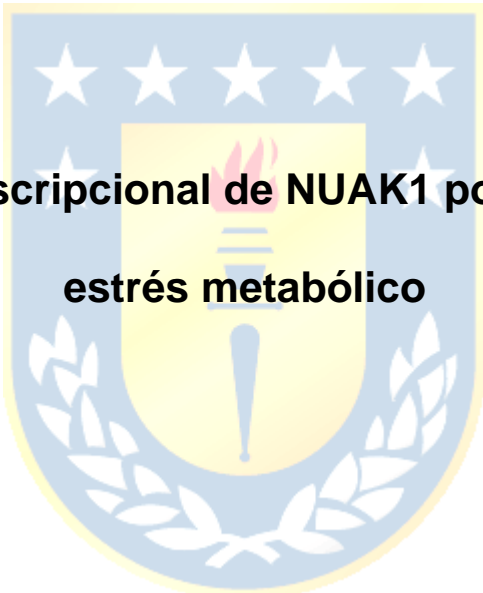




Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas,  
área Biología Celular y Molecular.



**Regulación transcripcional de NUA1 por SALL2 frente a  
estrés metabólico**

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas, área Biología  
Celular y Molecular

CLAUDIA ISABEL ÁLVAREZ MARTÍNEZ-CONDE  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2023

Profesores Guías: Dra. Roxana Jacqueline Pincheira Barrera  
Dr. Ariel Fernando Castro Alma

Dpto. de Bioquímica y Biología molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

© 2023. Claudia Isabel Álvarez Martínez-Conde.

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

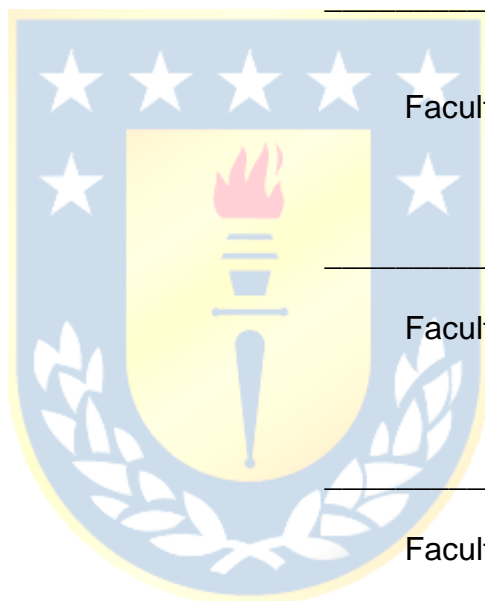


Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

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



---

Dr. Ariel Castro Alma  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Violeta Morín Muñoz  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Sylvain Marcellini  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Viviana Montesinos Acuña  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Chile

---

Dr. Gustavo Moraga Cid  
Director (S)  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>ABREVIATURAS</b>	xi
<b>RESUMEN</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
Cáncer y estrés metabólico	1
Proteínas relacionadas con AMPK	3
NUAK1	4
i. Roles de NUAK1	4
ii. Regulación de NUAK	7
SALL2	10
iii. Familia de proteínas Spalt-like	10
iv. Isoformas de SALL2	11
v. Funciones de SALL2	13
vi. SALL2 y estrés celular	15
<b>2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN</b>	18
<b>3. HIPÓTESIS</b>	19
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	19
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
i. Reactivos	20
ii. Clonamiento y generación de constructos	22
a. Fragmentos del promotor de Nuak1 de ratón	22
b. Clonamiento de SALL2-E1A para modelos celulares inducibles	24
iii. Cultivo Celular	26
a. Condiciones de crecimiento y tratamientos	26
b. Aislamiento de fibroblastos embrionarios de	28

	ratón	
	c. Inmortalización de MEF	29
	d. Generación de modelos inducibles	29
	e. Testeo y limpieza de micoplasma	30
iv.	Transfección con Fosfato de Calcio	32
v.	Ensayos de gen reportero de luciferasa	32
vi.	Ensayos de muerte celular	33
vii.	Obtención de lisados proteicos	34
viii.	Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot	35
ix.	Extracción de ARN	36
x.	PCR cuantitativa en tiempo real	37
xi.	Inmunoprecipitación de cromatina	38
	a. Extracción de núcleos	38
	b. Inmunoprecipitación	39
	c. Reversión de entrecruzamiento	40
xii.	Análisis estadísticos	41
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	42
1.	Objetivo específico I	42
1.1.	Análisis del gen de <i>NUAK1</i> y potenciales reguladores	42
1.2.	La expresión del ARNm <i>SALL2</i> correlaciona con la de <i>NUAK1</i> , tanto en tejidos normales como en cáncer	48
1.3.	Modelos celulares de estudio	53
1.4.	<i>NUAK1</i> incrementa sus niveles de forma correlativa con la sobreexpresión de <i>SALL2</i> en células HEK293	56
1.5.	El promotor <i>NUAK1</i> tiene sitios putativos de unión a <i>SALL2</i> en su secuencia	57
1.6.	<i>SALL2</i> incrementa la actividad del promotor <i>Nuak1</i> murino	60
1.7.	Determinación de los sitios de unión de <i>SALL2</i> al promotor <i>Nuak1</i>	62

1.8. SALL2 interacciona <i>in vivo</i> con el promotor <i>Nuak1</i>	66
2. Objetivo específico II	70
2.1. SALL2 y NUA1 incrementan sus niveles de proteína y ARNm frente a estrés metabólico por privación de glucosa de forma dependiente del tiempo, pero no frente a estrés oxidativo ni privación de suero	70
2.2. NUA1 incrementa sus niveles proteicos de forma correlativa con la inducción de SALL2	74
2.3. SALL2 es necesario para el incremento de los niveles de NUA1 frente a estrés metabólico	76
2.4. No se observan diferencias en la supervivencia celular frente a estrés metabólico en los modelos inducibles de HEK293 y MEF	78
2.5. Inhibición de NUA1 reduce el efecto pro-supervivencia de SALL2 en células MEF shSall2.	81
<b>8. DISCUSIÓN</b>	85
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES</b>	93
<b>10. ANEXOS</b>	95
<b>Anexo 1.</b> Células deficientes de SALL2 presentan menor número de vacuolas frente al tratamiento con el inhibidor de CK2, CX-4945	95
<b>Anexo 2.</b> Los promotores de los reguladores transcripcionales descritos para <i>NUAK1</i> presentan sitios consenso para SALL2	96
<b>Anexo 3.</b> Células de cáncer colorrectal SW480 expresan SALL2	97
<b>Anexo 4.</b> Esquema de la estrategia de subclonamiento para generación del vector inducible pCW57-MCS1-2A-MCS2-E1A	98
<b>Anexo 5.</b> SALL2 E1 incrementa la expresión del ARNm <i>NUAK1</i> en condiciones basales	100
<b>Anexo 6.</b> Relación propuesta entre las isoformas de SALL2	101
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	102

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas relacionadas a AMPK.	3
<b>Tabla 2.</b> Regulación postranscripcional de NUA1.	8
<b>Tabla 3.</b> Plásmidos.	20
<b>Tabla 4.</b> Partidores.	21
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos.	21
<b>Tabla 6.</b> Otros reactivos.	22
<b>Tabla 7.</b> Ejemplo de interpretación del coeficiente de Pearson.	49
<b>Tabla 8.</b> Tejidos en los que se observó una correlación estadísticamente significativa entre SALL2 y NUA1.	51



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> NUAK1 responde frente a estrés metabólico aumentando sus niveles, tanto de proteínas como de ARNm.	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de las isoformas de SALL2.	13
<b>Figura 3.</b> SALL2 responde frente a estrés metabólico aumentando sus niveles y favoreciendo la supervivencia celular.	16
<b>Figura 4.</b> La expresión de NUAK1 correlaciona positivamente con SALL2 y se asocian con supervivencia celular frente a privación de glucosa.	17
<b>Figura 5.</b> Vista general del gen de <i>NUAK1</i> .	42
<b>Figura 6.</b> El promotor de NUAK1 tiene una isla CpG.	44
<b>Figura 7.</b> NUAK1 está regulado por un enhancer distal.	45
<b>Figura 8.</b> Esquema de las marcas de histonas.	47
<b>Figura 9.</b> La correlación entre los niveles de ARN mensajero de SALL2 y NUAK1 es tejido específica.	50
<b>Figura 10.</b> Correlación positiva entre <i>SALL2</i> y <i>NUAK1</i> desde distintas plataformas.	52
<b>Figura 11.</b> Estrategia experimental utilizada en células HEK293.	54
<b>Figura 12.</b> Estrategia experimental utilizada en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF).	55
<b>Figura 13.</b> El ARNm <i>NUAK1</i> incrementa sus niveles de forma correlativa con la sobreexpresión de SALL2.	57
<b>Figura 14.</b> Los promotores <i>NUAK1</i> humano y <i>Nuak1</i> de ratón presentan sitios de unión para SALL2.	59
<b>Figura 15.</b> Promotor de <i>Nuak1</i> murino aumenta su actividad al sobreexpresar Sall2-GFP.	61
<b>Figura 16.</b> Estrategia para clonar el fragmento de 1413pb del promotor de <i>Nuak1</i> de ratón.	63
<b>Figura 17.</b> Estrategia para clonar el fragmento de 228pb promotor de <i>Nuak1</i> de ratón.	64
<b>Figura 18.</b> La actividad de los diferentes fragmentos del promotor de <i>Nuak1</i> incrementa al sobreexpresar Sall2-GFP.	65
<b>Figura 19.</b> Diseño y estandarización de los partidores para ChIP-qPCR.	67
<b>Figura 20.</b> SALL2 se une a la región proximal del promotor de <i>NUAK1</i> .	69
<b>Figura 21.</b> SALL2 y NUAK1 incrementan sus niveles de forma transitoria frente a estrés metabólico por carencia de glucosa.	71
<b>Figura 22.</b> NUAK1 no presenta cambios en su expresión de proteínas ni ARNm frente a privación de glucosa o tratamiento con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	73
<b>Figura 23.</b> NUAK1 incrementa sus niveles de forma correlativa con la inducción de SALL2.	75
<b>Figura 24.</b> <i>NUAK1</i> incrementa sus niveles proteicos y de ARNm frente a privación de glucosa al inducir SALL2 en células HEK293.	76
<b>Figura 25.</b> <i>Nuak1</i> incrementa sus niveles proteicos y de ARNm frente a privación de glucosa al inducir Sall2 en células MEF.	78



<b>Figura 26.</b> No se observan diferencias en la muerte celular frente a estrés metabólico en presencia o ausencia de SALL2 en células HEK293.	79
<b>Figura 27.</b> No se observan diferencias en la muerte celular al inducir SALL2 en células MEF.	80
<b>Figura 28.</b> Inhibición de NUA1K1 revierte el efecto pro-supervivencia de SALL2 frente a estrés metabólico por carencia de glucosa.	81
<b>Figura 29.</b> Células tratadas con el inhibidor de NUA1K1 HTH-01-015 presentan menor número de vacuolas al silenciar <i>Sall2</i> .	83



## ABREVIATURAS

<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMP:</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMPK:</b>	Quinasa activada por AMP
<b>AP4:</b>	Proteína adaptadora 4
<b>ARK:</b>	Proteína relacionada con AMPK
<b>ARK5:</b>	Proteína relacionada con AMPK 5 (también llamada NUAK1)
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm:</b>	ARN mensajero
<b>ARNseq:</b>	Secuenciación de ARN
<b>ATM:</b>	ataxia telangiectasia mutado
<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato
<b>BRSK1/2:</b>	Quinasa selectiva de cerebro 1 y 2
<b>CDP/Cut11:</b>	Proteína de desplazamiento CCAAT/ Proteína 1 tipo Cut
<b>ChIP:</b>	Inmunoprecipitación de cromatina
<b>ChIP-qPCR:</b>	Inmunoprecipitación de cromatina asociada a PCR cuantitativa en tiempo real
<b>ChIPseq:</b>	Inmunoprecipitación de cromatina asociada a secuenciación
<b>CK2:</b>	Caseína quinasa 2
<b>CRISPR/Cas9:</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespa- ciadas/ proteína 9 asociada a CRISPR
<b>CTGF:</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>DBD:</b>	Dominio de unión a ADN
<b>DEPC:</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DGB:</b>	Glioblastoma diferenciado
<b>DMEM:</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOX:</b>	Doxociclina
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiamintetraacético
<b>FBS:</b>	Suero Bovino Fetal
<b>GFP:</b>	Proteína Fluorescente Verde
<b>GTEX:</b>	Proyecto de expresión genotipo-tejido
<b>H3K27Ac:</b>	Acetilación de la lisina 27 de la histona H3
<b>H3K27me3:</b>	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
<b>H3K4me1:</b>	Monometilación de la lisina 4 de la histona H3
<b>H3K4me3:</b>	Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3
<b>HBS:</b>	Tampón salino de HEPES
<b>HEK293</b>	Riñón embrionario humano (línea celular)
<b>HEPES:</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
<b>IGF-1:</b>	Factor de crecimiento tipo insulina 1
<b>LKB1:</b>	Quinasa de hígado B1

<b>MAF:</b>	Factor activador de macrófagos
<b>MARK1-4:</b>	Quinasa reguladora de afinidad de microtúbulos 1-4
<b>MEF:</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón
<b>MELK:</b>	Quinasa cremallera de leucina materna embrionaria
<b>miR:</b>	Micro ARN
<b>MLC2:</b>	Cadena liviana de la miosina 2
<b>MMP2/9:</b>	Metaloproteinasas de matriz 2/9
<b>MYPT-1:</b>	Target 1 de la miosina fosfatasa
<b>NLS:</b>	Señal de localización nuclear
<b>NP-40:</b>	Nonil fenoxipolietoxietanol
<b>NRF2:</b>	factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide
<b>NUAK1:</b>	Quinasa nueva (Nua) 1 (proteína humano o ratón, según la nomenclatura sugerida por la guía oficial de NCBI)
<b><i>NUAK1:</i></b>	Gen <i>NUAK1</i> humano
<b><i>Nuak1:</i></b>	Gen <i>Nuak1</i> murino
<b>NuRD:</b>	Complejo desacetilasa y de remodelación de nucleosomas
<b>OLIG2:</b>	Factor de transcripción de oligodendrocitos 2
<b>p75NTR:</b>	Receptor de neurotrofinas p75
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PLK1:</b>	Quinasa tipo Polo 1
<b>PNUTS:</b>	Subunidad regulatoria de PP1
<b>POU3F2:</b>	Dominio POU, clase 3, factor de transcripción 2
<b>PP1:</b>	Proteína fosfatasa 1
<b>qPCR:</b>	PCR cuantitativa
<b>Q-Rich:</b>	Dominio rico en glutamina
<b>RD:</b>	Dominio represor
<b>RNAseq:</b>	Secuenciación de ARN
<b>SALL2:</b>	Proteína tipo-Spalt 2 (proteína humano o ratón, según la nomenclatura sugerida por la guía oficial de NCBI)
<b><i>SALL2:</i></b>	Gen <i>SALL2</i> humano
<b><i>Sall2:</i></b>	Gen <i>Sall2</i> murino
<b>SDS:</b>	Docecilsulfato sódico
<b>SIK1-3:</b>	Quinasa inducible por sal
<b>SOX2:</b>	SRY (Región Y determinante del sexo)-Box 2
<b>SPI-1:</b>	Isla de patogenicidad de Salmonella 1
<b>TAE:</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TCGA:</b>	Atlas del genoma del cáncer
<b>TENS:</b>	Tris-EDTA-NaOH-SDS
<b>TGF-β:</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>Tm:</b>	Temperatura de fusión
<b>TPC:</b>	Células propagadoras de tumor
<b>TPM:</b>	Transcritos por millón

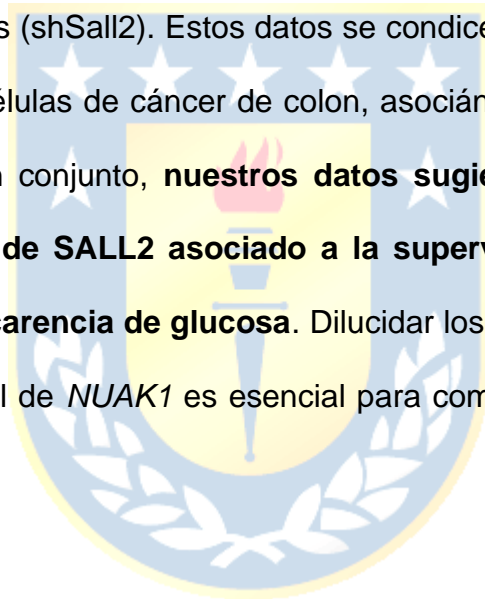
**TSS:** Sitio de inicio de la transcripción  
**UTR:** Región no traducida  
**ZF:** Dedos de Zinc



## RESUMEN

El estrés metabólico en cáncer es un paso crítico para la migración, invasión y metástasis. NUAK1, un miembro de la familia de quinasas relacionadas a AMPK (ARKs), se encuentra desregulado en algunos tipos de cáncer. Su sobreexpresión promueve migración, metástasis y **supervivencia celular** frente a distintos contextos, incluyendo **estrés metabólico**. Datos de nuestro laboratorio muestran que NUAK1 es inducido transcripcionalmente frente a la carencia de glucosa; sin embargo, se desconocen los mecanismos que participan en esta respuesta. Se ha propuesto que SALL2, un factor de transcripción con roles duales en el cáncer podría estar involucrado. Aunque SALL2 generalmente actúa como un supresor tumoral, en condiciones de estrés metabólico su expresión aumenta y contribuye a la supervivencia en células MEF; sin embargo, el mecanismo mediante el cual SALL2 ejerce este rol no ha sido reportado. Para investigar la relación entre NUAK1 y SALL2, se realizaron análisis bioinformáticos utilizando bases de datos como miPanda y R2, los cuales mostraron una correlación positiva entre los niveles de SALL2 y NUAK1 en varios tejidos. De acuerdo con esos análisis, encontramos una dependencia de SALL2 para el incremento en la expresión de NUAK1 frente a estrés metabólico por carencia de glucosa. Con el fin de determinar si NUAK1 es un blanco directo de SALL2, se analizó el promotor de *NUAK1* humano y *Nuak1* de ratón, en los cuales se encontraron sitios consenso de unión a SALL2 conservados entre ambas especies. Ensayos de gen reportero de luciferasa demostraron que la ganancia de función de SALL2 incrementa la actividad del promotor *Nuak1*, mientras que estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostraron que SALL2 se une al promotor *NUAK1*. Al comprobar el rol pro-supervivencia de SALL2 ante estrés metabólico en

diferentes modelos, se encontraron tendencias controversiales. Solo se observó el incremento en la supervivencia celular dependiente de SALL2 en modelos de pérdida de función (silenciamiento), y la tendencia fue similar a los datos previos usando células MEF silvestres y deficientes de Sall2. Más aún, nuestros estudios sugieren que existe **una dependencia de NUAK1 para el rol pro-supervivencia de SALL2**. De forma interesante, la inhibición de NUAK1 en condiciones de alta glucosa, induce la formación de vacuolas que se corresponden con el fenotipo de un tipo de muerte celular conocida como methuosis, las cuales son más abundantes en células shCtrl respecto a las silenciadas (shSall2). Estos datos se condicen con observaciones previas del laboratorio en células de cáncer de colon, asociándose SALL2 con la generación de methuosis. En conjunto, **nuestros datos sugieren a NUAK1 como un blanco transcripcional de SALL2 asociado a la supervivencia celular frente a estrés metabólico por carencia de glucosa**. Dilucidar los mecanismos normales de regulación transcripcional de *NUAK1* es esencial para comprender su desregulación en cáncer.



## ABSTRACT

Metabolic stress in cancer is critical for migration, invasion, and metastasis. NUAK1, a member of the AMPK-related kinases (ARKs) family, is deregulated in some types of cancer. NUAK1 overexpression promotes cell migration, metastasis, and **survival** in different contexts, **including metabolic stress**. Data from our laboratory show that NUAK1 is transcriptionally induced by glucose deprivation; however, the mechanisms involved in this response are unknown. It has been proposed that SALL2, a transcription factor with dual roles in cancer, may be implicated. Although SALL2 generally acts as a tumor suppressor, under conditions of metabolic stress, its expression increases and contributes to cell survival in MEF cells; however, the mechanism by which SALL2 exerts this role has not been reported. Bioinformatic analyses were performed using databases such as miPanda and R2, which showed a positive correlation between SALL2 and NUAK1 levels in several tissues. Accordingly, we found SALL2 dependence for the increase of NUAK1 expression against metabolic stress due to glucose deficiency. To determine whether NUAK1 is a direct target of SALL2, we analyzed the promoter of human *NUAK1* and mouse *Nuak1*, in which we found consensus SALL2 binding sites conserved in both species. Through luciferase reporter gene assays, we demonstrated that SALL2 gain-of-function increases *Nuak1* promoter activity, while chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies showed that SALL2 binds to the NUAK1 promoter. Controversial trends were found when testing the pro-survival role of SALL2 against metabolic stress in different models. The SALL2-dependent increase in cell survival was only observed in loss-of-function models (silencing), similar to previous data using wild-type and SALL2-

deficient MEF cells. Moreover, our results **suggest a dependence on NUAK1 for the pro-survival role of SALL2**. Interestingly, NUAK1 inhibition under high glucose conditions induced vacuole formation corresponding to the phenotype of a type of cell death known as methuosis, which is more abundant in shCtrl cells than silenced (shSall2) cells. These data are consistent with previous observations from the laboratory in colon cancer cells, associating SALL2 with the generation of methuosis. **Our data suggest NUAK1 as a transcriptional target of SALL2 associated with cell survival under metabolic stress by glucose deprivation**. Elucidating the normal mechanisms of transcriptional regulation of NUAK1 is essential to understanding its dysregulation in cancer.

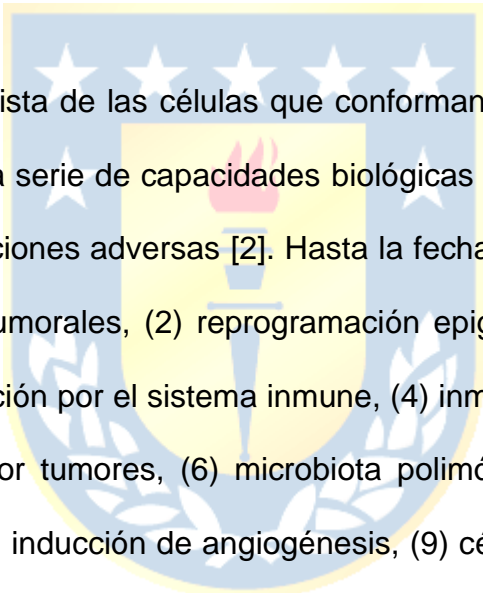




# 1. INTRODUCCIÓN

## Cáncer y estrés metabólico

El cáncer es un conjunto de enfermedades heterogéneas con características en común, principalmente la proliferación descontrolada que afecta la integridad y funcionalidad del tejido afectado. En el año 2020, se reportaron 10 millones de muertes causadas por esta patología a nivel mundial, situándola como la segunda causa de muerte por enfermedad [1].



Desde un punto de vista de las células que conforman un tumor, éstas se caracterizan por poseer una serie de capacidades biológicas que les permiten sobrevivir y proliferar en condiciones adversas [2]. Hasta la fecha se han descrito 14: (1) evasión de supresores tumorales, (2) reprogramación epigenética no mutacional, (3) evasión de la destrucción por el sistema inmune, (4) inmortalidad replicativa, (5) inflamación promovida por tumores, (6) microbiota polimórfica, (7) activación de invasión y metástasis, (8) inducción de angiogénesis, (9) células senescentes, (10) inestabilidad genómica y mutaciones, (11) **resistencia a la muerte celular**, (12) desregulación del metabolismo celular, (13) desbloqueo de plasticidad fenotípica y (14) mantenimiento de la señalización proliferativa.

Dentro de estas capacidades, destacamos la supervivencia frente a estrés, entendiéndose como estrés celular a cualquier condición o estímulo que afecta la homeostasis y conduce a un comportamiento anormal o muerte prematura de las células [3].


Las células tumorales, debido a su alta tasa de proliferación, generan poblaciones heterogéneas, quedando las células más internas con menor acceso a nutrientes y oxígeno. Esto conduce a un estado de estrés metabólico que retrasa el crecimiento. Sin embargo, a través de un mecanismo de adaptación metabólica, las células sobreviven y, seguido de la inducción de angiogénesis, éstas recuperan la disponibilidad de nutrientes y oxígeno [4]. **La supervivencia frente a estrés metabólico es crítica para la progresión tumoral.**

Estas adaptaciones frente a estrés metabólico son posibles gracias a mecanismos moleculares que regulan la bioenergética celular, modulan la biosíntesis de macromoléculas y mantienen el balance redox [5]. En este aspecto, cobra especial relevancia la quinasa activada por AMP (AMPK), que es un regulador clave del crecimiento celular y la homeostasis bioenergética. AMPK actúa como un biosensor de la relación AMP:ATP, aumentando su actividad cuando esta relación crece [6], favoreciendo los procesos que generan o preservan el ATP celular e inhibe procesos que consumen ATP [7]. AMPK también responde frente a estrés oxidativo, manteniendo el balance redox y cumpliendo así un rol pro-supervivencia [8], [9]. La activación de AMPK en condiciones de estrés metabólico requiere de la fosforilación en su residuo de treonina 172 por la quinasa de hígado B1 (LKB1) [10].

AMPK es un complejo formado por una subunidad catalítica alfa, y dos subunidades regulatorias: beta y gamma. Esta última une a las moléculas de AMP [6]. Su subunidad alfa forma parte de una familia de 13 miembros (incluyendo a AMPK), conocidos como “quinzasas relacionadas con AMPK” (ARKs)[11].

## Proteínas relacionadas con AMPK

Las proteínas relacionadas con AMPK (ARKs) son un blanco común de la quinasa de hígado B1 (LKB1) [11]. Se han descrito 13 miembros, incluyendo a AMPK: quinasas nuevas (nua) 1 y 2 (NUAK1/2), quinasas inducibles por sal (SIK1-3), quinasa cremallera de leucina materna embrionaria (MELK), quinasas reguladoras de la afinidad de microtúbulos (MARK1-4) y quinasas selectivas de cerebro (BRSK1/2). Sus funciones se resumen en la **tabla 1**.



Quinasa	Nombres alternativos	Función	Ref.
<b>NUAK1</b>	ARK5	Metabolismo Respuesta a estrés Apoptosis y senescencia Fibrosis	[12]– [17]
<b>NUAK2</b>	SNARK	Metabolismo Ciclo celular	[16], [18], [19]
<b>SIK1</b>		Metabolismo Polarización de membrana	[20], [21]
<b>SIK2</b>	QIK	Metabolismo Fibrosis Migración Pluripotencialidad	[22]– [26]
<b>SIK3</b>	QSK	Metabolismo	[26]
<b>MELK</b>		Maduración de ovocito	[27]
<b>MARK1-4</b>		Organización de microtúbulos Metabolismo Inflamación Estrés oxidativo	[28]– [32]
<b>BRSK1</b>	Sad-b o SAD-1	Polarización de membrana y liberación de vesículas sinápticas Ciclo celular y daño al ADN Metabolismo	[33], [34]
<b>BRSK2</b>	Sad-a o SAD-2	Polarización de membrana y liberación de vesículas sinápticas Metabolismo	[35], [36]

**Tabla 1. Proteínas relacionadas a AMPK.** Resumen de las proteínas relacionadas a AMPK y sus roles descritos. Traducida y actualizada desde Molina y colaboradores [37].

## NUAK1

### i. Roles de NUAK1

Dentro de las ARKs, nuestro laboratorio centra su atención en ARK5, también conocida como NUAK1, debido a que ha sido identificada como un marcador de mal pronóstico en diversas neoplasias [38]–[42], lo que la convierte en una quinasa de interés para el estudio del cáncer. NUAK1 fue identificada y caracterizada el año 2003 por Suzuki y colaboradores como una quinasa que responde frente a estrés metabólico por carencia de glucosa, **favoreciendo la supervivencia celular** [43], [44].

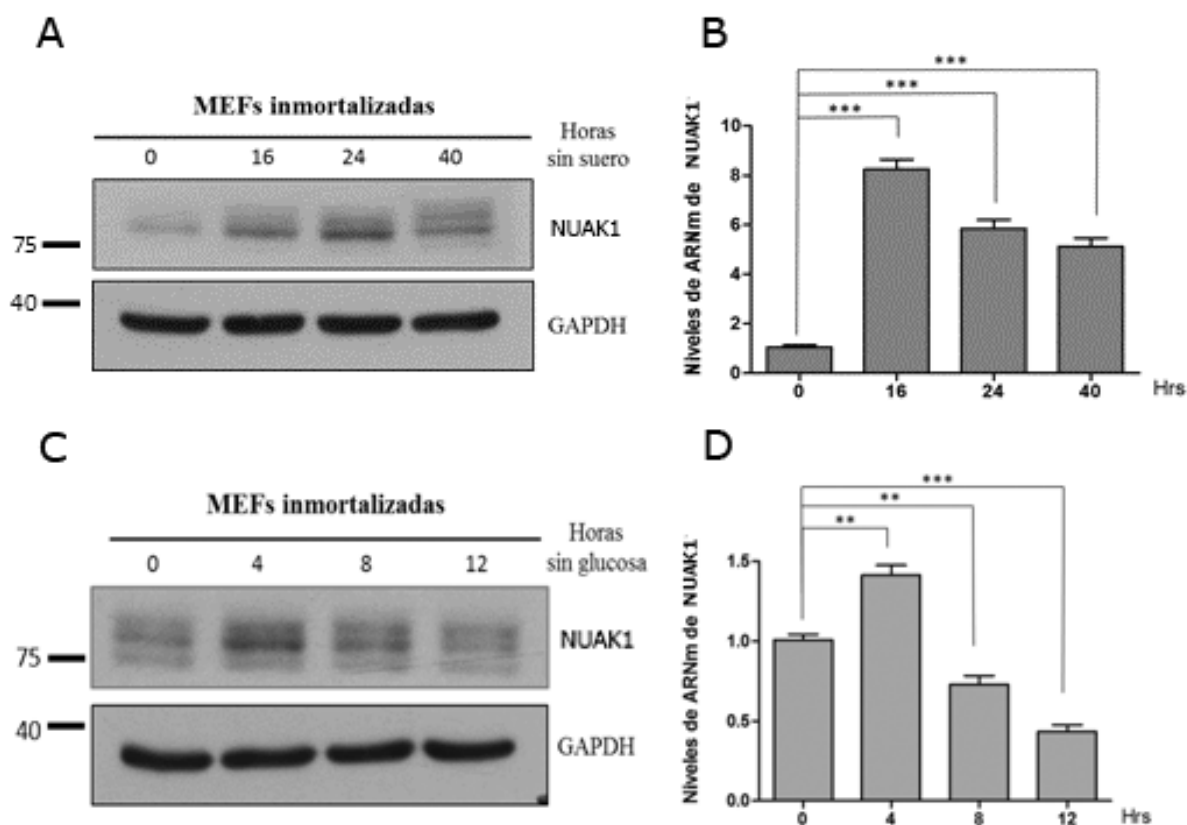
NUAK1 participa además en migración, invasión, metástasis e inflamación [38], [45]–[49]. En respuesta a agonistas que inducen desprendimiento celular, NUAK1 fosforila al complejo formado por el target-1 de la miosina fosfatasa (MYPT-1) y proteína fosfatasa-1 $\beta$  (PP1 $\beta$ ), lo que impide la desfosforilación de la cadena liviana reguladora de la miosina-2 (MLC2) y conduce a la activación de la miosina [45]. La fosforilación de MLC2 es esencial para regular diversos procesos, incluyendo polaridad celular, adhesión y otras funciones contráctiles en células no musculares [50]. El silenciamiento de NUAK1 disminuye los niveles de ARNm de metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP2/9) [38] y su activación, de forma dependiente de la vía de señalización de IGF-1 [39], [51]. Esto se condice con una correlación positiva entre los niveles de ARNm de *NUAK1* y *MMP2/9* en distintas líneas de cáncer colorrectal esporádico [42].

Uno de sus blancos directos es p53, el cual al ser fosforilado por NUA1, regula la proliferación celular a través de la inducción transcripcional de p21, lo que conduce al arresto del ciclo celular [52]. Adicionalmente, NUA1 fosforila a la quinasas ATM [53], la cual a su vez fosforila a p53, aumentando su estabilidad [54]. Sin embargo, el silenciamiento de NUA1 conduce a pérdida de ATP y colapso de células de hepatoma p53<sup>-/-</sup> que expresan c-MYC y AKT, sugiriendo un rol prosupervivencia de NUA1 independiente de p53 [55]. De forma interesante, estudios de nuestro laboratorio demuestran que NUA1 se acumula en el citosol frente a estrés metabólico y oxidativo [56] y cumple diferentes roles metabólicos de forma dependiente de su localización [12]. NUA1 citosólico participa en la producción de ATP mitocondrial e incrementa la capacidad glicolítica frente a la inhibición de la mitocondria. Por otro lado, NUA1 nuclear es esencial para la reprogramación metabólica [12]. Un estudio del mismo año muestra que NUA1 nuclear se asocia con interactores de la proteína fosfatasa 1 (PP1) y fosforila a su subunidad reguladora (PNUTS). La inhibición de NUA1 disocia la unión entre PNUTS y la cromatina, reduce la actividad del “splicesoma” y suprime la síntesis del ARN naciente. Más aún, en células transformadas por c-MYC, la inhibición de NUA1 induce acumulación global de la ARN polimerasa II, pero no incrementa la síntesis de ARNm [57].

NUA1 es un componente clave para la supervivencia frente a estrés oxidativo, ya que favorece el importe al núcleo del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide (NRF2), el principal factor de respuesta a estrés oxidativo [17]. Un estudio reciente realizado en células de cáncer de colon HCT116 resistentes a oxi-

platino (HCT116-or), mostró que la inhibición del eje KIF20A/NUAK1/Nrf2/GPX4 induce ferroptosis e incrementa la sensibilidad a esta droga [58].

Datos de nuestro laboratorio muestran que NUAK1 aumenta sus niveles, tanto de proteínas como de ARNm, frente a privación de suero y glucosa (**figura 1**), **su-  
giriendo un efecto transcripcional.**



**Figura 1. NUAK1 responde frente a estrés metabólico aumentando sus niveles, tanto de proteínas como de ARNm.** Análisis de los niveles de NUAK1 (ARK5) mediante Western blot (**A**) y PCR en tiempo real (**B**) frente a estrés metabólico. Células MEFs fueron sometidas a la ausencia de suero durante 0, 16, 24 y 40 horas. Las células fueron colectadas a las horas respectivas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles de NUAK1. GAPDH fue usado como control de carga (**A**) y RNA Pol II como gen normalizador (**B**). **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ) (Modificado desde Palma M. Tesis de pregrado, 2013).

## ii. Regulación de NUAK1

La regulación de NUAK1 se ha estudiado a nivel postraducciona, postranscripcional y transcripcional. La regulación postraducciona de NUAK1 está dada por las quinasas LKB1, Akt, NDR2, CDK y PLK1. Tanto LKB1 como NDR2 fosforilan en el residuo de Thr211 del sitio activo (T loop). Estudios *in vitro* mostraron que NUAK1 aumenta su actividad 10 a 20 veces tras ser fosforilada por LKB1 [11]. Akt, por su parte, activa a NUAK1 mediante la fosforilación en su residuo de serina 600 y se asocia a supervivencia [53] e invasión [51]. Tanto NDR2 [59] como Akt fosforilan a NUAK1 a través de la señalización del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1). Por su parte, CDK fosforila a NUAK1 en su residuo de serina 445, lo que conduce a la unión con la quinasa tipo polo (PLK1), que fosforila a NUAK1 en dos residuos de serina no catalíticos (Ser476 y Ser480). Esto permite su ubiquitinación y posterior degradación [60].

La regulación postranscripcional está dada por moléculas pequeñas de ARN, conocidas como microARN (miR). Los miR tienen como blanco a los ARN mensajeros, pudiendo actuar mediante la degradación del ARNm e inhibiendo su traducción [61]. Los miR descritos hasta la fecha que tienen a NUAK1 como uno de sus blancos se resumen en la **tabla 1**.

miARN	Contexto celular	Referencia
miR-204	NSCLC Carcinoma hepatocelular	[62], [63] [64]
miR-424-5p	Cáncer hepático/ colangiocarcinoma	[65], [66]
miR-1182	Colangiocarcinoma	[12]
miR-145	Colangiocarcinoma	[67]
miR-145a-5p	Carcinoma nasofaríngeo	[68]
miR-203	Carcinoma de cabeza y cuello	[69]
miR-211	Melanoma	[70]
	Alzheimer	[71]
miR-96	Cáncer de páncreas	[72]
miR-622	Cáncer gástrico	[73]
	Cáncer de mamas	[74]
miR-1275	Cáncer de mamas	[75]
miR-30b-5p	Cáncer de próstata	[76]
miR-642a-5p	Cáncer de próstata	[77]
miR-125b	Cáncer de vejiga	[75]

**Tabla 2. Regulación postranscripcional de *NUAK1*.** Resumen de los microRNAs descritos como reguladores negativos de *NUAK1*.

Respecto a la **regulación transcripcional** de *NUAK1*, es muy poco lo que se conoce. Hasta la fecha, se han descrito a c-MAF [78], [79], MAFB [79], Nrf2 [17] y TGF- $\beta$  [80] como reguladores transcripcionales de *NUAK1*.

MAFB y c-MAF son miembros de la familia de factores de transcripción large-MAF. El factor activador de macrófagos (MAF) es una familia de oncogenes, identificado por primera vez en el genoma del retrovirus transformante aviar, AS42. Esta familia de factores de transcripción se divide en dos subgrupos de acuerdo con su tamaño molecular. Los MAF grandes, de 240-340 aminoácidos, son **c-MAF**, MafA/L-Maf, **MAFB** y NRL, mientras que los MAF pequeños, de 150-160 aminoácidos, son MAFK, MAFF, MAFG y MAFT [81], [82]. **La regulación sobre *NUAK1* depende de la señalización vía IGF-1** e induce invasión celular en mieloma múltiple [79]



y tumorigénesis en linfoma angioinmunoblástico de células T [78]. El factor nuclear tipo eritroide 2 (Nrf2) es el principal factor de respuesta frente a estrés oxidativo. La inducción transcripcional de NUA1 por Nrf2 se asocia a mayor supervivencia celular [17]. El factor transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) participa en diversos procesos, incluyendo diferenciación, migración, arresto del ciclo celular, fibrosis, mantenimiento de la pluripotencialidad, entre otros [80]. Dentro de sus múltiples blancos se encuentran las proteínas NUA1 y NUA2, las cuales tienen efectos opuestos en la retroalimentación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /SMAD en células de fibroblastos de piel. Mientras que NUA2 actúa como un regulador positivo de la vía, NUA1 la inhibe [80]. Contrariamente, un estudio reciente determinó que NUA1 promueve fibrosis mediante la activación de las vías YAP y TGF- $\beta$ /SMAD en fibroblastos derivados de pulmón y riñón, siendo a su vez activado por estas vías, creando una retroalimentación positiva que conduce a fibrosis persistente [13]. Los autores sugirieron que estos resultados contradictorios podrían explicarse por el modelo de estudio y el ambiente local.

Puesto que ninguno de estos estudios descritos fue realizado frente a estrés metabólico, y a que ni c-MAF, MAFB ni Nrf2 participan en esta respuesta, surge la necesidad de conocer un regulador transcripcional de NUA1 en este contexto. Esto es relevante, ya que el estrés metabólico es una condición a la que están expuestas las células cancerosas. Además, **la regulación transcripcional de NUA1 ha sido escasamente descrita hasta la fecha.**

Análisis bioinformáticos realizados previamente en nuestro laboratorio sugieren posibles reguladores transcripcionales de *NUAK1*, entre los que se encuentran E2F, SPI-1, YY1, YY2, CDP/Cut1, JunB, p53, Myc y SALL2 (Venturelli K, tesis de pregrado, 2016).

Dentro de estos posibles reguladores transcripcionales, **datos previos de nuestro laboratorio sugieren al factor de transcripción SALL2 como un candidato para regular a NUAK1 frente a estrés metabólico.**

## **SALL2**

### **i. Familia de proteínas Spalt-like**

Las proteínas Spalt son factores de transcripción presentes en vertebrados e invertebrados. Se caracterizan por la presencia de múltiples motivos de dedos de Zn a lo largo de su secuencia y un dominio rico en glutamina, que permite su interacción con otras proteínas [83]. En vertebrados, las proteínas tipo Spalt presentan 4 parálogos, conocidos como SALL1-4 (**Spalt-like**) [83]. Las proteínas SALL cumplen diversas funciones durante el desarrollo embrionario, entre las que se encuentran regular la migración, mantenimiento de la pluripotencialidad y supervivencia celular. Su desregulación se ha asociado con diversas patologías, incluyendo el cáncer [84], [85]. La participación de los diferentes miembros de la familia SALL en cáncer depende de la proteína SALL involucrada y el contexto tumoral. SALL1-3 presentan un rol dual, mientras que SALL4 es un oncogén altamente caracterizado (revisado en [86]).

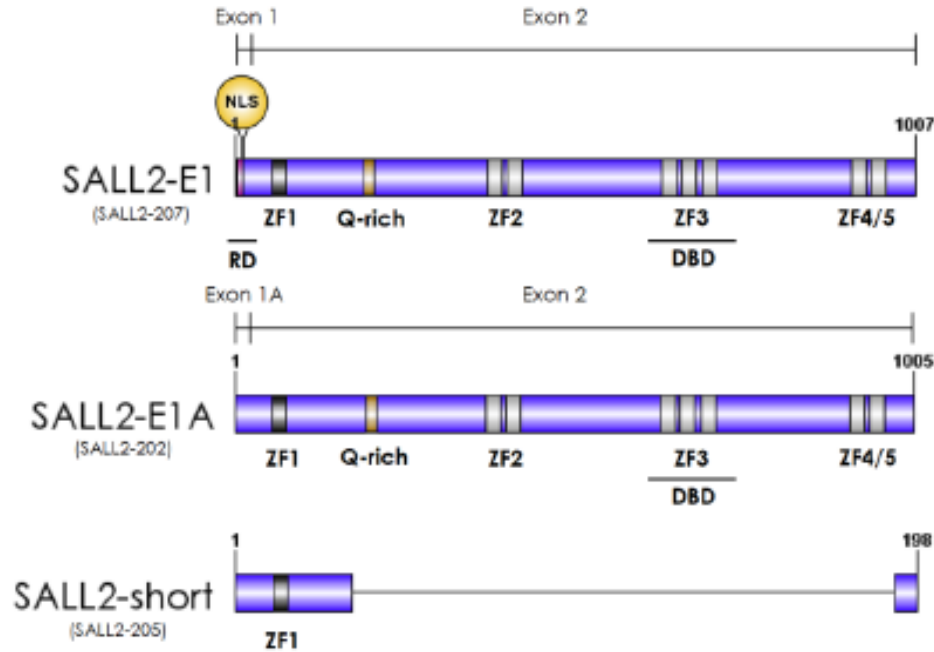
El extremo C-terminal de SALL2 es el que presenta menor homología con los demás miembros de la familia [87], ya que carece de la “caja-SAL”, distintiva de todos los otros miembros de la familia [88]. Adicionalmente, el motivo consenso de unión de SALL2 (GGG(C/T)GGG) [89] es diferente al de otros miembros de la familia. SALL1 se une a secuencias ricas en AT [ATAA(A/T)(A/T)] [90], SALL3 se une a dodecámeros que contengan el sitio AATATT [91] y SALL4 reconoce el sitio ACAATGT [92]. Un estudio reciente demostró que el dedo de Zn ZFC4, compartido por SALL1, SALL3 y SALL4, pero no por SALL2, se une a secuencias que contengan el tetranucleótido AATA [91].

## ii. Isoformas de SALL2

SALL2 presenta dos isoformas principales, que resultan del uso alternativo de dos promotores: P1 y P2 [93]. Ambas isoformas comparten el segundo exón, el cual codifica para todos los motivos de dedos de Zn, y difieren en el primer exón: E1 y E1A, respectivamente [93] (desde ahora, la isoforma canónica se mencionará como E1 y la alternativa, como E1A). Esta diferencia se traduce en una variación de 25 residuos de aminoácidos en el dominio N-terminal de la proteína (**figura 2**). Es importante destacar que la isoforma E1 tiene un motivo represor conservado en todos los miembros de la familia SALL (MSRRKQRKPQ), no presente en la isoforma E1A, que permite la unión al complejo desacetilasa y de remodelación de nucleosomas (NuRD) [94]. Como dice su nombre, el complejo NuRD se caracteriza por su doble función como represor (mediante su actividad desacetilasa) y remodelador de cromatina ATP-dependiente (mediante su asociación con la ATP-asa Mi-2) [94], [95]. Datos públicos de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuen-

ciación (ChIP-seq) provenientes del consorcio fase 3 de ENCODE, muestran la presencia de una tercera isoforma, más corta que E1 y E1A, la cual carece de sitios de unión a ADN [96] (**figura 2**).

La expresión de la isoforma E1 se restringe a ciertos tejidos, como timo, testículos y colon, mientras que la isoforma E1A tiene expresión ubicua [97]. En conjunto, las evidencias sugieren un rol isoforma-específico. De forma interesante, recientemente nuestro laboratorio publicó un estudio que integró datos públicos y propios de ChIP-seq y RNA-seq en diferentes contextos celulares, con el objetivo de caracterizar la función de las tres isoformas principales de SALL2. Se demostró que E1 presenta menor expresión que la isoforma alternativa, E1A, y tiene un rol principalmente represor, al correlacionar su unión al ADN con marcadores de represión en ausencia de E1A (H3K27me3), mientras que la unión de E1A correlaciona con cromatina transcripcionalmente activa (H3K27Ac y H3K4me3). Esto sugiere además que E1A tiene un potencial rol regulador sobre E1 [96]. Por otro lado, la isoforma corta tiene localización citosólica, a diferencia de E1 y E1A, que se encuentran principalmente en el núcleo. Análisis ontológicos sugieren que esta isoforma corta no es funcionalmente relacionada con E1 y E1A [96].



**Figura 2. Representación esquemática de las isoformas de SALL2.** Rectángulos grises representan los motivos de dedos de Zinc (gris oscuro: tipo C2HC; gris claro: tipo C2H2). Rectángulo rosado en el extremo N-terminal representa la región de 12 residuos de aminoácidos conservada que une al complejo NuRD, conocida como dominio represor (RD). SALL2 E1A y la isoforma corta (SALL2-short) no presentan este dominio. El rectángulo amarillo entre los dedos de zinc 1 y 2 (ZF1 y ZF2, respectivamente) representa a una región rica en glutamina (Q-rich) conservada entre las proteínas SALL. El círculo amarillo en la región N-terminal muestra la secuencia de localización nuclear (NLS) descrita solo para SALL2 E1, SALL4A y SALL4B. **ZF:** Dedo de Zinc; **Q-Rich:** región rica en glutamina; **RD:** dominio de represión; **DBD:** dominio de unión al ADN; **NLS:** Secuencia de localización nuclear (modificado desde [85]).

### iii. Funciones de SALL2

El factor de transcripción SALL2 participa en diversos procesos celulares normales y patológicos. Se ha descrito la expresión de una forma truncada de SALL2 debido a una mutación que genera un codón de término prematuro en coloboma ocular en humanos. Esto fue corroborado en modelos de ratones *Sall2*<sup>-/-</sup>, los cuales presentan retrasos en el cierre de la fisura óptica y un fenotipo de coloboma de la retina anterior después del nacimiento [98]. SALL2 también participa en la diferen-

ciación neuronal. En modelos murinos se demostró que SALL1, SALL2 y SALL4 son necesarios para el correcto cierre del tubo neural [99]. Además, SALL2 interacciona con el receptor de neurotrofinas p75NTR. Esta interacción se interrumpe durante la diferenciación neuronal dependiente del factor de crecimiento neural (NGF), donde SALL2 es translocado al núcleo. En este contexto, SALL2 regula el crecimiento de neuritas y conduce a un arresto del ciclo celular a través de la inducción transcripcional de p21 [100]. Adicionalmente, SALL2 inhibe la proliferación celular a través de la represión transcripcional de las ciclinas D1 y E1 [101] y el incremento en la expresión de p16 [102].

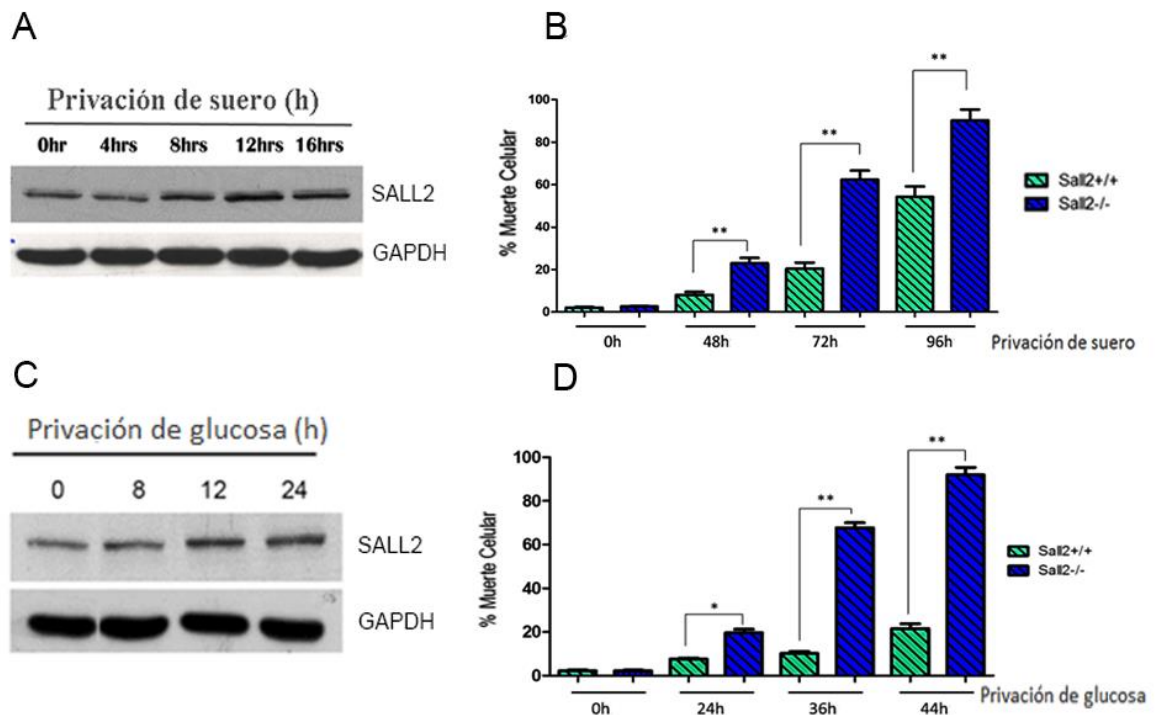
El mantenimiento de la pluripotencialidad de células madre es un rol común entre las proteínas de la familia SALL, lo que se asocia tanto a sus funciones en desarrollo embrionario como en cáncer (revisado en [85]). SALL2 y SALL4 son necesarios para la autorrenovación de células madre hematopoyéticas [103]–[105]. Además, SALL2 es parte de un grupo de 4 factores de transcripción centrales que incluyen a SOX2, OLIG2 y POU3F2, cuya expresión es suficiente para reprogramar células de glioblastoma diferenciado (DGB) en células propagadoras de tumores tipo célula madre (TPC) [106]. Adicionalmente, la pérdida de función de este grupo de factores de transcripción centrales, incluyendo a SALL2, se asocia con menor malignidad en tumores cerebrales en ratones [107] y células de glioblastoma U87 [108].

Si bien SALL2 cumple un rol oncogénico en glioblastoma [106]–[108], otras evidencias sugieren a SALL2 como un supresor tumoral (revisado en [85], [87],

[109]). En conjunto, se puede inferir que el rol de SALL2 en cáncer depende del contexto celular.

#### iv. SALL2 y estrés celular

Se ha observado que SALL2 responde frente a estrés celular de forma dependiente del contexto. Por ejemplo, SALL2 aumenta sus niveles frente a estrés genotóxico inducido por los antineoplásicos doxorubicina [110] y etopósido [88]. Frente a estrés genotóxico, SALL2 cumple un rol pro-apoptótico, induciendo transcripcionalmente la expresión de BAX [88], [110] y NOXA [110]. Los estudios realizados no discriminan entre las isoformas de SALL2. Por otro lado, un estudio realizado por Liu y colaboradores demostró que SALL2 es inducido en respuesta a privación de factores de crecimiento, siendo requerido para la inducción de genes de respuesta a carencia de suero y para detener la síntesis de ADN [111]. Además, frente a privación de glucosa y de suero, SALL2 aumenta sus niveles proteicos. Sin embargo, contrario a lo observado en un contexto de estrés genotóxico, los datos sugieren que **SALL2 cumple un rol pro-supervivencia en células MEF frente a estrés metabólico por carencia de suero (figura 3A y B) y de glucosa (figura 3C y D)**. Si bien no se ha descrito si es sólo una isoforma o son ambas las que participan en esta respuesta, cabe destacar que en las células MEF la isoforma predominante es E1A [101].

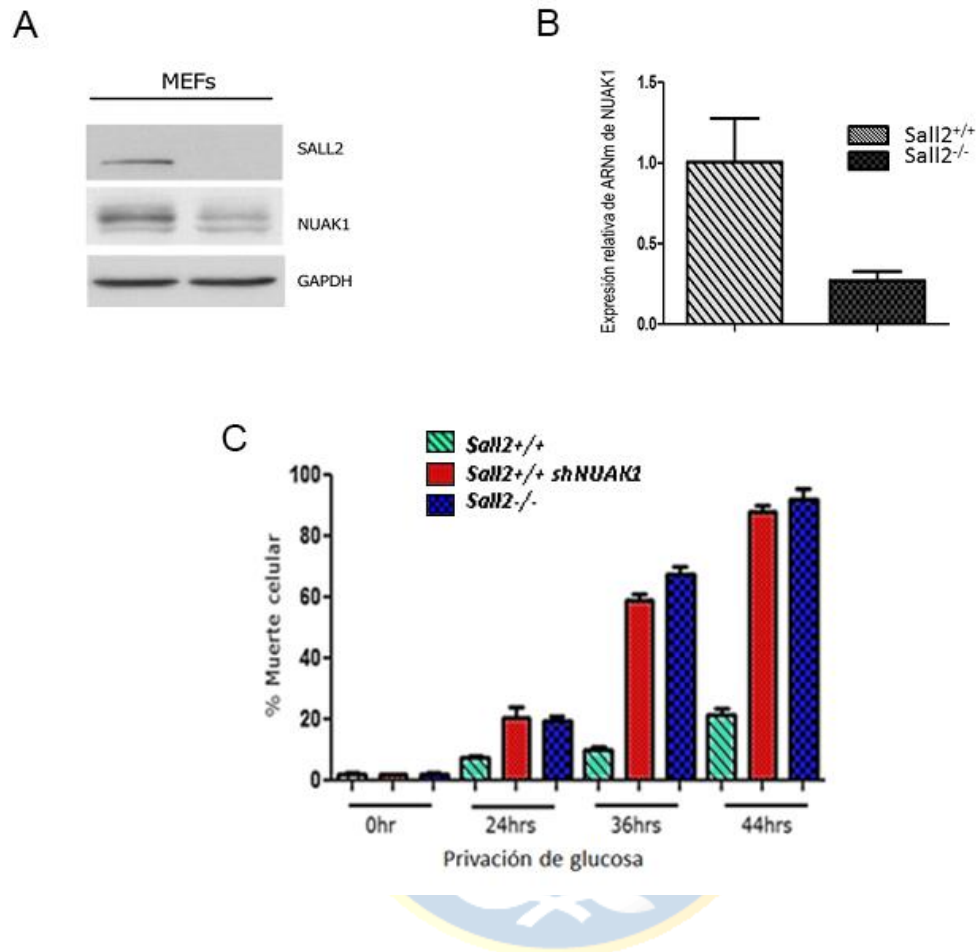


**Figura 3. SALL2 responde frente a estrés metabólico, aumentando sus niveles y favoreciendo la supervivencia celular.** (A y B) Análisis de los niveles de SALL2 mediante Western blot. Células MEFs fueron sometidas a la ausencia de suero por 0, 4, 8, 12 y 16 horas (A) y de glucosa por 0, 8, 12 y 24 horas (C). Las células fueron colectadas a las horas respectivas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles de SALL2. GAPDH fue utilizado como control de carga. (B y D) Células MEF immortalizadas *Sall2*<sup>+/+</sup> y *Sall2*<sup>-/-</sup> fueron sometidas a privación de suero por 0, 48, 72 y 96 horas (B) y de glucosa por 0, 24, 36 y 44 horas (D). Se comparó la muerte celular utilizando la técnica de azul de tripán. **Análisis estadístico:** Test-t (P<0.05) (Modificado desde Riffo E. Tesis de pregrado, 2014).

Datos de nuestro laboratorio sugieren a la **inducción transcripcional de NUAK1 como un posible mecanismo mediante el cual SALL2 ejerce su rol pro-supervivencia frente a estrés metabólico**. Se ha observado que en células MEF deficientes de SALL2 (*Sall2*<sup>-/-</sup>), los niveles de NUAK1, tanto de ARNm como de proteínas, son menores que en su contraparte silvestre (*Sall2*<sup>+/+</sup>) (**figura 4A y**



**B).** En adición, al silenciar NUA1 en células MEF *Sall2*<sup>+/+</sup>, el porcentaje de muerte celular es similar al observado en células MEF *Sall2*<sup>-/-</sup> (**figura 4C**).



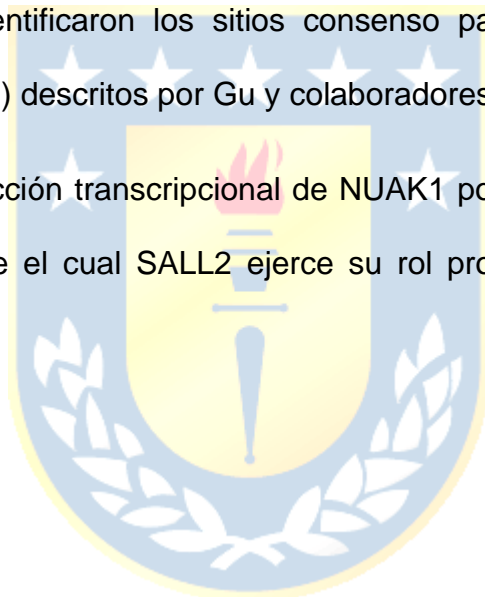
**Figura 4. La expresión de NUA1 correlaciona positivamente con SALL2 y se asocian con supervivencia celular frente a privación de glucosa (A y B)** Análisis de los niveles de NUA1 mediante Western blot (**A**) y PCR en tiempo real (**B**). Células MEFs *Sall2*<sup>+/+</sup> y *Sall2*<sup>-/-</sup> fueron colectadas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles de NUA1 (**C**) Porcentaje de muerte celular de MEFs inmortalizadas *Sall2*<sup>+/+</sup>, *Sall2*<sup>+/+</sup> shNUAK1 y *Sall2*<sup>-/-</sup> frente a 0, 24, 36 y 44 horas de privación de glucosa, evaluada por el método de exclusión de azul de tripán. Ensayo realizado en triplicado (Riffo E, Unidad de Investigación de Magíster, 2014).

## 2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

Considerando los siguientes antecedentes:

- SALL2 y NUAK1 están involucrados en supervivencia celular frente a estrés metabólico en células MEF.
- Existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de SALL2 y NUAK1.
- Al analizar el promotor de *NUAK1*, tanto de humano como de ratón (*Mus musculus*), se identificaron los sitios consenso para la unión de SALL2 (GGG(T/C/A)GGG) descritos por Gu y colaboradores.

Proponemos la inducción transcripcional de NUAK1 por SALL2 como un posible mecanismo mediante el cual SALL2 ejerce su rol pro-supervivencia frente a estrés metabólico.



### 3. HIPÓTESIS

Los datos ya presentados nos permiten proponer la siguiente hipótesis:

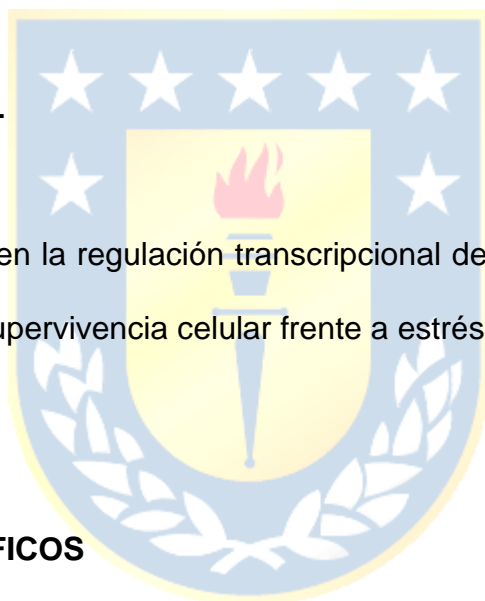
**La inducción transcripcional de NUA1 es un mecanismo mediante el cual SALL2 favorece la supervivencia celular frente a estrés metabólico.**

### 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol de SALL2 en la regulación transcripcional de NUA1 y la asociación de esta regulación con supervivencia celular frente a estrés metabólico.

### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si NUA1 es un blanco transcripcional directo de SALL2.
2. Determinar si SALL2 promueve supervivencia celular frente a estrés metabólico a través de la inducción transcripcional de NUA1



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### i. Reactivos

Para facilitar la comprensión, los reactivos se han dividido en 4 tablas que contienen la información de plásmidos (**tabla 3**), oligonucleótidos (**tabla 4**), anticuerpos (**tabla 5**) y otros reactivos (**tabla 6**) como se detalla a continuación:

Plásmido	Uso	N°Cat/Ref.
Antígeno T grande SV40	Inmortalización de células MEF	Addgene Plasmid # 9053 [113]
pGL3 basic	Ensayos de gen reportero de luciferasa (vector vacío)	Donado por Dr. Thomas Benjamin (Dana Farber, Harvard Cancer Center, USA) [114]
pGL3-mNuak1 promotor 2008pb	Ensayos de gen reportero de luciferasa (promotor de Nuak1 murino, 2008pb)	Generado en el laboratorio (Venturelli, K, tesis de pregrado, 2016)
pGL3-mNuak1 promotor 1413pb	Ensayos de gen reportero de luciferasa (promotor de Nuak1 murino, 1413pb)	Generado en esta tesis
pGL3-mNuak1 promotor 1008pb	Ensayos de gen reportero de luciferasa (promotor de Nuak1 murino, 1008pb)	Generado en el laboratorio (Venturelli, K, tesis de pregrado, 2016)
pGL3-mNuak1 promotor 228pb	Ensayos de gen reportero de luciferasa (promotor de Nuak1 murino, 228pb)	Generado en esta tesis
pcDNA3	Vector control de expresión ectópica de SALL2-GFP para ensayos de gen reportero de luciferasa, Western blot y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).	[110]
pcDNA3-mSALL2-GFP	Expresión ectópica de SALL2-GFP para ensayos de gen reportero de luciferasa, Western blot y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	[110]
RSV-beta-Gal	Ensayos de gen reportero de luciferasa (control interno)	[110], [115]
pCMV2(NH)-Flag	Vector control de expresión ectópica de Flag-SALL2 para ensayos de Western blot, PCR cuantitativa en tiempo real e Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	[100]
pCMV2(NH)-Flag-hSALL2	Expresión ectópica de Flag-SALL2 para ensayos de Western blot, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) e Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	[100]
pCW57-MCS1-2A-MCS2	Subclonamiento para la generación de modelos inducibles	Addgene Plasmid #71782
pCW57-MCS1-2A-MCS2-SALL2E1	Expresión inducible de SALL2 E1	Generado en el laboratorio
pCW57-MCS1-2A-MCS2-SALL2E1A	Expresión inducible de SALL2 E1A	Generado en esta tesis

**Tabla 3.** Plásmidos.

Secuencia (5'→ 3')	Blanco	Uso
F: AGAGCCTCCGTTATCCAACA R: TGCTGAGCCACTGTCTGCTA	<i>Sall2</i> ratón (zona delecionada en modelos <i>Sall2</i> <sup>-/-</sup> )	Genotipificación de <i>Sall2</i> en ratones
F: GTTGGGAGGAAGCATGTAAGA R: CCAGAGACCAGGAAGTACAAAC	ARNm <i>NUAK1</i> humano	PCR cuantitativa en tiempo real
F: GATGAGATTGGCATGGCTTT R: CACCTTCACCGTTCCAGTTT	ARNm $\beta$ -Actina humano	
F: TCCTCGTCCTTCCTTTGCTT R: TGAGAACTGTACGTTGCCT	ARNm <i>Nuak1</i> ratón	
F: ACTGTGCGGAACTCCATCAA R: AGCCAGGTTCTGGAACCTCAA	ARNm <i>RNA Pol II</i> (común humano, rata y ratón)	
F: GGCTGTTGCTAGAGTCCAGTGT R: GGAGCGTCCATGAGGTGGC	Fragmento -1413...+1	Clonar promotor de <i>Nuak1</i> de ratón
F: GCAGACCGGTATGGACTACAAAGACGATGA R: TGGCAGCGACCAGGAAATGC	Región N-terminal de SALL2 E1A humana	Clonar SALL2 E1A inducible
F: AGCAAGTCCGATGGTCTCATCT R: GATGAGTGGCATGCAGGTTGAGT	Fragmento -2051...-1803	
F: ACTCAACCTGCATGCCACTCATC R: TGCCAGAGTAATGGCCTGAAACAC	Fragmento -1826...-1502	Inmunoprecipitación de cromatina
F: GGCAGTGTTCAGGCCATTACTCT R: AGGTGCAGCCCTTCTCTACATT	Fragmento -1530...-1383	
F: AAAAGAACCGCCATGCGATCTG R: GGCCTTGGGAGATTCCTTTCACT	Fragmento -1344...-1065	
F: AAATCGCCTCCTGCTCAGCAAA R: AAGGCCAGGGACGTGGAAGA	Fragmento -1045...-870	
F: TCCGTCCCTGACTCTCCTTTCTT R: GGCGCCCTTCATTTCTTGTA	Fragmento -774...-554	
F: TGAGTCACCGCCTGTAACCGA R: GAAGGGACCGGAAATTCCA	Fragmento -554...-291	
F: GTCGCGACAGCTCCAT R: GTGTTTGCAGGAGGGAGGGGA	Fragmento -212...+27	
F: AAGCCAATCAGAGCCACAGC R: TCCACCTTTCACCATTTCCCC	Región de unión a SALL2 en promotor de p21 (Control positivo)	Control positivo de Inmunoprecipitación de cromatina
F: TGCAGTGTGGCTTGCATAT R: TGGGTGGACAGTGAGCTATG	Región no relacionada	Control negativo de Inmunoprecipitación de cromatina

**Tabla 4.** Partidores.

Anticuerpo	Dilución	Uso
Anti-SALL2 (HPA004162, SIGMA)	1:1000	Western blot (Anticuerpo primario)
ARK5 (CS4458S, Cell signaling)	1:1000	Western blot (Anticuerpo primario)
Anti- $\beta$ -Actin (C4, Santa Cruz Biotechnology)	1:10000	Western blot (Anticuerpo primario)
Anti-FLAG (M2, SIGMA)	1:5000	Western blot / Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (Anticuerpo primario)
IgG anti-mouse HRP	1:20000	Western blot (Anticuerpo secundario)
IgG anti-rabbit HRP	1:20000	Western blot (Anticuerpo secundario)

**Tabla 5.** Anticuerpos.

Reactivo	Concentración	Uso
Doxiciclina	1µg/mL	Inducción de SALL2 en modelos TET-ON
HTH-01-015	5-10µM	Inhibición de NUAK1

**Tabla 6.** Otros reactivos.

ii. **Clonamiento y generación de constructos**

a. **Fragmentos del promotor de *Nuak1* de ratón**

El plásmido **pGL3-mNuak1 promotor 1413pb** se obtuvo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del plásmido **pGL3-mNuak1 promotor 2008pb (Venturelli, K, tesis de pregrado, 2016) (figura 18)**, mientras que el plásmido **pGL3-mNuak1 promotor 128pb** se generó por digestión enzimática a partir de **pGL3-mNuak1 promotor 1008pb (Venturelli, K, tesis de pregrado, 2016)**, como se detalla en la sección de resultados (**figura 19**).

Para verificar la correcta orientación de los fragmentos clonados, se incubaron 50µL de bacterias quimiocompetentes DH5α con 10µL del producto de ligación por 20min en hielo. Pasado este tiempo, se indujo shock térmico a 42°C por 40s, seguido de incubación en hielo por 2 minutos. Las bacterias fueron recuperadas en medio LB (Luria-Bertani, MO BIO Laboratories, Inc.) sin antibióticos por una hora a 37°C con agitación (210rpm). Las bacterias fueron sembradas en una placa conteniendo agar LB/Ampicilina (100ng/mL) y se incubaron a 37°C por 16h. Las colonias obtenidas se crecieron de forma individual en caldo LB/Ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación (210rpm). Se colectaron 1,5mL de bacterias, las cuales fueron sometidas a centrifugación por 10min a 9000rpm a temperatura ambiente. Se

descartó el sobrenadante y los pellet fueron resuspendidos en 300µL de solución tampón TENS (Tris-HCl 10mM (pH=8,0); EDTA 1mM (pH=8,0); NaOH 0,1N; SDS 0.5% p/v). Se incubó por 10min en hielo y se agregaron 15µL de Acetato de sodio 3M (pH=5,2), agitándose en vórtex. Las muestras fueron centrifugadas por 15min a 14000xg (fuerza centrífuga relativa, RCF) a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 1mL de isopropanol para precipitar el ADN, repitiendo el paso de agitación y centrifugación. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 800µL de etanol frío 70% v/v para lavar el pellet. Se realizó nuevamente agitación y centrifugación, para luego secar el ADN precipitado a temperatura ambiente, el cual, una vez seco y sin rastros de etanol, fue resuspendido en 20µL de agua ultrapura con 1µg/mL de ARNasa A (Life Technologies). Para verificar la ligación, se liberó el fragmento con las enzimas KpnI y NcoI. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v disuelto en solución tampón TAE (*Tris-Ácido Acético* EDTA; Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM) pH=7,6 y Bromuro de Etidio 0,5µg/mL (APEX). Se utilizó el marcador GeneRuler (Thermo Scientific) como estándar de peso molecular. Las bandas fueron visualizadas usando transiluminador UV. Tras seleccionar las colonias que contuvieran el producto deseado, se generó un stock de glicerol utilizando 800µL del cultivo bacteriano y 200µL (20% v/v) de glicerol, el cual fue almacenado a -80°C.

Para obtener el plásmido a gran escala, se creció 1mL del cultivo bacteriano en 400mL de caldo LB/Ampicilina a 37°C por toda la noche con agitación (210rpm). El cultivo fue centrifugado a 5000rpm en centrífuga Hitachi CR22GIII (3920xg) durante

15min 4°C. La purificación de plásmidos a gran escala se realizó usando el kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos obtenidos fueron cuantificados por absorbancia a 260nm usando el lector de microplacas TECAN Infinite 200 PRO (Life Sciences).

#### **b. Clonamiento de SALL2-E1A para modelos celulares inducibles**

En base a que ambas isoformas de SALL2 difieren solo en la porción N-terminal, se realizó el subclonamiento de la isoforma E1A humana a partir del vector lentiviral *pCW57-MCS1-2A-MCS2* que contiene la isoforma E1 humana, disponible previamente en el laboratorio. El diseño experimental es mostrado en el **Anexo 4**.

El subclonamiento de la isoforma E1A de SALL2 humana con epítipo Flag (Flag-hSALL2 E1A) se realizó en el vector lentiviral *pCW57-MCS1-2A-MCS2* (Addgene plasmid # 71782), portador del gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias, y gen de resistencia a puromicina para su selección en células de mamíferos. Este constructo se generó para expresar de forma inducible en células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> la proteína recombinante SALL2 E1A humana.

Para generar el constructo, se siguió el procedimiento esquematizado en el **Anexo 4**. Se amplificó mediante PCR 100 ng de la región N-terminal de Flag-hSALL2-E1A, ya sintetizada (GenScript) y disponible en el laboratorio, con la polimerasa KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems), según recomendaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación de PCR en todos los casos fue: una denaturación inicial de 3min a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificación



consistentes en 98°C por 20s, 69°C por 15s y 72°C por 20s, más un ciclo de extensión final a 72°C por 10min.

Con el objetivo de confirmar el tamaño de las amplificaciones, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5µg/mL). A partir del gel se purificaron los fragmentos generados utilizando un Kit de extracción de gel GeneJET™ (ThermoFisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de la porción N-terminal purificados, se digirieron con las enzimas de restricción Agel y BamHI a 37°C durante 16 horas.

Por otra parte, se realizó la digestión del vector *pCW57-MCS1-2A-MCS2-E1* con las enzimas de restricción BamHI y AvrII (New England Biolabs) para obtener de esta forma la región C-terminal de SALL2 que es constante entre ambas isoformas y se caracteriza por contener todos los dominios de dedos de zinc de la proteína. Una vez que se obtuvieron los fragmentos, se procedió a digerir el vector *pCW57-MCS1-2A-MCS2* vacío con las enzimas Agel y AvrII a 37°C por 16 horas para finalmente ligar estos fragmentos.

Luego de confirmar la digestión de los fragmentos mediante gel de agarosa al 1% y su posterior purificación, se cuantificó la cantidad de ADN generado mediante TECAN y se procedió a una reacción de ligación utilizando T4 ADN ligasa (ThermoFisher Scientific) en su buffer respectivo (Fermentas), utilizando 100 ng del vector, los fragmentos de interés generados en una relación molar de 1:3 y polietilenglicol 5% v/v y se llevó a 10 µL con agua grado biología molecular. La reacción se dejó du-

rante 16 horas a 37°C. De esta manera se obtuvo el constructo con la isoforma SALL2-E1A humana.

Una vez obtenido el vector lentiviral *pCW57-MCS1-2A-MCS2* resistente a ampicilina conteniendo a la isoforma E1A subclonada, se realizó la transformación bacteriana con *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes por *shock* térmico, usando el procedimiento previamente descrito.

### iii. Cultivo celular

#### a. **Condiciones de crecimiento y tratamientos**

Las células HEK293 (human embryonic kidney, ATCC CRL-1573) fueron cultivadas en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Hyclone) alto en glucosa (4.5g/L), suplementado con suero bobino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) al 10% v/v (Biological Industries), L-glutamina 2 mM y mezcla de antibióticos Penicilina (50 U/mL) y Estreptomina (50  $\mu$ g/mL) (HyClone). Para expandir las células se utilizó tripsina al 0,05% (Hyclone).

Las células MEF (mouse embryonic fibroblast) fueron cultivadas en condiciones similares a las HEK293, pero reemplazando la marca de FBS (Sigma). Para expandir las células se utilizó tripsina al 0,25% (Hyclone).

Modelos inducibles HEK293 *SALL2* KO *Flag-mSall2* TET-ON y MEF *Sall2* KO *Flag-mSall2* TET-ON generadas en el laboratorio fueron cultivadas en DMEM suplementado en las mismas condiciones que el modelo anterior, difiriendo en el uso de

suero certificado para modelos inducibles por tetraciclina (Biological Industries). La inducción se realizó mediante la adición de Doxociclina hasta una concentración final de 1µg/mL por 24 horas.

Para el estrés metabólico, se retiró el medio de las células, se lavaron cuidadosamente con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*, NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM) pH 7,4 y se agregó DMEM fresco sin glucosa o sin suero, respectivamente, suplementado con FBS, L-glutamina y mezcla de antibióticos en las mismas concentraciones ya descritas. Para las células inducibles, el tratamiento se realizó 24h tras la inducción. En el caso de las células transfectadas, la privación de glucosa se realizó 48h post-transfección.

Para el estrés oxidativo, se utilizó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a concentraciones de 100, 250 y 500µM, además de su vehículo (PBS) por 4h. Las condiciones elegidas fueron previamente estandarizadas en el laboratorio para la inducción de SALL2 (Álvarez, C, tesis de pregrado).

El inhibidor de NUA1 HTH-01-015 se utilizó en concentraciones de 5 y 10µM por 48 horas (concentración stock: 10mM). Previo a los tratamientos con inhibidor de NUA1 HTH-01-015, se realizó una estandarización con 2.5, 5 y 10µM del inhibidor, además de su vehículo (DMSO) en placas de 24 pocillos. Tras 48, 60 y 72 horas las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta (protocolo detallado más adelante), con el fin de seleccionar el tiempo y concentraciones óptimos para los ensayos.

Todas las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y testeadas de micoplasma periódicamente (ver protocolo de testeo y limpieza de micoplasma). Todo el material utilizado en cultivo celular fue estéril o previamente autoclavado.

**b. Aislamiento de fibroblastos embrionarios de ratón.**

El modelo murino *Sal12<sup>-/-</sup>* fue obtenido por intermedio de un acuerdo de transferencia de material desde el Dr. Ryuichi Nishinakamura (Kumamoto University, Kumamoto, Japan) a la Dra. Roxana Pincheira (Universidad de Concepción, Chile) en el año 2010. Los fibroblastos embrionarios de ratón se prepararon desde embriones 13,5 días *post coitum*. El saco de embriones se colectó en tubo Falcon de 50mL con PBS a 4°C. El saco fue lavado con PBS frío y dejado en una placa de 10cm para su procesamiento. Se separó cada embrión en una placa de cultivo celular de 6cm diferente, usando pinzas y tijeras desinfectadas con etanol 70%. Se retiraron las capas del saco, desinfectando los instrumentos quirúrgicos con etanol 70% en cada paso. El cuerpo de cada embrión fue separado de sus órganos rojos y su cabeza. Las cabezas fueron congeladas para genotipificar, primero usando congelado rápido en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>l), -196°C) y posterior almacenamiento a -80°C. El tejido restante fue disgregado usando un bisturí estéril. Tras obtener una consistencia homogénea, se centrifugaron por 5min a 1000rpm. Se eliminó el sobrenadante y se incubaron por 1h a 37°C con tripsina 0,25% (Hyclone). Pasada la incubación, se resuspendieron en 1,5mL de DMEM completo a 37°C (pipeteando 10 a 20 veces). Posteriormente, se agregó más DMEM (6mL) y se dejó decantar por 5-10 minutos. El sobrenadante fue sembrado en placa de 10cm, con su respectiva rotulación (nombre, genotipo, número de embrión, pasaje y fecha). Las células fueron incubadas de forma rutinaria (37°C y

5% de CO<sub>2</sub>) hasta alcanzar 90% de confluencia, momento en el cual fueron congeladas.

### **c. Inmortalización de MEF**

La inmortalización de células MEF se realizó utilizando el antígeno T grande del virus de simio SV40, usando un protocolo modificado desde (Zhu 1991). Las células MEF primarias fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2µg del vector de expresión del antígeno T grande SV40 (Addgene #9053). El medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM sin suero, conteniendo la mezcla de transfección. Se incubó por 4-6 horas a condiciones rutinarias de temperatura y CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se reemplazó el medio por DMEM completo. Se congelaron tras 5-6 pasajes a baja densidad.

### **d. Generación de modelos inducibles**

La línea celular HEK293 SALL2<sup>-/-</sup> (generada previamente en el laboratorio [96]) fue transfectada con la isoforma E1A de SALL2 humano unida al epítipo Flag, contenida en el vector lentiviral pcW57-MCS1-2A-MCS2. Para ello, se produjeron partículas virales en células HEK-293T por transfección transitoria con 15 µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 235 µL de medio DMEM sin suero ni antibiótico. En otro tubo se diluyeron 5µg del vector de expresión pcW57-MCS1-2A-MCS2 con SALL2 E1A en 245,45µL de DMEM sin suero ni antibiótico y además se añadieron 5µg y 1µg de los vectores plasmídicos formadores del virus pCMV dR 8.2 y VSV-G, respectivamente, utilizando un sistema de empaquetamiento de segunda generación. Esta

solución se añadió gota a gota sobre la solución con DMEM y lipofectamina. La mezcla se incubó durante 20min a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos lípido-ADN y se agregó cuidadosamente sobre las células HEK293T previamente incubadas en medio libre de suero y antibiótico. Estas células se incubaron en presencia de los complejos, luego de lo cual el medio de cultivo con las partículas virales generadas se recogió a las 24 y 48h, para infectar las células HEK293 SALL2<sup>-/-</sup> mediante dos rondas de infección. La infección se realizó añadiendo la suspensión viral mezclada con medio de cultivo completo sobre las líneas celulares a infectar, junto con 8 µg/mL de polibreno para aumentar la eficiencia de la infección. Dos días después del último ciclo de infección, los cultivos celulares se comenzaron a seleccionar con puromicina (Sigma-Aldrich, USA). Se indujo la expresión de SALL2 con doxociclina (1 µg/mL) durante 3 días y se comprobó mediante la técnica de Western blot.

#### **e. Testeo y limpieza de micoplasma**

Las células fueron descongeladas en frascos de cultivo celular T-25 provistos de filtro, usando medio libre de antibióticos. Se realizaron pasajes, con el objetivo de cumplir por lo menos 7 días libres de antibióticos. El último pasaje debe estar por lo menos 3 días sin cambiar medio antes de su detección. Pasado ese tiempo se colectaron 1-1,5mL del medio en un tubo Eppendorf de 1,5mL. Se centrifugó para separar el debris a 250 x g por 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5mL nuevo. Se centrifugó a 20000 x g por 10 minutos para sedimentar el micoplasma. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 25µL de la solución provista por el kit *EZ-PCR Mycoplasma Test kit* (Biological Industries) y se incu-

bó a 96°C por 3 minutos. La detección de micoplasma se realizó por PCR, usando los reactivos provistos por el kit ya mencionado y según las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación por PCR fueron: 94°C por 30s, seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en: 94°C por 30s, 60°C por 120s y 72°C por 60s. Finalmente se realizó un ciclo consistente en: 94°C por 30s, 60°C por 120s y 72°C por 5 minutos.

La presencia o ausencia de micoplasma se visualizó a través de un gel de agarosa al 1%. Interpretación de resultados:

- La muestra positiva de micoplasma se observa por una banda de 270pb y una de 357pb (control interno).
- La muestra negativa se observa por una banda de 357pb (control interno).

Las células que resultaron ser positivas a micoplasma fueron limpiadas usando el antibiótico Plasmocin (InvivoGen, L:3801A) a una concentración final de 25 µg/mL. Se realizaron pasajes cada 3 días, hasta dejarlas por lo menos dos semanas con el tratamiento. Pasado ese tiempo se volvieron a testear. Tras confirmar la ausencia de micoplasma, fueron congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido para su posterior uso. Se realizó testeo periódico de las células utilizadas en el desarrollo de esta tesis (cada 6 meses).

#### iv. Transfección con Fosfato de Calcio

Las mezclas de transfección contenían los respectivos plásmidos, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y solución HBS 2X (del inglés *HEPES Buffered Saline*, HEPES 50mM, NaCl 280mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.5mM) pH 7,1. Para transfectar, se prepararon las mezclas de plásmidos en las cantidades necesarias para obtener la concentración final requerida con  $\text{CaCl}_2$  (concentración final de 125mM) y se completó con agua grado biología molecular, de modo de tener 125 $\mu\text{L}$  por pocillo (para placas de 6 pocillos). Por separado, se alicuotó HBS 2X, de modo que cada mezcla tuviera 125 $\mu\text{L}$  de HBS por pocillo. Se añadió gota a gota la mezcla de plásmidos sobre el HBS, agitando suavemente con vórtex. A continuación, se retiró cuidadosamente el medio DMEM para luego agregar 1mL de medio fresco. Se repartieron 250 $\mu\text{L}$  de mezcla de transfección a cada pocillo cuidadosamente, evitando despegar las células. Se realizó cambio de medio a las 6 horas post-transfección.

#### v. Ensayos de gen reportero de luciferasa

Luego de 24 horas de transfección, las células fueron lavadas con PBS pH 7.4 frío en tubos Eppendorf de 1.5mL. Se centrifugaron a 2000xg por 5 min a 4°C y el pellet de células se lisó con una dilución 1X de la solución comercial 5X Luciferase Cell Lysis Buffer (New England Biolabs), según las instrucciones del fabricante. 20 $\mu\text{L}$  del lisado se usaron para la medición de actividad de luciferasa o  $\beta$ -galactosidasa, usando el kit Luciferase-Glo® (Promega) o Beta-Glo® (Promega), respectivamente, en placas de 96-well. La medición de luminiscencia se realizó usando el luminómetro



Victor3, Perkin Elmer Wallac. La actividad de luciferasa de cada pocillo se normalizó usando la actividad de  $\beta$ -galactosidasa del pocillo correspondiente.

vi. **Ensayos de muerte celular**

El **ensayo de azul de tripán** se basa en la incapacidad de las células vivas de incorporar este colorante, a diferencia de las células muertas, las cuales pierden la integridad de membrana [116]. Para ello, células HEK293 *SALL2* KO *Flag-mSall2* TET-ON fueron tratadas con o sin 1 $\mu$ g/mL de doxociclina (DOX) por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio por DMEM sin glucosa con o sin DOX por 60 y 72h. Adicionalmente, las células fueron tratadas con 5 y 10 $\mu$ M del inhibidor de *NUAK1* HTH-01-015 o DMSO (vehículo) por 48h. Pasado ese tiempo, se colectó el medio y se depositó en tubos Falcon de 15mL. Luego, se agregó 150 $\mu$ L de tripsina a cada pocillo. Se recolectaron las células usando DMEM completo y se adicionó al tubo Falcon que contenía el medio extraído anteriormente. Se centrifugaron las células por 5 minutos a 1000 rpm. Se eliminó sobrenadante, dejando aproximadamente 1mL en el tubo y se resuspendió. Se tomó una alícuota de 10 $\mu$ L y se mezcló con 10 $\mu$ L del colorante azul de tripán en tubos Eppendorf de 0,6mL. Se dejó reposar por 10 minutos para que las células muertas incorporen el colorante. Luego se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer, contando 4 cuadrantes (1mm<sup>2</sup> cada uno, de 4x4) y promediándolos. Se graficaron por porcentaje de muerte respecto al control (DMEM completo 4.5g/L de glucosa).

El **ensayo de cristal violeta** es un método indirecto para evaluar viabilidad celular, mediante la tinción de las células adheridas a la placa. Se utiliza el colorante cristal violeta, el cual se une a proteínas y ADN. Las células no viables pierden su capacidad de adherirse a la placa, lo que se refleja en una menor tinción con cristal violeta [116]. Para este ensayo, células MEF *Sall2*<sup>-/-</sup>, *Flag-mSall2-E1A* TET-ON fueron tratadas con o sin glucosa durante 48h, en presencia de 10 $\mu$ M del inhibidor de NUA1 HTH-01-015 o su vehículo, respectivamente. Transcurrido ese tiempo, los siguientes pasos se realizaron en mesón a temperatura ambiente. Se removió el medio y se lavó cada pocillo 2 veces con PBS. Se adicionó 1mL de solución fijadora (ácido acético 10% v/v; metanol 10% v/v; agua destilada 80% v/v) y se incubó por 10 minutos. Tras remover la solución fijadora, se adicionó 1mL de solución cristal violeta (colorante cristal violeta 2% p/v; ácido acético 10% v/v; metanol 10% v/v; agua destilada 80% v/v) y se incubó por 10 minutos. Se removió la solución colorante, se lavó con PBS y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se tomaron fotografías. Para cuantificar, las células fueron desteñidas con ácido acético al 10% v/v y se determinó su absorbancia a 590nm.

#### vii. **Obtención de lisados proteicos.**

Para la obtención de proteínas totales, las células fueron colectadas mediante arrastre mecánico con PBS pH 7.4 frío. Luego fueron centrifugadas a 1000rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue lisado con buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4; glicerol 10%; NaCl<sub>2</sub> 200mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM; Tritón X-100 1%; inhibidores de proteasas y de fosfatasa). La cuantificación de las proteínas obtenidas fue realizada mediante el método colorimétrico de reactivo de

Bradford, midiendo la absorbancia a 595nm usando el espectrofotómetro MECASYS-Optizen Pop. Los lisados celulares obtenidos fueron igualados en concentración y denaturados a 100°C por 5 minutos, en presencia de buffer de carga (Tris-HCl 300mM, pH 6.8; SDS al 12% p/v; azul de bromofenol al 0.06 % p/v; β-mercaptoetanol 760mM; Glicerol al 60% v/v).

#### viii. Electroforésis en gel de poliacrilamida y Western blot

Las proteínas fueron separadas utilizando la técnica de electroforesis denaturante (SDS-page) al 8% de acrilamida, utilizando un voltaje constante de 80V y en presencia de un tampón de corrida (Tris 25mM; Glicina 192mM; SDS al 0.1% p/v). Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar pre-teñido Accuruler (MAESTROGEN, No. Cat. # 02102-250). Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Millipore) usando buffer de transferencia frío y fresco (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS al 0.004% p/v; Metanol 20% v/v). La transferencia se realizó por 80 minutos a 100V o por 16 horas a 30V. Las transferencias fueron visualizadas por tinción con Rojo Ponceau (*Ponceau S* (Sigma) 0,1% p/v; ácido acético 5% v/v), el cual es retirado con agua ultrapura.

Para el análisis de proteínas por Western blot, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% disuelta en solución TBS-Tween20 (Tris 20mM; NaCl 500mM; pH 7.4; Tween20 0.05% v/v) por una hora, para impedir uniones inespecíficas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución TBS-Tween20. Los anticuerpos primarios fueron preparados en TBS-Tween20 con las diluciones indicadas (**tabla 5**) e incubados por 2 horas a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C. Tras ser retirados, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5

minutos cada una con solución TBS-Tween20. Los anticuerpos secundarios fueron diluidos en proporción 1:20.000 en solución TBS-Tween20 e incubados por 1 hora, seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución TBS-Tween20. Las proteínas se visualizaron con el sistema quimioluminiscente ECL (GE *Healthcare*). Los análisis densitométricos se realizaron a través del programa ImageJ 1.49q (NIH, USA).

#### ix. Extracción de ARN

Las células fueron colectadas desde placas de 60mm en 500µL de TriZol (Invitrogen) para placas de 60mm. Se incubaron a temperatura ambiente con agitación por 5 minutos y luego se colectaron mediante arrastre mecánico. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Para el aislamiento del ARN, las muestras en TriZol se descongelaron en hielo y se dejaron por 3 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a cada muestra 100µL de cloroformo, se mezcló con agitación vigorosa y se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000xg por 10 minutos a 4°C, obteniendo 2 fases. Se recuperó la fracción superior (acuosa) en un tubo Eppendorf de 1,5mL estéril. La precipitación del ARN fue realizada agregando 500µL de isopropanol. Se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos y luego fueron centrifugadas a 12000xg por 10 minutos. Tras la eliminación del sobrenadante, los pellets fueron lavados con etanol 70% libre de nucleasas a -20°C y se centrifugaron a 7500xg por 5 minutos a 4°C. Se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 30µL de agua pre-tratada con dietilpropilcarbonato (DEPC). Se dejaron hidratar por 5-10 mi-

nutos antes del siguiente paso. Las muestras de ARN purificado fueron tratadas con 2 $\mu$ L de Turbo DNasa (Invitrogen) y 3 $\mu$ L de su correspondiente buffer para eliminar residuos de ADN genómico. La reacción se realizó por 30 minutos a 37°C y se detuvo usando el inactivador de DNasa del mismo kit. Las muestras fueron cuantificadas mediante la absorbancia a 260nm usando el lector de microplacas TECAN Infinite 200 PRO (Life Sciences). También se determinó su absorbancia a 280nm y se calculó la razón A260/280 para determinar la pureza del ARN. Se realizó retrotranscripción del ARN aislado usando la transcriptasa reversa MMLV-RT y su correspondiente buffer, cargando 1  $\mu$ g de ARN, el cual fue previamente anclado con oligos dT (25 $\mu$ M cada uno) por 5 minutos a 70°C. La mezcla fue llevada al termociclador, donde se realizaron los ciclos de temperatura: 25°C por 5 minutos (alineamiento), 42°C por 60 minutos (extensión) y 70°C por 15 minutos (inactivación de la transcriptasa inversa). El ADNc obtenido se almacenó a -20°C para su utilización en PCR cuantitativa (qPCR).

x. **PCR cuantitativa en tiempo real**

La **reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa** (qPCR) se realizó por triplicado utilizando el kit KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Kit (Kapa Biosciences). Las mezclas contenían para cada reacción: 0,4 $\mu$ M de partidores (0,4 $\mu$ L de cada uno), 5 $\mu$ L del kit 2X, 1 $\mu$ L de ADN de copia (ADNc) y agua grado biología molecular hasta completar el volumen final de 10 $\mu$ L. Los ciclos de temperatura fueron: 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación consistentes en 90°C por 5s y 60°C por 10s. Finalmente, se realizó un ciclo para realizar curva de disociación para confirmar la especificidad del producto amplificado, la cual constó de 95, 65 y 95°C

por 30s. La expresión del ARNm de *NUAK1* fue normalizada respecto al ARNm de  $\beta$ -Actina.

**xi. Inmunoprecipitación de cromatina**

**a. Extracción de núcleos**

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se utilizaron células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup>. Se plaquearon 2,5 millones de células en placas de 10cm. 24 horas después, se transfectaron 15 $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-hSall2-Flag o pcDNA3-Flag, respectivamente, usando la técnica de fosfato de calcio. En el caso de la **figura 23D**, previo a su colección las células fueron tratadas por 1 hora con DMEM completo sin glucosa (BI) o su control (DMEM completo 4.5g/L de glucosa). 48 horas post-transfección, las células fueron colocadas en hielo y se lavaron 2 veces con PBS frío. Todos los pasos se realizaron en hielo y las centrifugaciones a 4°C. Se realizó entrecruzamiento con formaldehído 1% (diluido en PBS) por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave (5mL por cada placa de 10cm). Para detener la reacción, se adicionó glicina a una concentración final de 0,125M y se incubó por 5min a temperatura ambiente con agitación suave. Se dieron 2 lavados con PBS frío y se colectaron en 5mL de PBS por cada condición. Se centrifugaron por 5min a 1800rpm, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1mL de buffer de lisis (HEPES 50mM (pH=7,8); MgCl<sub>2</sub> 3mM, KCl 20mM, NP-40 0,1%) con inhibidor de proteasas al 1%. Se incubó en hielo por 10min y se homogenizaron con homogenizador Dounce (20 golpes con bastón B, loose). Se centrifugaron por 5min a 1800rpm, se descartó el sobrenadante y los núcleos se resuspendieron en 300 $\mu$ L de buffer de sonicación (HEPES 50mM (pH=7,9); NaCl 140mM, EDTA 1mM, tritón X-

100 1%; desoxicolato de sodio 0,1%; SDS 0,1%), con inhibidor de proteasas 1%. Se sonicaron, usando el Sonicador Bioruptor PLUS (Diagenode) usando 2 rondas de 20 ciclos cada uno (15s ON, 15s OFF, a alta potencia). Posterior a la sonicación, se centrifugaron por 15 minutos a 14000rpm. Los sobrenadantes se colectaron en un tubo limpio, se cuantificaron y se realizó congelado rápido en nitrógeno líquido previo a su almacenaje a -80°C.

### **b. Inmunoprecipitación**

Al igual que en el paso anterior, todos los pasos siguientes se realizaron en hielo y tanto las centrifugaciones como las agitaciones en agitador rotatorio se hicieron a 4°C. Las muestras fueron cuantificadas mediante la absorbancia a 260nm usando el lector de microplacas TECAN Infinite 200 PRO (Life Sciences). De cada muestra se separaron 2 tubos con 25µg cada uno. Uno de ellos fue usado como input y el otro, para inmunoprecipitar. A los tubos de inmunoprecipitación se adicionó buffer de sonificado hasta completar 500µL. Se realizó un preaclaramiento adicionando 25µL de la resina proteína A/G agarosa (Santa Cruz Biotechnology), agitando por 2h. Pasado este tiempo se separó la resina mediante centrifugación por 5min a 4000rpm, se tomó el sobrenadante y se adicionó 1µL del anticuerpo anti-Flag (M2-Sigma) (concentración final 1:500). Se agitó por toda la noche. Al día siguiente se agregaron 50µL de proteína A/G agarosa y se agitó por 1h. Se centrifugó por 5 minutos a 4000rpm. Tras descartar el sobrenadante, se hicieron lavados de la resina con los siguientes buffer:

- 1 lavado con buffer de sonicación 500mM (HEPES 50mM (pH=7,9); NaCl 500mM, EDTA 1mM, tritón X-100 1%; desoxicolato de sodio 0,1%; SDS 0,1% p/v)
- 2 lavados con buffer de lavado IP (LiCl 500mM; Tris-HCl 100mM (pH=8); NP-40 1% p/v; desoxicolato de sodio 0,1% p/v)
- 1 lavado con Tris-EDTA a pH=8 (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM)

En cada paso, se incubó por 5 minutos con agitación, se centrifugó por 5min a 4000rpm y se descartó el sobrenadante. Después del último paso, se resuspendió la resina con buffer de elusión (NaHCO<sub>3</sub> 50mM; SDS 1% p/v) y se incubó por 15min a 65°C. Cada 3min se dieron golpes suaves con el dedo, con el objetivo de levantar la resina y mejorar la eficiencia. Finalmente, se centrifugó a temperatura ambiente por 1 minuto a 14000rpm, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

### **c. Reversión del entrecruzamiento**

En esta etapa se incluyeron los tubos separados para Input, los cuales se llevaron a 100µL de buffer de elusión. Se adicionó NaCl a una concentración final de 200mM a todos los tubos (Input e inmunoprecipitación) y 10µg de RNasa A. Se incubaron a 65°C por toda la noche. Al día siguiente, se adicionaron 25µg de proteinasa K y se incubaron por 2h a 50°C. Se purificó el ADN usando el kit DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo research), según las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa.



Las mezclas contenían: 0,5 $\mu$ M de partidores (0,5 $\mu$ L de cada uno), 5 $\mu$ L del kit 2X, DMSO 5%, 1 $\mu$ L de ADN en caso de los Input y 3 $\mu$ L de ADN para las muestras inmunoprecipitadas. Se completó con agua grado biología molecular hasta completar el volumen final de 10 $\mu$ L. Los ciclos de temperatura fueron: una desnaturalización inicial de 3min a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación consistentes en 90°C por 5s para desnaturalizar y 65°C por 10s para la extensión. Finalmente, se realizó un ciclo para realizar curva de disociación para confirmar la especificidad del producto amplificado, la cual constó de 95, 65 y 95°C por 30s. La normalización se realizó usando la amplificación de los Input.

xii. **Análisis estadísticos**

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prisma 5, mediante el test t-student con corrección de Welch no pareado. Para obtener estadística, se promediaron por lo menos 3 experimentos independientes.

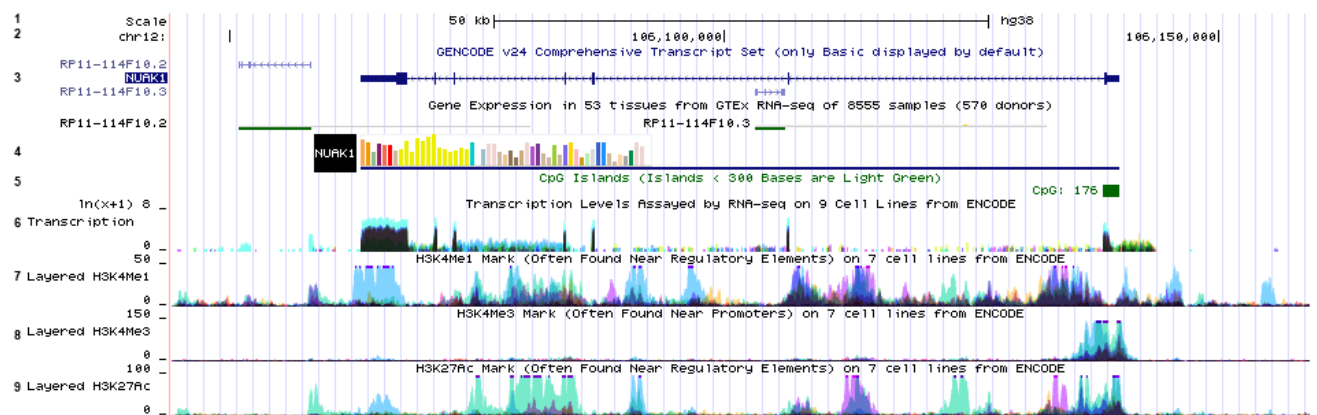
## 7. RESULTADOS

### Objetivo 1: Determinar si NUA1 es un blanco transcripcional directo de SALL2.

Como primera aproximación al estudio de la regulación de NUA1 mediada por SALL2 se procedió a analizar el gen de NUA1 y su región promotora.

#### 1.1 Análisis del gen *NUAK1* y potenciales regulaciones

El gen de *NUAK1* humano se encuentra en la hebra reversa del cromosoma 12q23.3. Según la base de datos ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/>), *NUAK1* presenta 7 exones y 6 intrones, con un tamaño total de 76.694pb, incluyendo las regiones no traducidas (UTRs, por su sigla en inglés: **untranslated region**). La región 5'UTR tiene un tamaño de 1380pb y la región 3'UTR, de 3462pb. Entre las características de *NUAK1* asociadas a su potencial regulación, se identifican: una isla CpG, un enhancer distal, un promotor proximal y marcas epigenéticas (**figura 5**).



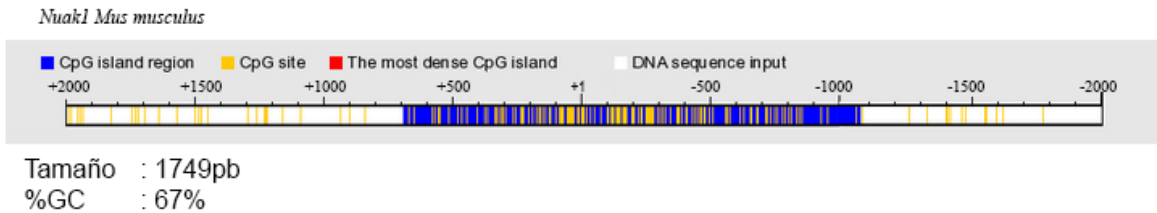
**Figura 5. Vista general del gen de *NUAK1*.** Esquema del gen de *NUAK1* generado a partir de la base de datos ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/>). Desde arriba hacia abajo, se observa: **1:** Escala (50kb); **2:** Ubicación en cromosoma 12; **3:** Esquema general del gen de *NUAK1*. Las líneas horizontales esquematizan las zonas 3' y 5'UTR, en el último y primer exón, respectivamente (de izquierda a derecha). La zona punteada esquematiza a los intrones. Las líneas verticales representan a los exones; **4:** Expresión de *NUAK1* en 53 tejidos estudiados por RNA-seq; **5:** Islas CpG. Se observa una isla CpG a la altura del 5'UTR; **6:** Actividad transcripcional. Se observa transcripción desde parte del promotor proximal (aprox. 1.2kb) hasta la zona 3'UTR; **7:** Marca de monometilación de lisina 4 en la histona H3 (H4K4Me1). Esta señal indica la presencia de enhancer distales y de secuencias río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS); **8:** Marca de trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4Me3). Esta señal indica que existe un promotor proximal activo. Se observa cerca de la zona promotora; **9:** Señal de acetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27Ac). Esta modificación indica que la cromatina se encuentra accesible para transcripción. Se observa a lo largo de todo el gen.

Se entiende por isla CpG como una región de aproximadamente 1000pb con alta densidad (>60%) de sitios CpG (citosinas seguidas por nucleótidos de guanina en dirección 5'→3') [117]. Las citosinas de estas islas CpG pueden ser hipermetiladas, lo que conduciría a la represión del gen, cumpliendo así un rol regulatorio [118]. Aproximadamente el 72% de los promotores humanos tienen islas CpG [119] y la presencia de éstas se asocian con una regulación tejido específica [120]. Usando el programa bioinformático DBCAT (<http://dbcacat.cgm.ntu.edu.tw/>), que predice islas CpG, se identificó una isla CpG tanto en el promotor de *NUAK1* humano como *Nuak1* de ratón (**figura 6**).

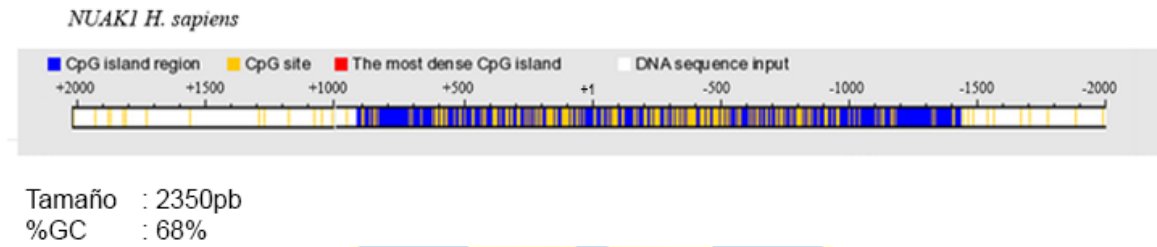
Estudios de captura de conformación de cromosoma (cHi-C) [121] usando la base de datos 3D Genome Browser (<http://3dgenome.fsm.northwestern.edu/index.html>) sugieren que *NUAK1* está regulado por un enhancer distal (**figura 7**). Según la base de datos Ensembl

(<http://www.ensembl.org>), de las 68 células en que fue estudiado este enhancer, sólo se encuentra activo en neutrófilos y monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>).

A



B



**Figura 6. El promotor *NUAK1* tiene una isla CpG.** Se utilizó la herramienta bioinformática DBCAT (<http://dbcat.cgm.ntu.edu.tw/>), que predice islas CpG. Se estudió el promotor y parte de la región 5'UTR de *Nuak1* de ratón (A) y *NUAK1* humano (B) obtenidos desde la base de datos Eukaryotic Database (EPD) (<http://epd.vital-it.ch/>). La isla CpG del promotor de *Nuak1* de ratón presenta una isla CpG de un tamaño de 1749pb. Se encuentra desde la posición +687 en el extremo 5'UTR hasta 1061pb río arriba del gen, con 67% de contenido de CG. Esta isla CpG se encuentra conservada en el gen *NUAK1* humano, en el cual tiene un tamaño de 2350pb, y abarca desde la posición +917, en el extremo 5'UTR, hasta 1432pb río arriba del gen, con un 68% de CG. Debido a que el gen de *NUAK1* se encuentra en la hebra reversa, se utilizó el programa A plasmid Editor (ApE) (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) para obtener el reverso y complementario de la secuencia. Se tomó la secuencia desde 2000pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS), que corresponde a parte del extremo 5'UTR (izquierda) hasta 2000pb río arriba, que corresponden a la zona promotora (derecha).

A



B

Secuencia enhancer posición chr12: 105,784,201-105,784,799

```

AATGAAGGCAGGAAATCAACTTGTAAAGCATCATCAAACCTTTGTCTAGTTTCTTCTTCTTTTAGGCTGACAAC
ATGGTTTTTGAAGGATGAGAAAGCACTTAGAGCGTTAGGGACTCCAGATGTTAGATCACCTGCTCCAGATT
CAGCTGAGACTTGCAAATTTGTTTCATCTAAATTTCTTAAGCTAGTTTCAAGCCTTGGTCCCTGAGGCAGAATTG
AAGACTATAAAAATAACCCCGGTACAACCTCCAGGCTGGAAGACAGATGCTGCAGGCAGAAGTGATTTCCAT
AGTTAGAAGTGCTTCTACTTTGGGGCTGCCCCAGAATTTCCGGAAATGATTAAGGAGATCTGAGGGACCACAG
AGATCAGCAGGAGCAGTTTTTTTTCATTTCCCTGAAGTATGTTTTGGGTATGTTGGTGGATGATGGGAAGGGTTT
GTGGGACAGTTGCCAATGGCACCAGGAAGCAAGGAGCCAGCTCCAAGTCAGTGCTGCCTGGTGTGAGAATA
CCCCATGGCTCTTCTGCATGGACAGGCCTGGGGTTGAGTGTACCGGTGACTGGGAAACACCACAACCTCCCTCT
GCCCCGCTCTGCGAGCA
  
```

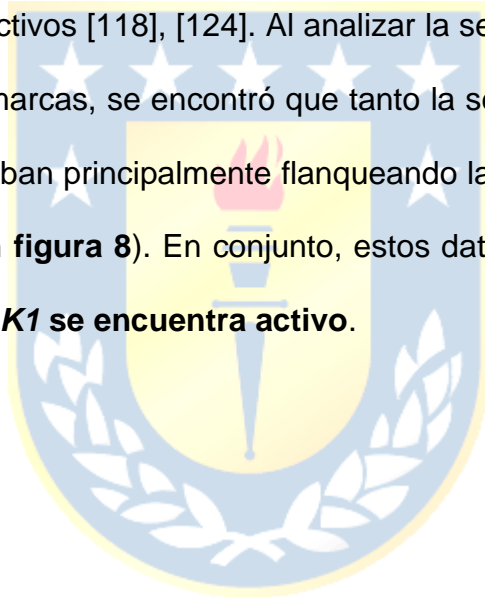
Sitios de unión a SALL2:

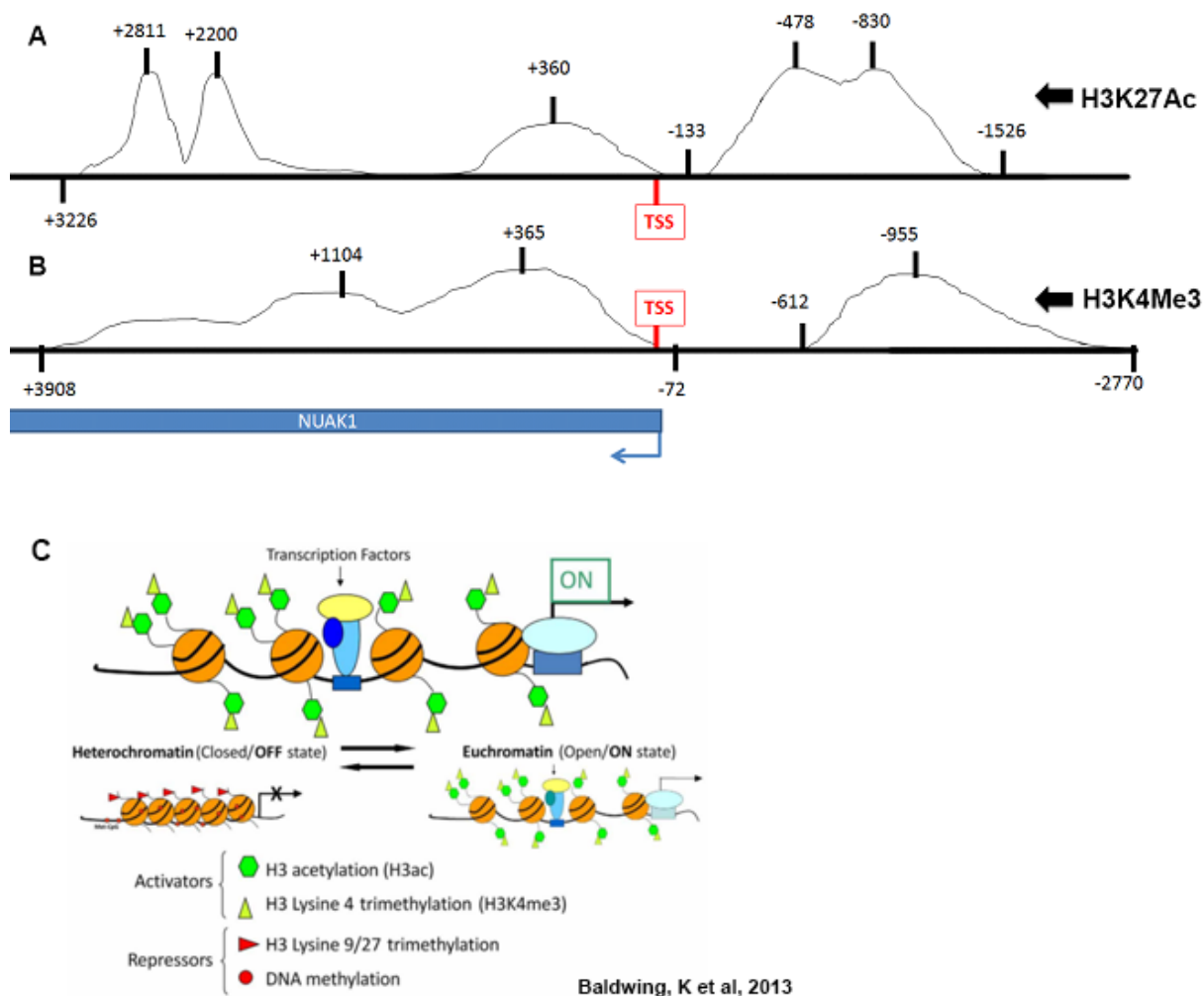
```

GGGCGGG
GGGTGGG
GGGAGGG
  
```

**Figura 7. *NUAK1* está regulado por un enhancer distal.** (A) Se utilizó la herramienta bioinformática 3D Genome Browser (<http://3dgenome.fsm.northwestern.edu/index.html>), que utiliza datos de 3C, 4C, 5C y Hi-C para buscar elementos regulatorios distales. Este enhancer fue encontrado en distintas líneas celulares del sistema inmune. (B) Secuencia del enhancer distal según la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Su ubicación exacta es: [chr12: 105,784,201-105,784,799](http://www.ensembl.org). No presenta sitios de unión para SALL2.

Adicionalmente, desde la base de datos ENCODE se identificaron marcas epigenéticas, tales como la acetilación y metilación de histonas. Estas modificaciones covalentes entregan información acerca de la accesibilidad de la cromatina para la transcripción [122]. En la **figura 5** se muestran marcas de acetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27Ac) y la mono y trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1 y H3K4me3, respectivamente). Se postula que H3K27Ac mejora la transcripción bloqueando la propagación de la marca represora H3K27me3 [123]. H3K4me1 se asocia a señal de enhancer distales, mientras que H3K4me3, marca promotores proximales activos [118], [124]. Al analizar la secuencia de ADN bajo la cual se observan estas marcas, se encontró que tanto la señal de H3K4me3 como de H3K27Ac se encontraban principalmente flanqueando la zona del promotor proximal (esquemático en **figura 8**). En conjunto, estos datos sugieren que **el promotor proximal de *NUAK1* se encuentra activo.**





**Figura 8. Esquema de las marcas de histonas.** A partir del esquema general obtenido de ENCODE, el cual no se encuentra a escala, se analizó la secuencia bajo la cual se observaron las marcas de histonas. El esquema muestra la posición real de estas marcas, teniendo como referencia el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Como el gen de *NUAK1* se encuentra en la hebra reversa, a la izquierda del TSS se observa el gen y a la derecha, la zona promotora proximal. **(A)** Se muestra la señal de acetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac). Esta señal es activadora y flanquea a zonas en las cuales la cromatina se encuentra accesible. **(B)** Señal de trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4Me3). Esta marca indica la presencia de un promotor proximal activo, el cual se encuentra flanqueado por las histonas modificadas. **(C)** Representación del efecto en la cromatina de las marcas de histonas. Imágenes A y B son de elaboración propia. Imagen C fue obtenida desde Baldwin, K, et al 2013 [125]

## 1.2 La expresión del ARNm *SALL2* correlaciona con la de *NUAK1* tanto en tejidos normales como en cáncer.

Un método para determinar correlación es a través del coeficiente de Pearson ( $r$ ). Este se expresa en valores que van desde -1 a +1, siendo interpretado un valor cercano a +1 como una correlación positiva. Si tiende a -1 se interpreta como una correlación negativa y, si se acerca a 0, no hay correlación significativa [126]. Debido a que la interpretación de los valores intermedios de  $r$  se considera arbitraria, se usará como referencia un ejemplo convencional de interpretación sugerida por Schober y colaboradores [126], resumida en la **tabla 6**.

Se realizaron análisis bioinformáticos en los servidores R2 (<http://r2.amc.nl>) y miPanda (<http://www.mipanda.org/>) para visualizar la correlación entre el ARNm de *SALL2* y *NUAK1* en diversos tejidos (**figura 9**). Los datos seleccionados en el servidor R2 corresponden a 17382 muestras de tejidos normales secuenciadas por la octava versión del proyecto de expresión genotipo-tejido (GTEx), disponibles públicamente en la plataforma Gencode versión 26. Los datos se muestran normalizados en forma de transcritos por millón (TPM).

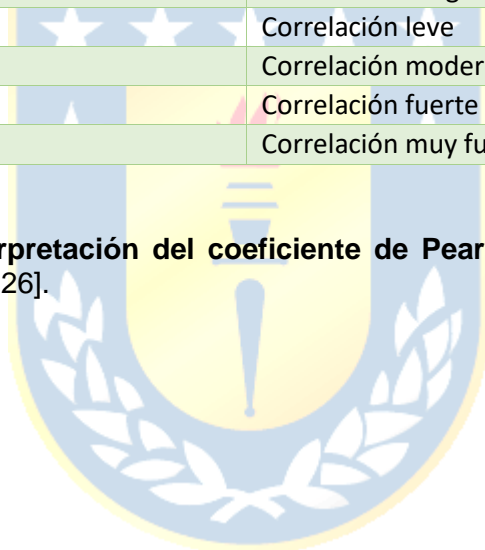
El servidor miPanda integra datos públicos de muestras de secuenciación de transcriptoma completo (RNAseq). Esta cohorte se compone actualmente de: tejido humano normal de 21 tipos de una combinación de muestras del TCGA ( $n = 730$ ) y GTEx ( $n = 9236$ ), muestras de cáncer primario humano del TCGA ( $n = 9496$ ), muestras de cáncer metastásico humano del centro de patología traduccional, Michigan ( $n = 125$ ) y líneas celulares de cáncer humano de la enciclopedia de líneas celulares de cáncer (CCLE) ( $n = 935$ ) [127].

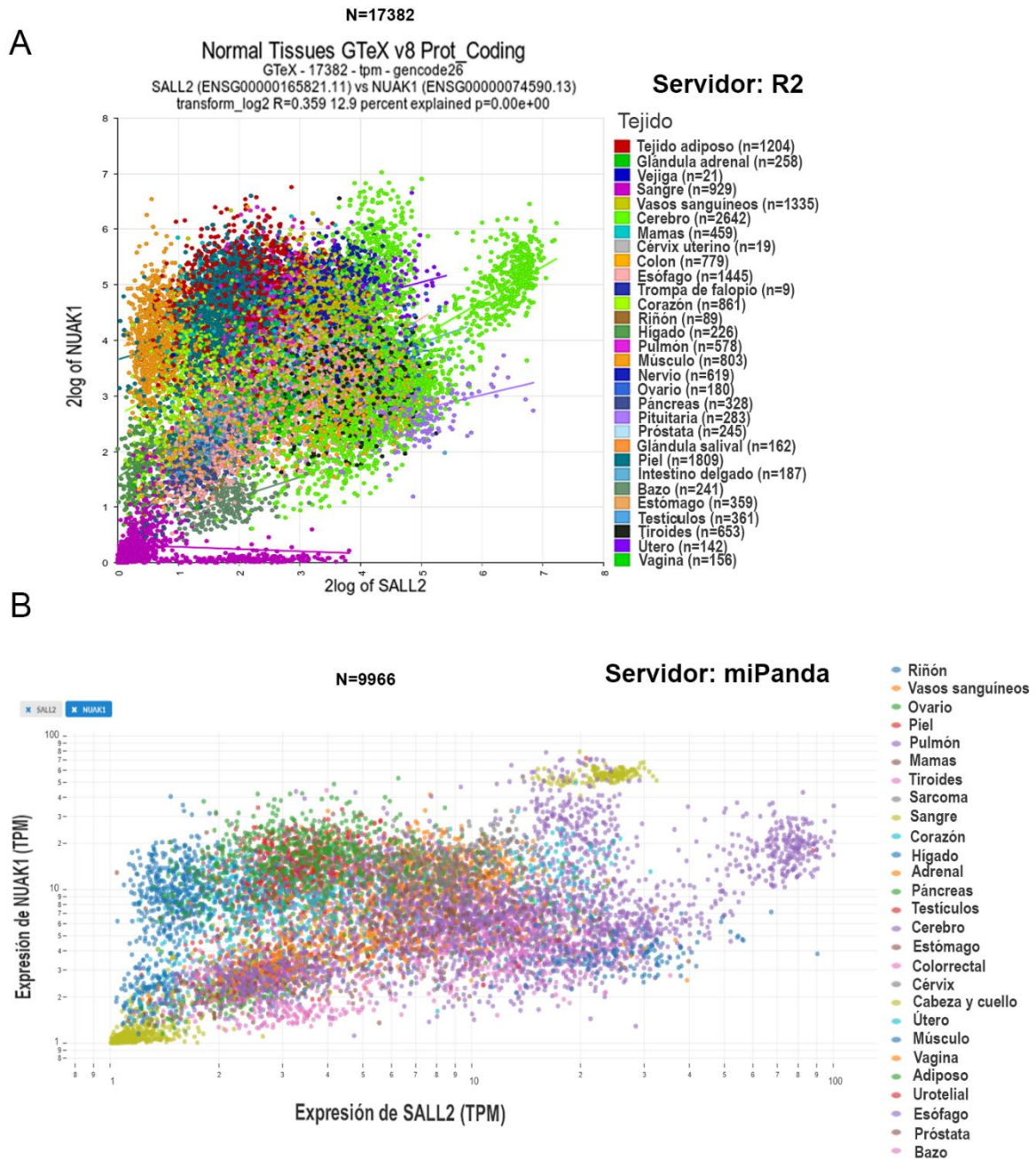


En la **tabla 7** se resume el valor de  $r$  de los tejidos que se repetían en ambos servidores y que mostraron una correlación entre *SALL2* y *NUAK1* estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Los tejidos que presentaron correlación positiva fuerte en uno o ambos servidores fueron: riñón (R2: 0,783; miPanda: 0,771), estómago (R2: 0,774; miPanda: 0,700), testículo (R2: 0,727; miPanda: 0,776), esófago (R2: 0,724; miPanda: 0,712) y páncreas (R2: 0,690; miPanda: 0,708).

Valor absoluto del coeficiente de correlación ( $r$ )	Interpretación
0,00 - 0,10	Correlación insignificante
0,10 - 0,39	Correlación leve
0,40 - 0,69	Correlación moderada
0,70 - 0,89	Correlación fuerte
0,90 - 1,00	Correlación muy fuerte

**Tabla 7. Ejemplo de interpretación del coeficiente de Pearson.** Tabla traducida desde Schober y colaboradores [126].





**Figura 9. La correlación entre los niveles de ARN mensajero de *SALL2* y *NUAK1* es tejido específica.** Correlación de *SALL2* y *NUAK1* observada en diferentes plataformas: R2 (<http://r2.amc.nl>) (A) y miPanda (<http://www.mipanda.org/>) (B). En ambas plataformas se utilizaron datos de tejidos normales.

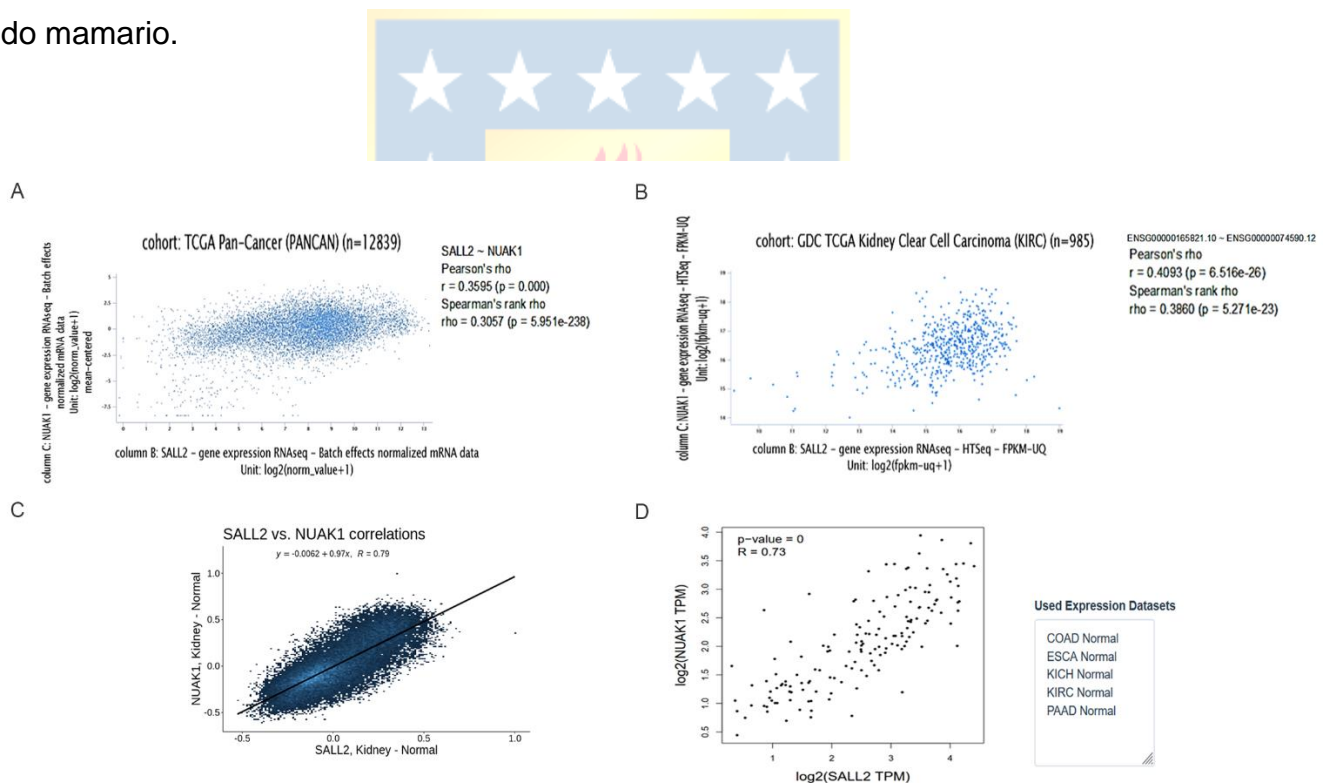
Tejido	R2			MiPanda			Interpretación
	r	p-value	N	r	p-value	N	Positiva (+) o Negativa (-)
Riñón	0,783	1,27E-19	89	0,771	7,76E-34	1089	(+) fuerte
Estómago	0,774	6,61E-73	359	0,7	7,43E-37	702	(+) fuerte
Testículo	0,725	5,03E-60	361	0,776	2,75E-31	355	(+) fuerte
Esófago	0,724	5,26E-235	1445	0,712	2,61E-125	1016	(+) fuerte
Páncreas	0,69	1,08E-47	328	0,708	2,75E-31	417	(+) moderada/fuerte
Glándula Adrenal	0,674	1,40E-35	258	0,578	8,21E-16	425	(+) moderada
Intestino Delgado	0,571	1,39E-17	187	0,472	4,05E-07	104	(+) moderada
Cerebro	0,525	2,31E-187	2642	0,386	2,43E-51	2175	(+) moderada/leve
Próstata	0,522	1,72E-18	245	0,417	1,43E-08	680	(+) moderada
Colon	0,456	2,75E-41	779	0,523	2,40E-31	890	(+) moderada
Pulmón	0,442	5,37E-29	578	0,339	1,44E-14	1715	(+) moderada/leve
Vagina	0,433	1,67E-08	156	0,47	1,16E-06	97	(+) moderada
Corazón	0,431	2,63E-40	861	0,273	9,73E-10	485	(+) moderada/leve
Hígado	0,378	4,52E-09	226	0,478	4,90E-12	592	(+) leve/ moderada
Útero	0,279	7,82E-04	142	0,375	3,86E-05	359	(+) leve
Nervios	0,219	3,45E-08	619	0,341	1,48E-10	335	(+) leve
Piel	0,182	6,82E-15	1809	0,431	2,13E-31	1189	(+) leve/moderada
Vasos sanguíneos	0,107	8,71E-05	1335	0,121	9,02E-04	745	(+) leve (tendiendo a insignificante)
Mamas	-0,17	2,49E-04	459	-0,422	9,97E-16	1506	(-) leve/moderada

**Tabla 8. Tejidos en los que se observó una correlación entre *SALL2* y *NUAK1* estadísticamente significativa.** Se muestran los valores del coeficiente de Pearson de aquellos tejidos normales en los cuales se observó una tendencia, ya sea positiva o negativa, con significancia estadística ( $P < 0,001$ ).

Para complementar el estudio, se revisaron otras plataformas disponibles: **Xenabrowser** (<https://xenabrowser.net/heatmap/> [127]), usada para analizar una cohorte de 12839 muestras de ARNm de PAN-cancer y 985 muestras de ARNm de carcinoma renal de células claras; **análisis interactivo de perfiles de expresión génica (Gepia)** (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html> [128]), usado para estudiar muestras de ARNm de riñón normal provenientes de los proyectos TCGA y GTEx; y el **anali-**

zador de correlaciones del laboratorio Bishop, Universidad de Texas (<https://gccri.bishop-lab.uthscsa.edu/correlation-analyzer/>), en el que se estudiaron muestras de diferentes tejidos normales adyacentes a sus respectivos cánceres. En todas estas plataformas se encontró una correlación positiva entre SALL2 y NUAK1, especialmente en tejidos normales y cancerosos de riñón (figura 10).

A partir de estos análisis bioinformáticos se evidencia predominantemente una correlación positiva entre los niveles de SALL2 y NUAK1, con excepción de tejido mamario.

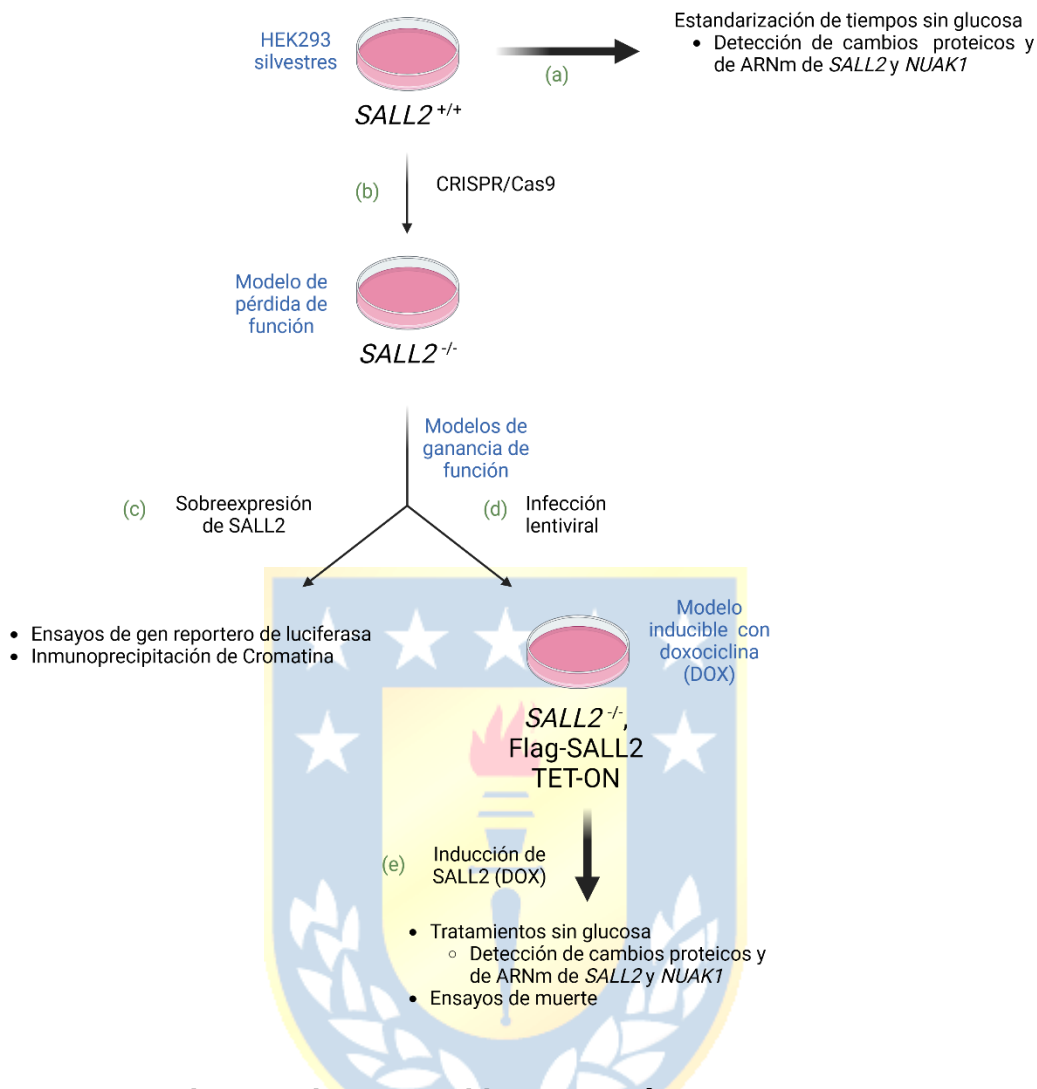


**Figura 10. Se observa una correlación positiva entre SALL2 y NUAK1 en diferentes plataformas usando bases de datos de cáncer y tejidos normales. Correlación de SALL2 y NUAK1 observada en diferentes plataformas: (A y B) Xenabrowser (<https://xenabrowser.net/heatmap/> [127]), (C) el analizador de correlaciones del laboratorio Bishop, Universidad de Texas (<https://gccri.bishop-lab.uthscsa.edu/correlation-analyzer/>) y (D) análisis interactivo de perfiles de expresión génica (Gepia) (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html> [128]).**

### 1.3 Modelos celulares de estudio

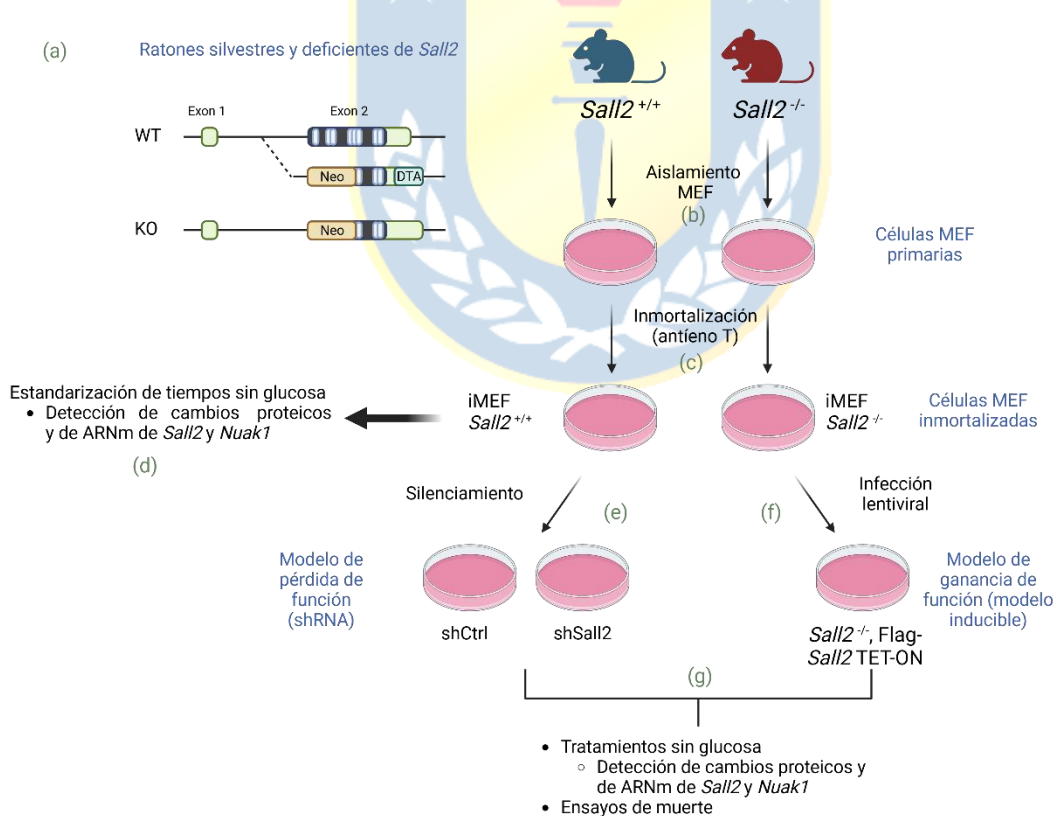
Con el fin de validar *in vitro* los datos informáticos, se utilizaron células embrionarias de riñón humano (HEK293) y fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), los cuales se detallan a continuación.

Las células HEK293 derivan desde riñón embrionario humano. Fueron seleccionadas como una línea celular óptima para el desarrollo de esta tesis por diversas razones: **(1)** Los tejidos renales presentaron correlación positiva fuerte en los diferentes estudios bioinformáticos; **(2)** es una línea celular ampliamente utilizada y caracterizada; **(3)** expresan tanto SALL2 (isoformas E1 y E1A) como NUA1; **(4)** presentan alta eficiencia de transfección y **(5)** su morfología es epitelial, lo que permite proyectar a futuro para estudios con cáncer, considerando que los tumores más frecuentes tienen origen epitelial. Sin perjuicio de lo anteriormente mencionado, es importante tener en cuenta que las células HEK293 no son consideradas un modelo de función renal normal, incluso siendo utilizadas para estudiar genes asociados a transformación tumoral [129]. Esto nos permite acercarnos a un modelo intermedio entre células normales y tumorales.



**Figura 11. Estrategia experimental utilizada en células HEK293.** Diagrama representativo del diseño experimental en células HEK293. **(a)** Células HEK293 silvestres fueron privadas de glucosa por diferentes tiempos y se detectaron los cambios a nivel proteico y de ARNm de *SALL2* y *NUAK1*, con el fin de estandarizar las condiciones adecuadas de estrés metabólico para los diferentes experimentos. **(b)** Se generó un modelo deficiente de *SALL2* ( $SALL2^{-/-}$ ) utilizando la técnica de CRISPR/Cas9. La metodología se detalla en [96]. **(c)** Ensayos realizados a través de ganancia de función a partir de HEK293  $SALL2^{-/-}$ . La sobreexpresión de *SALL2* se utilizó para determinar la actividad del promotor de *Nuak1* murino en ensayos de gen reportero de luciferasa y la unión de *SALL2* al promotor de *NUAK1* humano mediante ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). **(d)** En células  $SALL2^{-/-}$  se generaron modelos de ganancia de función inducibles por doxociclina (TET-ON), como se detalla en metodología (iii.d). **(e)** Se utilizó 1µg/mL de doxociclina para inducir la expresión de *SALL2* en el modelo generado. Este tratamiento fue utilizado para detectar cambios proteicos y de ARNm de *NUAK1* frente a privación de glucosa y para determinar la dependencia de *NUAK1* sobre el rol prosupervivencia de *SALL2* ante estrés metabólico.

Adicionalmente y a modo de comparación, algunos experimentos se realizaron en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), por las siguientes razones: **(1)** expresan SALL2 (solo isoforma E1A) [112]; **(2)** los datos previos que relacionan SALL2 y NUAK1 se obtuvieron en este modelo (**figuras 3 y 4**) y **(3)** el laboratorio dispone de modelos murinos silvestres y deficientes de *Sall2*, de los cuales se extraen las células MEF. En la **figura 11** se especifica la estrategia experimental en las células HEK293, partiendo por las células parentales (silvestres), las cuales se utilizaron como base para la pérdida y ganancia de función de SALL2. En la **figura 12** se detalla el flujo experimental utilizado en las células MEF, las cuales fueron aisladas a partir de embriones murinos, como se detalla en metodología (iii.b).

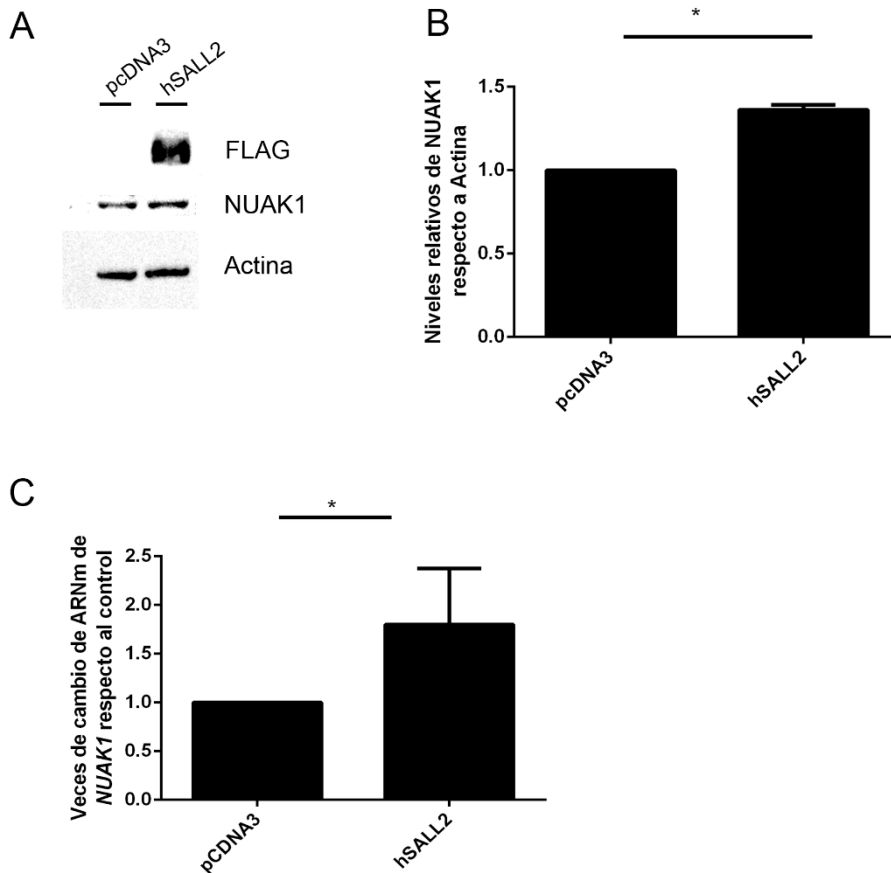


**Figura 12. Estrategia experimental utilizada en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF).** Diagrama representativo del diseño experimental en células MEF. **(a)** Esquema de la deleción realizada en los ratones silvestres para obtener modelos deficientes de *Sall2* (detallado en [130]) **(b)** Se aislaron MEFs a partir de los embriones de ratones silvestres y deficientes de *Sall2*, como se detalla en metodología (sección iii.b, realizado en esta tesis) **(c)** Los MEFs aislados fueron inmortalizados usando el antígeno T, como se detalla en metodología (sección iii.c, realizado en esta tesis) **(d)** Las células silvestres y *Sall2*<sup>-/-</sup> inmortalizadas fueron privadas de glucosa a diferentes tiempos, con el fin de estandarizar las condiciones de estrés metabólico. Los niveles proteicos y de ARNm de *Sall2* y *Nuak1* fueron detectados por Western blot y qPCR, respectivamente. Tras la estandarización, se utilizaron modelos de pérdida **(e)** y ganancia **(f)** de función de *Sall2* (disponibles en el laboratorio). **(g)** Las células fueron privadas de glucosa para detectar cambios proteicos y de ARNm de *Nuak1* y para determinar la dependencia de *Nuak1* sobre el rol prosupervivencia de *Sall2* ante estrés metabólico.

#### **1.4 NUAK1 incrementa sus niveles de forma correlativa con la sobreexpresión de SALL2 en células HEK293.**

Con el objetivo de determinar si la ganancia de función de SALL2 afecta la expresión de NUAK1, se utilizó un modelo de células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> previamente generado en el laboratorio a través de la técnica de CRISPR/Cas9. Las células fueron transfectadas con un vector de expresión de SALL2 humano unido al epítipo FLAG o con el vector vacío. Se observó un leve incremento, pero estadísticamente significativo, en los niveles proteicos y del ARNm *NUAK1* en las células que sobreexpresaban SALL2 respecto al control (**figura 13**).





**Figura 13. El ARNm *NUAK1* incrementa sus niveles de forma correlativa con la sobreexpresión de *SALL2*.** Células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> fueron transfectadas con el vector pCMV2(NH)-Flag-hSALL2 y fueron colectadas 48h tras la transfección. **(A)** Las células fueron lisadas, para posteriormente evaluar los niveles proteicos de Flag-SALL2 y NUAK1. Actina fue usado como control de carga. **(B)** Cuantificación de los cambios en los niveles proteicos de NUAK1, normalizados respecto a Actina. **(C)** Las células fueron colectadas en TRIZOL, para posteriormente extraer ARNm y evaluar los cambios en la expresión del ARNm *NUAK1*. *Actina* fue usado como gen normalizador (control interno). Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

### 1.5 El promotor *NUAK1* tiene sitios putativos de unión a *SALL2* en su secuencia.

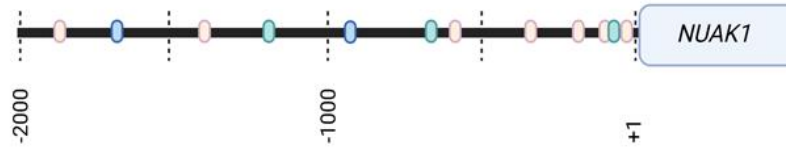
Considerando los cambios observados a nivel de ARN, se procedió a la búsqueda de sitios de unión a *SALL2* en el promotor de *NUAK1* humano y *Nuak1* murino

con el objetivo de evaluar una posible regulación transcripcional de *NUAK1* mediada por SALL2.

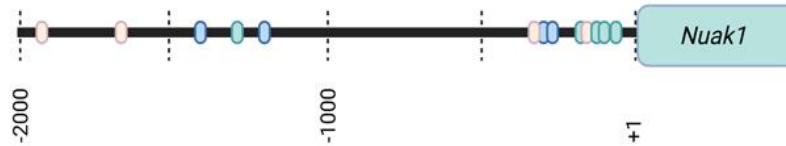
Los sitios putativos consenso de unión a SALL2 fueron identificados utilizando el método SELEX por Gu y colaboradores el año 2011, y corresponden a la secuencia GGG(A/T/C)GGG [89]. Para determinar si los promotores de *NUAK1* humano y *Nuak1* de ratón contienen estos sitios, se obtuvo la secuencia promotora a través de la base de datos de promotores eucariontes (*The Eukaryotic Promoter Database*, <https://epd.epfl.ch//index.php>) desde el nucleótido -2000 al +200pb, considerando como +1 al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Se buscaron los sitios putativos utilizando las herramientas bioinformáticas TRED (*Transcriptional Regulatory Element Database*, <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>) y MatInspector [131]. En la **figura 14A** se muestra un esquema representativo de los sitios putativos identificados realizado a través del programa Biorender (<https://app.biorender.com/>). En la **figura 14B** se muestra el alineamiento entre el promotor de *NUAK1* humano y *Nuak1* murino. Se encontró una coincidencia en la región proximal del promotor (-278...-69pb de *Nuak1* murino y -250...-1pb de *NUAK1* humano), con un 71,71% de identidad. Estos análisis sugieren que es factible que SALL2 se una directamente al promotor de *NUAK1*, tanto en humano como ratón. Además, la región proximal surge como principal candidata, al presentar sitios conservados entre las dos especies. Esto se condice con los análisis de modificación de histonas previamente realizados, donde se observó que la región proximal (+1...-612pb) se encuentra flanqueada por las marcas de promotor activo, H3K4me3 (**figura 8B**).

A

Promotor *NUAK1*  
*H. Sapiens*



Promotor *Nuak1*  
*M. musculus*



- GGGAGGG
- GGGCGGG
- GGGTGGG

B



**Figura 14. Los promotores *NUAK1* humano y *Nuak1* de ratón presentan sitios de unión para SALL2.** (A) De arriba hacia abajo: sitios putativos de unión a SALL2 descritos en literatura por Gu y colaboradores [89] en el promotor de *NUAK1* de *Homo sapiens* y *Nuak1* de *Mus musculus*, respectivamente. Ambos fueron obtenidos por análisis bioinformático usando los programas TRED y Matinspector. Óvalos en naranja representan el sitio GGGAGGG, en verde, el sitio GGGCGGG y en azul, el sitio GGGTGGG. El promotor de *NUAK1* humano presenta, además, un sitio

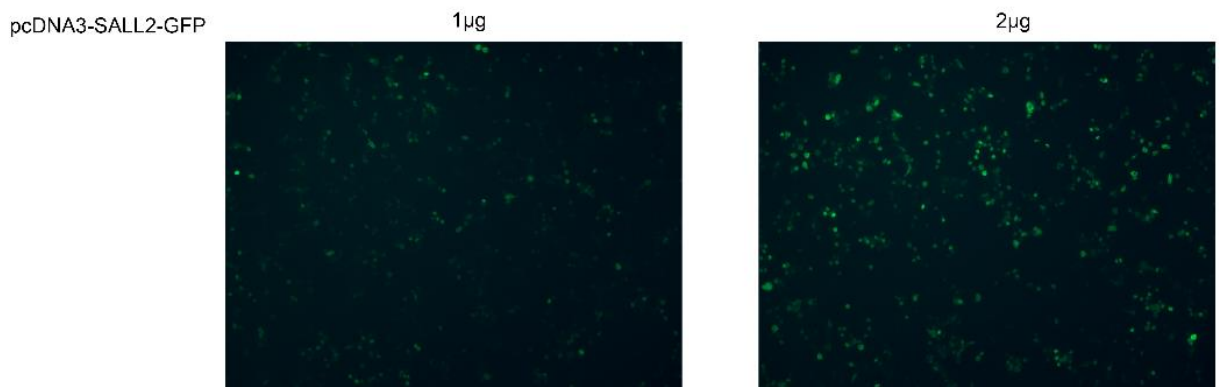
GGGAGGG en la posición +8 (no mostrado en este esquema). **(B)** Alineamiento entre el promotor de *Nuak1* de ratón y *NUAK1* humano.

### 1.6 SALL2 incrementa la actividad del promotor *Nuak1* murino.

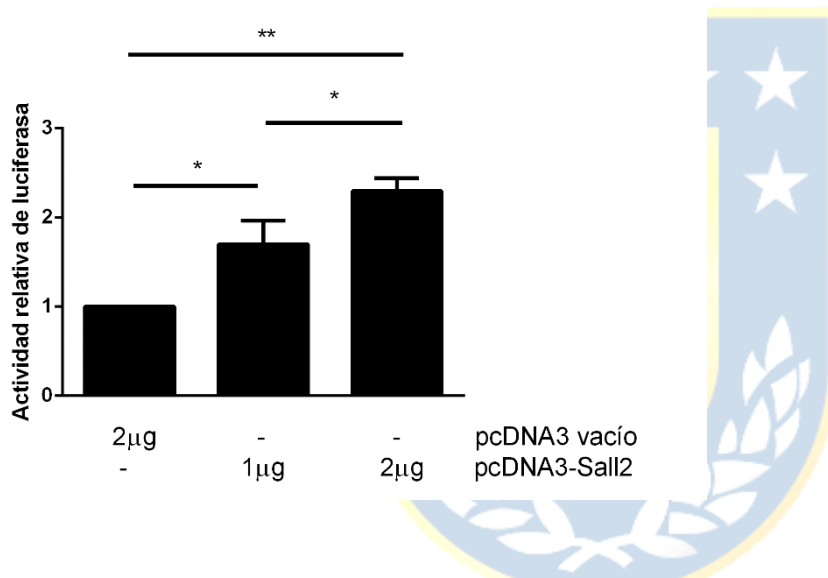
Para determinar si SALL2 tiene un efecto en la actividad transcripcional del promotor *Nuak1*, se realizaron ensayos de gen reportero de luciferasa, utilizando el constructo del promotor *Nuak1* murino de 2000pb clonado previamente en el laboratorio (Venturelli K, Tesis de pregrado, 2016). Este se encuentra unido a un gen reportero de luciferasa. Se cotransfectó con cantidades crecientes de pcDNA3-mSALL2-GFP, observándose un incremento dependiente de la concentración en la actividad del promotor **(figura 15)**.



A



B

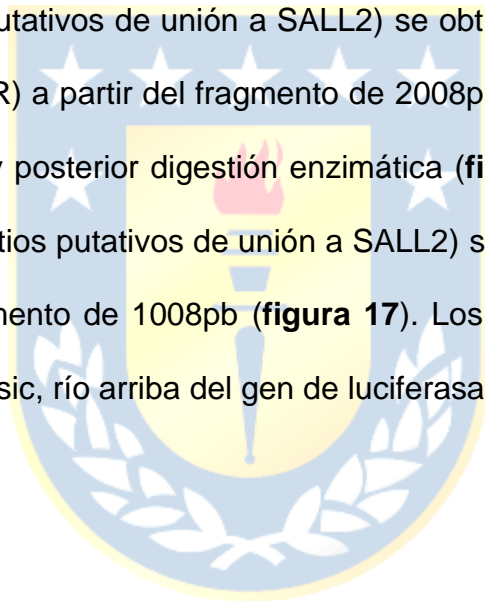


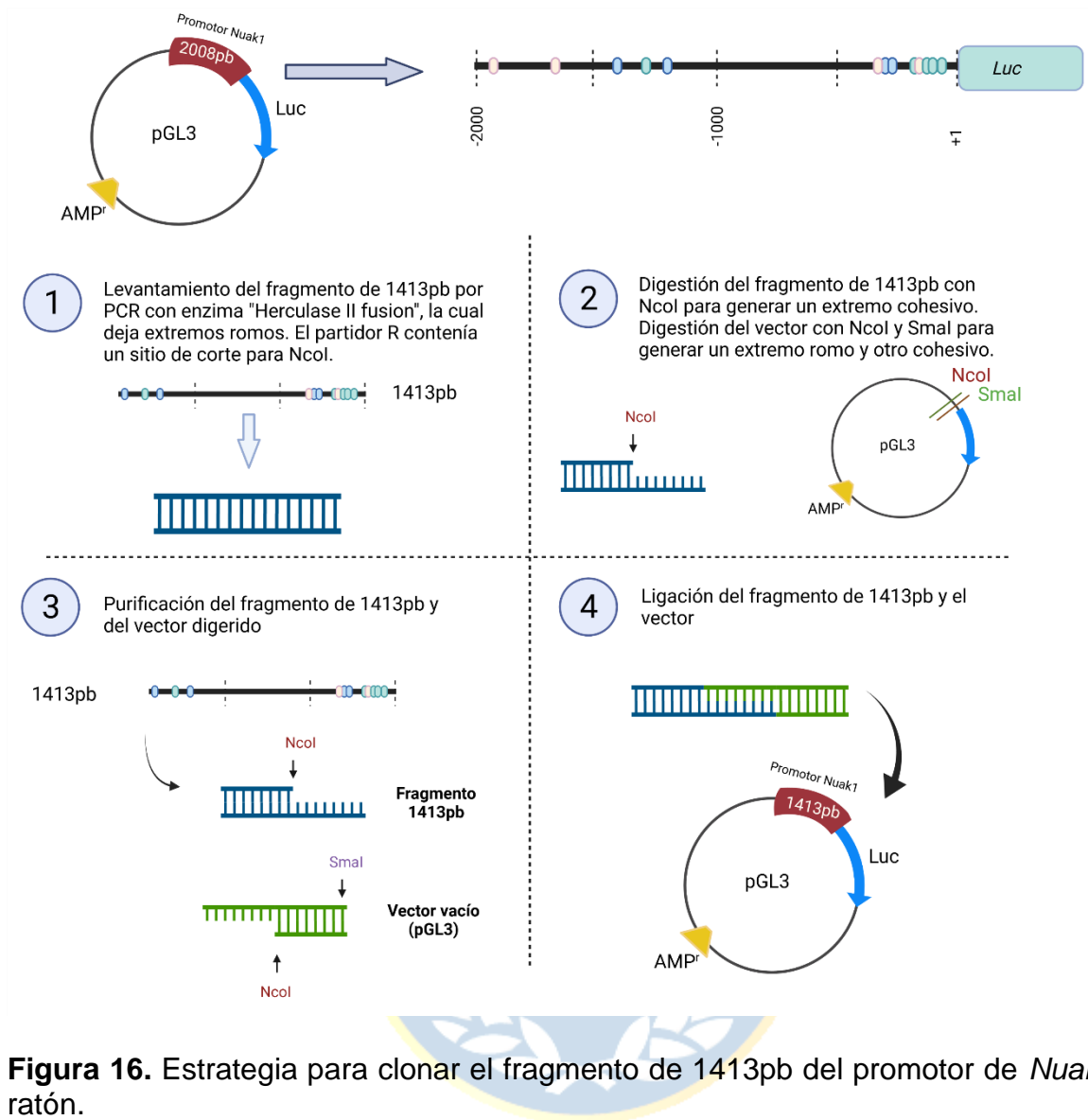
**Figura 15. Promotor de *Nuak1* murino aumenta su actividad al sobreexpresar *Sall2-GFP*.** Células HEK293 SALL2<sup>-/-</sup> fueron cotransfectadas con el reportero que contiene 2000pb del promotor de *Nuak1* y el vector vacío, o 1 y 2µg de *pcDNA3-mSALL2-GFP*, respectivamente. El plásmido RSV-β-Gal, el cual expresa el gen de la β-galactosidasa, se utilizó como normalizador. (A) Fotografía por epifluorescencia de células HEK293 transfectadas con Sall2-GFP 24 horas post-transfección, con 1 y 2µg, respectivamente. (B) 24 horas post-transfección, las células fueron colectadas y los lisados fueron obtenidos utilizando el buffer de lisis adecuado (Promega®) para medir la actividad de luciferasa y β-galactosidasa. Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t (P<0.05).

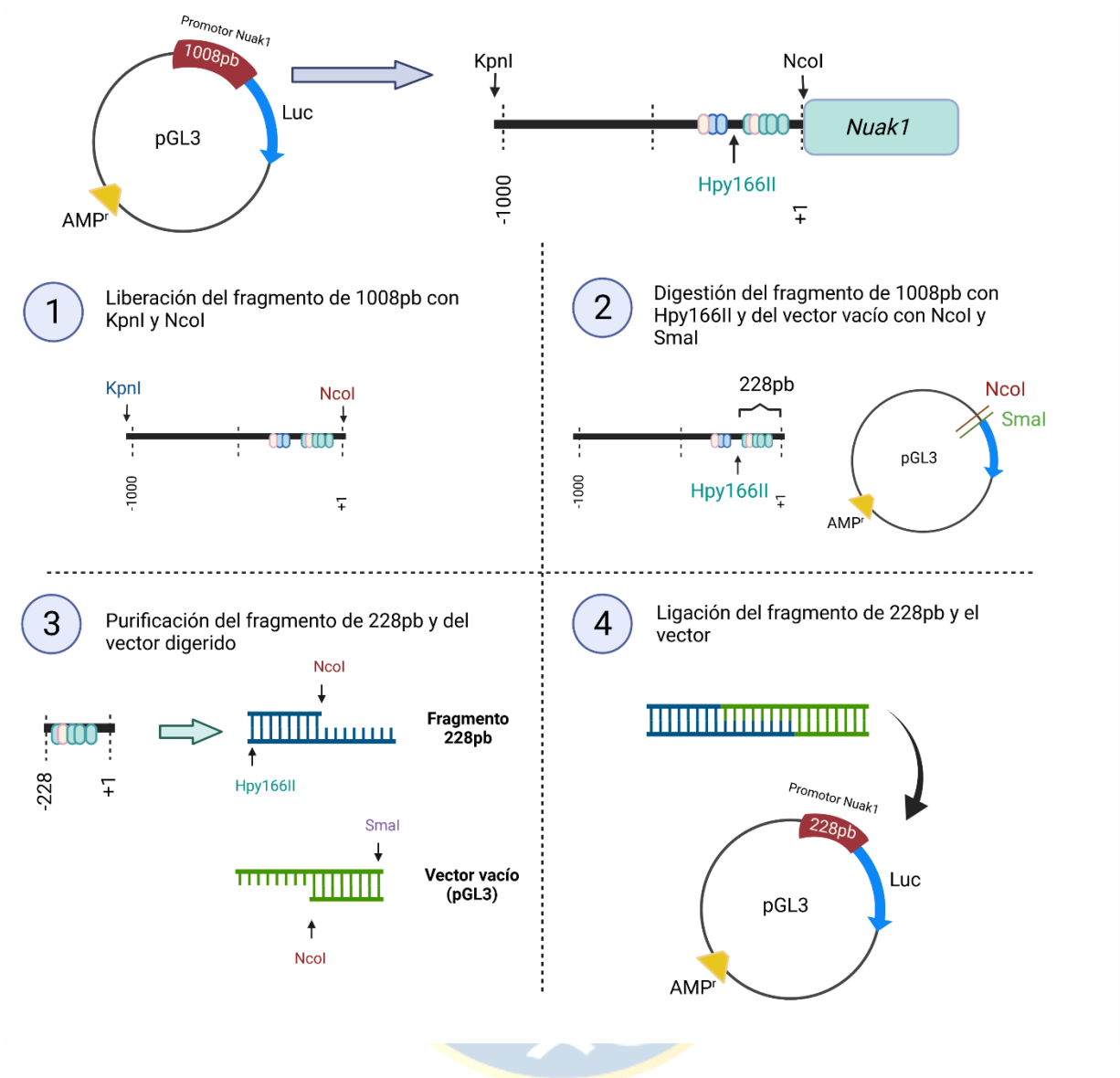
### 1.7 Determinación de los sitios de unión de SALL2 al promotor *Nuak1*.

Para responder a este objetivo, se clonaron diferentes fragmentos del promotor de *Nuak1* murino, como se esquematiza en la **figura 16A**, los cuales tienen los sitios putativos de unión a SALL2.

Para realizar el clonamiento de los distintos fragmentos del promotor *Nuak1* murino (**tabla 3**) se utilizaron los plásmidos de 2000pb y 1008pb, previamente generados en el laboratorio (Venturelli K, tesis de pregrado, 2016). El **fragmento de 1413pb** (que contiene 11 sitios putativos de unión a SALL2) se obtuvo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del fragmento de 2008pb, utilizando los partidores indicados en la **tabla 4** y posterior digestión enzimática (**figura 9**). El **fragmento de 228pb** (que contiene 5 sitios putativos de unión a SALL2) se obtuvo a partir de digestión enzimática del fragmento de 1008pb (**figura 17**). Los fragmentos fueron clonados al plásmido pGL3 basic, río arriba del gen de luciferasa.





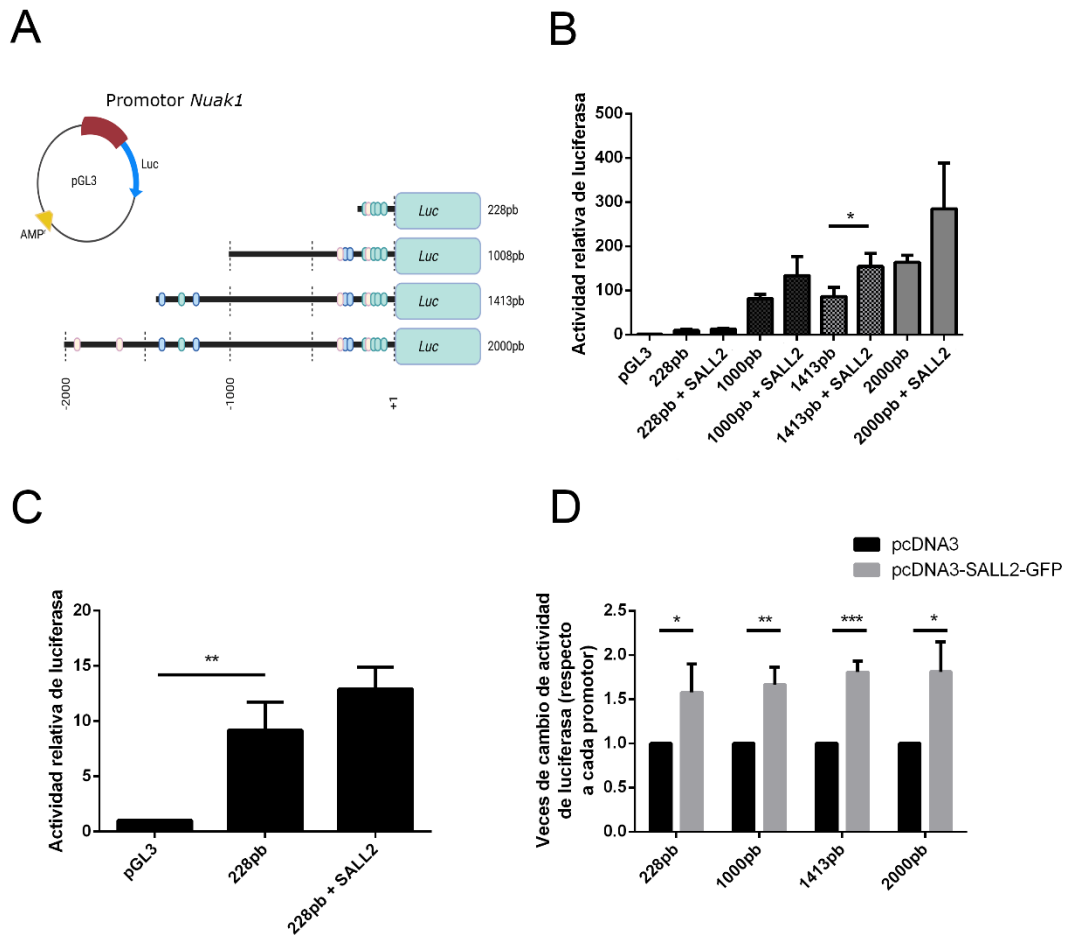


**Figura 17.** Estrategia para clonar el fragmento de 228pb promotor de *Nuak1* de ratón.

Los reporteros generados fueron cotransfectados con un vector de expresión de *Sall2* murino en células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup>. Se observó una diferencia en la actividad basal de cada fragmento del promotor, y que en todos los casos existe una tendencia a aumentar la actividad frente a SALL2 (**figura 18B y C**). Este efecto se observa más claramente al normalizar respecto a la actividad basal de cada promotor (**figura 18D**). Estos resultados sugieren que **la región proximal (228pb) contiene los sitios**



necesarios para incrementar la actividad del promotor de *Nuak1* al sobreexpresar SALL2.

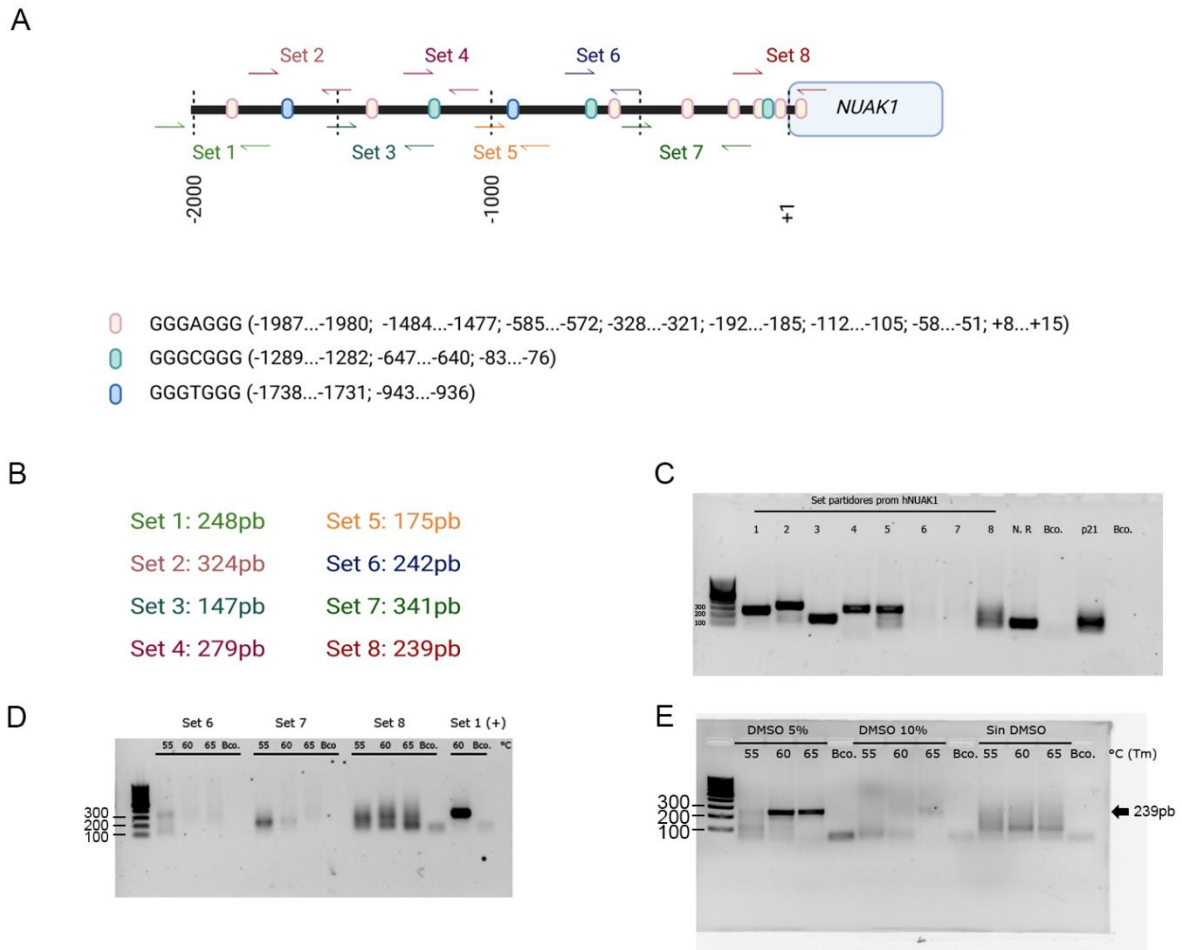


**Figura 18. La actividad de los diferentes fragmentos del promotor de *Nuak1* incrementa al sobreexpresar *Sall2-GFP*.** (A) Esquema representativo de las deleciones en el promotor de *Nuak1* murino. (B - C) Para el ensayo de gen reportero de luciferasa, las células fueron transfectadas con los distintos reporteros del promotor de *Nuak1* de ratón (228, 1000, 1413 y 2000pb, respectivamente), con y sin sobreexpresión de *Sall2-GFP*. En todas las condiciones se agregó además el plásmido RSV- $\beta$ -Gal como normalizador. 24 horas post-transfección, se evaluó la actividad de luciferasa con el kit LuciferaseGlo®, Promega, y la actividad de  $\beta$ -galactosidasa con el kit BetaGlo® (Promega). Los resultados se muestran normalizados respecto al vector vacío, pGL3 (B y C) o cada uno de los promotores (D). En (C) se muestra el detalle del fragmento de 228pb. Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

## 1.8 SALL2 interacciona *in vivo* con el promotor *Nuak1*.

Con el fin de determinar si existe una unión *in vivo* de SALL2 al promotor de *Nuak1*, se propuso realizar inmunoprecipitación de cromatina acoplada a PCR en tiempo real (ChIP-qPCR). Para ello se diseñaron 8 set de partidores que contenían, desde el más distal al más proximal al sitio +1, los diferentes sitios putativos de unión a SALL2 identificados previamente (**figura 19A-C**). Se usó además una región no relacionada (N. R.), diseñada previamente en el laboratorio [112]. Se estandarizó la PCR para cada set de partidores con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 60°C. Los sets 6, 7 y 8 no dieron una banda única del tamaño esperado a esa  $T_m$ , por lo que se realizó un barrido de temperatura a 55°C, 60°C y 65°C (**figura 19D**).

Con el objetivo de corroborar que en células humanas se cumpla lo observado en los ensayos de luciferasa en el modelo murino, los cuales mostraron que la región más proximal (228pb) es suficiente para que exista un incremento en la actividad promotora, centramos nuestra atención a los sitios de unión contenidos en esa región (set 8). Debido a que la región proximal del promotor de *NUAK1* se encuentra en una isla CpG (**figura 6**), se evaluó el uso de facilitadores de PCR, dentro de los cuales se seleccionó el DMSO. Se obtuvieron resultados óptimos a una concentración del 5% DMSO (**figura 19E**).

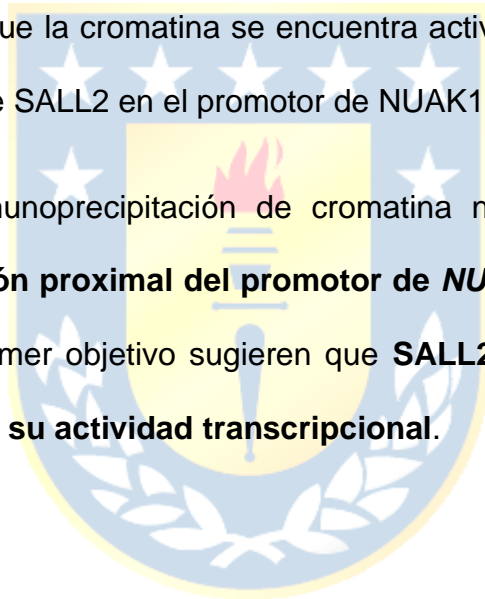


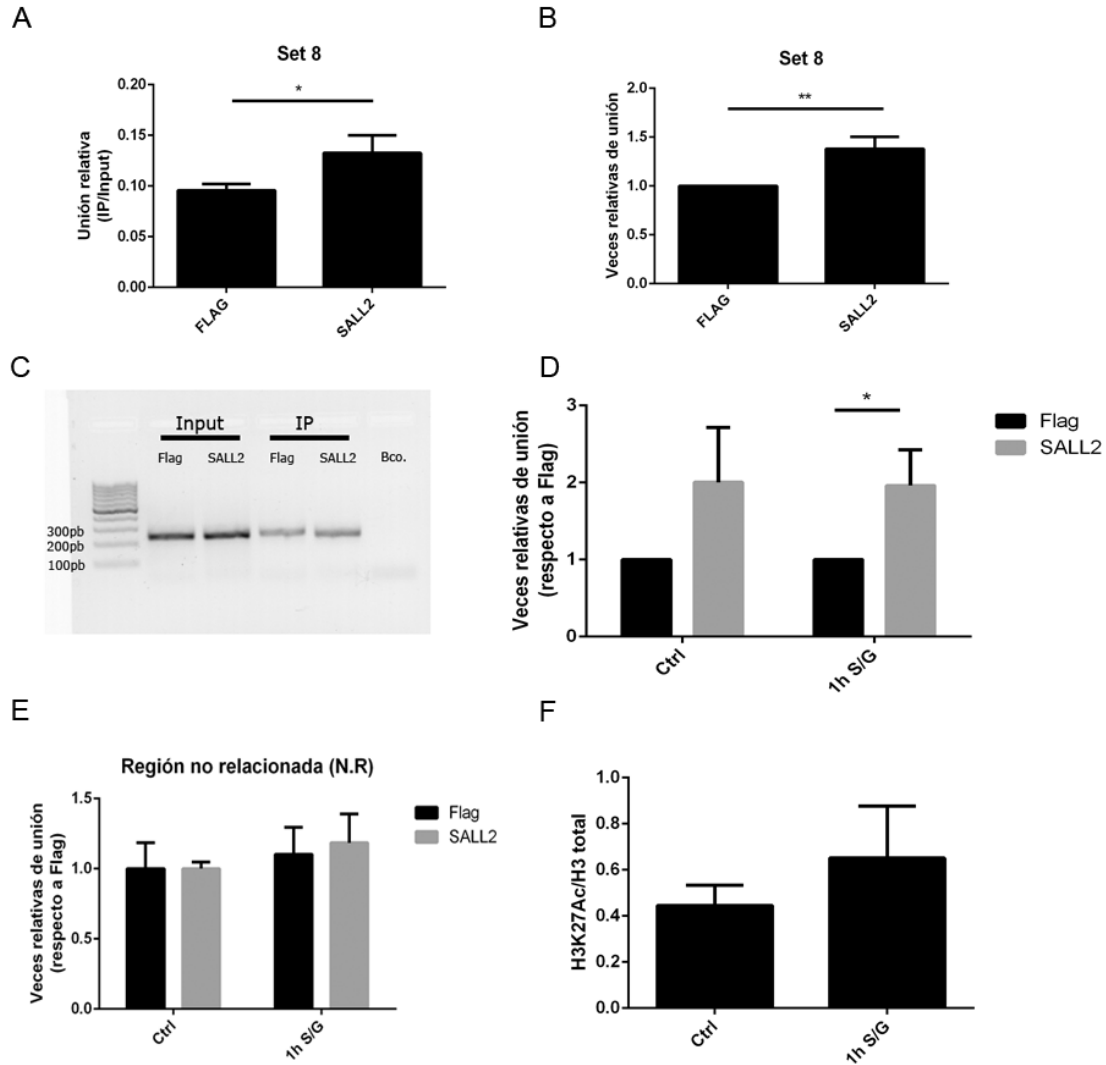
**Figura 19. Diseño y estandarización de los partidores para CHIP-qPCR.** (A) Esquema representativo del promotor de *NUAK1* humano y los sitios de unión de *SALL2*. Las flechas de colores indican las regiones amplificadas por los diferentes set de partidores. (B) Tamaños de amplicón esperados. (C y D) Gel de agarosa al 2% para visualizar los tamaños de bandas obtenidos a las diferentes temperaturas de fusión ( $T_m$ ). En (C) se observa el producto obtenido a 60°C. Los sets 6, 7 y 8 no formaron un producto único a la temperatura de fusión usada por defecto, por lo que se realizó un barrido de temperatura (D). (E) Para mejorar la eficiencia de los partidores de la región proximal (set 8) se trató con 5 y 10% de DMSO, y se realizó un nuevo barrido de temperatura, definiendo la condición 65°C con 5% de DMSO como óptima.

A continuación se transfectaron células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> con un plásmido que contenía *SALL2* unido al epítipo FLAG o su correspondiente vector vacío. Las células fueron colectadas 48h post-transfección, se purificaron los núcleos y se inmunoprecipitó *SALL2* usando un anticuerpo anti-FLAG.

En la **figura 20A y B** se observa la unión relativa de SALL2 al promotor de *NUAK1*, normalizado respecto al input y a la condición sin SALL2, respectivamente. En la **figura 20C** se muestra un gel de agarosa al 2% para confirmar el tamaño del amplicón. En la **figura 20D** se observa que el incremento en la ocupancia de SALL2 en el promotor de *NUAK1* no cambia frente a estrés metabólico sin glucosa en comparación con las condiciones basales. Como control negativo se utilizó una región que no contiene sitios putativos de unión a SALL2, denominada “no relacionada” (N.R.) (**figura 20E**). En la **figura 20F** se observa un incremento en la relación H4ac/H3, lo que indica que la cromatina se encuentra activa en la región correspondiente al sitio de unión de SALL2 en el promotor de *NUAK1*.

Los análisis de inmunoprecipitación de cromatina nos permiten sugerir que **SALL2 se une a la región proximal del promotor de *NUAK1* humano**. En conjunto, los resultados del primer objetivo sugieren que **SALL2 se une al promotor de *NUAK1*, incrementando su actividad transcripcional**.



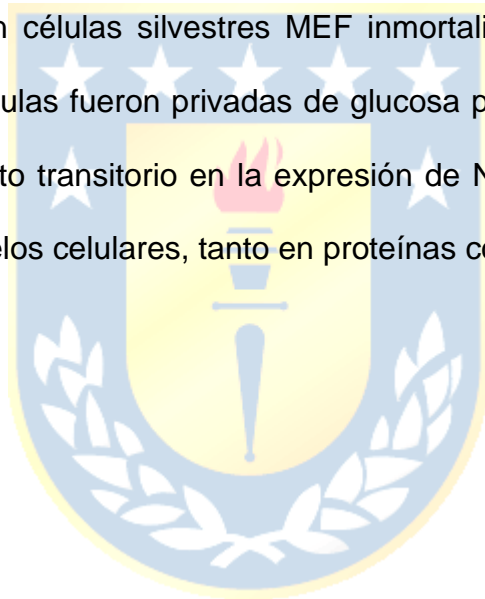


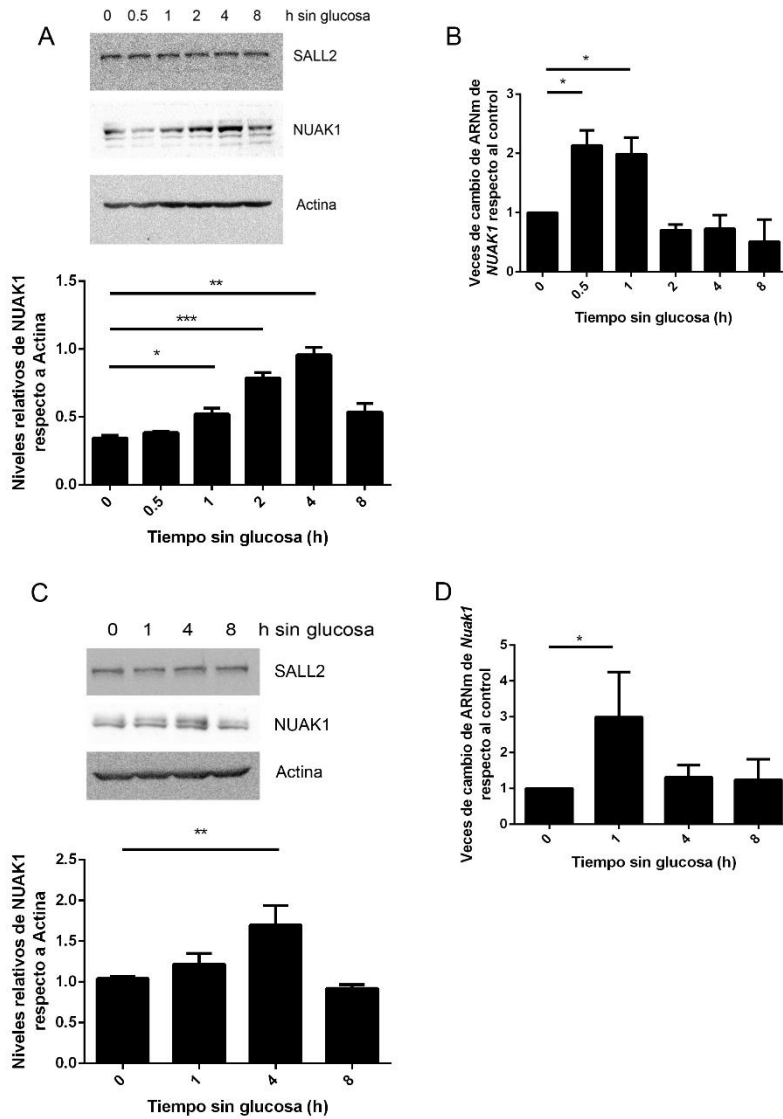
**Figura 20. SALL2 se une a la región proximal del promotor de NUA1.** (A y B) Inmunoprecipitación de cromatina de la región proximal del promotor de *NUAK1* (set 8). Los resultados se muestran normalizados respecto al input (A) y como veces de cambio respecto al vector vacío (B). Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. (C) Gel de agarosa al 2% para confirmar tamaño de amplificación. (D) Inmunoprecipitación de cromatina del set 8 en condiciones de privación de glucosa. La estandarización del tiempo usado se muestra a continuación en la **figura 21**. (E) Inmunoprecipitación de cromatina de la región no relacionada (N. R). (F) Inmunoprecipitación de cromatina usando anticuerpos contra la histona H3 acetilada en su residuo de lisina 27 (H3K27Ac), normalizada respecto a la histona H3 total. Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

**Objetivo 2: Determinar si SALL2 promueve supervivencia celular frente a estrés metabólico a través del aumento en la expresión de NUA1.**

**2.1 SALL2 y NUA1 incrementan sus niveles de proteína y ARNm frente a estrés metabólico por privación de glucosa de forma dependiente del tiempo, pero no frente a estrés oxidativo ni privación de suero.**

A modo de estandarización, se determinaron las condiciones óptimas para realizar estrés metabólico en células silvestres MEF inmortalizadas (iMEF) y HEK293, respectivamente. Las células fueron privadas de glucosa por diferentes tiempos, observándose un incremento transitorio en la expresión de NUA1 tras 1 hora de tratamiento en ambos modelos celulares, tanto en proteínas como ARNm (**figura 21**).



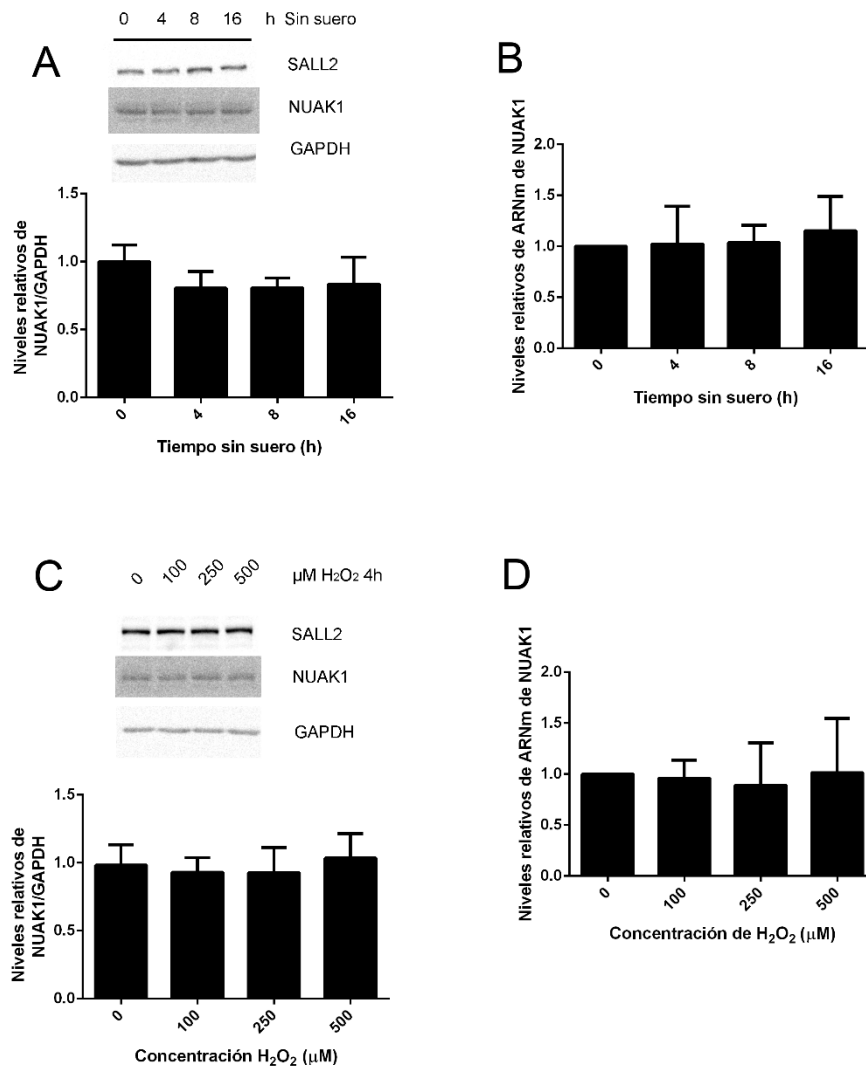


**Figura 21. SALL2 y NUAK1 incrementan sus niveles de forma transitoria frente a estrés metabólico por carencia de glucosa.** Análisis de los niveles de SALL2 y NUAK1 mediante Western blot (**A** y **C**) y los niveles del ARNm *NUAK1* por qPCR (**B** y **D**). Células HEK293 silvestres (**A** y **B**) y MEF (**C** y **D**) fueron sometidas a privación de glucosa a diferentes tiempos (0-8 horas). (**A** y **C**) Las células fueron colectadas a las horas respectivas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles proteicos de SALL2 y NUAK1. Actina fue usado como control de carga. (**B** y **D**) Las células fueron colectadas en TRIzol a las horas respectivas para posteriormente extraer el ARNm mediante solventes orgánicos, como se describe en metodología. Los cambios en los niveles de *NUAK1* humano y *Nuak1* murino fueron determinados por PCR en tiempo real. Se usó *Actina* como normalizador (**B**) y ARN ribosomal (ARNr) 18s murino (**D**), respectivamente. Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

Como un método alternativo de estrés metabólico se analizó la privación de suero por 4, 8 y 16 horas en células HEK293 silvestres. Los tiempos elegidos corresponden a los utilizados en el modelo murino en células MEF para inducir *NUAK1* (Palma M, tesis de pregrado, 2013). Si bien se observó un incremento transitorio en los niveles proteicos de *SALL2*, no hubo cambios de proteínas ni ARNm de *NUAK1* frente a esta condición (**figura 22A y B**).

Uno de los efectos de la privación de nutrientes es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la consecuente inducción de estrés oxidativo [132]. El inductor de estrés oxidativo más ampliamente usado es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Además de ser ROS por sí mismo, puede generar intermediarios reactivos, por ejemplo, radical hidroxilo por reacción de fenton [133]. Bajo esta premisa y considerando la posibilidad de que el incremento en *NUAK1* frente a privación de glucosa pudiera deberse a la producción de ROS, se realizó un tratamiento con  $H_2O_2$ . La selección del tiempo y concentraciones fueron previamente estandarizadas para la inducción de *SALL2* en células MEF (Álvarez C, tesis de pregrado, 2017). No se detectaron cambios significativos en los niveles de *NUAK1* frente a esta condición (**figura 22C y D**). En conjunto, los datos sugieren que **la privación de glucosa induce la expresión proteica y de ARNm de *NUAK1* en el modelo celular empleado (HEK293)**. No se observaron cambios frente a privación de suero ni exposición a peróxido de hidrógeno en las condiciones evaluadas.



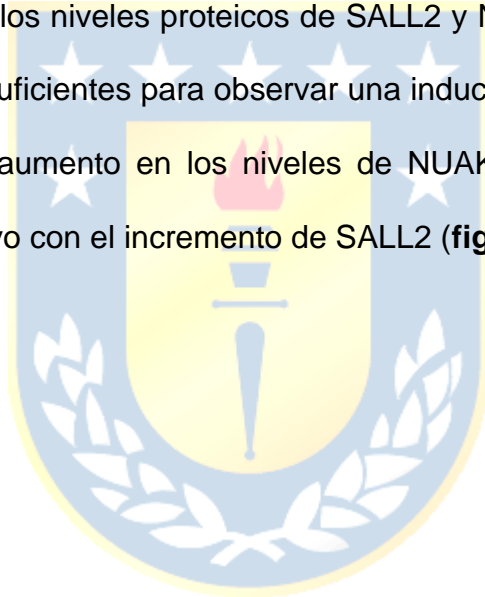


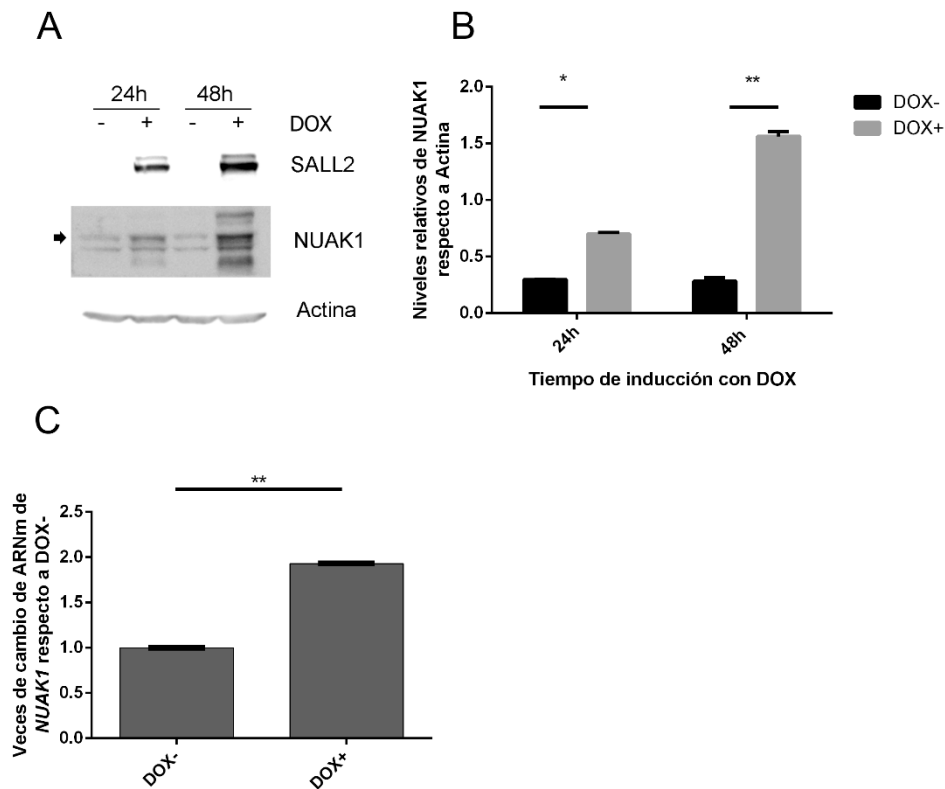
**Figura 22. NUAK1 no presenta cambios en su expresión de proteínas ni ARNm frente a privación de glucosa o tratamiento con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Análisis de los niveles de SALL2 y NUAK1 mediante Western blot (A y C) y qPCR (B y D). Células HEK293 silvestres fueron sometidas a privación de suero a diferentes tiempos (0-16 horas) (A y B) o tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4h a diferentes concentraciones de (C y D). (A y C) Las células fueron colectadas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles proteicos de SALL2 y NUAK1. Actina fue usado como control de carga. (B y D) Las células fueron colectadas en TRIzol a las horas respectivas para posteriormente extraer el ARN mediante solventes orgánicos. Los cambios en los niveles de *NUAK1* fueron determinados por PCR en tiempo real. *Actina* se usó como gen normalizador. Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t (P<0.05).

## 2.2 NUAK1 incrementa sus niveles proteicos de forma correlativa con la inducción de SALL2.

Con el objetivo de determinar la dependencia de SALL2 para el incremento de los niveles proteicos y de ARNm de *NUAK1*, se utilizó un modelo de HEK293 *SALL2*<sup>+/+</sup>, el cual expresa *Flag-Sall2* murino inducible al tratar con doxociclina, el cual fue previamente generado en el laboratorio.

A modo de estandarización, se realizó tratamiento con doxociclina (DOX) por 24 y 48h y se determinaron los niveles proteicos de SALL2 y NUAK1. Se determinó que 24h de tratamiento son suficientes para observar una inducción de SALL2. En ambos tiempos se observó un aumento en los niveles de NUAK1 respecto al control sin DOX, el cual es correlativo con el incremento de SALL2 (**figura 23A**).



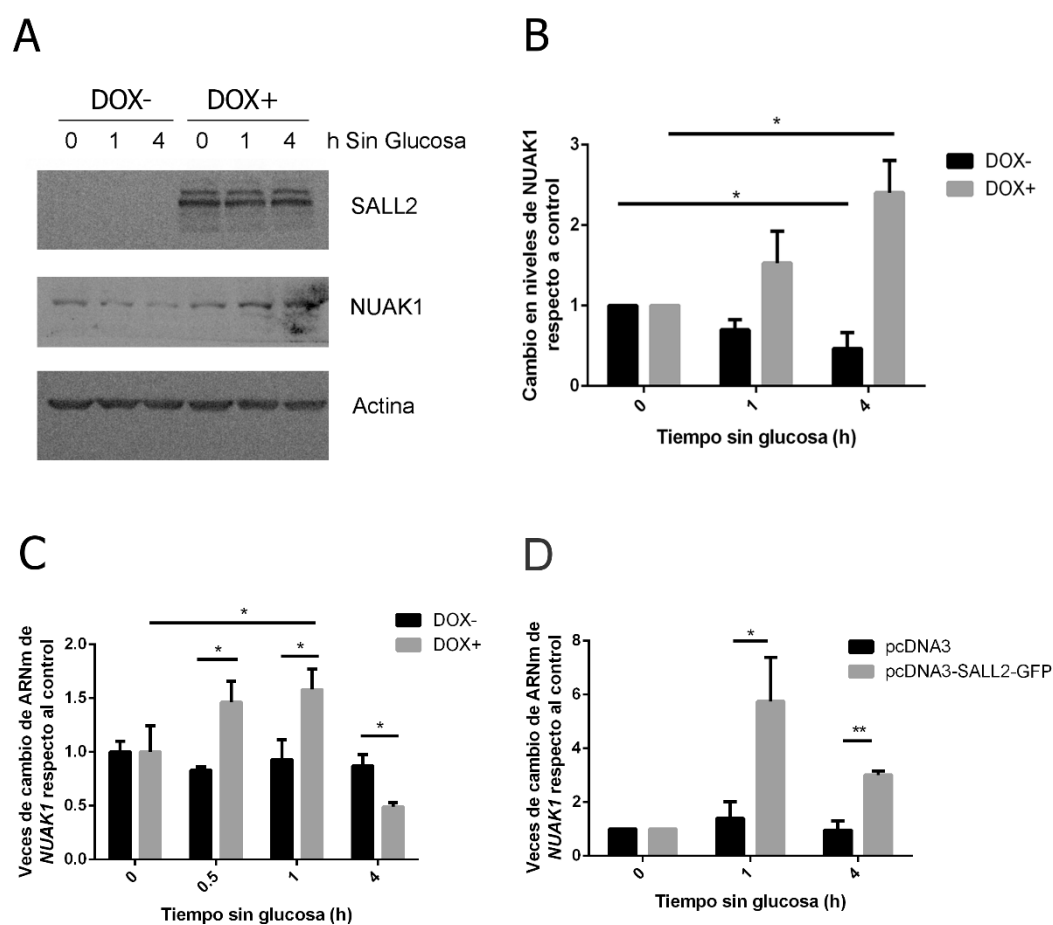


**Figura 23. NUAK1 incrementa sus niveles de forma correlativa con la inducción de SALL2.** Análisis de los niveles de SALL2 y NUAK1 mediante Western blot (A) y qPCR (B). Células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> fueron sometidas a 1µg/mL de doxociclina (DOX) por 24 y 48h. (A) Las células fueron colectadas en PBS a las horas respectivas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles de SALL2 y NUAK1. Actina fue usado como control de carga. (B) Cuantificación de los niveles relativos de NUAK1, normalizados respecto a Actina. (C). Los cambios en los niveles del ARNm *NUAK1* fueron determinados por PCR en tiempo real. *Actina* se usó como gen normalizador. Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t (P<0.05).

### 2.3 SALL2 es necesario para el incremento de los niveles de NUAK1 frente a estrés metabólico.

A continuación, se determinó la dependencia de SALL2 para el cambio de expresión en proteínas y ARNm de *NUAK1* frente a estrés metabólico por carencia de glu-

cosa. Se observó un aumento en los niveles proteicos de NUA1 frente a carencia de glucosa en células tratadas con DOX (DOX+), no así en las células no tratadas (DOX-) (**figura 24A y B**). Similares resultados se observaron al analizar los cambios del ARNm *NUAK1*, (**figura 24C**). Adicionalmente, se transfectaron células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> con un vector de expresión de *Sall2* murino unido a GFP. Se determinaron los niveles del ARNm *NUAK1* frente a estrés metabólico, observando un incremento tras 1h sin glucosa solo en las células que sobreexpresan *Sall2* (**figura 24D**).

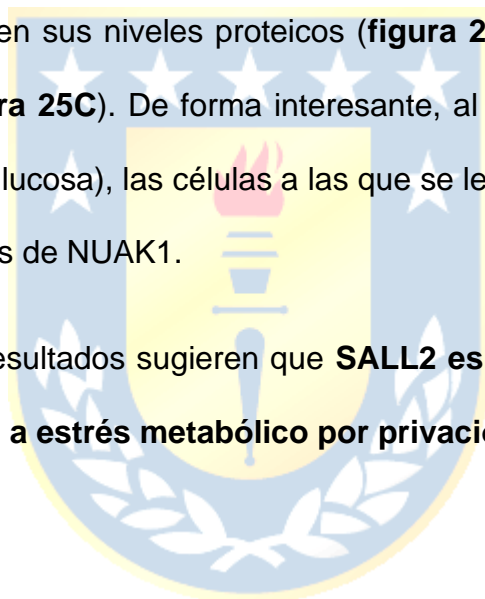


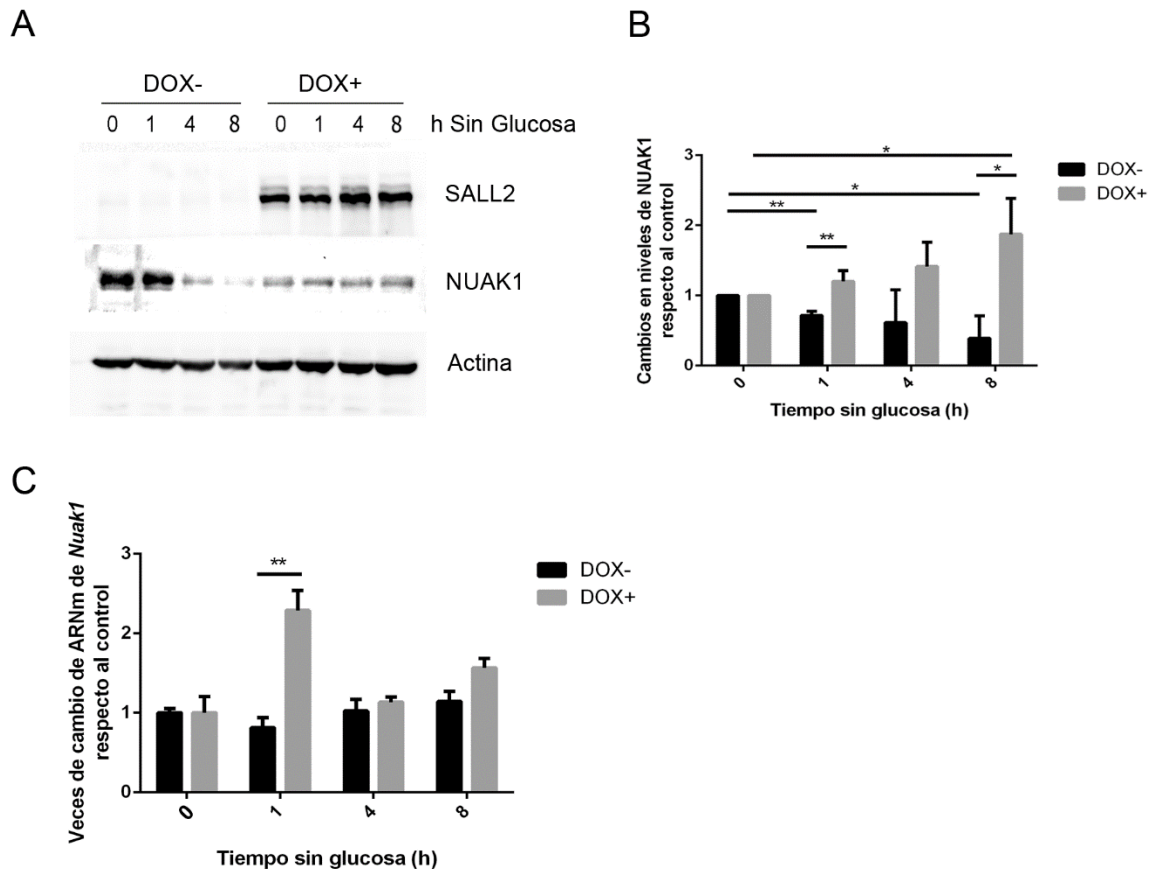
**Figura 24. NUA1 incrementa sus niveles proteicos y de ARNm frente a privación de glucosa al inducir SALL2 en células HEK293.** Análisis de los niveles proteicos de NUA1 mediante Western blot (**A y B**) y de ARNm de *NUAK1* mediante PCR en tiempo real (**C y D**). Células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> fueron sometidas a 1µg/mL de doxociclina (DOX) por 24h (**A-C**) o transfectadas con un vector de expresión de *SALL2* murino unido a GFP (**D**) y privadas de glucosa por 1 y 4h (**A-D**). (**A**) Las células

las fueron colectadas a las horas respectivas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles de SALL2 y NUAK1. Actina fue usado como control de carga. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. **(B)** Cuantificación de los cambios en los niveles proteicos de NUAK1, normalizados respecto a Actina. **(C y D)** Las células fueron colectadas en TRIzol a las horas respectivas, para posteriormente extraer ARNm y evaluar los cambios en la expresión de ARNm de *NUAK1*. *Actina* fue usado como gen normalizador. Resultados se muestran, además, normalizados respecto al control (DMEM alto en glucosa). Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ )

Similar a lo observado en HEK293, células MEF a las que se le indujo *Sall2* (DOX+) presentaron un incremento en los niveles proteicos y del ARNm *Nuak1* frente a estrés metabólico, mientras que las células no tratadas (DOX-) mostraron una tendencia a la disminución en sus niveles proteicos (**figura 25A y B**) y no presentaron cambios en ARNm (**figura 25C**). De forma interesante, al comparar las condiciones basales (DMEM alto en glucosa), las células a las que se les indujo *Sall2* presentaron menores niveles proteicos de NUAK1.

En conjunto, estos resultados sugieren que **SALL2 es necesario para el incremento de NUAK1 frente a estrés metabólico por privación de glucosa.**





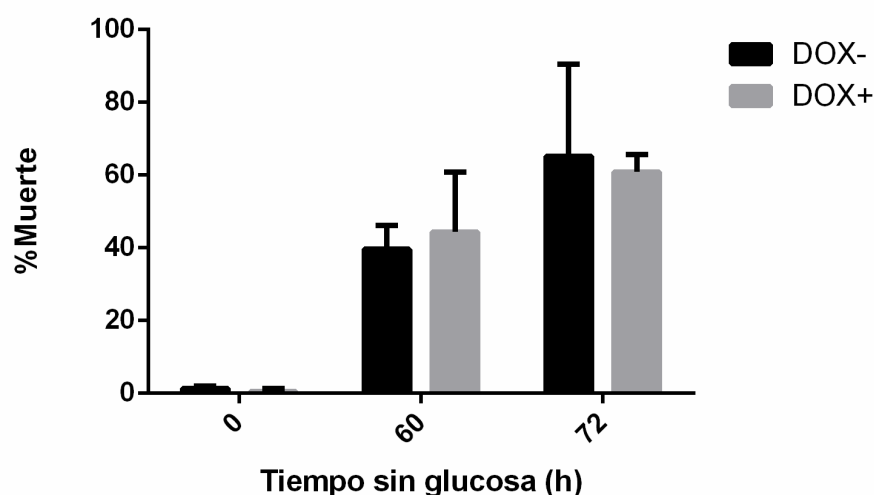
**Figura 25. *Nuak1* incrementa sus niveles proteicos y de ARNm frente a privación de glucosa al inducir *Sall2* en células MEF.** Análisis de los niveles proteicos de NUA1 mediante Western blot (**A** y **B**) y de ARNm de *Nuak1* mediante PCR en tiempo real (**C** y **D**). Células iMEF *Sall2*<sup>-/-</sup> fueron sometidas a 1µg/mL de doxociclina (DOX) por 24h y privadas de glucosa por 1, 4 y 8h. (**A**) Las células fueron colectadas a las horas respectivas y luego lisadas, para posteriormente evaluar los niveles de SALL2 y NUA1. Actina fue usado como control de carga. (**B**) Cuantificación de los cambios en los niveles proteicos de NUA1, normalizados respecto a Actina. (**C**) Las células fueron colectadas en TRIZOL a las horas respectivas, para posteriormente extraer ARNm y evaluar los cambios en la expresión de ARNm de *Nuak1*. ARNr *18s* fue usado como normalizador. Resultados se muestran, además, normalizados respecto al control (DMEM alto en glucosa). Valores corresponden al promedio de 4 experimentos independientes. **Análisis estadístico:** Test-t (P<0.05).

## 2.4 No se observan diferencias en la supervivencia celular frente a estrés metabólico en los modelos inducibles de HEK293 y MEF.

Estudios previos mostraron una dependencia de SALL2 para la supervivencia de células MEF frente a estrés metabólico por carencia de glucosa y suero (**figura 3**).

Adicionalmente, se observó una correlación entre la ausencia de SALL2 (modelos knockout) y de NUAK1 (silenciamiento) frente a privación de glucosa (**figura 4**).

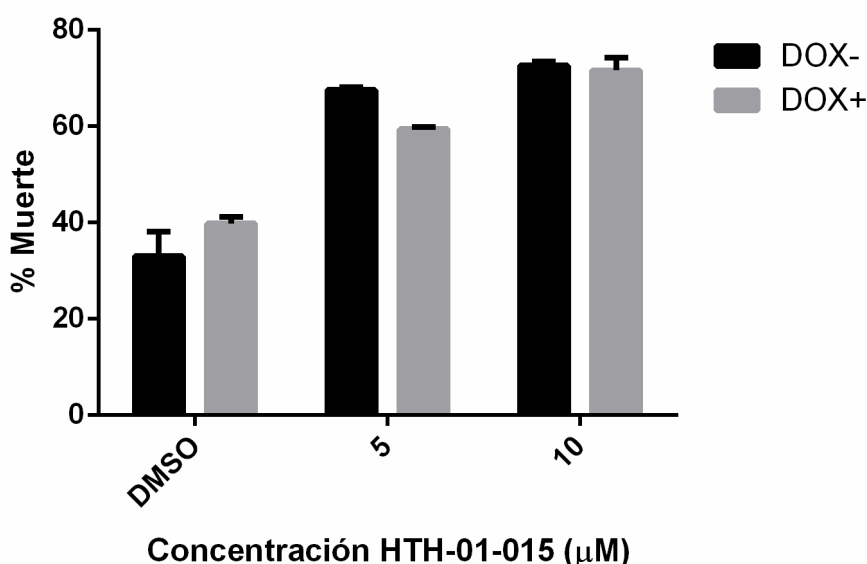
Para determinar si existe una dependencia de NUAK1 para el rol prosupervivencia de SALL2, se propuso utilizar el método de azul de tripán en el modelo ya probado de células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> inducibles (FLAG-*mSall2* TET-ON) en presencia del inhibidor de NUAK1 (HTH-01-015) en comparación con su vehículo (DMSO). Sin embargo, al utilizar el tratamiento con el inhibidor, las células se agregaban y se volvían incontables. En la **figura 26** se muestra la cuantificación del método de azul de tripán solo en condiciones de estrés metabólico, pero en ausencia del inhibidor. Contrario a lo descrito en células MEF (**figura 3**), no se observan diferencias significativas en presencia o ausencia de SALL2. Se intentó replicar este experimento en células MEF inducibles, con similares resultados al agregar el inhibidor (figura no mostrada).



**Figura 26. No se observan diferencias en la muerte celular frente a estrés metabólico en presencia o ausencia de SALL2.** Células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> inducibles por doxociclina (TET-ON) fueron sometidas a privación de glucosa por 0, 60 y 72 ho-

ras. Se comparó la muerte celular utilizando la técnica de azul de tripán. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

Considerando que métodos como el XTT o MTT no son factibles en condiciones de estrés metabólico, ya que determinan actividad metabólica que depende de la glicólisis, se utilizó el método de cristal violeta. Debido a que no se observaron diferencias frente a estrés metabólico en las células HEK293 inducibles usando el método de azul de tripán, se utilizaron MEF inducibles. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en la viabilidad entre DOX- y DOX+ frente a privación de glucosa, tanto en presencia del vehículo como tras inhibir NUA1 (figura 27).

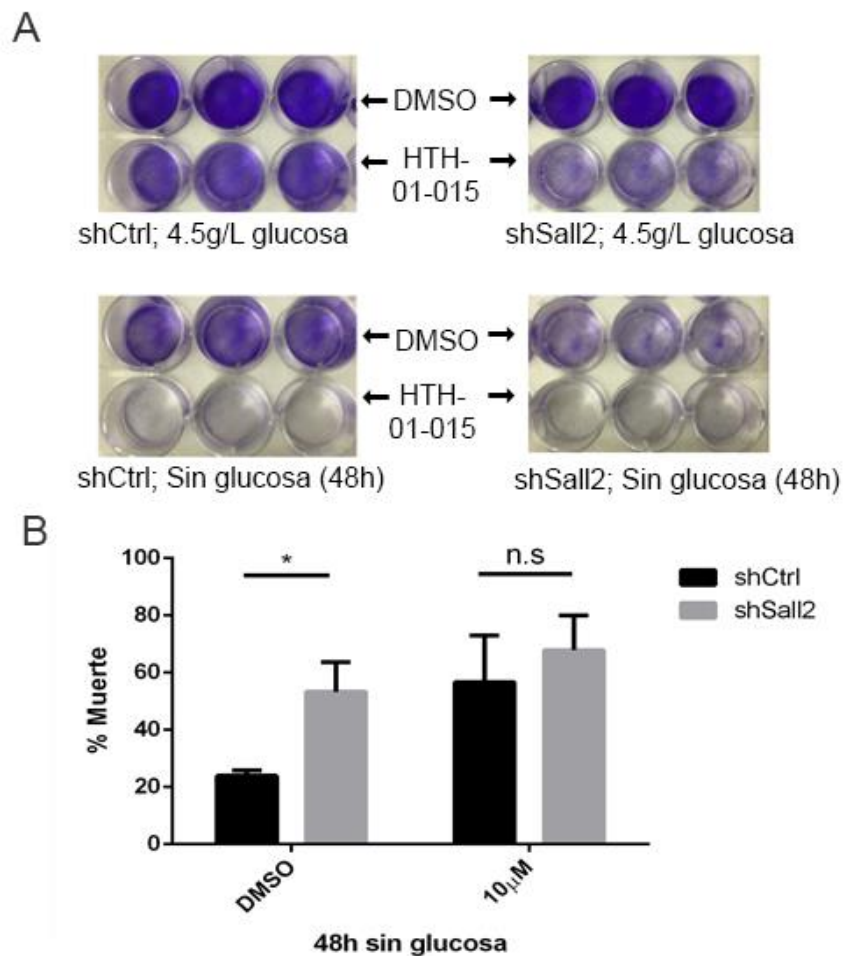


**Figura 27. No se observan diferencias en la muerte celular al inducir SALL2 en células MEF.** Células MEF inducibles fueron privadas de glucosa por 48h y sometidas a tratamiento con el inhibidor específico de NUA1 HTH-01-015 por el mismo tiempo o con su respectivo vehículo (DMSO). Las células fueron fijadas y teñidas con una solución de cristal violeta al 1%. Las células fueron desteñidas con ácido acético al 10% y se determinó su absorbancia a 570nm. Los valores representan al porcentaje de muerte tras normalizar con su respectivo control (DMEM alto en glucosa). **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ )



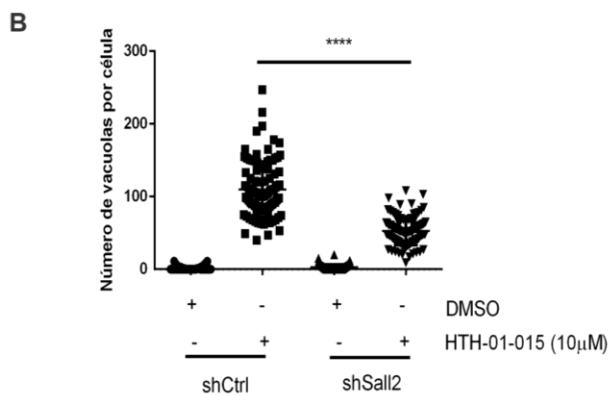
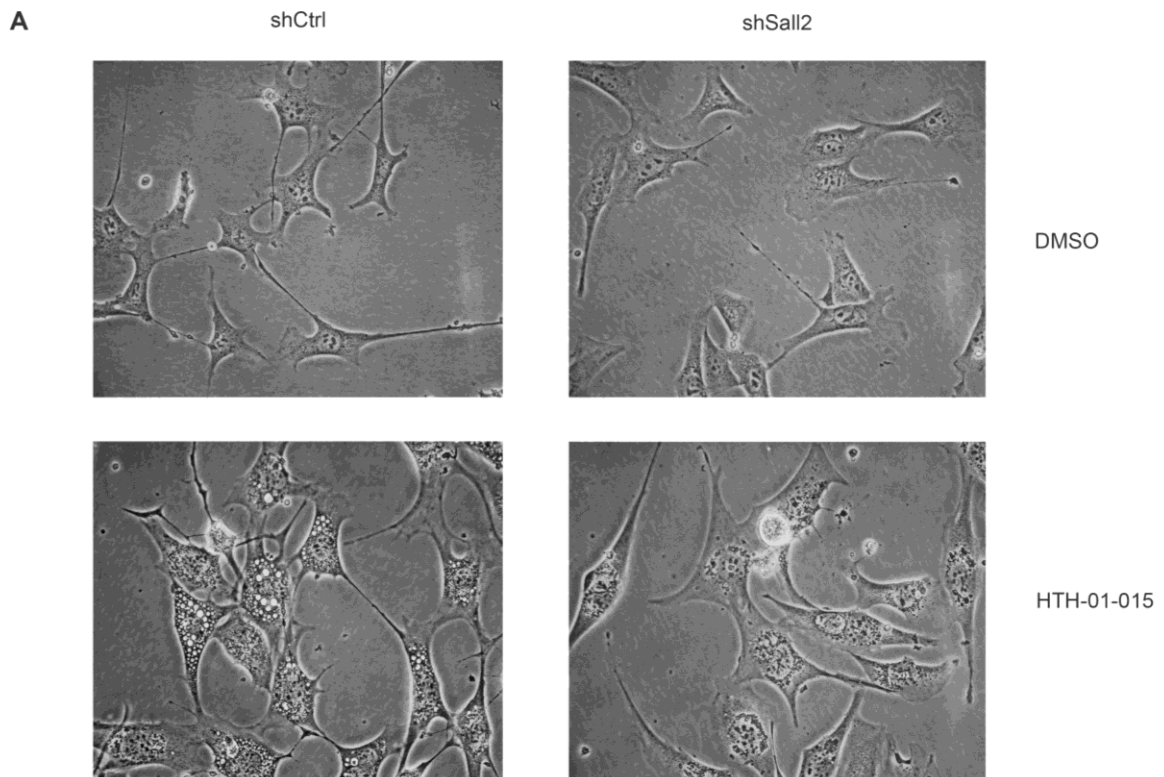
## 2.5 Inhibición de NUA1 reduce el efecto pro-supervivencia de SALL2 en células MEF shSall2.

Con el fin de complementar los estudios de ganancia de función de SALL2, se utilizó un modelo de pérdida de función mediante silenciamiento (*shSall2*) validado previamente en el laboratorio [134]. Similar a lo observado en la **figura 3**, el silenciamiento de Sall2 en MEF silvestres genera un incremento del porcentaje de muerte celular respecto al control, efecto que se revierte en presencia del inhibidor de NUA1 HTH-01-015 (**figura 28**), lo que sugiere que **SALL2 requiere de NUA1 para ejercer su efecto pro-supervivencia.**



**Figura 28. Inhibición de NUA1K1 revierte el efecto pro-supervivencia de SALL2 frente a estrés metabólico por carencia de glucosa.** Células MEF *shSall2* y *shCtrl* fueron privadas de glucosa por 48h y sometidas a tratamiento con el inhibidor específico de NUA1K1 HTH-01-015 o con su respectivo vehículo (DMSO). Las células fueron fijadas y teñidas con una solución de cristal violeta al 1% (A) Fotografía de la placa teñida con cristal violeta. Imagen representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (B) Las células fueron desteñidas con ácido acético al 10% y se determinó su absorbancia a 570nm. Los valores obtenidos representan al porcentaje de muerte tras normalizar con su respectivo control (DMEM alto en glucosa en presencia del inhibidor o vehículo). **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

De forma interesante, en las células tratadas con el inhibidor de NUA1K1 se observó al microscopio la presencia de grandes vacuolas que coinciden con el fenotipo de methuosis, un tipo de muerte celular independiente de caspasas recientemente descrita [135]. Al analizar con mayor detalle, se observó una marcada diferencia en el número y tamaño de vacuolas en las células con y sin silenciamiento de *Sall2*. Con el objetivo de cuantificarlas, se replicó el experimento en placas independientes y se tomaron fotografías en campo claro con el aumento de 40X, confirmándose que las **células MEF con *Sall2* silenciado presentan menor número de vacuolas al tratarlas con HTH-01-015 (figura 29)**. Estos resultados son consistentes con lo previamente observado en nuestro laboratorio frente al inhibidor de CK2, CX-4945. Células SW480 deficientes de SALL2 presentan significativamente menor número y tamaño de vacuolas que su contraparte silvestre (Paulina Sepúlveda, Tesis de Pregrado, 2021, **anexo 1**). La relación de SALL2 con la formación de vacuolas surge como una temática interesante para futuros estudios.



**Figura 29. Células tratadas con el inhibidor de NUA1 HTH-01-015 presentan menor número de vacuolas al silenciar *Sall2*.** Células iMEF sh*Sall2* y su respectivo control fueron tratadas con 10 $\mu$ M del inhibidor de NUA1 HTH-01-015 o su vehículo (DMSO) por 48h. Las células fueron fotografiadas a distintos campos. **(A)** Fotografía representativa de las diferentes condiciones. Las fotografías se tomaron en campo claro con un aumento de 40X. **(B)** Se seleccionaron al azar 100 células de cada condición y se cuantificaron sus vacuolas. **Análisis estadístico:** Test-t ( $P < 0.05$ ).

En conjunto, los resultados obtenidos del objetivo 2 sugieren que el rol prosupervivencia de SALL2 observado frente a estrés metabólico depende del modelo celular. Adicionalmente, en el modelo murino con *Sal/2* silenciado, **el rol prosupervivencia de SALL2 depende de la actividad de NUA1.**



## 8. DISCUSIÓN

La regulación transcripcional de NUAKE1 ha sido escasamente estudiada. Hasta la fecha se sabe que es regulado transcripcionalmente por c-MAF [78], [79], MAFB [79], Nrf2 [17] y TGF- $\beta$  [80]. Esta tesis propone a SALL2 como un nuevo regulador transcripcional de NUAKE1 frente a estrés metabólico por privación de glucosa. Los resultados del primer objetivo muestran una correlación positiva entre la ganancia de función de SALL2 con un incremento de NUAKE1 a nivel proteico, de ARNm y de actividad del promotor. Más aún, los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) revelan que SALL2 se une a sus sitios consenso en la región proximal (228pb) del promotor *NUAK1*.

De forma consistente, modelos con SALL2 inducible en células HEK293 y MEF mostraron una dependencia de SALL2 para el incremento de NUAKE1 frente a estrés metabólico en tiempos tempranos. Sin embargo, al estudiar el efecto en la supervivencia celular, los resultados fueron controversiales. Por un lado, modelos con SALL2 inducible en células HEK293 y MEF no mostraron el rol pro-supervivencia de SALL2 previamente descrito en el laboratorio al comparar entre células MEF silvestres y deficientes de *Sall2* (*Sall2*<sup>-/-</sup>). Por otro lado, células MEF silvestres en las que se silenció *Sall2* (*shSall2*) mostraron una respuesta consistente con los datos previos en cuanto a supervivencia celular, presentando mayor porcentaje de muerte en comparación con las células no silenciadas (*shCtrl*), diferencia que se perdió usando el inhibidor específico de NUAKE1, HTH-01-015. Esto se podría entender como que **existe una dependencia de NUAKE1 para el rol prosupervivencia de SALL2 frente a estrés metabólico.**

La contradicción entre los modelos de pérdida y ganancia de función podría dar cuenta de un **mecanismo compensatorio** ante la ausencia de SALL2, lo que cambiaría la expresión basal de genes y la respuesta celular frente a estrés metabólico. Existen antecedentes en modelos *in vivo* de pez cebra [136], [137], *Arabidopsis* [138] y ratón [139] de que la delección (knockout) de algunos genes producen efectos compensatorios no observados al silenciar mediante morfolinos (revisado en [140]).

Considerando la posibilidad de un mecanismo compensatorio asociado a la ausencia de SALL2, se discute la relación entre este factor de transcripción y los diferentes reguladores transcripcionales de NUA1 descritos hasta la fecha. Cabe destacar que se realizaron análisis de los promotores de cada uno de ellos y se encontraron sitios putativos de unión a SALL2 (**anexo 2**).

La primera regulación transcripcional descrita para NUA1 fue a través de los factores de transcripción de la familia MAF grande: c-MAF y MAFB [79]. c-MAF está implicado en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en la respuesta a la insulina en el tejido adiposo y el hígado. Además, la expresión de c-MAF se incrementa en respuesta a una dieta alta en grasas, lo que sugiere que podría estar involucrado en la respuesta adaptativa al estrés metabólico en el tejido adiposo y el hígado [81]. MAFB, por su parte, es crucial para la diferenciación de las células beta pancreáticas funcionales [141] y protege a células de podocitos de la nefropatía diabética [142]. La regulación de c-MAF y MAFB sobre NUA1 se asocia con un fenotipo agresivo en mieloma múltiple [79]. Si bien no existe evidencia que pudiera relacionar a c-MAF y MAFB con SALL2, y que su respuesta frente a estrés metabólico se podría considerar opuesta, al analizar sus promotores, se encontraron sitios putativos

de unión a SALL2 (**anexo 2**). No se encontraron sitios MARE (sitio consenso de las proteínas MAF) en ninguno de los promotores de SALL2 (P1 y P2). La inducción transcripcional de NUA1 en contextos opuestos (privación y exceso de glucosa) podría tener diferentes funciones dependiendo de la localización subcelular. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la privación de glucosa promueve la acumulación de NUA1 citosólico en células HeLa, y que la localización de NUA1 depende de la línea celular estudiada [56]. NUA1 citosólico incrementa la capacidad glicolítica frente a inhibición de la mitocondria y producción de ATP en células de cáncer, mientras que NUA1 nuclear está envuelto en la reprogramación metabólica hacia la glicólisis [12]. Para responder esta pregunta, se propone evaluar la localización subcelular de NUA1 al ser inducida transcripcionalmente por SALL2 y por las proteínas MAF, respectivamente.

NUA1 incrementa frente a estrés oxidativo en cáncer de colon a través de la inducción transcripcional por NRF2, cumpliendo un rol protector [17]. De forma interesante, *NFE2L2*, el promotor de NRF2, presenta 14 sitios consenso de unión para SALL2 (**anexo 2**). Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que SALL2 incrementa sus niveles frente a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y arsenito de sodio en células MEF (Claudia Álvarez, Tesis de pregrado, 2017). Esta correlación podría sugerir que frente a estrés oxidativo, SALL2 incrementa la expresión de NRF2, regulando de forma indirecta la expresión de NUA1. Pese a que no se observó incremento de NUA1 frente a estrés oxidativo en células HEK293, se propone evaluar esta relación en células de cáncer de colon SW480, las cuales expresan SALL2 (**anexo 3**).

El factor transformante beta (TGF- $\beta$ ) es una proteína de señalización celular que regula diversas funciones, incluyendo la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y la respuesta inmunológica. Su función es crucial en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos, así como en la respuesta del cuerpo a la inflamación y el cáncer. TGF- $\beta$  también se ha identificado como un objetivo terapéutico para varias enfermedades, incluyendo la fibrosis y el cáncer. NUAK1 presenta retroalimentación con TGF- $\beta$  que, dependiendo del tipo celular, puede ser positiva o negativa [13], [143]. Por un lado, NUAK1 y NUAK2 son inducidos transcripcionalmente al tratar fibroblastos de piel con TGF- $\beta$ , donde NUAK1 reprime la señalización de TGF- $\beta$ , mientras que NUAK2 la incrementa [80]. Por el otro lado, TGF- $\beta$  también induce un incremento rápido de NUAK1 en fibroblastos de riñón y pulmón, mientras que, a su vez, NUAK1 promueve la señalización profibrótica YAP y TGF- $\beta$ /SMAD, generando una retroalimentación positiva que conduce a fibrosis persistente [13]. Los autores explican estos resultados aparentemente contradictorios por la diferencia en el contexto celular [13]. Se ha descrito previamente **que TGF- $\beta$  tiene distintos efectos y regulación dependiendo de las células estudiadas y la coexpresión con diferentes factores** [144]. Respecto a SALL2, este incrementa sus niveles frente a privación de suero en conjunto con su regulador, AP4. Tanto la reincorporación de suero en fibroblastos quiescentes como el tratamiento con el factor transformante beta (TGF- $\beta$ ) reprimen a SALL2 y AP4 y los llevan a ubiquitinación, de forma independiente del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) [114]. Debido a la presencia de sitios de unión de SALL2 en el promotor de TGF- $\beta$  (**anexo 2**), se propone para futuros estudios evaluar si existe una relación de retroalimentación entre SALL2 y TGF- $\beta$ , y cómo este eje podría afectar la expresión de NUAK1.



Otra alternativa para explicar las diferencias observadas en nuestros resultados dependiendo del modelo celular podría ser por el contexto genético de las células utilizadas. Las células MEF fueron aisladas a partir de ratones *Sall2*<sup>+/+</sup> y *Sall2*<sup>-/-</sup>, respectivamente. Nuestro laboratorio determinó que en células MEF derivadas de los ratones *Sall2*<sup>-/-</sup> existe una huella congénica de mutaciones asociadas al método mediante el cual se generó el modelo [134]. Esta huella congénica influencia en la expresión de genes, pudiendo afectar la respuesta de NUA1K1 frente a estrés metabólico por privación de glucosa de forma independiente de SALL2.

Además, es importante considerar que las células MEF son del tipo mesenquimal, mientras que las HEK293 tienen características epiteliales, por lo que su respuesta frente a diversos factores, tanto extrínsecos como intrínsecos, es diferente. Cabe destacar que el origen de las células HEK293 es controversial. Si bien son ampliamente usadas como modelo de células normales, esto ha sido discutido por diversos autores (revisado en [129]). Las células HEK293 **no presentan un patrón de expresión tejido-específico evidente**, y expresan marcadores de células progenitoras renales [145], [146], neuronales [147] [148] y de glándula adrenal [149]. Más aún, existen evidencias de que las células HEK293 pueden generar sinapsis [150], son sensibles a agonistas implicados en señalización neuronal [151] y expresan canales funcionales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje, específicos de neuronas [152]. Además, el cariotipo de las células HEK293 es complejo, presentando aneuploidía, la cual puede variar de grado dependiendo del pasaje, origen y modificación realizada (HEK293T, HEK293S, etc.) (revisado en [129]). Las células HEK293 han sido consideradas más cercanas a un modelo de transformación oncogénica que a epitelio renal normal [129]. Un buen acercamiento para futuros estudios que bus-

quen la función normal de SALL2 sobre NUA1 frente a estrés metabólico y su desregulación en cáncer, podría ser el uso de células de riñón normal y de cáncer renal, teniendo los antecedentes en HEK293 como un modelo intermedio.

Otro aspecto que se debe considerar es la diferencia en las isoformas de SALL2 presentes en ambos modelos celulares. Por un lado, las células HEK293 expresan ambas isoformas [96]. Ensayos preliminares de esta tesis, usando células HEK293 deficientes de SALL2 a las cuales se les indujo ambas isoformas por separado (**anexo 4**), mostraron que E1 incrementa los niveles de ARNm de *NUAK1*, mientras que E1A no produce efectos en su expresión (**anexo 5**). Si bien SALL2 E1 se ha descrito principalmente como represor debido a su interacción con el complejo NuRD, cabe destacar que los diferentes miembros de la familia SALL pueden actuar como activadores o represores transcripcionales (revisado en [85]). Por otro lado, las células MEF silvestres solo expresan la isoforma E1A [101]. Los resultados obtenidos sugieren que la privación de *Sall2* en MEF en condiciones basales (DMEM alto en glucosa) se asocia con niveles incrementados de *Nuak1*. Si bien los resultados del ensayo de gen reportero fueron realizados con el promotor murino y sobreexpresando *Sall2* E1A, el contexto genético de las células (HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup>) pudo haber afectado en la actividad basal del promotor de *Nuak1*. Para futuros estudios, se proyecta clonar el promotor de *NUAK1* humano y realizar ensayos de gen reportero de luciferasa, sobreexpresando SALL2 E1 y E1A por separado.

Estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales se investigó la participación de las diferentes isoformas en cáncer, demostraron que SALL2 total (isoformas E1 y E1A) correlacionan principalmente con marcas de cromatina activa (H3K27Ac y

H3K4me3) por sobre marcas de represión (H3K27me3). Por otro lado, en ausencia de la isoforma E1A, SALL2 E1 correlaciona principalmente con la marca de represión por sobre las de activación [96]. Esto es consistente con la presencia del motivo de unión al complejo represor NuRD en SALL2 E1, el cual no se encuentra presente en la isoforma E1A [94]. En esta publicación, nosotros hipotetizamos un rol potencial de SALL2 E1A como un regulador negativo de SALL2 E1 por mecanismos diferentes al reclutamiento del complejo NuRD [96]. Esta hipótesis abre nuevas líneas de investigación para demostrar una posible retroalimentación entre las dos isoformas, donde SALL2 E1 podría incrementar los niveles de NUA1 en alta glucosa (condiciones basales), siendo reemplazada por SALL2 E1A frente a estrés metabólico (**anexo 6**). Siguiendo esta línea de pensamiento, la ausencia de SALL2 E1 en las células MEF podría relacionarse con las diferencias observadas en el comportamiento de NUA1 en los diferentes modelos de pérdida y ganancia de función.

Más allá del rol del eje SALL2/NUA1 en la supervivencia celular frente a privación de glucosa, cabe destacar la presencia de vacuolas metuóticas frente al tratamiento con el inhibidor de NUA1, HTH-01-015, las cuales son significativamente menos abundantes en las células silenciadas (*shSall2*) respecto al control (*shCtrl*) (**figura 29**). Es importante destacar que las vacuolas se observaron en condiciones de **alta glucosa**.

La methuosis corresponde a un tipo de muerte independiente de caspasas, caracterizada por una vacuolización masiva del citoplasma. Estas vacuolas derivan desde macropinosomas [135]. La macropinocitosis es un proceso de endocitosis independiente de clatrina, donde las células de mamíferos internalizan fluido extracelu-

lar, nutrientes y proteínas en vesículas formadas por protrusiones membranosas, conocidas como lamelipodios [153]. En condiciones normales, los macropinosomas entran en la vía endocítica, donde se reciclan en la membrana o maduran en endosomas tardíos, para finalmente fusionarse con lisosomas. Por el contrario, en la methuosis este proceso es disfuncional, donde los macropinosomas no son reciclados ni fusionados con lisosomas, sino que confluyen y forman vacuolas de mayor tamaño [135], [154], [155]. La evidencia obtenida con el inhibidor de NUA1, HTH-01-015 resulta interesante, ya que datos previos de nuestro laboratorio muestran que células de cáncer de colon SW480 deficientes de SALL2 presentan menor formación de vacuolas methuóticas en comparación con las células silvestres al tratarlas con el inhibidor de CK2, CX-4945 (**anexo 1**, Paulina Sepúlveda, tesis de pregrado, 2020). **La relación entre SALL2 y la ocurrencia de methuosis es un área aún por explorar, siendo relevante en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para células de cáncer resistentes a apoptosis.**

En conjunto, los resultados aportan evidencia sobre SALL2 como un nuevo regulador transcripcional de NUA1 frente a estrés metabólico asociado a supervivencia celular y sugieren una aparente regulación isoforma-específica, la cual depende del contexto celular. Se proyecta buscar la relevancia de esta regulación frente a diferentes contextos de estrés celular, o frente a estrés metabólico por deficiencia de otros nutrientes, como glutamina y piruvato, entre otros. Esta tesis propone nuevas e interesantes líneas de investigación para comprender los mecanismos involucrados en la respuesta celular a estrés metabólico mediada por SALL2 y NUA1.

## 9. CONCLUSIÓN

**Objetivo 1:** Determinar si NUAKE1 es un blanco transcripcional directo de SALL2.

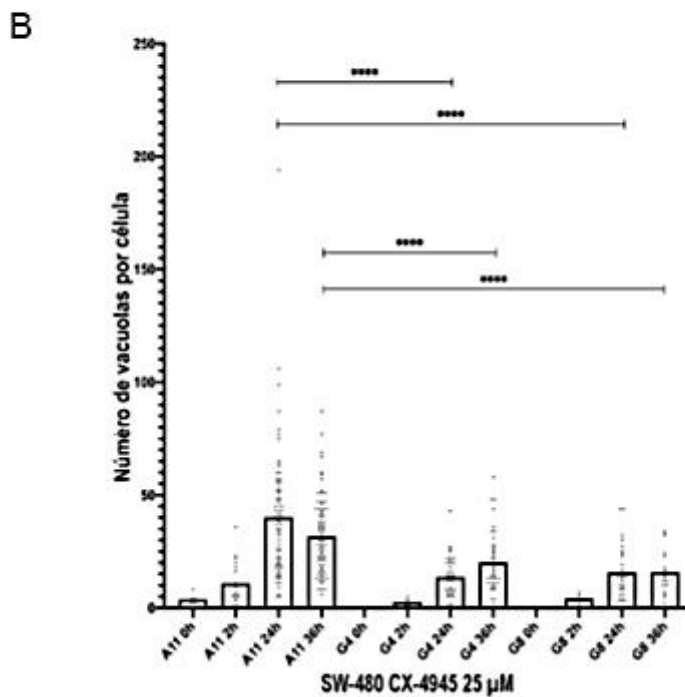
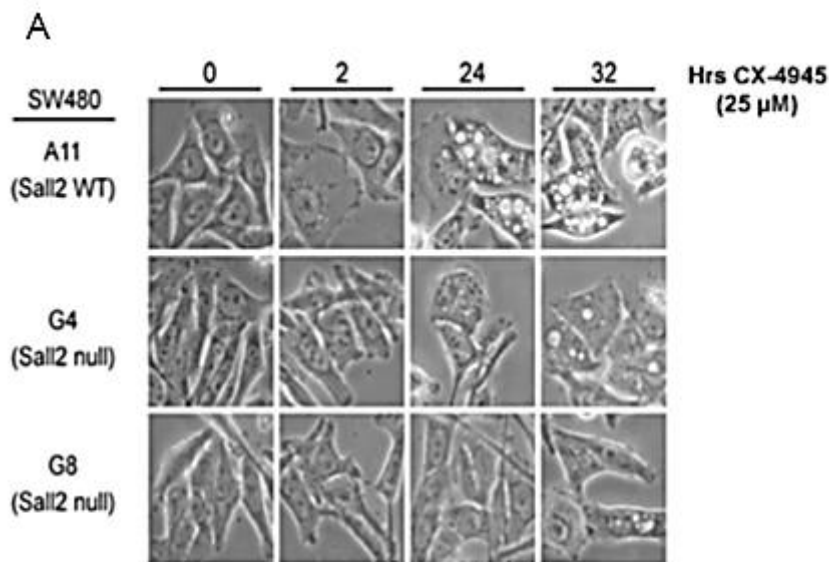
- i. Se analizó el gen de NUAKE1 y sus potenciales regulaciones.
  - a. Se encontró una isla CpG de 2350pb y 68% de GC en la región promotora de *NUAK1* humano y 1749 y 67% de GC en la región promotora de *Nuak1* murino.
  - b. Las modificaciones epigenéticas (H3K27Ac, H3K27me3 y H3K4me3) indican que el promotor proximal se encuentra activo.
  - c. El promotor proximal de *NUAK1* humano y *Nuak1* murino presentan sitios de unión para SALL2.
  - d. Se encontró un enhancer distal activo en neutrófilos y monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), el cual no presenta sitios de unión a SALL2.
- ii. Se realizaron análisis bioinformáticos utilizando bases de datos públicas (miPanda y R2, además de análisis complementarios en XenaBrowser, Gepia y el analizador de correlaciones del laboratorio Bishop), encontrándose correlación positiva entre la expresión de SALL2 y NUAKE1 en diversos tejidos normales y cancerosos.
- iii. Niveles proteicos y de ARNm de NUAKE1 incrementan de forma correlativa con la sobreexpresión de SALL2.

- iv. A través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y de gen reportero, se concluye que SALL2 se une al promotor de *NUAK1* e incrementa su actividad.

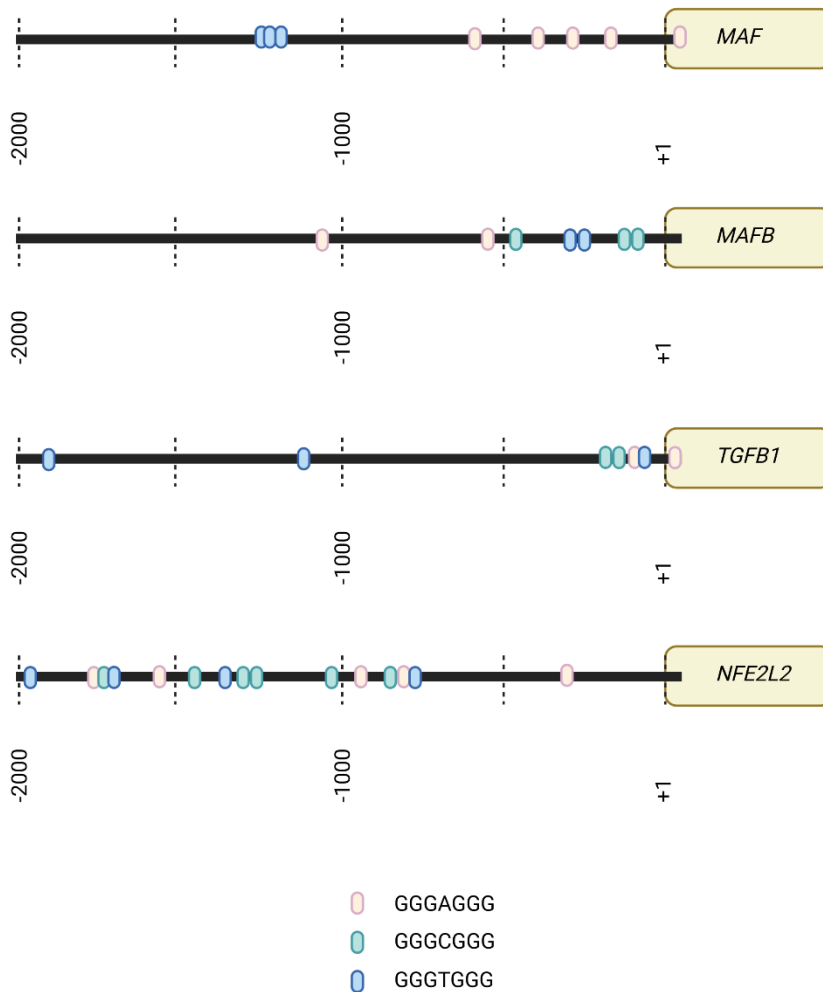
**Objetivo 2:** Determinar si SALL2 promueve supervivencia celular frente a estrés metabólico a través de la inducción transcripcional de NUAK1

- i. SALL2 y NUAK1 incrementan frente a estrés metabólico por privación de glucosa de forma dependiente del tiempo.
- ii. La inducción de SALL2 es necesaria para el incremento de NUAK1 en modelos HEK293 y MEF inducibles por doxociclina.
- iii. Células MEF con *Sall2* silenciado presentan mayor porcentaje de muerte frente a estrés metabólico por carencia de glucosa. Este efecto es revertido al utilizar el inhibidor de NUAK1 HTH-01-015. Esto nos lleva a sugerir que **NUAK1 es necesario para el rol pro supervivencia de SALL2.**
- iv. Las células con SALL2 silenciado (*shSall2*) presentan menor número de vacuolas al tratarlas con el inhibidor de NUAK1, HTH-01-015. Estas vacuolas se corresponden con un fenotipo de methuosis, un tipo de muerte celular caracterizado por una macropinocitosis catastrófica. Se requieren mayores estudios para confirmar el rol de SALL2 en este proceso.

## 10. ANEXOS

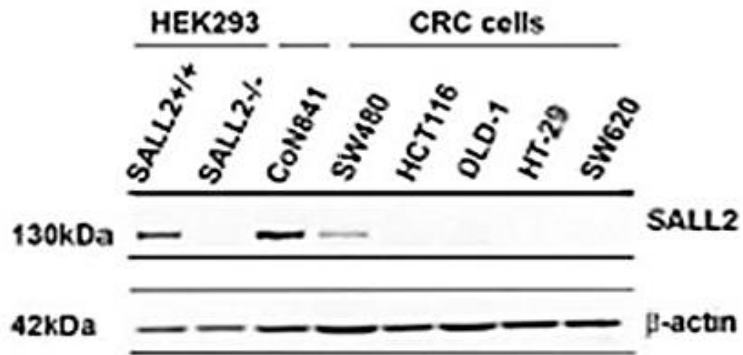


**Anexo 1. Células deficientes de SALL2 presentan menor número de vacuolas frente al tratamiento con el inhibidor de CK2, CX-4945.** Células SW480 SALL2WT(A11) y SALL2KO (G4 y G8) fueron tratadas con 25 $\mu$ M de CX-4945 por 2, 24 y 32h. Se tomaron fotografías en campo claro con el aumento 40X (A) y se cuantificó el número de vacuolas (B). Modificado desde Paulina Sepúlveda, Tesis de Pregrado, 2020



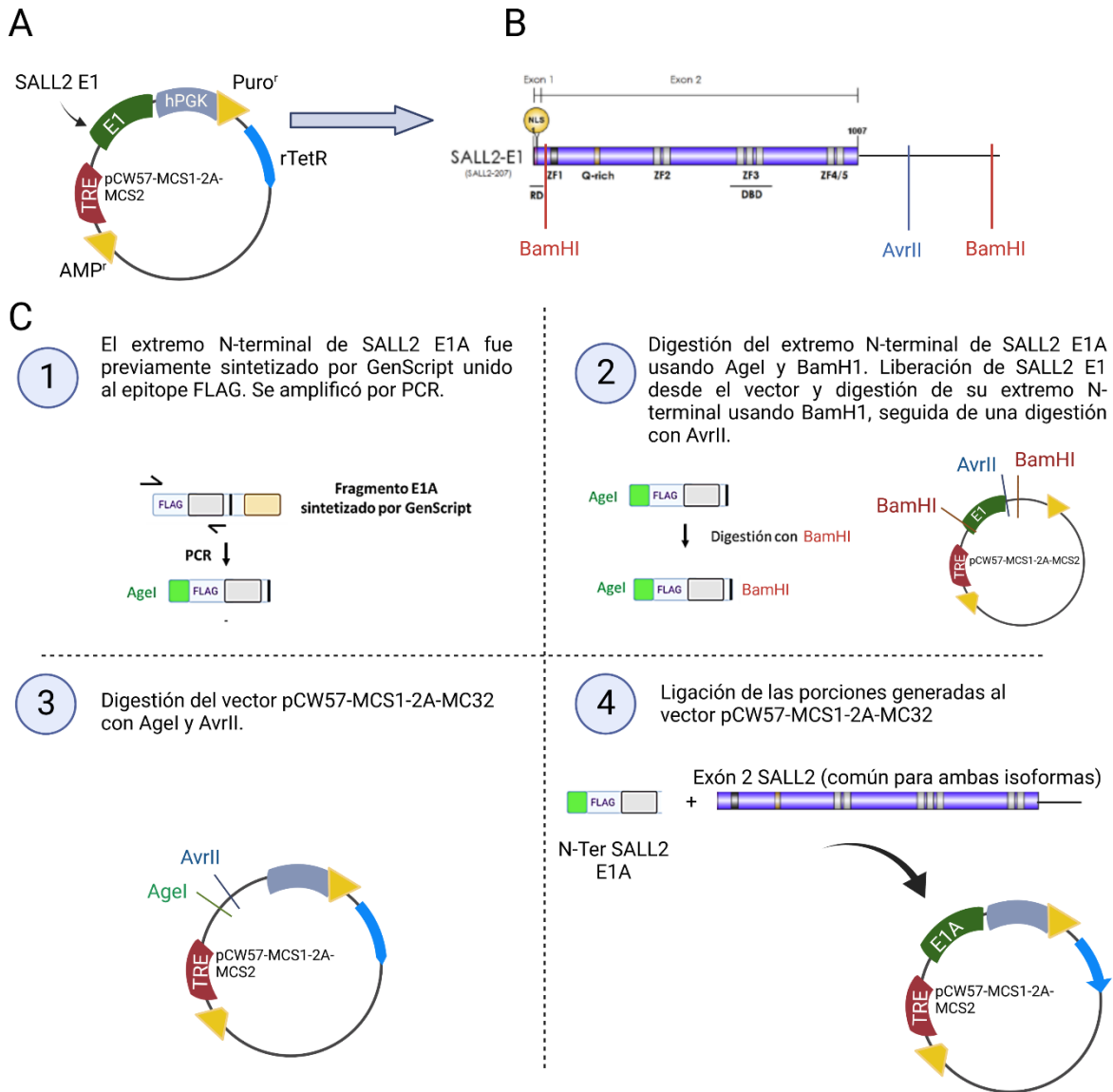
**Anexo 2. Los promotores de los reguladores transcripcionales descritos para NUA1K1 presentan sitios consenso para SALL2.** Sitios putativos de unión a SALL2 descritos en literatura por Gu y colaboradores [89] en los promotores de c-MAF (*MAF*), MAFB (*MAFB*), TGF- $\beta$  (*TGFB1*) y NRF2 (*NFE2L2*), respectivamente. Óvalos en naranja representan el sitio GGGAGGG, en verde, el sitio GGGCGGG y en azul, el sitio GGGTGGG. Las secuencias de los promotores fueron obtenidas de la base de datos de promotores eucarióticos (EPD, por sus siglas “Eukaryotic promoter database” <https://epd.epfl.ch//index.php>).





**Anexo 3. Células de cáncer colorrectal SW480 expresan SALL2.** Análisis de los niveles de SALL2 mediante *western blot* en distintas líneas celulares de CCR. Las líneas celulares HEK293 y CoN841 fueron utilizados como control positivo y HEK293 con SALL2 nulo como control negativo.



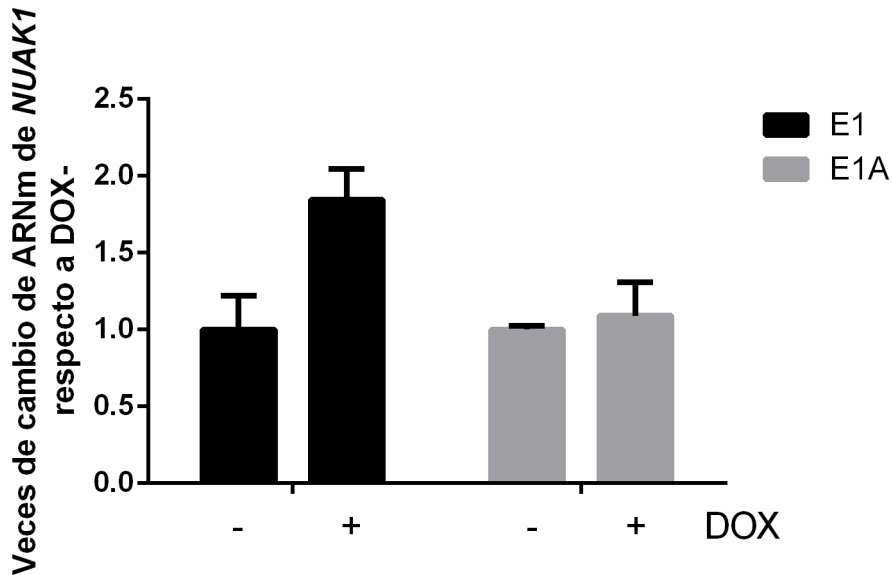


**Anexo 4. Esquema de la estrategia de subclonamiento para generación del vector inducible *pCW57-MCS1-2A-MCS2-E1A*.** (A) Esquema de las regiones principales del vector *pCW57-MCS1-2A-MCS2* unido al gen de SALL2 E1 (B) Representación de la proteína SALL2 E1 con sus regiones características y el exón que codifica para cada una de ellas (modificado desde [85]). Cabe destacar que el esquema representa a la proteína, pero al estar en un plásmido, se extrapolará a la región correspondiente del exón. Se muestran además los sitios de corte para las enzimas BamHI (cerca de la región que codifica para el extremo N-terminal y en la región dentro del vector por la zona que codifica al extremo C-terminal) y AvrII (en el vector). (C) Estrategia de subclonamiento del vector inducible para la isoforma E1A a partir del plásmido que contenía la isoforma E1 inducible. **1**: Generación del fragmento Flag-E1A de SALL2 a partir de una porción ya sintetizada por GenScript (<https://www.genscript.com/>). **2**: Se digirió con las enzimas de restricción AgeI y

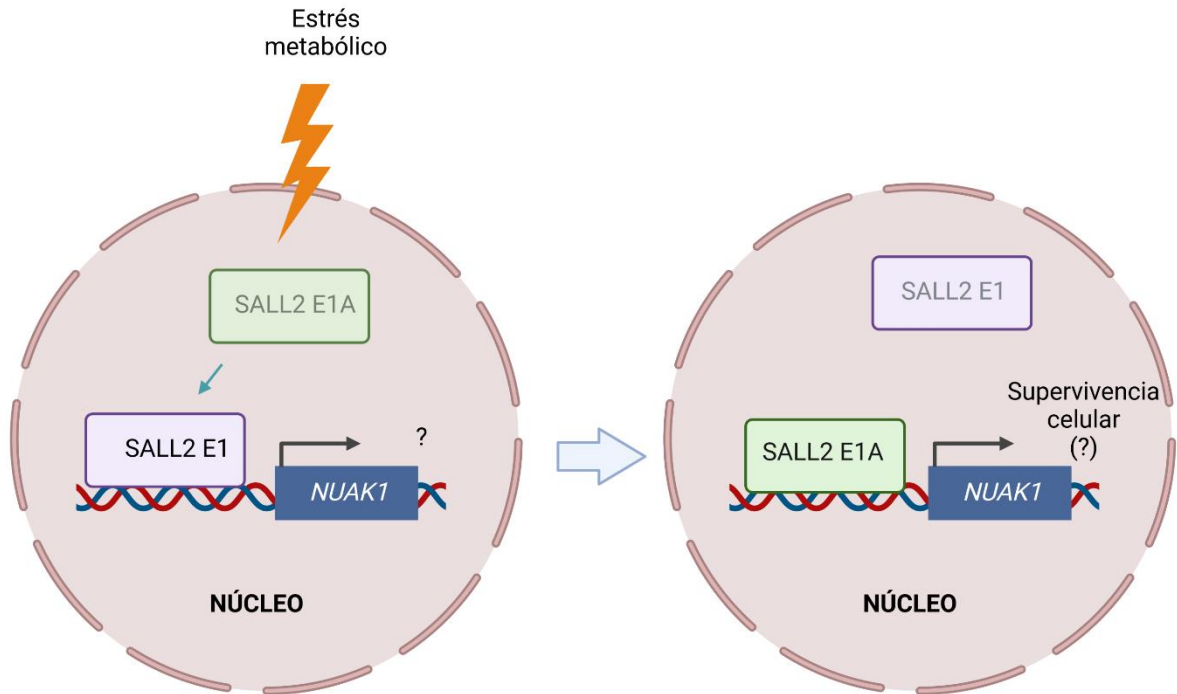
BamHI para la obtención del fragmento final a ligar. También se digirió el plásmido que contenía la isoforma de SALL2 E1 inducible, primero con BamHI y luego con AvrII, con el objetivo de liberar la parte constante de SALL2 (correspondiente al exón 2). **3:** Se digirió el vector vacío pCW57-MCS1-2A-MCS2 con las enzimas AgeI y AvrII. **4:** Ligación final de las porciones de SALL2 E1A generadas en el vector pCW57-MCS1-2A-MCS2.



HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup>, *Flag-hSALL2* TET-ON  
(diferentes isoformas)



**Anexo 5. SALL2 E1 incrementa la expresión del ARNm *NUAK1* en condiciones basales.** Análisis de los niveles de ARNm de *NUAK1* mediante PCR en tiempo real. Células HEK293 *SALL2*<sup>-/-</sup> inducibles para las diferentes isoformas fueron sometidas a 1µg/mL de doxociclina (DOX) por 24h. Las células fueron colectadas en TRIzol, para posteriormente extraer ARNm y evaluar los cambios en la expresión de ARNm de *NUAK1*. *Actina* fue usado como gen normalizador. N=1.



**Anexo 6. Relación propuesta entre las isoformas de SALL2.** Los datos presentados sugieren que SALL2 E1 incrementa la expresión de NUA1 en condiciones de alta glucosa (**figura 13 y anexo 6**), mientras que SALL2 E1A ha mostrado una tendencia a incrementar los niveles de NUA1 frente a estrés metabólico (**figura 24 y 25**). Sumado a las conclusiones propuestas por estudios previos de nuestro laboratorio [96], planteamos la hipótesis de que existe una competencia entre ambas isoformas por la regulación de NUA1, dependiente del contexto metabólico.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] D. Hanahan, “Hallmarks of Cancer: New Dimensions,” *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [3] C. J. Chan, M. J. Smyth, and L. Martinet, “Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress,” *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 1, pp. 5–14, 2014, doi: 10.1038/cdd.2013.26.
- [4] R. G. Jones and C. B. Thompson, “Tumor suppressors and cell metabolism : a recipe for cancer growth Tumor suppressors and cell metabolism : a recipe for cancer growth,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 514, pp. 537–548, 2009, doi: 10.1101/gad.1756509.
- [5] R. A. Cairns, I. S. Harris, and T. W. Mak, “Regulation of cancer cell metabolism,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 85–95, 2011, doi: 10.1038/nrc2981.
- [6] G. J. Gowans and D. G. Hardie, “AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 1, pp. 71–75, 2014, doi: 10.1042/BST20130244.
- [7] T. Monteverde, N. Muthalagu, J. Port, and D. J. Murphy, “Evidence of cancer-promoting roles for AMPK and related kinases,” *FEBS J.*, vol. 282, no. 24, pp. 4658–4671, 2015, doi: 10.1111/febs.13534.
- [8] S.-M. Jeon, N. S. Chandel, and N. Hay, “AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress,” *Nature*, vol. 485, no. 11, pp. 661–667, 2012, doi: 10.1038/nature11066.
- [9] B. M. Emerling *et al.*, “Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 46, no. 10, pp. 1386–1391, 2009, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.019.
- [10] S. A. Hawley *et al.*, “Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD $\alpha$ - $\beta$  and MO25 $\alpha$ - $\beta$  are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade,” *J. Biol.*, vol. 2, no. 4, pp. 1–16, 2003.
- [11] J. M. Lizcano *et al.*, “LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 4, pp. 833–843, 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
- [12] E. Escalona, M. Muñoz, R. Pincheira, Á. A. Elorza, and A. F. Castro, “Cytosolic NUAK1 Enhances ATP Production by Maintaining Proper Glycolysis and Mitochondrial Function in Cancer Cells,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. July, pp. 1–12, 2020, doi:

10.3389/fonc.2020.01123.

- [13] T. Zhang *et al.*, “NUAK1 promotes organ fibrosis via YAP and TGF- $\beta$ /SMAD signaling,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 4028, pp. 1–14, 2022.
- [14] T. Monteverde, A. Hedley, J. R. Knight, O. J. Sansom, and D. J. Murphy, “Calcium signalling links MYC to NUAK1,” *Oncogene*, vol. 37, no. 8, pp. 982–992, 2017, doi: 10.1038/onc.2017.394.
- [15] R. Esteve-Puig *et al.*, “A Mouse Model Uncovers LKB1 as an UVB-Induced DNA Damage Sensor Mediating CDKN1A (p21WAF1/CIP1) Degradation,” *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 10, 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004721.
- [16] N. Humbert *et al.*, “Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUAK1,” *EMBO J.*, vol. 29, no. 2, pp. 376–86, 2010, doi: 10.1038/emboj.2009.342.
- [17] J. L. F. Port *et al.*, “Colorectal tumors require NUAK1 for protection from oxidative stress,” *Cancer Discov.*, p. CD-17-0533, 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0533.
- [18] T. Namiki *et al.*, “AMP kinase-related kinase NUAK2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 16, pp. 6597–6602, 2011, doi: 10.1073/pnas.1007694108.
- [19] K. Goto *et al.*, “The AMPK-related kinase SNARK regulates hepatitis C virus replication and pathogenesis through enhancement of TGF- $\beta$  signaling,” *Journal of Hepatology*, vol. 59, no. 5, pp. 942–948, 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.025.
- [20] C. Wang, D. Song, J. Fu, and X. Wen, “SIK1 Regulates CRT2-Mediated Gluconeogenesis Signaling Pathway in Human and Mouse Liver Cells,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 11, no. September, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00580.
- [21] R. Stewart, D. Akhmedov, C. Robb, C. Leiter, and R. Berdeaux, “Regulation of SIK1 abundance and stability is critical for myogenesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 1, pp. 117–122, 2013, doi: 10.1073/pnas.1212676110.
- [22] L. Zou, D. Hong, K. Li, and B. Jiang, “Salt-inducible kinase 2 (SIK2) inhibitor ARN-3236 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice,” *BMC Pulm. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1186/s12890-022-01940-0.
- [23] Z. Rong *et al.*, “SIK2 maintains breast cancer stemness by phosphorylating LRP6 and activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling,” *Oncogene*, vol. 41, no. 16, pp. 2390–2403, 2022, doi: 10.1038/s41388-022-02259-0.
- [24] X. Shi *et al.*, “SIK2 promotes ovarian cancer cell motility and metastasis by phosphorylating MYLK,” *Mol. Oncol.*, pp. 1–17, 2022, doi: 10.1002/1878-0261.13208.

- [25] N. Horike *et al.*, "Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 20, pp. 18440–18447, 2003, doi: 10.1074/jbc.M211770200.
- [26] Y. Katoh *et al.*, "Salt-inducible kinase (SIK) isoforms: Their involvement in steroidogenesis and adipogenesis," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 217, no. 1–2, pp. 109–112, 2004, doi: 10.1016/j.mce.2003.10.016.
- [27] B. S. Heyer, H. Kochanowski, and D. Solter, "Expression of Melk, a new protein kinase, during early mouse development," *Dev. Dyn.*, vol. 215, no. 4, pp. 344–351, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199908)215:4<344::AID-AJA6>3.0.CO;2-H.
- [28] L. N. Johnson, M. E. M. Noble, and D. J. Owen, "Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation," *Cell*, vol. 85, no. 2, pp. 149–158, 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81092-2.
- [29] T. Timm *et al.*, "MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1," *EMBO J.*, vol. 22, no. 19, pp. 5090–5101, 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg447.
- [30] S. Natarajan, L. Ponnusamy, and R. Manoharan, "MARK2 4 promotes Warburg effect and cell growth in non-small cell lung carcinoma through the AMPK $\alpha$ 1 mTOR HIF-1 $\alpha$  signaling pathway.pdf," *BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1869, p. 119242, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119242>.
- [31] L. Wang, W. Pu, C. Wang, L. Lei, and H. Li, "Microtubule affinity regulating kinase 4 promoted activation of the NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in periodontitis," *J. Oral Microbiol.*, vol. 14, no. 1, 2022, doi: 10.1080/20002297.2021.2015130.
- [32] L. Tian, G. Liu, Z. Kang, and P. Yan, "Microtubule Affinity-Regulating Kinase 4 Promotes Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction by Activating NF- $\kappa$ B and Inhibiting AMPK Pathways in Porcine Placental Trophoblasts," *Biomedicines*, vol. 10, no. 1. 2022, doi: 10.3390/biomedicines10010165.
- [33] A. Rodríguez-Asiain *et al.*, "Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: Modulation of kinase activity by lipid environment," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1811, no. 12, pp. 1124–1135, 2011, doi: 10.1016/j.bbalip.2011.10.004.
- [34] R. Lu, H. Niida, and M. Nakanishi, "Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31164–31170, 2004, doi: 10.1074/jbc.M404728200.
- [35] H. Saiyin *et al.*, "BRSK2 induced by nutrient deprivation promotes Akt activity in pancreatic cancer via downregulation of mTOR activity," *Oncotarget*, vol. 8, no. 27, pp. 44669–44681, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.17965.



- [36] Y. J. Choi *et al.*, "Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation," *Genes Dev.*, vol. 22, no. 18, pp. 2485–2495, 2008, doi: 10.1101/gad.1685008.
- [37] E. Molina, L. Hong, and I. I. Chefetz, "AMPK $\alpha$ -like proteins as LKB1 downstream targets in cell physiology and cancer," *Journal of Molecular Medicine*. 2021, doi: 10.1007/s00109-021-02040-y.
- [38] P. Chen, K. Li, Y. Liang, L. Li, and X. Zhu, "High NUA1 expression correlates with poor prognosis and involved in NSCLC cells migration and invasion.," *Exp. Lung Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 9–17, 2013, doi: 10.3109/01902148.2012.744115.
- [39] S. Lu *et al.*, "ARK5 promotes glioma cell invasion, and its elevated expression is correlated with poor clinical outcome.," *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 3, pp. 752–763, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2012.09.018.
- [40] J. Cui *et al.*, "Overexpression of ARK5 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma.," *Tumour Biol.*, vol. 34, no. 3, pp. 1913–1918, Jun. 2013, doi: 10.1007/s13277-013-0735-x.
- [41] N. T. Phippen *et al.*, "NUAK1 (ARK5) Is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer.," *Front. Oncol.*, vol. 6, p. 213, 2016, doi: 10.3389/fonc.2016.00213.
- [42] S. A. Roh *et al.*, "Growth and invasion of sporadic colorectal adenocarcinomas in terms of genetic change," *J. Korean Med. Sci.*, vol. 25, no. 3, pp. 353–360, 2010, doi: 10.3346/jkms.2010.25.3.353.
- [43] A. Suzuki, G.-I. Kusakai, A. Kishimoto, J. Lu, T. Ogura, and H. Esumi, "ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation.," *Oncogene*, vol. 22, no. 40, pp. 6177–6182, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206899.
- [44] A. Suzuki *et al.*, "Involvement of transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 36, pp. 31557–31563, 2005, doi: 10.1074/jbc.M503714200.
- [45] B. Y. Shorning and A. R. Clarke, "LKB1 loss of function studied in vivo," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 7, pp. 958–966, 2011, doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.019.
- [46] J. L. Fritz *et al.*, "A novel role for NUA1 in promoting ovarian cancer metastasis through regulation of fibronectin production in Spheroids," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 5, pp. 1–23, 2020, doi: 10.3390/cancers12051250.
- [47] G. Kusakai, A. Suzuki, T. Ogura, M. Kaminishi, and H. Esumi, "Strong association of ARK5 with tumor invasion and metastasis," *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 23, no. 2, pp. 263–268, 2004, [Online]. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15354411](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15354411).

- [48] A. Buensuceso *et al.*, "Loss of LKB1-NUAK1 signalling enhances NF- $\kappa$ B activity in a spheroid model of high-grade serous ovarian cancer," *Sci. Rep.*, vol. 12, p. 3011, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-06796-2.
- [49] H. Xu *et al.*, "AMP-activated protein kinase family member 5 is an independent prognostic indicator of pancreatic adenocarcinoma: A study based on the Cancer Genome Atlas," *Molecular Medicine Reports*, vol. 22, no. 5. pp. 4329–4339, 2020, doi: 10.3892/mmr.2020.11504.
- [50] M. Vicente-Manzanares, X. Ma, R. S. Adelstein, and A. R. Horwitz, "Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 11, pp. 778–790, 2009, doi: 10.1038/nrm2786.
- [51] A. Suzuki, J. Lu, G. -i. Kusakai, A. Kishimoto, T. Ogura, and H. Esumi, "ARK5 Is a Tumor Invasion-Associated Factor Downstream of Akt Signaling," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 3526–3535, 2004, doi: 10.1128/MCB.24.8.3526-3535.2004.
- [52] X. Hou, J.-E. Liu, W. Liu, C.-Y. Liu, Z.-Y. Liu, and Z.-Y. Sun, "A new role of NUA1: directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation.," *Oncogene*, vol. 30, no. 26, pp. 2933–42, 2011, doi: 10.1038/onc.2011.19.
- [53] A. Suzuki *et al.*, "Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 1, pp. 48–53, 2003, doi: 10.1074/jbc.M206025200.
- [54] M. P. Sheetz, D. Felsenfeld, C. G. Galbraith, and D. Choquet, "Cell migration as a five-step cycle.," *Biochem. Soc. Symp.*, vol. 65, pp. 233–243, 1999.
- [55] L. Liu *et al.*, "Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5," *Nature*, vol. 483, pp. 608–614, 2012, doi: 10.1038/nature10927.
- [56] M. Palma *et al.*, "Identification of a nuclear localization signal and importin beta members mediating NUA1 nuclear import inhibited by oxidative stress," *J. Cell. Biochem.*, vol. 120, no. 9, pp. 16088–16107, 2019, doi: 10.1002/jcb.28890.
- [57] G. Cossa *et al.*, "Localized Inhibition of Protein Phosphatase 1 by NUA1 Promotes Spliceosome Activity and Reveals a MYC-Sensitive Feedback Control of Transcription," *Mol. Cell*, vol. 77, no. 6, pp. 1322-1339.e11, 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.008.
- [58] C. Yang, Y. Zhang, S. Lin, Y. Liu, and W. Li, "Suppressing the KIF20A/NUAK1/Nrf2/GPX4 signaling pathway induces ferroptosis and enhances the sensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin.," *Aging (Albany. NY).*, vol. 13, pp. 1–20, 2021, doi: 10.18632/aging.202774.
- [59] S. Atsushi, O. Tsutomu, and H. Esumi, "NDR2 Acts as the Upstream Kinase of ARK5 during Insulin-like Growth Factor-1 Signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 20, pp. 13915–13921, 2006, doi: 10.1074/jbc.M511354200.

- [60] S. Banerjee, A. Zagórska, M. Deak, D. G. Campbell, A. R. Prescott, and D. R. Alessi, "Interplay between Polo kinase, LKB1-activated NUA1 kinase, PP1 $\beta$ <sup>MYPT1</sup> phosphatase complex and the SCF <sup>$\beta$ TRCP</sup> E3 ubiquitin ligase," *Biochem. J.*, vol. 461, no. 2, pp. 233–245, 2014, doi: 10.1042/BJ20140408.
- [61] M. C. de Sousa, M. Gjorgjieva, D. Dolicka, C. Sobolewski, and M. Foti, "Deciphering miRNAs' action through miRNA editing," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 24, 2019, doi: 10.3390/ijms20246249.
- [62] L. Shi *et al.*, "MiR-204 inhibits human NSCLC metastasis through suppression of NUA1," *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 12, pp. 2316–2327, 2014, doi: 10.1038/bjc.2014.580.
- [63] M. M. Zhao *et al.*, "Lncrna neat1/mir-204/nuak1 axis is a potential therapeutic target for non-small cell lung cancer," *Cancer Manag. Res.*, vol. 12, pp. 13357–13368, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S277524.
- [64] Y. Yu *et al.*, "MiR-204 inhibits hepatocellular cancer drug resistance and metastasis through targeting NUA1," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 97, no. 5, pp. 563–570, 2019, doi: 10.1139/bcb-2018-0354.
- [65] Z. Ye, Q. He, Q. Wang, Y. Lin, K. Cen, and X. Chen, "LINC00922 promotes the proliferation, migration, invasion and EMT process of liver cancer cells by regulating miR-424-5p/ARK5," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 476, no. 10, pp. 3757–3769, 2021, doi: 10.1007/s11010-021-04196-0.
- [66] J. Wu *et al.*, "mir-424-5p represses the metastasis and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting ARK5," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 15, no. 8, pp. 1591–1599, 2019, doi: 10.7150/ijbs.34113.
- [67] X. Xiong *et al.*, "MIR-145 functions as a tumor suppressor targeting NUA1 in human intrahepatic cholangiocarcinoma," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 465, no. 2, pp. 262–269, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.013.
- [68] X. Lan and X. Liu, "LncRNA SNHG1 functions as a ceRNA to antagonize the effect of miR-145a-5p on the down-regulation of NUA1 in nasopharyngeal carcinoma cell," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 23, no. 4, pp. 2351–2361, 2019, doi: 10.1111/jcmm.13497.
- [69] M. Obayashi *et al.*, "microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 7, pp. 8223–8239, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.6972.
- [70] R. E. Bell *et al.*, "Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 2, pp. 441–451, 2014, doi: 10.1038/jid.2013.340.
- [71] C. Fan *et al.*, "Role of miR-211 in neuronal differentiation and viability: Implications to

- pathogenesis of Alzheimer's disease," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 8, no. JUN, pp. 1–10, 2016, doi: 10.3389/fnagi.2016.00166.
- [72] X. Huang, L. V. Wei, J.-H. Zhang, and D. Liu, "miR-96 functions as a tumor suppressor gene by targeting NUA1 in pancreatic cancer," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 34, pp. 1599–1605, 2014, doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2016.02.004.
- [73] J. Yang, J. Lu, N. Yin, J. Sun, J. Pu, and J. Zang, "MiR-622 Counteracts the NUA1-Induced Gastric Cancer Cell Proliferation and the Antioxidative Stress," *Dis. Markers*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/9616764.
- [74] F. M. Orlandella *et al.*, "miR-622 is a novel potential biomarker of breast carcinoma and impairs motility of breast cancer cells through targeting NUA1 kinase," *Br. J. Cancer*, vol. 123, no. 3, pp. 426–437, 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0884-9.
- [75] C. Wang, W. Tao, S. Ni, and Q. Chen, "Upregulation of lncRNA snoRNA host gene 6 regulates NUA1 family SnF1-like kinase-1 expression by competitively binding microRNA-125b and interacting with Snail1/2 in bladder cancer," *J. Cell. Biochem.*, vol. 120, pp. 357–367, 2018, doi: 10.1002/jcb.27387.
- [76] Y. Guan, H. Shi, and T. Xiao, "NUA1 knockdown suppresses prostate cancer cell epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion through microRNA-30b-5p," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 11, no. 12, pp. 5694–5704, 2018, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31949655><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6963066>.
- [77] D. J. Beveridge *et al.*, "The tumor suppressor miR-642a-5p targets Wilms Tumor 1 gene and cell-cycle progression in prostate cancer," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-97190-x.
- [78] N. Morito *et al.*, "Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 812–819, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2154.
- [79] A. Suzuki *et al.*, "ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma," *Oncogene*, vol. 24, no. 46, pp. 6936–44, 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208844.
- [80] K. Constantinos *et al.*, "Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) induces NUA1 kinase expression to fine-tune its signaling output," *J. Biol. Chem.*, 2019, doi: 10.1074/jbc.RA118.004984.
- [81] S. Takahashi, "Functional analysis of large MAF transcription factors and elucidation of their relationships with human diseases," *Exp. Anim.*, vol. 70, no. 3, pp. 264–271, 2021.

- [82] C. Zhang, "Multiple functions of Maf in the regulation of cellular development and differentiation," no. December 2014, pp. 773–778, 2015, doi: 10.1002/dmrr.
- [83] J. F. de Celis and R. Barrio, "Regulation and function of Spalt proteins during animal development.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 53, no. 8–10, pp. 1385–98, Jan. 2009, doi: 10.1387/ijdb.072408jd.
- [84] D. Sweetman and A. Munsterberg, "The vertebrate spalt genes in development and disease.," *Dev. Biol.*, vol. 293, no. 2, pp. 285–293, May 2006, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.009.
- [85] C. Álvarez, A. Quiroz, D. Benítez, R. Pincheira, E. Riffo, and A. F. Castro, "SALL Proteins; Common and Antagonistic Roles in Cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 13, pp. 1–26, 2021.
- [86] F. A. Abouelnazar *et al.*, "The new advance of SALL4 in cancer: Function, regulation, and implication," *J. Clin. Lab. Anal.*, no. January, pp. 1–16, 2023, doi: 10.1002/jcla.24927.
- [87] V. Hermosilla *et al.*, "Developmental SALL2 transcription factor; a new player in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 38, no. 7, pp. 680–690, 2017, doi: 10.1093/carcin/bgx036.
- [88] H. Gu, D. Li, C. K. Sung, H. Yim, and P. Troke, "DNA-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor p150(Sal2).," *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1809, pp. 276–283, 2012, doi: 10.1016/j.bbagr.2011.02.002.DNA-binding.
- [89] H. Gu, D. Li, C. K. Sung, H. Yim, P. Troke, and T. Benjamin, "DNA-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor p150Sal2," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1809, no. 4–6, pp. 276–283, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.bbagr.2011.02.002.
- [90] Y. Shikauchi *et al.*, "SALL3 interacts with DNMT3A and shows the ability to inhibit CpG island methylation in hepatocellular carcinoma.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 7, pp. 1944–58, 2009, doi: 10.1128/MCB.00840-08.
- [91] W. Ru *et al.*, "Structural studies of SALL family protein zinc finger cluster domains in complex with DNA reveal preferential binding to an AATA tetranucleotide motif," *J. Biol. Chem.*, vol. 298, no. 12, p. 102607, 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102607.
- [92] D. L. Lovelace, Z. Gao, K. Mutoji, Y. C. Song, J. Ruan, and B. P. Hermann, "The regulatory repertoire of PLZF and SALL4 in undifferentiated spermatogonia," *Development*, vol. 143, no. 11, pp. 1893–1906, 2016, doi: 10.1242/dev.132761.
- [93] Y. Ma *et al.*, "Cloning and Characterization of Two Promoters for the Human HSAL2 Gene and Their Transcriptional Repression by the Wilms Tumor Suppressor Gene Product," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 48223–48230, 2001, doi: 10.1074/jbc.M106468200.

- [94] S. M. Lauberth and M. Rauchman, "A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 33, pp. 23922–23931, 2006, doi: 10.1074/jbc.M513461200.
- [95] J. Basta and M. Rauchman, "The Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) Complex in Development and Disease," *Transl. Res.*, vol. 165, no. 1, pp. 36–47, 2015, doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.003.The.
- [96] C. Farkas *et al.*, "Characterization of SALL2 Gene Isoforms and Targets Across Cell Types Reveals Highly Conserved Networks," *Front. Genet.*, vol. 12, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fgene.2021.613808.
- [97] Y. Ma *et al.*, "Cloning and Characterization of Two Promoters for the Human HSAL2 Gene and Their Transcriptional Repression by the Wilms Tumor Suppressor Gene Product," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 48223–48230, Dec. 2001, doi: 10.1074/jbc.M106468200.
- [98] D. Kelberman *et al.*, "Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 10, pp. 2511–2526, 2014, doi: 10.1093/hmg/ddt643.
- [99] J. Böhm *et al.*, "Sall1, sall2, and sall4 are required for neural tube closure in mice.," *Am. J. Pathol.*, vol. 173, no. 5, pp. 1455–63, Nov. 2008, doi: 10.2353/ajpath.2008.071039.
- [100] R. Pincheira, M. Baerwald, J. D. Dunbar, and D. B. Donner, "Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth.," *EMBO J.*, vol. 28, no. 3, pp. 261–273, 2009, doi: 10.1038/emboj.2008.274.
- [101] V. Hermosilla *et al.*, "SALL2 represses cyclins D1 and E1 expression and restrains G1/S cell cycle transition and cancer-related phenotypes," *Mol. Oncol.*, vol. 12, no. 7, pp. 1026–1046, 2018, doi: 10.1002/1878-0261.12308.
- [102] Z. Wu *et al.*, "Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element," *Cancer Sci.*, vol. 106, no. 3, pp. 253–261, 2015, doi: 10.1111/cas.12606.
- [103] L. Chai, "The role of HSAL (SALL) genes in proliferation and differentiation in normal hematopoiesis and leukemogenesis," *Transfusion*, vol. 51, no. Suppl 4, pp. 87S-93S, 2011, doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03371.x.
- [104] S. Fukuda *et al.*, "Survivin Modulates Genes with Divergent Molecular Functions and Regulates Proliferation of Hematopoietic Stem Cells through Evi-1," *Leukemia*, vol. 29, no. 2, pp. 433–440, 2015, doi: 10.1038/leu.2014.183.
- [105] J. Yang, J. R. Aguila, Z. Alipio, R. Lai, L. M. Fink, and Y. Ma, "Enhanced self-renewal of

- hematopoietic stem/progenitor cells mediated by the stem cell gene Sall4," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 4, no. 1, p. 38, 2011, doi: 10.1186/1756-8722-4-38.
- [106] M. L. Suvà *et al.*, "Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells," *Cell*, vol. 157, no. 3, pp. 580–594, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.030.
- [107] D. Yu *et al.*, "Multiplexed RNAi therapy against brain tumor- initiating cells via lipopolymeric nanoparticle infusion delays glioblastoma progression," *PNAS*, vol. 114, no. 30, pp. 6147–6156, 2017, doi: 10.1073/pnas.1701911114.
- [108] C. M. Yang *et al.*, "Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes," *Int. J. Cancer*, vol. 137, no. 10, pp. 2296–2309, 2015, doi: 10.1002/ijc.29606.
- [109] C. K. Sung and H. Yim, "Roles of SALL2 in tumorigenesis," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 146–151, 2016, doi: 10.1007/s12272-016-0874-x.
- [110] D. Escobar *et al.*, "Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin," *Cell Death Dis.*, vol. 6, no. 7, p. e1816, 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.165.
- [111] H. Liu, A. S. Adler, E. Segal, and H. Y. Chang, "A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence," *PLoS Genet.*, vol. 3, no. 6, pp. 0996–1008, 2007, doi: 10.1371/journal.pgen.0030091.
- [112] E. Riffo *et al.*, "The Sall2 transcription factor promotes cell migration regulating focal adhesion turnover and integrin  $\beta$ 1 expression," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 10. 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.1031262.
- [113] J. Zhu, M. Abate, P. W. Rice, and C. N. Cole, "The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53," *J. Virol.*, vol. 65, no. 12, pp. 6872–6880, 1991, doi: 0022-538X/91/126872-09\$02.00/0.
- [114] C. K. Sung, J. Dahl, H. Yim, S. Rodig, and T. L. Benjamin, "Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150(Sal2)," *FASEB J.*, vol. 25, no. 4, pp. 1275–1283, 2011, doi: 10.1096/fj.10-173674.
- [115] C. Farkas *et al.*, "Wild type p53 transcriptionally represses the SALL2 transcription factor under genotoxic stress," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, pp. 1–16, Jan. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0073817.
- [116] W. Strober, "Trypan blue exclusion test of cell viability.," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Appendix 3, pp. 2–3, 2001, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.

- [117] L. D. Moore, T. Le, and G. Fan, "DNA Methylation and Its Basic Function," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 23–38, 2013, doi: 10.1038/npp.2012.112.
- [118] A. Deaton and A. Bird, "CpG islands and the regulation of transcription," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 10, pp. 1010–1022, 2011, doi: 10.1101/gad.2037511.1010.
- [119] S. Saxonov, P. Berg, and D. L. Brutlag, "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 5, pp. 1412–1417, 2006, doi: 10.1073/pnas.0510310103.
- [120] R. S. Illingworth *et al.*, "Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome," *PLoS Genet.*, vol. 6, no. 9, 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1001134.
- [121] R. Jäger *et al.*, "Capture Hi-C identifies the chromatin interactome of colorectal cancer risk loci," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6178, 2015, doi: 10.1038/ncomms7178.
- [122] D. Shlyueva, G. Stampfel, and A. Stark, "Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 4, pp. 272–86, 2014, doi: 10.1038/nrg3682.
- [123] F. Tie *et al.*, "CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing.," *Development*, vol. 136, no. 18, pp. 3131–3141, 2009, doi: 10.1242/dev.037127.
- [124] L. A. Steiner, V. P. Schulz, Y. Maksimova, C. Wong, and P. G. Gallagher, "Patterns of histone H3 lysine 27 monomethylation and erythroid cell type-specific gene expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 45, pp. 39457–39465, 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.243006.
- [125] K. M. Baldwin, F. Haddad, C. E. Pandorf, R. R. Roy, and V. R. Edgerton, "Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms.," *Front. Physiol.*, vol. 4, no. art 284, pp. 1–13, 2013, doi: 10.3389/fphys.2013.00284.
- [126] P. Schober and L. A. Schwarte, "Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation," *Anesth. Analg.*, vol. 126, no. 5, pp. 1763–1768, 2018, doi: 10.1213/ANE.0000000000002864.
- [127] Y. S. Niknafs *et al.*, "MiPanda: A Resource for Analyzing and Visualizing Next-Generation Sequencing Transcriptomics Data," *Neoplasia (United States)*, vol. 20, no. 11, pp. 1144–1149, 2018, doi: 10.1016/j.neo.2018.09.001.
- [128] Z. Tang, C. Li, B. Kang, G. Gao, C. Li, and Z. Zhang, "GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. W1, pp. W98–W102, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx247.



- [129] A. A. Stepanenko and V. V. Dmitrenko, "HEK293 in cell biology and cancer research : phenotype , karyotype , tumorigenicity , and stress-induced genome-phenotype evolution," *Gene*, vol. 569, no. 15, pp. 182–190, 2015, doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065.
- [130] A. Sato *et al.*, "Zinc Finger Protein Sall2 Is Not Essential for Embryonic and Kidney Development," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 62–69, 2003, doi: 10.1128/MCB.23.1.62.
- [131] K. Cartharius *et al.*, "MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 13, pp. 2933–2942, 2005, doi: 10.1093/bioinformatics/bti473.
- [132] E. Panieri and M. M. Santoro, "Ros homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells," *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 6, pp. e2253-12, 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.105.
- [133] S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali, "Cellular stress responses: cell survival and cell death.," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2010, p. 214074, Jan. 2010, doi: 10.1155/2010/214074.
- [134] C. Farkas, F. Fuentes-Villalobos, B. Rebolledo-Jaramillo, F. Benavides, A. F. Castro, and R. Pincheira, "Streamlined computational pipeline for genetic background characterization of genetically engineered mice based on next generation sequencing data.," *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, p. 131, 2019, doi: 10.1186/s12864-019-5504-9.
- [135] W. A. Maltese and J. H. Overmeyer, "Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments," *Am. J. Pathol.*, vol. 184, no. 6, pp. 1630–1642, 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.02.028.
- [136] F. O. Kok *et al.*, "Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish," vol. 32, no. 1, pp. 97–108, 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.018.Reverse.
- [137] G. Kürekci *et al.*, "Knockout of zebrafish desmin genes does not cause skeletal muscle degeneration but alters calcium flux," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 7505, pp. 1–15, 2011, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86974-w>.
- [138] Y. Gao, Y. Zhang, D. Zhang, X. Dai, M. Estelle, and Y. Zhao, "Auxin binding protein 1 ( ABP1 ) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development," vol. 1, 2015, doi: 10.1073/pnas.1500365112.
- [139] A. T. De Souza *et al.*, "Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice," vol. 34, no. 16, pp. 4486–4494, 2006, doi: 10.1093/nar/gkl609.
- [140] A. Rossi *et al.*, "Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene

- knockdowns," *Nature*, vol. 524, pp. 230–233, 2015, doi: 10.1038/nature14580.
- [141] R. Russell *et al.*, "Loss of the transcription factor MAFB limits  $\beta$ -cell derivation from human PSCs," *Nature Communications*, vol. 11, no. 1. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16550-9.
- [142] M. He *et al.*, "Correction: MiR-320a induces diabetic nephropathy via inhibiting MafB (Aging, (2019), 11(10), (3055–3079), (10.18632/aging.101962))," *Aging (Albany. NY)*, vol. 14, no. 23, pp. 9773–9774, 2022, doi: 10.18632/aging.204441.
- [143] R. A. J. van de Vis, A. Moustakas, and L. P. van der Heide, "Nuak1 and nuak2 fine-tune tgf- $\beta$  signaling," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 13, 2021, doi: 10.3390/cancers13133377.
- [144] M. Morikawa, R. Derynck, and K. Miyazono, "TGF-  $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 8, no. 5. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
- [145] G. S. Braun and S. M. Huber, "Development of renal function," *Zoology*, vol. 105, no. 2002, pp. 341–354, 2006.
- [146] G. Su *et al.*, "The effect of forced growth of cells into 3D spheres using low attachment surfaces on the acquisition of stemness properties," *Biomaterials*, vol. 34, no. 13, pp. 3215–3222, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.044.
- [147] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, and F. L. Graham, "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells," *FASEB J.*, vol. 16, pp. 869–871, 2002, doi: 10.1096/fj.01.
- [148] P. Thomas and T. G. S. T, "HEK293 cell line : A vehicle for the expression of recombinant proteins," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 51, pp. 187–200, 2005, doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014.
- [149] Y. C. Lin *et al.*, "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 11, 2014, doi: 10.1038/ncomms5767.
- [150] Z. Fu, P. Washbourne, P. Ortinski, S. Vicini, P. Washbourne, and P. Ortinski, "Functional Excitatory Synapses in HEK293 Cells Expressing Neuroligin and Glutamate Receptors," pp. 3950–3957, 2018.
- [151] I. Vetter and R. J. Lewis, "Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines," vol. 79, pp. 908–920, 2010, doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.020.
- [152] B. He and D. M. Soderlund, "Human embryonic kidney ( HEK293 ) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na v 1 . 7 sodium channels," *Neurosci. Lett.*, vol. 469, no. 2, pp. 268–272, 2010, doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.012.

- [153] J. Swanson, C. Biology, L. Avenue, and C. Watts, "Macropinocytosis," *Trends Cell Biol.*, vol. 5, no. November, pp. 424–428, 1995.
- [154] M. Ritter, N. Bresgen, and H. H. Kerschbaum, "From Pinocytosis to Methuosis—Fluid Consumption as a Risk Factor for Cell Death," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. June, pp. 1–37, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.651982.
- [155] S. Song, Y. Zhang, T. Ding, N. Ji, and H. Zhao, "The Dual Role of Macropinocytosis in Cancers: Promoting Growth and Inducing Methuosis to Participate in Anticancer Therapies as Targets," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3389/fonc.2020.570108.

