuya actividad es diametralmente opuesta a la actividad de CK2, se plantea una regulación negativa ejercida por CK2 sobre SALL2 (Figura 8). La presencia de una potencial secuencia de degradación PEST en SALL2, sugiere un mecanismo de regulación a través de degradación, el cual ya ha sido descrito para otros supresores tumorales (Ampofo y col., 2010; Lin y col., 1996; Scaglioni y col., 2006). Adicionalmente, este mecanismo podría corresponder a un proceso conservado, puesto que el ortólogo Salm interacciona con CK2 (Trott y col.,

2001) en *D. melanogaster*, y que el parólogo SALL3 también es fosforilado *in vitro* por CK2 (Tarrant y col., 2012).

La fosforilación constituye un mecanismo de regulación reversible y rápida, utilizada ampliamente por las células para transducir señales externas hacia el núcleo (Filtz y col., 2014; Whitmarsh y Davis, 2000). Comprender cómo ocurre la regulación post-traducciona de SALL2 mediada por fosforilación es esencial para vislumbrar los mecanismos moleculares que pueden estar alterados en condiciones fisiopatológicas, siendo este el primer paso hacia el diseño de potenciales terapias que permitan restituir la actividad transcripcional de este supresor tumoral en cáncer.



**Figura 8.- Esquema de propuesta de regulación post-traducciona de SALL2 mediada por CK2.** CK2 regularía negativamente a SALL2, siendo este uno de los mecanismos a través de los cuales CK2 promovería la proliferación y supervivencia celular. Fuente: propia.

### 3. HIPOTESIS

En base a lo anteriormente expuesto, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

**“El factor de Transcripción SALL2 es negativamente regulado por fosforilación mediada por CK2”.**



#### **4. OBJETIVO GENERAL**

**Identificar mecanismos de regulación post-traducciona l de SALL2 dependientes de CK2.**

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I.- Validar a SALL2 como sustrato de CK2.

II.- Determinar la relevancia fisiológica de la fosforilación de SALL2 mediada por CK2.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1.- Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Dimetilsulfóxido (DMSO): Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC-358801).
- Cicloheximida (CHX): Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC-3508).
- MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al): Sigma (No. Cat. # C2211).
- 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB): Sigma (No. Cat. # T0826).
- CX-4945 (Silmitasertib): MedChem Express (No. Cat. # HY-50855) para cultivo celular y Medkoo (No. Cat. # 200843) para espectrometría de masas y ensayos *in vitro*.

### 6.2.- Cultivo Celular

Las líneas celulares HL-60 (línea celular de leucemia promielocítica aguda humana, ATCC® CCL-240™), gentilmente cedidas por la Dra. Soraya Gutiérrez de la Universidad de Concepción) y H1299 (línea celular derivada de nodo linfático de cáncer de pulmón metastásico humano, ATCC® CRL-5803™) se cultivaron en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, HyClone)

suplementado con FBS al 10% v/v, L-glutamina 2 mM, Penicilina 50 U/mL y Estreptomicina 50 µg/mL (HyClone).

Las células SKOV-3 (línea celular derivada de adenocarcinoma ovárico, ATCC® HTB-77™, facilitadas por el Dr. Gareth Owen de la Pontificia Universidad Católica de Chile) se cultivaron en medio DMEM-F12 (Gibco) suplementado con FBS al 10% v/v, Penicilina 50 U/mL y Estreptomicina 50 µg/mL (HyClone).

Se cultivaron células HEK 293 (línea celular derivada de riñón embrionario humano, ATCC® CRL-1573™) y U2OS (línea celular derivada de osteosarcoma humano, ATCC® HTB-96™, cedidas por el Dr. Mario Galindo de la Universidad de Chile), en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, HyClone) alto en glucosa (4.5 g/L), suplementado con FBS al 10% v/v (suero bovino fetal, HyClone), L-glutamina 2 mM (HyClone), Penicilina 50 U/mL y Estreptomicina 50 µg/mL (HyClone). En las mismas condiciones, se cultivaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS, las cuales contienen un sitio único de inserción FRT para recombinación mediada por la recombinasa Flipasa, cedidas por la Dra. Karmella Haynes de Arizona State University (Haynes y Silver, 2011).<sup>1</sup>

Todos los cultivos celulares se incubaron en estufa a 37° C y atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

---

<sup>1</sup> Estas células se utilizaron para los ensayos de fosforilación *in vitro* y espectrometría de masas, con el objetivo de generar células estables para expresar SALL2 de forma inducible, con el sistema Flp-In™ T-REx™ System (Life Technologies, No. Cat. # K6500-01). Sin embargo, se desistió de este objetivo posteriormente, ya que estas células no son óptimas para ensayos de *xenograft* (8).

### 6.3.- Plásmidos

Los plásmidos utilizados se resumen en la Tabla 3.

Plásmido	Objetivo	No. Cat. / Ref.
<b>pGEX-4T-3</b>	Plásmido para expresión procarionte inducible de la enzima Glutación-S-Transferasa (GST) de <i>Schistosoma japonicum</i> , bajo el control del promotor tac, un promotor híbrido entre los promotores trp y lacUV5.	GE Healthcare No. Cat. # 27-1542-01.
<b>pGEX 3X-CK2<math>\alpha</math>-GST (pDB1)</b>	Plásmido para expresión procarionte inducible de la subunidad catalítica $\alpha$ de Caseína Quinasa II humana (CK2 $\alpha$ , gen <i>CSNK2A1</i> ), en fusión con GST.	Addgene No. Cat. # 27083 (Turowec y col., 2010).
<b>pQE81-L</b>	Plásmido para expresión procarionte inducible de proteínas de interés fusionadas a un epítipo de 6 histidinas en el extremo N-terminal, bajo el control del promotor PT5 (del fago T5).	Qiagen, No. Cat. # 32923.
<b>pQE81-L/hSall2 FL-His</b>	Plásmido pQE81-L en el cual se clonó la región codificante de la isoforma E1 del gen <i>SALL2</i> obtenida por digestión de pCMV2(NH)/Sall2-Flag. Esta región codifica para los aminoácidos 22 a 1007, en marco con la secuencia codificante para epítipo de 6 histidinas.	Generado para esta Tesis.
<b>pQE81-L/hSall2 C-ter- His</b>	Plásmido pQE81-L en el cual se clonó la región codificante de la isoforma E1 del gen <i>SALL2</i> obtenida desde pCMV2(NH)/ Sall2-Flag. Esta región codifica para los aminoácidos 689-1007, en marco con la secuencia codificante para epítipo de 6 histidinas.	Generado para esta Tesis.
<b>pQE81-L/hSall2 PEST-His</b>	Plásmido pQE81-L en el cual se clonó la región codificante de la isoforma E1 del gen <i>SALL2</i> obtenida desde pCMV2(NH)/ Sall2-Flag. Esta región codifica para los aminoácidos 687-820, en marco con la secuencia codificante para epítipo de 6 histidinas.	Generado para esta Tesis.

<b>Plásmido</b>	<b>Objetivo</b>	<b>No. Cat. / Ref.</b>
<b>pCMV2(NH)-Flag</b>	Plásmido de expresión eucarionte para clonamiento de regiones codificantes para proteínas, las cuales se expresan bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), en fusión a epítotope Flag en extremo amino terminal.	(Pincheira y col., 2009)
<b>pCMV2(NH)/Sall2-Flag (wild type y mutantes)</b>	Plásmido pCMV2(NH)-Flag en el cual se clonó la región codificante de la isoforma E1 del gen <i>SALL2</i> , en marco con la secuencia codificante para epítotope Flag. A partir de este constructo se generaron mutaciones sitio-dirigidas.	(Pincheira y col., 2009) Mutantes se Generaron para esta Tesis.
<b>pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag</b>	Plásmido pCMV2(NH)/Sall2-Flag en el cual se deletó región que codifica para segmento amino terminal correspondiente a los residuos 32 a 377 de la proteína SALL2-Flag (19 a 364 de la isoforma E1 humana), reteniendo epítotope Flag y secuencia putativa de localización nuclear.	Generado para esta Tesis.
<b>pCGN-HA</b>	Plásmido de expresión eucarionte para clonamiento de regiones codificantes para proteínas, las cuales se expresan bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), en fusión a epítotope de hemaglutinina derivado de virus de la influenza humana (HA) en extremo amino terminal.	(Tanaka y Herr, 1990)
<b>pRC-CMV/CK2α-HA</b>	Plásmido de expresión eucarionte de subunidad catalítica CK2α humana (gen <i>CSNK2A1</i> ) fusionada a epítotope HA en extremo amino terminal.	Addgene No. Cat. # 27086 (Penner y col., 1997; Turowec y col., 2010)
<b>pRC-CMV/CK2α K68M-HA</b>	Plasmido pRC- CMV/CK2α-HA donde se mutó codón de Lisina 68 por Metionina, dando lugar a una forma catalíticamente inactiva (dominante negativa) de CK2α.	Addgene No. Cat. # 27089 (Penner y col., 1997; Turowec y col., 2010)
<b>pRK5/Ubc-HA</b>	Plásmido de expresión eucarionte pRK5-HA en el cual se clonó la región codificante del gen de Ubiquitina C ( <i>UBC</i> ), en marco con la secuencia codificante para epítotope HA.	Addgene No. Cat. # 17608 (Lim y col., 2005).

Plásmido	Objetivo	No. Cat. / Ref.
<b>pRK5/UbC KO-HA</b>	Plásmido de expresión eucarionte pRK5/UbC-HA cuyos codones de lisina se encuentran sustituidos por codones de arginina. Así, se expresa Ubiquina C fusionada a epítotope HA en extremo amino terminal, la cual no puede ser ramificada al no poseer lisinas.	Addgene No. Cat. # 17603 (Lim y col., 2005).

**Tabla 3.- Plásmidos.** Fuente: propia.

#### **6.4.- Transformación bacteriana y purificación de plásmidos**

Para la purificación de plásmidos, se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  o XL-Blue químicamente competentes por *shock* térmico. Para ello, se incubaron 50  $\mu$ L de bacterias XL-Blue competentes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 100 ng de plásmido puro o 10  $\mu$ L de reacción de ligación, en hielo durante 20 minutos. Luego, las bacterias junto con el ADN se incubaron a 42° C por 50 segundos y nuevamente en hielo por 2 minutos. Con el objetivo de recuperar las bacterias, se añadieron 800  $\mu$ L de caldo LB (Luria Broth, Mo Bio) sin antibiótico al tubo y se incubó a 37° C con agitación a 210 rpm durante 45 minutos. Se centrifugó el contenido del tubo, se removieron 800  $\mu$ L de sobrenadante y se resuspendió el volumen sobrante que contiene las bacterias transformadas. Este volumen se traspasó a una placa con medio sólido LB-agar con antibiótico de selección (ampicilina 100 ng/mL, United States Biological). Las bacterias se dejaron crecer toda la noche en la placa a 37° C. Al

día siguiente, se seleccionó una o más colonias aisladas y se traspasó de forma individual cada colonia desde la placa a un tubo de ensayo con 5 mL de caldo LB con antibiótico de selección. Se incubó el cultivo durante toda la noche a 37° C con agitación a 210 rpm. Se utilizaron 800 µL de cultivo bacteriano para guardar stock con glicerol al 20% v/v a -80° C. Otros 3 mL de cultivo se utilizaron para purificación de plásmidos a pequeña escala. Esta purificación se realizó de dos formas, dependiendo del objetivo:

#### **6.4.1.- Purificación de plásmidos a pequeña escala para identificación de colonias:**

1.5-3 mL de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche a 37° C con agitación a 210 rpm, se centrifugó a 10000 xg (fuerza centrífuga relativa, RCF). Se descartó sobrenadante y se resuspendió el pellet en 150 µL de Solución I fría (Glucosa 50 mM; Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM; Tris 25 Mm, pH 8.0). Al mismo tubo se le añadieron 300 µL de Solución II para lisis alcalina (Hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 N; Dodecil Sulfato Sódico (SDS) al 1% p/v) y se agitó el contenido por inversión. A continuación, se adicionaron 225 µL de Solución III para neutralizar (Acetato de Potasio 3 M, pH 6.0) y se agitó el tubo por inversión. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 14000 xg durante 15 minutos a 4° C. Se tomó cuidadosamente el sobrenadante y se traspasó a

otro tubo. Se precipitó el ADN con 1 mL de isopropanol y se repitió la agitación por inversión y centrifugación a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol frío (70% v/v), se agitó el contenido del tubo por inversión y se centrifugó nuevamente la muestra. El pellet se dejó secar y una vez seco, se resuspendió en 20 µL de agua ultrapura con ARNasa A a una concentración de 1 µg/mL (Life Technologies) y se incubó durante 20 minutos a 37° C.

#### **6.4.2.- Purificación de plásmidos a pequeña escala con Kit:**

La purificación con kit se llevó a cabo en caso de requerir plásmidos puros para ligación o bien para enviar a secuenciación. Para esta purificación se utilizó el kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, No. Cat. # K0721) o con Presto™ Miniplasmid Kit (Geneaid, No. Cat. # PDH300), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### **6.4.3.- Purificación plasmidial a gran escala**

Se inoculó 1 mL de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche a 37° C con agitación a 210 rpm, en 400 mL de caldo de cultivo LB con antibiótico de selección. El cultivo se dejó crecer durante toda la noche a 37° C con agitación

a 210 rpm. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm en centrifuga Hitachi CR22GIII (3920 xg) durante 15 minutos 4° C y se procedió a la purificación de plásmidos a gran escala con kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La concentración del plásmido obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y se estableció su pureza al obtener la relación A260/A280. Paralelamente, los plásmidos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v (Lonza) en tampón TAE (Tris 40 mM, pH 7.6; ácido acético 20 mM; EDTA 1mM, pH 8) al 1% v/v con bromuro de etidio 0.5 µg/mL (Merck).



### **6.5.- Digestión de plásmidos**

La digestión plasmidial se realizó tanto para la identificación de colonias de interés como para la posterior ligación de fragmentos. Para ello, se realizaron reacciones en 10 µL de volumen. Este volumen contenía: 1 µL de tampón acorde a la(s) enzima(s) utilizada(s), 10 U (0.5 µL) de enzima (New England Biolabs) y 05-1 µg de ADN. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos - toda la noche dependiendo de la capacidad de la enzima para cortar ADN plasmidial y el tampón utilizado en caso de digestiones dobles. Para realizar ligaciones, las enzimas se inactivaron durante 20 minutos a la

temperatura recomendada por el fabricante. Finalmente, los fragmentos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en tampón TAE al 1% v/v con bromuro de etidio 0.5 µg/mL.

### **6.6.- Desfosforilación preparativa de vectores digeridos**

Con el objetivo de ligar un fragmento de interés en un vector de expresión, evitar religaciones entre los extremos del mismo vector lineal y favorecer la inserción del fragmento de interés durante la posterior reacción de ligación, los vectores digeridos se trataron con la enzima fosfatasa antártica (New England Biolabs, No. Cat. # M0289S). La reacción de desfosforilación se llevó a cabo directamente sobre la reacción de digestión previamente inactivada, tal como se indicó en el apartado de “Digestión de plásmidos”. Para ello, se diluyó 10 veces el tampón de la enzima fosfatasa antártica en el volumen de reacción de digestión y se agregaron 5 U (1 µL) de enzima por µg de ADN digerido. La reacción se incubó a 37° C durante 15 minutos para extremos romos o extremos cohesivos 5', o durante 1 hora para extremos cohesivos 3'. Posteriormente, se inactivó la enzima durante 5 minutos a 70° C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los vectores lineales se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en tampón TAE al 1% v/v con bromuro de etidio 0.5 µg/mL y se purificaron como se indica a continuación.

### **6.7.- Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa**

La purificación de fragmentos desde geles de agarosa se efectuó con el objetivo de obtener ADN puro para realizar ligaciones posteriores -como se mencionará en el apartado de “Ligación de fragmentos de ADN”- o de transformar directamente el vector purificado -como se mencionará más adelante en el apartado de “Mutación sitio-dirigida”. Para purificar los fragmentos de interés, se utilizó el kit GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, No. Cat. # K0691), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.8.- Ligación de fragmentos de ADN**

Los fragmentos digeridos y purificados se ligaron utilizando la enzima T4 ADN ligasa (ThermoFisher Scientific, No. Cat. # EL0016). Para ello, se utilizaron 100 ng de vector lineal desfosforilado, el fragmento de interés en una relación molar de 3:1 con respecto al vector lineal, 2  $\mu$ L de tampón y 1 U (1  $\mu$ L) de enzima para extremos cohesivos, en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Para extremos romos, se agregaron 5 U (5  $\mu$ L) de enzima y 5% v/v de polietilenglicol (PEG, 2  $\mu$ L de stock al 50% v/v). La reacción se incubó durante 16 horas a 22° C. A continuación, la enzima se inactivó a 65° C por 10 minutos.

Alternativamente, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs, No. Cat. # M0202S). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L, agregando 100 ng de vector lineal desfosforilado, inserto en una relación molar de 3:1 con respecto al vector, 2  $\mu$ L de tampón y 400 U (1  $\mu$ L) de enzima. La reacción se incubó durante 16 horas a 22° C, seguido por un paso de inactivación a 65° C por 10 minutos.

Se utilizaron 10  $\mu$ L de reacción para transformación bacteriana, y se prosiguió como se indicó anteriormente en “transformación bacteriana y purificación de plásmidos”.



## **6.9.- Clonamiento y generación de constructos**

Los constructos generados se muestran en la Tabla 2 y el procedimiento para la obtención de cada uno de ellos se detalla a continuación:

### **6.9.1- pQE81-L/hSall2 FL-His:**

Constructo generado para expresar de forma inducible en bacterias *E. coli* BL-21 CodonPlus (Agilent Technologies) la proteína recombinante SALL2 E1 humana, la cual contiene los aminoácidos 22-1007 de SALL2 en fusión con

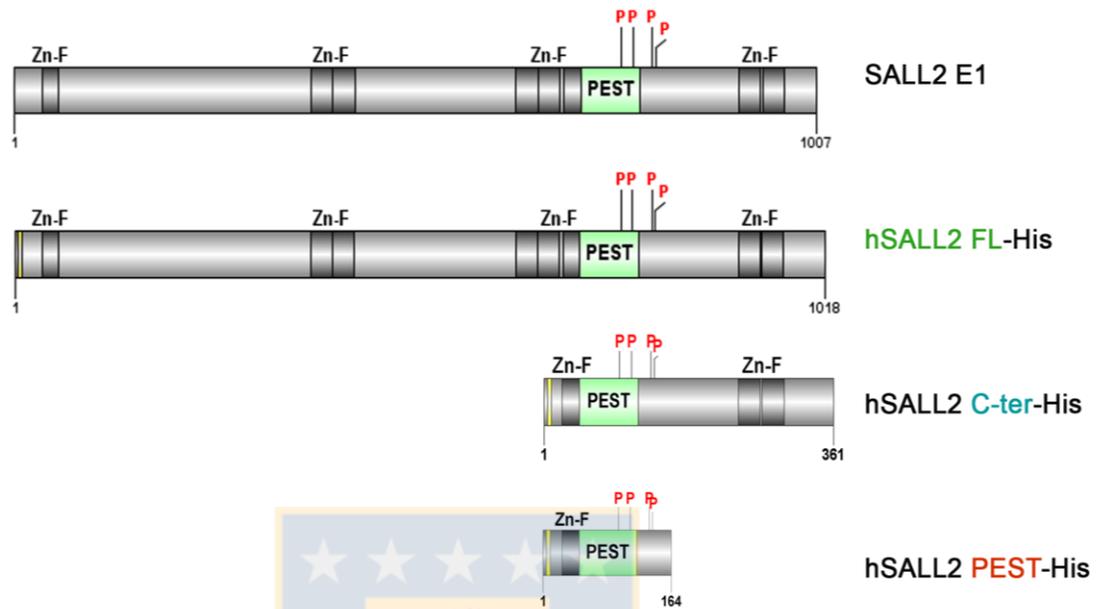
un epítoto de 6 histidinas en el extremo amino terminal (Figura 9). Para obtener este constructo se siguió el procedimiento esquematizado en la Figura 10.C: se digirió el plásmido pCMV2(NH)/Sall2-Flag (Pincheira y col., 2009) con la enzima BstUI como se indica en la sección de “Digestión de plásmidos”, liberándose un fragmento de interés de 2971 pb. Paralelamente, se digirió el vector pQE81-L (Qiagen, No. Cat. # 32923) con la enzima SmaI y se desfosforiló como se describe en el apartado de “Desfosforilación preparativa de vectores digeridos”. Posteriormente, el fragmento de 2971 pb se insertó en el vector lineal pQE81-L siguiendo el protocolo descrito en “Ligación de fragmentos de ADN” para extremos romos, esperando la obtención de un constructo de 7724 pb. De acuerdo a lo indicado en el ítem de “Transformación bacteriana y purificación de plásmidos”, parte de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes. Se seleccionaron las colonias aisladas y se crecieron para identificar cuál de ellas contenía el inserto en la orientación correcta mediante purificación manual. Una vez identificada la colonia de interés, se procedió a purificar el plásmido con kit (Figura 10.D) y a corroborar la inserción adecuada con múltiples enzimas de restricción (no mostrado).

### 6.9.2.- pQE81-L/hSall2 C-ter-His:

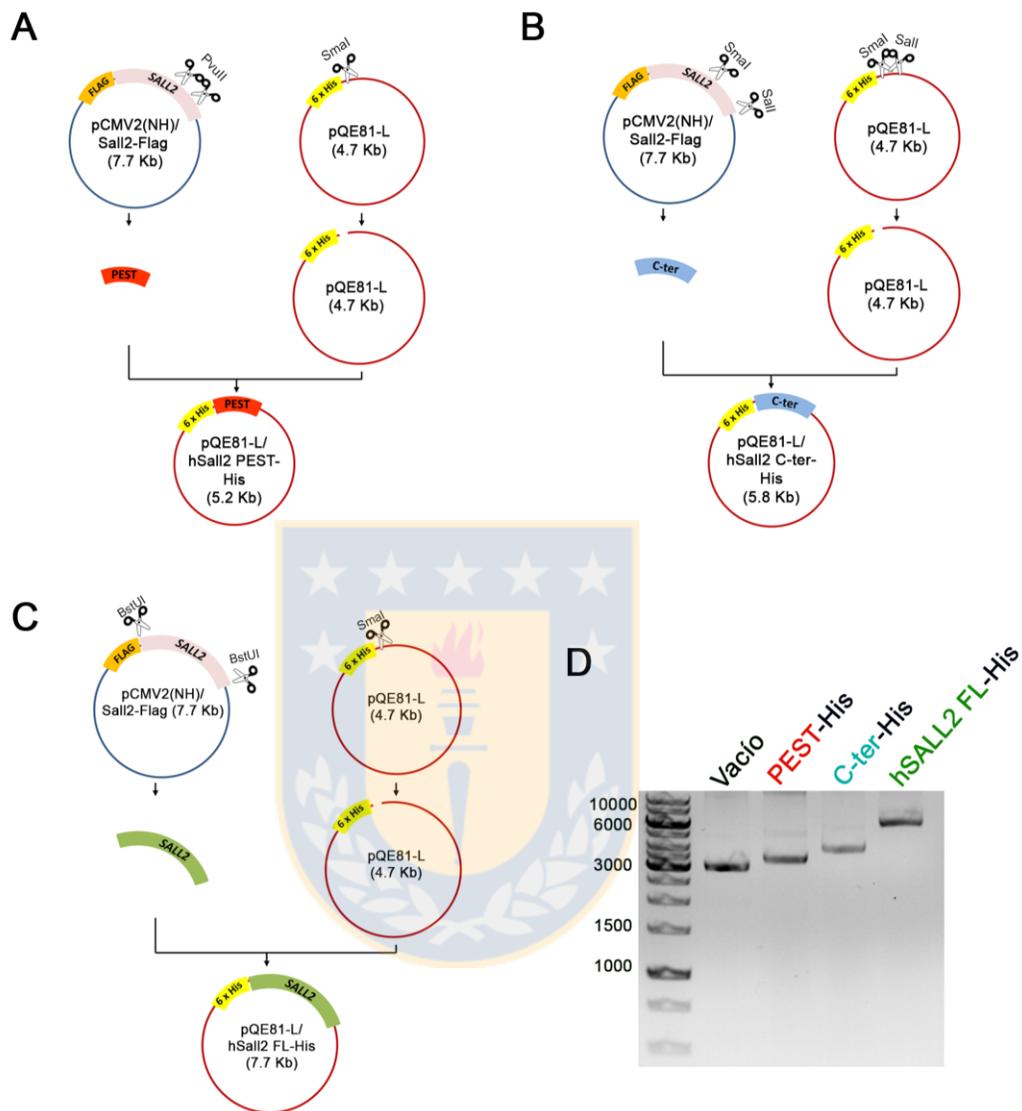
Constructo generado para expresar de forma inducible en bacterias *E. coli* BL-21 CodonPlus (Agilent Technologies) el extremo carboxilo terminal de la proteína SALL2 E1 humana, la cual contiene los aminoácidos 689-1007 de SALL2 en fusión con un epítipo de 6 histidinas en el extremo amino terminal (Figura 9). Para obtener este constructo se siguió el procedimiento esquematizado en la Figura 10.B: se digirió el plásmido pCMV2(NH)/Sall2-Flag (Pincheira y col., 2009) de forma secuencial, primero con la enzima Sall y luego con la enzima SmaI, obteniéndose un fragmento de interés de 1003 pb. Paralelamente, se digirió el vector pQE81-L (Qiagen, No. Cat. # 32923) de la misma forma y se desfosforiló como se describió anteriormente. El fragmento de 1003 pb se insertó en el vector lineal pQE81-L, dando lugar a un constructo de 5753 pb. Parte de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes. Se seleccionaron las colonias aisladas y se crecieron para identificar cuál de ellas contenía una copia del inserto en orientación adecuada mediante purificación manual. Una vez identificadas las colonias de interés, se purificó el plásmido con kit (Figura 10.D) y se corroboró el tamaño y la inserción adecuada con múltiples enzimas de restricción (no mostrado).

### 6.9.3.- pQE81-L/hSall2 PEST-His:

Constructo generado para expresar de forma inducible en bacterias *E. coli* BL-21 CodonPlus (Agilent Technologies) el extremo carboxilo terminal de la proteína SALL2 E1 humana, la cual contiene los aminoácidos 687-820 de SALL2 en fusión con un epítoto de 6 histidinas en el extremo amino terminal (Figura 9). Para obtener este constructo se siguió el procedimiento esquematizado en la Figura 10.A: se digirió el plásmido pCMV2(NH)/Sall2-Flag (Pincheira y col., 2009) con la enzima PvuII, liberándose múltiples fragmentos, incluido el fragmento de interés de 405 pb. Paralelamente, se digirió el vector pQE81-L (Qiagen, No. Cat. # 32923) con la enzima SmaI y se desfosforiló como se describió anteriormente. El fragmento de 405 pb se insertó en el vector lineal pQE81-L siguiendo el protocolo descrito en “Ligación de fragmentos de ADN” para extremos romos, esperando la obtención de un constructo de 5158 pb. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes con parte del volumen de ligación. Se seleccionaron las colonias aisladas y se crecieron para identificar cuál de ellas contenía una copia del inserto en la orientación apropiada mediante purificación manual. Una vez identificadas las colonias, se purificó el plásmido con kit (Figura 10.D) y se corroboró la inserción adecuada con múltiples enzimas de restricción (no mostrado).



**Figura 9.- Proteínas recombinantes con epítipo de histidina, generadas a partir de constructos pQE81-L/ hSall2 FL-His, pQE81-L/hSall2 C-ter-His o pQE81-L/hSall2 PEST-His.** Representación esquemática de la proteína SALL2 E1 humana (superior) y las proteínas recombinantes hSALL2 FL-His (aa 22-1007), hSALL2 C-ter-His (aa 689-1007) y hSALL2 PEST-His (aa 687-820). Los motivos de dedos de Zinc (Zn-F) se representan en gris oscuro. En verde se destaca la potencial secuencia de degradación PEST. Los sitios putativos de fosforilación mediada por CK2 (S763, T778, S802, S806) se indican en rojo (P). El epítipo de 6 histidinas se indica en amarillo. Fuente: propia.



**Figura 10.- Generación de los constructos pQE81-L/ hSall2 FL-His, pQE81-L/hSall2 C-ter-His o pQE81-L/hSall2 PEST-His. A.-** Estrategia de subclonamiento para generar el constructo pQE81-L/hSall2 PEST-His: se digirió el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag con la enzima PvuII, y uno de los fragmentos obtenidos, de 405 pb, se insertó en el vector pQE81-L, previamente digerido con SmaI. **B.-** Estrategia de subclonamiento para generar el constructo pQE81-L/hSALL2 C-ter-His: se digirió el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag con las enzimas SmaI y SallI, y el fragmento de 1003 pb obtenido, se ligó en el vector pQE81-L, previamente digerido con las

mismas enzimas. **C.-** Estrategia de subclonamiento para generar el constructo pQE81-L/hSall2 FL-His: se digirió el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag con la enzima BstUI, y el fragmento de 2971 pb obtenido se insertó en el vector pQE81-L, previamente digerido con SmaI. **D.-** Electroforesis en gel de agarosa de los constructos purificados. Fuente: propia.

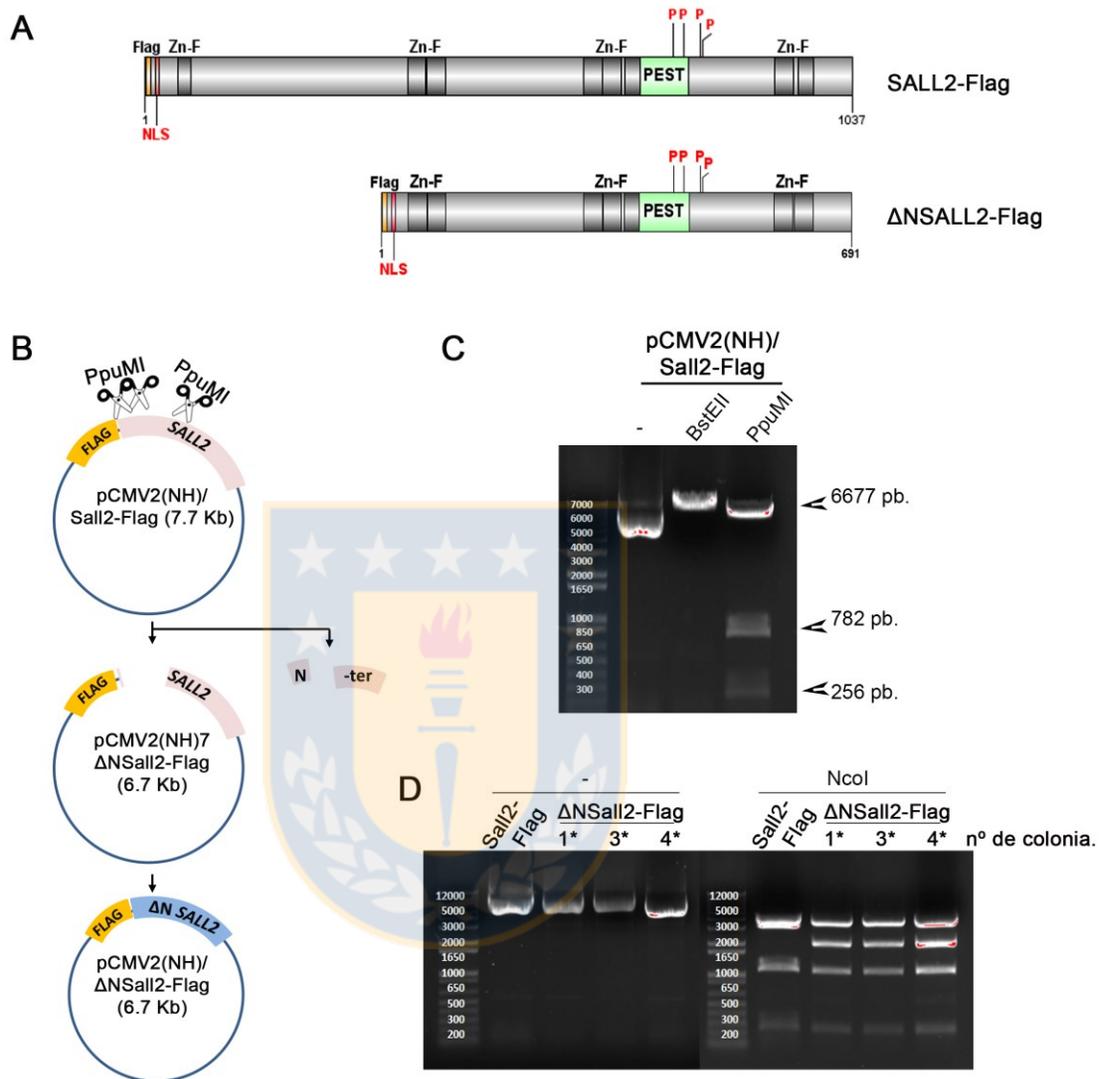
#### **6.9.4.- pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag:**

Este constructo se generó con el objetivo de expresar una forma de SALL2 carente del extremo amino terminal, en células eucariontes (Figura 11.A), y así enriquecer la zona de interés para los posteriores análisis por espectrometría de masas. La proteína generada, la cual será llamada  $\Delta$ NSALL2, carece de los residuos 19-364 de la isoforma E1 de SALL2 humano, pero retiene una potencial secuencia de localización nuclear entre los residuos 3-8, determinada con las herramientas NucPred y NLStradamus (Brameier y col., 2007; Nguyen Ba y col., 2009). Adicionalmente, se identificó una potencial secuencia de exporte nuclear ubicada entre los residuos 181-188 de la proteína SALL2 con las herramientas NetNES y LocNES (la Cour y col., 2004; Xu y col., 2015).  $\Delta$ NSALL2 carece de esta secuencia, así como también el primer dedo de Zn del tipo C2HC y la región rica en glutamina descritas en la Figura 1.

Para obtener el plásmido pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag, se digirió el plásmido pCMV2(NH)/Sall2-Flag con la enzima de restricción PpuMI, liberándose dos

fragmentos (256 pb y 782 pb), eliminándose de esta forma 1038 pb desde el plásmido original. La región escindida codifica para el extremo amino terminal de SALL2 (Figura 11.B y C). Luego, el plásmido lineal resultante -de 6677 pb- se religó como se describió anteriormente. Parte de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se seleccionaron colonias aisladas, las cuales se crecieron en medio líquido para luego purificar los plásmidos con Kit e identificar la colonia que contiene el constructo deseado - colonias 1, 3 y 4- por digestión con la enzima de restricción NcoI (3480, 1918, 1043 y 236 pb; Figura 11.D).





**Figura 11.- Generación de constructo pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag.** **A.-** Representación esquemática de la proteína SALL2-Flag en su longitud completa, codificada por el constructo pCMV2(NH)/Sall2-Flag (superior) y de la proteína ΔNSALL2-Flag (inferior), codificada por el constructo pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag. Esta última carece de los residuos 19-364 de la isoforma E1 humana. En gris oscuro se representan los motivos de dedos de Zinc (Zn-F); en verde se destaca la potencial secuencia de degradación PEST. Los sitios putativos de fosforilación mediada por CK2 (S763, T778, S802, S806) se indican en rojo (P). En naranja se señala el epítipo Flag, y en rojo, la potencial secuencia de localización nuclear (NLS) **B.-** Estrategia de

subclonamiento para generar el constructo pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag: se digirió el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag con la enzima PpuMI, se removió la región que codifica para el extremo amino terminal y se religó el vector. **C.-** Electroforesis en gel de agarosa del vector pCMV2(NH)/SALL2-Flag sin digerir (-), digerido con la enzima BstEII (lineal) o con la enzima pPuMI. En este último caso, se generaron fragmentos de 256, 782 y 6677 pb (flechas). **D.-** Electroforesis de ADN plasmidial sin digerir o digerido con NcoI, para identificación de colonias con el constructo de interés. \*: colonias positivas. Fuente: propia.

### 6.10.- Mutación sitio-dirigida

Para obtener constructos que codifiquen para la proteína SALL2 en la que los sitios fosfoaceptores se encuentren sustituidos por alanina (A) o ácido aspártico (D), se siguió la estrategia esquematizada en la Figura 12: Se realizaron reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando como templado el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag *wild type* o mutado y la enzima KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems No. Cat. # KR0370), agregando los partidores a una concentración de 0.3  $\mu$ M y 6 ng de templado en un volumen final de 20  $\mu$ L. La reacción se realizó como sigue:

1 ciclo:	Denaturación Inicial:	95° C por 3 minutos.
20 ciclos:	Denaturación:	98° C por 30 segundos.
	Alineamiento:	Gradiente por 20 segundos.
	Extensión:	72° C por 4 minutos.
1 ciclo:	Extensión final:	72° C por 4 minutos.

En algunos casos también se utilizó la enzima PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies No. Cat. # 600670), agregando los partidores a una concentración final de 0.2  $\mu$ M, dNTPs a una concentración de 250  $\mu$ M cada uno, tampón 10X PfuUltra II reaction diluido 1:10, 2 ng de templado y 0.3  $\mu$ L de enzima en un volumen final de 20  $\mu$ L. La reacción se realizó como sigue:

1 ciclo:	Denaturación Inicial:	95° C por 2 minutos.
20 ciclos:	Denaturación:	95° C por 30 segundos.
	Alineamiento:	Gradiente por 20 (60-74° C)
	Extensión:	72° C por 4 minutos.
1 ciclo:	Extensión final:	72° C por 3 minutos.

Los partidores utilizados se diseñaron con la herramienta PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/index.htm>) y se señalan en el Anexo 1.

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Donde N es el número de nucleótidos del partidor y % mismatch es el porcentaje de bases desapareadas entre el partidor y el templado. La temperatura de alineamiento experimental se determinó de forma empírica, como se observa en las Figura 13.A, 13.B y 14.A.

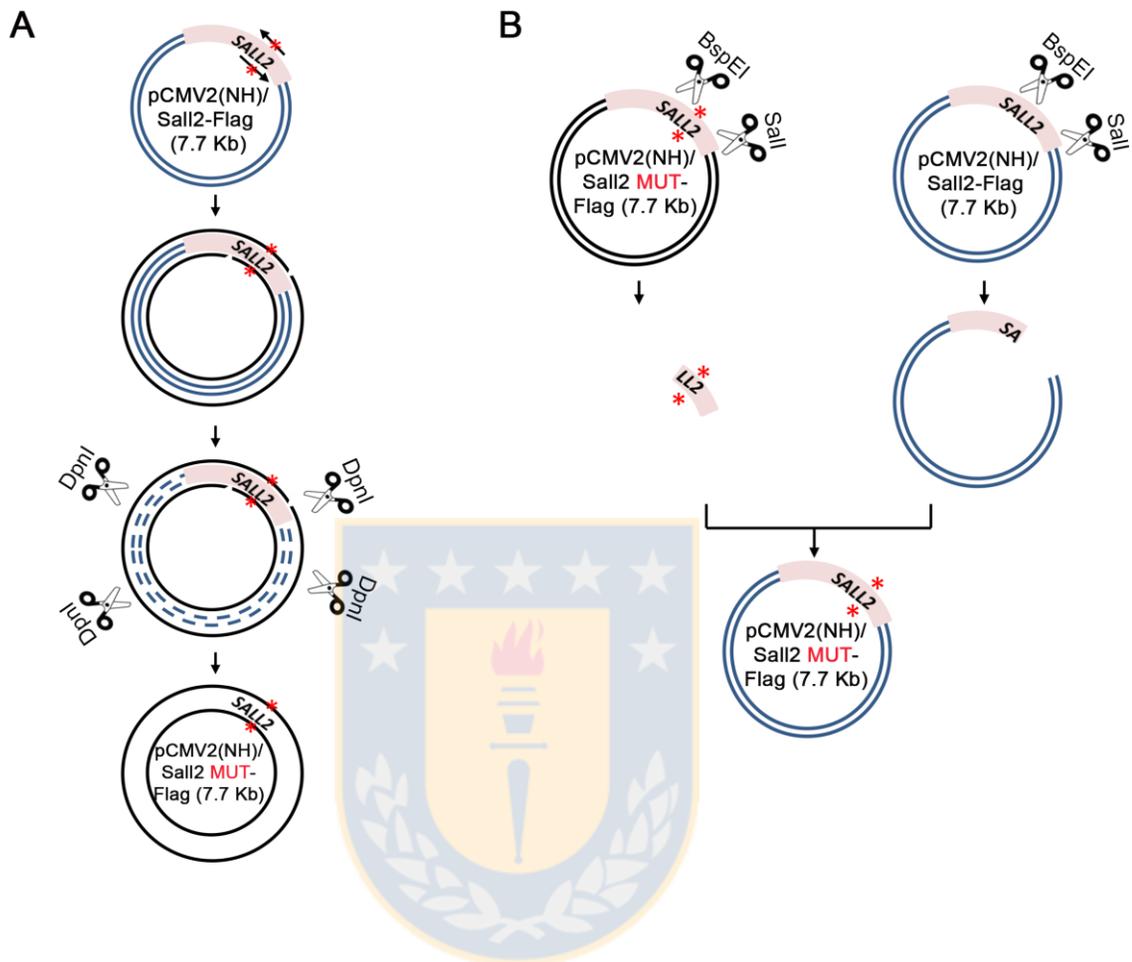
Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figuras 13.A, 13.B y 14.A) y se purificaron como se describió en apartado de “Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa”. Para degradar el ADN plasmidial utilizado como templado (Figura 12.A), los productos purificados se trataron con la enzima DpnI (New England Biolabs No. Cat. # R0176S), agregando 40 U de enzima y tampón 1X CutSmart® diluido 1:10 en el volumen final. La reacción se incubó 2 horas – toda la noche a 37° C y la enzima se inactivó a 80° C durante 20 minutos antes de la transformación en bacterias competentes *E. coli* XL-Blue. Las colonias que contienen en plásmido de interés se identificaron por digestión del ADN plasmidial con las enzimas de restricción EcoRI o NcoI, comparando el patrón de digestión con el del plásmido *wild type* (Figuras 13.C y 14.B).

Finalmente, con el objetivo de evitar cualquier posible alteración derivada de la reacción de PCR fuera del sitio de interés y así secuenciar solamente la región donde se encuentra la mutación, se siguió el procedimiento esquematizado en la Figura 12.B: el vector original pCMV2(NH)/Sall2-Flag se digirió con las enzimas de restricción BspEI y Sall y desfosforiló como se describió anteriormente, removiéndose un fragmento de 936 pb, sin mutaciones. Paralelamente, los plásmidos mutados se digirieron con las mismas enzimas, liberándose un fragmento de interés de 936 pb -el cual contiene las mutaciones- que se insertó en el vector original pCMV2(NH)/Sall2-Flag previamente digerido, reemplazando al fragmento *wild type*. De esta forma,

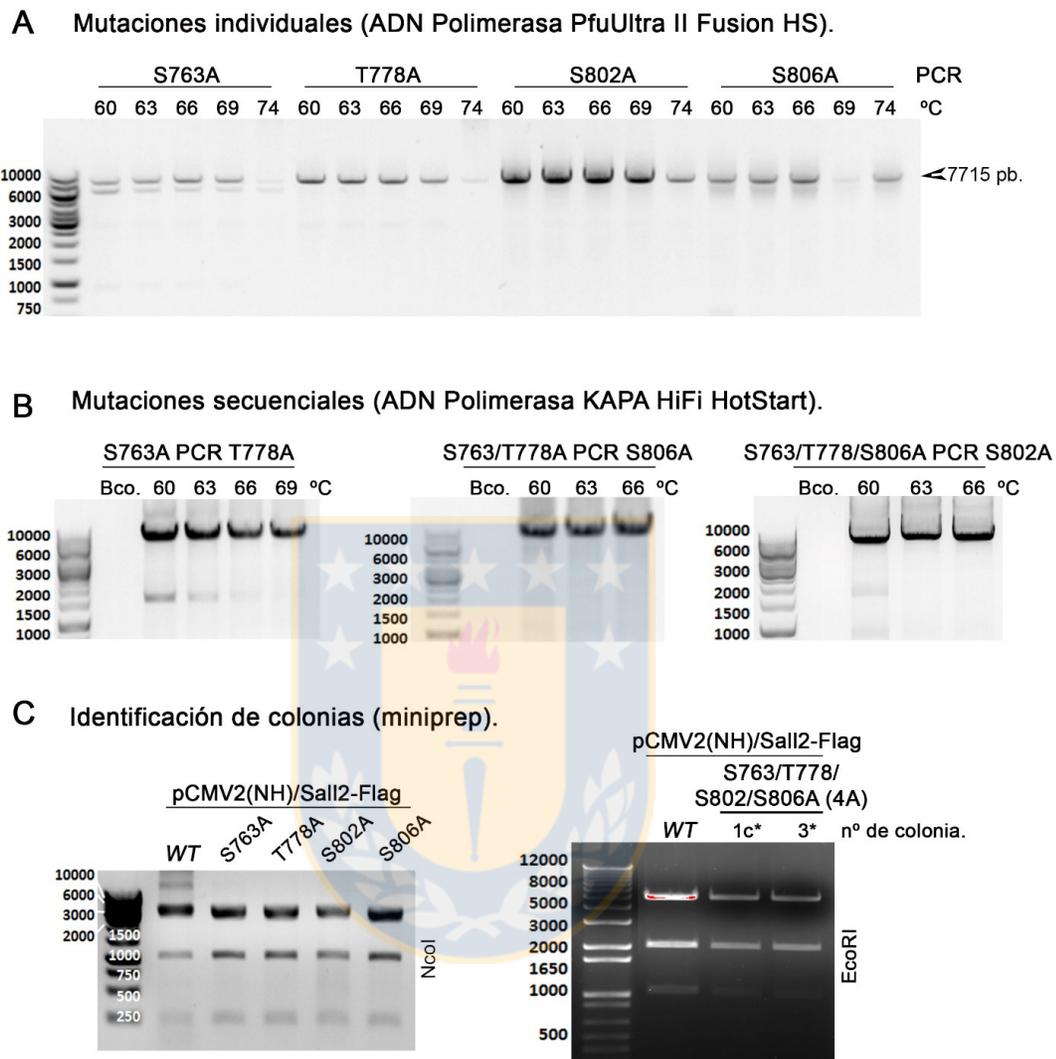
se generaron constructos que codifican para la proteína SALL2 con mutaciones de cada residuo fosfoceptor identificado (S763, T778, S802 y S806) por alanina (A) de forma individual (Figura 13.A y C), y también con todos los residuos fosfoceptores mutados de forma secuencial por alanina (SALL2 4A, Figuras 13.B y 13.C) o por ácido aspártico (SALL2 4D, Figuras 14.A y 14.B). Las mutaciones por ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) corresponden a mutaciones fosfomiméticas (Dissmeyer y Schnittger, 2011).

Las mutaciones secuenciales implicaron la repetición de los pasos indicados anteriormente, es decir, se mutó un sitio, se transformaron bacterias, se purificó el ADN plasmidial, se identificó la colonia de interés por análisis de patrón de restricción, y sobre el plásmido mutado se realizó la mutación siguiente.

Para obtener las mutaciones fosfomiméticas, se usó como templado el plásmido de expresión de la proteína SALL2 cuyos residuos fosfoceptores se han sustituido previamente por alanina, es decir, se mutó A>D, para así disminuir el porcentaje de mismatch y con ello la Tm. La sustitución de alanina por ácido glutámico (A>E) no se concretó, debido al alto porcentaje GC de los partidores (no mostrado).

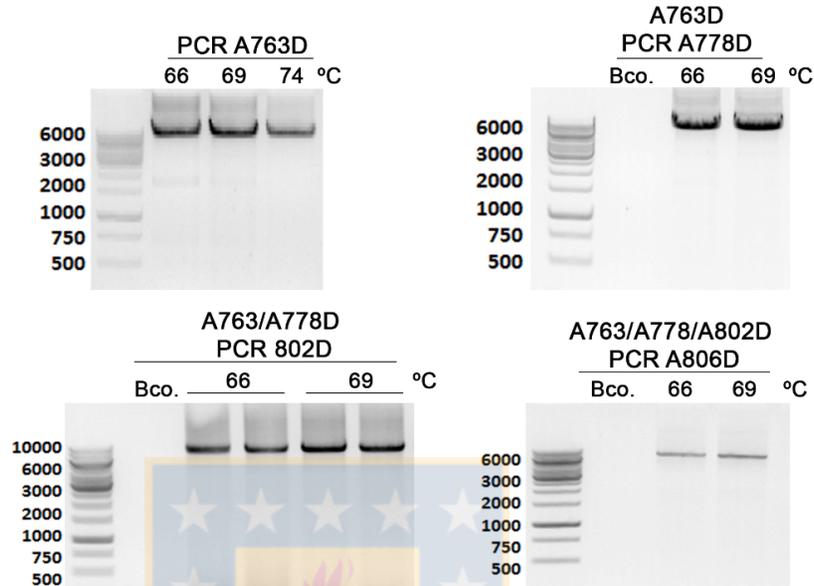


**Figura 12.- Estrategia para mutagénesis sitio dirigida.** **A.-** Se realizaron reacciones de PCR con partidores conteniendo las mutaciones deseadas, utilizando como templado el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag. Se purificó el producto de PCR desde gel de agarosa y se digirió con la enzima DpnI para degradar el ADN utilizado como templado. La enzima DpnI se inactivó y la reacción se utilizó para transformar bacterias *E. coli* XL-Blue. **B.-** Se purificó ADN plasmidial desde colonias positivas, el cual se digirió con las enzimas BspEI y Sall para liberar un fragmento de 936 pb que contiene la mutación. Este fragmento se ligó en el vector original, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, con el fin de reemplazar el fragmento *wild type* por el fragmento mutado. Fuente: propia.

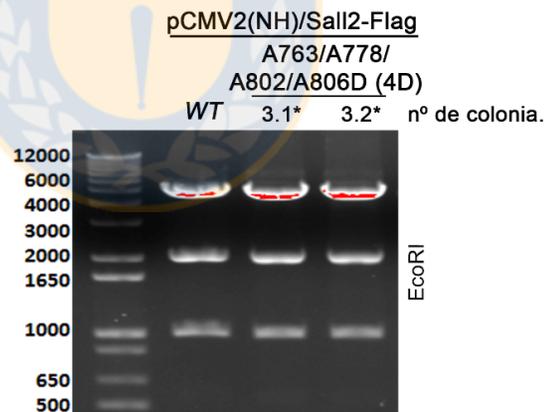


**Figura 13.- Obtención de mutantes no fosforilables de SALL2.** **A.-** Se estandarizó la reacción de PCR con partidores para obtener las mutaciones individuales deseadas, utilizando temperaturas de alineamiento entre los 60 y 74° C y la polimerasa PfuUltra II Fusion HS. **B.** Para generar el constructo mutante codificante para SALL2 S763/T778/S802/S806A (4A), se realizaron mutaciones secuenciales con la enzima ADN Polimerasa KAPA HiFi Hotstart, utilizando temperaturas de alineamiento entre los 60 y 69° C. **C.-** Para identificar las colonias que contienen los plásmidos esperados, se purificó el ADN plasmidial desde las colonias seleccionadas y se digirió con las enzimas NcoI (izquierda) o EcoRI (derecha). WT: plásmido *wild type*. \*: colonias positivas. Fuente: propia.

**A** Mutaciones secuenciales (ADN Polimerasa KAPA HiFi HotStart).



**B** Identificación de colonias (miniprep).



**Figura 14.- Obtención de mutante fosfomimética de SALL2.** **A.-** Sobre el constructo mutado que codifica para SALL2 S763/T778/S802/S806A, se realizaron reacciones de PCR secuenciales para obtener el constructo codificante para SALL2 con los sitios fosfoaceptores mutados por ácido aspártico (4D), probando temperaturas de alineamiento entre 66 y 74° C. **B.-** Para identificar las colonias que contienen los plásmidos esperados, se purificó el ADN plasmidial desde las colonias seleccionadas y se digirió con la enzima EcoRI. WT: plásmido *wild type*. \*: colonias positivas. Fuente: propia.

### **6.11.- Secuenciación de plásmidos**

Una vez purificados los plásmidos generados, éstos se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile o en el Servicio de Secuenciación de ADN del Centro de Genómica Regional de Londres (London Regional Genomics Centre), en la Universidad de Western Ontario, Canadá. Los partidores utilizados para secuenciar se diseñaron con la herramienta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) o bien se solicitaron al servicio de secuenciación, y se indican en el Anexo 2.

### **6.12.- Lisis celular**

Para extraer proteínas desde cultivos celulares, se lavaron las células en placa con 3 mL de tampón fosfato salino (PBS) 1X (NaCl 137 mM; KCl 2.7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM) pH 7.4. Luego, se agregó 1 mL de PBS 1X pH 7.4 frío y se cosecharon las células por arrastre mecánico. La suspensión resultante se traspasó a tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se repitió el arrastre mecánico con 500 µL más de PBS 1X pH 7.4 frío y la suspensión resultante se agregó al volumen previamente depositado en el tubo. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2000 xg durante 7 minutos a 4° C. Se removió el sobrenadante y el pellet se congeló de forma rápida en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80° C o para lisis inmediata.

La lisis celular se llevó a cabo resuspendiendo las células con tampón de lisis B (Tris 50 mM, pH 7.4; NaCl 200 mM; MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM; Tritón X-100 al 1% v/v; Glicerol al 10% v/v) o con tampón TLB (Tris 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM; Igepal al 1% v/v, Deoxicolato al 0,1% p/v; Glicerol al 10% v/v), suplementado con inhibidores de proteasas (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM; Pepstatina A 7 µg/mL; Leupeptin 20 µg/mL; Aprotinin 2.9 µg/mL; o cóctel inhibidor de proteasas 1 Sigma, No. Cat. # P8340) e inhibidores de fosfatasas (Ácido okadaico 1 µM; NaF 5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mM; o cóctel inhibidor de fosfatasas 2 Sigma, No. Cat. # P5726). Las células se incubaron en hielo por 30 minutos, con vortex cada 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó el lisado a 20000 xg durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante se almacenó a -80° C hasta su uso.

### **6.13.- Cuantificación de proteínas totales**

La cantidad de proteínas totales contenidas en el lisado celular se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), tomando 1 µL de lisado, con una curva estándar entre 0 y 15 µg de albúmina de suero bovino (BSA, Merck) en un volumen final de 1 mL en cubeta plástica. Para espectrometría de masas, las proteínas totales se cuantificaron con BCA Protein Assay Kit (Pierce, No. Cat. #23225), siguiendo las instrucciones del fabricante para lectura en microplaca.

#### 6.14.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación de proteínas se llevó a cabo a través de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes, de acuerdo al método utilizado por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello, a los lisados celulares se les agregó 1/6 de volumen de tampón de carga 6X (Tris 300 mM, pH 6.8; SDS al 12% p/v; azul e bromofenol al 0.06 % p/v;  $\beta$ -mercaptoetanol 760 mM, Glicerol al 60% v/v). Las muestras se incubaron a 100° C durante 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), sumergidos en un tampón de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM, SDS al 0.1% p/v). Estos geles constan de un sistema discontinuo compuesto por un gel inferior separador (acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 8, 10 o 12% p/v; Tris 375 mM, pH 8.8; SDS al 0.1% p/v; persulfato de amonio al 0.1% p/v; N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0.06% v/v) y un gel superior concentrador (acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 5.1 % p/v; Tris 125 mM, pH 6.8; SDS al 0.1% p/v; persulfato de amonio al 0.1% p/v; TEMED al 0.1% v/v). Como marcador de tamaño se utilizaron los marcadores pre-teñidos Blueye (FroggaBio, No. Cat. # PM007-0500M), PageRuler (ThermoFisher Scientific, No. Cat. # 26616) o Accuruler (MAESTROGEN, No. Cat. # 02102-250). Una vez cargadas las muestras y el marcador de tamaño en el gel, se sometieron a un voltaje de 70-80 V, utilizando para este propósito el sistema Mini Protean® Tetra System de BioRad.

### **6.15.- Tinción de proteínas en gel**

La tinción de proteínas se llevó a cabo por modificación del protocolo descrito por Candiano y col. (Candiano y col., 2004), siguiendo las recomendaciones entregadas por el Servicio de Proteómica Funcional (Functional Proteomics Facility) de la Universidad de Western Ontario, Canadá. Los geles de poliacrilamida se sumergieron en una solución de fijación (Etanol al 50% v/v; Ácido Fosfórico al 3% v/v) durante 45 minutos en agitación. Se retiró la solución de fijación y se lavó el gel con agua destilada dos veces rápido y dos veces durante 10 minutos en agitación. A continuación, se equilibró el gel con solución Neuhoffs (Sulfato de Amonio al 16% p/v; Metanol al 25% v/v; Ácido Fosfórico al 5% v/v) durante 1 hora en agitación, tras lo cual se añadió Coomassie coloidal G-250 (Sigma) al 0.1% v/v y se dejó teñir en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, el gel se destiñó con agua destilada, en agitación.

### **6.16.- Western Blot**

La inmunodetección de proteínas se realizó por modificación del protocolo descrito por Towbin y col. (Towbin y col., 1979): se transfirieron las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de Fluoruro de polivinidileno (PVDF) con poro de 0.45  $\mu$ M (Millipore, Immobilon-P),

previamente sumergida en metanol para su activación. Para este propósito se utilizó el sistema Mini Protean® Tetra System de BioRad, en tampón de transferencia (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol al 20% v/v, SDS al 0.004% p/v) a 30 Volts durante 16-18 horas. La adecuada transferencia de proteínas se verificó por tinción con solución de rojo Ponceau 1X (Ponceau S al 0.1% p/v; ácido acético al 5% v/v). Las membranas luego se decoloraron con agua destilada y se bloquearon con leche descremada al 5% p/v en tampón tris salino (TBS) 1X-Tween 0.05% (Tris 20 mM; NaCl 500 mM; pH 7.4; Tween al 0.05% v/v) durante 1 hora en agitación. Luego, las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos con TBS 1X-Tween 0.05% en agitación, tras lo cual se procedió a incubar con anticuerpo primario diluído en TBS 1X-Tween 0.05% 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en el Anexo 3<sup>2</sup>. Posteriormente, las membranas se lavaron nuevamente con TBS 1X-Tween 0.05% tres veces durante 5 minutos en agitación y se incubó con anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación. Los anticuerpos secundarios se indican en el Anexo 4.

Para los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), éstos se diluyeron en leche descremada al 5% p/v en TBS 1X-Tween 0.05%. Tras la incubación con anticuerpo secundario las membranas se lavaron

---

<sup>2</sup> Durante el desarrollo de la Tesis se utilizaron tres anticuerpos para inmunodetectar Caseína Quinasa II  $\alpha$ : el anticuerpo Anti-Casein Kinase II $\alpha$ , clon 1AD9 de Millipore, que también reconoce a CK2 $\alpha'$  y que se indicará en las imágenes como CK2 $\alpha/\alpha'$ ; el anticuerpo CK2 $\alpha$ -only, que sólo reconoce a CK2  $\alpha$  y que se indicará en las imágenes como CK2 $\alpha$ ; y el anticuerpo GST-Fusion, el cual se encuentra dirigido a CK2 $\alpha'$ , pero que también reconoce a CK2 $\alpha$ , señalado en las imágenes como CK2 $\alpha'/\alpha$ .

en TBS 1X-Tween 0.05% como se describió anteriormente. Luego, las membranas se incubaron durante 1 minuto con una solución compuesta reactivo 1 (luminol) y 2 (peróxido de hidrógeno) en relación 1:1 del kit de quimioluminiscencia Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences, No. Cat. # RPN2106) o durante 5 minutos con una solución compuesta por agua destilada, reactivo 1 (luminol) y reactivo 2 (peróxido de hidrógeno) en relación 2:1:1 del kit de quimioluminiscencia Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, No. Cat. # RPN2232). El revelado se llevó a cabo en cámara oscura, con un cassette de revelado, en donde se expusieron las membranas en placas fotográficas, o bien en el sistema Multi-application gel imaging system PXi de Syngene. Las cuantificaciones se realizaron con el software Image J, normalizando la señal de las proteínas de interés con la señal de proteínas utilizadas como control de carga, GAPDH (Gliceraldehido-3-Fosfato Dehidrogenasa),  $\beta$ -actina, o PARP (Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1) dependiendo de las condiciones utilizadas, o proteínas totales para el caso de fosfoproteínas.

Los anticuerpos secundarios Li-Cor se diluyeron en BSA al 3% en TBS 1X-Tween 0.05% (IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG) o BSA al 3% en PBS 1X pH 7.4 -Tween 0.1% (IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG), se lavaron nuevamente dos veces durante 10 minutos con TBS 1X-Tween 0.05% o PBS 1X-Tween 0.05% y luego una vez más en TBS 1X o PBS 1X sin detergente y se

procedió a revelar en sistema Li-Cor Odyssey Infrared Imaging System. Las cuantificaciones se realizaron con el software Odyssey V3.0, normalizando la señal de las proteínas de interés con la señal de proteínas utilizadas como control de carga (GAPDH).

### **6.17.- Transfección transiente**

Para sobre-expresar transientemente las proteínas de interés en células eucariontes, se utilizaron dos métodos de transfección, dependiendo de la línea celular:



#### **6.17.1.- Transfección por Fosfato de Calcio:**

Este método de transfección se utilizó en células HEK 293, U2OS y Flp-In™ T-REx™ U2OS, por modificación del protocolo descrito por Graham y Van der Eb (Graham y van der Eb, 1973). El día previo a la transfección se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células HEK 293 o  $1.0 \times 10^6$  células U2OS por placa de cultivo de 100 mm. Al momento de transfectar, se preparó 275  $\mu\text{L}$  de una solución de ADN plasmidial a una concentración de 80 ng/ $\mu\text{L}$  y 250 mM de  $\text{CaCl}_2$  en agua ultrapura autoclavada en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Esta solución se agregó gota a gota sobre un volumen equivalente de tampón

HEPES salino (HBS) 2X (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) 50 mM; NaCl 280 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 1.5 mM; pH 7.05) contenido en otro tubo, en vortex a mínima velocidad. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado de fosfato de calcio. Paralelamente, se reemplazó el medio de cultivo de células sembradas el día anterior por 5 mL de medio de cultivo fresco. Sobre este medio de cultivo se agregaron 500 µL de la suspensión de precipitado de fosfato de calcio, gota a gota, tratando de cubrir toda la superficie. Las células se incubaron en presencia del precipitado durante 16 horas, tras lo cual se procedió a remover el medio de cultivo, agregando medio de cultivo fresco. Las células se trataron de acuerdo al objetivo de cada experimento, y se colectaron a las 44-48 horas post-transfección. Para la transfección de células contenidas en placas de cultivo de distinto diámetro o para utilizar mayor cantidad de ADN, se siguió el mismo procedimiento, manteniendo las concentraciones de los componentes y ajustando los volúmenes a utilizar con respecto al área de la placa o a la cantidad de ADN requerida.

#### **6.17.2.- Transfección con lipofectamina:**

Para transfectar de forma transiente células H1299, se utilizó lipofectamina 2000 (ThermoFisher Scientific, No. Cat. # 11668) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se sembraron  $1.0 \times 10^6$  células H1299 en

placas de 60 mm el día anterior a la transfección, con el objetivo de que la confluencia alcanzada al momento de la transfección sea cercana al 80-90%. Al momento de la transfección, se disolvieron 6  $\mu$ L de lipofectamina en 119  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI sin suero y sin antibióticos, en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Esta solución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. En otro tubo, se diluyeron 4  $\mu$ g de ADN plasmidial en medio de cultivo RPMI sin suero y sin antibióticos, hasta alcanzar un volumen final de 125  $\mu$ L. Esta solución se agregó gota a gota sobre el tubo que contenía la solución de RPMI-lipofectamina. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos lípido-ADN. Paralelamente, se reemplazó el medio de cultivo de las células sembradas el día anterior, por 1.75 mL de medio fresco suplementado con 10% de FBS, sin antibióticos. Sobre este medio se agregaron los 250  $\mu$ L de suspensión lípido-ADN. Las células se incubaron durante 6 horas en presencia de los complejos, tras lo cual se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, suplementado con 10% de FBS y con antibióticos.

Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X pH 7.4 tibio y se les agregó 500  $\mu$ L de una solución de EDTA 2.5 mM en PBS 1X pH 7.4 a cada placa. Las células se incubaron a 37° C por 5 minutos para desprenderlas de la superficie de la placa. Posteriormente, las células se resuspendieron en 3 mL de PBX 1X, se traspasaron a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 800 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el PBS 1X y las

células se resuspendieron en 4 mL de medio fresco, para ser distribuidas en dos placas de 60 mm. Finalmente, las células se trataron dependiendo del experimento a realizar, y se colectaron 44-48 horas post-transfección.

### **6.18.- Inmunofluorescencia**

Para los ensayos de Inmunofluorescencia, se sembraron células HEK 293 o U2OS en cubreobjetos de 15 mm recubiertos previamente con polilisina 0.01% p/v en PBS 1X (Trevigen). Las células se transfectaron y/o trataron de acuerdo al objetivo de cada experimento y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X pH 7.4 a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, los cubreobjetos se lavaron tres veces por 5 minutos con PBS 1X pH 7.4 a temperatura ambiente y se permeabilizaron con tritón al 0.1% v/v en PBS 1X pH 7.4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la permeabilización, se lavaron nuevamente los cubreobjetos de la forma descrita anteriormente y las células se bloquearon con una solución de BSA al 3% en PBS 1X pH 7.4 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los cubreobjetos se lavaron rápidamente con PBS 1X pH 7.4 y se incubaron en cámara húmeda con anticuerpos primarios (Anexo 5) diluidos en solución de BSA al 1% p/v en PBS 1X pH 7.4. durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, se lavaron nuevamente los cubreobjetos con PBS 1X pH 7.4, dos veces rápido y dos veces durante 5 minutos, para retirar el excedente de anticuerpos primarios, y se

incubaron con anticuerpos secundarios (Anexo 5) anti IgG de ratón y/o de conejo conjugado a fluoróforo Alexa 488 o Alexa 555 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) en dilución 1:500 y 1 µg/mL de Hoechst 33342 (Immunochemistry Technologies, No. Cat. # 639) en solución de BSA al 1% p/v en PBS 1X pH 7.4 durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. Finalmente, tras dos lavados rápidos y tres lavados de 5 minutos con PBS 1X pH 7.4, los cubreobjetos se montaron en 8 µL de medio de montaje para fluorescencia (Dako, No. Cat. # S3023) sobre portaobjetos de vidrio. Las células se visualizaron en microscopio confocal espectral LSM780 NLO (Carl Zeiss) en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción. Los análisis de las imágenes se realizaron con los softwares Image J y Zen lite (Carl Zeiss).

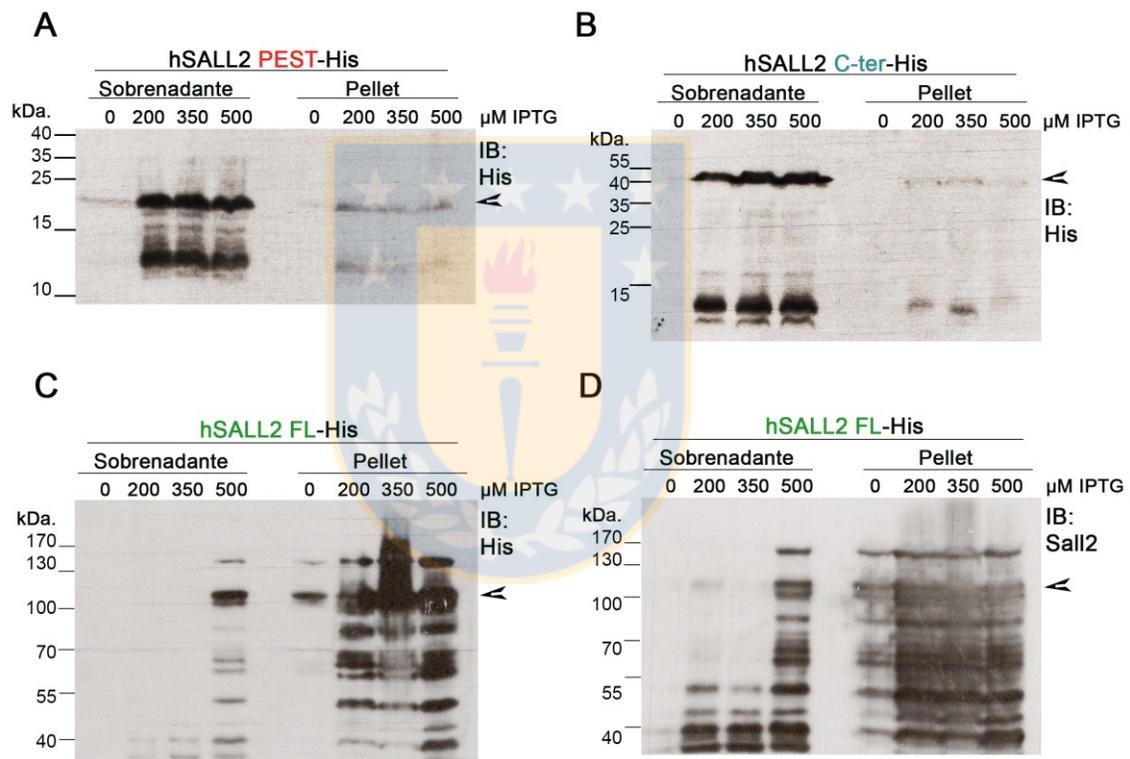
#### **6.19.- Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

La purificación de proteínas recombinantes con epítoto de histidina hSALL2 FL-His (aa 22-1007), hSALL2 C-ter-His (aa 689-1007) y hSALL2 PEST-His (aa 687-820) (Figura 9) se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), utilizando resina de Níquel-agarosa Ni-NTA (Qiagen, No. Cat. # 1018244). Se transformaron bacterias *E. coli* BL-21 por *shock* térmico, de la forma descrita en el apartado de “Transformación bacteriana y purificación de plásmidos”, con los constructos pQE81-L/ hSall2 FL-His, pQE81-L/hSall2 C-ter-

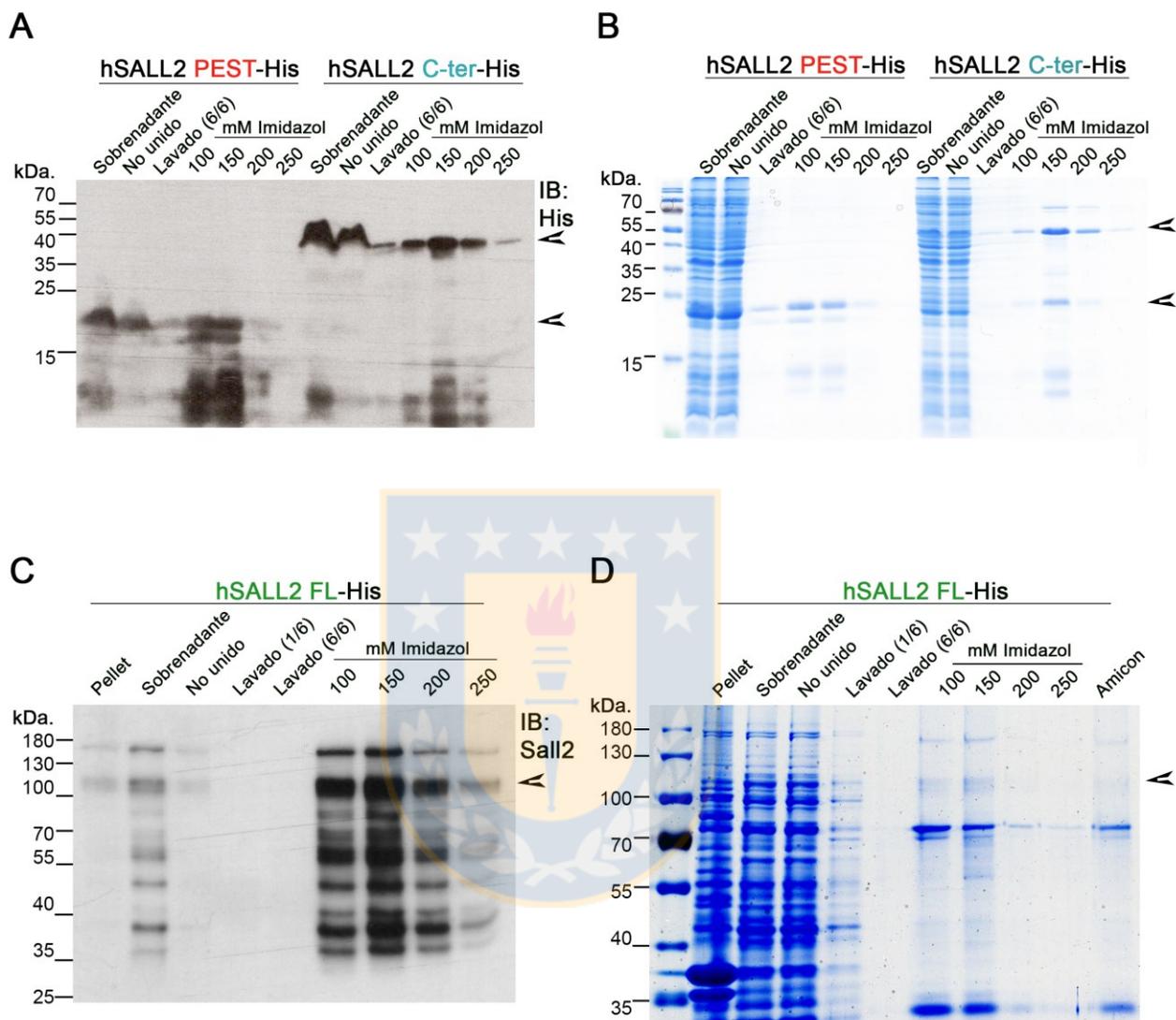
His o pQE81-L/hSall2 PEST-His. Luego, se escogió una colonia aislada desde placa con medio sólido LB-agar con Ampicilina 100 ng/mL y se inoculó en 6 mL de caldo de cultivo LB, manteniendo el antibiótico de selección. Este cultivo se creció durante 16 horas a 37° C con agitación a 210 rpm. Al día siguiente, se inocularon 5 mL de cultivo bacteriano en 600 mL de caldo LB con Ampicilina y se creció el cultivo a 29.5° C en agitación a 210 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6 a 600 nm. En este punto, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes agregando Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 200  $\mu$ M para hSALL2 PEST-His, 350  $\mu$ M para hSALL2 C-ter y 500  $\mu$ M para hSALL2 FL-His. Estas concentraciones se estandarizaron previamente, como se muestra en la Figura 17. Las bacterias se incubaron durante 3 horas a 29.5° C con agitación a 210 rpm, tras lo cual se centrifugaron a 3600 xg durante 10 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de tampón de lisis y lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM) suplementado con inhibidores de proteasas: Aprotinin 3  $\mu$ g/mL, Leupeptin 2  $\mu$ g/MI y PMSF 1 mM (preparado en el momento y readicionado cada 30 minutos). La suspensión bacteriana se sonicó a una potencia de 30 W con pulsos de 15 segundos durante 150 segundos, con descanso entre pulsos de 20 segundos. Para purificar hSALL2 FL-His, se agregó Tritón al 1% v/v al lisado y se incubó en agitación durante 15 minutos a 4° C para permitir una lisis completa y favorecer el plegamiento de la proteína. Las bacterias lisadas por sonicación se

centrifugaron a 13000 xg durante 10 minutos a 4° C. Paralelamente, se depositaron 300 µL de resina Ni-NTA en columna Poly-Prep® (BioRad) y se incubó este volumen con 2 mL de agua ultrapura fría en agitación durante 5 minutos a 4° C. Se vació la columna por gravedad y se equilibró la resina con 2 mL de tampón de lisis y lavado, incubándose nuevamente durante 5 minutos a 4° C en agitación. Se vació la columna por gravedad y se agregó el lisado bacteriano. La resina junto al lisado se incubó en agitación durante 1 hora a 4° C, tras lo cual se descartó el sobrenadante de la columna por gravedad. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 3 mL de tampón de lisis y lavado suplementado con inhibidores de proteasas y tres lavados con 3 mL del mismo tampón con Imidazol a una concentración final de 50 mM e inhibidores de proteasas. La proteína de interés se eluyó de forma seriada con 450 µL de tampón de lisis y lavado suplementado con cóctel inhibidor de proteasas 1 (Sigma), con concentraciones crecientes de Imidazol: 100-150-200-250 mM. Al volumen de eluato obtenido se le adicionó glicerol a una concentración final de 15% v/v. La concentración óptima de Imidazol a la cual eluyen las proteínas hSALL2 PEST-His, hSALL2 C-ter y hSALL2 FL-His desde la resina corresponde a 150 mM, como se muestra en la Figura 15. Para eliminar las especies de hSall2 FL-His de menor tamaño molecular al esperado, las eluciones obtenidas con 100, 150 y 200 mM de Imidazol se filtraron en una unidad de filtración Amicon® Ultra-4 de 100K MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*, Millipore) y luego se le añadió glicerol e inhibidores de proteasas al eluato obtenido. La banda

correspondiente a hSALL2-His se identificó por espectrometría de masas en el Servicio de Espectrometría de Masas MALDI del Centro de Proteómica regional de Londres (London Regional Proteomics Centre), en la Universidad de Western Ontario, Canadá.



**Figura 15.- Inducción de expresión de las proteínas recombinantes hSALL2 FL-His, hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His.** Se analizó la expresión de las proteínas hSALL2 PEST-His (**A**), hSALL2 C-ter-His (**B**) y hSALL2 FL-His (**C**), inducidas a distintas concentraciones de IPTG durante 3 horas a 29.5° C, a través de la inmunodetección por *western blot* con anticuerpo anti-6xHis. **E.-** La inducción de la expresión de hSALL2 FL-His también se evaluó mediante la inmunodetección con anticuerpo anti-Sall2. Fuente: propia.



**Figura 16.- Purificación de las proteínas recombinantes hSALL2 FL-His, hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His.** Inmunodetección por *western blot* de las proteínas hSALL2 PEST-His, hSALL2 C-ter-His (**A**) y hSALL2 FL-His (**C**), en muestras tomadas durante el proceso de purificación: pellet (fracción insoluble), sobrenadante, fracción no unida a resina de Níquel-agarosa, primer y último lavados, y eluciones a concentraciones crecientes de imidazol. **B.-** Tinción de coomassie de muestras cargadas en **A**. **D.-** Tinción de coomassie de muestras cargadas en **C**. Las flechas indican la proteína recombinante, de acuerdo al tamaño esperado. Fuente: propia.

## 6.20.- GST-Pulldown

Para los ensayos de *GST-Pulldown*, se utilizó la proteína GST-CK2 $\alpha$  humana como “carnada”, y las proteínas hSALL2 FL-His, hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His como “presa”. Para ello, se transformaron bacterias *E. coli* BL-21 CodonPlus con el constructos pGEX 3X-CK2 $\alpha$ -GST (pDB1) (Turowec y col., 2010) o pGEX-4T-3 (GE Healthcare). Se seleccionó una colonia aislada por cada plásmido transformado, y se creció a 37° C con agitación a 210 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0.6-0.8, tras lo cual se agregó IPTG a una concentración final de 350  $\mu$ M para inducir la expresión de las proteínas GST y GST-CK2 $\alpha$  durante 3 horas a 37° C. Las bacterias luego se centrifugaron a 3600 xg durante 10 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 30 mL de PBS 1X frío. Se centrifugó la suspensión bacteriana a 13000 xg durante 5 minutos a 4° C, para remover el remanente de caldo de cultivo. A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 8 mL de PBS 1X frío, suplementado con DTT 1 mM e inhibidores de proteasas (aprotinin 3  $\mu$ g/mL; leupeptin 2  $\mu$ g/mL; PMSF 1 mM, preparado en el momento y readicionado cada 30 minutos). La suspensión bacteriana se sonicó a una potencia de 30 W con pulsos de 15 segundos durante 150 segundos, con descanso entre pulsos de 20 segundos. Se agregó Tritón X-100 a una concentración final de 1% y se agitó a 4° C por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 13000 xg durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante (lisado) se incubó con resina

Glutation-sefarosa 4B (Bioworld, No. Cat. # 201820032) al 50% en PBS 1X, durante 2 horas con agitación a 4° C. La resina se lavó previamente con 10 volúmenes de PBS 1X frío. Se centrifugó la muestra con la resina a 500 xg durante 5 minutos a 4° C y se lavó cuatro veces la resina con 5 mL de PBS 1X, frío suplementado con DTT e inhibidores de proteasas, y dos veces con 5 mL de tampón de almacenamiento (MOPS 15 mM, pH 7.0; EDTA 1.5 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 300 mM; glicerol al 25% v/v; DTT 0.75 mM) suplementado con inhibidores de proteasas. En cada lavado, se incubó la resina y el tampón correspondiente durante 5 minutos con agitación a 4° C, y se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos a 4° C.

Para el ensayo de *GST-Pulldown* propiamente tal, se prepararon tubos de microcentrífuga con 100 µL de resina, conteniendo 5 µg de proteína “carnada” (GST-CK2α o GST como control negativo). Se agregaron 200 µL de solución de BSA al 5% en PBS 1X frío (suplementado con DTT e inhibidores de proteasas) a cada tubo. Se incubó en agitación a 4° C durante 40 minutos y se lavó tres veces con 1 mL de PBS 1X frío suplementado con DTT 1 mM, centrifugando a 500 xg durante 5 minutos a 4° C cada vez. Paralelamente, se prepararon tubos de microcentrífuga con 20 µg de proteína “presa” en un volumen de 1 mL, utilizando para este propósito tampón igepal 2X (Tris 100 mM, pH 8.0; NaCl 300 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; Igepal al 2% v/v; deoxicolato de sodio al 0.5% p/v; glicerol al 20% v/v) hasta llevar a 1X, añadiendo cóctel inhibidor de proteasas (Sigma). Estas muestras se incubaron con 20 µL de resina vacía

durante 1 hora a 4° C con agitación. Luego, se centrifugaron todos los tubos a 500 xg durante 5 minutos a 4° C, y se añadió el sobrenadante (la proteína “presa”) al tubo con resina cargada con la proteína “carnada”.

Las proteínas recombinantes se dejaron interaccionar durante 12 horas en agitación a 4° C, tras lo cual se lavó la resina cuatro veces con 1 mL de tampón igepal 1X, centrifugando a 500 x g durante 5 minutos a 4° C cada vez. Finalmente, se agregaron 50 µL de tampón de carga 2X a cada tubo.

## **6.21.- Inmunoprecipitación**

Para los ensayos de inmunoprecipitación se utilizaron dos resinas de distintas características, en consecuencia, dos protocolos diferentes, de acuerdo al objetivo del experimento. Los anticuerpos utilizados se señalan en el Anexo 6.

### **6.21.1.- Inmunoprecipitación para ensayos de interacción y ubiquitinación:**

En tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se incubaron 300-400 µL de lisado de proteínas (0.5-2 mg) con 10 µL de resina de Proteína AG Plus-

agarosa (Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. # SC-2003) en agitación a 4° C durante 15 minutos, tras lo cual se centrifugaron las muestras a 500 xg a 4° C durante 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le agregó 0.5 µg de anticuerpo por mg de proteína total. El lisado, junto con el anticuerpo, se incubó durante 1 hora a 4° C en agitación. Transcurrido este periodo de tiempo, se le agregó a cada tubo un volumen de 30 µL de resina de Proteína AG Plus-agarosa y se dejó incubar durante toda la noche en agitación a 4° C. Al día siguiente, se centrifugó la muestra con resina y anticuerpo a 500 xg durante 5 minutos a 4° C, se removió el sobrenadante y la resina se lavó cinco veces con 1 mL de tampón de lisis B. Después del lavado final, se removió el sobrenadante y se agregaron 30 µL de tampón de carga 2X a la resina lavada. Las muestras se denaturaron durante 5 minutos a 100° C. La inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas se analizó mediante *western blot*.

#### **6.21.2.- Inmunoprecipitación para ensayos de incorporación de [ $\gamma^{32}$ ]-ATP y espectrometría de masas:**

Para los ensayos de actividad quinasa y espectrometría de masas, se utilizó la resina Proteína G-Sefarosa ® 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, No. Cat. # 17-0618-01). Esta resina se encuentra resuspendida en

20% de etanol. Para su uso, se lavó un volumen de resina tres veces con 5 volúmenes de PBS 1X frío, centrifugando a 500 xg durante 5 minutos a 4° C después de cada lavado. Para su uso, se llevó la resina a 50% en PBS 1X frío.

En tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se incubaron 300-400 µL de lisado de proteínas sin inhibidores de fosfatasas (0.2-0.5 mg) con 15 µL de resina durante 30 minutos en agitación a 4° C, tras lo cual se centrifugaron las muestras a 500 xg a 4° C durante 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le agregó 2.5 µg de anticuerpo. El lisado, junto con el anticuerpo, se incubó toda la noche a 4° C en agitación. Al día siguiente, se le agregó a cada tubo un volumen de 30 µL de resina y se dejó incubar durante 2 horas en agitación a 4° C. Luego, se centrifugó la muestra con resina y anticuerpo a 500 xg durante 5 minutos a 4° C y se removió el sobrenadante. La resina se lavó cuatro veces con 300 µL de tampón de lisis TLB y dos veces con 300 µL de tampón de lisis TLB sin detergentes y sin glicerol. Después del lavado final, se removió el sobrenadante y se agregaron 15 µL de agua y 10 µL de tampón de carga 4X, o bien se prosiguió con el protocolo para los ensayos de fosforilación *in vitro*.

## 6.22.- Fosforilación *in vitro*

Para realizar los ensayos de fosforilación *in vitro*, se resuspendió la resina lavada, conteniendo la proteína inmunoprecipitada, en 24.6  $\mu\text{L}$  de agua. Luego, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de tampón para metalofosfatasas (PMP, New England Biolabs, No. Cat. # B0761S) y 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnCl}_2$  10 mM, para alcanzar una concentración final de 1 mM. A continuación, se agregaron 0.4  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$ -Fosfatasa recombinante, producida en el laboratorio. Las muestras se incubaron a 30° C por 40 minutos y la reacción se detuvo con dos lavados de 5 minutos con 250  $\mu\text{L}$  de tampón TLB sin detergentes ni glicerol, suplementado con  $\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final de 1 mM. Se lavó la resina con 200  $\mu\text{L}$  de tampón TLB sin detergentes ni glicerol, para remover el remanente de inhibidores. Posteriormente, se removió todo el sobrenadante y se agregó a cada tubo los componentes que se indican a continuación:

Inmunoprecipitación (resina)	15 $\mu\text{L}$
Tampón de Reacción 5X	8 $\mu\text{L}$
Dilución de enzima (13 U de enzima/mL)	8 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	9 $\mu\text{L}$
Volumen final	40 $\mu\text{L}$

La dilución de cada enzima se preparó en tampón de dilución (MOPS 5 mM, pH 7.0; NaCl 200 mM; BSA 1 mg/mL), hasta alcanzar una concentración de 13 U/mL.

El tampón de reacción 5X contiene los siguientes reactivos, a la concentración indicada:

Tris pH 7.5	250 mM
NaCl	750 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
ATP	0.5 mM
[ <sup>32</sup> γ]-ATP	1 μL * 2 <sup>nº</sup> decaimientos (100-200 μCi/mL)
H <sub>2</sub> O	a 100 μL

La reacción quinasa se dejó proceder por 10 minutos a 30° C en agitación y se detuvo al agregar 20 μL de tampón de carga 3X. Para los análisis de espectrometría de masas, sólo se agregó ATP frío al tampón de reacción 5X.

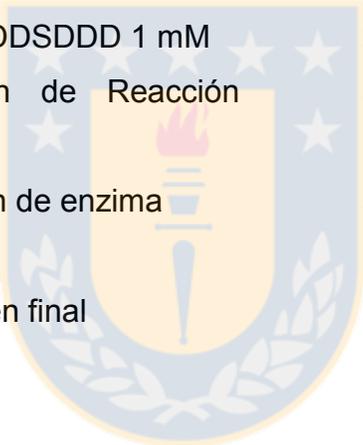
Para los controles negativos, se llevaron a cabo reacciones en ausencia de [<sup>32</sup>γ]-ATP o en ausencia de sustrato (inmunoprecipitación sin anticuerpo anti-Flag). También se realizaron reacciones de fosforilación sin desfosforilación previa con λ-Fosfatasa, para lo cual se utilizaron lisados en tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y todo el

procedimiento de inmunoprecipitación se llevó a cabo en presencia de inhibidores de fosfatasas.

En determinadas ocasiones, se realizaron controles de reacción en presencia del inhibidor específico de CK2, CX-4945 (Siddiqui-Jain y col., 2010). Para ello, la proteína inmunoprecipitada y desfosforilada con  $\lambda$ -Fosfatasa se pre-incubó con CX-4945 100 nM, sólo con tampón de dilución y H<sub>2</sub>O (sin tampón de reacción 5X), durante 20 minutos en hielo con agitación eventual. La concentración de CX-4945 utilizada se calculó con respecto al volumen de reacción final (40  $\mu$ L). A continuación, se agregó el tampón de reacción 5X y se incubó la reacción a 30° C por 10 minutos.

Las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual se tiñó con coomassie coloidal, como se indica en el apartado de “Tinción de proteínas en gel”. El gel se sumergió en solución de glicerol al 1% v/v para remover residuos orgánicos, y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se deshidrató el gel en secador de geles modelo 583 de BioRad, durante 60-90 minutos a 80° C y se expuso a pantalla intensificadora (Amersham Biosciences) en cassette autoradiográfico, durante toda la noche. Las pantallas intensificadoras se escanearon en escáner Epson 4990 en escala de grises de 16 bit. Las señales obtenidas se cuantificaron con el software ImageQuant Version 5.2 (Molecular Dynamics).

Con el fin de determinar la actividad específica de las proteínas recombinantes CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\alpha_2\beta_2$  y CK2 $\alpha'_2\beta_2$ , se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* con el sustrato DSD (péptido RRRDDDSDDD) (Kuenzel y col., 1987), a una concentración final de 100  $\mu$ M. Las reacciones se realizaron con distintas diluciones de enzima (Figura 17.A), y se prepararon como se detalla a continuación:



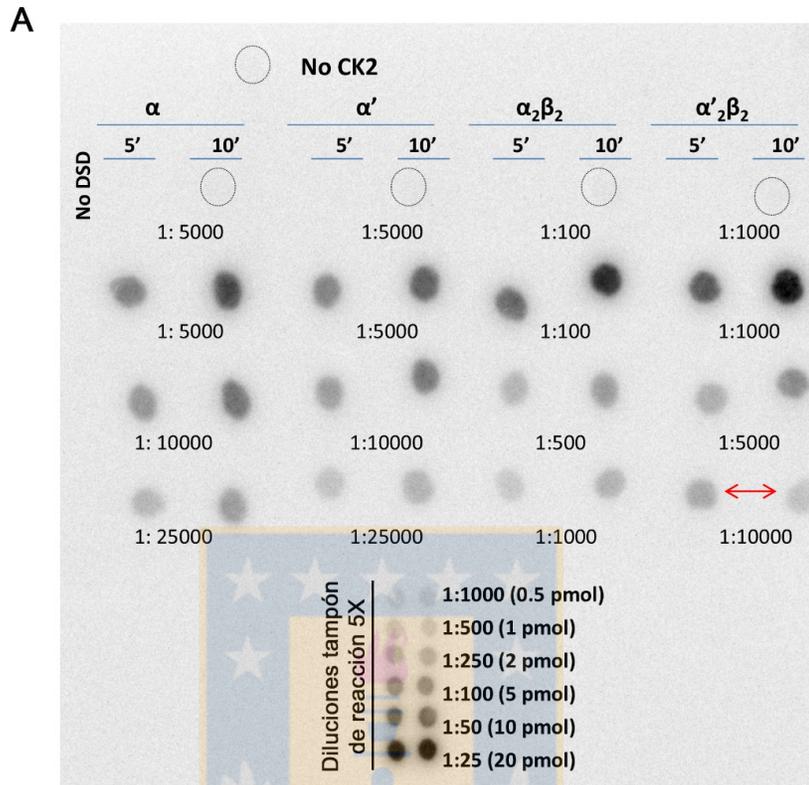
RRRDDDSDDD 1 mM	2.5 $\mu$ L (100 $\mu$ M)
Tampón de Reacción 5X	5 $\mu$ L
Dilución de enzima	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	12.5 $\mu$ L
Volumen final	25 $\mu$ L

Paralelamente, se realizaron controles negativos sin enzima o sin sustrato para cada enzima. Todas las reacciones se incubaron a 30° C en agitación, y se detuvieron a los 5 y 10 minutos. La detención de la reacción se logró al agregar 5  $\mu$ L de la misma sobre papel P81 previamente rotulado, el cual se sumergió en una solución de ácido fosfórico al 1% v/v en agitación. Luego, se lavó el papel P81 tres veces durante 5 minutos en solución de ácido fosfórico al 1% y 30 segundos en etanol al 95%. El papel con las reacciones se dejó

secar y se expuso a pantalla autoradiográfica intensificadora durante 1 hora, la cual se escaneó y analizó como se describió previamente.

La cantidad de ATP incorporado se determinó al cuantificar la señal de [ $\gamma^{32}$ ]-ATP en diluciones seriadas de tampón de reacción 5X (Figura 17.A), equivalentes a cantidades de ATP conocidas (pmol). Se calculó la actividad específica de cada enzima (nmol/min/mg), considerando la cantidad de fosfato (nmol) incorporado por cada enzima, a los 5 y 10 minutos (Figura 17.B), en relación a la concentración de enzima en las mayores diluciones utilizadas (1:25000 para CK2 y CK2 $\alpha'$ , 1:1000 para CK2 $\alpha_2\beta_2$  y 1:10000 para CK2 $\alpha'_2\beta_2$ ).





**B**

Enzima	Concentración (mg/mL)	Actividad específica (nmol/min/mg)
α	32.44	655.1
α'	30.77	373.9
α <sub>2</sub> β <sub>2</sub>	0.39	1150.9
α' <sub>2</sub> β <sub>2</sub>	1.53	3821.9

**Figura 17.- Determinación de actividad específica de CK2α, CK2α', CK2α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> y CK2α'<sub>2</sub>β<sub>2</sub> recombinantes.** **A.-** Se prepararon reacciones para fosforilación *in vitro*, con distintas diluciones de las enzimas CK2α, CK2α', CK2α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> o CK2α'<sub>2</sub>β<sub>2</sub> purificadas desde bacterias, y el péptido DSD (RRRDDDSDDD) como sustrato. Las reacciones se detuvieron a los 5 y 10 minutos. La incorporación de fosfato radioactivo se calculó en base a curva de intensidad de [<sup>32</sup>P]-ATP v/s cantidad de ATP, obtenida por diluciones seriadas del tampón de reacción 5X. **B.-** Actividad específica de cada enzima, calculada en base a la incorporación de fosfato en las reacciones con la mayor dilución de cada enzima a los 5 y 10 minutos de reacción. Fuente: propia.

### 6.23.- Espectrometría de Masas

La proteína de interés,  $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células Flp-In™ T-REx™ U2OS transfectadas con el constructo pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes. El gel se tiñó como se indica en el apartado de “Tinción de proteínas en gel”, para extraer las bandas de interés con el equipo MASSPrep Automated Digestor (Waters/Micromass) del Servicio Proteómica Funcional del Centro de Proteómica regional de Londres (London Regional Proteomics Centre), en la Universidad de Western Ontario, Canadá. Se removió la tinción de la muestra y ésta se digirió toda la noche en gel con 7 ng de Tripsina (Sigma) en 30  $\mu$ L de solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 Mm. Posteriormente, se digirió la muestra toda la noche con 24 ng de Asp-N (Sigma) en 30  $\mu$ L de solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. Luego, se extrajeron las proteínas desde el gel, de acuerdo a los protocolos establecidos en el Servicio de Proteómica Funcional, y las muestras se enviaron al Servicio de Espectrometría de Masas del Laboratorio de Espectrometría de Masas Biológica, en el mismo Centro. Las muestras se sometieron a espectrometría de Masas en tándem en el equipo Q-tof Ultima Global (Micromass), con ionización por electrospray (ESI) y fragmentación por disociación activada/inducida por colisión (CAD/CID). Los análisis se realizaron en software PEAKS Studio (Han y col., 2011) en base de datos UniProt para *Homo sapiens*, con FDR (false discovery rate) de 1%, es decir, se espera que un 99% de la identificación de péptidos sea correcta, y no por azar. Se soportó

hasta 3 sitios sin clivar y 1 sitio de clivaje no específico. Se consideró una intensidad de mínima de ión del 5% para considerar cada modificación post-traducciona.

#### **6.24.- Ensayos de estabilidad**

Para los análisis de estabilidad en células HEK 293 y H1299, se cultivaron las células en presencia de cicloheximida (CHX, Santa Cruz) a concentraciones de 50 y 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente. Para los análisis de degradación proteosoma, se trataron células HEK 293 con 20  $\mu\text{M}$  del inhibidor de proteosoma MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma) durante 6 horas.

#### **6.25.- Análisis Bioinformáticos**

Para la identificación de sitios potenciales de fosforilación, se utilizaron las siguientes herramientas:

- KinasePhos: Herramienta de predicción de sitios de fosforilación que considera la secuencia de aminoácidos y con ello los patrones de acoplamiento (termoestabilidad) que rodean a los sitios modificados, además de la accesibilidad del solvente (Huang y col., 2005).

- NetPhos 3.1: Aplica un algoritmo que permite predecir sitios de fosforilación específicos para 17 grupos de quinasas. Se basa en datos experimentalmente validados (Blom y col., 2004).
- ScanSite: Se basa en estudios de librerías de péptidos. Predice sitios aceptores para un gran rango de quinasas y motivos de unión a fosfoproteínas, utilizando una aproximación entrópica. Adicionalmente, informa sobre la probabilidad de una región de interés de ubicarse en la superficie, es decir, de estar expuesta (Songyang y col., 1994).

Adicionalmente, se compararon los resultados obtenidos con la información disponible en la base de datos Phosphosite Plus, la cual resume información curada -publicada o no- de análisis de espectrometría de masas que demuestran la presencia de modificaciones post-traduccionales *in vivo*, tales como fosforilación, acetilación, ubiquitinación y metilación (Hornbeck y col., 2015).

Finalmente, se utilizó la herramienta epestfind, el cual permite localizar posibles secuencias PEST, ricas en residuos de prolina (P), serina (S), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) y treonina (T), relacionadas con la degradación proteica. El algoritmo incluye la detección de regiones hidrofílicas de al menos 12 aminoácidos de longitud, que contengan residuos cargados negativamente (al menos una prolina, una serina o treonina y un ácido aspártico o ácido glutámico), y flanqueadas por residuos cargados positivamente. Para

calcular el puntaje de cada secuencia, se considera el enriquecimiento en los residuos antes mencionados y el índice de hidrofobicidad. Regiones con puntaje por sobre 5.0 son consideradas como potenciales secuencias PEST (Rechsteiner y Rogers, 1996; Rogers y col., 1986).

#### **6.26.- Análisis estadísticos**

El análisis de los datos se llevó a cabo en el Programa GraphPad Prism 5, mediante el test de Welch (t-test con corrección de Welch) no pareado, para comparar muestras normales con varianzas diferentes. Para comparar más de dos grupos, los datos se analizaron mediante ANOVA (Analysis of Variance) de una vía para muestras que difieren en solo factor (una sola variable independiente, e.g., tratamiento), o de dos vías para muestras que difieren en dos factores (e.g. concentración de una droga y tiempo de tratamiento). Las comparaciones se realizaron en unidades relativas a la condición control.

## 7. RESULTADOS

### 7.1.- Objetivo específico I: Validar a SALL2 como sustrato de CK2.

#### 7.1.1.- La secuencia proteica de SALL2 contiene múltiples sitios putativos de fosforilación por CK2.

Con el objetivo de identificar posibles mecanismos de regulación de SALL2 a nivel post-traducciona, se realizó una búsqueda bioinformática para detectar sitios que pudieran estar sujetos a modificaciones post-traduccionales. A este respecto, la base de datos Phosphosite Plus (Hornbeck y col., 2015) contiene información de modificaciones post-traduccionales, proveniente desde diversos análisis masivos, e indica que la proteína SALL2 se encuentra altamente fosforilada a lo largo de toda su secuencia (Figura 6.A). Las quinasas responsables de estas fosforilaciones y el efecto celular de estas modificaciones no han sido definidos aún. Para obtener información sobre las quinasas que pudieran reconocer estos sitios, se realizó una búsqueda de sitios consenso para quinasas específicas en la secuencia de SALL2. Para ello, se utilizaron las herramientas de predicción KinasePhos (Huang y col., 2005), NetPhos 3.1 (Blom y col., 2004) y ScanSite (Songyang y col., 1994).

La búsqueda de sitios putativos de fosforilación arrojó la identificación de varios sitios consenso distribuidos a lo largo de toda la secuencia proteica de SALL2, los cuales pueden ser reconocidos por diversas quinasas (no mostrado). Entre ellas, se destacan por su abundancia los sitios consenso para las quinasas Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK-3) y Caseína Quinasa II (CK2), y sugieren que estas quinasas están involucradas en la fosforilación de dos regiones definidas o *clusters*, ubicados entre los residuos 222-303 en el extremo amino terminal y entre los residuos 757-814 en el extremo carboxilo terminal de la proteína SALL2 humana (isoforma E1), respectivamente. Los resultados obtenidos con las herramientas de predicción, junto con la información disponible en Phosphosite Plus, se resume en la Tabla 4. De manera de simplificar la información entregada por Phosphosite Plus, en la Tabla 4 se indican sólo los sitios de fosforilación localizados en o cerca de los *clusters* de fosforilación amino o carboxilo terminal predichos previamente, y/o que coinciden con la información entregada por la mayoría de las herramientas de predicción.

Los residuos putativos para GSK-3 identificados por la mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas, en las secuencias proteicas de SALL2 Humano (NP\_005398.2), de Ratón (NP\_056587.2) y de Rata (NP\_001100732.1), corresponden a S299 y T303 (Tabla 4, destacados en azul). La herramienta NetPhos 3.1 predice además que el residuo S243 podría ser fosforilado por GSK-3 en humanos. De acuerdo a la información disponible en

Phosphosite Plus, este sitio ha sido identificado como fosforesiduo en células en cultivo. Utilizando la herramienta PhosphoMotif Finder, de Human Protein Reference Database (HPRD (Amanchy y col., 2007)), se corroboró la posibilidad de que este sitio pueda ser reconocido por GSK-3, aunque varios autores han sugerido que podría ser blanco de la quinasa dependiente de ciclinas, CDK2 (Christensen y col., 2010; Franz-Wachtel y col., 2012; Rigbolt y col., 2011).

Los residuos putativos para CK2 identificados por la mayoría de herramientas de predicción en la secuencia de SALL2 de humano, ratón y rata, corresponden a S28, S763, T778 y S806 (Tabla 4, destacados en rojo). La información disponible en la base de datos Phosphosite Plus indica que los residuos S28, S802 y S806 han sido reportados como fosforesiduos en análisis masivos (Christensen y col., 2010; Franz-Wachtel y col., 2012; Van Hoof y col., 2009; Mayya y col., 2009; Mertins y col., 2013; Rigbolt y col., 2011). A diferencia de S28 y S806, S802 no representa un sitio consenso estándar para CK2 (S/T-X-X-E/D) (Allende y Allende, 1995; Kuenzel y col., 1987). Sin embargo, se consideró como sitio putativo para CK2, ya que se han reportado ejemplos de fosforilación mediada por CK2 en sitios como este (S-X-E) en otros sustratos (Deplus y col., 2014).

Con la información hasta ahora recabada, se considerarán como sitios putativos para fosforilación mediada por GSK-3 a los sitios: S243, T299 y S303,

presentes en el cluster de fosforilación amino terminal (202-303), mientras que para CK2 se considerarán los residuos: S28, S763, T778, S802 y S806, presentes en su mayoría en el cluster de fosforilación carboxilo terminal (757-814).

<b>Especie</b> <b>Programa</b>	<b><i>Homo sapiens</i></b> <b>(NP_005398.2)</b>	<b><i>Mus musculus</i></b> <b>(NP_056587.2)</b>	<b><i>Ratus norvegicus</i></b> <b>(NP_001100732.1)</b>
KinasePhos (Huang y col., 2005)	S28, S763, S806 (CK2)	S28, S761, S803 (CK2)	S28, S761, S803 (CK2)
NetPhos 3.1 (Blom y col., 2004)	S14, S20, S28, T44, S265, S358*, S757, S763, T778, S790, S806, S887, S895* (CK2)	S14, S20, S28, S44, S264, S363*, S755, S761, T775, S787, S803, S857*, S884, T885*, T921* (CK2)	S14, S20, S28, S44, S264, S363*, S755, S761, T775, S787, S803, S857*, T885*, S887*, T921* (CK2)
	S222, S243*, T299, S303, T527, S757*, S987, S996 (GSK3)	S222, T298, S302, T466*, T526, S745*, S755*, S989, S993 (GSK3)	S222, T298, S302, T526, S989, S993 (GSK3)
ScanSite (Songyang y col., 1994)	S763, T778, S806* (CK2)	S741*, S761, T775 (CK2)	S741*, S761, T775 (CK2)
	T299, S303 (GSK3)	T298, S302, S989* (GSK3)	T298, S302, S989* (GSK3)
Phosphosite Plus (Hornbeck y col., 2015)	S28, S243, T253, S258, T269*, S797, S802, S806, T814	S28, S243, T253, S257, S794, S799, S803, T811	-----

**Tabla 4.- Sitios putativos de fosforilación identificados en las secuencias de SALL2 de Humano, Ratón y Rata.** Se realizó una búsqueda bioinformática de sitios putativos de fosforilación en las secuencias de SALL2 humano (*Homo sapiens*), de Ratón (*Mus musculus*) y de Rata (*Ratus norvegicus*). El número de identificación de las secuencias utilizadas se indica

entre paréntesis. En azul se destacan los residuos putativos de fosforilación por GSK-3. En rojo se destacan los residuos putativos para fosforilación por CK2. Con asterisco se señalan aquellos residuos que no se identificaron en todas las especies por el mismo programa. Para la herramienta Netphos 3.1, se utilizó un puntaje de corte de 0.5. Para Phosphosite Plus, sólo se indican los sitios identificados en *clusters* de fosforilación amino o carboxilo terminal, y el residuo de Ser28. Fuente: propia.

Tomando en consideración que tanto CK2 como GSK-3 pueden afectar la vida media de sus sustratos (Ampofo y col., 2010; Lin y col., 1996; Xu y col., 2009), se evaluó la presencia de secuencias de degradación PEST con la herramienta epestfind (Rechsteiner y Rogers, 1996; Rogers y col., 1986). Estas secuencias corresponden a regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T) y, en menor medida, ácido aspártico (D), flanqueadas por residuos básicos, y se relacionan con una rápida degradación de las proteínas que las contienen (Rogers y col., 1986). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5, y sugieren la presencia de cuatro secuencias de degradación PEST (Figura 18.C): tres de ellas en el extremo amino terminal, y una en el extremo carboxilo terminal. Una de las potenciales secuencias PEST en el extremo amino terminal se encuentra entre los residuos 252-271 (Tabla 5 y Figura 18.C, destacada en azul), y se ubica próxima al *cluster* de fosforilación amino terminal que contiene los sitios putativos de fosforilación para GSK-3. Los sitios putativos de fosforilación para CK2 se encuentran contenidos en o

adyacentes a la potencial secuencia PEST del extremo carboxilo terminal (Tabla 5 y Figura 18.C, destacada en verde).

Para la secuencia proteica humana, se señalan dos secuencias PEST en el extremo carboxilo terminal, de igual ubicación, pero de diferente longitud (Figura 18.A y B). Esto, debido a que se ha reportado un polimorfismo del residuo 746 (variante dbSNP\_ID rs1263810), el cual puede presentarse como glicina o arginina. En el primer caso (glicina, Figura 18.A), la potencial secuencia PEST detectada es más extensa y el puntaje o *score* otorgado por el algoritmo es menor que en el segundo caso (arginina, Figura 18.B).

Las regiones PEST, de naturaleza hidrofílica, se encuentran en extensiones conformacionalmente flexibles de las proteínas, sin estructura definida y expuestas al solvente (Singh y col., 2006). Con el objetivo de determinar si las secuencias de degradación PEST identificadas previamente, se localizan en regiones de estructura no definida, se analizó la secuencia de SALL2 con el programa IUPred, el cual predice regiones de estructura terciaria desordenada, en base a la estimación de la energía de interacciones entre residuos y en la frecuencia observada de pares de interacción (Dosztányi y col., 2005). La Figura 18.D muestra que la predicción de la estructura general de SALL2 es, en su mayoría, desordenada (puntaje sobre 0.5), y que la región de mayor predicción de desorden en la proteína corresponde a la zona donde se localiza la potencial secuencia de degradación PEST carboxilo terminal.

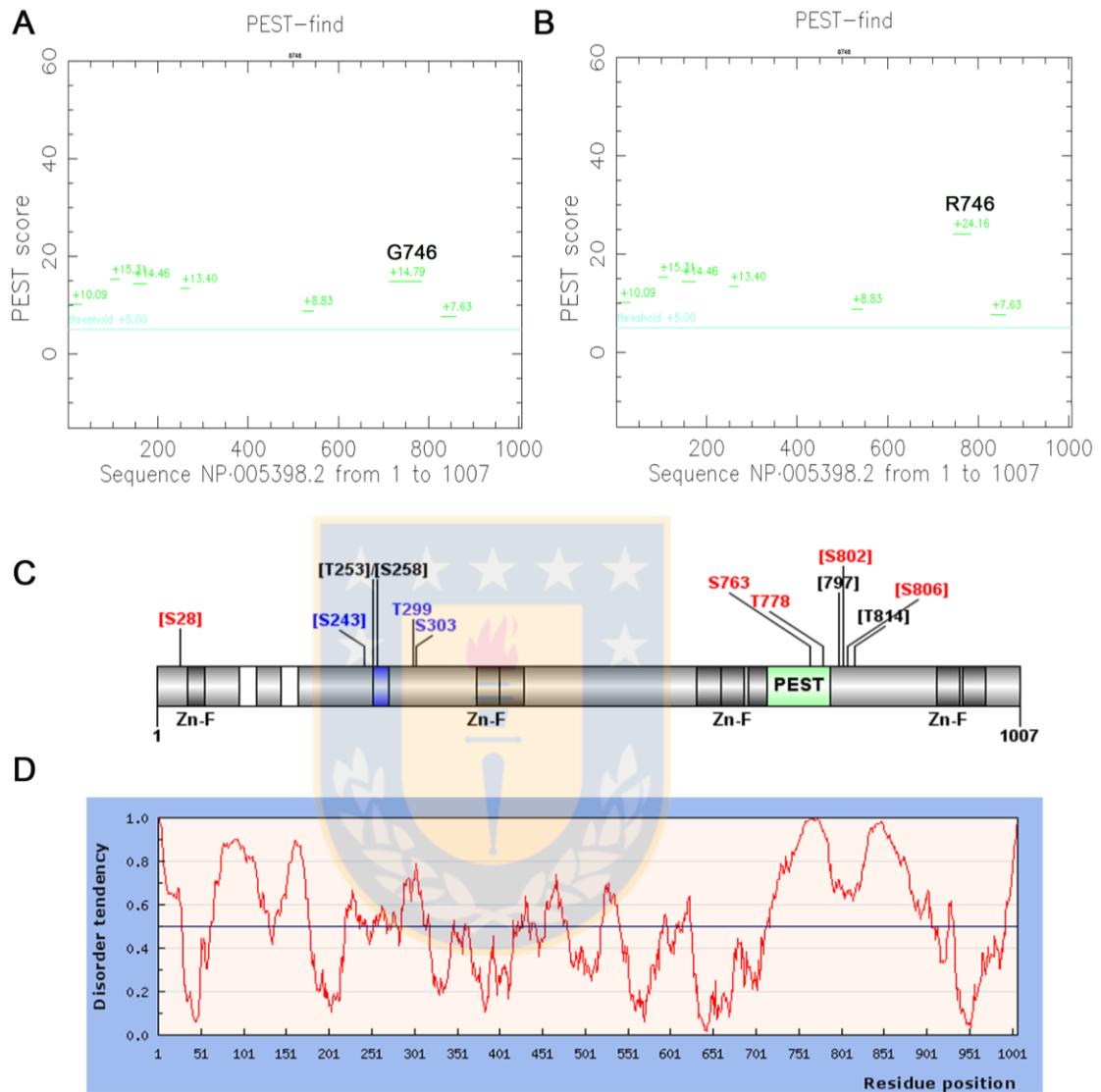
También se predijo un alto grado de desorden en las regiones donde se localizan las dos primeras potenciales secuencias PEST amino terminales (ubicadas entre los residuos 96-116 y 146-166).

Las regiones de predicción de menor desorden, identificadas como regiones globulares, corresponden a los residuos ubicados entre 366-416, 546-592 y 620-674. Las regiones 366-416 y 620-674 coinciden con el segundo y tercer par de motivos de dedos de Zinc, tipo C2H2.



<b><i>Homo sapiens</i></b> <b>(NP_005398.2)</b>		<b><i>Mus musculus</i></b> <b>(NP_056587.2)</b>		<b><i>Ratus norvegicus</i></b> <b>(NP_001100732.1)</b>	
<b>Ubicación</b>	<b>Puntaje</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Puntaje</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Puntaje</b>
aa 96-116	15.31	aa 96-116	14.42	aa 96-116	9.51
aa 146-166	14.46	aa 146-166	14.46	aa 146-176	14.56
aa 252-271	13.4	aa 252-270	12.28	aa 252-270	12.28
aa 713-786	14.79	aa 711-783	16.45	aa 711-783	15.33
aa 746-786 (p.Gly746Arg)	24.16				

**Tabla 5.- Potenciales secuencias PEST identificadas con epestfind en las secuencias proteicas de SALL2 de Humano, Ratón y Rata.** Se identificaron tres potenciales secuencias PEST en el extremo amino terminal y una en el extremo carboxilo terminal de SALL2 humano (*Homo sapiens*), de Ratón (*Mus musculus*) y de Rata (*Ratus norvegicus*). La región destacada en azul se encuentra próxima a los sitios putativos de fosforilación para GSK-3. La región destacada en verde contiene o se encuentra adyacente a los sitios putativos de fosforilación para CK2. p.Gly746Arg indica el efecto del polimorfismo rs1263810 en la proteína humana. El número de identificación de las secuencias utilizadas se señala entre paréntesis. Se indica también el puntaje otorgado por el algoritmo (epestfind) a cada secuencia identificada. Se consideraron como relevantes aquellas secuencias con puntaje sobre 5.0. aa: aminoácidos. Fuente: propia.



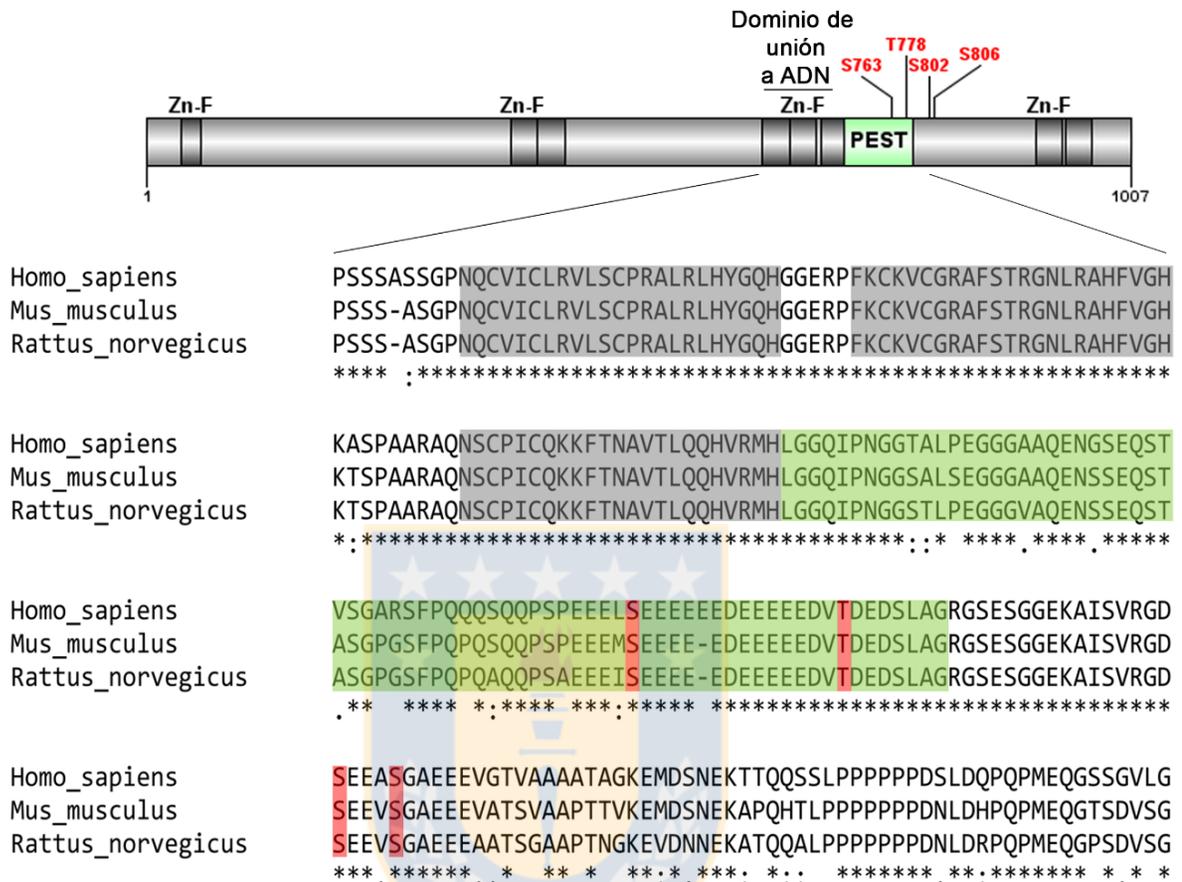
**Figura 18.- Identificación de potenciales secuencias de degradación PEST y sitios de fosforilación mediada por GSK-3 y CK2.** Se identificaron potenciales regiones de degradación PEST con la herramienta epestfind, en la secuencia proteica de SALL2 humano, isoforma E1, conteniendo **A.-** glicina (G746) o **B.-** arginina en el residuo 746 (R746). En el eje Y se representa el puntaje entregado por el programa, y en el eje X se observa la longitud de la secuencia. **C.-** Representación esquemática de la secuencia proteica de SALL2 humano, isoforma E1, conteniendo glicina en el residuo 746. Los motivos de dedos de Zinc (Zn-F) se representan en gris oscuro. Las secuencias PEST del extremo amino terminal, ubicadas entre los residuos 96-116 y 146-166, se representan en blanco; la secuencia PEST amino terminal

ubicada entre los residuos 252-271 se muestra en azul. En verde, se destaca la potencial secuencia PEST del extremo carboxilo terminal, localizada entre los residuos 713-786 (PEST). Los sitios que han sido reportados como fosfo-residuos y que se localizan en o cercanos a las regiones PEST identificadas, se señalan entre corchetes. Los sitios putativos de fosforilación por GSK-3 y CK2 se destacan en azul y rojo, respectivamente. **D.-** Predicción de desorden de la estructura de la proteína SALL2 con la herramienta IUPred. En el eje Y se representa el puntaje entregado por el programa, y en el eje X se observa la longitud de la secuencia. Fuente: propia.



Los resultados hasta ahora obtenidos *in silico*, sugieren que SALL2 podría ser regulada de manera post-traducciona por las quinasas CK2 y GSK-3. Mediante espectrometría de masas, se han detectado fosforilaciones en dos de los sitios putativos identificados para CK2 en el *cluster* carboxilo terminal (Van Hoof y col., 2009; Mertins y col., 2013; Rigbolt y col., 2011), mientras que no existe mayor información disponible respecto a los sitios putativos identificados para GSK-3, salvo el sitio S243, que también podría ser reconocido por otras quinasas. Adicionalmente, la región de mayor probabilidad de desorden estructural coincide con la potencial secuencia PEST carboxilo terminal, que contiene los sitios putativos de fosforilación para CK2. En virtud de lo anterior, este trabajo se enfocó al estudio de la regulación de SALL2 mediada por CK2.

Como se observa en la Figura 19, los sitios putativos para CK2 se localizan en o próximos a la potencial secuencia PEST detectada en el extremo carboxilo terminal, la que, a su vez, se encuentra adyacente al dominio de unión a ADN de SALL2 (Gu y col., 2011; Li y col., 2004), en una región altamente conservada entre las especies analizadas. Todas las regiones y sitios identificados se encuentran tanto en la isoforma E1 como en la isoforma E1A de SALL2.



**Figura 19.- Sitios putativos para fosforilación mediada por CK2 y potencial secuencia PEST en extremo carboxilo terminal de SALL2.** En la parte superior se observa una representación esquemática de la proteína SALL2 humana. Los motivos de dedos de Zinc (Zn-F) se representan en gris oscuro. En verde se destaca la potencial secuencia de degradación PEST, adyacente al dominio de unión a ADN. Los sitios putativos de fosforilación mediada por CK2 (S763, T778, S802, S806) se indican en rojo. En la parte inferior se aprecia un alineamiento de la región de interés de las secuencias proteicas de SALL2 de humano (*Homo sapiens*, NP\_005398.2), Ratón (*Mus musculus*, NP\_056587.2) y Rata (*Rattus norvegicus*, NP\_001100732.1). Fuente: propia.

### 7.1.2.- SALL2 y CK2 interactúan de forma directa.

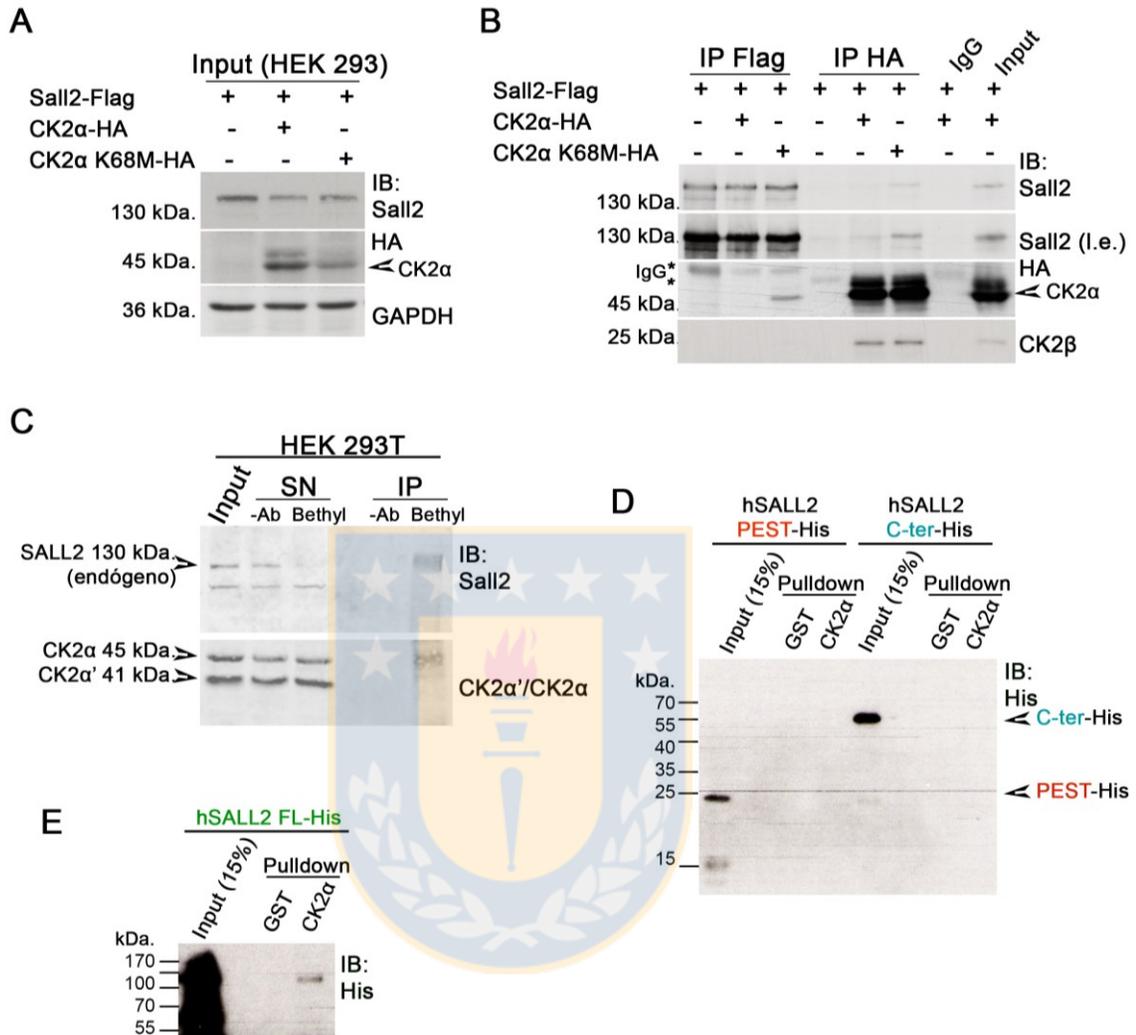
Para evaluar si SALL2 constituye un potencial sustrato para CK2, en primer lugar, se analizó si existe interacción entre ambas proteínas en células HEK 293. Estas células se co-transfectaron con los plásmidos pCMV2(NH)/Sall2-Flag junto al vector vacío pCGN-HA o junto a los plásmidos pRC-CMV/CK2 $\alpha$ -HA (contiene ADNc codificante para CK2 $\alpha$  *wild type* en fusión a epítipo HA en el extremo carboxilo terminal, Addgene No. Cat. # 27086) o pRC-CMV/CK2 $\alpha$  K68M-HA (contiene ADNc codificante para dominante negativa de CK2 $\alpha$  en fusión a epítipo HA en el extremo carboxilo terminal, Addgene No. Cat. # 27089). Este último codifica para CK2 $\alpha$  mutado en el residuo de lisina 68, el cual es sustituido por metionina (Penner y col., 1997; Turowec y col., 2010). Este residuo de lisina se encuentra conservado en todas las quinasas y es esencial para la actividad catalítica de todas ellas, puesto que orienta la molécula de ATP al interactuar con los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  (Adams, 2001; Hanks y Hunter, 1995).

Una vez co-transfectadas las células (Figura 20.A), se inmunoprecipitó SALL2-Flag con un anticuerpo anti-Flag y se evaluó la co-inmunoprecipitación de CK2 $\alpha$ -HA y CK2 $\alpha$  K68M-HA por *western blot*, con un anticuerpo anti-HA. También se realizó la inmunoprecipitación inversa, es decir, se inmunoprecipitó CK2 $\alpha$ -HA o CK2 $\alpha$  K68M-HA con un anticuerpo anti-HA y se evaluó la co-inmunoprecipitación de SALL2-Flag con un anticuerpo anti-Sall2. Como se

observa en la Figura 20.B, al inmunoprecipitar SALL2-Flag, se aprecia una clara co-inmunoprecipitación de CK2 $\alpha$  K68M-HA, mientras que al inmunoprecipitar CK2 $\alpha$ -HA o CK2 $\alpha$  K68M-HA, se observa la co-inmunoprecipitación de SALL2-Flag con ambas proteínas, pero en mayor medida con CK2 $\alpha$  K68M-HA. Para dilucidar si la enzima sobre-expresada se encuentra como subunidad catalítica libre o como holoenzima, se evaluó también la co-inmunoprecipitación de la subunidad regulatoria CK2 $\beta$ . Tanto CK2 $\alpha$ -HA o CK2 $\alpha$  K68M-HA interaccionan con esta subunidad en células HEK 293, sugiriendo que forman parte de la holoenzima.

Para corroborar que la interacción entre CK2 y SALL2 ocurre en ausencia de sobre-expresión, se realizó la inmunoprecipitación de SALL2 con anticuerpo anti-Sall2 (Bethyl) en células sin transfectar, con mayores cantidades de lisado (Figura 20.C), observándose la co-inmunoprecipitación de CK2 $\alpha$ , pero no CK2 $\alpha'$ .

Finalmente, se realizaron ensayos de *GST-Pulldown*, utilizando a GST-CK2 $\alpha$  humana como proteína “carnada”, y las proteínas hSALL2 FL-His, hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His como “presa”. Como se observa en la Figura 20.D y E, la interacción directa *in vitro* se detectó de forma tenue y sólo con la proteína hSALL2 FL-His. En conjunto, estos resultados indican que SALL2 interacciona con CK2 de forma directa y que esta interacción ocurre a nivel celular, sugiriendo que SALL2 podría ser fosforilada por CK2.



**Figura 20.- SALL2 y CK2 interactúan en células HEK 293. A.-** Se co-transfectaron células HEK 293 con los plásmidos pCMV2(NH)/Sall2-Flag junto a pCGN-HA (vector vacío), pRC-CMV/CK2α-HA o pRC-CMV/CK2α K68M-HA. La expresión de SALL2-Flag y CK2α-HA o la dominante negativa CK2α K68M-HA se evaluó mediante *western blot*. **B.-** Se realizaron inmunoprecipitaciones de los lisados celulares analizados en **A**, con anticuerpos anti-Flag o anti-HA. Las flechas señalan las bandas correspondientes a SALL2-Flag, CK2α-HA y CK2α K68M-HA. IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina (banda) o control con IgG normal (rótulo superior); I.e.: exposición prolongada (*long exposure*); IP: inmunoprecipitado. n=4. **C.-** Se inmunoprecipitó SALL2 endógeno desde lisado de células HEK 293T con anticuerpo anti-Sall2

(Bethyl) y se evaluó la co-inmunoprecipitación de CK2 $\alpha$  y CK2 $\alpha'$ . SN: sobrenadante; IP: inmunoprecipitado; -Ab: inmunoprecipitación sin anticuerpo. n=3. **D** y **E**.- Se realizaron ensayos de *GST-Pulldown* con la proteína GST-CK2 $\alpha$  humana como proteína “carnada”, y las proteínas hSALL2 FL-His (**E**) o hSALL2 C-ter-His y hSALL2 PEST-His (**D**) como “presa”. Como control se utilizó resina sólo con GST. La interacción de proteínas se evaluó mediante *western blot*. n=1. Fuente: propia.

### 7.1.3.- SALL2 es fosforilado por CK2 *in vitro*.

Con el objetivo de determinar si SALL2 es fosforilado por CK2, se transfectaron células de osteosarcoma Flp-In™ T-REx™ U2OS (U2OS con un único sitio de recombinación FRT-Flp) con el plásmido pCMV2(NH)/Sall2-Flag, de modo de inmunoprecipitar la proteína con un anticuerpo anti-Flag, para posteriormente someterla a ensayos de fosforilación *in vitro* con [ $\gamma^{32}$ ]-ATP en presencia de CK2. Se utilizaron las células Flp-In™ T-REx™ U2OS como modelo, ya que la proteína SALL2 es indetectable, lo cual también ha sido reportado en U2OS (Figura 21.A; The Human Protein Atlas, (Thul y col., 2017; Uhlén y col., 2015)).

Con el fin de obtener los mayores niveles posibles de proteína, se estandarizó la concentración de ADN a utilizar en la transfección con fosfato de calcio. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se evaluaron los niveles de SALL2-Flag por *western blot*. Como se observa en la Figura 21.A y B, la sobre-expresión de SALL2-Flag conlleva a la

inmunodetección de dos bandas, siendo preponderante la de mayor tamaño. Los mayores niveles de proteína se alcanzan al transfectar 30  $\mu\text{g}$  de ADN plasmidial pCMV2(NH)/Sall2-Flag en placas de 100 mm. Una mayor cantidad de ADN no se relaciona con una expresión más eficiente.

Luego, se estandarizó la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag, con el fin de determinar la cantidad óptima de anticuerpo para obtener una eficiente purificación de la proteína de interés. Esto se logró al utilizar 2.5  $\mu\text{g}$  de anticuerpo, pudiendo capturar cerca de un 50% de la proteína presente en la muestra (Figura 21.C y D). Concentraciones mayores de anticuerpo no generaron un incremento en la cantidad de proteína purificada.

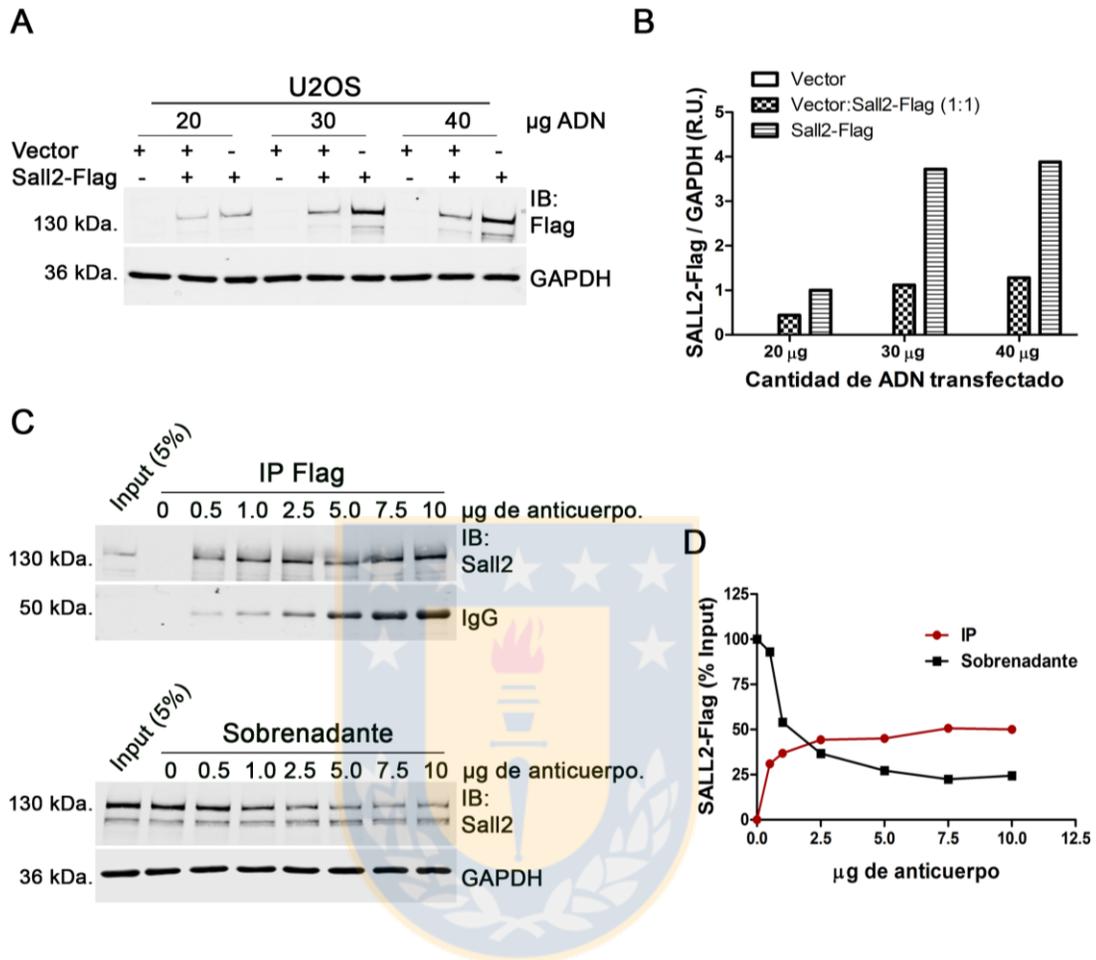
Para realizar los ensayos de incorporación de fosfato radioactivo mediado por CK2 *in vitro*, se inmunoprecipitó la proteína sobre-expresada y se desfosforiló con  $\lambda$ -Fosfatasa recombinante. La proteína desfosforilada se incubó en presencia de  $[\gamma^{32}]\text{-ATP}$  y las subunidades catalíticas CK2 $\alpha$  o CK2 $\alpha'$ , o las holoenzimas CK2 $\alpha_2\beta_2$  o CK2 $\alpha'_2\beta_2$ , purificadas desde bacterias (Turowec y col., 2010). Como se muestra en la Figura 22.A y B, SALL2-Flag es fosforilado por todas las formas de CK2 utilizadas, pero en mayor medida por la subunidad catalítica CK2 $\alpha$ . La fosforilación, al igual que la inmunodetección de SALL2-Flag, da lugar a dos bandas, siendo preponderante la de mayor tamaño. En el carril 2 de la Figura 22.A se observa que la proteína es fosforilada incluso en ausencia de CK2 recombinante. En el carril 3, sin embargo, se aprecia que esta

fosforilación basal disminuye al pre-incubar la reacción con el inhibidor específico de CK2, CX-4945 (Siddiqui-Jain y col., 2010). En los carriles 6, 10, 14 y 18, se observa que no ocurre incorporación de fosfato radioactivo si la proteína no es previamente desfosforilada, sugiriendo que los sitios fosfoaceptores ya se encuentran ocupados al momento de inmunoprecipitar la proteína.

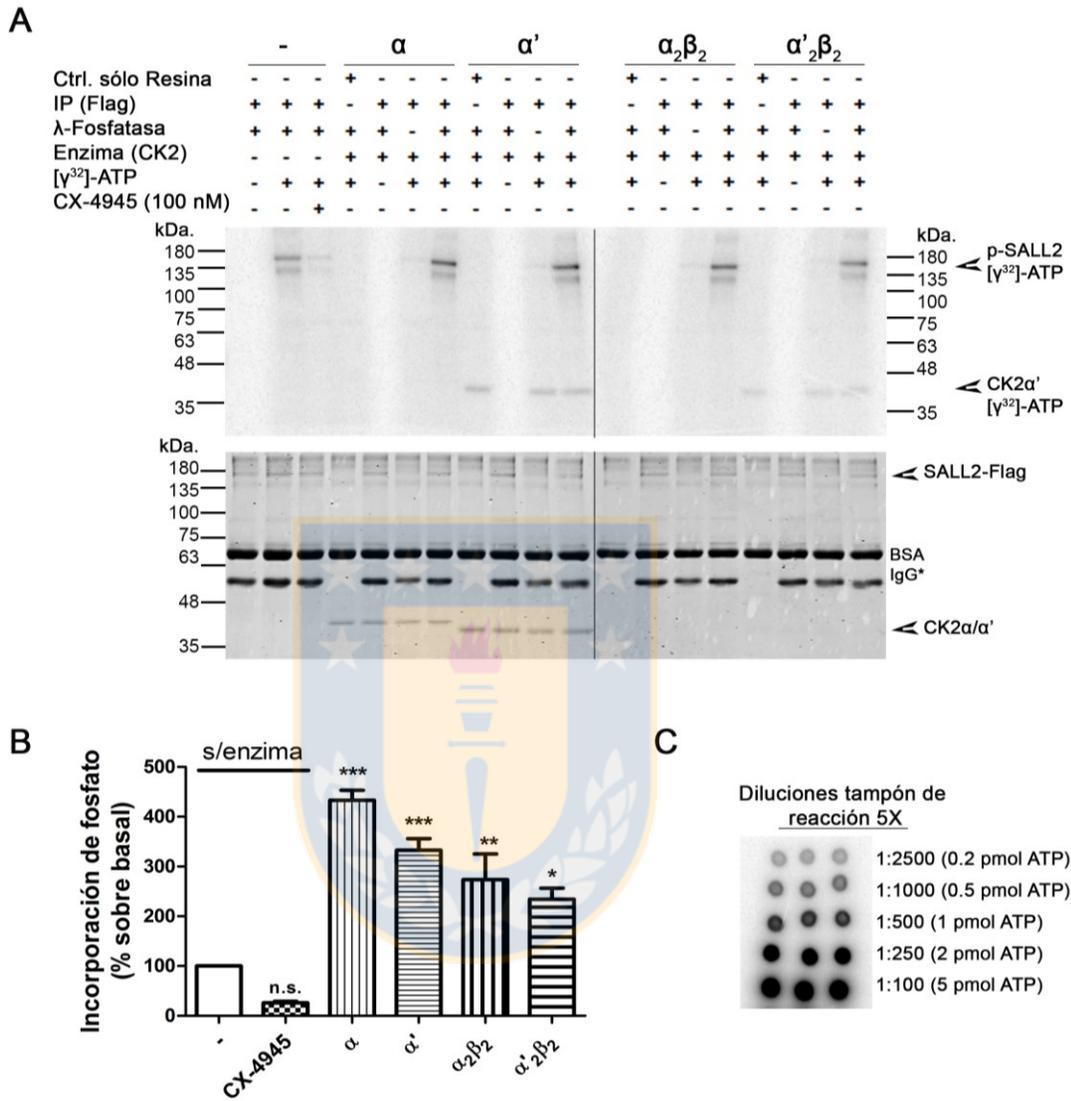
En la Figura 22.C se puede apreciar que la intensidad de la señal radioactiva es directamente proporcional a la cantidad de ATP y que no hay saturación de la señal radioactiva en la imagen. Para determinar la cantidad de fosfato incorporado en cada condición, se generó una curva de intensidad de radioactividad versus la cantidad de ATP (no mostrado). Con el fin de estimar la estequiometría de incorporación de fosfato en relación a la cantidad de proteína utilizada como sustrato, se calculó la cantidad de SALL2-Flag utilizada en las reacciones de fosforilación *in vitro*. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con una muestra de proteína inmunoprecipitada y desfosforilada, y concentraciones crecientes de BSA (Figura 23.A). Luego, se generó una curva estándar de BSA, graficando la intensidad integrada de la banda de BSA en cada carril versus la cantidad de BSA en nanógramos (Figura 23.B). Finalmente, se determinó la cantidad de proteína inmunoprecipitada, al interpolar el valor de la intensidad integrada de la banda correspondiente a SALL2-Flag en la curva de BSA. Se estimó el tamaño teórico de la proteína con la herramienta Compute pI/Mw de Expasy y se obtuvo la cantidad de proteína

utilizada en picomoles. La cuantificación de la inmunoprecipitación de SALL2-Flag con una curva estándar de BSA arrojó como resultado que para cada reacción quinasa mostrada en la Figura 22.A, se utilizaron 0.547 pmoles de SALL2-Flag (Figura 23.C). La estequiometría de reacción entre ATP y SALL2-Flag para CK2 $\alpha$  corresponde a  $2.024 \pm 0.859$  (n=3), es decir, bajo las condiciones experimentales utilizadas, CK2 $\alpha$  incorpora aproximadamente 2 moles de fosfato por mol de SALL2-Flag.





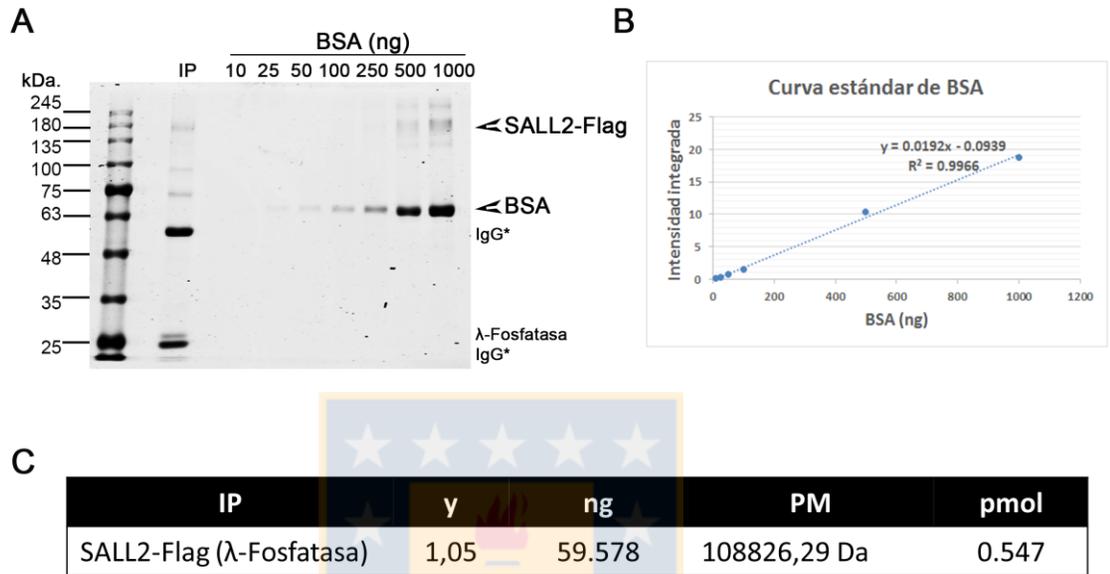
**Figura 21.- Estandarización de transfección de pCMV2(NH)/Sall2-Flag y de inmunoprecipitación de SALL2-Flag con anticuerpo anti-Flag.** **A.-** Se transfectaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS en placas de 100 mm con distintas cantidades de ADN plasmidial. Se utilizaron los plásmidos pCMV2(NH)-Flag (Vector), pCMV2(NH)/Sall2-Flag (Sall2-Flag), o una combinación de ambos en relación 1:1 y se inmunodetectó SALL2-Flag mediante *western blot*. **B.-** Cuantificación de los niveles de SALL2-Flag en **A**, normalizados con GAPDH. n=1. **C.-** Se inmunoprecipitó SALL2 desde lisados de células U2OS transfectadas con pCMV2(NH)/Sall2-Flag, con distintas cantidades de anticuerpo anti-Flag. Se inmunodetectó SALL2 en el sobrenadante y la fracción inmunoprecipitada. IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina; IP: inmunoprecipitado. **D.-** Cuantificación de **C**. n=1. Fuente: propia.



**Figura 22.- SALL2 es fosforilado por CK2 in vitro.** **A.-** Se inmunoprecipitó la proteína SALL2-Flag desde células Flp-In™ T-REx™ U2OS, con anticuerpo anti-Flag. La proteína se desfosforiló con  $\lambda$ -Fosfatasa y se incubó con  $[\gamma^{32}]$ -ATP en ausencia de enzima (-), en ausencia de enzima y con CX-4945, o en presencia de CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\alpha_2\beta_2$  o CK2 $\alpha'_2\beta_2$  recombinantes. Las flechas señalan las bandas correspondientes a SALL2-Flag y CK2 $\alpha$  y/o  $\alpha'$ , tanto en la autoradiografía (parte superior) como en la tinción de coomassie coloidal (parte inferior). Ctrl. sólo resina: inmunoprecipitación sin anticuerpo; IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina; IP (Flag): inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag. **B.-** Cuantificación relativa de incorporación de fosfato con respecto a los niveles de fosforilación basal, normalizado con respecto a los

niveles de proteína (barras  $\pm$  SEM). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía con post-test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s.: no significativo. **C.-** Se sembraron diluciones secuenciales de tampón de reacción para cuantificar la cantidad de fosfato incorporado en cada condición mostrada en **A.** n=3. Fuente: propia.





**Figura 23.- Cuantificación de la cantidad de proteína inmunoprecipitada para ensayo de fosforilación *in vitro*.** **A.-** Se inmunoprecipitó SALL2-Flag para los ensayos de fosforilación *in vitro* y se sembró una muestra para cuantificar por electroforesis en gel de policarilamida, junto a concentraciones crecientes de BSA. Las flechas indican las bandas correspondientes SALL2-Flag y BSA. IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina. **B.-** Se obtuvo una curva estándar de BSA, cuantificando la señal (intensidad integrada) de BSA con el software Odyssey V3.0. **C.-** Se interpoló el valor de la señal de SALL2-Flag en la curva estándar, y se obtuvo la cantidad de proteína inmunoprecipitada, en nanogramos. A partir de este valor se calcularon los picomoles de proteína utilizados para la reacción *in vitro*. Fuente: propia.

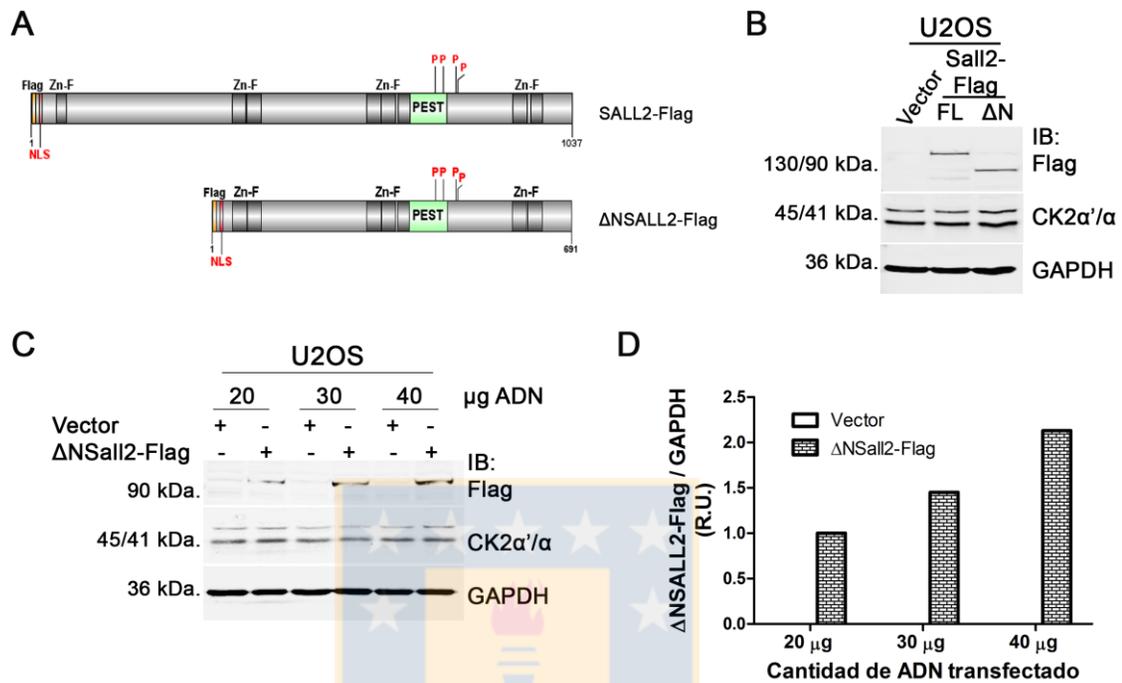
#### **7.1.4.- El extremo C-terminal de SALL2 es fosforilado de forma dependiente de CK2.**

Luego de determinar que SALL2 es un sustrato de CK2 *in vitro*, el siguiente propósito fue identificar a través de espectrometría de masas, aquellos sitios que se encuentran fosforilados en o cercanos a la región PEST carboxilo terminal, tanto *in vitro* como en cultivo. Análisis previos de nuestro laboratorio, indican que la región amino terminal es la región de mayor representación en la identificación de péptidos por espectrometría de masas, previa digestión con tripsina. En virtud de lo anterior, se elaboró una estrategia experimental consistente en enriquecer la región de interés de la proteína, removiendo el fragmento de ADN que codifica para el extremo amino terminal de SALL2 en el vector pCMV2(NH)/Sall2-Flag. El constructo obtenido, pCMV2(NH)/ $\Delta$ Sall2-Flag, codifica para la proteína  $\Delta$ SALL2, la cual no contiene los residuos 19-364 de la isoforma E1 de SALL2 humano, donde se encuentran el primer dedo de Zinc del tipo C2HC y la región rica en glutamina, descritas en la Figura 1.  $\Delta$ SALL2 tampoco contiene ninguna de las potenciales regiones PEST amino terminales señaladas en la Tabla 5. Sin embargo,  $\Delta$ SALL2 retiene el epítipo Flag amino terminal y también una potencial secuencia de localización nuclear entre los residuos 3-8 (Figura 24.A), identificada con las herramientas NucPred y NLStradamus (Brameier y col., 2007; Nguyen Ba y col., 2009).

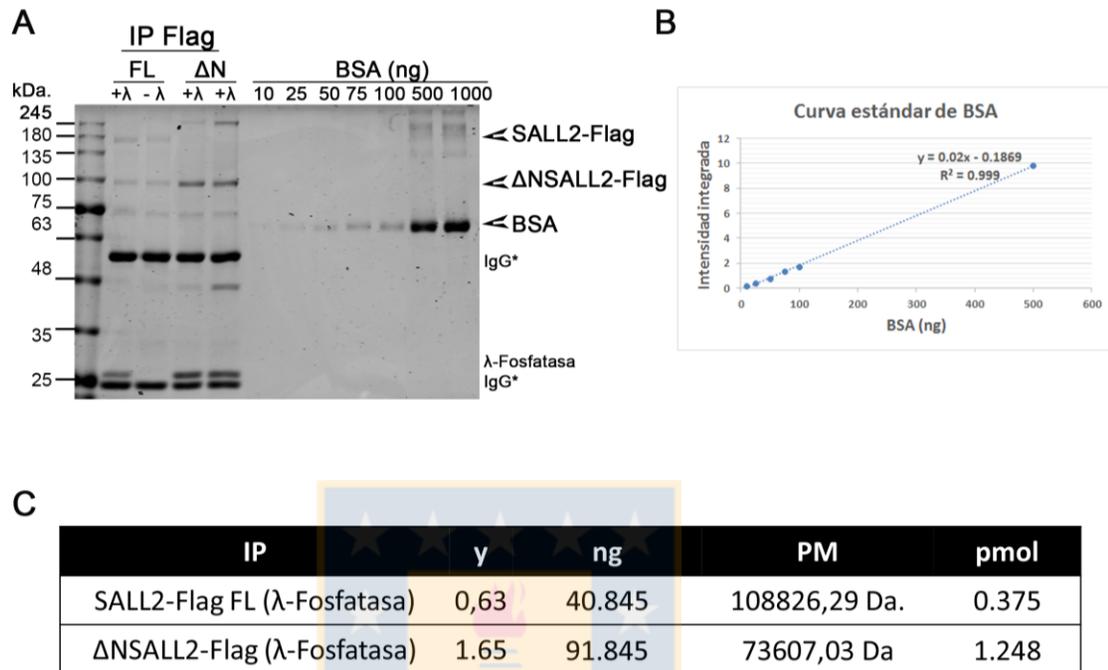
Se transfectaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS con el constructo obtenido, y se validó la presencia de la proteína de interés mediante *western blot*. Como se observa en la Figura 23.B,  $\Delta$ NSALL2 presenta un tamaño aproximado de 90 kDa.

De forma similar a lo realizado con el constructo pCMV2(NH)/Sall2-Flag, se estandarizó la cantidad de ADN a transfectar en Flp-In™ T-REx™ U2OS, con el objetivo de obtener los mayores niveles de proteína. Esto se logró utilizando 40  $\mu$ g de ADN plasmidial por placa de 100 mm (Figura 23.C y D).

Al contrario de lo observado con la transfección del constructo pCMV2(NH)/Sall2-Flag (Figura 21.A), la transfección de mayores cantidades del constructo pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag conlleva a mayores niveles de la proteína  $\Delta$ SALL2-Flag (Figura 23.C). Para poder determinar si comparativamente se obtienen mayores cantidades de  $\Delta$ N-SALL2-Flag con respecto a SALL2-Flag FL, se realizó una inmunoprecipitación de ambas proteínas por separado y se calcularon los pmoles de proteína obtenidos, utilizando una curva estándar de BSA (Figura 24). Como se indica en la Figura 24.A y C, la cantidad de proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada es aproximadamente tres veces la cantidad de proteína SALL2-Flag FL.



**Figura 24.- Estandarización de transfección de pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag para espectrometría de masas. A.-** Esquema representativo de las proteínas SALL2-Flag (FL: full length) y ΔNSALL2-Flag. Los motivos de dedos de Zinc (Zn-F) y la potencial secuencia PEST carboxilo terminal se señalan en gris oscuro y verde, respectivamente. Los potenciales sitios de fosforilación mediada por CK2 se indican con letras rojas (P). En naranja se destaca el epítipo Flag y en rojo, la potencial secuencia de localización nuclear (NLS). **B.-** Se transfectaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS y los lisados celulares se analizaron por western blot. Vector: lisado de células transfectadas con vector vacío; FL: lisado de células transfectadas con pCMV2(NH)/Sall2-Flag; ΔN: lisado de células transfectadas con pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag. n=2. **C.-** Se transfectaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS en placas de 100 mm con distintas cantidades de ADN plasmidial, correspondiente al vector vacío (Vector) o a pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag (ΔNSall2-Flag). ΔNSALL2-Flag se inmunodetectó por *western blot*, al igual que en **B**. **D.-** Cuantificación de los niveles de SALL2 visualizado en **C**, normalizados con GAPDH. n=1. Fuente: propia.

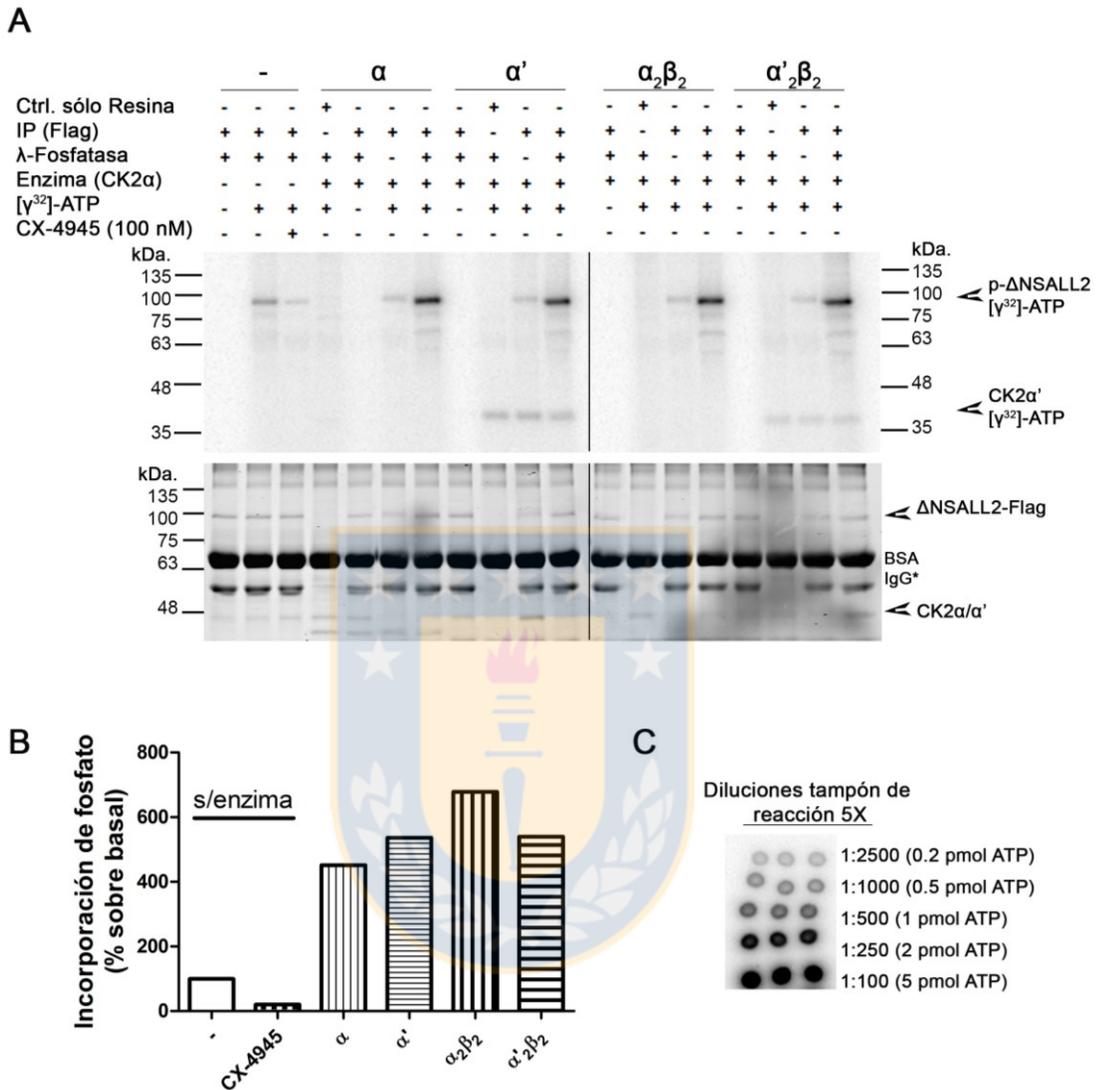


**Figura 25.- Comparación de niveles de proteína SALL2-Flag versus ΔNSALL2-Flag obtenidas por inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag. A.-** Se transfectaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS con 30 μg de pCMV2(NH)/Sall2-Flag o 40 μg de pCMV2(NH)/ΔNSall2-Flag. Las células se lisaron y se inmunoprecipitaron las proteínas SALL2-Flag FL y ΔNSALL2-Flag con anticuerpo anti-Flag. Las proteínas inmunoprecipitadas en la resina se trataron o no con λ-Fosfatasa (+λ o -λ, respectivamente). Las muestras se separaron por electroforesis junto a cantidades crecientes de BSA. Las flechas indican las bandas correspondientes SALL2-Flag (FL), ΔNSALL2-Flag y BSA. IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina. **B.-** Se obtuvo una curva estándar de BSA, cuantificando la señal (intensidad integrada) de BSA con el software Odyssey V3.0. **C.-** Se interpoló el valor de las señales de SALL2-Flag (FL) y ΔNSALL2-Flag (sin λ-Fosfatasa) en la curva estándar, y se obtuvo la cantidad de cada proteína inmunoprecipitada, en nanogramos. A partir de estos valores, se determinó la cantidad obtenida de cada proteína, en picomoles. n=2. Fuente: propia.

La proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag se generó con el propósito de analizar por espectrometría de masas si los sitios putativos de fosforilación por CK2 se encuentran efectivamente fosforilados tanto *in vitro* como en el cultivo celular. Para el primer caso, se estableció si la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag puede ser utilizada para ensayos de fosforilación *in vitro*, al igual que SALL2-Flag FL (Figura 22). Se transfectaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS con pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag. Las células se lisaron y se inmunoprecipitó la proteína, la cual se utilizó como sustrato para reacciones de fosforilación en presencia de  $[\gamma^{32}]$ -ATP y las subunidades catalíticas CK2 $\alpha$  o CK2 $\alpha'$ , o las holoenzimas CK2 $\alpha_2\beta_2$  o CK2 $\alpha'_2\beta_2$ , purificadas desde bacterias.  $\Delta$ NSALL2-Flag es fosforilado por todas las formas de CK2 utilizadas en el ensayo, de manera similar a SALL2-Flag (FL). En el carril 2 de la Figura 26.A y B se observa que la proteína es fosforilada incluso en ausencia de CK2 recombinante, y al igual que para SALL2-Flag (FL), esta fosforilación basal disminuye drásticamente al preincubar la reacción con el inhibidor específico de CK2, CX-4945 (Siddiqui-Jain y col., 2010). En los carriles 6, 10, 14 y 18, se observa que la incorporación de fosfato radioactivo es menor si la proteína no es previamente desfosforilada, sugiriendo que parte de los sitios fosfoaceptores ya se encuentran ocupados al momento de inmunoprecipitar la proteína.

En la Figura 26.C se puede apreciar que la intensidad de la señal radioactiva es directamente proporcional a la cantidad de ATP, y que no hay saturación de la señal en la imagen.

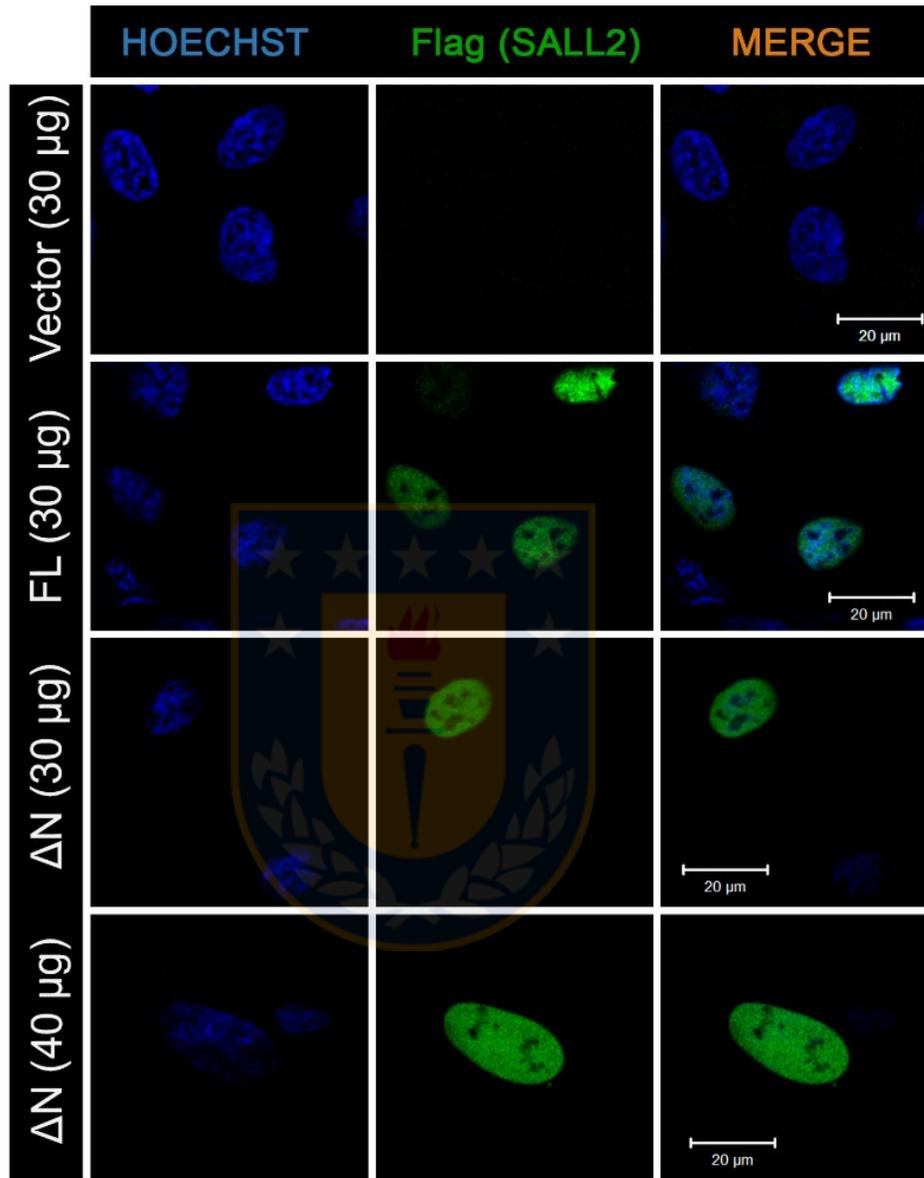
Los resultados anteriormente descritos indican que la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag se puede obtener en mayor cantidad que su contraparte SALL2-Flag (FL) y que exhibe un comportamiento similar en reacciones de fosforilación *in vitro*. Sin embargo, se desea validar los sitios putativos de fosforilación por CK2 no sólo *in vitro*, sino también en cultivo. Como se mencionó anteriormente,  $\Delta$ N-SALL2-Flag retiene una potencial secuencia de localización nuclear en el extremo amino terminal. Para determinar si  $\Delta$ N-SALL2-Flag se localiza a nivel nuclear, al igual que SALL2-Flag FL, se transfectaron células U2OS con vector vacío, pCMV2(NH)/Sall2-Flag o pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag. La localización subcelular de las proteínas SALL2-Flag FL y  $\Delta$ NSALL2-Flag se analizó por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Flag. Como se observa en la Figura 27, tanto SALL2-Flag FL como  $\Delta$ NSALL2-Flag se localizan exclusivamente en el núcleo. Considerando que para obtener mayor cantidad de proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag por inmunoprecipitación, se utilizó más ADN plasmidial que para la obtención de la proteína SALL2-Flag FL (40  $\mu$ g versus 30  $\mu$ g de ADN por placa de 100 mm), se evaluó también si mayores cantidades de ADN alteran la localización subcelular de la proteína sobreexpresada. Los resultados indican que en este caso la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag también se localiza a nivel nuclear. Resultados similares se han obtenido por fraccionamiento subcelular (no mostrado).



**Figura 26.- Fosforilación in vitro de  $\Delta$ NSALL2-Flag por CK2 recombinante. A.-** Se inmunoprecipitó la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag desde células Flp-In™ T-REx™ U2OS, con anticuerpo anti-Flag. La proteína se desfosforiló con  $\lambda$ -Fosfatasa y se incubó con  $[\gamma^{32}]$ -ATP en ausencia de enzima (-), en ausencia de enzima y con CX-4945, o en presencia de CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\alpha_2\beta_2$  o CK2 $\alpha'_2\beta_2$  recombinantes. Las flechas señalan las bandas correspondientes a  $\Delta$ NSALL2-Flag y CK2 $\alpha$  y/o  $\alpha'$ , tanto en la autoradiografía (parte superior) como en la tinción de coomassie coloidal (parte inferior). Ctrl. sólo resina: inmunoprecipitación sin anticuerpo; IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina; IP (Flag): inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag. **B.-** Cuantificación relativa de la incorporación de fosfato por CK2 con respecto a los niveles de

fosforilación basal, normalizado con respecto a los niveles de proteína. **C.-** Se sembraron diluciones secuenciales de tampón de reacción para cuantificar la cantidad de fosfato incorporado en cada condición mostrada en **A.** n=2 para basal, CK2 $\alpha$  y CK2 $\alpha_2\beta_2$ , n=1 para el resto de las condiciones. Fuente: propia.



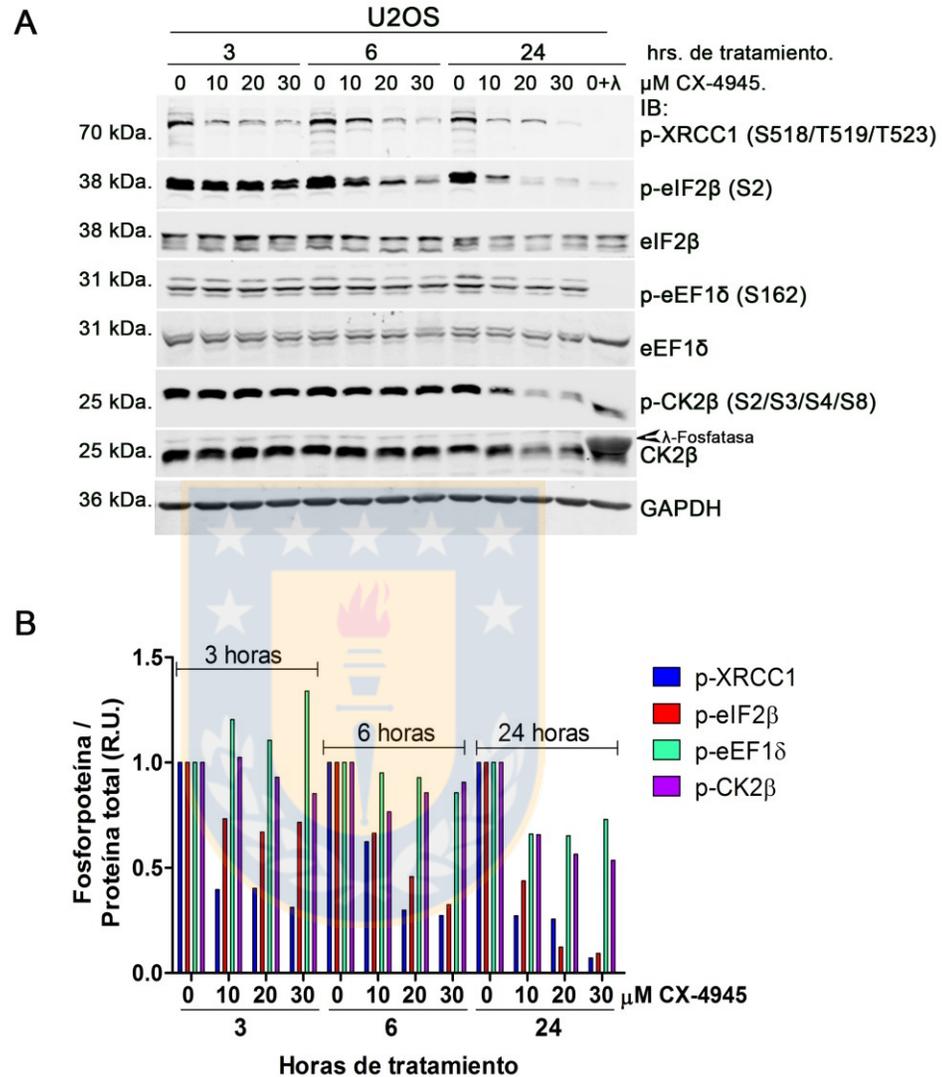


**Figura 27.- Localización subcelular de SALL2-Flag y  $\Delta$ NSALL2-Flag.** Se transfectaron células U2OS en placa de 100 mm con 30  $\mu$ g o 40  $\mu$ g de ADN plasmidial, correspondientes a vector vacío (Vector), pCMV2(NH)/Sall2-Flag (FL) o pCMV2(NH)/ $\Delta$ NSall2-Flag ( $\Delta$ N). Las células se analizaron por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Flag. En azul se observa el núcleo (Hoechst), en verde las proteínas SALL2-Flag FL y  $\Delta$ NSALL2-Flag. Merge: superposición de canales individuales. Barra de tamaño: 20  $\mu$ m. n=1. Fuente: propia.

Finalmente, para realizar análisis de espectrometría de masas con la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células en cultivo en presencia y ausencia del inhibidor específico de CK2, CX-4945 (Siddiqui-Jain y col., 2010), se realizó una estandarización de la concentración y tiempo de tratamiento de las células Flp-In™ T-REx™ U2OS con este inhibidor. El volumen de vehículo se mantuvo constante en todas las condiciones (DMSO al 0.3% v/v). La inhibición de CK2 se analizó a través de la inmunodetección de sustratos fosforilados por CK2, utilizando fosfoanticuerpos específicos. Los sustratos evaluados se mencionan a continuación:

- XRCC1 (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*): Proteína de reparación de rupturas de cadena simple del ADN (SSB, *Single-strand Breaks*), es fosforilada por CK2 en los residuos S518, T519 y T523 (Loizou y col., 2004).
- eIF2 $\beta$ : (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Beta*): Subunidad beta del complejo de iniciación de la traducción eIF2, es fosforilado por CK2 en los residuos S2 y S67 (Llorens y col., 2006; Welsh y col., 1994).
- eEF1 $\delta$  (*Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta*): Subunidad intercambiadora de nucleótido de guanina (GEF) del factor de elongación de la traducción eEF1, es fosforilado por CK2 en el residuo S162 (Gyenis y col., 2011).
- CK2 $\beta$ : Subunidad regulatoria de CK2, se autofosforila por CK2 en los residuos S2, S3 y S4 (Litchfield y col., 1991).

En la Figura 28 se observa que la concentración de CX-945 y el tiempo de incubación óptimos varían según el sustrato de CK2. Bajas concentraciones de CX-4945 y 3 horas de tratamiento son suficientes para observar una disminución de la fosforilación en XRCC1 y eIF2 $\beta$ , mientras que las fosforilaciones mediadas por CK2 en eEF1 $\delta$  y CK2 $\beta$  no disminuyen sino hasta las 24 horas de tratamiento con el inhibidor. La especificidad de los fosfoanticuerpos se probó mediante desfosforilación previa del lisado proteico, con  $\lambda$ -Fosfatasa. El anticuerpo anti-fosfo CK2 $\beta$  muestra inmunoreactividad en lisado desfosforilado. Esta banda corresponde a  $\lambda$ -fosfatasa, la cual es reconocida por el anticuerpo secundario utilizado (Li-Cor IRDye® 800CW anti-Rabbit IgG). Se decidió trabajar con 30  $\mu$ M de CX-4945 durante 6 horas, ya que se estimó que SALL2 podría tener un comportamiento similar a XRCC1, al ser también una proteína de unión a ADN. Adicionalmente, tiempos más extensos de incubación podrían gatillar mecanismos compensatorios que dificulten el análisis posterior.



**Figura 28.- Estandarización de concentración y tiempo de tratamiento de CX-4945 en células U2OS. A.-** Se trataron células Flp-In™ T-REx™ U2OS con distintas concentraciones de CX-4945 y se colectaron a distintos tiempos de incubación, como se indica. La inhibición de CK2 se evaluó por *western blot* con fosfoanticuerpos específicos para distintos sustratos de CK2. 0+λ: lisado desde células sin CX-4945 (sólo vehículo), desfosforilado con λ-Fosfatasa. **B.-** Cuantificación de fosfoproteínas mostradas en **A**, normalizadas con respecto a la proteína total. Fosfo-XRCC1 (p-XRCC1) se normalizó con respecto a GAPDH. R.U.: unidades relativas. n=2. Fuente: propia.

A continuación, se prepararon las muestras para espectrometría de masas en tándem, considerando cinco condiciones:

1. Proteína inmunoprecipitada y desfosforilada con  $\lambda$ -Fosfatasa como control (referida como:  $\lambda$ -Fosfatasa).
2. Proteína inmunoprecipitada y desfosforilada, fosforilada *in vitro* sin adición de enzima (referida como: Basal).
3. Proteína inmunoprecipitada y desfosforilada, fosforilada *in vitro*, en presencia de CK2 $\alpha$  (referida como: CK2 $\alpha$ ).
4. Proteína inmunoprecipitada desde células en cultivo, tratadas durante 6 horas con vehículo (referida como: DMSO).
5. Proteína inmunoprecipitada desde células en cultivo, tratadas durante 6 horas con 30  $\mu$ M de CX-4945 (referida como: CX-4945).

En la Figura 29.A, B y C se muestran los geles de poliacrilamida con las proteínas de interés. En la Figura 29.D y E se aprecian los controles de inmunoprecipitación e inhibición para las muestras “DMSO” y “CX-4945”.

El procedimiento estándar de digestión de proteínas para la obtención de péptidos a analizar por espectrometría de masas, implica el uso de la proteasa Tripsina, la cual cliva después de residuos de lisina o arginina. Sin embargo, de acuerdo a ensayos previos de nuestro laboratorio, el uso de esta enzima no genera péptidos detectables a partir de la región de interés. El análisis con la herramienta MS-Digest de Protein Prospector arrojó como resultado que, al

digerir con tripsina, los sitios putativos para CK2 S763 y T778, se encuentran dentro de un péptido de 40 residuos de longitud, mientras que los sitios putativos S802 y S806 se localizan dentro de un péptido de 24 residuos. Cabe destacar que una longitud óptima de péptido para espectrometría de masas bordea los 14 residuos (Burkhart y col., 2012). Para establecer cuál enzima o combinación de enzimas generan péptidos de un tamaño apropiado, y que contengan la región de interés, se analizó la secuencia proteica de  $\Delta$ NSALL2-Flag con la herramienta MS-Digest. De este modo, se estableció que con la combinación de enzimas Tripsina y Asp-N es posible obtener dos péptidos de 23 residuos; uno conteniendo el sitio putativo S746 y otro con los sitios S802 y S806, mientras que el residuo de T778 sólo sería detectable si se mantienen sitios sin clivar (*miscleavage*).

Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se escindieron desde los geles de poliacrilamida (Figura 30.A, B y C). Las proteínas se digirieron de forma secuencial con Tripsina y Asp-N. Posteriormente se extrajeron los péptidos desde el gel para su análisis por espectrometría de masas. Para asumir una modificación post-traducciona como confiable, se consideró un umbral de intensidad de ión modificado igual o superior al 5% (abundancia relativa del fragmento iónico de péptido, y que contiene la modificación).

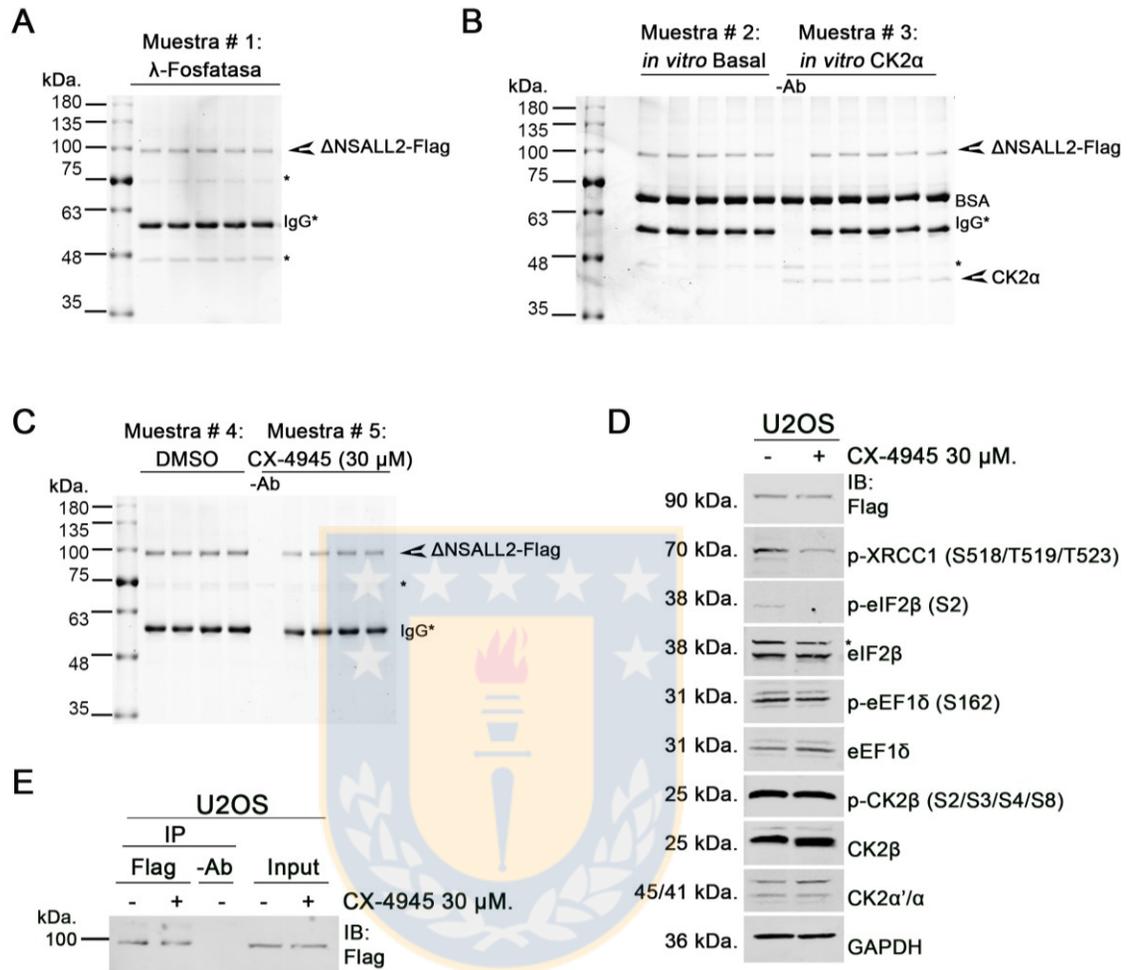
Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6 y la Figura 30, e indican que: en la condición “λ-Fosfatasa” no se detectó fosforilación alguna; en la condición “Basal” se encuentran fosforilados los residuos S802 y S806; en la condición “CK2α”, hay un incremento en el porcentaje de fosfopéptidos con modificaciones en los residuos S802 y S806. Los espectros obtenidos en estas condiciones se muestran en los Anexos 7 y 8.

En cuanto a la fosforilación de ΔNSALL2-Flag inmunoprecipitada directamente desde células en cultivo, se estableció que: todos los sitios putativos para CK2 identificados bioinformáticamente en el extremo carboxilo terminal se encuentran fosforilados en la condición “DMSO”, mientras que los fosfopéptidos con estas modificaciones decaen en proporción (S802, S806) o no se detectan en absoluto (S763, T778) en la condición “CX-4945”. Este efecto es particularmente drástico para el residuo S763. Los espectros correspondientes a los fosfopéptidos con los sitios fosforilados en estas condiciones, se muestran en los Anexos 9-14.

De forma interesante, se detectó además una fosforilación en el residuo T467, que presenta una dinámica opuesta en presencia de DMSO y CX-4945, con respecto a los fosforesiduos mencionados en el párrafo anterior: la proporción de fosfopéptidos con esta modificación aumenta en presencia del inhibidor. Modificaciones en este sitio no han sido reportado previamente y la secuencia que lo flanquea no corresponde a un sitio consenso para CK2. La

búsqueda de patrones con la herramienta PhosphoMotif Finder de Human Protein Reference Database (HPRD (Amanchy y col., 2007)), indica que este sitio podría ser reconocido por CK1 (Caseína Quinasa I) o bien por GSK-3, ERK1/2 (Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2), o CDK5 (Quinasa dependiente de Ciclina 5).

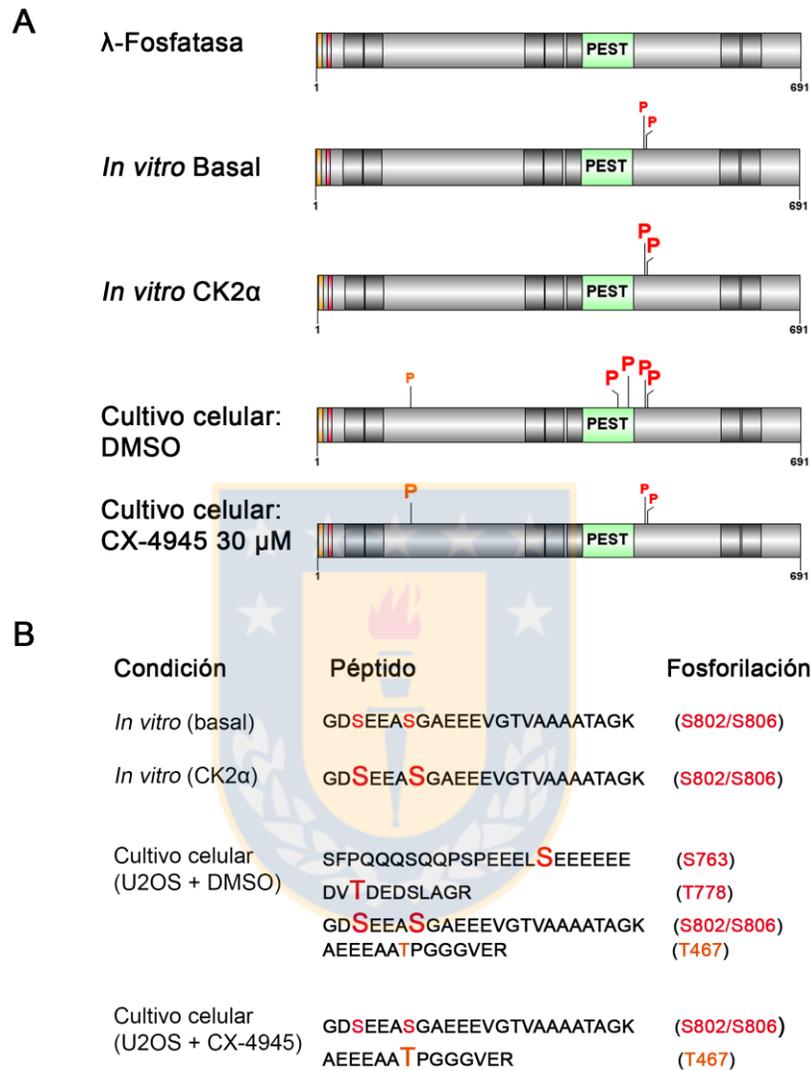




**Figura 29.- Preparación de muestras para espectrometría de masas.** Se inmunoprecipitó la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag desde células Flp-In™ T-REx™ U2OS y se trató con: **A.-**  $\lambda$ -Fosfatasa (Muestra # 1) **B.-** o con  $\lambda$ -Fosfatasa y posteriormente se fosforiló *in vitro* con ATP frío en ausencia de enzima (Basal, Muestra # 2) o con CK2 $\alpha$  recombinante (CK2 $\alpha$ , Muestra # 3). **C.-** También se inmunoprecipitó la proteína desde células tratadas con vehículo (DMSO, Muestra # 4) o 30  $\mu$ M de CX-4945 durante 6 horas (CX-4945, Muestra # 5).  $\Delta$ NSALL2-Flag y CK2 $\alpha$  se señalan por una flecha. **D.-** La inhibición de CK2 con CX-4945 en la Muestra # 5 se evaluó a través de western blot. **E.-** Se corroboró la inmunoprecipitación de  $\Delta$ NSALL2-Flag en las muestras 4 y 5 por western blot. IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina; -Ab: inmunoprecipitación sin anticuerpo; \*: bandas no específicas. Fuente: propia.

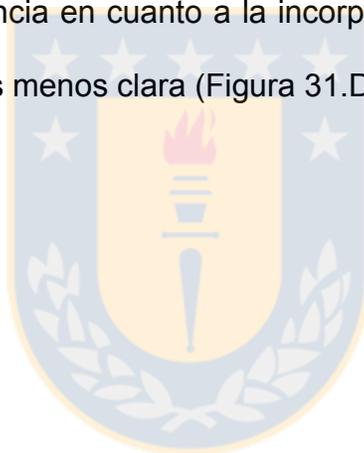
Residuo	Condición	Nº péptidos	Nº Fosfopéptidos	Intensidad de ión	% Fosfopéptidos
<b>T467</b>	# 1: λ-Fosfatasa	128	0	-	0
	# 2: Basal	116	0	-	0
	# 3: CK2α	124	0	-	0
	# 4: DMSO	208	4	<b>37%</b>	<b>1.9</b>
	# 5: CX-4945	156	10	<b>43%</b>	<b>6.4</b>
<b>S763</b>	# 1: λ-Fosfatasa	74	0	-	0
	# 2: Basal	27	0	-	0
	# 3: CK2α	44	1	0%	2.3
	# 4: DMSO	20	20	<b>19%</b>	<b>100</b>
	# 5: CX-4945	81	0	-	0
<b>T778</b>	# 1: λ-Fosfatasa	30	0	-	0
	# 2: Basal	3	0	-	0
	# 3: CK2α	32	0	-	0
	# 4: DMSO	19	8	<b>9%</b>	<b>4.2</b>
	# 5: CX-4945	44	0	-	0
<b>S802</b>	# 1: λ-Fosfatasa	333	0	-	0
	# 2: Basal	350	16	0%	4.6
	# 3: CK2α	430	49	0%	11.4
	# 4: DMSO	456	182	2%-0%	39.9
	# 5: CX-4945	594	107	0%	18.0
<b>S806</b>	# 1: λ-Fosfatasa	333	0	-	0
	# 2: Basal	350	33	<b>15%</b>	<b>9.4</b>
	# 3: CK2α	430	71	<b>14%-16%</b>	<b>16.5</b>
	# 4: DMSO	456	206	<b>15%-21%</b>	<b>45.2</b>
	# 5: CX-4945	594	75	<b>20%-16%</b>	<b>12.6</b>

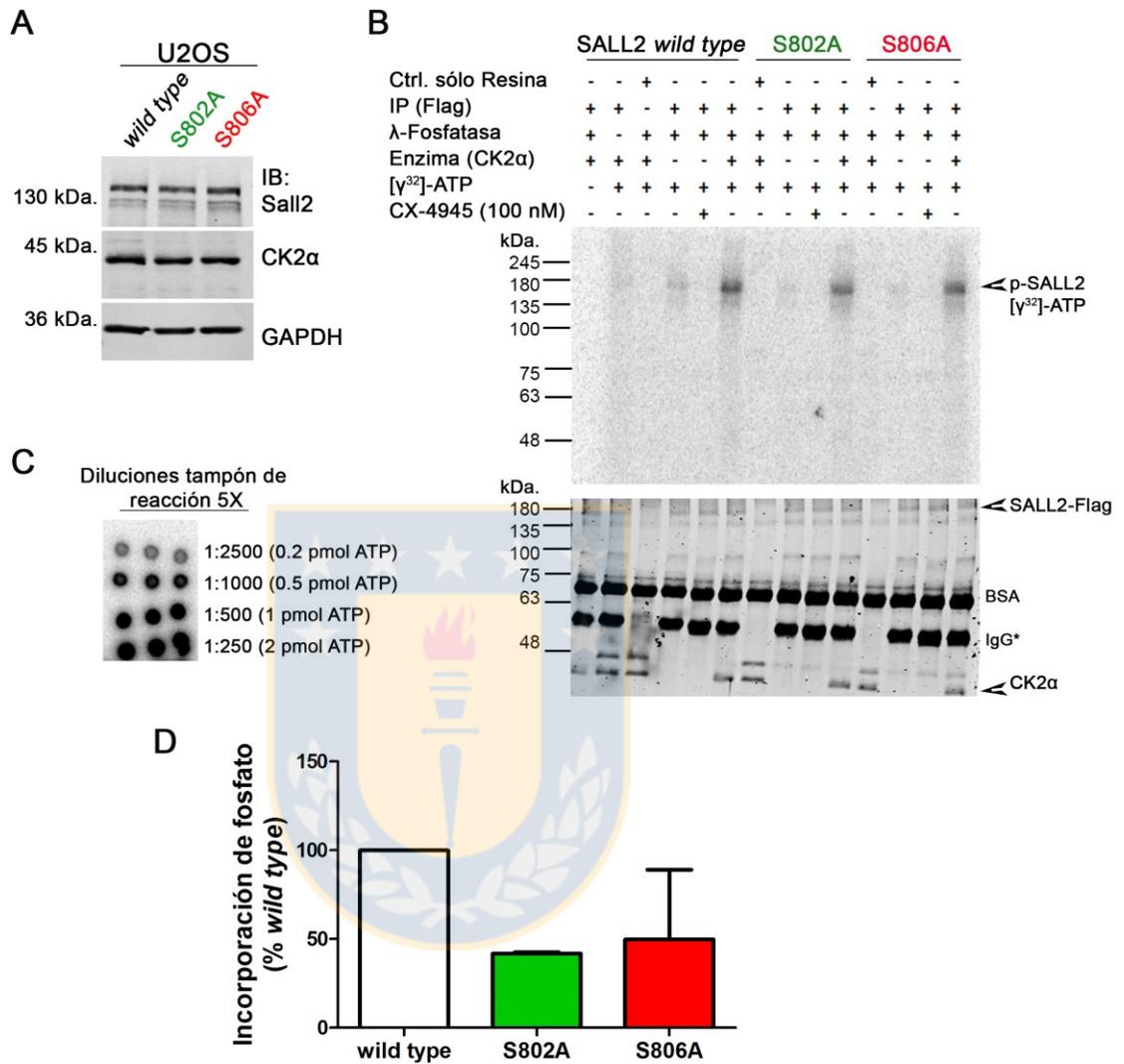
**Tabla 6.- Resultados obtenidos por espectrometría de masas.** En negrita se destacan aquellos sitios detectados en fragmentos iónicos cuya intensidad supera el 5% de abundancia relativa. Los sitios para CK2 se destacan en rojo. En naranja se muestra el sitio T467, que no corresponde a un sitio de fosforilación mediada pro CK2. Fuente: propia.



**Figura 30.- Resultados obtenidos por espectrometría de masas. A.-** Esquema representativo de la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag, con la potencial secuencias PEST señalada en verde y los motivos de dedos de Zinc (Zn-F), en gris oscuro. En el extremo amino terminal se muestra el epítipo Flag (naranja) y la potencial secuencia de localización nuclear (rojo). Los sitios que permanecen fosforilados en cada condición se indican con la letra P en rojo (consenso para CK2) y naranja (T467). El tamaño de la letra se relaciona con el nivel de fosforilación. **B.-** Péptidos y fosfopéptidos identificados en cada condición. En rojo se señala la fosforilación de residuos ubicados en sitios consenso para CK2, y en naranja, el residuo de T467. El tamaño de la letra se relaciona con el nivel de fosforilación. Fuente: propia.

Cabe destacar que, en ninguna de las condiciones analizadas por espectrometría de masas se detectó iones de fosfopéptidos con la modificación del residuo de S802 a un nivel por sobre el umbral (5%). Sin embargo, la incorporación de fosfato por CK2 $\alpha$  *in vitro* en la mutante SALL2-Flag (FL) S802A, decae a un 41.8% en relación a la incorporación de fosfato en la proteína *wild type* (Figura 31.B y D), sugiriendo que este sitio es blanco de CK2 $\alpha$ . La fosforilación de la mutante SALL2-Flag (FL) S806A también decae, sin embargo, la diferencia en cuanto a la incorporación de ATP con respecto a la proteína *wild type* es menos clara (Figura 31.D).





**Figura 31.- Fosforilación in vitro de mutantes SALL2-Flag S802A y S806A.** **A.-** Se transfecaron células Flp-In™ T-REx™ U2OS con los constructos pCMV2(NH)/Sall2-Flag (*wild type*), pCMV2(NH)/Sall2-Flag S802A y pCMV2(NH)/Sall2-Flag S806A. Los lisados se analizaron mediante *western blot* con anticuerpo anti Sall2. **B.-** Se inmunoprecipitaron las proteínas SALL2-Flag (*wild type*), S802A y S806A. Las proteínas se desfosforilaron con λ-Fosfatasa y se incubaron con [γ<sup>32</sup>]-ATP en ausencia de enzima (-), en ausencia de enzima y con CX-4945, o en presencia de CK2α recombinante. Las flechas señalan las bandas correspondientes a SALL2-Flag (*wild type*, S802A, S806A) y CK2α, tanto en la autoradiografía (parte superior) como en la

tinción de coomassie coloidal (parte inferior). Ctrl. sólo resina: inmunoprecipitación sin anticuerpo; IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina; IP (Flag): inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag. **C.-** Se sembraron distintas diluciones de tampón de reacción, para cuantificar la cantidad de fosfato incorporado en **B.** **D.-** Cuantificación relativa de la incorporación de fosfato por CK2 $\alpha$  con respecto a los niveles de fosforilación de la proteína *wild type* (barras  $\pm$  SEM). n=2. Fuente: propia.



## **7.2.- Objetivo específico II: Determinar la relevancia fisiológica de la fosforilación de SALL2 mediada por CK2.**

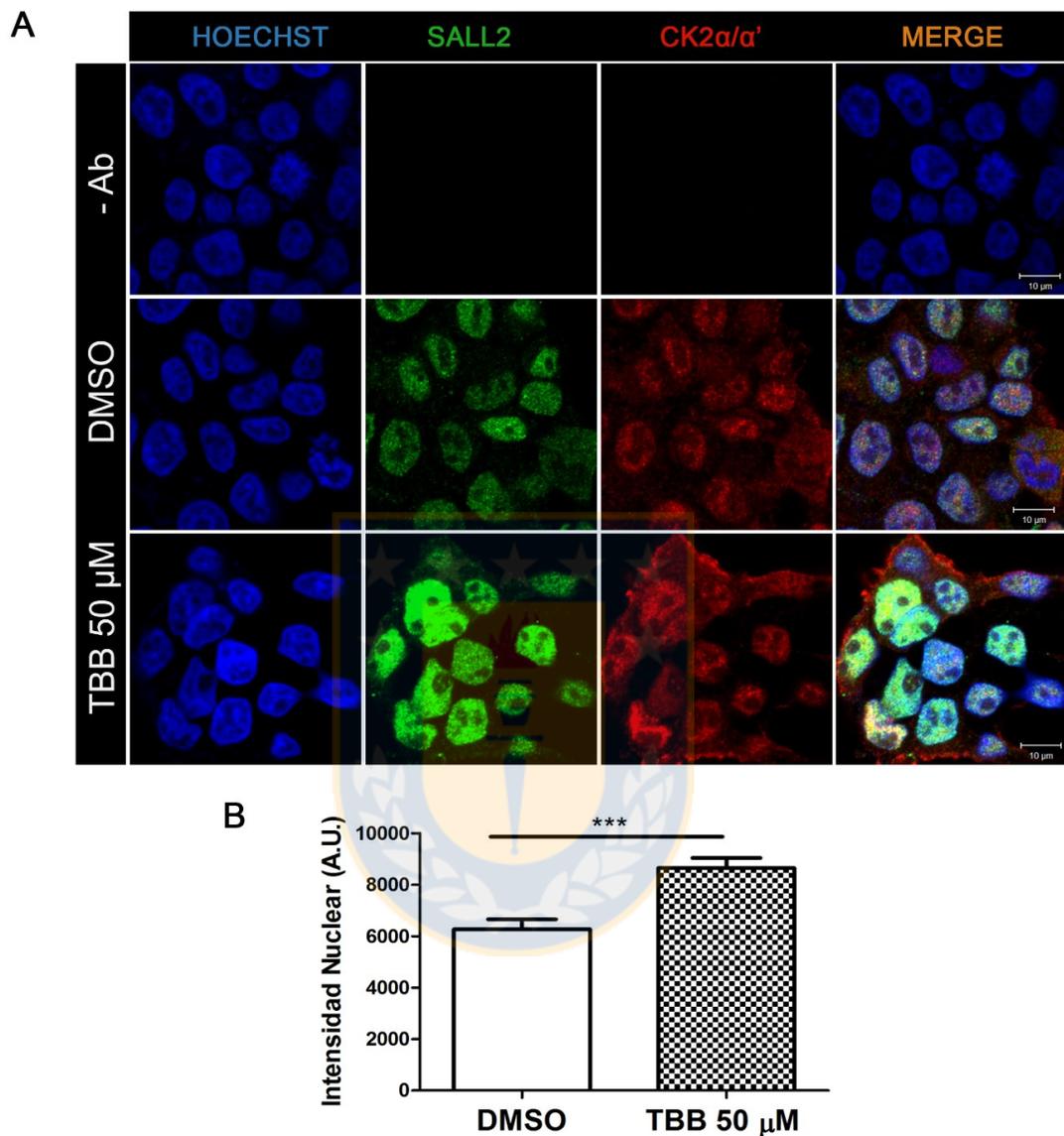
### **7.2.1.- La actividad de CK2 afecta negativamente la estabilidad de SALL2.**

CK2 regula negativamente a diversos supresores tumorales, pudiendo impactar sobre su localización subcelular (Gurel y col., 2008), su estabilidad (Ampofo y col., 2010; Lin y col., 1996; Scaglioni y col., 2006) y/o su actividad (Gurel y col., 2008; Miller y col., 2002).

Con el fin de determinar si la actividad de CK2 afecta la localización subcelular de la proteína SALL2, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para detectar SALL2 y CK2 $\alpha/\alpha'$  en células HEK 293. Esta línea celular exhibe altos niveles de SALL2 y CK2 endógeno (Thul y col., 2017; Uhlén y col., 2015) y presenta una elevada actividad de CK2 con respecto a otras células (Scaglioni y col., 2006). Las células se trataron con DMSO o con el inhibidor de CK2, TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol) (Sarno y col., 2001). Este inhibidor permeable ha demostrado ser específico y eficiente en la inhibición de la actividad de CK2 (Ampofo y col., 2010; Lolkema y col., 2005; Pagano y col., 2008; Ruzzene y col., 2010).

Como se observa en la Figura 32.A, tanto SALL2 como CK2 se localizan a nivel nuclear, lo cual es consistente con la interacción observada entre ambas proteínas en la Figura 20. La inhibición de CK2 con TBB no afecta la localización subcelular de SALL2 endógena, pero provoca un aumento los niveles de la proteína, como se grafica en la Figura 32.B.





**Figura 32.- La inhibición farmacológica de CK2 promueve un aumento de los niveles proteicos de SALL2 en células HEK 293. A.-** Se analizó la localización subcelular de SALL2 (verde) y CK2 $\alpha/\alpha'$  (rojo) endógenos en células HEK 293, tratadas durante 7 horas con vehículo (DMSO) o 50  $\mu$ M de TBB. El núcleo se tiñó con Hoechst (azul). Merge: superposición de canales individuales; -Ab: control sin anticuerpo primario. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m. **B.-** Cuantificación de la intensidad de señal nuclear de SALL2, medida con el software Image J (barras  $\pm$  SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo a través de T-test no pareado con corrección de Welch. \*\*\* $p$ <0.001. A.U.: unidades arbitrarias.  $n$ =115 células por condición. Fuente: propia.

Los resultados anteriormente obtenidos señalan que la inhibición de la actividad CK2 por TBB no afecta la localización subcelular de SALL2, pero si gatilla un aumento en los niveles de la proteína. Como se mencionó anteriormente, otro de los efectos de la fosforilación mediada por CK2 es la modificación de la estabilidad de diversos sustratos (Ampofo y col., 2010; Banerjee Mustafi y col., 2017; Lin y col., 1996; Scaglioni y col., 2006; Zhang y col., 2002). Con el objetivo de corroborar si la actividad de CK2 impacta sobre la estabilidad SALL2, se realizaron ensayos de estabilidad en células HEK 293 transfectadas con los plásmidos pCMV2(NH)/Sall2-Flag junto a los plásmidos pRC-CMV/CK2 $\alpha$ -HA o pRC-CMV/CK2 $\alpha$  K68M-HA. Para este propósito, las células se trataron con 50  $\mu$ g/mL del inhibidor de síntesis proteica, cicloheximida (CHX), durante distintos periodos de tiempo. Como se muestra en la Figura 33, la co-expresión de CK2 $\alpha$  K68M-HA estabiliza a la proteína SALL2-Flag, en comparación con la condición de co-expresión con CK2 $\alpha$ -HA (*wild type*).

Se ha descrito que la fosforilación mediada por CK2 puede afectar la estabilidad a través de la inducción de proteólisis mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma o por cisteino-proteasas no lisosomales dependientes de calcio, llamadas Calpaínas (Scaglioni y col., 2006; Shen y col., 2001). De estos, el proteosoma constituye la principal maquinaria degradación en células eucariontes, dando cuenta de alrededor del 80-90% de la proteólisis intracelular

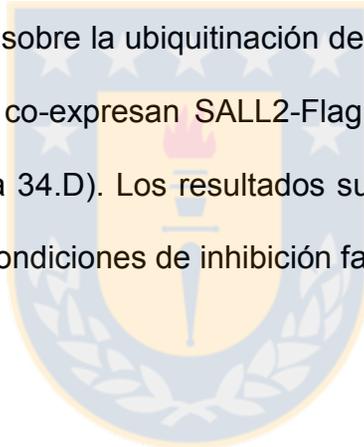
en cultivo, incluyendo proteínas nucleares (Chen y col., 2011; von Mikecz, 2006).

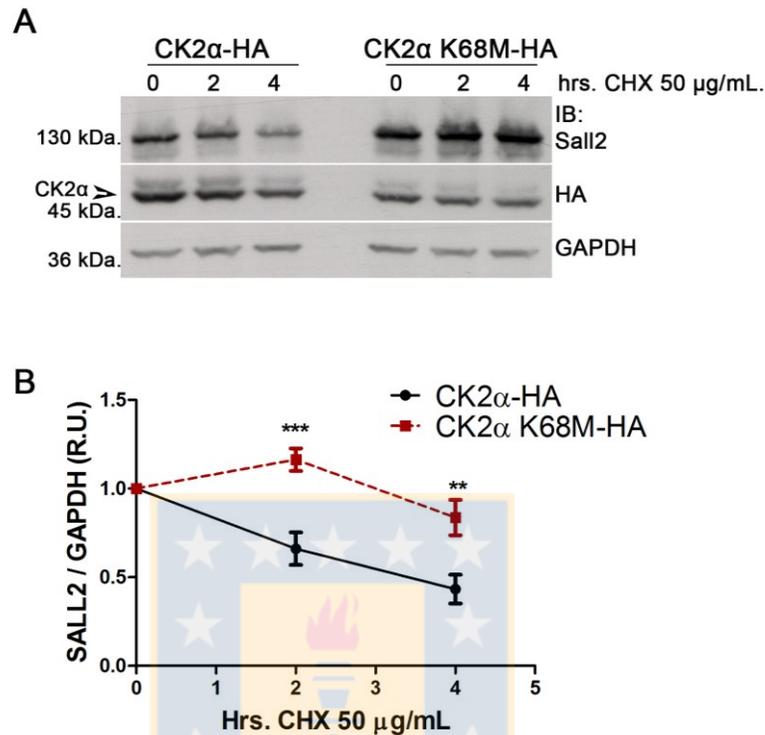
Para determinar si el efecto de CK2 sobre la estabilidad de SALL2 ocurre a través de degradación proteosomal, se trataron células HEK 293 con 20  $\mu\text{M}$  del inhibidor proteosomal, MG-132 y/o 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor de CK2, TBB (Figura 34.A y B). En presencia del inhibidor de proteosoma MG-132, se aprecia una acumulación de la proteína SALL2 (endógeno) en niveles similares a los observados en presencia del inhibidor de CK2, TBB. El tratamiento con ambos inhibidores en conjunto genera una acumulación de SALL2 similar a la observada bajo el tratamiento con cada uno de los inhibidores por separado. Resultados similares se obtuvieron al tratar con MG-132 células HEK 293 que co-expresan SALL2-Flag junto a CK2 $\alpha$ -HA o CK2 $\alpha$  K68M-HA (no mostrado). Estos resultados sugieren que CK2 y el proteosoma se encuentran formando parte de la misma vía de degradación de SALL2.

Para que una proteína sea degradada por el proteosoma, debe encontrarse unida covalentemente a cadenas de ubiquitina (Geng y col., 2012). Para determinar si la actividad de CK2 promueve la ubiquitinación de SALL2, se co-expresó SALL2-Flag junto a Ubiquitina C-HA (UbC-HA) o a una forma dominante negativa de Ubiquitina C, llamada UbC KO-HA, donde todos los residuos de lisina se encuentran mutados por arginina (Lim y col., 2005). Estos residuos de lisina -y particularmente el residuo de lisina 48 para la degradación

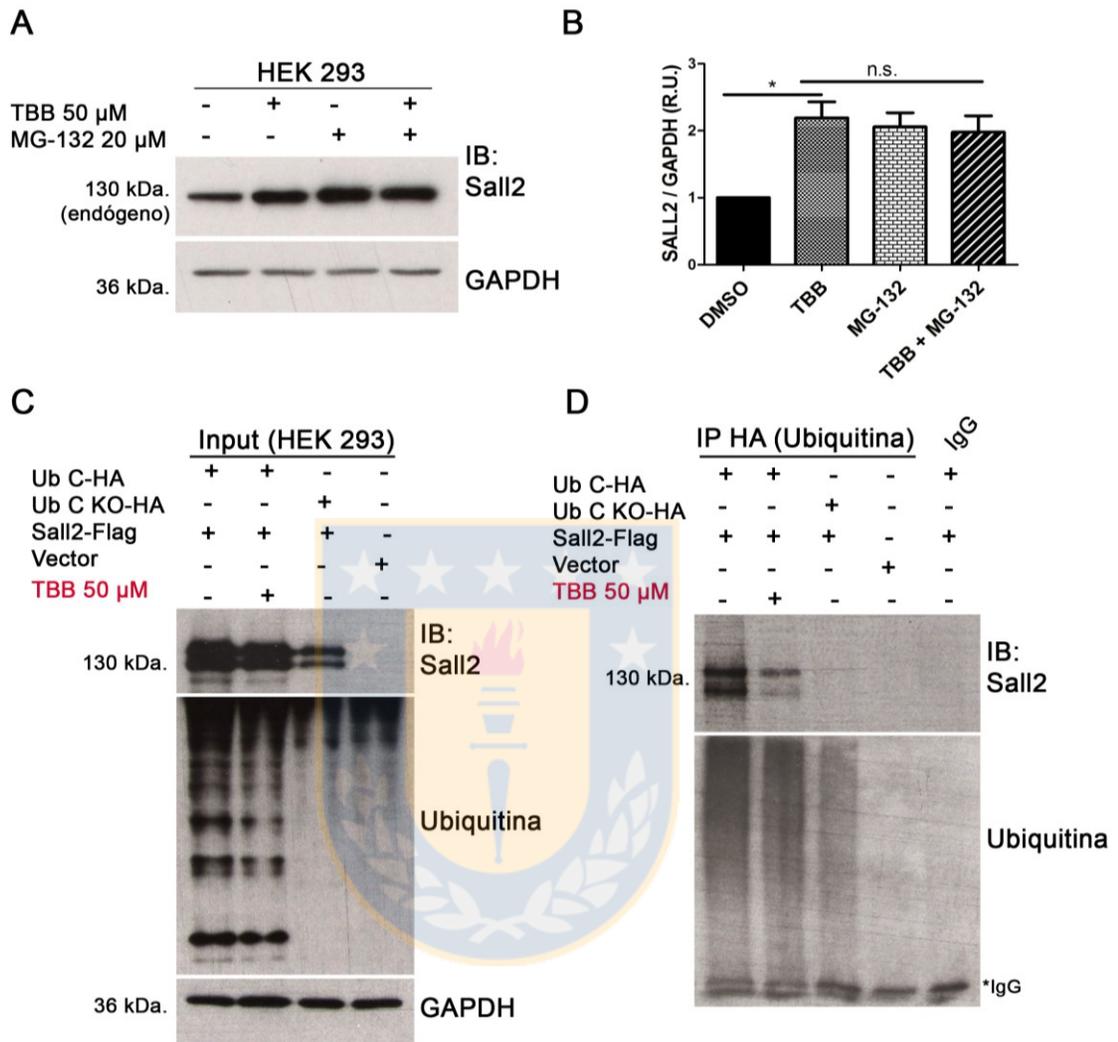
proteosomal- son cruciales para la extensión y ramificación de la cadena de ubiquitina (Komander y Rape, 2012).

Las células co-transfectadas con los plásmidos pCMV2(NH)/Sall2-Flag y pRK5/UbC-HA o pRK5/UbC KO-HA, se trataron con MG-132 para permitir la acumulación de las proteínas ubiquitinadas (Figura 34.C). Luego, se inmunoprecipitó UbC-HA y UbC KO-HA con anticuerpo anti HA, y la unión de SALL2 a Ubiquitina C se evaluó mediante *western blot*. El efecto de la inhibición farmacológica de CK2 sobre la ubiquitinación de SALL2-Flag se analizó al tratar células HEK 293 que co-expresan SALL2-Flag y UbC-HA con los inhibidores MG-132 y TBB (Figura 34.D). Los resultados sugieren que la ubiquitinación de SALL2 disminuye en condiciones de inhibición farmacológica de CK2 por TBB.





**Figura 33.- La forma dominante negativa de CK2 $\alpha$  aumenta la estabilidad de la proteína SALL2-Flag. A.-** Se co-transfectaron células HEK 293 con los plásmidos pCMV2(NH)/Sall2-Flag y pRC-CMV/CK2 $\alpha$ -HA o pRC-CMV/CK2 $\alpha$  K68M-HA. Luego, se trataron las células con 50  $\mu$ g/mL de cicloheximida (CHX) durante el tiempo indicado y se analizaron los niveles de SALL2-Flag mediante *western blot*. **B.-** Cuantificación de los niveles de SALL2-Flag con respecto a GAPDH (puntos  $\pm$  SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo a través de ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001. R.U.: unidades relativas.  $n$ =3. Fuente: propia.



**Figura 34.- La actividad de CK2 promueve la ubiquitinación y degradación proteosomal de SALL2 en células HEK 293.** **A.-** Células HEK 293 se pre-trataron con 50  $\mu$ M de TBB o vehículo (DMSO) durante 3 horas. Posteriormente, las células pre-tratadas con DMSO se mantuvieron en medio fresco con DMSO o con 20  $\mu$ M de MG-132; mientras que las células pre-tratadas con TBB se mantuvieron en medio fresco con TBB o con TBB y MG-132 durante 6 horas. La concentración de DMSO se mantuvo constante en todas las condiciones (0.25% v/v). Los niveles de proteína SALL2 endógena se evaluaron mediante *western blot*. **B.-** Cuantificación de los niveles de SALL2 con respecto a GAPDH (barras  $\pm$  SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo a través de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. \* $p < 0.05$ , n.s.: no significativo. R.U.: unidades relativas.  $n=2$ . **C.-** Se co-expresó SALL2-Flag con Ubiquitina C-

HA (Ub C-HA) o Ubiquitina C KO-HA (Ub C KO-HA) en células HEK 293. Las células se trataron con DMSO o 50  $\mu$ M de TBB durante 3 horas y luego con 20  $\mu$ M de MG-132 durante 6 horas, en presencia o ausencia de TBB. Los niveles de SALL2-Flag y Ubiquitina se evaluaron mediante *western blot*. **D.-** Se inmunoprecipitó Ubiquitina C-HA con un anticuerpo anti-HA y se analizó la unión de SALL2 a ubiquitina a través de *western blot* IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina (banda) o control con IgG normal (rótulo superior). n=2. Fuente: propia.



### **7.2.2.- La inhibición farmacológica de CK2 restituye a SALL2 en células H1299 de cáncer de pulmón.**

Algunos estudios han determinado que el inhibidor competitivo de CK2, TBB, también puede afectar la actividad de otras quinasas (Pagano y col., 2008). CX-4945 -conocido como Silmitasertib- es un inhibidor competitivo de CK2, altamente específico (Siddiqui-Jain y col., 2010), cuya potencia de inhibición es mayor que la de TBB ( $K_i = 0.38$  nM para CX-4945 versus  $K_i = 49$  nM para TBB) (Sarno y col., 2011). Ensayos con CX-4945 han demostrado que este inhibidor es eficiente en disminuir la proliferación celular y aumentar la apoptosis en células de cáncer, y de presentar actividad antitumoral en distintos modelos de *xenograft* (Pierre y col., 2011a; Siddiqui-Jain y col., 2010). Actualmente, CX-4945 se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de colangiocarcinoma (cáncer de las vías biliares), en combinación con los agentes genotóxicos gemcitabina y cisplatino (clinicaltrials.gov # NCT02128282), a cargo de la compañía Senhwa *Biosciences*.

Con el objetivo de determinar si la inhibición farmacológica de CK2 con el inhibidor CX-4945 gatilla una acumulación de la proteína SALL2, tal como ocurre en respuesta a TBB, se trataron células HEK 293 con distintas concentraciones de este inhibidor durante 3 y 6 horas (Figura 35.A). La acumulación de SALL2 se observa a las tres horas de tratamiento, a concentraciones desde 15  $\mu$ M, decayendo luego a las 6 horas. La inhibición de

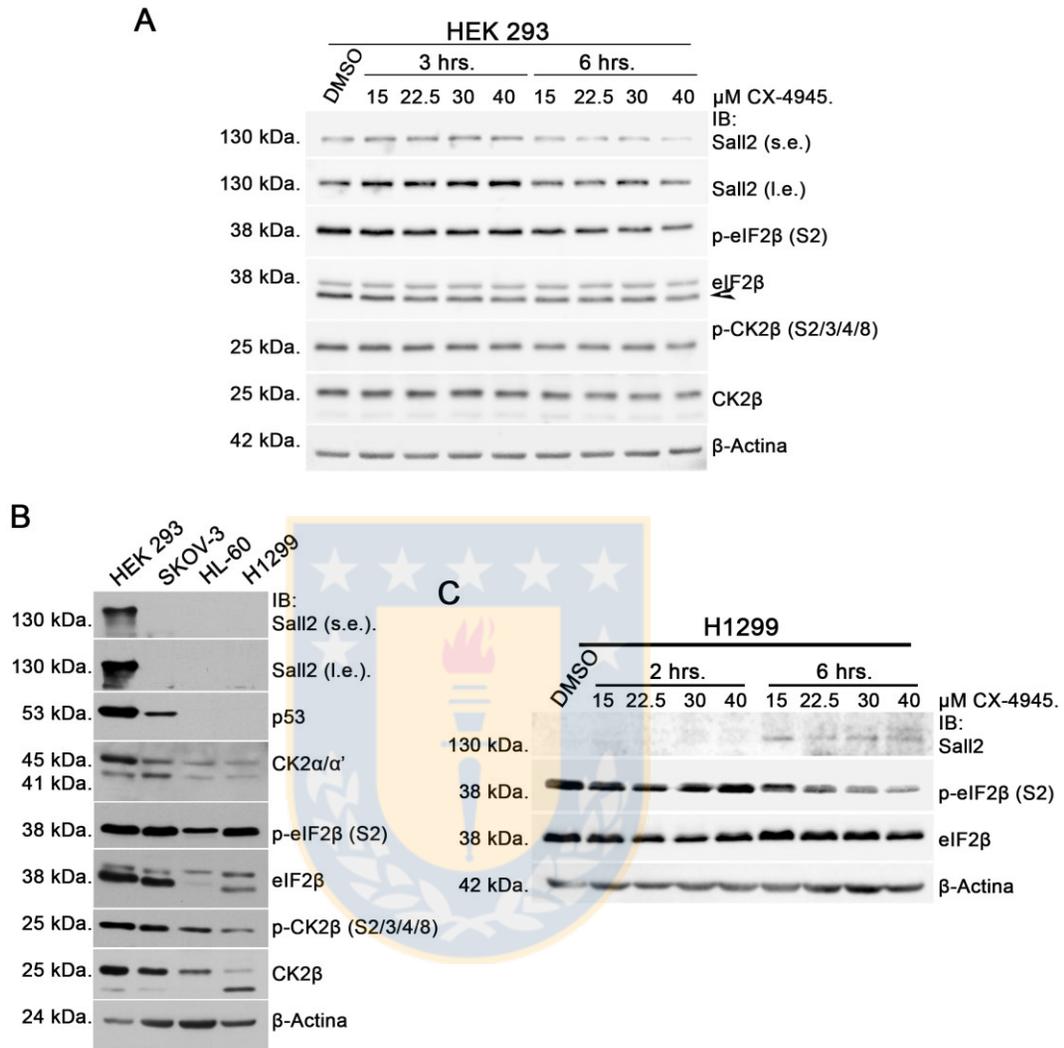
CK2 por CX-4945 se corroboró mediante la inmunodetección de las fosfoproteínas descritas como sustratos de CK2, p-eIF2 $\beta$  (S2) y p-CK2 $\beta$  (S2/3/4/8).

A continuación, se evaluaron los niveles de SALL2 y de distintos marcadores de la actividad de CK2 (p-eIF2 $\beta$  y p-CK2 $\beta$ ) en líneas celulares de cáncer que -de acuerdo a literatura o a nuestra experiencia en el laboratorio- presentan una nula o baja inmunodetección de SALL2 (Chai, 2011; Li y col., 2004; Thul y col., 2017; Uhlén y col., 2015). Adicionalmente, se inmunodetectó p53, ya que éste es un regulador transcripcional de SALL2 y ambos comparten ciertos blancos transcripcionales (Beckerman y Prives, 2010; Escobar y col., 2015; Farkas y col., 2013; Gu y col., 2011; Li y col., 2004), sugiriendo que SALL2 y p53 podrían cumplir roles similares ante determinados contextos celulares. En virtud de lo anterior, la expresión de p53 podría compensar funcionalmente la deficiencia de SALL2, lo cual podría conllevar a confusiones al momento de analizar el fenotipo celular en análisis posteriores.

Como se observa en la Figura 35.B, SALL2 no se encuentra presente en las líneas celulares de SKOV-3 (adenocarcinoma de ovario), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) y H1299 (cáncer de pulmón de células no pequeñas, NSCLC). Como control positivo se utilizaron células HEK 293, las cuales expresan altos niveles de SALL2 y CK2 endógeno (Thul y col., 2017; Uhlén y col., 2015).

Para evaluar si la inhibición de CK2 con CX-4945 provoca un aumento en los niveles de SALL2 en las líneas células de cáncer evaluadas, se crecieron estas células en presencia del inhibidor a distintas concentraciones y durante distintos periodos de tiempo. De las líneas celulares evaluadas, CX-4945 es capaz de reestablecer a SALL2 sólo en la línea celular derivada de cáncer de pulmón, H1299 (Figura 35.C). Por esta razón, se continuará trabajando con esta línea celular.

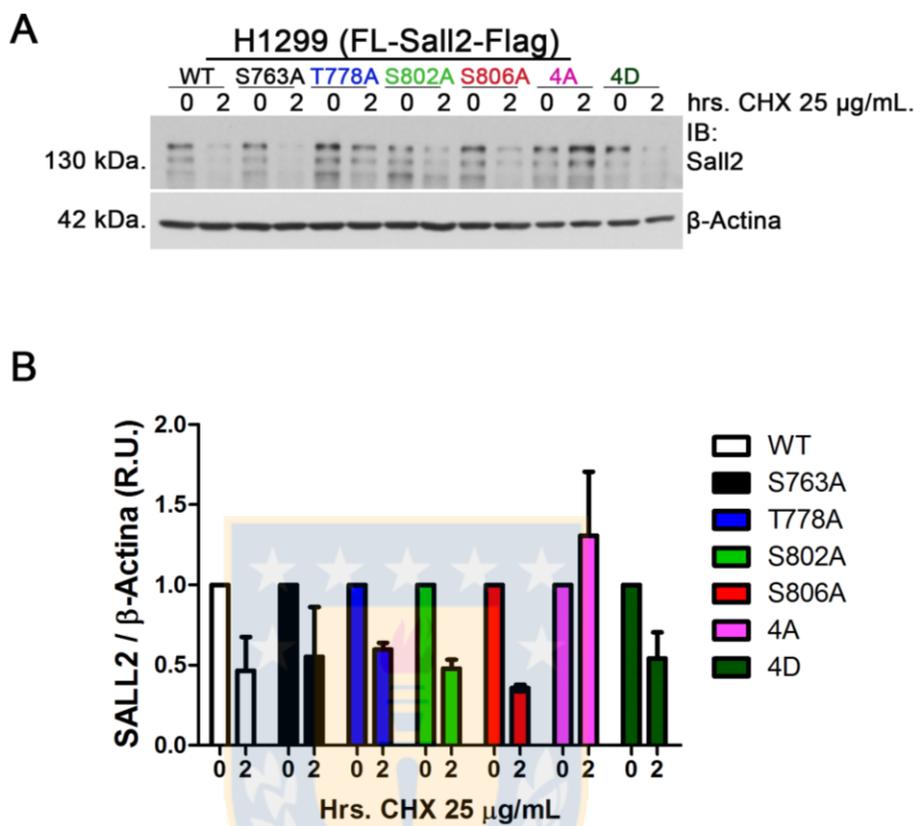




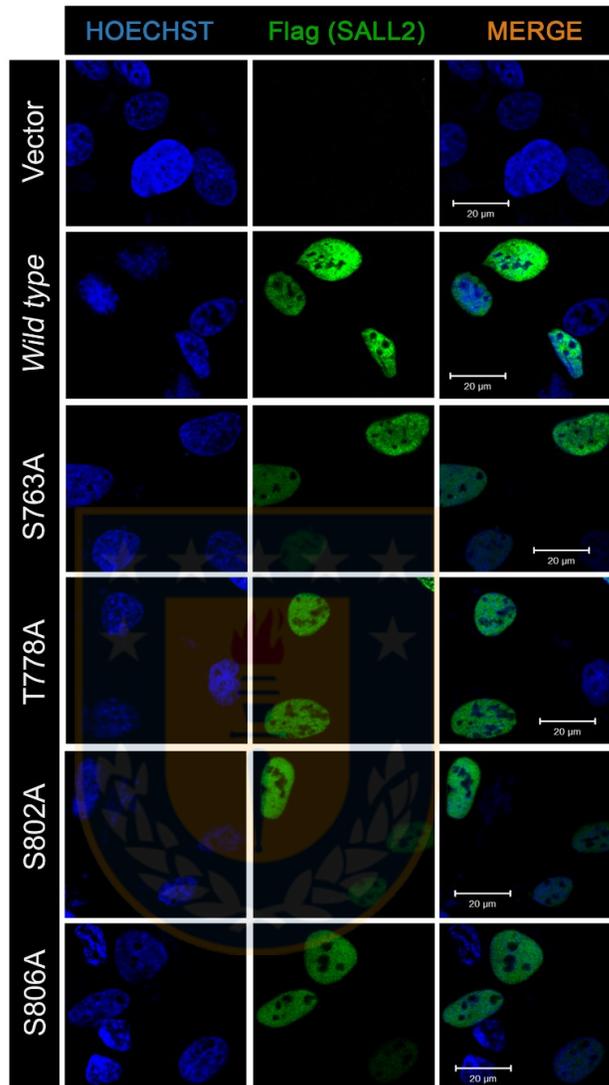
**Figura 35.- La inhibición farmacológica de CK2 restituye a SALL2 en la línea celular de cáncer de pulmón H1299.** **A.-** Se trataron células HEK 293 con CX-4945, como se indica. Los niveles de SALL2 y marcadores de actividad de CK2 se evaluaron mediante *western blot*. s.e.: exposición corta (*short exposure*); l.e.: exposición prolongada (*long exposure*). n=2. **B.-** Se analizaron los niveles de SALL2 en células de cáncer de ovario SKOV-3, de leucemia promielocítica HL-60, y de cáncer de pulmón de células no pequeñas, H1299, con células HEK 293 como control positivo. También se inmunodetectaron CK2  $\alpha/\alpha'$ , p53 y fosfoproteínas sustratos de CK2. n=1. **C.-** Se trataron células H1299 con el inhibidor CX-4945 como se indica, y se analizaron los niveles de SALL2 mediante *western blot*. La inhibición de CK2 se corroboró por inmunodetección de eIF2 $\beta$  fosforilado n=3. Fuente: propia.

Con el objetivo de determinar si la fosforilación de SALL2 en los sitios previamente identificados por espectrometría de masas influye sobre la estabilidad de la proteína, se evaluó la estabilidad de las mutantes con cicloheximida (CHX). Se transfectaron células H1299 con constructos que codifican para SALL2-Flag *wild type*, SALL2-Flag con sustitución por alanina en cada uno de los sitios fosfoaceptores por separado, SALL2-Flag con sustitución por alanina de todos los sitios fosfoaceptores identificados (4A) y SALL2-Flag con sustitución de todos los sitios por ácido aspártico (4D). Esta última corresponde a la mutante fosfomimética. Los resultados obtenidos (Figura 36) indican que la sustitución por alanina de cada sitio de forma individual no tiene efecto sobre la estabilidad de la proteína, mientras que la proteína con sustitución de todos los sitios en conjunto por alanina, presenta una mayor estabilidad con respecto a la proteína *wild type* y las otras mutantes.

Como control de que el efecto antes observado no guarda relación con una deslocalización de la proteína SALL2, se analizó la localización subcelular de cada mutantes mediante Inmunofluorescencia (Figura 37).



**Figura 36.- Mutante no fosforilable de SALL2 presenta mayor estabilidad que su contraparte *wild type*.** **A.-** Se transfectaron células H1299 con constructos que codifican para SALL2-Flag *wild type* (WT), S763A, T778A, S802A, S806A, S763A/T778A/S802A/S806A (4A, mutante no fosforilable) o SALL2-Flag S763D/T778D/S802D/S806D (4D, mutante fosfomimética). Las células se trataron con 25 µg/mL de cicloheximida (CHX) durante 0 y 2 horas y se inmunodetectó SALL2-Flag mediante *western blot*. **B.-** Cuantificación de SALL2-Flag en relación a los niveles de β-actina (barras ± SEM). R.U.: unidades relativas. n=2. Fuente: propia.



**Figura 37.- Mutaciones en sitios fosfoaceptores de SALL2 no alteran la localización nuclear de la proteína.** Se transfectaron células U2OS con pCMV2(NH)-Flag como vector vacío (Vector) o con plásmidos pCMV2(NH)/Sall2-Flag codificates para SALL2-Flag wild type o mutado individualmente en los residuos fosfoaceptores por alanina: S763A, T778A, S802A o S806A. Las células se fijaron con paraformaldehído 40 horas después de la transfección, y se detectó SALL2 por Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Flag (verde). El núcleo se muestra en azul (Hoechst). Merge: superposición de canales individuales. Barra de tamaño: 20  $\mu\text{m}$ . n=2. Fuente: propia.

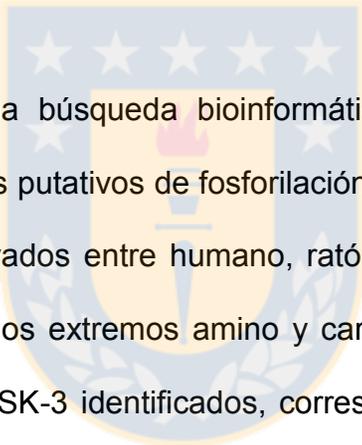
## 8. DISCUSIÓN

### 8.1.- Objetivo específico I: Validar a SALL2 como sustrato de CK2.

La exposición a estímulos extracelulares gatilla cambios en la expresión génica, que le permiten a una célula ejecutar una respuesta fisiológica apropiada de acuerdo al contexto celular. Para que esto ocurra, múltiples vías de señalización se integran para controlar la actividad de factores de transcripción, incidiendo sobre la expresión génica. En este contexto, uno de los mecanismos de regulación más ampliamente utilizado por las células es la fosforilación. Esta modificación se caracteriza por ser rápida y reversible, y puede afectar la estabilidad, localización, estructura e interacción con otras proteínas o con el ADN (Filtz y col., 2014; Whitmarsh y Davis, 2000).

SALL2 es un factor de transcripción pobremente caracterizado, con roles en el desarrollo y en cáncer (Hermosilla y col., 2017a). La identificación de blancos transcripcionales y el fenotipo celular ante la pérdida y ganancia de función, indican que SALL2 promueve el arresto del ciclo celular y la apoptosis en respuesta a agentes genotóxicos como etopósido y doxorubicina (Escobar y col., 2015; Li y col., 2004; Liu y col., 2007; Sung y col., 2012). A la fecha, existe muy poca información sobre los mecanismos de regulación de este factor de transcripción, especialmente a nivel post-traducciona. A pesar de ello, los

resultados de análisis masivos disponibles en la base de datos Phosphosite plus, indican que SALL2 es una proteína que se encuentra ampliamente fosforilada, en distintas condiciones experimentales y modelos celulares (Hornbeck y col., 2015). Sin embargo, la fosforilación de SALL2 no ha sido asociada a ninguna quinasa en particular, dejando abierta la interrogante de qué quinasa regula a SALL2, en respuesta a qué estímulo extracelular ocurre este proceso, y más importante aún, cuál es el efecto de estas modificaciones a nivel celular.



A través de una búsqueda bioinformática, se determinó que SALL2 contiene múltiples sitios putativos de fosforilación por CK2 y GSK-3. Estos sitios se encuentran conservados entre humano, ratón y rata, y se agrupan en dos regiones definidas en los extremos amino y carboxilo terminal de SALL2. Los sitios putativos para GSK-3 identificados, corresponden a los residuos S299 y T303. Adicionalmente, el residuo de S243 se encuentra fosforilado en múltiples modelos celulares (Hornbeck y col., 2015), y en base a predicciones de sitio consenso, se determinó que la quinasa responsable podría corresponder a GSK-3 (HPRD (Amanchy y col., 2007)), aunque también se han sugerido otras quinasas como CDK2 (Christensen y col., 2010; Franz-Wachtel y col., 2012; Rigbolt y col., 2011).

Los sitios putativos para CK2 identificados en la secuencia de SALL2, corresponden a S28, S763, T778 y S806. Fosforilaciones en los residuos S28 y S806 han sido reportados en células en cultivo (Hornbeck y col., 2015). El residuo S28, ubicado en el extremo amino terminal, se encuentra fosforilado en células de leucemia linfocítica aguda, Jurkat (Mertins y col., 2013). Múltiples estudios han demostrado además que el residuo S802 también se encuentra fosforilado, y que la modificación en este residuo coexiste con la modificación del residuo S806 (Christensen y col., 2010; Franz-Wachtel y col., 2012; Van Hoof y col., 2009; Mayya y col., 2009; Mertins y col., 2013; Rigbolt y col., 2011). Como se mencionó anteriormente, los sitios consenso para CK2 son del tipo S/T-X-X-D/E, donde el residuo ácido en la posición P+3 (tres residuos después del sitio de fosforilación, en dirección carboxilo terminal) es crítico para la fosforilación, y puede corresponder también a un residuo de serina, treonina o tirosina fosforilado (Allende y Allende, 1995; Kuenzel y col., 1987). El sitio S802 no corresponde a un sitio consenso típico para CK2, ya que se localiza en una secuencia SEEA, y no cuenta con un residuo ácido o fosforilado en la posición P+3. Sin embargo, se han descrito sitios de estas características (S-X-E) en otros sustratos de CK2 (Deplus y col., 2014). Es probable que la fosforilación de S806 en la posición P+4 de S802, actúe como residuo ácido, favoreciendo el reconocimiento por CK2, lo cual explicaría la co-ocurrencia de la fosforilación en ambos sitios. Por lo anteriormente expuesto, se consideró el residuo S802 como sitio putativo de fosforilación dependiente de CK2. Los sitios putativos

para CK2 S763, T778, S802 y S806 se localizan en el extremo carboxilo terminal de SALL2, próximos a los tres motivos de dedos de Zinc que participan en la unión a ADN (Gu y col., 2011; Li y col., 2004). De forma interesante, otros residuos también se encuentran fosforilados en esta región. Estos corresponden a S797 y T814 (Hornbeck y col., 2015). De acuerdo a la búsqueda de motivos con la herramienta PhosphoMotif Finder, S797 podría ser fosforilado por PKA (Proteína Quinasa A) o PKC (Proteína Quinasa C), mientras que T814 podría ser fosforilado por CK1 (Caseína Quinasa I). Todos los sitios hasta ahora mencionados, se encuentran tanto en la isoforma E1 como E1A de SALL2, y no en otros miembros de la familia Spalt-*like*

Tanto CK2 como GSK-3 pueden afectar la estabilidad de sus sustratos (Ampofó y col., 2010; Lin y col., 1996; Xu y col., 2009). Por esta razón, se realizó una búsqueda para identificar secuencias de degradación. Las secuencias de degradación del tipo PEST, se definen como regiones ricas en residuos de prolina (P), serina (S), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) y treonina (T), flanqueadas por residuos cargados positivamente (Rogers y col., 1986). Estas secuencias se encuentran presentes en proteínas de vida media corta, y han sido asociadas a proteólisis por el sistema ubiquitina-proteosoma o por cisteino-proteasas no lisosomales dependientes de calcio, llamadas Calpaínas (Rechsteiner y Rogers, 1996; Rogers y col., 1986). De éstos, el proteosoma es responsable de un 80-90% de la proteólisis intracelular en

células en cultivo, incluyendo proteínas nucleares como factores de transcripción (von Mikecz, 2006).

A través de análisis bioinformáticos, se detectaron cuatro potenciales secuencias de degradación PEST en SALL2: tres en el extremo amino terminal y una en el extremo carboxilo terminal (Tabla 5). Una de las secuencias PEST del extremo amino terminal, se localiza entre los residuos 252-271, cercana a los sitios putativos de fosforilación por GSK-3. La potencial secuencia PEST carboxilo terminal, se ubica en la misma región donde se encuentran los sitios putativos de fosforilación por CK2. Las secuencias PEST se localizan en extensiones sin estructura definida y expuestas al solvente (Rechsteiner y Rogers, 1996; Singh y col., 2006). En este contexto, todas las regiones PEST identificadas se localizan en zonas de potencial desorden estructural, en los extremos amino o carboxilo terminales (Figura 18.D). La región de mayor probabilidad de desorden estructural coincide con la ubicación de la secuencia PEST carboxilo terminal.

La presencia de potenciales secuencias de degradación PEST en el extremo amino terminal, se encuentra respaldada por la identificación de un sitio de ubiquitinación en el residuo de lisina 246 en células HEK 293T (Wagner y col., 2011). Adicionalmente, la delección de los residuos 19-364, da lugar a una proteína ( $\Delta$ SALL2-Flag) que se expresa en mayores cantidades que la proteína *full length* (Figura 25), sugiriendo que la región deletada podría ser

importante para la regulación de los niveles de la proteína contenidos en la célula. Considerando que esta región también contiene sitios putativos de fosforilación por GSK-3, existe la posibilidad de que la ubiquitinación del residuo K246 sea regulada por esta quinasa, de forma similar a como ha sido descrito para los sustrato de GSK-3,  $\beta$ -catenina y Snail (Xu y col., 2009). GSK-3 también puede alterar la localización subcelular de sus sustratos (Zhou y col., 2004).

Con respecto a la secuencia PEST carboxilo terminal, se ha descrito que el residuo de lisina 911 se encuentra ubiquitinado en células en cultivo. Si bien este sitio no se encuentra cercano a la secuencia PEST, se ha descrito que la degradación proteosomal puede comenzar en regiones de alto desorden estructural que se encuentren alejadas del sitio de ubiquitinación en la estructura primaria (Prakash y col., 2004). Adicionalmente, no se puede descartar que K911 se encuentre próximo a la secuencia PEST en la proteína plegada. Lamentablemente, lo anterior no puede ser corroborado, ya que a la fecha no se ha determinado la estructura tridimensional de SALL2, probablemente debido a su naturaleza desordenada. Cabe destacar que, debido a que la ubiquitinación es una modificación transiente, es de difícil identificación por espectrometría de masas, a menos que se cuente con péptidos altamente representados en la muestra (Parker y col., 2010). Durante el desarrollo de esta tesis, se utilizaron también múltiples herramientas bioinformáticas para identificar posibles sitios de ubiquitinación (Anexo 17). De acuerdo a la información obtenida, se generaron las mutantes K823R, K830R y

K911 las cuales se utilizarán en futuros ensayos de ubiquitinación, tal como se muestra en la Figura 34.D.

Para validar a SALL2 como sustrato de CK2, se demostró en primer lugar que ambas proteínas interaccionan en células en cultivo e *in vitro* (Figura 20). En el primer caso, se co-expresó SALL2-Flag junto a CK2 $\alpha$ -HA *wild type* o la mutante inactiva CK2 $\alpha$  K68M-HA, la que cuenta con una sustitución del residuo de lisina 68 por metionina (Penner y col., 1997). Este residuo de lisina se encuentra conservado dentro de las familias de quinasas, y es esencial para unir y/o orientar la molécula de ATP, al interaccionar con los grupos fosfato  $\alpha$  y  $\beta$  (Adams, 2001; Hanks y Hunter, 1995). En CK2, la mutación del residuo de K68 por metionina, arginina o alanina efectivamente reduce la actividad quinasa de CK2 (Cavin y col., 2003; Llorens y col., 2006; Penner y col., 1997; Sarno y col., 2002), sin afectar su localización predominantemente nuclear ni tampoco su unión a la subunidad regulatoria  $\beta$  (Penner y col., 1997). Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en la Figura 20.B, donde la subunidad  $\beta$  co-inmunoprecipita con CK2 $\alpha$  K68M-HA.

A través de inmunoprecipitación, se determinó que SALL2 y CK2 $\alpha$  interaccionan en células en cultivo (Figura 20.B y C). La naturaleza transiente de esta interacción queda de manifiesto al observar la forma dominante negativa de CK2 $\alpha$  co-inmunoprecipita con SALL2-Flag y vice-versa, mientras que la interacción con la quinasa activa es casi indetectable (Figura 20.B). El hecho de que SALL2 interaccione de forma más estable con la dominante

negativa de CK2 -que teóricamente no une o no hidroliza ATP- sugiere que la enzima catalizaría la reacción bi-sustrato a través de la formación de un complejo ternario que involucraría a la misma enzima, SALL2 y ATP. Ante la incapacidad de la enzima de catalizar la reacción, SALL2 permanecería unido al sitio activo. Análisis enzimáticos con CK2 purificada desde timo de ternero, corroboran la formación de un complejo ternario entre la enzima y los sustratos GTP y caseína, demostrando un mecanismo enzimático secuencial (Zandomeni, 1989). El ingreso secuencial de sustratos al sitio activo de la enzima podría ocurrir de forma ordenada o al azar. Mecanismos secuenciales al azar han sido descritos para serina/treonina quinasas como las que conforman el complejo IKK (*IκB kinase complex*) y la quinasa Rho II (ROCK-II) (Peet y Li, 1999; Trauger y col., 2002), mientras que mecanismos secuenciales ordenados han sido descritos para las serina/treonina quinasas p38 $\alpha$  y AKT (Szafranska y Dalby, 2005; Zhang y col., 2006).

A través de *GST-Pulldown*, se demostró que la interacción entre CK2 y SALL2 es directa y sólo tiene lugar entre GST-CK2 $\alpha$  y hSALL2 FL-His, y no con las proteínas recombinantes de menor tamaño hSALL2 PEST-His y hSALL2 C-ter-His (Figura 20.D y E). Es probable que, ante la ausencia de regiones que pudieran ser estructuralmente importantes para la proteína SALL2, las proteínas recombinantes de menor tamaño no se pliegan de forma correcta y, en consecuencia, no puedan ser reconocidas por la quinasa. Tampoco se descarta que las regiones deletadas sean importantes para la unión de SALL2 a CK2,

aun cuando éstas se encuentren distantes del sitio de fosforilación, como ha sido descrito para el sustrato de CK2 eIF2 $\beta$  (Llorens y col., 2003). En cualquier caso, el hecho de que la interacción sea directa indica que es posible realizar ensayos de fosforilación *in vitro*.

Una característica estructural de las enzimas quinasas es la presencia de un *loop* o segmento de activación que bloquea el acceso de los sustratos al sitio catalítico. La fosforilación de este *loop* aumenta la flexibilidad del mismo, activando la quinasa al permitir la unión de los sustratos. Algunas quinasas, sin embargo, no contienen un residuo fosforilable en el *loop* de activación, y en su lugar poseen un residuo negativamente cargado (Adams, 2001; Johnson y col., 1996). Este es el caso de CK2, cuyas subunidades catalíticas contienen un residuo de ácido glutámico en la posición 180 (CK2 $\alpha$ ) o 181 (CK2 $\alpha'$ ) en el *loop* de activación. En consecuencia, no requieren de fosforilación por otras quinasas para su activación. Adicionalmente, el segmento amino terminal de CK2 $\alpha$  interacciona con el *loop* de activación y es esencial para mantener a la quinasa en una conformación activa en ausencia de la subunidad regulatoria  $\beta$  (Sarno y col., 2002). Estas características estructurales explicarían por qué las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  y las holoenzimas  $\alpha_2\beta_2$  y  $\alpha'_2\beta_2$  recombinantes, producidas en bacterias, son catalíticamente activas.

Tomando este antecedente en consideración, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* con las subunidades  $\alpha$  o  $\alpha'$  o las holoenzimas  $\alpha_2\beta_2$  o  $\alpha'_2\beta_2$  purificadas desde bacterias, utilizando como sustrato [ $\gamma^{32}$ ]-ATP y la proteína

SALL2-Flag inmunoprecipitada desde células Flp-In™ T-REx™ U2OS (Figura 25). SALL2-Flag es fosforilada por todas las formas de CK2 evaluadas, pero principalmente por la subunidad catalítica  $\alpha$ . Esto es consistente con el hecho de que CK2 $\alpha$  y no CK2 $\alpha'$ , co-inmunoprecipita con la proteína SALL2 endógena en células HEK 293T (Figura 20.C), y que la subunidad regulatoria  $\beta$  no es detectada en la inmunoprecipitación de SALL2-Flag en células HEK 293 (Figura 23.B), sugiriendo que, al menos en las líneas celulares estudiadas, la fosforilación de SALL2 sería mediada por la subunidad  $\alpha$  en estado monomérico. En las Figuras 22.A y 26.A, también es posible observar la autofosforilación de la subunidad  $\alpha'$ , lo cual ha sido reportado con anterioridad (Cavin y col., 2003)

Una observación interesante que se desprende de los ensayos de fosforilación *in vitro*, es la fosforilación basal en ausencia de quinasa recombinante, la cual debe ser catalizada por quinasa(s) que co-inmunoprecipita(n) con SALL2-Flag y  $\Delta$ SALL2-Flag. Esta fosforilación se reduce drásticamente al pre-incubar la reacción con el inhibidor específico de CK2, CX-4945 (Figuras 22.A, 26.A y 31.B). Por otro lado, los análisis por espectrometría de masas corroboraron que los sitios que se encuentran fosforilados en la condición basal, corresponden a S802 y S806, y la fosforilación de estos residuos aumenta al agregar CK2 $\alpha$  a la reacción *in vitro* (Tabla 6, Figura 30), sugiriendo que la fosforilación basal sería mediada por CK2 $\alpha$  endógena, lo cual se discutirá más adelante. Si bien la reducción de la

incorporación de fosfato radioactivo basal en presencia de CX-4945, no es significativa (Figura 22.B), es probable que no se haya alcanzado la inhibición total de la enzima, ya que CX-4945 es un inhibidor competitivo con respecto al ATP (Pierre y col., 2011b; Siddiqui-Jain y col., 2010). La concentración de CX-4945 utilizada en las reacciones realizadas es de 100 nM, versus 100  $\mu$ M de ATP, sugiriendo que el ATP podría desplazar al inhibidor desde el sitio activo de la quinasa, al encontrarse en mayor concentración.

Otra observación relevante que se desprende de los ensayos de fosforilación *in vitro* (Figuras 22.A, 26.A y 31.B), es que el sustrato debe ser desfosforilado con  $\lambda$ -Fosfatasa antes de la reacción, de lo contrario no ocurre incorporación de fosfato radioactivo. Lo anterior sugiere que los sitios que son fosforilados *in vitro*, ya se encuentran modificados en la célula. La estequiometría de incorporación de ATP con respecto a la proteína SALL2-Flag *full length* es de 2:1 para CK2 $\alpha$ . Esta relación concuerda con la identificación de dos sitios de fosforilación por espectrometría de masas de la proteína  $\Delta$ SALL2-Flag fosforilada *in vitro* por CK2 $\alpha$ : S802 y S806 (Figura 30). Si bien la intensidad de ión fosforilado en S802A no supera el umbral de 5% de intensidad relativa para asumir esta modificación como confiable (Tabla 6), es posible observar una reducción importante de la fosforilación de  $\Delta$ SALL2-Flag al mutar el residuo S802 por alanina (Figura 31.D), sugiriendo que la fosforilación de este residuo es relevante. Por otro lado, durante el proceso de estandarización de análisis por espectrometría de masas, si se observó el

fragmento iónico con fosforilación en el residuo S802 con abundancia relativa por sobre el umbral (6%), al utilizar disociación por colisión de alta energía (HCD) como método de fragmentación (Anexo 15). Este proceso de fragmentación usa mayor energía y menor tiempo de activación que la disociación inducida por colisión (CID) (Quan y Liu, 2012). La identificación del ión fosforilado con una abundancia relativa por sobre el umbral, indica que este residuo sí es modificado en el modelo de estudio utilizado.

Se ha descrito que S802 se encuentra fosforilado en diversas condiciones en distintos modelos celulares, acompañado de la fosforilación de S806 (Christensen y col., 2010; Franz-Wachtel y col., 2012; Van Hoof y col., 2009; Mayya y col., 2009; Mertins y col., 2013; Rigbolt y col., 2011). Estos antecedentes sugieren que la fosforilación de ambos residuos es constitutiva, lo cual explicaría por qué la proteína debe ser desfosforilada de forma previa a los ensayos de fosforilación *in vitro*. En apoyo a esta hipótesis, se ha descrito que la fosforilación de otro sustrato para CK2, I $\kappa$ B $\alpha$ , también ocurre de forma constitutiva (Barroga y col., 1995; Lin y col., 1996; Schwarz y col., 1996).

De forma interesante, se ha sugerido que la fosforilación de S802 podría ser mediada por CK2 (Rigbolt y col., 2011) o por GSK-3 (Christensen y col., 2010; Franz-Wachtel y col., 2012). Esta última sugerencia coincide con la evaluación del motivo de fosforilación con la herramienta PhosphoMotif Finder. De ser fosforilado por GSK-3, este sitio podría estar sujeto a fosforilación

jerárquica, en donde la incorporación de un grupo fosfato en el residuo S806 por CK2 influenciaría la subsecuente fosforilación del residuo S802 por GSK-3, lo cual explicaría la co-ocurrencia de ambas modificaciones. Esto ocurriría, ya que la mínima unidad de reconocimiento para GSK-3 corresponde al motivo S/T-X-X-X-S/T, en donde la segunda serina o treonina es fosforilada o “cebada” primero por otra quinasa, antes de que GSK-3 fosforile el primer residuo de serina o treonina, ubicado hacia el extremo amino terminal (Xu y col., 2009). Existen diversos antecedentes que relacionan a GSK-3 y CK2 con eventos de fosforilación jerárquica (Roach, 1991). Este es el caso de la enzima Glicógeno Sintasa, donde la fosforilación del residuo S657 por CK2 da lugar a fosforilaciones posteriores mediadas por GSK-3 (Sugden y col., 2008). Algunas hipótesis propuestas sobre el mecanismo molecular de la fosforilación jerárquica incluyen la alteración de las interacciones que tienen lugar en el proceso de reconocimiento entre el sustrato fosforilado y la segunda quinasa, o cambios conformacionales que modifican la exposición del sitio de reconocimiento de la segunda quinasa (Roach, 1991)

Si la fosforilación del residuo S802 en SALL2 es mediada por GSK-3 de forma jerárquica, se explicaría por qué la pre-incubación de la reacción *in vitro* con CX-4945 en ausencia de enzima no es suficiente para inhibir la fosforilación basal en su totalidad (Figuras 22.A, 26.A y 31.B). En este escenario, la actividad residual de CK2 endógena, en presencia de CX-4945, promovería la fosforilación de S806, y GSK-3 endógena podría entonces mediar la

fosforilación de S802. Sin embargo, si este fuera el caso, no debería observarse fosforilación alguna en reacciones *in vitro* con la mutante S806A (Figura 34.B). Cabe destacar que no se puede descartar la posibilidad de que este residuo sea fosforilado por ambas quinasas, como ocurre con el residuo S29 en la proteína Ataxina-3 (Pastori y col., 2010). Un aspecto que distingue a CK2 de otras quinasas es su capacidad de catalizar la reacción de fosforilación tanto a partir de ATP como de GTP (Allende y Allende, 1995). Una posible aproximación experimental para dilucidar si S802 es fosforilado de forma jerárquica por CK2 y GSK-3, es realizar ensayos de fosforilación *in vitro* con la mutante S806A, utilizando [ $\gamma^{32}$ ]-GTP en vez de [ $\gamma^{32}$ ]-ATP.

A diferencia de las condiciones *in vitro*, la proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag también es fosforilada en los residuos S763 y T778 en células en cultivo, de forma dependiente de la actividad de CK2 (Tabla 6, Figura 30). Estos residuos no son fosforilados *in vitro*, lo cual puede deberse a que el proceso de desfosforilación previo a la incorporación de fosfato radioactivo: 1) remueve la fosforilación de otros sitios que podrían influir sobre la fosforilación mediada por CK2, 2) afecta la estructura de la proteína, alterando el reconocimiento de S763 y T778 por CK2 *in vitro*, o 3) impide la interacción de SALL2 con otras proteínas necesarias para el reconocimiento o unión de CK2 a SALL2. Tampoco se descarta que: 1) CK2 deba ser modificada post-traduccionalmente para fosforilar estos sitios, como parte de una cascada de señalización que no tiene lugar en las bacterias desde donde se purificó la quinasa, 2) que CK2 requiera

de un interactor para fosforilar estos residuos, o 3) que estos sitios si sean fosforilados *in vitro* por la subunidad  $\alpha'$  o la holoenzima.

Todos los sitios identificados por espectrometría de masas, cuya fosforilación es dependiente de CK2 (S763, T778, S802 y S806), corresponden a sitios putativos del extremo carboxilo terminal indicados al comienzo de la investigación (Tabla 4, Figura 19). Interesantemente, se identificó la fosforilación de un residuo de treonina en la posición 467. Esta fosforilación exhibe un comportamiento opuesto al de S763 y T778: el número de fosfopéptidos identificados con esta modificación es mayor al inhibir la actividad de CK2 con CX-4945 (Tabla 6, Figura 30), sugiriendo que la fosforilación de este residuo podría ser excluyente con la modificación de S763 y T778. El análisis de la secuencia que contiene este sitio, utilizando la herramienta PhosphoMotif Finder de HPRD, indica que el residuo T467 podría ser reconocido por CK1 (Caseína Quinasa I) o bien por GSK-3, ERK1/2 (*Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2*), o CDK5 (Quinasa dependiente de Ciclina 5), mientras que la predicción de NetPhos 3.1 sugiere como posibles quinasas a CK1 o p38.

Cabe destacar que la fosforilación de los residuos S763, T778 y S467 no ha sido descrita previamente, probablemente debido a que la detección de esta modificación post-traducciona es particularmente complicada, dada la baja abundancia de los fosfopéptidos con respecto a los péptidos no modificados (Parker y col., 2010). Los estudios en los que se han reportado fosforilaciones

en SALL2, corresponden a análisis masivos que implican la detección de péptidos provenientes de la proteína endógena, disminuyendo más aún la probabilidad de identificar fosfopéptidos. Más aún, la mayor parte de los análisis por espectrometría de masas involucran la digestión de la muestra con Tripsina. Con esta enzima, los péptidos que contienen los residuos S467 y S763-T778, alcanzan una longitud de 50 y 40 residuos, respectivamente, muy por encima de la longitud óptima de péptido para espectrometría de masas (14 residuos) (Burkhart y col., 2012). En este trabajo, los aspectos anteriormente señalados se resolvieron a través de la sobre-expresión de una variante más corta de SALL2, y la digestión de la muestra de forma secuencial con Tripsina y Asp-N. De esta forma, se ha demostrado por primera vez que los sitios S763, T778 y S467 se encuentran fosforilados en células Flp-In™ T-REx™ U2OS en cultivo, y que la fosforilación de estos residuos es dependiente de la actividad de CK2. Otros residuos cuya fosforilación no ha sido reportada previamente y que se pudieron visualizar durante la estandarización de análisis por espectrometría de masas, a través de disociación por colisión de alta energía (HCD) como método de fragmentación, son los residuos S585 y T880 (Anexo 16). De acuerdo a la herramienta de predicción NetPhos 3.1, la fosforilación de S585 podría ser mediada por las quinasas dependientes de ciclina CDK1 o CDK5, mientras que T880 podría ser modificado por CK1 o p38.

## **8.2.- Objetivo específico II: Determinar la relevancia fisiológica de la fosforilación de SALL2 mediada por CK2.**

CK2 promueve la tumorigénesis al regular positivamente a oncogenes y negativamente a supresores tumorales (Duncan y Litchfield, 2008). Se ha descrito que la actividad de CK2 puede afectar la localización subcelular (Gurel y col., 2008), estabilidad (Ampofo y col., 2010; Lin y col., 1996; Scaglioni y col., 2006) y/o actividad (Gurel y col., 2008; Miller y col., 2002) de supresores tumorales.

A través de Inmunofluorescencia, se determinó que la actividad de CK2 no influye sobre la localización subcelular de SALL2 (Figura 32). Estos ensayos se realizaron en células HEK 293, ya que estas células exhiben altos niveles de CK2 $\alpha$  y su actividad es alta con respecto a otras líneas celulares (Scaglioni y col., 2006; Thul y col., 2017; Uhlén y col., 2015). En este modelo, CK2 se localiza predominantemente en el núcleo, lo cual es consistente con observaciones previas en otros modelos celulares (Penner y col., 1997; Tarrant y col., 2012). Asimismo, la localización de SALL2 también es nuclear, tal como se ha demostrado en otros modelos celulares (Escobar y col., 2015). Más aún, la sustitución por alanina de los residuos fosforilables por CK2, no afecta la distribución nuclear de SALL2 en células U2OS, reforzando las observaciones de que la actividad de CK2 no afecta la localización subcelular de SALL2

(Figura 37). La colocalización de SALL2 y CK2 es concordante con la interacción entre ambas proteínas (Figura 20).

Como se mencionó anteriormente, las secuencias PEST han sido relacionadas con proteólisis mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma (Rechsteiner y Rogers, 1996). El proteosoma 26S es un complejo multiproteico que participa en la degradación selectiva de proteínas no requeridas por la célula (Chen y col., 2011). Para que una proteína sea degradada por el proteosoma 26S, debe encontrarse unida covalentemente a cadenas de ubiquitina (Geng y col., 2012). En este contexto, análisis con el inhibidor específico de CK2, TBB o la co-expresión de SALL2-Flag y CK2 $\alpha$ -HA *wild type* o catalíticamente inactiva, llevaron a demostrar que la actividad de CK2 disminuye la estabilidad de SALL2 de forma dependiente del sistema ubiquitina-proteosoma (Figuras 33 y 34). La inhibición de CK2 disminuye la ubiquitinación de SALL2, indicando que esta modificación post-traducciona es dependiente de la actividad de CK2 (Figura 34.D).

El efecto más relevante de la inhibición de CK2 es la restitución de los niveles de SALL2 en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) H1299 (Figura 35.C). Este efecto no se observa en células de cáncer de ovario SKOV-3, donde el silenciamiento de *SALL2* ocurre a nivel transcripcional por hipermetilación del promotor P2 (Sung y col., 2013), o en la línea celular de leucemia promielocítica aguda humana, HL-60, en donde el

mensajero de *SALL2* no ha sido detectado (Hornbeck y col., 2015) (no mostrado), indicando que en estos modelos celulares existen otros mecanismos de regulación que prevalecen sobre los mecanismos post-traduccionales descritos en este trabajo. Interesantemente, HL-60 y H1299 han sido descritas como líneas celulares altamente sensibles al efecto anti-proliferativo ejercido por CX-4945, mientras que la línea celular SKOV-3 no lo es (Siddiqui-Jain y col., 2010).

En células HEK 293, la inhibición farmacológica de CK2 con el inhibidor CX-4945 gatilla un aumento de los niveles de *SALL2* endógeno en células HEK 293, los cuales decaen al extender el tiempo de tratamiento (Figura 35.A). Este efecto en el decaimiento de los niveles de *SALL2*, no se observó al tratar las células con el inhibidor TBB, probablemente porque la potencia de inhibición de CX-4945 es mayor que la de TBB ( $K_i = 0.38$  nM para CX-4945 versus  $K_i = 49$  nM para TBB) (Sarno y col., 2011). La disminución de *SALL2* a tiempos extendidos de tratamiento guardaría relación con la disminución de la fosforilación de eIF2 $\beta$  en los residuos de S2 (Figura 35.A) y S67. Estas fosforilaciones son necesarias para mantener la tasa de síntesis proteica (Llorens y col., 2006), sugiriendo que la disminución de *SALL2* puede ser causada por una menor síntesis global de proteínas, lo cual se sustenta en la disminución de los niveles totales de CK2 $\beta$  y eIF2 $\beta$ . El hecho de CX-4945 gatille un aumento estable en los niveles de *SALL2* en células de cáncer de pulmón H1299 y no en células embrionarias de riñón HEK 293, es consistente con la observación de que la sobrevivencia en

respuesta a CX-4945 no se ve alterada en células no tumorales (Siddiqui-Jain y col., 2010).

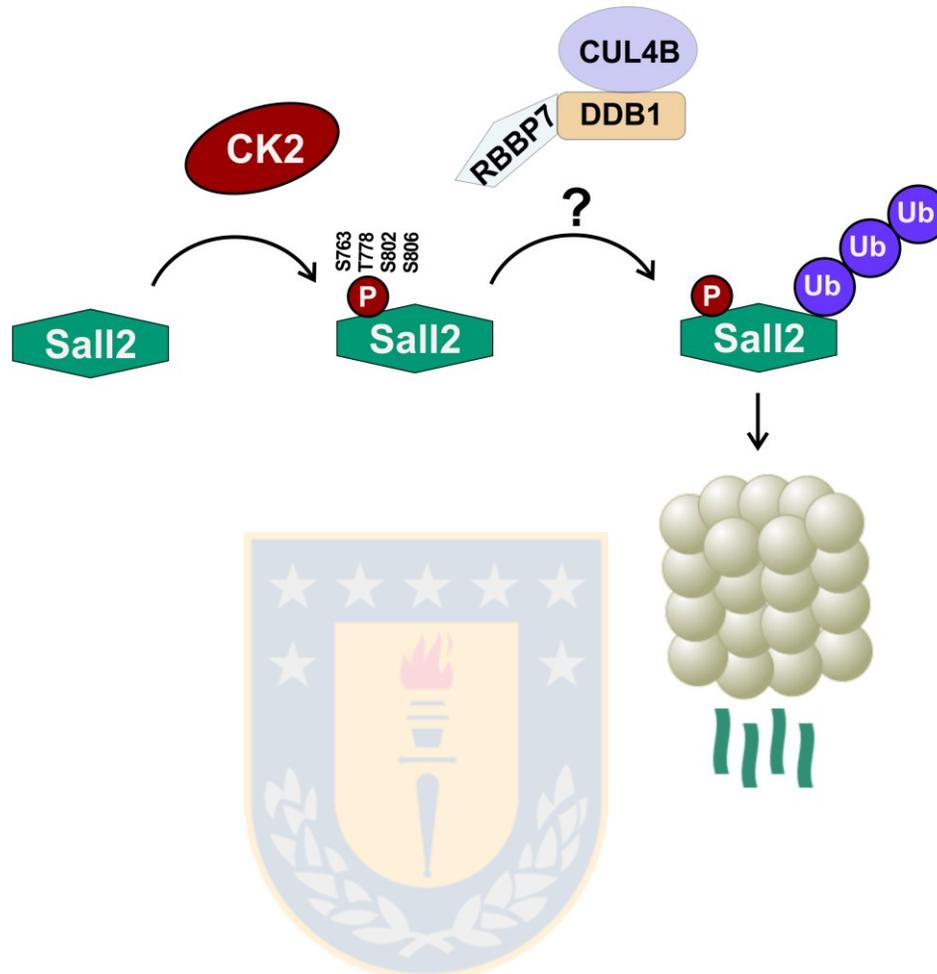
El efecto de la fosforilación de SALL2 dependiente de CK2 en la línea celular H1299, se corroboró a través de análisis de estabilidad de mutantes no fosforilables y de la mutante fosfomimética (Figura 36). Esta aproximación experimental permitió determinar que la fosforilación de todos los residuos identificados, es relevante para la estabilidad de la proteína. La mutante fosfomimética muestra una estabilidad similar a la proteína *wild type*, sugiriendo que, en estas condiciones, la fosforilación de SALL2 ocurre de manera constitutiva.

En conclusión, los resultados descritos sugieren que CK2 fosforila a SALL2, y que la actividad de esta quinasa promueve la ubiquitinación de SALL2 y su degradación dependiente del sistema ubiquitina-proteosoma.

La ubiquitinación de una proteína ocurre en tres pasos: en primer lugar, la molécula de ubiquitina se une a una enzima activadora de ubiquitina (E1) en un proceso dependiente de ATP; luego, la molécula de ubiquitina activada es transferida a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2), para finalmente ser adjuntada al sustrato a través de una enzima ligasa de ubiquitina (E3) (Chen y col., 2011; Teixeira y Reed, 2013). La especificidad del proceso de ubiquitinación está dada por la interacción entre la enzima ubiquitina-ligasa (E3) y el sustrato (Geng y col., 2012). Existen cientos de ubiquitina-ligasas, las

cuales se clasifican en tres tipos de acuerdo al dominio funcional que posean: HECT (*Homologous to E6-AP carboxy terminus*), RING (*Really Interesting New Gene*) *finger* y *U-box*. Dentro de las ubiquitina-ligasas del tipo RING *finger* existen dos sub-clases: RING-E3s, que contienen el dominio RING y el dominio de unión a sustrato en el mismo polipéptido, y las ligasas CRLs (*cullin-RING* ligasas). Estas últimas son responsables de la ubiquitinación de alrededor del 20% de todas las proteínas intracelulares destinadas a degradación proteosomal, y corresponden a complejos compuestos por proteínas llamadas culinas, asociadas a proteínas con el dominio RING y varios adaptadores y receptores intercambiables para el reconocimiento de sustratos (Soucy y col., 2009). Complejos ubiquitina-ligasas de la familia de las Culinas son responsables de la ubiquitinación de fosfo-sustratos durante el ciclo celular (Teixeira y Reed, 2013). En este contexto, se ha descrito que, al estimular la proliferación de fibroblastos humanos quiescentes a través de la restitución de suero en el cultivo, SALL2 es ubiquitinado por el complejo Culina 4B-DDB1-RBBP7 y posteriormente degradado por el proteosoma (Sung y col., 2011). Considerando que la actividad de CK2 aumenta al inducir la proliferación por adición de suero en fibroblastos de ratón NIH3T3 en estado de quiescencia (Orlandini y col., 1998), es probable que exista una relación entre la proliferación celular, la fosforilación de SALL2 mediada por CK2 y su posterior ubiquitinación por el complejo Culina 4B-DDB1-RBBP7.

Con todo lo anteriormente descrito, el modelo propuesto a partir de esta investigación se indica en la Figura 38, en donde CK2 fosforila a SALL2 en los residuos identificados en este trabajo, promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal. La ubiquitinación de SALL2 podría ser mediada por el complejo Culina 4B-DDB1-RBBP7, como ha sido descrito en fibroblastos en proliferación (Sung y col., 2011), aunque no se descarta la participación de otras enzimas ubiquitina-ligasas. Siendo SALL2 un supresor tumoral (Hermosilla y col., 2017a), la degradación de SALL2 podría constituir uno de los mecanismos a través de los cuales CK2 promovería la proliferación y sobrevivencia celular. Algunos ejemplos que sostienen el modelo descrito en la Figura 38, se basan en la regulación de la estabilidad de los supresores tumorales VHL (Von Hippel-Lindau), I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor  $\alpha$  de NF- $\kappa$ B) y PML (Leucemia Promielocítica), como se resume en la Tabla 7.



**Figura 38.- Modelo propuesto para la regulación de SALL2 dependiente de CK2.** SALL2 es fosforilado por CK2, lo cual gatilla su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal. A través de la regulación negativa de la estabilidad de SALL2, CK2 podría promover la sobrevivencia y proliferación celular. Un posible candidato para la ubiquitinación de SALL2 es el complejo Culina 4B (CUL4B)-DDB1-RBBP7, aunque no se descarta la participación de otras enzimas ubiquitina-ligasas. Por simpleza, sólo se muestra el core catalítico del proteosoma 26S. Fuente: propia.

Supresor tumoral	Sitios fosforilados por CK2	Secuencia PEST (epestfind)	Efecto de mutante no fosforilable	Ref.
<b>VHL</b> (AAB64200.1)	S33, S38 y S43	aa 4-58 (17.75)	Mayor degradación de HIF-1 $\alpha$ (Factor de transcripción Inducible por Hipoxia 1 $\alpha$ ) y, en consecuencia, una menor actividad transcripcional del mismo, incluso en condiciones de hipoxia.	(Ampofo y col., 2010)
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b> (NP_065390.1)	S283, T291, S293, T299	aa 264-314 (5.13)	Mayor muerte celular. mecanismo conservado, ya que CK2 fosforila también al homólogo de I $\kappa$ B $\alpha$ en <i>D. melanogaster</i> , Cactus, en una región PEST carboxilo terminal. Mutantes no fosforilables de Cactus se presentan en mayores niveles durante el desarrollo embrionario, en comparación con su contraparte <i>wild type</i> .	(Kato y col., 2003; Lin y col., 1996; Liu y col., 1997; Schwarz y col., 1996)
<b>PML</b> (NP_150252.1)	S517	aa 525-546 (12.03)	Mayor muerte celular en respuesta a radiación UV, menor proliferación y potencial tumorigénico.	(Scaglioni y col., 2006)
<b>SALL2</b> (NP_005398.2)	S793, T778, S802, S806	aa 713-786 (14.79)		

**Tabla 7.- Supresores tumorales cuya estabilidad es regulada negativamente por fosforilación mediada por CK2 en secuencias PEST.** CK2 fosforila a los supresores tumorales VHL, I $\kappa$ B $\alpha$  y PML en secuencias de degradación PEST, promoviendo su degradación. Se incluyen además los resultados obtenidos en esta tesis. El número de identificación de las secuencias utilizadas se señala entre paréntesis. *Se indica también el puntaje otorgado por la herramienta epestfind a cada secuencia identificada. Se consideraron como relevantes aquellas secuencias con puntaje sobre 5.0. aa: aminoácidos.* Fuente: propia.

Si bien CK2 ha sido descrita como una quinasa constitutivamente activa (St-Denis y Litchfield, 2009), su actividad aumenta en respuesta a estímulos como arsenito, radiación UV, shock osmótico o inhibición de síntesis proteica por anisomicina, de forma dependiente de p38 (Kato y col., 2003; Sayed y col., 2000; Scaglioni y col., 2006). p38 pertenece a la familia de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), quinasas que participan en cascadas de señalización en respuesta a una variedad de estímulos, tales como radiación UV, shock osmótico, citoquinas pro-inflamatorias o factores de crecimiento. El efecto de la activación de p38 depende del estímulo y del tipo celular, y puede influir sobre la proliferación celular, sobrevivencia, diferenciación, etc. (Zarubin y Han, 2005)

Tanto la subunidad  $\alpha$  como la subunidad  $\beta$  de CK2 interaccionan con la isoforma p38 $\alpha$  activa de forma directa, lo cual aumenta la actividad de CK2 *in vitro* (Sayed y col., 2000). El efecto de CK2 sobre la estabilidad de PML e I $\kappa$ B $\alpha$  se exagera en respuesta a estrés como shock osmótico o radiación UV, de forma dependiente de p38 (Kato y col., 2003; Scaglioni y col., 2006). Considerando lo anterior, no se descarta que la fosforilación dependiente de CK2 y consecuente degradación de SALL2 se vea exacerbada ante determinados tipos de estrés que involucran la activación de p38.

A pesar de que CK2 ejerce un efecto sobre la estabilidad de SALL2, no se puede descartar un efecto sobre la actividad transcripcional, ya que la adición de grupos fosfato, de carga negativa, ocurren en una región inmediatamente próxima a los tres dedos de Zinc que participan en la unión a ADN (Gu y col.,

2011; Li y col., 2004). Un ejemplo de este tipo de regulación mediada por CK2 ocurre sobre el supresor tumoral Ikaros, codificado por el gen *IKZF1*. Ikaros es un factor de transcripción que actúa como regulador maestro de la hematopoyesis (Gowda y col., 2017). Ikaros es fosforilado por CK2 en distintos residuos, lo cual se ha asociado no sólo con una deslocalización nuclear *in vivo*, sino también con una disminución de la afinidad de Ikaros por el ADN *in vitro* (Gómez-del Arco y col., 2004; Gurel y col., 2008). Adicionalmente, la fosforilación de Ikaros es regulada durante el ciclo celular, siendo desfosforilado durante G1 y nuevamente fosforilado al entrar en fase S. En su estado desfosforilado, Ikaros promueve el arresto celular en G1, lo cual es consistente con una mayor afinidad al ADN. Los autores de este trabajo discuten que este mecanismo de fosforilación sería relevante para la expansión proliferativa de linfocitos en presencia de antígeno, ya que la desfosforilación de Ikaros también ocurre en etapas tempranas de la estimulación de linfocitos T primarios, conforme progresan a fase S (Gómez-del Arco y col., 2004). Al igual que SALL2, el mecanismo a través del cual Ikaros promueve el arresto en G1 se relaciona con la represión transcripcional de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. La delección de *IKZF1* es frecuente en leucemia linfocítica aguda (B-ALL) y se asocia a mal pronóstico (Gowda y col., 2017). De forma interesante, la actividad de CK2 se encuentra elevada en B-ALL, y la inhibición farmacológica de CK2 con CX-4945, reestablece la actividad transcripcional de Ikaros, incluso en células primarias que contienen sólo un

alelo funcional de *IKZF1*. En este modelo celular, el efecto de CX-4945 se relaciona con un efecto anti-proliferativo en cultivo y anti-tumoral *in vivo* (Song y col., 2015). Este estudio plantea la posibilidad de que el uso de inhibidores de CK2 podría ser útil incluso en tumores con haploinsuficiencia para *SALL2*. En conjunto, los estudios antes mencionados refuerzan el rol de CK2 como regulador del ciclo celular a través de la inactivación de supresores tumorales, y abren la posibilidad de que CK2 también ejerza un rol sobre la actividad transcripcional de *SALL2*.

La actividad y/o expresión de CK2 se encuentra elevada en tejidos normales con alto índice mitótico y en una variedad de tipos de cáncer que incluyen leucemia, cabeza y cuello, próstata, riñón, glándula mamaria y pulmón. (Duncan y Litchfield, 2008; Gowda y col., 2017). Los resultados expuestos hasta ahora, han sido obtenidos principalmente en la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), H1299. Esta línea celular exhibe una elevada actividad de CK2 con respecto a otras líneas celulares (Scaglioni y col., 2006), lo cual es consistente con su alta sensibilidad frente al efecto anti-proliferativo ejercido por el inhibidor de CK2, CX-4945 (Siddiqui-Jain y col., 2010). La inhibición de CK2 en células de cáncer de pulmón deficientes de *SALL2*, H1299, restituye a este supresor tumoral (Figura 35). De forma relevante, la inhibición de CK2 con TBB en este modelo celular, restituye los niveles de otro supresor tumoral, PML (Scaglioni y col., 2006). Lo anterior sugiere que en células H1299, la inhibición de CK2 podría tener un efecto aditivo, al restituir a

SALL2 y PML. Adicionalmente, existe una correlación inversa entre los niveles de PML y la actividad la CK2 en tumores primarios de NSCLC (Scaglioni y col., 2006), lo cual podría ser también el caso para SALL2.

A nivel mundial, el cáncer de pulmón constituye la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres, dando cuenta de 1.6 millones de defunciones el año 2012. El diagnóstico de nuevos casos ese mismo año se estimó en 1.8 millones (Ferlay y col., 2015). En Chile, 2848 personas fallecieron a causa de tumores de pulmón el año 2012, correspondiente a un 11% de las muertes por cáncer en nuestro país (Departamento de Estadística e Información en Salud (DEIS), 2014). El cáncer de pulmón constituye un tipo de neoplasia asociada a mal pronóstico, ya que cerca de la mitad de los pacientes que padecen esta patología no sobreviven más de un año desde la fecha de diagnóstico. Se divide en dos grandes subtipos, el de células pequeñas y células no pequeñas o NSCLC. De ellos, NSCLC constituye un 85% de los casos (Zappa y Mousa, 2016).

La expresión de CK2 se encuentra elevada en NSCLC, lo cual ha sido asociado a mal pronóstico (O-charoenrat y col., 2004). De forma consistente, la inhibición de CK2 en líneas celulares de NSCLC disminuye la migración e invasión celular (Chua y col., 2017). La inhibición de CK2 con el péptido sintético CIGB-300, genera un efecto sinérgico en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón,

particularmente con paclitaxel (taxol) y cisplatino, ejerciendo efectos citotóxicos y arresto del ciclo celular (Perera y col., 2014). De forma similar, la inhibición de CK2 con CX-4945, en combinación con el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), Erlotinib, disminuye sinérgicamente la viabilidad de células en cultivo y el volumen tumoral en modelos de *xenograft* de cáncer de pulmón (Bliesath y col., 2012). Estos estudios refuerzan el uso de inhibidores de CK2 como potencial tratamiento para cáncer de pulmón. Sumado a los resultados obtenidos durante este trabajo, se abre la posibilidad de que el fenotipo observado bajo la inhibición de CK2 en cáncer de pulmón, sea mediado en parte por la restitución de los niveles de SALL2.

Hasta ahora, se han realizado avances en cuanto al estudio de la terapia combinada con CX-4945. CK2 inhibe la reparación de ADN, lo cual ha sido utilizado para sustentar el uso de agentes quimioterapéuticos en combinación con el inhibidor CX-4945 (Chua y col., 2017). En este contexto, la farmacéutica Senhwa *Biosciences* se encuentra realizando ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de vías biliares o colangiocarcinoma avanzado, para el cual no existe tratamiento disponible. Este ensayo comprende la terapia combinada con CX-4945 y agentes que generan daño en el ADN, como gemcitabina (Gemzar®) y/o cisplatino (Platinol®) (clinicaltrials.gov # NCT02128282). Esta terapia ha sido eficientemente probada en líneas celulares de cáncer de ovario en cultivo y en modelos de *xenograft*, donde se observa un efecto sinérgico en la muerte celular por apoptosis y daño al ADN. El modelo

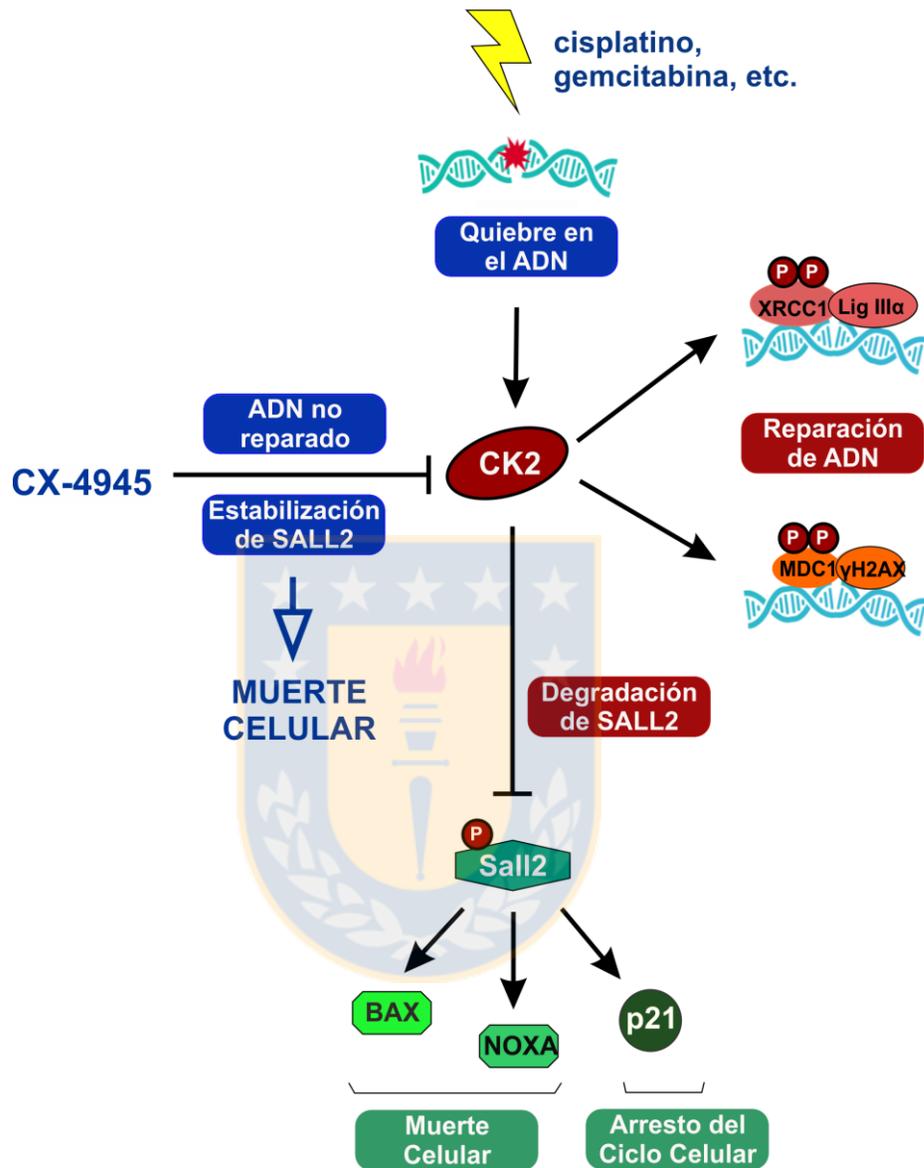
planteado (Figura 39) se basa en que CK2 promueve la reparación de ADN, a través de la fosforilación de las proteínas de reparación XRCC1 (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*) y MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*) (Siddiqui-Jain y col., 2012). La fosforilación de XRCC1 estabiliza la formación del complejo XRCC1-ADN ligasa III, y es requerida para una eficiente reparación de ADN (Parsons y col., 2010). MDC1, por otro lado, interacciona con la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX) y ambas proteínas reclutan a componentes de la maquinaria de reparación de ADN. Este reclutamiento se ve favorecido por la fosforilación de MDC1 mediada por CK2 (Kuo y Yang, 2008; Spycher y col., 2008). La exposición de las células tumorales a agentes como cisplatino o gemcitabina provoca quiebres en el ADN. La inhibición de CK2 impide que dichos quiebres sean reparados por XRCC1 y MDC1. La falta de reparación finalmente sería la causa de la muerte celular ((Siddiqui-Jain y col., 2012); Senhwa Biosciences).

Considerando que SALL2 regula a ciertos blancos transcripcionales pro-apoptóticos en respuesta a agentes genotóxicos como doxorubicina y etopósido (Escobar y col., 2015; Gu y col., 2011; Sung y col., 2012), y que SALL2 disminuye la viabilidad de células de cáncer de esófago radioresistentes en respuesta a cisplatino (Luo y col., 2017), es probable que la terapia combinada con CX-4945 y agentes que inducen daño en el ADN como gemcitabina y cisplatino, actúen de forma sinérgica sobre la función pro-apoptótica de SALL2 (Figura 39). Este efecto podría ser altamente relevante, ya que SALL2 comparte

blancos transcripcionales con otro supresor tumoral, p53 (Beckerman y Prives, 2010; Escobar y col., 2015; Farkas y col., 2013; Gu y col., 2011; Li y col., 2004). p53 se encuentra frecuentemente mutado en múltiples tipos de cáncer (Olivier y col., 2010), planteando la posibilidad de que el restablecimiento de la función de pro-apoptótica de SALL2 en terapia combinada, complemente funcionalmente la ausencia o inactivación de p53. Para que la terapia sea efectiva en este sentido, es necesario que el gen de *SALL2* se encuentre funcional y la proteína generada contenga los elementos necesarios para ser regulada por CK2. En este contexto, se han reportado mutaciones somáticas en cáncer, que implican la sustitución de residuos cercanos a los sitios de fosforilación dependientes de CK2 identificados en este trabajo (Figura 40, Anexo 18). Estas mutaciones incluyen las sustituciones p.E768Q (carcinoma de pulmón), p.D779V (carcinoma de colon), p.D781N (carcinoma de hígado) y p.E810K (neoplasia linfóide), e implican el cambio drástico de residuos ácidos ubicados hacia el extremo carboxilo terminal de los sitios de fosforilación dependientes de CK2 (S763, T778, S802 y S806). La sustitución de estos residuos ácidos por residuos sin carga, o incluso básicos, podrían alterar el reconocimiento de los sitios de fosforilación por CK2 y/o la funcionalidad de la secuencia PEST. La información sobre estas mutaciones se extrajo de las bases de datos COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Forbes y col., 2015) y cBioPortal for Cancer Genomics (Cerami y col., 2012; Gao y col., 2013) y se detallan en el Anexo 18. Si bien ninguna de las mutaciones identificadas ha sido detectada en

más de un 1% de las muestras analizadas, es necesario considerar este aspecto al momento de evaluar la respuesta celular bajo el tratamiento con inhibidores de CK2.

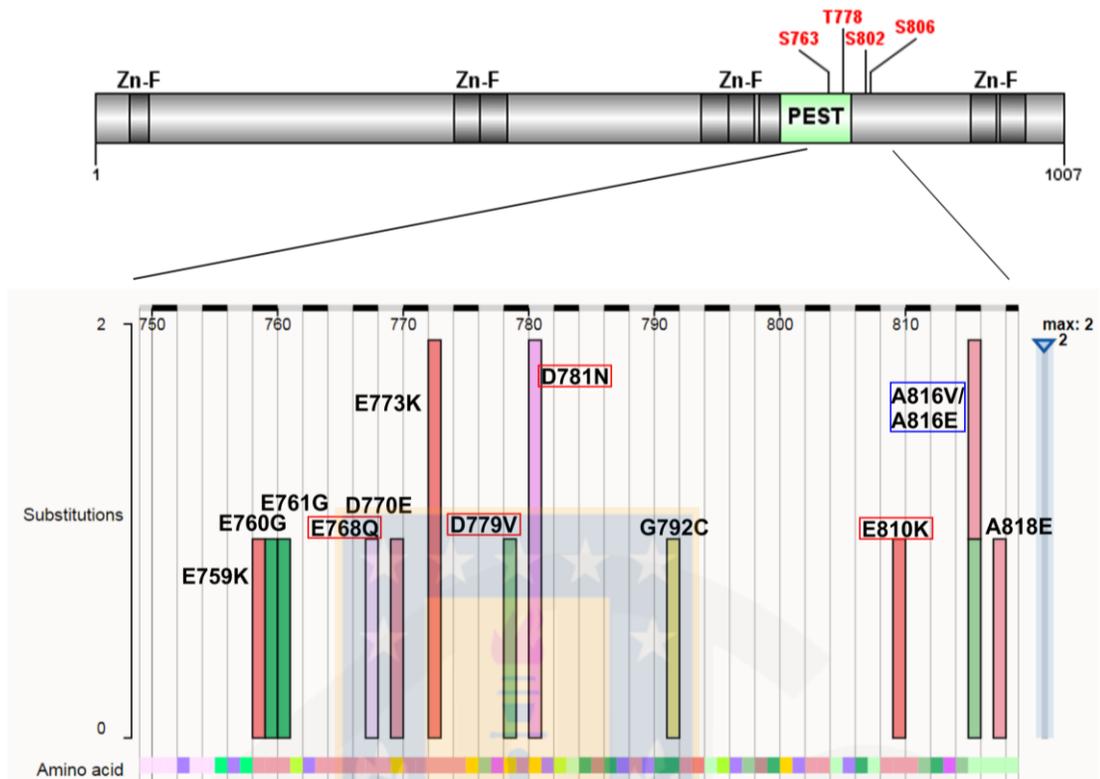




**Figura 39.- Modelo de acción de la terapia combinada con CX-4945 y Cisplatino o Gemcitabina.** Los efectos de las drogas cisplatino, gemcitabina y CX-4945 se indican en recuadros o letras azules. El efecto de CK2 se muestra en recuadros rojos, y el de SALL2, en recuadros verdes. CK2 fosforila a XRCC1 y MDC1, promoviendo la reparación del ADN. La fosforilación de XRCC1 estabiliza la formación del complejo XRCC1-ADN ligasa IIIα (Parsons y *col.*, 2010). MDC1 interacciona con la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ H2AX), para reclutar a la maquinaria de reparación de ADN, y este proceso es favorecido por la fosforilación de MDC1

por CK2 (Kuo y Yang, 2008; Spycher y *col.*, 2008). CK2 también promueve la degradación de SALL2, un factor de transcripción importante para la respuesta apoptótica ante estímulos genotóxicos (Escobar y *col.*, 2015; Gu y *col.*, 2011). Cisplatino o gemcitabina provocan quiebres en el ADN, y la inhibición de CK2 con CX-4945 impide que dichos quiebres sean reparados por XRCC1 y MDC1 (Siddiqui-Jain y *col.*, 2012). Paralelamente, la inhibición de CK2 reestablece los niveles de SALL2, lo cual promovería el arresto del ciclo celular a través de p21, y la muerte celular a través de BAX y NOXA. En conjunto, esta terapia combinada promueve la muerte celular. Fuente: modificado desde Senhwa Biosciences (<http://www.senhwabiosciences.com>).





**Figura 40.- Residuos cercanos a sitios de fosforilación dependiente de CK2 pueden encontrarse mutados en algunos tipos de cáncer.** En la parte superior se observa una representación esquemática de la proteína SALL2 humana. Los motivos de dedos de Zinc (Zn-F) se representan en gris oscuro. En verde se destaca la potencial secuencia de degradación PEST, adyacente al dominio de unión a ADN. Los sitios de fosforilación dependiente de CK2 (S763, T778, S802, S806) se indican en rojo. En la parte inferior se muestran sustituciones aminoacídicas localizadas entre los residuos 750-820 de SALL2, causadas por mutaciones somáticas en el gen de SALL2 en distintos tipos de cáncer. En recuadros rojos se destacan las mutaciones que tienen lugar hacia el extremo carboxilo terminal de los sitios de fosforilación dependiente de CK2. En recuadro azul se destacan mutaciones cercanas al fosforesiduo T814. Fuente: propia.

En conclusión, los resultados expuestos en esta tesis describen un nuevo mecanismo de regulación post-traducciona l de SALL2, en el cual la fosforilación mediada por CK2 impacta de forma negativa sobre la estabilidad del factor de transcripción. Al contrario de lo que se ha descrito entre PML y CK2 (Scaglioni y col., 2006), no existe una correlación inversa entre los niveles de expresión de los genes *SALL2* y *CSNK2A1* (CK2 $\alpha$ ) en cáncer. Lo anterior no es relevante, ya que el mecanismo descrito implica la estabilización proteica y no la regulación a nivel transcripcional. Un aspecto interesante es que el mecanismo descrito podría ser conservado, ya que el parólogo SALL3 también es fosforilado *in vitro* por CK2, y el ortólogo Salm interactúa con CK2 en *D. melanogaster* (Tarrant y col., 2012; Trott y col., 2001). La región involucrada en este último caso no se encuentra conservada en SALL2. Del mismo modo, la secuencia PEST de SALL2 no se encuentra presente en otros miembros de la familia. Este también es el caso de I $\kappa$ B $\alpha$  y su ortólogo en *D. melanogaster*, Cactus, en donde la regulación mediada por CK2 ocurre en regiones no conservadas entre ambas proteínas, pero el efecto de la fosforilación es similar en ambos casos (Lin y col., 1996; Liu y col., 1997).

Con todo lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo validan a SALL2 como un nuevo sustrato de CK2 *in vitro*, y demuestran que la actividad de CK2 regula de forma negativa la estabilidad de SALL2 en células en cultivo. En concordancia con lo anteriormente mencionado, la inhibición farmacológica de CK2 reestablece los niveles de SALL2 en la línea celular de cáncer de

pulmón H1299. Este trabajo constituye el primer estudio que describe un mecanismo de regulación de SALL2 mediado por fosforilación, y plantea un nuevo modelo que conlleva a la reducción de los niveles SALL2 en células de cáncer. Si bien no se evaluó el impacto proliferativo o pro-apoptótico de la restitución de SALL2 en presencia de CX-4945, este punto se considerará para estudios posteriores.



## 9. CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados expuestos, se desprenden las siguientes conclusiones:

- SALL2 es un sustrato de CK2 *in vitro*.
- SALL2 y CK2 $\alpha$  interactúan en células HEK 293 y HEK 293T. Ambas proteínas se localizan a nivel nuclear.
- La actividad de CK2 promueve la ubiquitinación de SALL2, disminuyendo su estabilidad.
- La fosforilación de los residuos S763, T778, S802 y S806 es dependiente de la actividad de CK2. La fosforilación del residuo S763 no es detectada en condiciones de inhibición de CK2 por CX-4945.
- La inhibición de CK2 por CX-4945 reestablece los niveles de SALL2 en células de cáncer de pulmón H1299.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abujiang, P., Mori, T.J., Takahashi, T., Tanaka, F., Kasyu, I., Hitomi, S., and Hiai, H. (1998). Loss of heterozygosity (LOH) at 17q and 14q in human lung cancers. *Oncogene* 17, 3029–3033.

Adams, J.A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical Reviews* 101, 2271–2290.

Alagaratnam, S., Lind, G.E., Kraggerud, S.M., Lothe, R.A., and Skotheim, R.I. (2011). The testicular germ cell tumour transcriptome. *International Journal of Andrology* 34, e133–e150; discussion e150–e151.

Allen, S.J., and Dawbarn, D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science* 110, 175–191.

Allende, J.E., and Allende, C.C. (1995). Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 313–323.

Al-Mulla, F., AlFadhli, S., Al-Hakim, A.H., Going, J.J., and Bitar, M.S. (2006). Metastatic recurrence of early-stage colorectal cancer is linked to loss of heterozygosity on chromosomes 4 and 14q. *Journal of Clinical Pathology* 59, 624–630.

Aloe, L., Rocco, M.L., Bianchi, P., and Manni, L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine* 10, 239.

Amanchy, R., Periaswamy, B., Mathivanan, S., Reddy, R., Tattikota, S.G., and Pandey, A. (2007). A curated compendium of phosphorylation motifs. *Nature Biotechnology* 25, 285–286.

Ampofo, E., Kietzmann, T., Zimmer, A., Jakupovic, M., Montenarh, M., and Götz, C. (2010). Phosphorylation of the von Hippel-Lindau protein (VHL) by protein kinase CK2 reduces its protein stability and affects p53 and HIF-1alpha mediated transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 1729–1735.

Andréasson, U., Edén, P., Peterson, C., Högerkorp, C.-M., Jerkeman, M., Andersen, N., Berglund, M., Sundström, C., Rosenquist, R., Borrebaeck, C.A.K.,

y col. (2010). Identification of uniquely expressed transcription factors in highly purified B-cell lymphoma samples. *American Journal of Hematology* 85, 418–425.

Bandera, C.A., Takahashi, H., Behbakht, K., Liu, P.C., LiVolsi, V.A., Benjamin, I., Morgan, M.A., King, S.A., Rubin, S.C., and Boyd, J. (1997). Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 57, 513–515.

Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P.K., Dwivedi, S.K.D., Ding, K., Moxley, K.M., Mukherjee, P., and Bhattacharya, R. (2017). BMI1, a new target of CK2 $\alpha$ . *Molecular Cancer* 16, 56.

Barroga, C.F., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., and Verma, I.M. (1995). Constitutive phosphorylation of I kappa B alpha by casein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7637–7641.

Basson, M., and Horvitz, H.R. (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene *sem-4* controls neuronal and mesodermal cell development and encodes a zinc finger protein. *Genes Dev* 10, 1953–1965.

Baulch, J.E., Geidzinski, E., Tran, K.K., Yu, L., Zhou, Y.H., and Limoli, C.L. (2015). Irradiation of primary human gliomas triggers dynamic and aggressive survival responses involving microvesicle signaling. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 57, 405–415.

Beckerman, R., and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000935.

Beder, L.B., Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Gunduz, E., Ito, S., Sakai, A., Nagai, N., Nishizaki, K., and Shimizu, K. (2003). Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 83, 99–105.

Van den Berg, D.L.C., Snoek, T., Mullin, N.P., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., and Poot, R. a (2010). An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 369–381.

Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R.A.M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 518–528.

Bhat, K.P., and Greer, S.F. (2011). Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 150–155.

Björkqvist, A.M., Wolf, M., Nordling, S., Tammilehto, L., Knuutila, A., Kere, J., Mattson, K., and Knuutila, S. (1999). Deletions at 14q in malignant mesothelioma detected by microsatellite marker analysis. *British Journal of Cancer* 81, 1111–1115.

Bliesath, J., Huser, N., Omori, M., Bunag, D., Proffitt, C., Streiner, N., Ho, C., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S.E., Lim, J.K.C., y col. (2012). Combined inhibition of EGFR and CK2 augments the attenuation of PI3K-Akt-mTOR signaling and the killing of cancer cells. *Cancer Letters* 322, 113–118.

Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *PROTEOMICS* 4, 1633–1649.

Böhm, J., Buck, A., Borozdin, W., Mannan, A.U., Matysiak-Scholze, U., Adham, I., Schulz-Schaeffer, W., Floss, T., Wurst, W., Kohlhase, J., y col. (2008). Sall1, sall2, and sall4 are required for neural tube closure in mice. *The American Journal of Pathology* 173, 1455–1463.

Borozdin, W., Wright, M.J., Hennekam, R.C., Hannibal, M.C., Crow, Y.J., Neumann, T.E., and Kohlhase, J. (2004). Novel mutations in the gene SALL4 provide further evidence for acro-renal-ocular and Okhiro syndromes being allelic entities, and extend the phenotypic spectrum. *J Med Genet* 41, e102.

Boyer, L., Lee, T.I., Cole, M., Johnstone, S., Levine, S., Zucker, J., Guenther, M., Kumar, R., Murray, H., Jenner, R., y col. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–956.

Bradford, 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, 248–254.

Brameier, M., Krings, A., and MacCallum, R.M. (2007). NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23, 1159–1160.

Brown, V.M., Ossadtchi, A., Khan, A.H., Yee, S., Lacan, G., Melega, W.P., Cherry, S.R., Leahy, R.M., and Smith, D.J. (2002). Multiplex Three-Dimensional Brain Gene Expression Mapping in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Genome Research* 12, 868–884.

Burkhardt, J.M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of Proteomics* 75, 1454–1462.

Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G.F., and Donzelli, M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23, 2050–2056.

Bustamante-Marín, X., Garness, J.A., and Capel, B. (2013). Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *The International Journal of Developmental Biology* 57, 201–210.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *ELECTROPHORESIS* 25, 1327–1333.

Cantera, R., Lüer, K., Rusten, T.E., Barrio, R., Kafatos, F.C., and Technau, G.M. (2002). Mutations in spalt cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)* 129, 5577–5586.

Cavin, L.G., Romieu-Mourez, R., Panta, G.R., Sun, J., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., Sonenshein, G.E., and Arsura, M. (2003). Inhibition of CK2 activity by TGF-beta1 promotes I $\kappa$ B-alpha protein stabilization and apoptosis of immortalized hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 38, 1540–1551.

De Celis, J.F., and Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *The International Journal of Developmental Biology* 53, 1385–1398.

De Celis, J.F., Barrio, R., and Kafatos, F.C. (1996). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* 381, 421–424.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., y col. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery* 2, 401–404.

Chai, L. (2011). The role of HSAL (SALL) genes in proliferation and differentiation in normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Transfusion* 51, 87S – 93S.

Chan, I.H., and Privalsky, M.L. (2009). Isoform-Specific Transcriptional Activity of Overlapping Target Genes that Respond to Thyroid Hormone Receptors  $\alpha 1$  and  $\beta 1$ . *Molecular Endocrinology* 23, 1758–1775.

Chang, W.Y., Cairns, P., Schoenberg, M.P., Polascik, T.J., and Sidransky, D. (1995). Novel Suppressor Loci on Chromosome 14q in Primary Bladder Cancer. *Cancer Research* 55, 3246–3249.

Chatterjee, R., Hoffman, M., Cliften, P., Seshan, S., Liapis, H., and 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, e76360.

Chédin, F. (2011). The DNMT3 Family of Mammalian De Novo DNA Methyltransferases. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 255–285.

Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., and Dou, Q.P. (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current Cancer Drug Targets* 11, 239–253.

Christensen, G.L., Kelstrup, C.D., Lyngsø, C., Sarwar, U., Bøgebo, R., Sheikh, S.P., Gammeltoft, S., Olsen, J. V, and Hansen, J.L. (2010). Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 9, 1540–1553.

Chua, M., Ortega, C., Sheikh, A., Lee, M., Abdul-Rassoul, H., Hartshorn, K., and Dominguez, I. (2017). CK2 in Cancer: Cellular and Biochemical Mechanisms and Potential Therapeutic Target. *Pharmaceuticals* 10, 18.

Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3260–3265.

Copp, A.J., Greene, N.D.E., and Murdoch, J.N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature Reviews. Genetics* 4, 784–793.

Counts, S.E., and Mufson, E.J. (2005). The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64, 263–272.

La Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS* 17, 527–536.

Di Cristofori, A., Ferrero, S., Bertolini, I., Gaudio, G., Russo, M.V., Berno, V., Vanini, M., Locatelli, M., Zavanone, M., Rampini, P., y col. (2015). The vacuolar H<sup>+</sup> ATPase is a novel therapeutic target for glioblastoma. *Oncotarget* 6, 17514–17531.

Departamento de Estadística e Información en Salud (DEIS) (2014). *Indicadores Básicos de Salud Chile 2014*. Ministerio de Salud CHILE.

Deplus, R., Blanchon, L., Rajavelu, A., Boukaba, A., Defrance, M., Luciani, J., Rothé, F., Dedeurwaerder, S., Denis, H., Brinkman, A.B., y col. (2014). Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a. *Cell Reports* 8, 743–753.

Desai, C., Garriga, G., McIntire, S.L., and Horvitz, H.R. (1988). A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons. *Nature* 336, 638–646.

Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (2011). Use of Phospho-Site Substitutions to Analyze the Biological Relevance of Phosphorylation Events in Regulatory Networks. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), pp. 93–138.

Dolan, K., Garde, J., Gosney, J., Sissons, M., Wright, T., Kingsnorth, A.N., Walker, S.J., Sutton, R., Meltzer, S.J., and Field, J.K. (1998). Allelotype analysis of oesophageal adenocarcinoma: loss of heterozygosity occurs at multiple sites. *British Journal of Cancer* 78, 950–957.

Domingos, P.M., Mlodzik, M., Mendes, C.S., Brown, S., Steller, H., and Mollereau, B. (2004). Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 131, 5695–5702.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221.

Dosztányi, Z., Csizmók, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins. *Journal of Molecular Biology* 347, 827–839.

Duncan, J.S., and Litchfield, D.W. (2008). Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784, 33–47.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.

Elstob, P.R., Brodu, V., and Gould, A.P. (2001). spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the *Drosophila* EGF receptor. *Development (Cambridge, England)* 128, 723–732.

Engelen, E., Akinci, U., Bryne, J.C., Hou, J., Gontan, C., Moen, M., Szumska, D., Kockx, C., van Ijcken, W., Dekkers, D.H.W., y col. (2011). Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nature Genetics* 43, 607–611.

Escobar, D., Hepp, M.I., Farkas, C., Campos, T., Sodir, N.M., Morales, M., Álvarez, C.I., Swigart, L., Evan, G.I., Gutiérrez, J.L., y col. (2015). Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death and Disease* 6, e1816.

Escobar, D., Farkas, C., Hermosilla, V.E., Gutierrez, J.L., Castro, A.F., Hepp, M.I., and Pincheira, R. (2017). TSA induces SP1-dependent Sall2 expression in cancer cells.

Estilo, C.L., O-charoenrat, P., Talbot, S., Socci, N.D., Carlson, D.L., Ghossein, R., Williams, T., Yonekawa, Y., Ramanathan, Y., Boyle, J.O., y col. (2009). Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer* 9, 11.

Farkas, C., Martins, C.P., Escobar, D., Hepp, M.I., Donner, D.B., Castro, A.F., Evan, G., Gutiérrez, J.L., Warren, R., and Pincheira, R. (2013). Wild Type p53 Transcriptionally Represses the SALL2 Transcription Factor under Genotoxic Stress. *PLoS ONE* 8, e73817.

Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359–E386.

Filtz, T.M., Vogel, W.K., and Leid, M. (2014). Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends in Pharmacological Sciences* 35, 76–85.

Finger, J.H., Smith, C.M., Hayamizu, T.F., McCright, I.J., Xu, J., Law, M., Shaw, D.R., Baldarelli, R.M., Beal, J.S., Blodgett, O., y col. (2017). The mouse Gene Expression Database (GXD): 2017 update. *Nucleic Acids Research* 45, D730–D736.

Forbes, S.A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S., y col. (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research* 43, D805–D811.

Franz-Wachtel, M., Eisler, S.A., Krug, K., Wahl, S., Carpy, A., Nordheim, A., Pfizenmaier, K., Hausser, A., and Macek, B. (2012). Global Detection of Protein Kinase D-dependent Phosphorylation Events in Nocodazole-treated Human Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 11, 160–170.

Freund, R., Bauer, P.H., Crissman, H.A., Bradbury, E.M., and Benjamin, T.L. (1994). Host range and cell cycle activation properties of polyomavirus large T-antigen mutants defective in pRB binding. *Journal of Virology* 68, 7227–7234.

Fujino, T., Risinger, J.I., Collins, N.K., Liu, F.S., Nishii, H., Takahashi, H., Westphal, E.M., Barrett, J.C., Sasaki, H., and Kohler, M.F. (1994). Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Research* 54, 4294–4298.

Fukuda, S., Hoggatt, J., Singh, P., Abe, M., Speth, J.M., Hu, P., Conway, E.M., Nucifora, G., Yamaguchi, S., and Pelus, L.M. (2015). Survivin modulates genes with divergent molecular functions and regulates proliferation of hematopoietic stem cells through Evi-1.

Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811.

Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511–517.

Gandin, V., Masvidal, L., Cargnello, M., Gyenis, L., McLaughlan, S., Cai, Y., Tenkerian, C., Morita, M., Balanathan, P., Jean-Jean, O., y col. (2016). mTORC1 and CK2 coordinate ternary and eIF4F complex assembly. *Nature Communications* 7, 11127.

Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., y col. (2013). Integrative Analysis of

Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Science Signaling* 6, pl1–pl1.

Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4510–4515.

Geng, F., Wenzel, S., and Tansey, W.P. (2012). Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annual Review of Biochemistry* 81, 177–201.

Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., Raya, A., Boué, S., Barrero, M.J., Corbella, B.A., y col. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood Using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 5, 353–357.

Gómez-del Arco, P., Maki, K., and Georgopoulos, K. (2004). Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2797–2807.

Gowda, C., Soliman, M., Kapadia, M., Ding, Y., Payne, K., and Dovat, S. (2017). Casein Kinase II (CK2), Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) and Ikaros mediated regulation of leukemia. *Advances in Biological Regulation*.

Goyama, S., Yamamoto, G., Shimabe, M., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., and Kurokawa, M. (2008). Evi-1 Is a Critical Regulator for Hematopoietic Stem Cells and Transformed Leukemic Cells. *Cell Stem Cell* 3, 207–220.

Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467.

Grant, K., Hanna-Rose, W., and Han, M. (2000). sem-4 Promotes Vulval Cell-Fate Determination in *Caenorhabditis elegans* through Regulation of lin-39 Hox. *Developmental Biology* 224, 496–506.

Gu, H.C., Li, D.W., Sung, C.K., Yim, H., Troke, P., and Benjamin, T. (2011). DNA-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor p150(Sal2). *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 276–283.

Gurel, Z., Ronni, T., Ho, S., Kuchar, J., Payne, K.J., Turk, C.W., and Dovat, S. (2008). Recruitment of Ikaros to pericentromeric heterochromatin is regulated by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 8291–8300.

Gyenis, L., Duncan, J.S., Turowec, J.P., Bretner, M., and Litchfield, D.W. (2011). Unbiased functional proteomics strategy for protein kinase inhibitor validation and identification of bona fide protein kinase substrates: application to identification of EEF1D as a substrate for CK2. *Journal of Proteome Research* 10, 4887–4901.

Han, X., He, L., Xin, L., Shan, B., and Ma, B. (2011). PeaksPTM: Mass Spectrometry-Based Identification of Peptides with Unspecified Modifications. *Journal of Proteome Research* 10, 2930–2936.

Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 576–596.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.

Haynes, K.A., and Silver, P.A. (2011). Synthetic Reversal of Epigenetic Silencing. *Journal of Biological Chemistry* 286, 27176–27182.

Hermosilla, V.E., Hepp, M.I., Escobar, D., Farkas, C., Riffo, E.N., Castro, A.F., and Pincheira, R. (2017a). Developmental SALL2 transcription factor: a new player in cancer. *Carcinogenesis*.

Hermosilla, V.E., Salgado, G., Riffo, E.N., Escobar, D., Hepp, M.I., Farkas, C., Galindo, M., Morin, V., García-Robles, M.A., Castro, A.F., y col. (2017b). SALL2 represses cyclins D1 and E1 expression, and restrains G1/S cell cycle transition and cancer-related phenotypes. *Molecular Oncology*.

Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27, 6462–6472.

Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews. Immunology* 6, 644–658.

Van Hoof, D., Muñoz, J., Braam, S.R., Pinkse, M.W.H., Linding, R., Heck, A.J.R., Mummery, C.L., and Krijgsveld, J. (2009). Phosphorylation Dynamics during Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5, 214–226.

Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research* 43, D512–D520.

Huang, C.-H., Su, M.-G., Kao, H.-J., Jhong, J.-H., Weng, S.-L., and Lee, T.-Y. (2016). UbiSite: incorporating two-layered machine learning method with substrate motifs to predict ubiquitin-conjugation site on lysines. *BMC Systems Biology* 10, S6.

Huang, E., Cheng, S.H., Dressman, H., Pittman, J., Tsou, M.H., Horng, C.F., Bild, A., Iversen, E.S., Liao, M., Chen, C.M., y col. (2003). Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 361, 1590–1596.

Huang, H.-D., Lee, T.-Y., Tzeng, S.-W., and Horng, J.-T. (2005). KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research* 33, W226–W229.

Ibáñez, C.F., and Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in Neurosciences* 35, 431–440.

Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149–158.

Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences : CABIOS* 8, 275–282.

Jürgens, G. (1988). Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves spalt, a novel homeotic gene. *The EMBO Journal* 7, 189–196.

Kato, T., Delhase, M., Hoffmann, A., and Karin, M. (2003). CK2 Is a C-Terminal I $\kappa$ B Kinase Responsible for NF- $\kappa$ B Activation during the UV Response. *Molecular Cell* 12, 829–839.

Kelberman, D., Islam, L., Lakowski, J., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Patel, A., Stupka, E., Buck, A., Wolf, S., y col. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Human Molecular Genetics* 23, 2511–2526.

Kiefer, S.M., Ohlemiller, K.K., Yang, J., McDill, B.W., Kohlhase, J., and Rauchman, M. (2003). Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects. *Hum Mol Genet* 12, 2221–2227.

Kohlhase, J. (2000). SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome and related disorders. *Human Mutation* 16, 460–466.

Kohlhase, J., Schuh, R., Dowe, G., Kuhnlein, R.P., Jackle, H., Schroeder, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H.A., Kohler, A., Muller, U., y col. (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the *Drosophila* gene spalt. *Genomics* 38, 291–298.

Kohlhase, J., Hausmann, S., Stojmenovic, G., Dixkens, C., Bink, K., Schulz-Schaeffer, W., Altmann, M., and Engel, W. (1999). SALL3, a new member of the human spalt-like gene family, maps to 18q23. *Genomics* 62, 216–222.

Kohlhase, J., Altmann, M., Archangelo, L., Dixkens, C., and Engel, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2. *Mamm Genome* 11, 64–68.

Kojima, T., Asano, S., and Takahashi, N. (2013). Teratogenic Factors Affect Transcription Factor Expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 1035–1041.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry* 81, 203–229.

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* 284, 478–485.

Kuenzel, E.A., Mulligan, J.A., Sommercorn, J., and Krebs, E.G. (1987). Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 9136–9140.

Kuhnlein, R.P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, a, Wagner-Bernholz, J.F., Gehring, W.J., Jackle, H., Schuh, R., Kuhnlein, R.P., y col. (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, 168–179.

Kultima, K., Jergil, M., Salter, H., Gustafson, A.L., Dencker, L., and Stigson, M. (2010). Early transcriptional responses in mouse embryos as a basis for selection of molecular markers predictive of valproic acid teratogenicity. *Reprod Toxicol* 11, 64–68.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.

Kuo, L.J., and Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Athens, Greece)* 22, 305–309.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lauberth, S.M., and Rauchman, M. (2006). A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol Chem* 281, 23922–23931.

Lauberth, S.M., Bilyeu, A.C., Firulli, B.A., Kroll, K.L., and Rauchman, M. (2007). A phosphomimetic mutation in the Sall1 repression motif disrupts recruitment of the nucleosome remodeling and deacetylase complex and repression of Gbx2. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 34858–34868.

Lee, D.J., Koch, W.M., Yoo, G., Lango, M., Reed, A., Califano, J., Brennan, J.A., Westra, W.H., Zahurak, Z., and Sidransky, D. (1997). Impact of chromosome 14q loss on survival in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 3, 501–505.

Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176.

Letovsky, J., and Dynan, W.S. (1989). Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Research* 17, 2639–2653.

Li, L., and Davie, J.R. (2010). The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 192, 275–283.

Li, C.-M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. a, Wei, M., Thaker, H.M., Friedman, R., Klein, U., and Tycko, B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *The American Journal of Pathology* 160, 2181–2190.

Li, D., Dower, K., Ma, Y., Tian, Y., and 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, 14619–14624.

Li, D., Tian, Y., Ma, Y., and Benjamin, T. (2004). p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Molecular and Cellular Biology* 24, 3885–3893.

Li, X., Wang, W., Wang, J., Malovannaya, A., Xi, Y., Li, W., Guerra, R., Hawke, D.H., Qin, J., and Chen, J. (2015). Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Molecular Systems Biology* 11, 775–775.

Lim, K.L., Chew, K.C.M., Tan, J.M.M., Wang, C., Chung, K.K.K., Zhang, Y., Tanaka, Y., Smith, W., Engelender, S., Ross, C.A., y col. (2005). Parkin Mediates Nonclassical, Proteasomal-Independent Ubiquitination of Synphilin-1: Implications for Lewy Body Formation. *Journal of Neuroscience* 25, 2002–2009.

Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., and Hiscott, J. (1996). Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Molecular and Cellular Biology* 16, 1401–1409.

Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Cicirelli, M.F., Harrylock, M., Ericsson, L.H., Piening, C.J., and Krebs, E.G. (1991). Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 20380–20389.

Liu, A.K.L., Chang, R.C.-C., Pearce, R.K.B., and Gentleman, S.M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica* 129, 527–540.

Liu, G.-H., Qu, J., Suzuki, K., Nivet, E., Li, M., Montserrat, N., Yi, F., Xu, X., Ruiz, S., Zhang, W., y col. (2012). Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* 491, 0–4.

Liu, H., Adler, A.S., Segal, E., and Chang, H.Y. (2007). A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. *PLoS Genetics* 3, 0996–1008.

Liu, L.Y.D., Chang, L.Y., Kuo, W.H., Hwa, H.L., Chang, K.J., and Hsieh, F.J. (2014). A supervised network analysis on gene expression profiles of breast tumors predicts a 41-gene prognostic signature of the transcription factor MYB across molecular subtypes. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2014, 813067.

Liu, Z.P., Galindo, R.L., and Wasserman, S.A. (1997). A role for CKII phosphorylation of the cactus PEST domain in dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* 11, 3413–3422.

Llorens, F., Roher, N., Miró, F.A., Sarno, S., Ruiz, F.X., Meggio, F., Plana, M., Pinna, L.A., and Itarte, E. (2003). Eukaryotic translation-initiation factor eIF2 $\beta$  binds to protein kinase CK2: effects on CK2 $\alpha$  activity. *The Biochemical Journal* 375, 623–631.

Llorens, F., Duarri, A., Sarró, E., Roher, N., Plana, M., and Itarte, E. (2006). The N-terminal domain of the human eIF2 $\beta$  subunit and the CK2 phosphorylation sites are required for its function. *Biochemical Journal* 394, 227–236.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., and Scott, M.P. (2013). *Molecular Cell Biology* (7<sup>o</sup> ed.). New York, U.S.: W. H. Freeman and Company.

Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., y col. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 38, 431–440.

Loizou, J.I., El-Khamisy, S.F., Zlatanou, A., Moore, D.J., Chan, D.W., Qin, J., Sarno, S., Meggio, F., Pinna, L.A., and Caldecott, K.W. (2004). The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell* 117, 17–28.

Lolkema, M.P., Gervais, M.L., Snijckers, C.M., Hill, R.P., Giles, R.H., Voest, E.E., and Ohh, M. (2005). Tumor Suppression by the von Hippel-Lindau Protein Requires Phosphorylation of the Acidic Domain. *Journal of Biological Chemistry* 280, 22205–22211.

Longo, I., Porcedda, P., Mari, F., Giachino, D., Meloni, I., Deplano, C., Brusco, A., Bosio, M., Massella, L., Lavoratti, G., y col. (2002). COL4A3/COL4A4 mutations: From familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney International* 61, 1947–1956.

Luo, H., Chan, D.W., Yang, T., Rodriguez, M., Chen, B.P.-C., Leng, M., Mu, J.-J., Chen, D., Songyang, Z., Wang, Y., y col. (2004). A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8356–8365.

Luo, J., Wang, W., Tang, Y., Zhou, D., Gao, Y., Zhang, Q., Zhou, X., Zhu, H., Xing, L., and Yu, J. (2017). mRNA and methylation profiling of radioresistant

esophageal cancer cells: the involvement of Sall2 in acquired aggressive phenotypes. *Journal of Cancer* 8, 646–656.

Ma, Y., Li, D., Chai, L., Luciani, A.M., Ford, D., Morgan, J., and 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. *Journal of Biological Chemistry* 276, 48223–48230.

Malanchi, I., Caldeira, S., Krützfeldt, M., Giarre, M., Alunni-Fabbroni, M., and Tommasino, M. (2002). Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. *Oncogene* 21, 5665–5672.

Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.-I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V., and Han, D.K. (2009). Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* 2, ra46.

McDonel, P., Costello, I., and Hendrich, B. (2009). Keeping things quiet: Roles of NuRD and Sin3 co-repressor complexes during mammalian development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 108–116.

McMahon, S.B. (2014). MYC and the control of apoptosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4, a014407.

Mertins, P., Qiao, J.W., Patel, J., Udeshi, N.D., Clauser, K.R., Mani, D.R., Burgess, M.W., Gillette, M.A., Jaffe, J.D., and Carr, S.A. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature Methods* 10, 634–637.

Mesulam, M.-M. (2013). Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. *The Journal of Comparative Neurology* 521, 4124–4144.

Von Mikecz, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell. Sci.* 119, 1977–1984.

Miller, S.J., Lou, D.Y., Seldin, D.C., Lane, W.S., and Neel, B.G. (2002). Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Letters* 528, 145–153.

Mollereau, B., Dominguez, M., Webel, R., Colley, N.J., Keung, B., de Celis, J.F., and Desplan, C. (2001). Two-step process for photoreceptor formation in *Drosophila*. *Nature* 412, 911–913.

Morales, M. (2013). Determinación del rol de SALL2 en la proliferación y sobrevivencia celular frente a injuria genotóxica. Tesis de pregrado, Bioingeniería, Universidad de Concepción, Chile.

Nastainczyk, W., Issinger, O.-G., and Guerra, B. (2003). Epitope Analysis of the MAb 1AD9 Antibody Detection Site in Human Protein Kinase CK2  $\alpha$ -Subunit. *Hybridoma and Hybridomics* 22, 87–90.

Netzer, C., Rieger, L., Brero, A., Zhang, C.D., Hinzke, M., Kohlhase, J., and Bohlander, S.K. (2001). SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Hum Mol Genet* 10, 3017–3024.

Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N., and Moses, A.M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10, 202.

Nie, J., Stewart, R., Zhang, H., Thomson, J. a, Ruan, F., Cui, X., and Wei, H. (2011). TF-Cluster: a pipeline for identifying functionally coordinated transcription factors via network decomposition of the shared coexpression connectivity matrix (SCCM). *BMC Systems Biology* 5, 53.

Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I., and Issinger, O.G. (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *The EMBO Journal* 20, 5320–5331.

Nielsen, T.O., Hsu, F.D., O'Connell, J.X., Gilks, C.B., Sorensen, P.H.B., Linn, S., West, R.B., Liu, C.L., Botstein, D., Brown, P.O., y col. (2003). Tissue microarray validation of epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *The American Journal of Pathology* 163, 1449–1456.

Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Sakaguchi, H., Akutsu, H., and Umezawa, A. (2011). DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genetics* 7, e1002085.

O-charoenrat, P., Rusch, V., Talbot, S.G., Sarkaria, I., Viale, A., Socci, N., Ngai, I., Rao, P., and Singh, B. (2004). Casein Kinase II Alpha Subunit and C1-Inhibitor Are Independent Predictors of Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clinical Cancer Research* 10, 5792–5803.

Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001008.

Onai, T., Sasai, N., Matsui, M., and Sasai, Y. (2004). *Xenopus* XsaIF: Anterior neuroectodermal specification by attenuating cellular responsiveness to Wnt signaling. *Developmental Cell* 7, 95–106.

Osborne, R.J., and Leech, V. (1994). Polymerase chain reaction allelotyping of human ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 69, 429–438.

Pagano, M.A., Bain, J., Kazimierczuk, Z., Sarno, S., Ruzzene, M., Di Maira, G., Elliott, M., Orzeszko, A., Cozza, G., Meggio, F., y col. (2008). The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochemical Journal* 415, 353–365.

Paradisi, I., and Arias, S. (2007). IVIC syndrome is caused by a c.2607delA mutation in the SALL4 locus. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A, 326–332.

Parker, C.E., Mocanu, V., Mocanu, M., Dicheva, N., and Warren, M.R. (2010). *Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications* (CRC Press/Taylor & Francis).

Parrish, M., Ott, T., Lance-Jones, C., Schuetz, G., Schwaeger-Nickolenko, A., and Monaghan, A.P. (2004). Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality. *Mol Cell Biol* 24, 7102–7112.

Parroche, P., Touka, M., Mansour, M., Bouvard, V., Thépot, A., Accardi, R., Carreira, C., Roblot, G.G., Sylla, B.S., Hasan, U., y col. (2011). Human papillomavirus type 16 E6 inhibits p21(WAF1) transcription independently of p53 by inactivating p150(Sa2). *Virology* 417, 443–448.

Parsons, J.L., Dianova, I.I., Finch, D., Tait, P.S., Ström, C.E., Helleday, T., and Dianov, G.L. (2010). XRCC1 phosphorylation by CK2 is required for its stability and efficient DNA repair. *DNA Repair* 9, 835–841.

Pastori, V., Sangalli, E., Coccetti, P., Pozzi, C., Nonnis, S., Tedeschi, G., and Fusi, P. (2010). CK2 and GSK3 phosphorylation on S29 controls wild-type ATXN3 nuclear uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 583–592.

Peet, G.W., and Li, J. (1999). I $\kappa$ B kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 32655–32661.

Pehlivan, D., Gunduz, E., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Beder, L.B., Cengiz, B., Rivera, R.S., Fukushima, K., Palanduz, S., Ozturk, S., y col. (2008). Loss of heterozygosity at chromosome 14q is associated with poor prognosis in head

and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134, 1267–1276.

Penner, C.G., Wang, Z., and Litchfield, D.W. (1997). Expression and localization of epitope-tagged protein kinase CK2. *Journal of Cellular Biochemistry* 64, 525–537.

Perera, Y., Del Toro, N., Gorovaya, L., Fernandez-De-Cossio, J., Farina, H., and Perea, S. (2014). Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models. *Molecular and Clinical Oncology* 2, 935–944.

Pierre, F., Chua, P.C., O'Brien, S.E., Siddiqui-Jain, A., Bourbon, P., Haddach, M., Michaux, J., Nagasawa, J., Schwaebe, M.K., Stefan, E., y col. (2011a). Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry* 356, 37–43.

Pierre, F., Chua, P.C., O'Brien, S.E., Siddiqui-Jain, A., Bourbon, P., Haddach, M., Michaux, J., Nagasawa, J., Schwaebe, M.K., Stefan, E., y col. (2011b). 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, 635–654.

Pincheira, R., and Donner, D.B. (2008). The Sall2 transcription factor is a novel p75NTR binding protein that promotes the development and function of neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 53–55.

Pincheira, R., Baerwald, M., Dunbar, J.D., and Donner, D.B. (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *The EMBO Journal* 28, 261–273.

Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., and Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 830–837.

Qiu, W.-R., Xiao, X., Lin, W.-Z., and Chou, K.-C. (2015). iUbiq-Lys: prediction of lysine ubiquitination sites in proteins by extracting sequence evolution information via a gray system model. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33, 1731–1742.

Quan, L., and Liu, M. (2012). CID,ETD and HCD Fragmentation to Study Protein Post-Translational Modifications. *Modern Chemistry & Applications*.

Ramlee, M.K., Wang, J., Toh, W.X., and Li, S. (2016). Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes* 7.

Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 267–271.

Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J. V, and Blagoev, B. (2011). System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science Signaling* 4, rs3.

Rivera, M.N., and Haber, D.A. (2005). Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nature Reviews. Cancer* 5, 699–712.

Roach, P.J. (1991). Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 14139–14142.

Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (New York, N.Y.)* 234, 364–368.

Rusten, T.E., Cantera, R., Urban, J., Technau, G., Kafatos, F.C., and Barrio, R. (2001). Spalt modifies EGFR-mediated induction of chordotonal precursors in the embryonic PNS of *Drosophila* promoting the development of oenocytes. *Development (Cambridge, England)* 128, 711–722.

Ruzzene, M., Di Maira, G., Tosoni, K., and Pinna, L.A. (2010). Assessment of CK2 constitutive activity in cancer cells. *Methods in Enzymology* 484, 495–514.

Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Tateno, H., Toyoda, M., Hidenori, A., Nishino, K., Chikazawa, E., Fukawatase, Y., Miyagawa, Y., y col. (2011). Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. *BMC Systems Biology* 5 *Suppl 1*, S17.

Sakaki-Yumoto, M., Kobayashi, C., Sato, A., Fujimura, S., Matsumoto, Y., Takasato, M., Kodama, T., Aburatani, H., Asashima, M., Yoshida, N., y col. (2006). The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* 133, 3005–3013.

Sánchez, J., Talamillo, A., González, M., Sánchez-Pulido, L., Jiménez, S., Pirone, L., Sutherland, J.D., and Barrio, R. (2011). *Drosophila* Sal and Salr are transcriptional repressors. *The Biochemical Journal* 438, 437–445.

Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S.P., Donella-Deana, A., Shugar, D., and Pinna, L.A. (2001). Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Letters* 496, 44–48.

Sarno, S., Ghisellini, P., and Pinna, L.A. (2002). Unique Activation Mechanism of Protein Kinase CK2. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22509–22514.

Sarno, S., Papinutto, E., Franchin, C., Bain, J., Elliott, M., Meggio, F., Kazimierczuk, Z., Orzeszko, A., Zanotti, G., Battistutta, R., y col. (2011). ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11, 1340–1351.

Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. (2003). Zinc finger protein sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Molecular and Cellular Biology* 23, 62–69.

Sayed, M., Kim, S.O., Salh, B.S., Issinger, O.-G., and Pelech, S.L. (2000). Stress-induced Activation of Protein Kinase CK2 by Direct Interaction with p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16569–16573.

Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Cai, L.F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A.J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269–283.

Schönbauer, C., Distler, J., Jährling, N., Radolf, M., Dodt, H.-U., Frasch, M., and Schnorrer, F. (2011). Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. *Nature* 479, 406–409.

Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., and Verma, I.M. (1996). Constitutive phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free I $\kappa$ B $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biology* 16, 3554–3559.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704–707.

Sha, L., MacIntyre, L., Machell, J.A., Kelly, M.P., Porteous, D.J., Brandon, N.J., Muir, W.J., Blackwood, D.H., Watson, D.G., Clapcote, S.J., y col. (2012). Transcriptional regulation of neurodevelopmental and metabolic pathways by NPAS3. *Mol Psychiatry* 17, 267–279.

Shen, J., Channavajhala, P., Seldin, D.C., and Sonenshein, G.E. (2001). Phosphorylation by the protein kinase CK2 promotes calpain-mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) *167*, 4919–4925.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* (New York, N.Y.) *274*, 1672–1677.

Siddiqui-Jain, A., Drygin, D., Streiner, N., Chua, P., Pierre, F., O'Brien, S.E., Bliesath, J., Omori, M., Huser, N., Ho, C., y col. (2010). CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Research* *70*, 10288–10298.

Siddiqui-Jain, A., Bliesath, J., Macalino, D., Omori, M., Huser, N., Streiner, N., Ho, C.B., Anderes, K., Proffitt, C., O'Brien, S.E., y col. (2012). CK2 Inhibitor CX-4945 Suppresses DNA Repair Response Triggered by DNA-Targeted Anticancer Drugs and Augments Efficacy: Mechanistic Rationale for Drug Combination Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* *11*, 994–1005.

Simon, M., von Deimling, A., Larson, J.J., Wellenreuther, R., Kaskel, P., Waha, A., Warnick, R.E., Tew, J.M., and Menon, A.G. (1995). Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Research* *55*, 4696–4701.

Singh, G.P., Ganapathi, M., Sandhu, K.S., and Dash, D. (2006). Intrinsic unstructuredness and abundance of PEST motifs in eukaryotic proteomes. *Proteins* *62*, 309–315.

Singh, L.P., Arorr, A.R., and Wahba, A.J. (1994). Phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor and eukaryotic initiation factor 2 by casein kinase II regulates guanine nucleotide binding and GDP/GTP exchange. *Biochemistry* *33*, 9152–9157.

Skaper, S.D. (2008). The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* *7*, 46–62.

Song, C., Gowda, C., Pan, X., Ding, Y., Tong, Y., Tan, B.-H., Wang, H., Muthusami, S., Ge, Z., Sachdev, M., y col. (2015). Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia. *Blood* *126*, 1813–1822.

Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M.F., Piwnica-Worms, H., and Cantley, L.C. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Current Biology : CB* 4, 973–982.

Soucy, T.A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin, J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S., y col. (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458, 732–736.

Sperger, J., Chen, X., Draper, J., Antosiewicz, J., Chon, C., Jones, S., Brooks, J., Andrews, P., Brown, P., and Thomson, J. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13350–13355.

Spycher, C., Miller, E.S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N.A., Janscak, P., Stewart, G.S., and Stucki, M. (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11–RAD50–NBS1 complex to damaged chromatin. *The Journal of Cell Biology* 181, 227–240.

St-Denis, N.A., and Litchfield, D.W. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 66, 1817–1829.

Sugden, P.H., Fuller, S.J., Weiss, S.C., and Clerk, A. (2008). Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br. J. Pharmacol.* 153 *Suppl* 1, S137–S153.

Sung, C.K., Dahl, J., Yim, H., Rodig, S., and Benjamin, T.L. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150(Sal2). *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 1275–1283.

Sung, C.K., Yim, H., Gu, H., Li, D., Andrews, E., Duraisamy, S., Li, C., Drapkin, R., and Benjamin, T. (2012). The Polyoma Virus Large T Binding Protein p150 Is a Transcriptional Repressor of c-MYC. *PLoS ONE* 7, e46486.

Sung, C.K., Li, D., Andrews, E., Drapkin, R., and Benjamin, T. (2013). Promoter methylation of the SALL2 tumor suppressor gene in ovarian cancers. *Molecular Oncology* 7, 419–427.

Suryadinata, R., Sadowski, M., and Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience Reports* 30, 243–255.

Suvà, M.L., Rheinbay, E., Gillespie, S.M., Patel, A.P., Wakimoto, H., Rabkin, S.D., Riggi, N., Chi, A.S., Cahill, D.P., Nahed, B. V., y col. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* 157, 580–594.

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research* 26, 399–422.

Sweetman, D., and Munsterberg, A. (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Dev Biol* 293, 285–293.

Sweetman, D., Smith, T., Farrell, E.R., Chantry, A., and Munsterberg, A. (2003). The conserved glutamine-rich region of chick *csal1* and *csal3* mediates protein interactions with other spalt family members. Implications for Townes-Brocks syndrome. *J Biol Chem* 278, 6560–6566.

Szafranska, A.E., and Dalby, K.N. (2005). Kinetic mechanism for p38 MAP kinase alpha. A partial rapid-equilibrium random-order ternary-complex mechanism for the phosphorylation of a protein substrate. *FEBS Journal* 272, 4631–4645.

Tan, F., Lu, L., Cai, Y., Wang, J., Xie, Y., Wang, L., Gong, Y., Xu, B.-E., Wu, J., Luo, Y., y col. (2008). Proteomic analysis of ubiquitinated proteins in normal hepatocyte cell line Chang liver cells. *Proteomics* 8, 2885–2896.

Tanaka, M., and Herr, W. (1990). Differential Transcriptional Activation by Ott-1 and Ott-2: Interdependent Activation Domains Induce Ott-2 Phosphorylation. *Cell* 60, 375–386.

Taneja, P., Zhu, S., Maglic, D., Fry, E.A., Kendig, R.D., and Inoue, K. (2011). Transgenic and knockout mice models to reveal the functions of tumor suppressor genes. *Clinical Medicine Insights. Oncology* 5, 235–257.

Tarrant, M.K., Rho, H.-S., Xie, Z., Jiang, Y.L., Gross, C., Culhane, J.C., Yan, G., Qian, J., Ichikawa, Y., Matsuoka, T., y col. (2012). Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. *Nature Chemical Biology* 8, 262–269.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 231–241.

Teixeira, L.K., and Reed, S.I. (2013). Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. *Annual Review of Biochemistry* 82, 387–414.

Thul, P.J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Björk, L., Breckels, L.M., y col. (2017). A subcellular map of the human proteome. *Science* 356, eaal3321.

Topolcan, O., and Holubec, L. (2008). The role of thymidine kinase in cancer diseases. *Expert Opinion on Medical Diagnostics* 2, 129–141.

Torchy, M.P., Hamiche, A., and Klaholz, B.P. (2015). Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 2491–2507.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65, 87–108.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350–4354.

Trauger, J.W., Lin, F.-F., Turner, M.S., Stephens, J., and LoGrasso, P. V (2002). Kinetic mechanism for human Rho-Kinase II (ROCK-II). *Biochemistry* 41, 8948–8953.

Trott, R.L., Kalive, M., Karandikar, U., Rummer, R., Bishop, C.P., and Bidwai, A.P. (2001). Identification and characterization of proteins that interact with *Drosophila melanogaster* protein kinase CK2. *Molecular and Cellular Biochemistry* 227, 91–98.

Tse, J.Y., Ng, H.K., Lau, K.M., Lo, K.W., Poon, W.S., and Huang, D.P. (1997). Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Human Pathology* 28, 779–785.

Turowec, J.P., Duncan, J.S., French, A.C., Gyenis, L., St. Denis, N.A., Vilks, G., and Litchfield, D.W. (2010). Protein Kinase CK2 is a Constitutively Active Enzyme that Promotes Cell Survival: Strategies to Identify CK2 Substrates and Manipulate its Activity in Mammalian Cells. In *Methods in Enzymology*, pp. 471–493.

Ubersax, J.A., and Ferrell Jr, J.E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 530–541.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., y col. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (New York, N.Y.) *347*, 1260419.

Valk, P.J.M., Verhaak, R.G.W., Beijen, M.A., Erpelinck, C.A.J., van Doorn-Khosrovani, S.B. van W., Boer, J.M., Beverloo, H.B., Moorhouse, M.J., van der Spek, P.J., Löwenberg, B., y col. (2004). Prognostically Useful Gene-Expression Profiles in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* *350*, 1617–1628.

Voutsadakis, I.A. (2017). Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells. *Tumor Biology* *39*, 101042831769224.

Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., and Choudhary, C. (2011a). A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP *10*, M111.013284.

Wagner-Bernholz, J.T., Wilson, C., Gibson, G., Schuh, R., and Gehring, W.J. (1991). Identification of target genes of the homeotic gene *Antennapedia* by enhancer detection. *Genes & Development* *5*, 2467–2480.

Wang, J.-R., Huang, W.-L., Tsai, M.-J., Hsu, K.-T., Huang, H.-L., and Ho, S.-Y. (2017). ESA-UbiSite: accurate prediction of human ubiquitination sites by identifying a set of effective negatives. *Bioinformatics* *33*, btw701.

Welsh, G.I., Price, N.T., Bladergroen, B.A., Bloomberg, G., and Proud, C.G. (1994). Identification of Novel Phosphorylation Sites in the  $\beta$ -Subunit of Translation Initiation Factor eIF-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *201*, 1279–1288.

Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS *57*, 1172–1183.

Willis, S.N., and Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 617–625.

Wright, A., and Hastie, N. (2007). *Genes and Common Diseases* (1<sup>o</sup> ed.). New York, U.S.: Cambridge University Press.

Wrzeszczynski, K.O., Ofran, Y., Rost, B., Nair, R., and Liu, J. (2003). Automatic prediction of protein function. *Cellular and Molecular Life Sciences* (CMLS) *60*, 2637–2650.

- Wu, Z., Cheng, K., Shi, L., Li, Z., Negi, H., Gao, G., Kamle, S., and Li, D. (2015). Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element. *Cancer Science* *106*, 253–261.
- Wuebben, E.L., and Rizzino, A. (2015). The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget* *8*, 44917–44943.
- Xiong, J. (2014). Sall4 SALL4 : Engine of Cell Stemness. *Current Gene Therapy* *14*, 400–411.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* *366*, 701–704.
- Xu, C., Kim, N.-G., and Gumbiner, B.M. (2009). Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle* *8*, 4032–4039.
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.-C., Ca atay, T., Grishin, N. V., and Chook, Y.M. (2015). LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* *31*, 1357–1365.
- Yang, C.M., Chiba, T., Brill, B., Delis, N., von Manstein, V., Vafaizadeh, V., Oellerich, T., and Groner, B. (2015). Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. *International Journal of Cancer* *137*, 2296–2309.
- Zandomeni, R.O. (1989). Kinetics of inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on calf thymus casein kinase II. *The Biochemical Journal* *262*, 469–473.
- Zappa, C., and Mousa, S.A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research* *5*, 288–300.
- Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* *15*, 11–18.
- Zhang, C., Vilks, G., Canton, D.A., and Litchfield, D.W. (2002). Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2 $\beta$  subunit. *Oncogene* *21*, 3754–3764.
- Zhang, X., Zhang, S., Yamane, H., Wahl, R., Ali, A., Lofgren, J.A., and Kendall, R.L. (2006). Kinetic Mechanism of AKT/PKB Enzyme Family. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 13949–13956.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Cell Biology* 6, 931–940.

Zuo, Y., Cui, Y., Yu, G., Li, R., and Ransom, H.W. (2017). Incorporating prior biological knowledge for network-based differential gene expression analysis using differentially weighted graphical LASSO. *BMC Bioinformatics* 18, 99.



## 11. ANEXOS

### Anexo 1.- Partidores para mutagénesis sitio-dirigida.

Partidor	Secuencia	Tm calculada	Sustitución (ADN)	Mutación (Proteína)
S763 For	5'-GAAGAGGAGTTGGCTGAGG AGGAGG-3'	75.1° C	c.T2329>G (TCT>GCT)	p.S763A
S763 Rev	5'-CCTCCTCCTCAGCCAACTC CTCTTC-3'			
T778 For	5'-GAAGAGGAAGATGTGGCTG ATGAAGATTCC-3'	74.8° C	c.A2374>G (ACT>GCT)	p.T778A
T778 Rev	5'-GGAATCTTCATCAGCCACAT CTTCCTCTTC-3'			
S802 For	5'-CAGTGAGAGGTGATGCAGA AGAGGCATC-3'	75.8° C	c.T2446>G (TCA>GCA)	p.S802A
S802 Rev	5'-GATGCCTCTTCTGCATCACC TCTCACTG-3'			
S806 For	5'-GATTCAGAAGAGGCAGCTG GGCAGAGGAG-3'	80.3 C	c.T2458>G (TCT>GCT)	p.S806A
S806 Rev	5' -CTCCTCTGCCCCAGCTGCC TCTTCTGAATC-3'			
S802A (B) For	5'- CAGTGAGAGGTGATGCAGA AGAGGCAGC-3'	77.2° C	c.T2446>G (TCA>GCA)	p.S802A- sobre mutación S806A
S802A (B) Rev	5'-GCTGCCTCTTCTGCATCACC TCTCACTG-3'			
A763D For	5'-GAAGAGGAGTTGGATGAG GAGGAGGAAG-3'	75.8° C	c.C2330>A (GCT>GAT)	p.A763D
A763D	5'-CTTCCTCCTCCTCATCAA			

Partidor	Secuencia	Tm calculada	Sustitución (ADN)	Mutación (Proteína)
Rev	CTCCTCTTC-3'			
A778D For	5'-GAAGAGGAAGATGTGGAT GATGAAGATTCCCTG-3'	76.7° C	c.C2375>A (GCT>GAT)	p.A778D
A778D Rev	5'-CAGGGAATCTTCATCATCC ACATCTTCCTCTTC-3'			
A802D For	5'-CAGTGAGAGGTGATGATG AAGAGGCAGCTGG-3'	79.0° C	c.CA2456>A T (GCA>GAT)	p.A802D
A802 Rev	5'-CCAGCTGCCTCTTCATCAT CACCTCTCACTG-3'			
A806D For	5'-GATGAAGAGGCAGATGGG GCAGAGGAG-3'	77.1° C	c.C2459>A (GCT>GAT)	p.A802D sobre mutación A802D
A806D Rev	5'-CTCCTCTGCCCATCTGCC TCTTCATC-3'			

Fuente: propia.

## Anexo 2.- Partidores para secuenciación de constructos generados.

Partidor	Secuencia	Tm	Constructo
SeqMut For	AGTGTGTGGCAGAGCCTTCT	58.9° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag (mutantes)
SeqMut todo Rev	CCGGGATCCTCTAGAGTCG	56.1° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag (mutantes)
Todo For	GCTCGTTTAGTGACCGTCAGA	56.7° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag
Nter-Seq Rev	TTCCATTCTTTGGCTTCAGG	53.0° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag
Mid-Seq For	GCTCCTGAAGCCAAAGAATG	54.1° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag
Mid-Seq Rev	AGAAGGCTCTGCCACACACT	58.9° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag
hGH-PoliA Rev	CCAGCTTGGTTCCCAATAGA	51.7° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag pCMV2(NH)/ΔNSall2- Flag
CMV-For	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	60.1° C	pCMV(NH)/Sall2-Flag pCMV2(NH)/ΔNSall2- Flag
pQE80s-FW	CGGATAACAATTTACACACAG	49.2° C	pQE81-L/ hSall2 FL- His pQE81-L/ hSall2 C- ter-His pQE81-L/ hSall2 PEST-His
pQE80s-Rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG	49.8° C	pQE81-L/ hSall2 FL- His pQE81-L/ hSall2 C- ter-His pQE81-L/ hSall2 PEST-His

Fuente: propia.

### Anexo 3.- Anticuerpos primarios usados para *western blot*.

Proteína	Anticuerpo	Especie	Fabricante	Dilución	Epítotope	Tamaño
Sall2	Anti-Sall2	Conejo	Sigma (Prestige Antibodies, No. Cat. # HPA004162)	1:1000	aa 49-159	130 kDa.
CK2 $\alpha$	Anti-Casein Kinase 2 $\alpha$ , clone 1AD9. (CK2 $\alpha$ / $\alpha'$ )	Ratón	Merck Millipore (No. Cat. # 05-1431)	1:500	aa 319-324 (CK2 $\alpha$ ) aa 320-325 (CK2 $\alpha'$ ) (Nastainczyk y col., 2003)	45 kDa. (CK2 $\alpha$ ) 41 kDa. (CK2 $\alpha'$ )
	CK2 $\alpha$ -only (CK2 $\alpha$ )	Conejo	Dr. David Litchfield (Litchfield y col., 1991)	1:2000	aa 376–391 (CK2 $\alpha$ )	
CK2 $\alpha'$	GST-Fusion (CK2 $\alpha'$ / $\alpha$ )	Conejo	Dr. David Litchfield	1:2000	aa 299-350 (CK2 $\alpha'$ , también reconoce CK2 $\alpha$ )	
CK2 $\beta$	6D5	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC-12739)	1:500	aa 1-215	25 kDa.
	KLH	Conejo	Dr. David Litchfield (Litchfield y col., 1991)	1:2000	aa 198-215	
eIF2 $\beta$	EIF2 beta antibody	Conejo	Genetex (No. Cat. # GTX106484)	1:1000	No especificado (Region central)	38 kDa.
eEF1 $\delta$	eEF1 delta antibody	Conejo	Novus (No. Cat. # 100223A)	1:5000	Descontinuado	31 kDa.
Fosfo CK2 $\beta$	Phospho CK2 $\beta$ (S2/S3/S4/S8)	Conejo	Dr. David Litchfield (YenZym Antibodies)	1:20000	aa 2-14, con fosforilación en Ser 2, 3, 4 y 8	25 kDa.
Fosfo eIF2 $\beta$	Phospho eIF2 $\beta$ (S2)	Conejo	Dr. David Litchfield (Gandin y col., 2016) (YenZym Antibodies)	1:10000	aa 2-14 con fosforilación se Ser 2	38 kDa.

Proteína	Anticuerpo	Especie	Fabricante	Dilución	Epítipo	Tamaño
Fosfo eEF1δ	Phospho eEF2δ (S162)	Conejo	Dr. David Litchfield (Gyenis y col., 2011) (YenZym Antibodies)	1:10000	aa 156-159, con fosforilación en Ser 162	31 kDa.
Fosfo XRCC1	Phospho XRCC1 (S518/T519/T523)	Conejo	Bethyl Laboratories (No. Cat. # A300-059A)	1:2500	No especificado	70 kDa.
P53	DO-1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC-126)	1:1000	aa 11-25	53 kDa.
Ubiquitina	P4D1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC -8017)	1:1000	aa 1-76 (Bovino)	8.6 kDa.
Flag	Monoclonal Anti-Flag M2, clone M2	Ratón	Sigma (No. Cat. # F3165)	1:5000	Flag tag	1 kDa.
6 X His	6xHis monoclonal antibody	Ratón	Clontech (No. Cat. # 631212)	1:2500	Histidine tag	<1 kDa.
HA	HA.11 Clone 16B12	Ratón	Covance (No. Cat. # MMS-101P)	1:5000	Hemagglutinin (HA) tag	1.1 Kda.
GAPDH	Anti-GAPDH Antibody, clone 6C5	Ratón	Merck Millipore (No. Cat. # MAB374)	1:1000	aa 1-333 (Conejo)	36 kDa.
	6C5	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC-32233)	1:10000		
β-Actina	AC-15	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (No. Cat. # SC-69879)	1:10000	No especificado (péptido sintético modificado)	42 kDa.

Fuente: propia.

**Anexo 4.- Anticuerpos secundarios usados para *western blot*.**

<b>Proteína</b>	<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Dilución</b>	<b>Conjugado a</b>
Anti-Mouse IgG	(H+L)-HRP Conjugate	Cabra	BioRad (No. Cat. # 172-1011)	1:20000	HRP
	Mouse TrueBlot® ULTRA	Rata	Rockland (No. Cat. # 18-8817- 30)	1:1000	HRP
	IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Cabra	Li-Cor (No. Cat. # 925-32210)	1:10000	IRDye® 680RD
Anti-Rabbit IgG	(H+L)-HRP Conjugate	Cabra	BioRad (No. Cat. # 160-6515)	1:20000	HRP
	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	Cabra	Li-Cor (No. Cat. # 925-3221)	1:10000	IRDye® 800CW

Fuente: propia.

### Anexo 5.- Anticuerpos utilizados para Inmunofluorescencia.

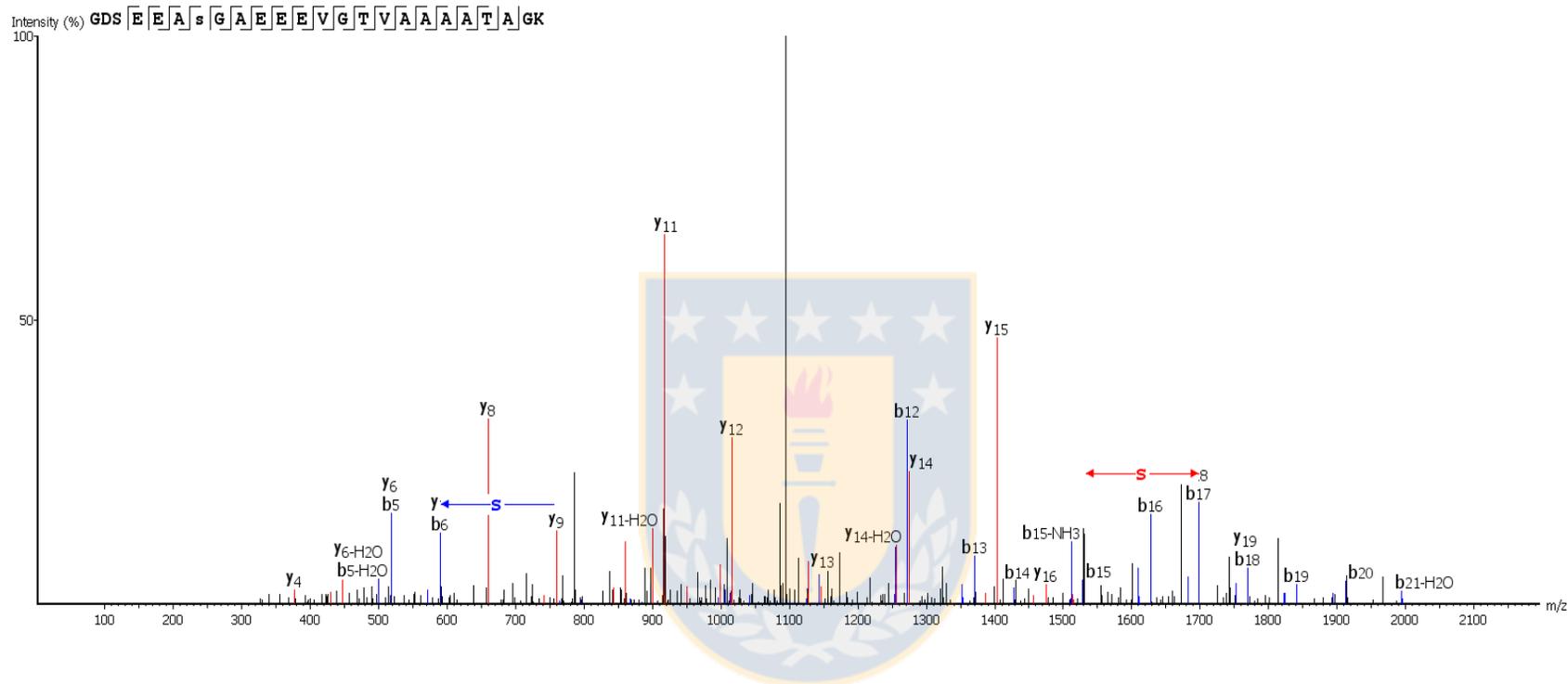
Proteína	Anticuerpo	Especie	Fabricante	Dilución	Conjugado
Sall2	Anti-Sall2	Conejo	Sigma (Prestige Antibodies, No. Cat. # HPA004162)	1:500 (sobre-expresión) o 1:100 (endógeno)	-
Flag (SALL2-Flag <i>wild type</i> , mutantes y ΔN)	Monoclonal Anti-Flag M2, clone M2	Ratón	Sigma (No. Cat. # F3165)	1:1000	-
CK2α/α'	Monoclonal Anti-Casein Kinase 2a Clone 1AD9	Ratón	Sigma (No. Ca. # C5367)	1:400	-
Anti-Mouse IgG	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Cabra	ThermoFisher Scientific(Molecular Probes, No. Cat. # A-11001)	1:500	Alexa Fluor 488®
	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	Cabra	ThermoFisher Scientific(Molecular Probes, No. Cat. # A-21422)	1:500	Alexa Fluor 555®
Anti-Rabbit IgG	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Cabra	ThermoFisher Scientific(Molecular Probes, No. Cat. # A-11008)	1:500	Alexa Fluor 488®
	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	Cabra	ThermoFisher Scientific(Molecular Probes, No. Cat. # A-21428)	1:500	Alexa Fluor 555®

Fuente: propia.

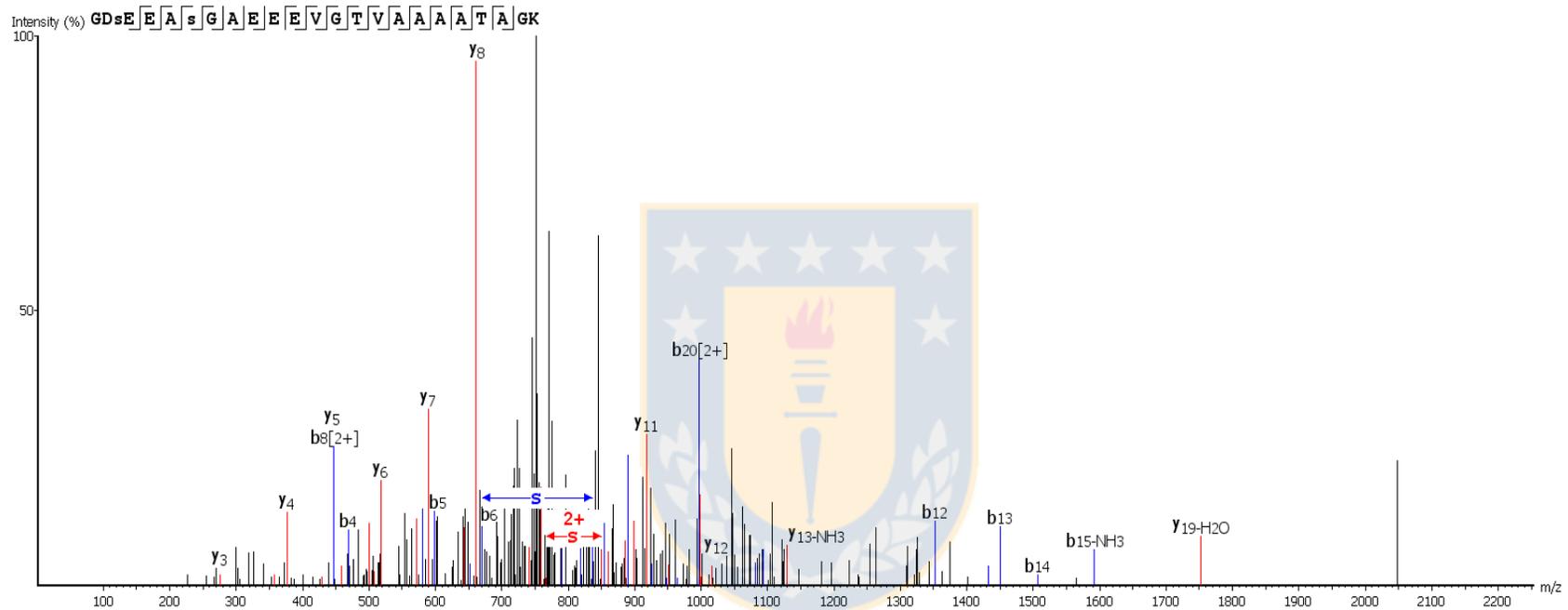
## Anexo 6.- Anticuerpo utilizados para Inmunoprecipitación.

Proteína	Anticuerpo	Especie	Fabricante	Epítotope
Sall2	Sall2 antibody	Conejo	Bethyl (No. Cat. # A303-208A)	aa 957-1007
Flag (SALL2-Flag)	Monoclonal Anti-Flag M2, clone M2	Ratón	Sigma (No. Cat. # F3165)	Flag tag
HA (CK2 $\alpha$ -HA, CK2 $\alpha$ K68M-HA, Ub C-HA, Ub C KO-HA)	HA.11 Clone 16B12	Ratón	Covance (No. Cat. # MMS-101P)	Hemagglutinin (HA) tag
IgG normal de Conejo	Normal Rabbit IgG	Conejo	Santa Cruz (No. Cat. # SC-2027)	----
IgG normal de Ratón	Normal Mouse IgG	Ratón	Santa Cruz (No. Cat. # SC-2025)	-----

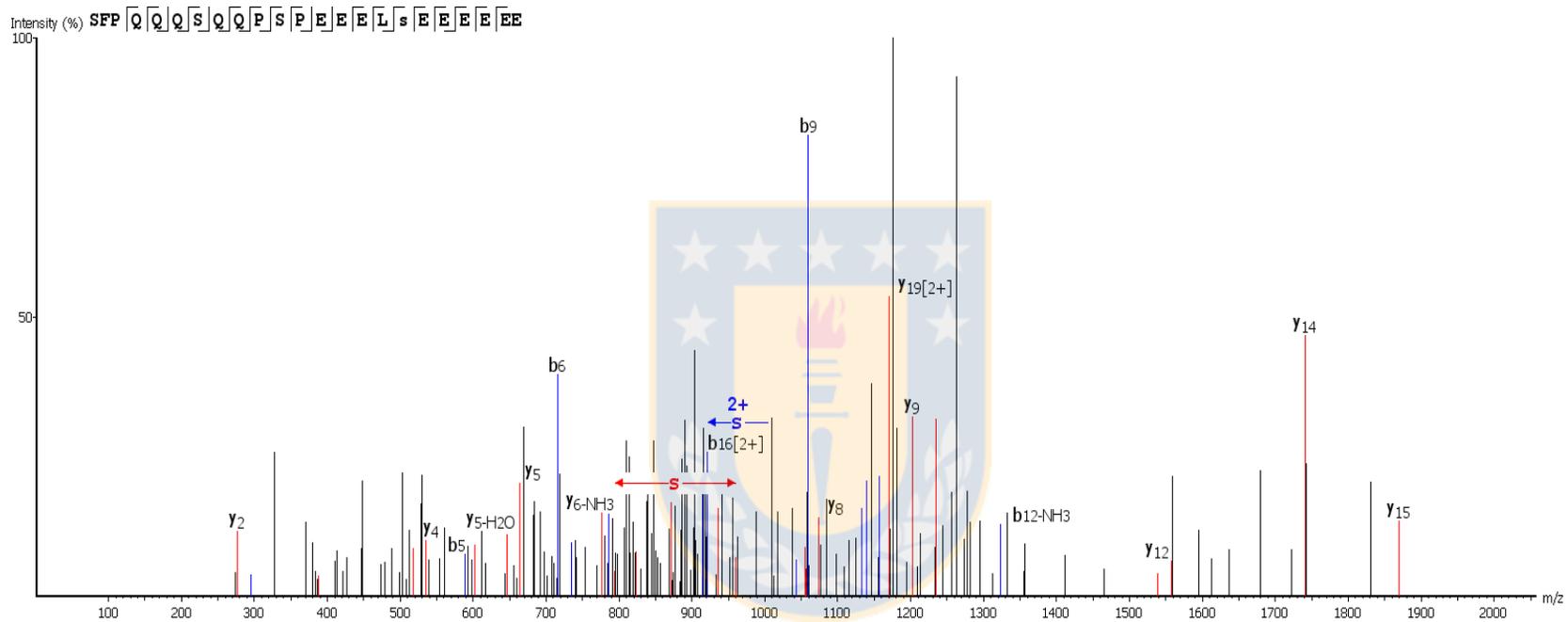
Fuente: propia.



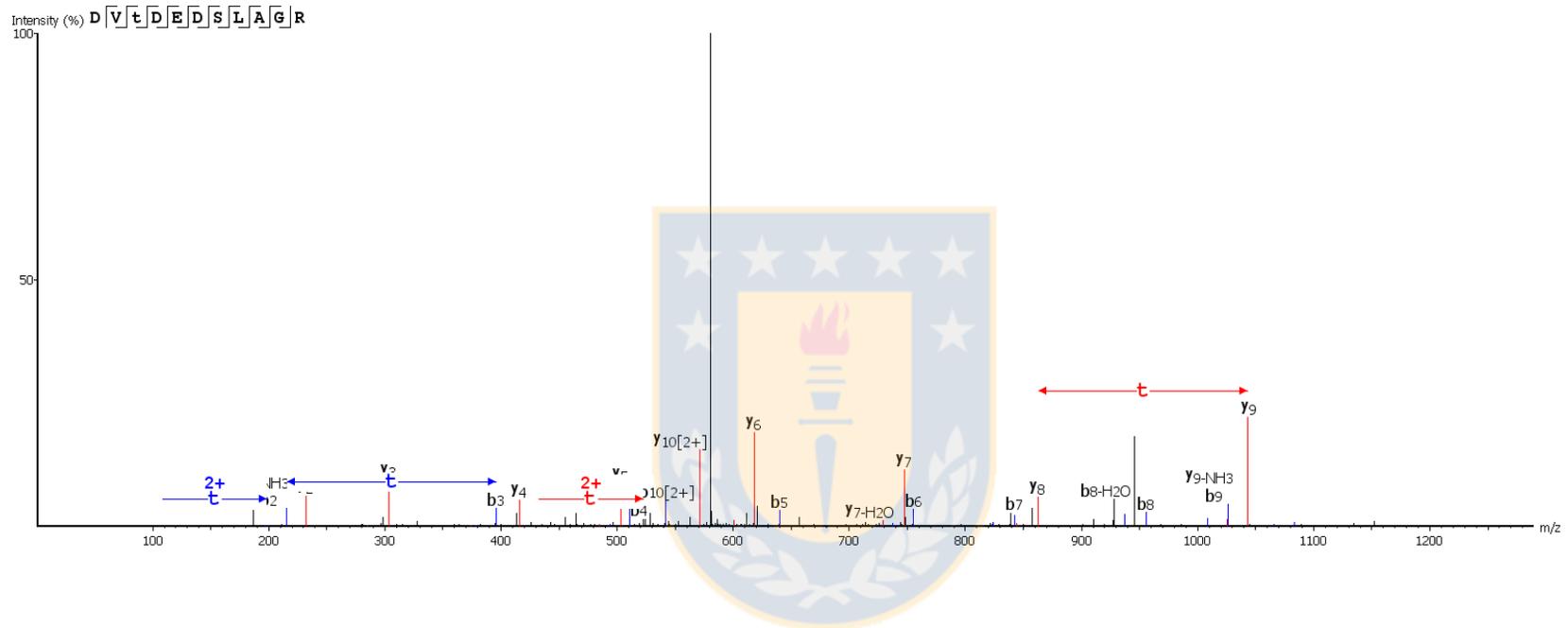
**Anexo 7.- Espectro de péptido con fosforilación en S806, obtenido por fosforilación de  $\Delta$ NSALL2-Flag *in vitro*, sin enzima (basal).** Espectro con fragmento iónico fosforilado en S806, con abundancia relativa de 15%. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de S806, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



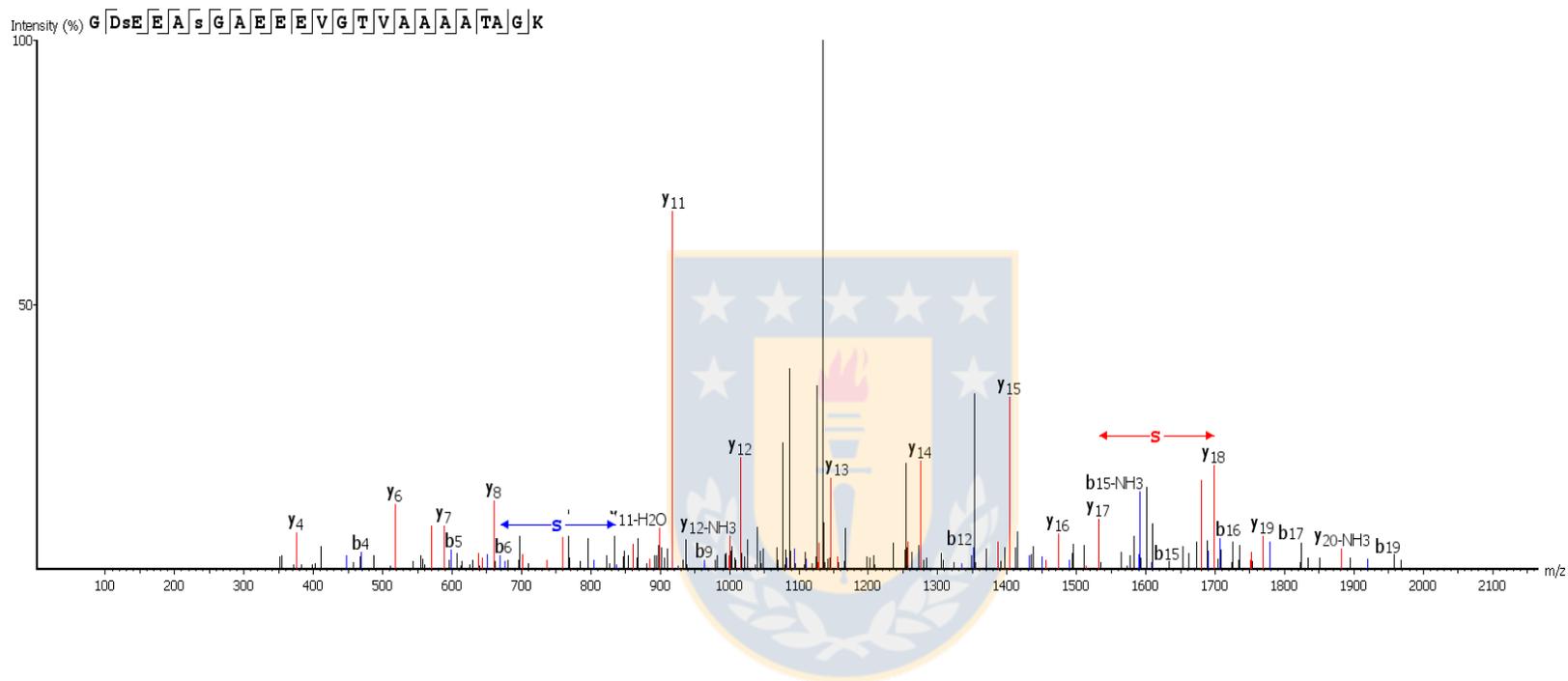
**Anexo 8.- Espectro de péptido con fosforilación en S802 y S806, obtenido por fosforilación de ΔNSALL2-Flag *in vitro* con CK2α.** Espectro con fragmentos iónicos fosforilados en S802 y S806, con abundancia relativa de 16% para ión con modificación en S806. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de S806, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



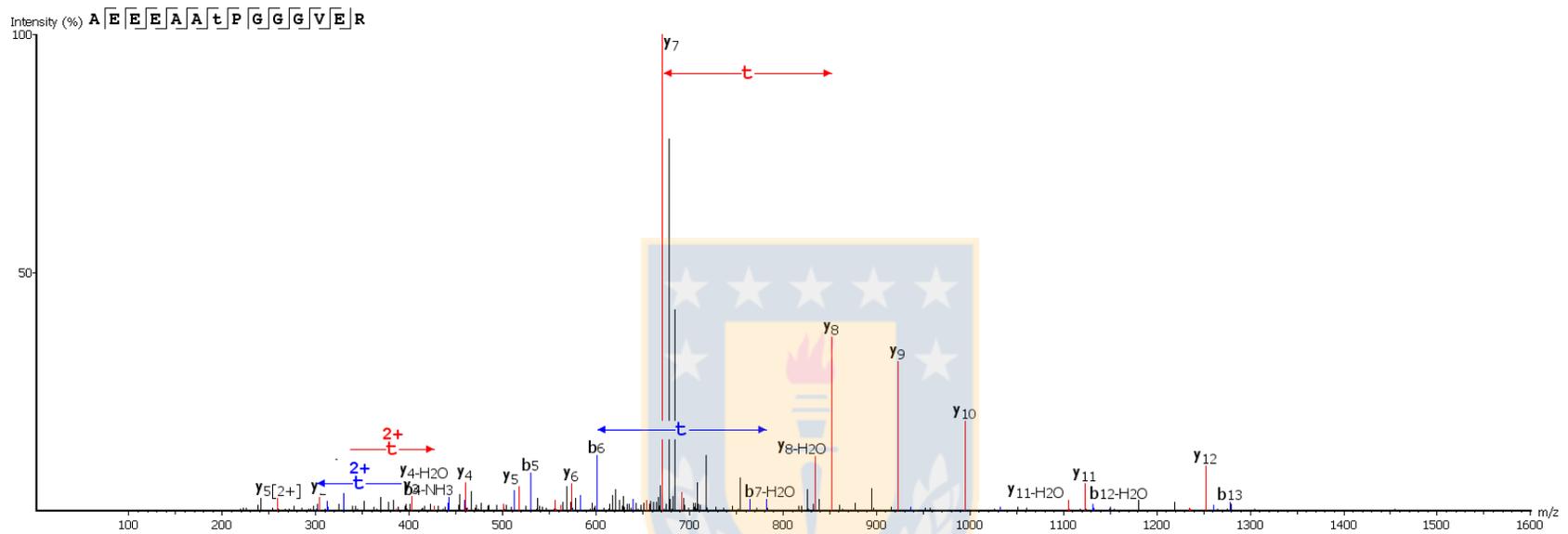
**Anexo 9.- Espectro de péptido con fosforilación en S763, obtenido de proteína ΔNSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO.** Espectro con fragmento iónico fosforilado en S763, con abundancia relativa de 19%. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de S763, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



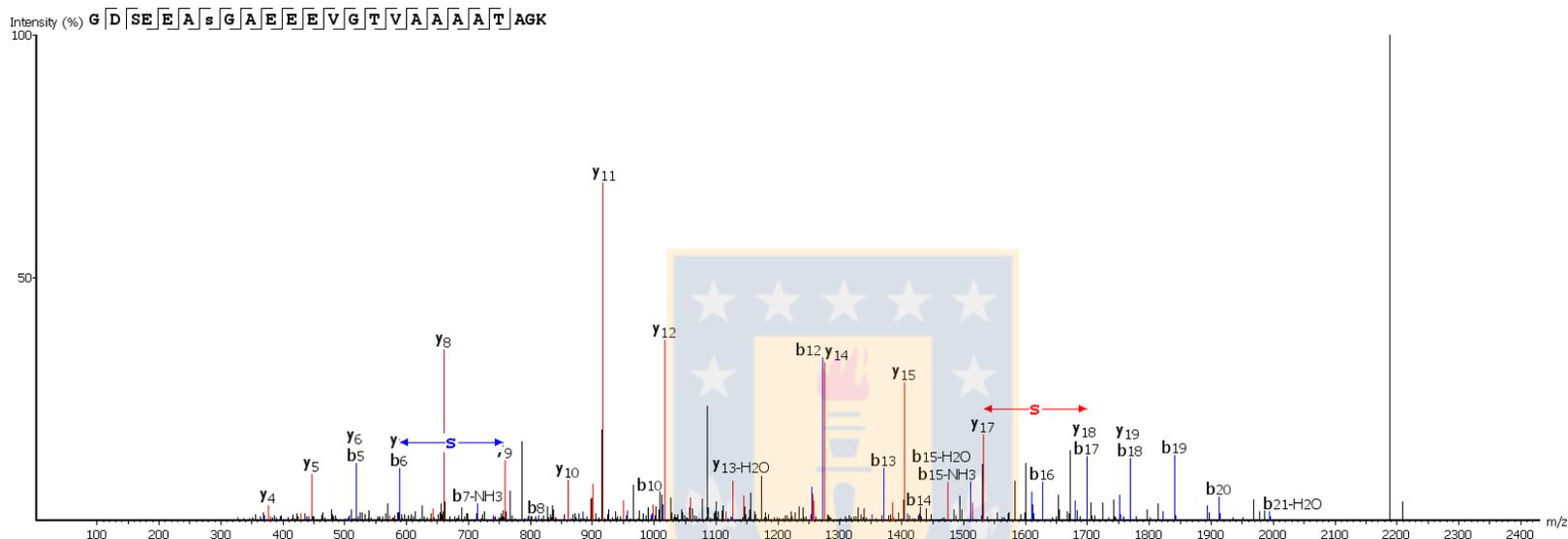
**Anexo 10.- Espectro de péptido con fosforilación en T778, obtenido de proteína ΔNSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO.** Espectro con fragmento iónico fosforilado en T778, con abundancia relativa de 9%. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de T778, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



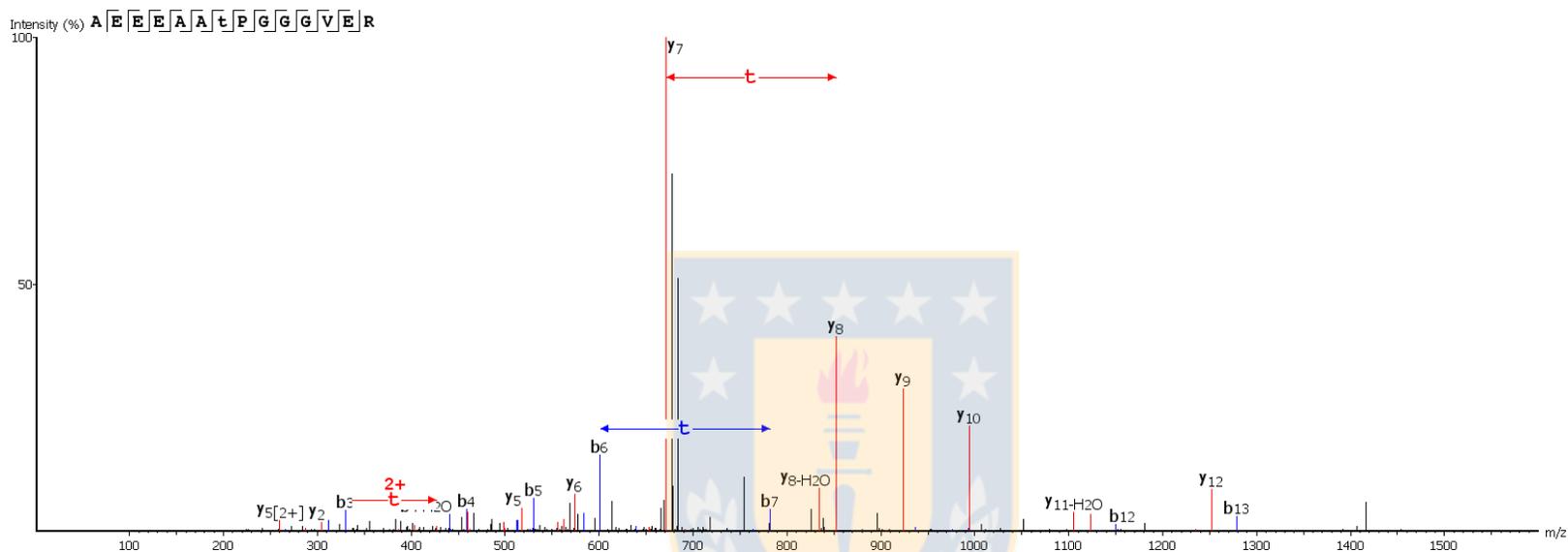
**Anexo 11.- Espectro de péptido con fosforilación en S802 y S806, obtenido de proteína ΔNSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO.** Espectro con fragmentos iónicos fosforilados en S802 y S806, con abundancia relativa de 21% para ión con modificación en S806. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de S806, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



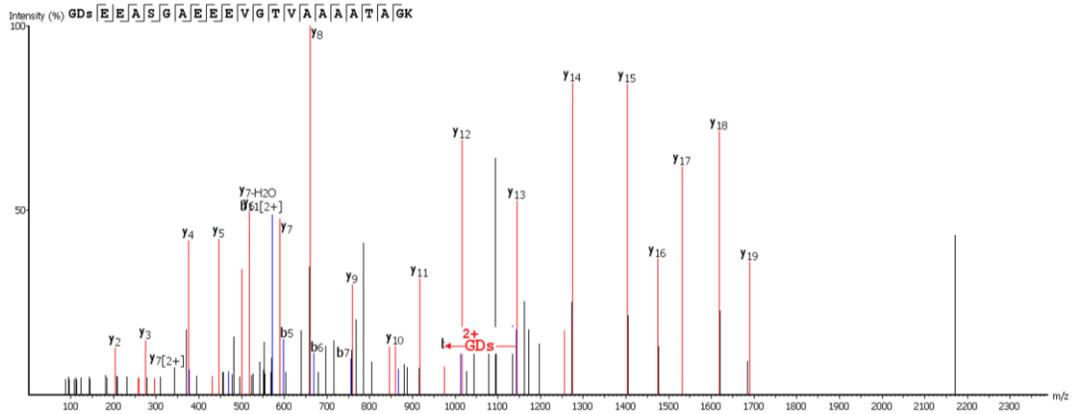
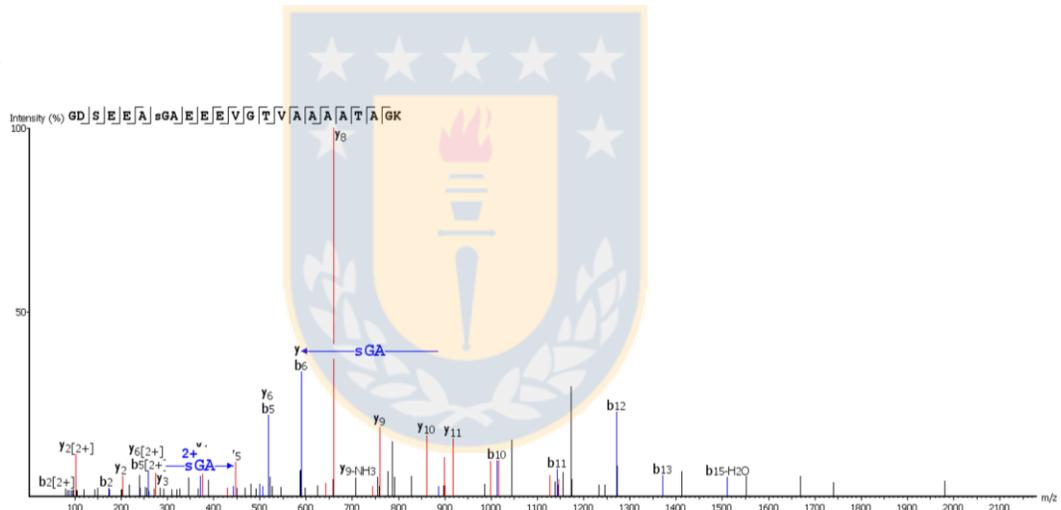
**Anexo 12.- Espectro de péptido con fosforilación en T467, obtenido de proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con DMSO.** Espectro con fragmento iónico fosforilado en T467, con abundancia relativa de 37%. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de T467, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



**Anexo 13.- Espectro de péptido con fosforilación en S806, obtenido de proteína ΔNSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con CX-4945.** Espectro con fragmento iónico fosforilado en S806, con abundancia relativa de 20%. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de S806, modificado por fosforilación. Fuente: propia.



**Anexo 14.- Espectro de péptido con fosforilación en T467, obtenido de proteína  $\Delta$ NSALL2-Flag inmunoprecipitada desde células tratadas con CX-4945.** Espectro con fragmento iónico fosforilado en T467, con abundancia relativa de 43%. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y (rojo) o b (azul) con y sin el residuo de T467, modificado por fosforilación. Fuente: propia.

**A****B**

**Anexo 15.- Espectros de péptidos fosforilados en S802 y S806, obtenidos desde proteína ΔNSALL2-Flag, fragmentados por disociación por colisión de alta energía (HCD). Se inmunoprecipitó ΔNSALL2-Flag desde células Flp-In™ T-REx™ U2OS (sin tratamiento).**

**A.-** Espectro con fragmento iónico fosforilado en S802, con abundancia relativa de 6%. Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie y, con y sin los residuos GDS, en donde el residuo S802 se encuentra modificado por fosforilación.

**B.-** Espectro con fragmento iónico fosforilado en S806, con abundancia relativa de 32%. Las flechas indican el desplazamiento en masa entre picos de fragmentos de la serie b, con y sin los residuos SGA, en donde el residuo S806 está modificado por fosforilación. Eje Y: intensidad relativa de ión (%); eje X: relación masa/carga (m/z). Fuente: propia.



<b>Servidor</b>	<b>Sitios alta probabilidad</b>	<b>Sitios media probabilidad</b>
<b>UbPred</b> (Wrzeszczynski y col., 2003)	K271, K475, <b>K830</b>	K236, K252, K349, K351, K460, K520, K522, <b>K794, K823, K863, K868, K902, K911, K1001</b>
<b>ESA-UbiSite</b> (Wang y col., 2017)	K475, K515, K520, K591, K682, <b>K830, K1001</b>	K146, K246, K252, K297, K522, K660, K698, K699, <b>K823, K931</b>
<b>UbiSite</b> (Huang y col., 2016)	K246, K460, K475, K510, K591, <b>K823, K863, K902, 1001</b>	K146, K236, K349, K351, K368, K417, K426, K515, K520, K552, K598, K699, <b>K794, K868, K931, K956</b>
<b>iUbiq-Lys</b> (Qiu y col., 2015)	<b>K911, K956</b>	
<b>Phosphosite</b> (Hornbeck y col., 2015)	K246 (Wagner y col., 2011) K515, K598 (Mertins y col., 2013) <b>K911</b> (Tan y col., 2008)	
<b>Consenso</b>	<b>K823, K830, K911</b>	

**Anexo 17.- Identificación de sitios putativos de ubiquitinación cercanos a secuencia PEST carboxilo terminal.** Se identificaron potenciales sitios de ubiquitinación en la secuencia proteica de SALL2 humana (NP\_005398.2), con las herramientas bioinformáticas señaladas. Para el análisis con ESA-UbiSite, se consideró arbitrariamente como sitio de alta probabilidad a aquellos sitios putativos con un puntaje >0.70. En rojo se indican los sitios cuya ubicación es próxima a la secuencia PEST carboxilo terminal. En negrita se señalan los sitios próximos a la secuencia PEST, identificados con mayor frecuencia por los distintos programas utilizados (Consenso). Fuente: propia.

Mutación	ID	Muestra (ID)	Tejido primario	Histología	Cigocidad	Estado Somático	Muestra	Casos
p.P758L	---	TCGA-AA-3525-01 (467)	Intestino grueso	Adenocarcinoma colorectal	---	---	Muestra de Tumor	1/276
p.P758Q	---	TCGA-2G-AALQ-01 (55)	Testículos	Tumor de Células germinales	---	---	Muestra de Tumor	1/150
p.E759K	COSM5382064	YUKAT (2439331)	Piel	Melanoma maligno	Heterocigoto	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/213
p.E760G	COSM6139964	TCGA-69-7980-01 (1914044)	Pulmón	Adenocarcinoma	Desconocido	Desconocido	Muestra de Tumor	1/517
p.E761G	COSM1740075	MINO (2088019)	Tejido hematopoyético y linfoide	Neoplasia linfoide	Desconocido	Somático confirmado	Cultivo	1/172
<b>p.E768Q</b>	COSM697522	TCGA-60-2708-01 (1782119)	Pulmón	Carcinoma	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/500
p.D770E	<b>COSM6457312</b>	P-05-14590-Tumor-SM-7CKB9	Tracto aerodigestivo superior	Carcinoma	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/111
p.E773K	COSM4961240	CHC892T (2428944)	Hígado	Carcinoma	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/243
		CHC892T (2340454)	Hígado	Carcinoma	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/327
<b>p.D779V</b>	COSM4723487	T2269 (2296107)	Intestino grueso	Carcinoma colorectal	Desconocido	Somático confirmado	---	1/185

Mutación	ID	Muestra (ID)	Tejido primario	Histología	Cigosisidad	Estado Somático	Muestra	Casos
<b>p.D781N</b>	COSM1607492	HCC35 (2120834)	Hígado	Carcinoma	Desconocido	Somático confirmado	---	2/457
		HCC35T (1919203)	Hígado	Carcinoma	Heterocigoto	Previamente reportado	Muestra de Tumor	
p.G792C	COSM5687425	S02292 (2480896)	Pulmón	Carcinoma	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/110
<b>p.E810K</b>	COSM4994454	SJHYPO146_D (2364198)	Tejido hematopoyético y linfoide	Neoplasia linfoide	Heterocigoto	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/154
p.A816V	COSM954475	TCGA-AP-A0LM-01 (1783352)	Endometrio	Carcinoma	Heterocigoto	Desconocido	Muestra de Tumor	1/540
p.A816E	<b>COSM6287246</b>	CHG-99T	Hígado	-----	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/435
p.A818E	<b>COSM6239001</b>	CHG-37T	Hígado	-----	Desconocido	Somático confirmado	Muestra de Tumor	1/435

**Anexo 18.- Mutaciones reportadas en SALL2 en algunos tipos de cáncer, y que generan sustituciones de aminoácidos cercanos a sitios de fosforilación dependiente de CK2.** Por simplificación no se muestran las mutaciones sin sentido. Aquellas mutaciones sin número identificados (ID), se encontraron sólo en cBioPortal. En letras negras se destacan las sustituciones de residuos ácidos, ubicados hacia el carboxilo terminal de los fosforesiduos identificados, y que podrían afectar la fosforilación mediada por CK2. Fuente: propia.