



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Rol del factor de transcripción SALL2 en la progresión del Ciclo Celular; un posible regulador de Ciclina E

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

GINESSA BELÉN SALGADO MUÑOZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: Roxana Pincheira Barrera
Profesor Co-Guía: Violeta Morín Muñoz
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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


Profesor tutor

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

Profesor Co-tutor

Dra. Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Ariel Castro Alma
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Paula Bustos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



A mis amados padres Graciela y Luis, a mi hermanita Sibela y mis amigos incondicionales...Gracias por su apoyo.



Tesis de magíster financiada por:

Fondecyt regular #1110821 y Fondecyt #1151031 de la Dra. Roxana Pincheira Barrera.

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	ix
Índice Figuras Suplementarias	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Introducción	1
1. Ciclo celular.....	1
1.1 Regulación de la progresión del ciclo celular.....	4
2. Familia de Factores de transcripción SPALT LIKE	9
2.1 Factor de transcripción SALL2	12
2.2 Funciones de SALL2.....	14
2.3 SALL2, Ciclo celular y Cáncer	15
3. Propuesta de Investigación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivo general	23
6. Objetivos específicos	23
7. Materiales y Métodos	24
7.1 Reactivos.....	24
7.1.1 Anticuerpos.....	24
7.2 Cultivo celular.....	25
7.2.1 Descongelamiento y expansión de Fibroblastos embrionarios de ratón..	25
7.2.2 Conteo celular.....	25
7.2.3 Sincronización celular	26
7.3 Citometría de flujo	26
7.4 Técnicas de ADN	27
7.4.1 Electroforesis en gel de Agarosa	26
7.5 Técnicas de ARN	27
7.5.1 Extracción y purificación de ARN	27

7.5.2 Transcripción reversa (RT-PCR)	28
7.5.3 PCR en Tiempo Real (Q-PCR)	28
7.6 Técnicas de proteínas	29
7.6.1 Obtención de extractos totales de proteínas	29
7.6.2 Separación de proteínas por SDS-PAGE.....	30
7.6.3 Análisis de Western blot	30
7.7 Ensayos de Actividad Luciferasa	31
7.8 Análisis Bioinformáticos	32
7.9 Análisis Estadístico	34
Resultados	35
8. <i>Objetivo 1.</i> Determinar regulación transcripcional de SALL2 en el gen de la Ciclina E1 y su relevancia en el ciclo celular.....	35
8.1 <i>Objetivo específico nº 1:</i> Caracterización del ciclo celular en Fibroblastos embrionarios de ratón <i>Sall2 Wild type (+/+)</i> y <i>Sall2</i> deficientes (-/-).....	35
8.1.1 <i>Validación del modelo de estudio.....</i>	35
8.1.2 <i>Evaluación del efecto de la deficiencia de SALL2 en el ciclo celular.....</i>	36
8.1.3 <i>Análisis de marcadores moleculares durante la progresión del ciclo celular.....</i>	42
8.1.4 <i>Evaluación del efecto de la deficiencia de Sall2 en genes reguladores del ciclo celular.....</i>	47
8.2 <i>Objetivo específico nº 2:</i> Analizar el efecto de Sall2 sobre la actividad transcripcional de Ciclina E1.....	54
8.2.1 <i>Sall2 disminuye la actividad del promotor de Ciclina E1.....</i>	54
8.3 <i>Objetivo 2.</i> Realizar análisis in Silico para correlacionar el efecto regulatorio de SALL2 sobre Ciclina E.....	59
8.3.1 <i>Correlacionar expresión de SALL2 y Ciclina E en cáncer.....</i>	59
9. Discusión.....	76
9.1 <i>Regulación de los niveles de Sall2 (SALL2) durante el ciclo celular; efecto de la deficiencia de la proteína SALL2 en la capacidad proliferativa.....</i>	76
9.2 <i>Sall2 regula negativamente la expresión de Ciclina D1/E1.....</i>	79

9.3 <i>SALL2</i> se correlaciona negativamente con Ciclina E1 (<i>CCNE1</i>) en cáncer de mama.....	83
10. Conclusiones generales.....	86
11. Anexos.....	87
12. Referencias.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de las fluctuaciones cíclicas de las concentraciones de las principales Ciclinas durante la progresión del ciclo celular.....	6
Figura 2: Representación esquemática de los dominios conservados en proteínas SALL.....	11
Figura 3: Esquema de la distribución de promotores alternativos de <i>SALL2</i> humano.	13
Figura 4: Perfil de expresión del mRNA de <i>Sall2</i> durante la progresión del ciclo celular.....	19
Figura 5: La expresión de <i>Sall2</i> es diferencial a lo largo del ciclo celular.....	20
Figura 6: Curva de proliferación de <i>Sall2</i> +/+, <i>Sall2</i> +/- y <i>Sall2</i> -/-.....	21
Figura 7: Validación del modelo celular mediante el análisis de expresión de la proteína SALL2.....	36
Figura 8: Optimización de la sincronización en G2/M para células iMEFs.....	37
Figura 9: Efecto de la deficiencia de <i>Sall2</i> en la progresión del ciclo celular.....	39
Figura 10: Efecto de la deficiencia de <i>Sall2</i> en la progresión del ciclo celular.....	41
Figura 11: “ <i>Shake off</i> ” mitótico provoca un aumento de apoptosis.....	43
Figura 12: Deficiencia de <i>Sall2</i> es asociada al incremento en los niveles de marcadores de G1/S, Ciclina D1 y Ciclina E1.....	45
Figura 13: Expresión de SALL2 es diferenciada en la progresión del ciclo celular....	46
Figura 14: Los niveles de mRNA de <i>Sall2</i> son regulados de manera dependiente del ciclo celular.....	47
Figura 15: Deficiencia de <i>Sall2</i> induce una rápida entrada a G1/S asociada a un incremento en los niveles de Ciclina E1.....	49

Figura 16: Deficiencia de <i>Sall2</i> es asociada con la disminución de los niveles del marcador G1/S Ciclina E2.....	50
Figura 17: Deficiencia de <i>Sall2</i> induce una rápida entrada a G1/S asociada a un incremento en los niveles de Ciclina D1.....	52
Figura 18: Deficiencia de <i>Sall2</i> modifica modestamente los niveles de mRNA del marcador de G1/S Ciclina D2.....	53
Figura 19: Alineamiento de secuencia de promotores de Ciclina E1 humana y de ratón.....	55
Figura 20: Actividad del promotor de <i>CCNE1</i> es negativamente regulado por <i>SALL2</i>	56
Figura 21: Actividad del promotor de <i>CCNE1</i> es negativamente regulado por <i>SALL2</i> de manera dosis dependiente.....	58
Figura 22: “Scatterplots” de correlación de los niveles de <i>SALL2</i> y <i>CCNE1</i> en diversas muestras de cáncer del servidor R2	63
Figura 23: Proteína <i>SALL2</i> presenta baja expresión en cortes histológicos con respecto a la expresión de Ciclina E1 en muestras de cáncer de Mama, Colon, Pulmón y Glioblastoma humano.....	64
Figura 24: “Scatterplots” de correlación de los niveles de <i>SALL2</i> y en muestras de cáncer de mama del servidor R2	66
Figura 25: Análisis de expresión de mRNA de <i>SALL2</i> en distintas muestras de cáncer de mama.....	68
Figura 26: Análisis de expresión de mRNA de <i>CCNE1</i> en distintas muestras de cáncer de mama.....	69
Figura 27: Análisis de supervivencia <i>Kaplan Meier</i> con respecto a la alta y baja expresión de <i>SALL2</i> en distintas muestras de cáncer de mama.....	71
Figura 28: Análisis de supervivencia <i>Kaplan Meier</i> con respecto a la alta y baja expresión de <i>CCNE1</i> en distintas muestras de cáncer de mama.....	72
Figura 29: Análisis de supervivencia <i>Kaplan Meier</i> con respecto a muestras con el gen de <i>SALL2</i> en condiciones normales y alterado en distintas muestras de cáncer de mama.....	74

Figura 30: Análisis de supervivencia <i>Kaplan Meier</i> con respecto a muestras con el gen de <i>CCNE1</i> en condiciones normales y alterado en distintas muestras de cáncer de mama.....	75
--	-----------

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis de correlación negativa entre la expresión de mRNA de <i>SALL2</i> y Ciclina E1 en diversos estudios de cáncer.....	60
--	-----------

INDICE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1: Efecto de la deficiencia de <i>SALL2</i> en la progresión del ciclo celular.....	87
Figura suplementaria 2: Células sincronizadas <i>Sall2</i> (+/+) y <i>Sall2</i> (-/-) exhiben dinámicos niveles de cambio del marcador de G2/M la Ciclina B1 durante la progresión del ciclo celular.....	88
Figura suplementaria 3: Análisis <i>in Silico</i> de las distintas alteraciones encontradas para el factor de transcripción <i>Sall2</i> en 148 estudios de diversas muestras tumorales.....	89
Figura suplementaria 4: Análisis <i>in Silico</i> de las mutaciones encontradas en el gen del factor de transcripción <i>Sall2</i> en 148 estudios de diversas muestras tumorales.....	89
Figura suplementaria 5: Análisis <i>in Silico</i> de las distintas alteraciones encontradas para el factor de transcripción <i>SALL2</i> en muestras de Cáncer de mama.....	90

Tabla suplementaria 1: Datos de porcentaje de células en cada fase del ciclo celular posterior a la liberación de Nocodazol en células iMEFs *Sall2 wilt type (+/+)* y *Sall2 null (-/-)*..... 91

Tabla suplementaria 2: Datos crudos del porcentaje de células apoptóticas en el tiempo 0H de todos los análisis de *shake off* considerados para análisis de Citometría de flujo. 92

Tabla suplementaria 3: Datos de correlación entre *SALL2 – CCNE1* y *SALL2 – CCND1* en diversas muestras tumorales..... 93



RESUMEN

Hoy en día, se sabe que existe una gran variedad de proteínas que regulan y controlan el ciclo celular. Dentro de estos reguladores encontramos a los factores de transcripción que, al ser activados, adquieren la capacidad de regular la expresión de genes en el núcleo celular.

SALL2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas SPALT, que cumplen funciones esenciales durante el desarrollo. SALL2 se ha asociado a varias enfermedades incluyendo coloboma ocular, disfunción renal y el cáncer. Sin embargo, el rol que desempeña SALL2 en cáncer es aún controversial. Estudios realizados en células derivadas de cáncer ovárico y en fibroblastos humanos sugieren a SALL2 como un regulador negativo del crecimiento y la supervivencia celular lo que avala un rol supresor de tumores. No obstante, SALL2 se encuentra aumentado en varios tipos de cánceres, y es esencial para la propagación de glioblastoma. Más aún, el modelo de ratón deficiente de *Sall2* no muestra la generación espontánea de tumores. Todas estas evidencias indican que el rol de SALL2 en cáncer es aún controversial.

Datos no publicados de nuestro laboratorio indican que SALL2 se expresa diferencialmente durante el ciclo celular, aumentando sus niveles en la etapa G1/S. Además, se observó que las células deficientes de *Sall2* (*Sall2*^{-/-}) proliferan más rápido que las células *wild type* (*Sall2*^{+/+}). Estas evidencias implican a SALL2 como un regulador negativo de la proliferación celular. Sin embargo, estudios adicionales fueron necesarios para definir la expresión y función de SALL2 durante la progresión del ciclo celular.

Con el objeto de profundizar el conocimiento sobre la función de SALL2 durante el ciclo celular, la presente tesis abordó el estudio de la expresión, función y blancos transcripcionales de SALL2 a lo largo de la progresión del ciclo celular.

Para estudiar el rol de SALL2 en el ciclo celular se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (iMEF) provenientes de los modelos *knockout* y *wild type* para *Sall2*, y experimentos de sincronización con Nocodazol. Nuestros resultados indican que células *Sall2*^{-/-} proliferan más rápido que las *Sall2*^{+/+}. Además, se determinó que los niveles de expresión de Ciclinas tipo D y E, tanto de mRNA como proteína, se ven aumentados en células *Sall2*^{-/-}. En un contexto funcional, se determinó a través de ensayos de gen reportero que la actividad promotora de ciclina E (*Ccne1*) es significativamente reprimida por la sobreexpresión de SALL2. Finalmente, mediante análisis bioinformáticos, se encontró que existe correlación negativa entre la expresión de mRNA de *SALL2* y *CCNE1* en diversas muestras tumorales, mayoritariamente en cáncer de mama.

Nuestros estudios corroboran y profundizan el rol de SALL2 en la regulación de la proliferación celular. En lo específico, la identificación de las Ciclinas como blancos regulatorios, ayuda a comprender la participación de SALL2 en procesos normales y/o patológicos clínicamente relevantes como es la enfermedad del cáncer. De este modo esta tesis aporta conocimientos que podrían ayudar en el desarrollo de nuevos tratamientos contra una de las principales causas de mortalidad en el mundo.

Palabras claves: genes Spalt, SALL2, ciclo celular, Ciclina E, proliferación.

ABSTRACT

Currently, a wide variety of proteins are known to regulate and control the cell cycle. Between these cell cycle regulators we find transcription factors that, when are activated, acquire the ability to regulate gene expression.

SALL2 is a transcription factor member of the SPALT protein family involved in development. SALL2 has been associated with ocular coloboma, renal dysfunction and cancer. However, the role of SALL2 in cancer remains controversial. Studies from ovarian cancer cells and human fibroblasts, suggest SALL2 as negative regulator of cell growth and survival, which is consistent with a tumor suppressor role. Nevertheless, SALL2 is increased in several types of cancers, and is essential for glioblastoma propagation. In addition, *Sall2* knock out mice do not show spontaneous tumor formation. All of these evidences indicate that the role of SALL2 in cancer remains controversial.

Unpublished data from our laboratory indicate that SALL2 is differentially expressed during the cell cycle, increasing its expression in the G1 / S step. In addition, *Sall2*-deficient cells (*Sall2* $-/-$) proliferate more rapidly than wild type cells (*Sall2* $+/+$). These evidences implicate SALL2 as negative regulator of cell proliferation. However, additional studies are needed to define the expression and specific function of SALL2 during cell cycle progression.

To further understand the role of SALL2, the present thesis addressed the expression, function and transcriptional targets of SALL2 during cell cycle progression. To study the role of SALL2 in the cell cycle, we used *Sall2* $+/+$ and *Sall2* $-/-$ mouse embryonic fibroblast (iMEF), and Nocodazole synchronization experiments.

Our results indicate that *Sall2* $-/-$ MEFs proliferate faster than *Sall2* $+/+$ cells. In addition, we showed that expression of cyclins type D and E, at mRNA and protein levels, were increased in *Sall2* $-/-$ MEFs. In a functional context, we demonstrated that

the activity of *CCNE1* promoter is significantly repressed by SALL2 overexpression. Finally, bioinformatic analysis using R2 tools, shows a strong negative correlation between the expression of *SALL2* and *CCNE1* in several tumor samples, but mainly in breast cancer.

Our studies corroborate and deepen the role of SALL2 in the regulation of cell proliferation. Specifically, the identification of G1/S cyclins as regulatory targets helps to understand the involvement of SALL2 in normal and pathologically states, such as in cancer. Thus, our data could help to the development of new treatments against the leading causes of mortality in the world.

Key words: *Spalt* genes, SALL2, cell cycle, Cyclin E, proliferation.



INTRODUCCIÓN

1. Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso de suma importancia para la célula, que tiene como objetivo la correcta formación de nuevas células hijas, a través de una serie de eventos altamente controlados que previenen, en lo posible, desórdenes que podrían afectar en la progresión normal de este. Los primeros estudios sobre el ciclo celular fueron elaborados fundamentalmente a partir de estudios en levaduras, eucariotas unicelulares. Estos estudios han demostrado la versatilidad de las células para regular los ciclos, a partir de proteínas específicas que se expresan y/o regulan las distintas etapas del ciclo celular.

En eucariotas el ciclo celular tiene fases bien definidas, correspondientes a: G1, S, G2 y M. GAP1(G1) que ocurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN, es una fase en la que la célula desarrolla una intensa actividad metabólica, donde además de acumular ATP necesario para la división celular, la célula aumenta de tamaño por la generación de nuevos orgánulos (ribosomas, mitocondrias y estructuras membranosas), de manera que la célula se prepara para el proceso de replicación de ADN, por lo que igualmente se producen desoxiribonucleótidos y las enzimas necesarias para la replicación (Golias, Charalabopoulos, & Charalabopoulos, 2004; Lukas & Bartek, 2004). Es durante la fase G1 que la célula integra las señales mitogénicas o señales de arresto del ciclo celular y toma la decisión de proceder, pausar o abandonar el ciclo celular (Bertoli, Skotheim, & de Bruin, 2013). La fase S (Síntesis) es definida como la etapa donde ocurre la síntesis de ADN nuclear. Existen factores que inducen la transcripción de genes que codifican enzimas relacionadas con la duplicación del ADN en fase de síntesis. En mamíferos, la estimulación directa de células en cultivo con factores de crecimiento, resulta en la activación temprana de factores de transcripción y por consecuencia, la inducción de genes que codifican a

proteínas ribosomales y reguladores de la traducción (Salazar-Roa & Malumbres, 2017). En esta fase se sintetizan las proteínas Histonas, constituyentes esenciales de los nucleosomas. Al final de la fase S, cada cromosoma queda duplicado y formado por dos cromátidas. G2 (GAP2) o premitótica es la fase donde la célula se prepara para proceder a la división celular. Existe crecimiento celular y la fase acaba cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis. La fase G2 proporciona un lapso de seguridad, que permite a la célula confirmar que se ha completado con éxito la replicación del ADN (Viallard, Lacombe, Belloc, Pellegrin, & Reiffers, 2001). Finalmente, en la etapa M (Mitosis) se desarrolla una gran actividad celular y es donde ocurre la división del núcleo (cariocinesis) y la división celular (citocinesis). Los cromosomas son condensados y la transcripción es silenciada, dejando a la célula en un estado inestable con reducida o nula biogénesis y una disminución de la capacidad de responder a estrés (Salazar-Roa & Malumbres, 2017). Los cromosomas duplicados se distribuyen de manera idéntica en cada una de las células hijas.

Existe una etapa adicional llamada G0, que corresponde a un estado estacionario o quiescente, también llamado estado post-mitótico, en el que algunos tipos celulares se mantienen cuando llegan a estar completamente diferenciados, es el caso de las neuronas y las células de músculo estriado del corazón (Bloom, 2008; Johnson & Walker, 1999). Hay células que cesan por completo su división en condiciones subóptimas de crecimiento y otras que solo se dividen ocasionalmente, como los fibroblastos, cuando es necesario reemplazar la pérdida de células por lesión o muerte celular. En estos casos las células permanecen durante un tiempo, que puede ser indefinido, en estado quiescente o de reposo (Viallard et al., 2001).

La coordinación entre las diferentes fases del ciclo celular, depende de un sistema de puntos de control y de controles por retroalimentación que evitan la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que se haya completado la anterior (Chaudhury & Koepp, 2016; Golias et al., 2004). Los puntos de control más importantes son dos:

uno se encuentra al final de G1 permitiendo que se repare el ADN dañado antes de ser replicado en la fase S, y el otro en G2 antes de entrar en mitosis. El punto de control G2 detecta el ADN que no ha sido replicado y/o el ADN dañado, generando una señal que evita que comience la fase M antes de que se haya completado y reparado la fase S, permaneciendo la célula en G2 (Lukas & Bartek, 2004). Además de estos dos controles esenciales, existe otro punto de control al final de la mitosis que supervisa el correcto alineamiento de los cromosomas en el huso mitótico, asegurando la distribución de un juego completo de cromosomas a cada célula hija (Chaudhury & Koepp, 2016).

En la actualidad el estudio del ciclo celular está tomando mucha importancia en el estudio clínico por su significativo papel en la formación de neoplasias (Malumbres & Barbacid, 2009), ya que los mecanismos moleculares involucrados en neoplasias a menudo se asocian con la pérdida de la regulación génica, mediada por mutaciones e inestabilidad genómica. Existen alteraciones básicas asociadas a células neoplásicas conocidas como “*Hallmarks*” del Cáncer; primeramente, la proliferación descontrolada, que respecta a la activación de la maquinaria del ciclo celular conduciendo a la proliferación continua, en ausencia o presencia de señales mitogénicas (Malumbres & Barbacid, 2009). Además de la inestabilidad genómica (GIN), que conduce a mutaciones adicionales como el proceso progresivo de ganancia o pérdida de los cromosomas o parte de ellos, conocido como inestabilidad cromosomal (CIN) (Kastan & Bartek, 2004). Entre estos eventos se encuentra además la pérdida por parte de las células de su capacidad para reparar el ADN, la pérdida de capacidad para regular la apoptosis y la evasión de supresores tumorales (Golias et al., 2004). Por este motivo, las células adquieren patrones anormales de respuesta frente a estímulos generados por factores de crecimiento, permitiendo la inducción de angiogénesis y de un crecimiento invasivo.

Por lo tanto, el desarrollo del cáncer es el resultado de la proliferación descontrolada y/o apoptosis aberrantes, como consecuencia de la acumulación de lesiones genéticas

que dan lugar a alteraciones que activan los protooncogenes e inactivan genes supresores de tumores. Los protooncogenes son activados para volverse oncogenes, es decir, genes que son altamente activos permitiendo la promoción del crecimiento celular. Los genes supresores de tumores, por el contrario, restringen el crecimiento celular, de manera que si son dañados, dan paso a una proliferación descontrolada (Nebert, 2002). Muchos genes de ambas clases codifican proteínas que regulan la entrada y/o la progresión del ciclo celular, por lo tanto, aberraciones en las vías de señalización que controlan estos procesos están asociadas con fenómenos oncogénicos. Estos defectos son mediados, directa o indirectamente, por desregulaciones en los complejos Ciclinas/CDKs; moléculas encargadas de la correcta progresión del ciclo celular.

1.1 Regulación de la progresión del Ciclo celular

Existe una gran variedad de proteínas que participan en la regulación del ciclo celular, sin embargo, los complejos Ciclinas/CDKs son responsables de la conducción de diversos eventos que tendrán lugar durante la interfase celular de manera secuencial y ordenada (Sherr, Roberts, Sherr, & Roberts, 2004). Las Ciclinas fueron descubiertas en estudios realizados en levaduras y se ha descrito que están altamente conservadas desde *Saccharomyces cerevisiae* hasta cordados superiores (Wittenberg, 2005). Esta familia de proteínas debe su nombre a que su concentración en la célula fluctúa de acuerdo con la etapa del ciclo celular como muestra la Figura 1, de modo que están presentes en una etapa concreta del ciclo y luego son degradadas (Bloom, 2008). Las Ciclinas pertenecen a una extensa familia de aproximadamente 30 proteínas que varían en tamaño fluctuando desde los 35-90 KDa. Estas proteínas tienen en común un dominio estructuralmente definido llamado “*Cyclin box*”, que permite su unión directa a quinasas que, al unirse, conforman una subunidad catalítica activa. De esta manera, pueden ejercer cambios oscilantes de fosforilación sobre diversas proteínas sustrato, permitiendo la progresión del ciclo celular (Malumbres & Barbacid, 2001). Este dominio es de aproximadamente 100 aminoácidos, que conforman en conjunto 5

α -helices. Muchas Ciclinas tienen 2 de estos dominios, uno en el extremo amino terminal que une a su subunidad catalítica las CDKs, y otro en el extremo carboxilo terminal que usualmente es requerido para el correcto plegamiento de la proteína (Malumbres, 2014). Existen por lo menos 16 Ciclinas que han sido caracterizadas: A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2 (Quezada, 2007; Sherr et al., 2004)

Posterior al descubrimiento de las Ciclinas, se estudiaron las proteínas quinasas dependientes de Ciclinas (CDKs) (Bertoli et al., 2013; Malumbres, 2014). Estas proteínas juegan un papel importante en la división celular y la modulación de la transcripción en respuesta a las señales intra y extra celulares. Los estudios pioneros de estas proteínas fueron realizados en la década de 1980 en estudios genéticos y bioquímicos utilizando modelos de levaduras y ranas. Los estudios mostraron que las CDKs son una subunidad catalítica que se asociaba a una proteína reguladora, las Ciclinas, y la constitución de estos complejos solo eran funcionales cuando permanecían unidas (Lim & Kaldis, 2013). De manera que las Ciclinas modulan la activación de las CDKs, que se lleva a cabo por la fosforilación que sufre las CDKs sobre ciertos aminoácidos (serinas y treoninas) (Johnson & Walker, 1999; Salazar-Roa & Malumbres, 2017). Las CDKs pueden ser agrupadas primero, como CDKs que se unen a múltiples Ciclinas y pueden regular la progresión del ciclo celular, y segundo como las CDKs que se activan con una Ciclina específica que permite la regulación de la transcripción de algunos genes (Malumbres, 2014).

Existen cinco Ciclinas principales, denominadas de la A - E, cada una de las cuales alcanza una concentración máxima en un momento distinto del ciclo. La progresión a través del ciclo celular, y la salida de la fase G1 del ciclo celular en mamíferos, en respuesta a señales mitogénicas extracelulares, está regida por CDKs activadas con Ciclinas del tipo D. En esta fase, las proteínas relevantes son tres Ciclinas del tipo D (D1, D2 y D3) que, en diferentes combinaciones, se unen para regular alostéricamente a una de las dos subunidades de CDKs (CDK4 y CDK6), por lo que se consideran

reguladoras de la transición de G1 a S (Malumbres & Barbacid, 2001; Nigg, 2001; Sherr et al., 2004). En células en cultivo, la sobreexpresión de Ciclinas del tipo D puede incluso acortar el intervalo de G1 (Jiang *et al.* 1993).

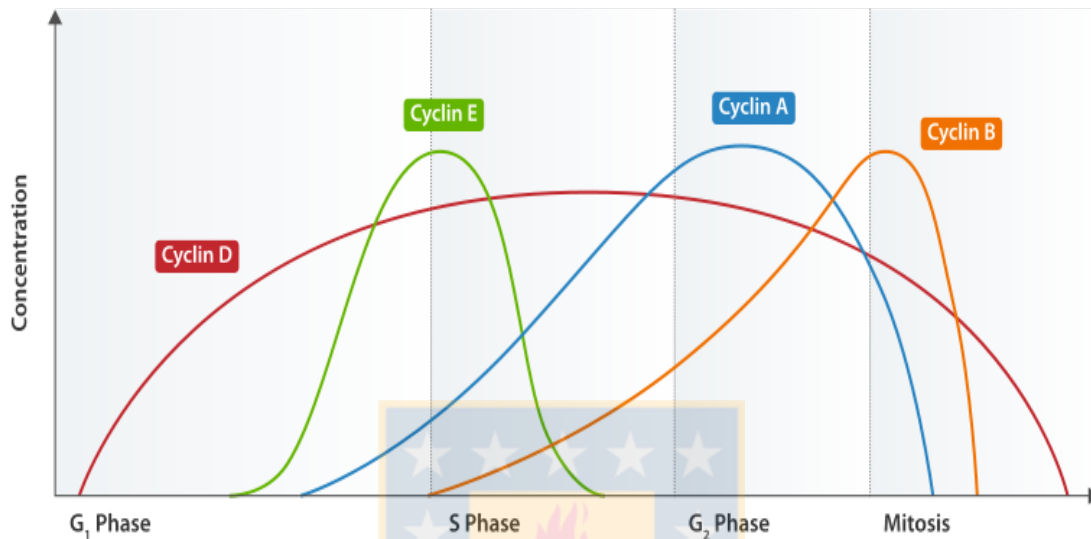


Figura 1. Representación esquemática de las fluctuaciones cíclicas de las concentraciones de las principales Ciclinas durante la progresión del ciclo celular. Fuente: Modificado de Malumbres *et al.*, 2001.

El principal sustrato para Ciclinas quinasas tipo D es la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb). Rb es una proteína que juega un papel importante en la regulación de la progresión de G1 y es además, un componente molecular que controla las restricciones del ciclo, debido a que en su estado hiperfosforilado, une e inhibe factores de transcripción de la familia E2F, regulando la progresión del ciclo celular. En células carentes de Rb, las Ciclinas quinasas del tipo D no son requeridas para la progresión del ciclo celular (Polager, Kalma, Berkovich, & Ginsberg, 2002). Estudios con ratones *knockout* demuestran que las Ciclinas D1, D2 y D3 son funcionalmente redundantes, sin embargo, cada una tiene funciones tejido-específicas (Sicinski et al., 1995). A pesar de que Ciclina D es una proteína crucial para la progresión en las primeras fases del ciclo celular, existen estudios donde los genes, tanto de Ciclina D como E, han sido interrumpidos en células embriónicas de ratón, indicando que gran

parte del desarrollo fetal se produce normalmente incluso en ausencia de estos complejos (Malumbres et al., 2004).

Más tarde, la progresión del ciclo se lleva a cabo por los complejos Ciclina E1/CDK2. Después de la inducción de mitógenos durante la progresión G1/S, Ciclina E alcanza sus niveles más altos de expresión. Las Ciclinas del tipo E (E1 y E2), que en forma análoga pueden gobernar la actividad de una sola subunidad catalítica, CDK2 permite la progresión desde la fase G1 tardía hacia S, permitiendo el correcto ensamblaje del complejo pre-replicativo y la iniciación de la síntesis de ADN (Caldon et al., 2013; Nigg, 2001). La periodicidad en la expresión de la Ciclina E resulta de la regulación tanto de la abundancia de su ARNm y la posterior degradación de la proteína en fase S. Falla en la degradación de Ciclina E promueve la proliferación, pero también la iniciación de la replicación de ADN (Ekholm-Reed et al., 2004), e inhibe la progresión hacia la mitosis (Nakayama, 2000). Conforme con esto, se ha registrado que la sobreexpresión de Ciclina E puede acelerar, en gran medida, la progresión de G1 en células cultivadas de mamíferos (Ohtsubo & Roberts, 1993). Padmakumar *et al.* (2009), determinó el rol de CDK2 y CDK4, demostrando que en asociación con la Ciclina E y D, promueven la transición de la fase G1/S. El estudio indica que la consecuencia de la pérdida de CDK2 y CDK4 en animales carentes del factor de transcripción p53, promueve la muerte de los ratones durante la embriogénesis por defectos cardiacos (Padmakumar, Aleem, Berthet, Hilton, & Kaldis, 2009).

La progresión a través de la fase S, se lleva a cabo principalmente por el complejo CDK2/ Ciclina A. La Ciclina A aparece en el núcleo acumulándose durante la fase S y permanece en él hasta su degradación antes de la metafase, y su síntesis es controlada principalmente a nivel transcripcional mediada por los factores de transcripción E2F (Viallard et al., 2001). La función de la Ciclina A en la fase de síntesis es el resultado de su capacidad para unir a las quinasas dependientes de ciclina CDK1 y CDK2 (Chibazakura et al., 2011). En la fase S, la fosforilación de componentes de la maquinaria de replicación por el complejo Ciclina A/CDK2 es importante para el inicio

de la replicación y para restringirlo a solamente una vez por ciclo. En mitosis, la función específica de la Ciclina A aún no está del todo claro, pero se sabe que contribuye a la estabilidad de la Ciclina B y que se degrada antes de que la célula ingrese en metafase (Lindqvist, Rodríguez-Bravo, & Medema, 2009; Viallard et al., 2001).

Posteriormente, el paso de G2/M, está regulado por el complejo Ciclina B/ CDK1 (Malumbres & Barbacid, 2001). La Ciclina B es una subunidad reguladora que se requiere para la actividad catalítica de la proteína quinasa CDK1. Su síntesis comienza en la fase S, acumulándose mayormente en la fase G2. La activación del complejo Ciclina B/CDK1 por defosforilación, permite el paso de G2 a M. La actividad de CDK1 provoca la degradación de la Ciclina B y ocurre por proteólisis mediada por ubiquitina. Esta degradación proteolítica lleva a la célula a salir de la mitosis y a volver a la interfase (Hershko, 1999). La Ciclina B es inicialmente localizada en el citoplasma durante las fases S y G2, y transloca al núcleo al comienzo de la mitosis. La localización citoplasmática de la Ciclina B1 es el resultado de su continuo expor-te desde el núcleo (Smits & Medema, 2001).

Entre los factores de transcripción que regulan los complejos Ciclina/CDKs, destaca el factor de transcripción p53, que hasta la fecha es una de las proteínas más estudiadas debido que se encuentra mutada en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos (Beckerman & Prives, 2010). Las distintas respuestas celulares que puede generar la activación de p53, dependen del estado en que se encuentre esta proteína, ya que p53 puede sufrir múltiples modificaciones post-traduccionales, las cuales abarcan fosforilaciones, acetilaciones, metilaciones, glicosilaciones, nedisilaciones, sumoilaciones y ribosilaciones, que son determinantes para su función (Feng, 2011). Este factor induce la expresión de p21, un potente inhibidor de CDKs. La inhibición de CDK2 por p21 es esencial para el establecimiento de G1, la detención del ciclo por daño al DNA y la senescencia celular (El-Deiry *et al.* 1993).

Como se ha podido apreciar, son múltiples las proteínas que juegan un papel importante para el correcto avance hacia la división celular. De todas las proteínas que se han involucrado en el ciclo celular, existen algunas cuya función aún es desconocida. En los últimos años se han asociado nuevos factores de transcripción a patologías como el cáncer, evidenciando así la importancia de su regulación en el desarrollo de neoplasias, además de generar posibles nuevos blancos de estudio.

Nuestro laboratorio está investigando la función que cumple el factor de transcripción SALL2 en la regulación del ciclo celular y su potencial rol en tumorigénesis. SALL2 es un factor de transcripción que ha sido escasamente caracterizado, sin embargo, diversos estudios han encontrado que SALL2 está altamente desregulado en varios tipos de cáncer, indicando un posible rol en la génesis tumoral. Por otro lado, estudios en células de cáncer ovárico transfectadas con *Sall2* e introducidas a ratones inmunodeficientes, indican que SALL2 reduciría la tumorigenicidad (Sato *et al.* 2002).

SALL2 es miembro de la familia de genes SPALT que han sido asociados al desarrollo y diferenciación celular. Sin embargo, cómo *Sall2* funciona, quiénes son sus blancos de acción y cómo podría participar en procesos de regulación de la proliferación en el ciclo celular y la tumorigénesis, no ha sido completamente establecido.

2. Familia de factores de transcripción SPALT-LIKE

Los factores de transcripción relacionados con Spalt, son una familia de proteínas cuyos miembros se caracterizan por poseer en su estructura múltiples motivos de dedos de zinc, los que se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia (De Celis & Barrio, 2009; Dawei Li, Tian, Ma, & Benjamin, 2004), como muestra la Figura 2. Esta familia de genes es altamente conservada en contexto evolutivo, siendo identificadas en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (*sem-4*) (Basson & Horvitz, 1996; De Celis & Barrio, 2009) y en cordados mayores, entre ellos, el ser humano. Específicamente en el caso de los mamíferos, los genes homólogos a *Spalt* son

requeridos para el desarrollo normal de extremidades, sistema nervioso y diversos órganos incluido el riñón y el corazón (Sweetman & Münsterberg, 2006).

Los genes *SALL* humanos (*HSAL*) codifican un grupo de factores de transcripción (*SALL1*, *SALL2*, *SALL3* Y *SALL4*) que han sido aislados basándose en sus ortólogos en *Drosophila melanogaster* (genes *Sal*) (Böhm et al., 2008; J Kohlhase et al., 1996). En vertebrados, los genes *Spalt* muestran diferencias en la distribución de los dominios de dedos de zinc, siendo *SALL2* el miembro de la familia más distanciado (Sweetman & Münsterberg, 2006).

Como se muestra en la Figura 2, las proteínas *SALL* (**Sal Like**), poseen varias características estructurales en común. El dominio dedo de zinc 1 corresponde a la clase C2HC y está presente sólo en homólogos vertebrados; el resto de los dominios (2-5) son del tipo C2H2 ordenados en pares (De Celis & Barrio, 2009). El segundo dedo de zinc de cada par, contiene un motivo característico denominado *Sal-box* que está presente en otros factores de transcripción con dominios de dedos de zinc. Los cuatro ortólogos en vertebrados, *SALL1-4*, presentan diferencias en la distribución de los motivos dedos de zinc, siendo *SALL2* el miembro más distante de la familia (J Kohlhase et al., 1996; Sweetman & Münsterberg, 2006). Los dominios dedos de zinc del extremo C-terminal de *SALL2* no son homólogos a los observados en otros miembros de la familia de proteínas SPALT (Figura 2). Otro dominio característico de gran importancia es la región rica en Glutamina (polyQ), la que está presente desde *Drosophila melanogaster* hasta humanos, que podría estar relacionado a interacciones proteína-proteína entre miembros de la misma familia y/o entre integrantes de *SALL* y otras proteínas (Sweetman & Münsterberg, 2006). Los genes homólogos de *Spalt* pertenecientes a vertebrados, han demostrado estar involucrados en el desarrollo de estos organismos superiores y en varios desórdenes genéticos. Específicamente en el caso de los mamíferos, los genes homólogos de *Spalt* son requeridos para el desarrollo normal de extremidades, sistema nervioso y diversos órganos incluido el riñón y el corazón (Sweetman et al. 2004). Además, han sido asociados en procesos

como la organogénesis, mantención de células madres embrionarias y asignación del destino celular durante el desarrollo neuronal (Sánchez et al., 2010), siendo estas funciones conservadas entre los diversos organismos (Celis & Barrios, 2008).

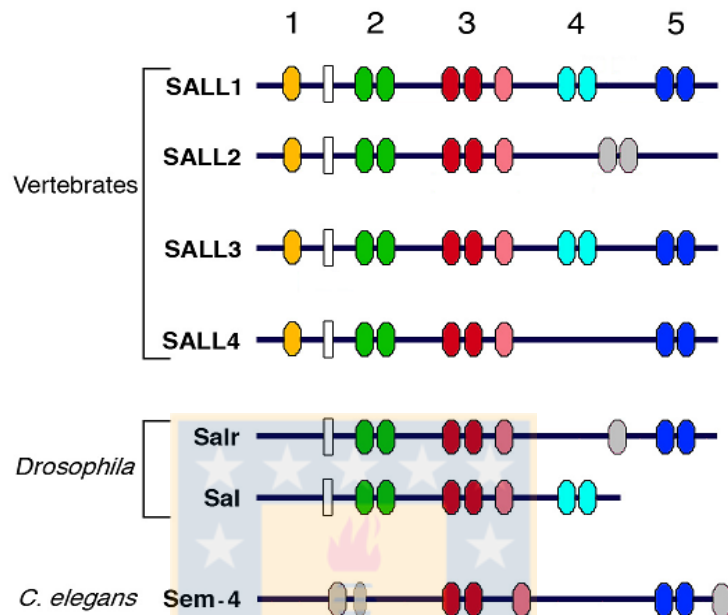


Figura 2. Representación esquemática de los dominios conservados en proteínas SALL. Dedos de zing representados por óvalos de colores y regiones ricas en glutamina, polyQ (rectángulos blancos). SALL1 y SALL3 se caracterizan por presentar múltiples motivos de dedos de zing del tipo C2H2, organizados en 5 dominios. SALL2 y SALL4 carecen del dominio no.4. SALL2 es el miembro evolutivamente más distante por la distribución de sus dedos de zinc, que además presenta diferencias en su extremo C- Terminal, pues los dedos de zinc en ese extremo no presentan homología con el resto de las proteínas SPALT-LIKE (Kolhase et al.1996; Sweetman et al. 2004). Fuente: J.F. de Celis y R. Barrio, 2009.

Se ha descrito además que mutaciones en esta familia de factores de transcripción provoca aberraciones fenotípicas en distintos órganos. Estudios en humanos indican que los portadores de mutaciones y polimorfismos en el gen *SALL1* padecen del síndrome de Townes Brocks, enfermedad hereditaria que se manifiesta con múltiples

malformaciones en el portador, así como retardo mental y polidactilia (Kohlhase *et al.* 1998; Surka *et al.* 2001). *SALL3*, mapeado en el cromosoma 18q23, ha sido asociado al fenotipo de pacientes con síndrome de depleción 18q, relacionado con retardos en el desarrollo, hipotonía, retardo del crecimiento, hipoplasia medio facial, pérdida de audición y dedos aguzados (Parrish *et al.*, 2004). En el caso de alteraciones genéticas en el gen *SALL4* da lugar al síndrome de Okhiro, de Holt-Oram y el síndrome Acro-Renal-Ocular (Borozdin *et al.*, 2004; B. Wang *et al.*, 2010). Además, estudios indican que *SALL4* tiene un rol oncogénico, ya que estaría participando en la génesis de la leucemia (Cui *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2013), la diferenciación del cáncer gástrico y se ha propuesto como un marcador útil para la distinción del carcinoma hepatoide gástrico del carcinoma hepatocelular (Ushiku *et al.*, 2010).

2.1 Factor de transcripción *Sall2*

Se identificó y caracterizó *Sall2* por primera vez como resultado de una investigación llevada a cabo en 1996 por S. R. Kohlhase, cuya finalidad fue encontrar homólogos de los genes *SAL-LIKE* en humanos. El gen *SALL2* (*Sal-like 2*) está ubicado en el brazo “q” del cromosoma 14 (14q11.1- q12.1), probablemente superponiéndose a una región asociada con la pérdida de heterocigocidad en el 49% de los casos de cáncer de ovario (Bandera *et al.* 1997). *SALL2* corresponde a un transcrito que se expresa principalmente en el cerebro, pero también en otros órganos adultos como el corazón, los pulmones, riñones y páncreas (Kohlhase, 1996). Al igual que el resto de los miembros de *SPALT*, *SALL2* conserva los 7 dominios dedos de zinc y el dominio adicional del tipo C2HC en el extremo N-Terminal característicos (Jürgen Kohlhase, Altmann, Archangelo, Dixkens, & Engel, 2000). Sin embargo, *SALL2* es el miembro más disímil de la familia, ya que contiene de manera alternativa un par de dedos de zinc diferente al del resto de los homólogos *SAL-LIKE* (De Celis & Barrio, 2009; J Kohlhase *et al.*, 1996). La unión de p150sal2 (150kDa de *SALL2*) al DNA, depende de los múltiples dominios dedos de zinc (D Li, Dower, Ma, Tian, & Benjamin, 2001).

SALL2 tiene dos isoformas originadas por un mecanismo de *splicing* alternativo, debido a la presencia de dos promotores alternativos en el extremo 5' del gen de *SALL2*, los que originan dos mRNA distintos, que difieren en el primer exón y comparten el segundo (Fig.3) (Jürgen Kohlhase et al., 2000; Ma et al., 2001). Las proteínas resultantes se diferencian tan solo en 25 aminoácidos localizados en la región N-terminal (Ma et al., 2001). La isoforma E1 contiene una secuencia putativa de localización nuclear y un motivo de represión conservado (Lauberth & Rauchman, 2006), que no está presente en la isoforma E1A, sugiriendo que ambas isoformas podrían tener funciones distintas. Además, el motivo triple dedos de zinc en el extremo C-terminal, presente en ambas isoformas, es necesario para que *SALL2* pueda unirse y transactivar al promotor de p21, un inhibidor de complejos Cdk/Ciclina (Li, 2004). Se ha reportado además que el antígeno T *large* del poliomavirus se une al dominio de transactivación de *Sall2* bloqueando su actividad (Li et al., 2001). Con esta información, si consideramos que este dominio no es homólogo con el resto de los miembros de la familia, y que molecularmente permite a *SALL2* asociarse tanto al promotor de p21 como al antígeno T *large*, se podría sugerir que *SALL2* tendría una función distintiva relacionada al control de la proliferación y al desarrollo del cáncer. En cuanto a lo que se conoce de su expresión, se determinó que ambas isoformas tienen un patrón de expresión tejido específico; la isoforma E1A se expresa de manera ubicua, mientras que la isoforma E1 se restringe a ciertos tejidos como el timo, testículos y colon (Kohlhase et al., 1996; Kohlhase et al., 2000; Li, 2001).

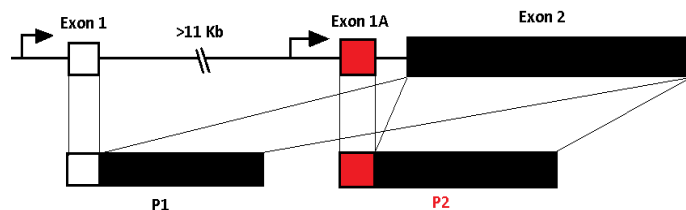


Figura 3. Esquema de la distribución de promotores alternativos de *SALL2* humano. Esquema de la distribución de los diferentes exones de *SALL2* en el genoma humano y su transcripción a ARNm. P1: Exón 1- Exón 2 mRNA, P2: Exón 1A-Exón 2 mRNA. Fuente: Modificado de Ma et al., 2001.

Adicionalmente, se sabe que SALL2 se expresa en mayor medida en células madre embrionarias humanas y líneas celulares derivadas de carcinomas embrionarios que en líneas celulares somáticas y muestras de tejido (Sperger et al., 2003). SALL2 se encuentra altamente expresado en células multipotentes hematopoyéticas derivadas de cordón umbilical (Giorgetti *et al.* 2010) y células madre pluripotentes inducidas provenientes de diferentes células humanas (Liu *et al.*, 2012; Nishino *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2011). Estudios recientes indican que SALL2 tendría una expresión diferencial bajo distintos contextos celulares; SALL2 aumenta sus niveles de expresión frente a condiciones de estrés metabólico, como la carencia de factores de crecimiento o frente a estrés genotóxico (Escobar et al., 2015; Liu, Adler, Segal, & Chang, 2007; Chang Kyoo Sung et al., 2012).

2.2 Funciones de SALL2

Ratones homocigotos que carecen de la proteína SALL2 presentan anomalías en el cierre del tubo neural (Böhm et al., 2008), lo que sugiere que estaría involucrada en la fisiología del sistema nervioso. En relación al papel que desempeña *Sall2* en el desarrollo del cerebro, en nuestro laboratorio se demostró por ensayos de doble híbrido, que SALL2 se une al dominio de muerte del receptor de neurotrofinas p75, un miembro de los receptores de factores de necrosis tumoral (TFNR). La neurotrofina NGF (Factor de Crecimiento Neural) disocia el complejo SALL2-p75 y activa a TrkA (Receptor de Trosomiosin –Tirosina quinasa), lo que favorece la translocación nuclear de SALL2. Esta interacción es importante ya que permite que SALL2 aumente la expresión de p21(waf- 1/cip1), con lo que se promueve la diferenciación y desarrollo de neuritas en células neuronales (Pincheira, Baerwald, Dunbar, & Donner, 2009). Consistente con el rol de SALL2 en el cerebro, Brown *et al.* (2002), mediante análisis de expresión génica en hemisecciones de tejido cerebral humano normal y con Alzheimer, identificaron que SALL2 es uno de los 27 genes, de un total de 5000 genes analizados, que tiene significativamente disminuida su expresión ($P < 10^{-7}$), sugiriendo que existe una relación entre la pérdida de SALL2 con los trastornos cerebrales

(Sperger et al., 2003). Recientemente se han identificado mutaciones en *Sall2* que están ligadas al coloboma ocular recesivo, una enfermedad congénita provocada por el cierre incompleto de la fisura óptica, generando ceguera en los individuos. Estos defectos se corroboraron en el modelo *knock-out* para *Sall2* utilizado por Böhm et al.,(2008) y en una familia que presentaba una mutación en la glutamina 29 del gen *Sall2*, lo cual genera una proteína trunca, no funcional (Kelberman et al., 2014).

Otros estudios basados en la premisa que *SALL1* es esencial para el desarrollo del riñón, demostraron que *SALL2* también se expresa en estadios tempranos del desarrollo del riñón y presenta una expresión aumentada en el Tumor de Wilms (C.-M. Li et al., 2002), una neoplasia maligna del riñón que afecta principalmente a niños, por lo que se le atribuye un rol en el desarrollo del riñón. Sin embargo, ratones homocigotos deficientes en *Sall2*, no presentan ningún tipo de anomalía en el desarrollo del riñón, a diferencia a lo que ocurre con la ausencia de *Sall1* (Sato et al., 2003).

En relación a la función de *SALL2* en procesos celulares, los primeros indicios de que *SALL2* podría jugar un rol como una proteína supresora de tumores, fue un estudio realizado con el virus de polio de ratón, que determinó que *SALL2* impone un bloqueo para la replicación viral. El antígeno T “*Wild type*” del virus era capaz de unirse a *SALL2*, inhibiendo el bloqueo y permitiendo la replicación viral, mientras que la replicación del virus no sucedía al usar un virus con un antígeno T mutante que era incapaz de unirse a *SALL2* (Li et al. 2001).

2.3 *Sall2*, Ciclo celular y Cáncer

Existen genes que son codificados para cumplir actividades regulatorias en el ciclo celular, particularmente la progresión de células quiescentes a través de G1 y hacia la etapa S. Estos son blancos para alteraciones genéticas y epigenéticas que subyacen en el desarrollo de muchas neoplasias humanas. Dentro de los genes sujetos a mutación encontramos dos tipos bien caracterizados, y cuyos productos proteicos regulan procesos de división celular, apoptosis y senescencia celular: proto-

oncogenes y genes supresores de tumor. Mientras que los primeros están regulando los procesos de proliferación y diferenciación celular, los últimos proveen señales de freno que limitan la proliferación y diferenciación celular, además de favorecer a la apoptosis. Dentro de los procesos celulares que podrían ser alterados en cáncer, el estudio del ciclo celular presenta numerosas oportunidades para orientar las estrategias terapéuticas contra el cáncer. La pérdida de control de G1 en el ciclo celular es un paso importante que contribuye en la tumorigénesis (Hartwell & Weinert, 1989).

Consistente con una función de SALL2 en la regulación del ciclo celular, se ha demostrado que SALL2 es inducido en respuesta a la ausencia de factores de crecimiento y es requerido para que fibroblastos humanos puedan salir del ciclo celular y se mantengan en un estado de quiescencia (G₀) (Liu et al., 2007). Otros estudios indican que al liberar células desde un estado de quiescencia e inducir la progresión del ciclo celular mediante la estimulación con suero, SALL2 es degradado mediante ubiquitinación (Chang K Sung, Dahl, Yim, Rodig, & Benjamin, 2011).

Estudios recientes mediante ensayos de microarray, han permitido identificar nuevos blancos de SALL2 en cáncer de ovario. En el estudio realizado por Wu *et al.* (2015), se comparan los perfiles de expresión de genes entre células de carcinoma ovárico que expresan *Sall2* y células carentes de este factor de transcripción. En el estudio se identificaron 26 genes cuya expresión se vio disminuida en presencia de *Sall2* y tienen relación con el crecimiento celular (Wu et al., 2015). Entre estos se identificó el supresor de tumores p16, un inhibidor de quinasas dependientes de Ciclinas que es importante en participación en la transición G1/S. En este contexto, se demostró que SALL2 se une al promotor de p16 activando su actividad transcripcional mediante la unión directa a un sitio putativo de unión para SALL2 con motivo GGGTGGG (Wu *et al.*, 2015). Consistente con lo anterior, la sobreexpresión de SALL2 incrementa los niveles de la proteína p16 en células de carcinoma ovárico ES-2. La expresión ectópica del “mini-gen” p16 en células de carcinoma ovárico SKOV3, que carecen tanto de SALL2 como de p16, muestran una inhibición de la progresión del ciclo celular y un

efecto mayor se obtiene cuando en conjunto se co-expresa SALL2. Considerando esta información se puede estimar que SALL2 actuaría como un regulador negativo de la progresión del ciclo celular en la transición G1/S. Otros estudios han dilucidado que SALL2 también ejerce una regulación positiva sobre los niveles de la proteína p21, un mediador del arresto celular en las fases G1- S, a través de los complejos Ciclina/CDKs (Li, 2004; Pincheira, 2009). En relación a SALL2 y p21, estudios más recientes demostraron que la proteína viral E6 del virus de papiloma humano 16 (HPV16) se une a SALL2 estabilizándola. Sin embargo, la estabilización de SALL2 por la unión con E6 la transforma en una proteína transcripcionalmente inactiva, incapacitándola para unirse al promotor de p21 y promover su expresión (Parroche *et al.* 2011). Estos estudios sugirieron que SALL2 funciona como regulador negativo de la replicación viral (Li *et al.*, 2001).

En un contexto de cáncer, estudios realizados por Li *et al.*, (2004), proporcionaron más evidencias sobre la posible función supresora de la proteína Sall2. La sobre expresión transitoria de SALL2 en una línea celular de carcinoma ovárico humano (SKOV-3), que normalmente expresa bajos niveles de SALL2, disminuyó la síntesis de ADN y aumentó la apoptosis celular. La expresión estable de SALL2 en estas células además aumentó los niveles de la proteína p21 y de la proteína pro-apoptótica BAX. En correlación con lo anterior, células normales de la superficie epitelial de ovario humano (HOSE) a las que se les inhibió la expresión de SALL2 con siRNA, muestran una disminución de la expresión de p21 y un aumento de la síntesis de ADN (Li *et al.* 2004). Estos estudios podrían dar una explicación funcional a reportes previos que indicaban bajos niveles de expresión de SALL2 en muestras de carcinoma ovárico. Esto debido a la pérdida de heterocigocidad en la región donde se encuentra ubicado el gen de SALL2 o al silenciamiento de SALL2 por la hipermetilación de uno de sus promotores (Bandera *et al.* 1997; Sung *et al.* 2013). La pérdida de heterocigocidad también se ha identificado en el 40% de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, y en el 25% de casos de cáncer de vesícula, sugiriendo que en esta región del cromosoma 14 se mapean genes supresores de tumores (Chang *et al.* 1995; Lee *et al.* 1997). Sin

embargo, contrario al rol supresor de tumores, existen estudios que muestran a *Sall2* como posible oncogen, debido a que se encuentra sobre expresado en distintas neoplasias. Estas incluyen el tumor de Wilms (Li *et al.*, 2002), carcinoma oral de células escamosas (Estilo *et al.*, 2009), cáncer testicular (Alagaratnam, Lind, Kraggerud, Lothe, & Skotheim, 2011), sarcoma sinovial (Nielsen *et al.*, 2003) y carcinoma de células escamosas de la lengua (Estilo *et al.*, 2009). Sumado a esto, se propuso a SALL2 como un biomarcador de carcinoma de cabeza y cuello, debido a que su expresión está asociada con la capacidad de invasión y del estado avanzado del cáncer (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2011). Además, se conoce que los dos modelos de ratones deficientes en *Sall2* que existen, no muestran generación espontánea de tumores, algo esperado cuando se elimina un gen supresor de tumores (Böhm *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2003). Todos estos datos apuntan a considerar a *Sall2* con un posible rol de oncogén. En resumen, los blancos transcripcionales identificados para *Sall2* en el último tiempo, asocian a este factor de transcripción con un rol supresor de tumores. El rol antiproliferativo de SALL2 podría deberse a la regulación positiva que ejerce sobre proteínas blanco relacionadas con el ciclo celular, como son p21^{WAF} y p16^{INK4A} (Gu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que la función de SALL2 en células tumorales se pierde, ya sea por el secuestro por parte de proteínas virales, la hipermetilación de su promotor o eliminación del genoma. Como contraparte, estudios realizados en líneas tumorales muestran a SALL2 con un rol oncogénico, debido a que el aumento de su expresión se relaciona con el desarrollo de distintas neoplasias.

Las evidencias presentadas sugieren que SALL2 tiene una función en la proliferación celular, sin embargo, el entendimiento de los mecanismos involucrados en esta función aún no ha sido esclarecido. A modo de caracterizar funcionalmente a SALL2 y estudiar su expresión en el ciclo celular, experimentos preliminares en nuestro laboratorio, utilizando fibroblastos embrionarios de ratón, sugieren que la expresión del mRNA de *Sall2*, tanto para la isoforma E1 como para la E1A, cambia durante las diferentes fases del ciclo celular. Células sincronizadas por privación total de suero

fueron luego reactivadas para entrar al ciclo celular adicionándoles medio completo. Este estudio indicó que tanto el mRNA de *Sall2*-E1A (banda de 157 bp) como el de *Sall2*-E1 (banda 299bp), presenta una expresión diferenciada, teniendo un *peak* máximo de expresión a las 16 y 44h post- estímulo (Fig.4).

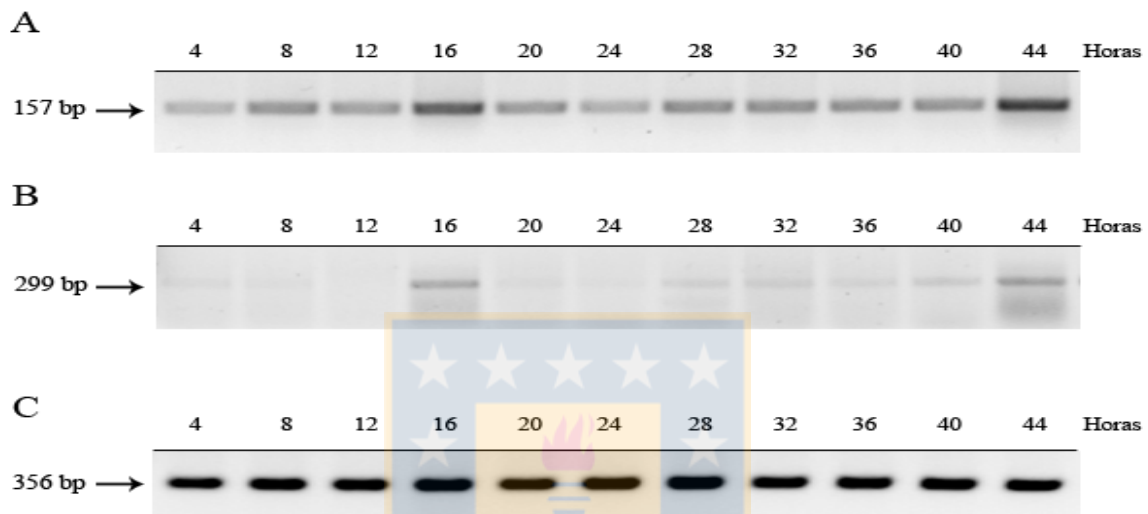


Figura 4: Perfil de expresión del mRNA de *Sall2* durante la progresión del ciclo celular. A: MEFs se sincronizaron por privación de suero durante 72 h y luego fueron reactivadas por la adición del medio completo. Análisis por gel de agarosa de la expresión de RNAm de *Sall2* en MEFs *wild-type* a las diferentes horas de la progresión del ciclo celular mediante PCR convencional. A Isoforma E1A. B Isoforma E1. C Normalizador de carga GAPDH. Fuente: Tesis de pregrado carrera Bioingeniería – Fernanda Sánchez, 2012.

Adicionalmente, se usaron tres métodos de sincronización a modo de comparar expresión de SALL2 en las distintas fases del ciclo. En la Figura 5 se observa la expresión de la proteína SALL2 luego de sincronizar las células con privación de suero (G0), con bloqueo doble Timidina, que inhibe la síntesis de ADN (G1/S), y con Nocodazol, agente que impide la polimerización de los microtúbulos y así la entrada a la Mitosis (G2/M). El resultado sugiere que SALL2 aumenta considerable en la

transición G1/S (Fig.5). Además, se observó que la expresión de SALL2 se correlaciona con la expresión de Ciclina E1, gen del cual se sabe que se expresa en esta transición del ciclo celular (G1/S) (Mussman *et al.*, 2000; Golias *et al.*, 2004).

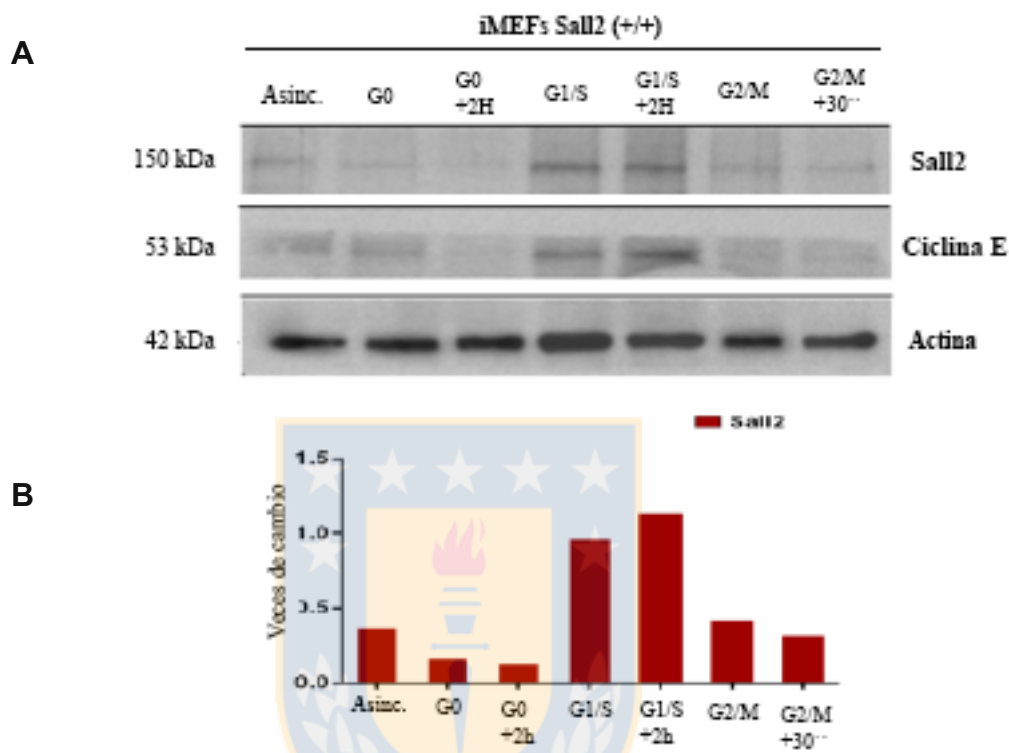


Figura 5. La expresión de SALL2 es diferencial a lo largo del ciclo celular. (A) Análisis de *Western-blot* para determinar niveles de expresión de SALL2 en los distintos puntos de control del ciclo celular **(B)** Densitometría de los niveles de proteína SALL2 utilizando el programa ImageJ. La cantidad de cada proteína detectada por *Western blot* se normalizó por la cantidad de proteína Actina para cada condición de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente se realizaron estudios preliminares comparando las tasas de crecimiento entre células MEFs SALL2 (+/+) y SALL2 (-/-). Los resultados indican que células SALL2 (-/-) proliferan más rápido que las células SALL2 (+/+) (Fig.6), lo que sugiere a SALL2 como un regulador negativo del ciclo celular.

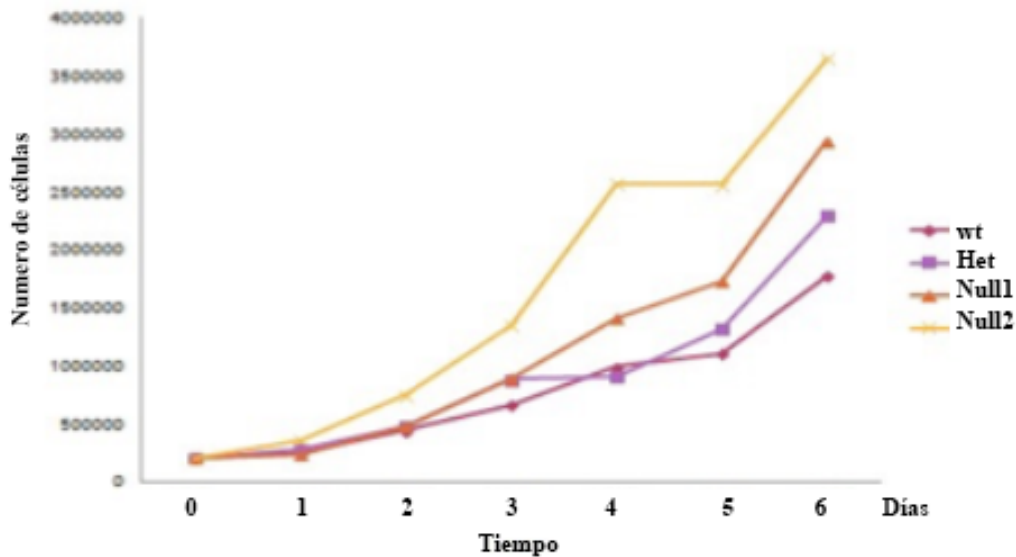


Figura 6: Curva de proliferación de MEFs *Sall2* +/+, *Sall2* +/- y *Sall2* -/-. Conteo celular de genotipos (*Sall2* +/+, *Sall2* +/- y *Sall2* -/-), fue realizado durante 6 días utilizando cámara de *Neubauer*. Línea roja corresponde a MEFs *Sall2* +/+, línea morada corresponde a MEFs *Sall2* +/- y líneas amarilla y naranja a genotipo *Sall2* -/-. Experimento fue realizado 3 veces en triplicado (* indica $p < 0.05$ basado en el test t-Student). Fuente: Tesis de pregrado carrera Bioquímica – Elizabeth Riffo, 2013.

Como se mencionó anteriormente, SALL2 es un factor de transcripción poco caracterizado, cuyos únicos blancos identificados hasta ahora, son p21, p16, BAX y Myc. Con objetivo de dilucidar cómo es que SALL2 podría estar ejerciendo un rol regulatorio sobre el ciclo celular, se realizó un estudio bioinformático para identificar posibles blancos de SALL2, analizando sitios putativos de unión en regiones promotoras de genes asociados al ciclo celular.

Basados en la secuencia consenso de unión de SALL2, GGGTGGG previamente caracterizada por Gu *et al.* (2001), se identificaron sitios putativos de unión a SALL2 en el promotor de Ciclina E1 (5 sitios) y Ciclina E2 (4 sitios). Lo que sugiere a Ciclina E como un blanco transcripcional de SALL2.

3. Propuesta de investigación

En base a toda la información entregada, se plantearon las siguientes preguntas: i) ¿Qué función cumple Sall2 en la progresión del ciclo celular? ii) ¿Qué fase específica del ciclo celular se ve afectada por la regulación de Sall2? iii) ¿ Existe una relación funcional entre Sall2 y las Ciclinas bajo condiciones normales de proliferación? iv) ¿ Regula Sall2 la expresión de Ciclina E1?.

Proponemos determinar si el factor de transcripción Sall2 tiene un rol regulatorio sobre la transcripción de la Ciclina E y de esta manera un efecto directo sobre la progresión del ciclo celular, permitiendo la detención de este en la transición G1/S.



4. Hipótesis

En base a lo anterior, se propone como hipótesis que: **“El factor de transcripción Sall2 regula negativamente la progresión del ciclo celular mediante la represión transcripcional de la Ciclina E”**.

5. Objetivo General

Determinar si el factor de transcripción Sall2 regula la expresión de la Ciclina E, y su posible correlación en cáncer.

6. Objetivos Específicos

6.1) Determinar regulación transcripcional de Sall2 en el gen de la Ciclina E1 y su relevancia en el ciclo celular.

- 6.1.1 Caracterizar ciclo celular en células MEF's Sall2 (+/+) y Sall2 (-/-).
- 6.1.2 Analizar el efecto de Sall2 sobre la actividad transcripcional de Ciclina E1.

6.2) Realizar análisis *in Silico* para correlacionar efecto regulatorio de Sall2 sobre Ciclina E.

- 6.2.1 Correlacionar expresión de Sall2 y Ciclina E en cáncer.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Reactivos.

Se utilizaron los siguientes reactivos: etanol (MERK), Cloroformo (MERK), alcohol isoamílico (Sigma), Isopropanol (MERCK), solución acrilamida/bisacrilamida (BIO-RAD) Tris-HCl (Invitrogen), EDTA (OmniPur), EGTA (Applichem), NaCl (MERCK), SDS (MERCK), suero fetal bovino (FBS) (HyClone), Glicina (United States Biological), Metanol (MERCK), Tween 20 (Sigma), leche descremada Svelty (Nestlé), etanol (MERCK), Glucosa (MERCK), NaOH (MERCK), KCH_3CO_2 (MERCK), NaCH_3CO_2 (MERCK), MgCl_2 (MERCK), KCl (MERCK), Triton X-100 (Applichem), desoxicolato de sodio (Sigma), NaHCO_3 (MERCK), isopropil β -D1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma), Imidazol (MERCK), NaH_2PO_4 (MERCK), BSA (Thermo Scientific), Glicerol (United States Biological), ZnCl_2 (MERCK). Nocodazol (#M1404), (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA). El promotor de Ciclina E1 (#8458:10-4) Addgene; Cambridge, MA, USA. RNAsa y Yoduro de propidio (SIGMA).

7.1.1 Anticuerpos.

Anticuerpo policlonal SALL2 (#HPA004162) fue comprado en SIGMA (Atlas antibodies, AlbaNova University Center, Stockholm, Sweden). Anti-Sall2 policlonal de Bethyl Laboratoryes (A303-208A). PARP clivado monoclonal específico (Asp-214, #9544) fue obtenido de Cell Signalling (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA). Anticuerpo polyclonal Ciclina A (C-19, #SC-596) y Ciclina B1 (GNS1, #SC-245), y los anticuerpos monoclonales Ciclina D1 (DCS-6, #SC-20044), Ciclina E1 (E-4, #SC-377100), P21 (Sc-6264) y b-Actina (AC-15, #SC-69879) fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA). Los anticuerpos secundarios Anti-conejo HRP (Sc-2314) y Anti-ratón HRP (Sc-2004) fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA)

7.2 CULTIVO CELULAR

7.2.1 Descongelamiento y expansión de fibroblastos embrionarios de ratón

Tanto para las líneas celulares iMEF (*Immortal Mouse Embryo Fibroblast*) y HEK 293T (*Human Embryo Kidney*), los viales de criogenia fueron sacados del nitrógeno líquido y puestos directamente en hielo. Pasados 5 minutos son llevados a 37°C para ser descongelados. El contenido del vial se resuspendió, se transfirió a un tubo que contenía DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Hyclone) alto en glucosa (4,5 g/L) suplementado con 2mM de glutamina (Hyclone), penicilina (50 U/mL)/estreptomicina (50 µg/mL) (Hyclone) y 10% v/v FBS (*Fetal Bovine Serum*). Posteriormente las células se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos. Se conservó el pellet de células y se resuspendió por agitación manual, se adicionó medio de cultivo y se resuspendió nuevamente. Las células se transfirieron a una placa con medio de cultivo fresco. Después de 2 días en el incubador a 37°C- 5% CO₂, las células se encontraban entre 90-95% de confluencia, por lo que se procedió a tripsinizarlas. Para dividir los cultivos celulares, éstas se lavaron con solución fosfato salina (PBS 1X, Phosphate buffered saline, Hyclone) y posteriormente se soltaron de la placa con Tripsina 0,25% con EDTA (Hyclone). Se realizó revisión diaria de los cultivos para asegurar un correcto crecimiento celular y esterilidad. El mismo procedimiento se realizó para cada nuevo pasaje.

7.2.2 Conteo celular

Se tomó una alícuota de 10-16 µL de suspensión celular y se sembró con micropipeta en una cámara de Neubauer, se observó al microscopio y se contó las células en los cuatro cuadrantes externos. Se sacó un promedio de los cuatro cuadrantes de la cámara y luego se multiplicó por 10000, que corresponde al factor de dilución de la cámara; obteniendo de esta forma el número de células contenidos en 1 mL.

7.2.3 Sincronización celular

Después de haber realizado el conteo y haber dispuesto las células en las correspondientes placas de acuerdo a cada experimento, se procedió a crecer las células con medio DMEM (Hyclone) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS, Hyclone), 1% glutamina (Invitrogen) y 0.5% penicilina/estreptomicina (Invitrogen) a 37°C con 5% CO₂ durante 24 horas. Para la sincronización en fase G2/M se procedió a cultivar las células en medio DMEM 10% FBS concentrado a 125 uM de Nocodazol por 16 horas. Posteriormente se liberaron las células al ciclo celular con la adición de medio DMEM completo. Muestras fueron colectadas a varios tiempos post-sincronización.

7.3 Citometría de flujo

Aproximadamente 1.5×10^6 células por placas de 100 mm de diámetro fueron plaqueadas un día antes de la adición con Nocodazol 125 uM por 16 h y posterior a una leve agitación de las placas (*Shake off*). Posterior a la incubación, las células fueron lavadas con PBS. Tanto el medio de cultivo como el PBS fueron usados para la colección de muestras. Después del lavado con PBS, las células fueron despegadas de la placa con tripsina al 0.25% trypsin y colectadas en el mismo tubo falcon. Luego las células fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas con PBS frío, y finalmente fijadas con etanol frío al 70%. Las muestras fueron guardadas a 4° C hasta su uso. Posterior a la fijación con etanol, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con 0.4 mg/mL de RNAsa (Sigma) en PBS a 37°C durante 40 minutos. Luego se adicionó Yoduro de Propidio (Sigma) a una concentración final de 10 µg/mL. Finalmente, las células fueron filtradas y analizadas el contenido de DNA en el citómetro Becton Dickinson FACSCanto II. Los datos crudos del análisis fueron procesados con el programa ModFit LT 3.0.

7.4 TÉCNICAS DE ADN

7.4.1 Electroforesis en gel de agarosa

El ADN se separó por tamaño a través de electroforesis en gel de agarosa (Axygen). El gel se preparó al 1% p/v en solución tampón TAE 1X (Tris Acetato EDTA), conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Merck). Luego, se procedió a realizar la electroforesis durante 1 hora a un voltaje constante de 80 volt. Los fragmentos se visualizaron bajo luz ultravioleta. Se utilizaron los estándares de ADN “*1Kb Ladder DNA marker*” y “*100bp Ladder DNA marker*” (Axygen).

7.5 TÉCNICAS DE ARN

7.5.1 Extracción y purificación de ARN

Las células adheridas a la placa de cultivo se lavaron dos veces con PBS. Sobre la superficie de la placa se añadió 1 mL de Trizol (Invitrogen) y se dejó reaccionar por 5 minutos a temperatura ambiente. El lisado celular se colectó con una espátula, se transfirió a un tubo 1,5 mL y se añadió 200 µL de cloroformo (Merck). Con objeto de separar la fase orgánica de la fase acuosa, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó reposar 5 minutos antes de ser centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4°C. El ARN se precipitó de la fase acuosa mediante la adición de 500 µL de isopropanol (Merck), dejándolo reposar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando durante 10 minutos a 12.000 g. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos. Se secó a temperatura ambiente con el tubo abierto por 10-20 minutos y se adicionó 80 µL de agua DEPC (del inglés *Diethylpyrocarbonate*) al 0,1%. Los tubos se dejaron en reposo en hielo por 30 minutos y el ARN total se resuspendió suavemente.

Para eliminar cualquier residuo de ADN genómico del ARN aislado, se trató las muestras con la enzima desoxirribonucleasa (DNasa) según el protocolo del kit

comercial *TURBO DNA-free* (Invitrogen), luego se cuantificaron las muestras en el espectrofotómetro (Biorad) y se guardó a -80°C hasta su uso. Todo el material utilizado para la manipulación de ARN estaba libre de ribonucleasas (RNAsas).

7.5.2 Transcripción reversa (RT-PCR)

La transcripción inversa de los ARNs aislados se realizó con 200 unidades de la enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” (Promega), con 0,5 µg oligodT anclados (Invitrogen) y 1 µg de ARN total en un volumen de reacción de 20 µL siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego, para la reacción de PCR en tiempo real se utilizó el kit “*KAPA SYBR Fast qPCR*” (Kapabiosystems) en una reacción de 20 µL con 50 ng de ADNc. El programa utilizado fue de 40 ciclos con temperatura de denaturación de 95°C por 5 segundos y un solo paso de alineamiento y extensión de 20 a 30 segundos a temperatura entre 60 y 62°C. Al final de cada PCR cuantitativo, se realizó una curva de “*melting*” que consistió de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 25°C, 1 segundo a 70°C y la medición de fluorescencia cada 0,2 segundos hasta llegar a 90°C. Las reacciones de PCR cuantitativo se realizaron en el termociclador Mx3000P (Agilent Technologies).

7.5.3 PCR en Tiempo Real (Q.-PCR)

Para validar la cuantificación por PCR en tiempo real de los genes analizados, se realizó una estandarización de las reacciones de PCR, de manera asegurar que se obtuvo en cada reacción un solo producto y una eficiencia de la PCR entre 90 y un 100% aproximadamente. Debido a esto, junto a cada medición del ARNm de cada gen, se realizó una curva estándar, utilizando las condiciones de tiempo, temperatura de alineamiento y concentración de partidores ya estandarizadas, y como templado diluciones seriadas del producto de PCR de cada gen. Las secuencias para el análisis de Q-PCR fueron 5'-GATCTCCTCCGCAGTCTGG-3' (sentido) y 5'-ACACAATGGGTATCCGGTCT-3' (antisentido) para SALL2, y 5'-

TTGTGGCCTTAGCTACAGGA-3' (sentido); 5'-GCTCACCGTAGATGCTCTTT-3' (antisentido) para Ciclofilina (PPIB). Para la amplificación de Ciclina E1 fue Sentido 5' GGGGTATTCAAGCTCATTGTC 3' y Anti-sentido 5' GTGAAAAGCGAGGATAGCAGTCAG 3'. Para la Ciclina D1 la secuencia es Sentido 5' AGGAAGCGGTCCAGGTAGTT 3' y Anti-sentido 5' AGTGCCTGCAGAAGGAGATT 3' y para Ciclina D2 fue Sentido 5' TCCCGCAGTGTTCTATTTC 3' y Anti-sentido 5'GGTAATTCATGGCCAGAGGA. Para la Ciclina E2 la secuencia usada fue sentido 5' TCTGTGCATTCTAGCCATCG 3' y Anti-sentido 5' CAAAAGGCACCATCCAGTCT 3' y finalmente para Ciclina B1 la secuencia es Sentido 5' TGGACTACGACATGGTGCAT 3' y Anti-sentido 5' CAGGTGCTGCATAACAGGAA 3'. Las expresiones relativas de los genes durante la progresión del ciclo celular fueron calculados con respecto al tiempo 0 h que corresponde a las células sincronizadas con Nocodazol por 16 horas.

7.6 TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

7.6.1 Obtención de extractos totales de proteínas

Las células fueron colectadas en solución de PBS frío por arrastre mecánico y centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue lisado con tampón de lisis frío [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10% glicerol; 200 mM NaCl₂; 2,5 mM MgCl₂; 1% Tritón X-100; inhibidores de proteasas; mezcla de inhibidor de fosfatasa (Sigma)]. Se dejaron los tubos en rotación a 4°C por 30 minutos. Los lisados celulares fueron centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. La concentración de proteínas totales fue determinada por el método *Bradford*.

7.6.2 Separación de proteínas por SDS-PAGE

La separación de proteínas fue llevada a cabo por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida en condiciones denaturantes (en presencia de dodecil sulfato sódico o SDS-PAGE). Estos geles verticales se componían de dos regiones: el gel concentrador en la parte superior (Tris-HCl, 250 mM, SDS 7 mM, 30% acrilamida: 1% bisacrilamida; pH 6,8) y el gel separador en la parte inferior (Tris-HCl 375 mM, SDS 3,5 mM; pH 8,8), cuyo tamaño de poro variaba según el porcentaje de acrilamida añadido (entre 8 y 13,5%). Para catalizar la polimerización se adicionó persulfato amónico (APS 10%) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Antes de proceder a su separación, las muestras proteicas se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C con solución de carga en presencia de DTT (Ditiotreitol). Se cargó un total de 25 µg de proteína por carril. La electroforesis se realizó a voltaje constante (70V) en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,05% y el marcador de peso utilizado fue de 100kb (Fermentas). Los sistemas de preparación y corrida de geles utilizados fueron Bio-Rad.

7.6.3 Análisis de Western blot.

Para la detección de proteínas, las células se lisaron con tampón de lisis (0,5% v/v NP40; 10 mM Hepes pH 7,9; 1 mM DTT y 100 mM NaCl) en presencia de un Cóctel de Inhibidores de Proteasas 1 y un Cóctel de Inhibidores de Fosfatasa 2 (Roche). Los lisados celulares se centrifugaron a 2.000 g durante 5 minutos y las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford 1976). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos con tampón de carga en presencia de DTT, se cargaron en un gel denaturante de poliacrilamida SDS-PAGE a diferentes porcentajes, de acuerdo al peso molecular de la proteína en estudio, y se corrieron durante 2 horas a un voltaje constante de 100 volt. Se utilizó el estándar "*PageRuler Prestained Protein Ladder*" (Thermo Scientific). Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*, Millipore) en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% v/v Metanol) durante 2 horas a un voltaje constante de 100 volt. Los sitios

inespecíficos de la membrana se bloquearon con 5% p/v de leche descremada en TBS-tween20 (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% v/v Tween20) durante una hora. El “*western blot*” se desarrolló incubando por 2 horas con anticuerpo primario: anti-actina, anti- histone H3. Mientras que los anticuerpos anti-Sall2, anti-Ciclina E1, anti-Ciclina D1, anti-Ciclina A1, anti-p21 fueron incubados durante toda la noche en rotación a 4°C. Luego, la membrana fue lavada en TBS-tween e incubada con anticuerpo secundario anti IgG de ratón o conejo acoplado a peroxidasa (BioRad), en una dilución 1:20.000 en el mismo tampón. Finalmente, la membrana se reveló con sustrato de la peroxidasa (GE Healthcare) y se expuso ante un *film* autoradiográfico (GE Healthcare). En algunas ocasiones se incubó la membrana con solución de “*Re-blot*” (Millipore) para realizar una segunda incubación con otros anticuerpos y nuevo revelado de las membranas.

Las densitometrías realizadas a los *Western blot* se hicieron con la imagen escaneada de los *films* revelados. De manera breve, con el programa ImageJ, se cuantificó los pixeles que formaban una banda para una proteína específica en el *film* revelado de cada “*Western blot*”. La cuantificación de cada proteína de interés se dividió por la cuantificación de una proteína cuya cantidad no se viera modificada con los tratamientos y por lo tanto utilizada como control de carga (GAPDH).

7.7 Ensayos de actividad luciferasa.

Para la medición de la actividad de los promotores mediante el gen reportero de luciferasa se realizó el siguiente protocolo. Las células HEK 293T (*Human Embryo Kidney cells*), fueron sembradas en una densidad entre 200.000 y 300.000 por pocillo de placa de 6 pocillos, la cantidad dependió del tipo celular. Después de 24 horas las células fueron transfectadas por triplicado, de acuerdo al protocolo ya mencionado, con un vector de control de transfección de actividad B- Galactosidasa, un vector que contenía el reportero de luciferasa, como el pGL3-Basic u otro similar, pero conteniendo una secuencia promotora, y finalmente, un vector de expresión eucarionte vacío o conteniendo la secuencia codificante de un factor de transcripción cuya

actividad se quería evaluar. Previo al ensayo de luciferasa, las células transfectadas fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus CKX41) para determinar la eficiencia de transfección, a través de la fluorescencia emitida por la proteína SALL2-GFP. Para las situaciones control, se transfectaron por pocillo 1 µg de promotor de CCNE1 (Plasmid 8458:10-4, Addgene) y 0.5 µg de vector codificante de β-galactosidasa, mediante el método de fosfato de calcio. Para las situaciones experimentales, se transfectó con el promotor de CCNE y vectores de Sall2 a modo de sobreexpresar la proteína, además del vector codificante de β-galactosidasa. Tanto el control como el experimento se ejecutaron en triplicado.

Para el ensayo de luciferasa, las células se lavaron con PBS 1X (Phosphate buffered saline, Hyclone), se colectaron en un tubo de 1,5 mL, se centrifugaron a 2.000 g a 4°C y el pellet de células se lisó con una dilución 1X de la solución de lisis comercial 5X (*Luciferase Cell Lysis Buffer, New England Biolabs*), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, 20 uL de los lisados obtenidos se utilizaron para la medición de la actividad luciferasa o β-Galactosidasa, según los kits comerciales Luciferase Assay System Protocol y Beta-Glo® Assay System Protocol, respectivamente, ambos de Promega. La emisión de luz, por parte de cada kit fue medida por triplicado, en placas de 96 pocillos con fondo negro (Perkin Elmer), utilizando el equipo luminómetro Victor 3 (Perkin Elmer). La actividad luciferasa de cada pocillo en la placa de 6 pocillos, fue normalizada por la actividad β-galactosidasa del mismo pocillo. Finalmente, la actividad luciferasa normalizada fue graficada en relación a la actividad del vector pGL3 basic.

7.8 Análisis Bioinformáticos

Los análisis genómicos de datos de expresión de genes para los análisis de correlación fueron trabajados en las bases de datos disponibles en el portal R2 (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). Los tipos de cáncer seleccionados para los análisis específicos de correlación fueron aquellos que presentaban fuerte

correlación negativa entre la expresión de *Sall2* y Ciclina E1 y que, además se sabe que en su derivación de tejidos normales expresan normalmente *Sall2*. Estos fueron el Cáncer de mama (BRCA), Cáncer de Pulmón (LUSC), Glioblastoma (GBM) y Cáncer de colon (HCC). Para todos los sets de datos, los niveles de expresión de *Sall2* y Ciclina E1 en los diversos tumores, fueron trabajados en la misma plataforma virtual a modo de obtener los *scatter plots* de correlación entre *Sall2* y Ciclina E1. El coeficiente de correlación de Pearson y su asociación con los valores P fueron calculados por defecto en la plataforma R2.

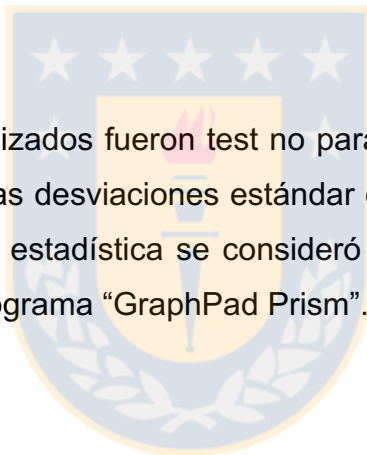
Con respecto a los análisis de expresión de las proteínas SALL2 y Ciclina E1 en tejidos de cáncer, se consultó en la base de datos *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>). En este caso, centramos nuestra búsqueda en la expresión de *Sall2* y Ciclina E1 en tejido de cáncer de colon, cáncer de mama, Glioblastoma y cáncer de pulmón. Un estudio de correlación similar fue realizado en la plataforma Oncomine (<https://www.oncomine.org>). La diferencia es que esta plataforma permite visualizar, analizar y descargar conjunto de datos de transcriptómica para *Sall2* y Ciclina E1 por separado. Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos publica Curtis Breast disponible en Oncomine. Esto corresponde a los datos de 2136 muestras cuyo análisis de expresión de mRNA se realizó a través de secuenciación masiva Illumina HumanHT-12 V3.0 R2 Array. Tanto para la expresión de *Sall2* como la de Ciclina E1, los datos fueron filtrados a modo de obtener expresiones significativas en el 5% superior de cada dataset. Adicionalmente se investigó por alteraciones genómicas en el gen de *Sall2* utilizando el recurso bioinformático disponible en la plataforma *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://www.cbioportal.org>). Primeramente, se analizó el gen de *Sall2* en varios tipos de cáncer. Posteriormente, se centró la búsqueda en Cáncer de mama utilizando la misma plataforma.

Con respecto a los análisis *Kaplan- Meier* se realizó una comparación entre el tiempo de sobrevivencia de una cohorte de pacientes en cuyas muestras tumorales de mama

se encuentra sobreexpresado tanto *SALL2* y *CCNE1* (Ciclina E1). Para generar un gráfico de *Kaplan meier* se utilizó la plataforma R2 mediante la opción expresión de un solo gen, ya que el análisis que se realiza en la plataforma separa las muestras de un conjunto de datos en dos grupos basados en la expresión de un gen. En este caso, se eligió la base de datos Bertucci ya que contiene mayor número de muestras para el estudio. Este estudio utilizó como plataforma de secuenciación masiva la herramienta u122p2 (Human Genome U133 microarray platform) y posteriormente, los datos fueron tomados para realizar el análisis Kaplan Meier donde fueron separadas las muestras de un conjunto de datos en dos grupos basados en la alta y baja expresión de *Sall2* en las muestras de cáncer de mama.

7.9 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos utilizados fueron test no paramétricos, con la corrección de Welch, la cual asume que las desviaciones estándar de las muestras a comparar no son iguales, la significancia estadística se consideró válida desde $p < 0.05$, según el análisis entregado por el programa "GraphPad Prism".



RESULTADOS

8. **Objetivo 1. Determinar regulación transcripcional de SALL2 en el gen de la Ciclina E1 y su relevancia en el ciclo celular.**

8.1 **Objetivo específico nº 1:** Caracterización del ciclo celular en Fibroblastos embrionarios de ratón *Sall2 Wild type (+/+)* y *Sall2* deficientes (-/-).

La idea central de este trabajo fue definir la función de SALL2 en la regulación del ciclo celular y su relación funcional con proteínas Ciclinas bajo condiciones normales de proliferación. Con este objetivo se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), que son un tipo de células muy utilizadas en el estudio del efecto de la ablación de genes específicos. Células MEFs se caracterizan por no presentar alteraciones genéticas, por lo que han sido extensamente utilizados para la medición y estudio de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Attardi, de Vries, & Jacks, 2004). Sin embargo, los fibroblastos primarios se caracterizan por proliferar rápidamente en los primeros pasajes y tener un tiempo límite de vida en cultivo. Considerando esto último durante el desarrollo de esta tesis se utilizó el modelo de células MEFs *wild type (Sall2 +/+)* y *null (Sall2 -/-)* immortalizadas bajo el protocolo modificado de Zhu *et al.* (1991).

8.1.1 *Validación del modelo de estudio*

Nuestro laboratorio generó un modelo de MEFs inmortales (iMEFs) a través del protocolo de infección con el antígeno “large T” del virus de Polioma de Simio, lo que se traduce en la inhibición funcional de la proteína supresora de tumores p53 (Zhu, Rice, Chamberlain, & Cole, 1991). Posterior a la immortalización, se determinó la expresión de la proteína SALL2 en los modelos generados, a modo de corroborar que efectivamente el genotipo celular corresponde a células *Sall2 (+/+)* y *Sall2 (-/-)*. Células

fueron cultivadas bajo condiciones normales de crecimiento y posteriormente los lisados celulares fueron analizados, mediante *western blot*. Como se muestra en la Figura 7, la proteína SALL2 (130 KDa) solo es distinguible en el modelo iMEFs *Sall2 Wild type (+/+)*, corroborando de esta forma nuestros modelos de estudio.

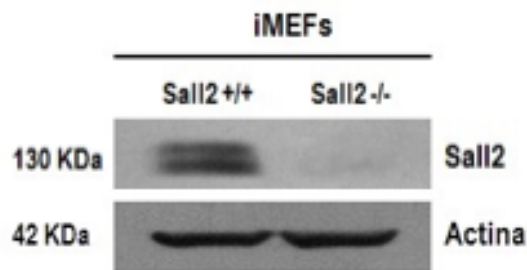


Figura 7. Validación del modelo celular mediante el análisis de expresión de la proteína SALL2. *Western blot* realizado a partir de lisados de células asincrónicas iMEF *Sall2 wild type (+/+)* y *Sall2 null (-/-)* cultivadas en condiciones normales de proliferación. Se utilizó Actina como control de carga (42 kDa). Fuente: Elaboración propia.

8.1.2 Evaluación del efecto de la deficiencia de SALL2 en el ciclo celular.

Los factores de transcripción (FT) son reguladores maestros de la expresión génica y su actividad puede ser modulada por múltiples mecanismos, incluyendo cambios en sus niveles de expresión (Nebert, 2002). Es por este motivo que, es imperante conocer con exactitud en qué fase del ciclo celular los factores de transcripción podrían estar desempeñando su regulación.

Con el fin de comparar la progresión de células con ambos genotipos (*Sall2 +/+* y *Sall2 -/-*) desde el comienzo de un nuevo ciclo celular, se estimó sincronizar las células en fase G2/M utilizando Nocodazol, y posteriormente liberarlas al ciclo celular. Para esto, previamente se realizó la estandarización de la concentración óptima de Nocodazol en MEFs. Considerando que el Nocodazol es un agente antineoplásico que impide la

polimerización de los microtúbulos lo que conduce a sincronizar en la fase previa a la mitosis, la célula cambia su morfología normal a una forma redondeada. Como se muestra en la Figura 8.A, a partir de 100 ng/mL ya es posible distinguir un cambio en la morfología de la célula, sin embargo, este no varía significativamente al aumentar las concentraciones de Nocodazol. Del mismo modo, se corroboró mediante análisis de expresión de proteínas, que sobre 100 ng/mL de Nocodazol incubando las células por 16 horas, es posible detectar con mayor intensidad la expresión del marcador de mitosis Histona H3- fosforilada (Fig. 8.B-C). De esta manera y con el fin de lograr una óptima sincronización de MEFs en nuestros estudios de ciclo celular, se procedió a utilizar una concentración intermedia de Nocodazol de 125 ng/mL por un tiempo máximo de incubación de 16 horas.

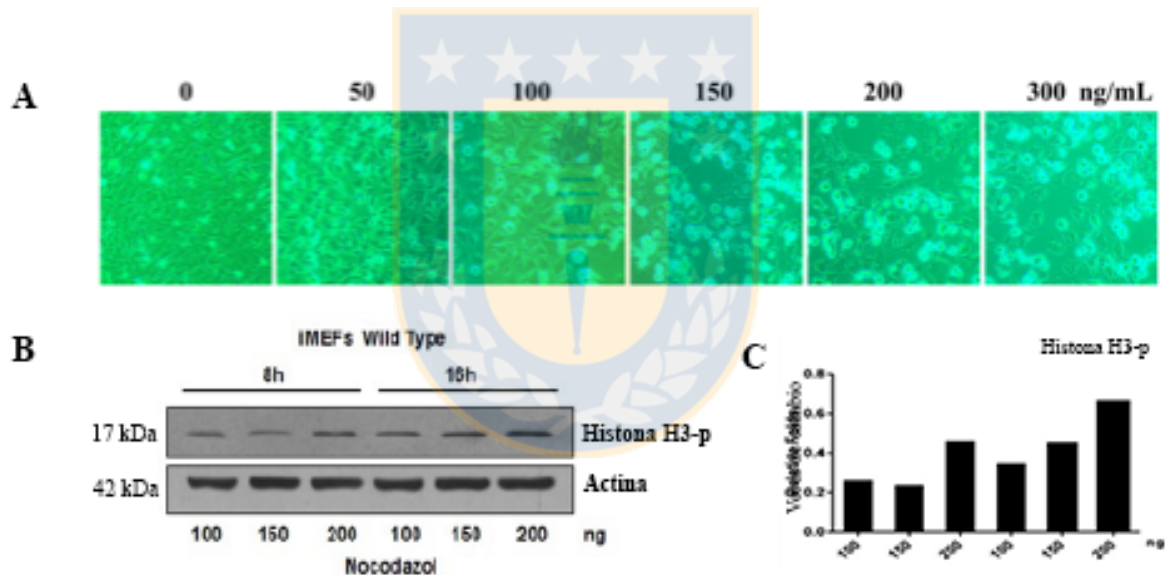


Figura 8. Optimización de la sincronización en G2/M para células iMEFs (A) Análisis morfológico por microscopía de células iMEFs *Sall2 wild type* (+/+) bajo distintas concentraciones de nocodazol. **(B)** Análisis de expresión por *western blot* del marcador de mitosis Histona H3-fosforilada en distintas horas de tratamiento y bajo concentraciones crecientes de nocodazol. **(C)** Densitometría de los niveles de proteína Histona H3- fosforilada utilizando el programa ImageJ. La cantidad de cada proteína detectada por *Western blot* se normalizó por la cantidad de proteína Actina para cada condición de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Una vez estandarizada la concentración de Nocodazol, se procedió a evaluar y comparar como se ven afectadas las distintas fases del ciclo celular en células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) por citometría de flujo. Con este fin, células iMEFs fueron sincronizadas con Nocodazol 125 ng/ mL por 16h, y posteriormente fueron liberadas al ciclo celular con la adición de medio completo (FBS 10%). Desde la liberación, se fijaron las células en distintas horas de progresión del ciclo y posteriormente fueron teñidas con Yoduro de propidio, utilizado para medir cuantitativamente el ADN (Ver Materiales y Métodos). Finalmente se analizaron las poblaciones celulares por ensayo de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) en el citómetro de flujo.

Como se muestra en la Figura 9, luego de 16h con Nocodazol (t=0 de liberación), tanto iMEFs *Sall2* (+/+) como *Sall2* (-/-) se encuentran en fase G2 (80%), por lo tanto, las células fueron sincronizadas de manera exitosa. Considerando que ambos genotipos están sincronizados en la misma fase, es posible notar que hacia la 4h de liberación al ciclo, existe una gran diferencia de la población de células *Sall2* (-/-) que ya se encuentra en fase G1 (34,41%) a diferencia de las células *Sall2* (+/+) que están aparentemente saliendo de la mitosis hacia la fase G1 temprana (15,89%). Ya en el punto de las 16h, ambos genotipos están en fase S (45,81% de células en síntesis para iMEFs *Sall2* (+/+) y 40,70% para *Sall2* (-/-)), sin embargo, no muestran diferencias significativas en el porcentaje de células en replicación. El mismo patrón ocurre para el tiempo 24h post-liberación (42,03% de células en S para iMEFs *Sall2* (+/+) y 46,92 % para *Sall2* (-/-)). Estos resultados se muestran de forma más evidente en la Figura 9.B, donde mediante un diagrama lineal se puede ver el dinamismo de la progresión en cada fase del ciclo celular (G1-S-M) para cada genotipo analizado. Estos resultados sugieren que *Sall2* estaría cumpliendo una función regulatoria del ciclo celular en las etapas tempranas de la progresión, ya que cuando las células son liberadas al ciclo celular desde la fase G2/M, las iMEFs *Sall2* (-/-) avanzan significativamente más rápido hacia la fase G1/S.

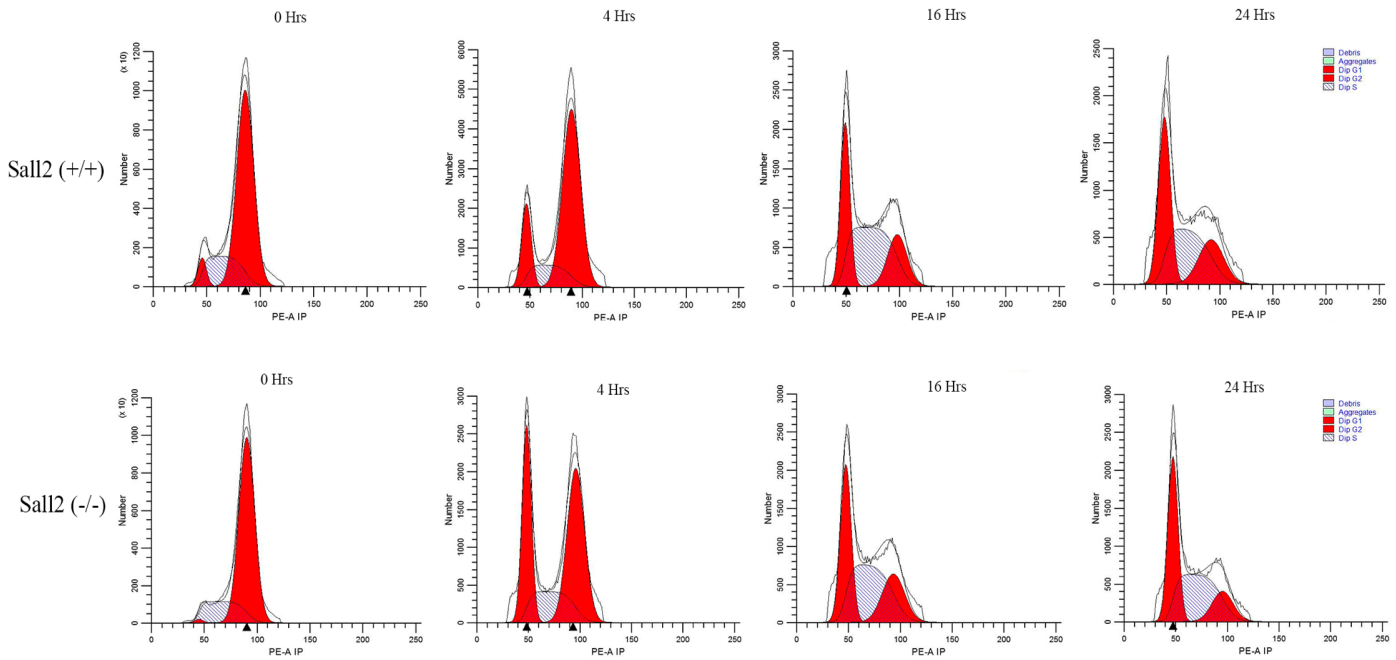
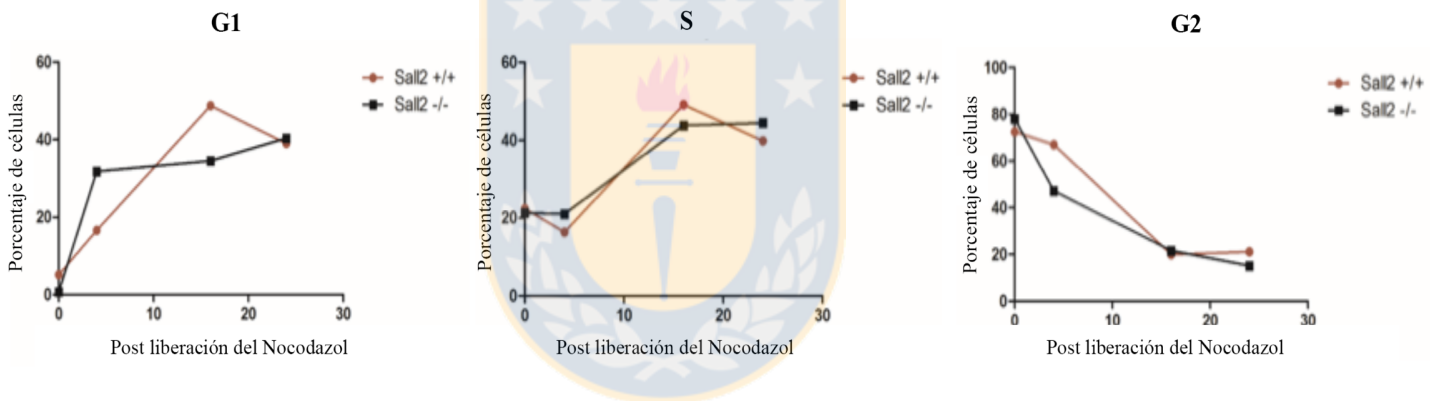
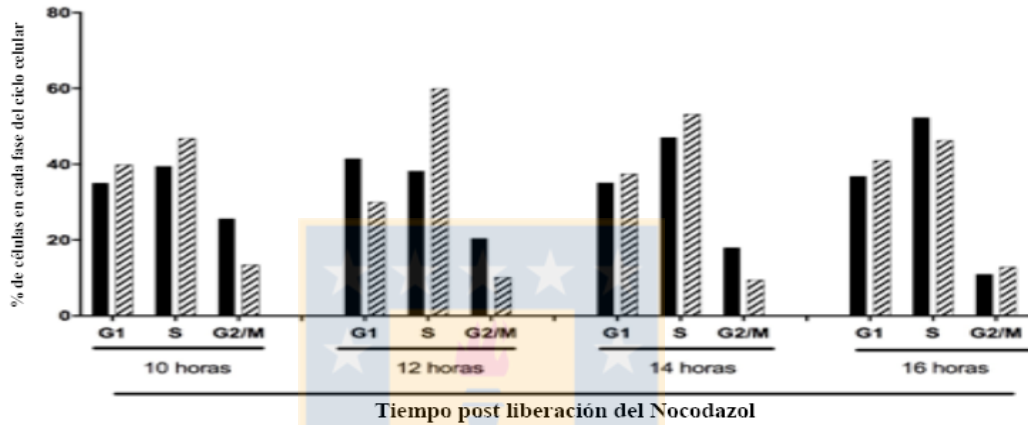
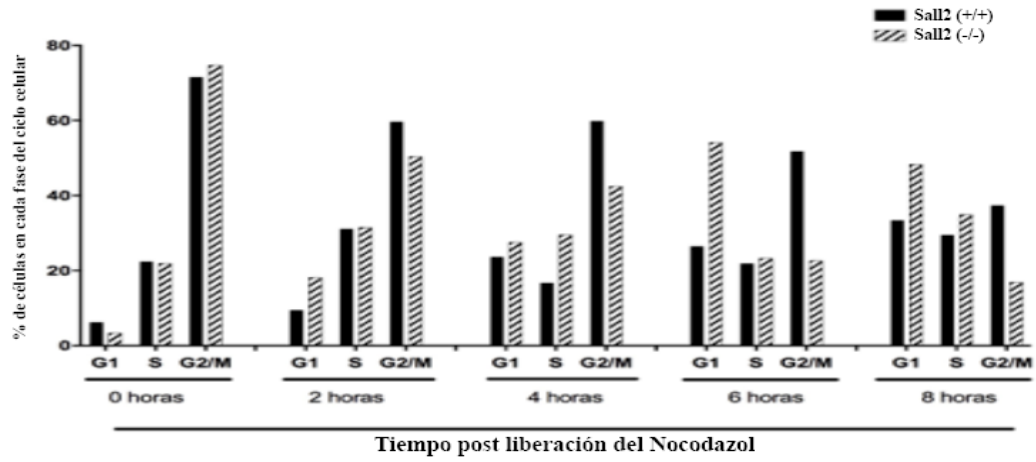
A**B**

Figura 9: Efecto de la deficiencia de *Sall2* en la progresión del ciclo celular.

Análisis por citometría de flujo de las células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) sincronizadas 16h con Nocodazol 125 ng/mL y liberadas al ciclo, finalmente fijadas y teñidas con la solución de Yoduro de propidio (A) Progresión del ciclo celular de células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) (B) Diagrama lineal que compara el dinamismo de la progresión del ciclo celular mediante el porcentaje de células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) en las distintas fases del ciclo celular (G1-S-M) post-liberación del arresto con Nocodazol. Fuente: Elaboración propia.

Se procedió a realizar un análisis más detallado colectando y analizando muestras cada 2 horas por un total de 16 horas post- liberación del arresto en G2/M, bajo las mismas condiciones experimentales. Como se puede apreciar en la Figura 10, el porcentaje de células mitóticas en ambos genotipos fue superior al 70%, por lo que se logró una sincronización con éxito (70,5% de células en G2 para iMEFs *Sall2* (+/+) y 74% para *Sall2* (-/-)). El análisis de Citometría de flujo revela que la progresión hacia la fase G1 después de la remoción del Nocodazol, inmediatamente se ve afectada en células *Sall2* (-/-), pues ya a la hora 2 del reingreso al ciclo celular, existe un 20% más de células que ya se encuentran en G1 temprana en comparación con las *Sall2* (+/+) (Figura 10.A). El cambio se hace más evidente hacia hora 6h, donde el 54,12% de las células *Sall2* (-/-) se encuentran progresando en la fase G1, a diferencia de las *Sall2* (+/+) que tienen un 51,72% de células aún en fase G2/M. Finalmente, el cambio más dramático en la progresión se vio en la hora 12 del ciclo celular, donde las células *Sall2* (-/-) se encuentran progresando en fase de síntesis (59,93% de células), mientras que las células *Sall2* (+/+) recién pasan a esta fase a las 16 horas (52,24%). Estos resultados se pueden evidenciar de mejor manera mediante un diagrama lineal de progresión (Figura 10.B) y el detalle de la progresión del ciclo en cada hora analizada en la Figura Suplementaria 1- Tabla 1. En resumen, nuestros resultados muestran que después de la salida de fase mitótica y posterior progresión hacia G1/S (2-12 hrs después de la mitosis), *Sall2* estaría siendo necesario, ya que células *Sall2* (-/-) empiezan un nuevo ciclo significativamente más rápido que células *Sall2* (+/+).

A



B

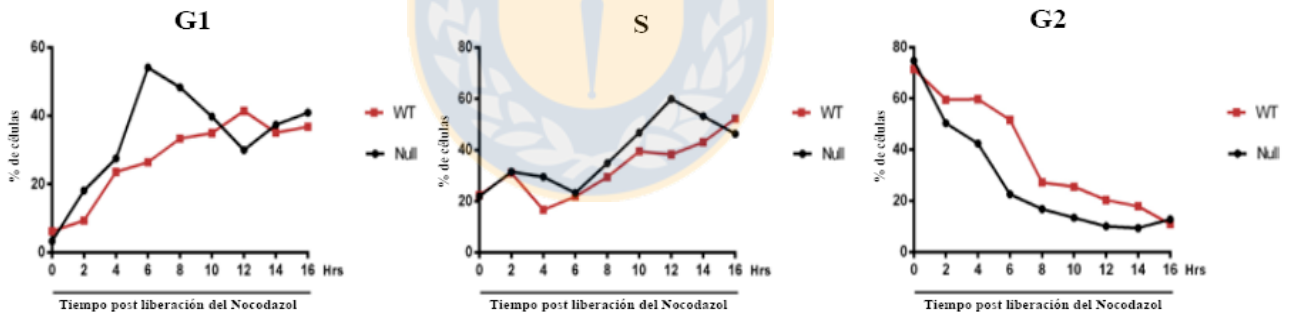


Figura 10: Efecto de la deficiencia de SALL2 en la progresión del ciclo celular.

(A) Comparación de porcentaje de células *Sall2 (+/+)* y *Sall2 (-/-)* en las distintas fases del ciclo celular para las horas 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 post-liberación de la detención del ciclo en G2/M. (B) Diagrama lineal que compara el dinamismo de la progresión del ciclo celular mediante el porcentaje de células *Sall2 (+/+)* y *Sall2 (-/-)* en las distintas fases del ciclo celular (G1-S-M) post liberación del Nocodazol. Fuente: Elaboración propia.

Con el fin de lograr una mejor sincronización, posteriormente a la incubación con Nocodazol, las células fueron sometidas a “*Shake off*”, que consiste en agitar las placas de cultivo suavemente para soltar las células que han perdido su capacidad de adherirse por la pérdida de su estructura. Estas células fueron traspasadas e incubadas en medio de cultivo completo con el fin de liberarlas al ciclo celular desde la fase G2/M. Cabe destacar que este procedimiento se realizó en varias oportunidades para posteriores análisis de citometría de flujo, sin embargo, la técnica del “*shake off*” genera un aumento de apoptosis detectable por el citómetro como muestra la Figura 11 (Datos crudos de los análisis de *shake off* tiempo 0h en Tabla 2 – Anexos). Considerando esto, los análisis de ciclo celular por citometría fueron realizados posterior a la sincronización con Nocodazol sin hacer “*Shake off*”. No obstante, para todo lo que respecta al análisis de expresión de proteínas y mRNA, esta técnica es óptima para demostrar un alto grado de sincronización celular sin ver afectado los resultados.

8.1.3 Análisis de marcadores moleculares durante la progresión del ciclo celular.

Una vez que fueron establecidas las fases del ciclo celular de mayor diferencia durante la progresión del ciclo celular entre células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-), se realizaron nuevos experimentos de sincronización bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Debido a la ventaja proliferativa de las células *Sall2* (-/-) sobre las *Sall2* (+/+), se investigó más en profundidad la expresión de SALL2 durante la progresión del ciclo celular. Para esto se colectaron lisados celulares y se procedió a analizar expresión de marcadores del ciclo celular por *Western blot*. Cambios en la expresión de SALL2 se visualizaron en iMEFs *Sall2* (+/+). Inicialmente, se analizó la expresión de *Sall2* utilizando un anticuerpo comercial que reconoce la proteína endógena. Se determinó que SALL2 se expresa a lo largo del ciclo celular, sin embargo, tiene una alta expresión en t=0 (G2/M) comparado con las otras horas analizadas. Progresando hacia el t=4-6h post-liberación, los niveles de expresión de SALL2 disminuyen significativamente para volver a aumentar levemente hacia el t= 8-12h (Figura 12).

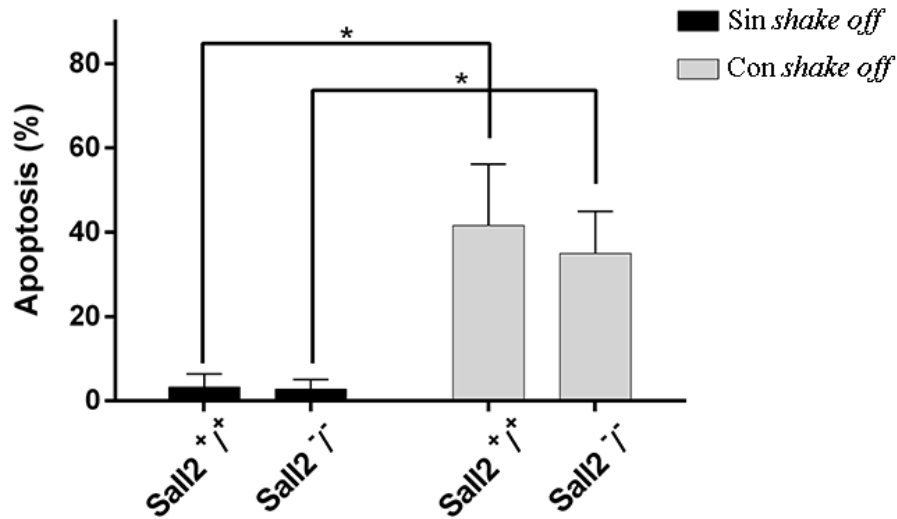


Figura 11. “Shake off” mitótico provoca un aumento de apoptosis. Células iMEFs *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) fueron sincronizadas con Nocodazol 125 uM por 16h correspondientes al tiempo 0h. Posteriormente, mediante el software ModFit LT se analizaron las poblaciones de células que fueron colectadas con y sin “*shake off*”. La gráfica muestra el análisis estadístico de 5 experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por el test no paramétrico con corrección de Welch’s \pm S.D. *P <0.05. Fuente: Elaboración propia.

En cuanto Ciclina B1, para ambos genotipos celulares tiene una alta expresión en el tiempo 0h del ciclo celular y vuelve a expresarse significativamente en la hora 12h. Este resultado es esperado ya que Ciclina B1 es un marcador de fase G2/M, lo que nos indica que hay una alta eficiencia de sincronización con el método *shake off*. Junto a lo anterior, considerando que la Ciclina A es un marcador de fase S/G2, se puede observar que alcanza sus máximos niveles de expresión a la hora 12, sin ser significativamente distintas en las dos líneas celulares, por lo que su expresión no estaría siendo regulada por la presencia de SALL2. En cuanto a la expresión de la Ciclina D1, se ha descrito que se expresa a lo largo de todo el ciclo celular, así como se muestra en la Figura 12, donde se observa que mantiene constantes sus niveles de expresión en las distintas horas del ciclo celular analizadas. Sin embargo, en las células *Sall2* (-/-) muestran una expresión significativamente mayor a lo largo de todos los puntos evaluados. Consistente con lo anterior, se observa también el aumento de

la expresión de la Ciclina E1 mayoritariamente entre las 8-12h post-liberación, que correspondería a la transición del ciclo en la fase G1/S. Sin embargo, para las células *Sall2* (-/-), la carencia del factor de transcripción se traduce en un aumento significativo en la expresión de Ciclina E1 a lo largo de todas las horas evaluadas. Cabe mencionar que no fue posible detectar claramente Ciclina E1 en células *Sall2* (+/+) con el anticuerpo disponible, de manera que se realizaron otros experimentos para evaluar su expresión en células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-). Finalmente, se evaluó la expresión de la proteína p21, blanco transcripcional descrito de SALL2 (Li, 2004). En ambos genotipos se observa la expresión de p21 fuertemente a partir del t=4h post-liberación correspondiente a fase G1, sin embargo, en el t=12h donde aparentemente estaría ocurriendo la progresión hacia la fase de Síntesis, p21 disminuye drásticamente en células *Sall2* (-/-), lo que concuerda con la conocida regulación positiva de SALL2 sobre p21 en esta fase del ciclo celular, no observada en células deficientes de SALL2. En resumen, estos resultados sugieren que SALL2 tendría una función regulatoria en el ciclo celular; primeramente, porque SALL2 tiene una expresión dinámica en las primeras horas de progresión del ciclo, encontrándose ya expresado en fase G2/M y disminuyendo sus niveles hacia la entrada de G1. Posteriormente su expresión vuelve a aumentar hacia la transición G1/S. Además, existe una diferencia en la expresión de Ciclina D1 y E1, ya que en células *Sall2* (-/-) la expresión de estas Ciclinas aumenta significativamente. Sumado a esto, se observó una disminución de la proteína p21 en células *Sall2* (-/-) hacia la transición S del ciclo celular. De manera que una regulación de SALL2 sobre estos blancos transcripcionales hace suponer que SALL2 cumple una función durante la transición G1 a S del ciclo celular.

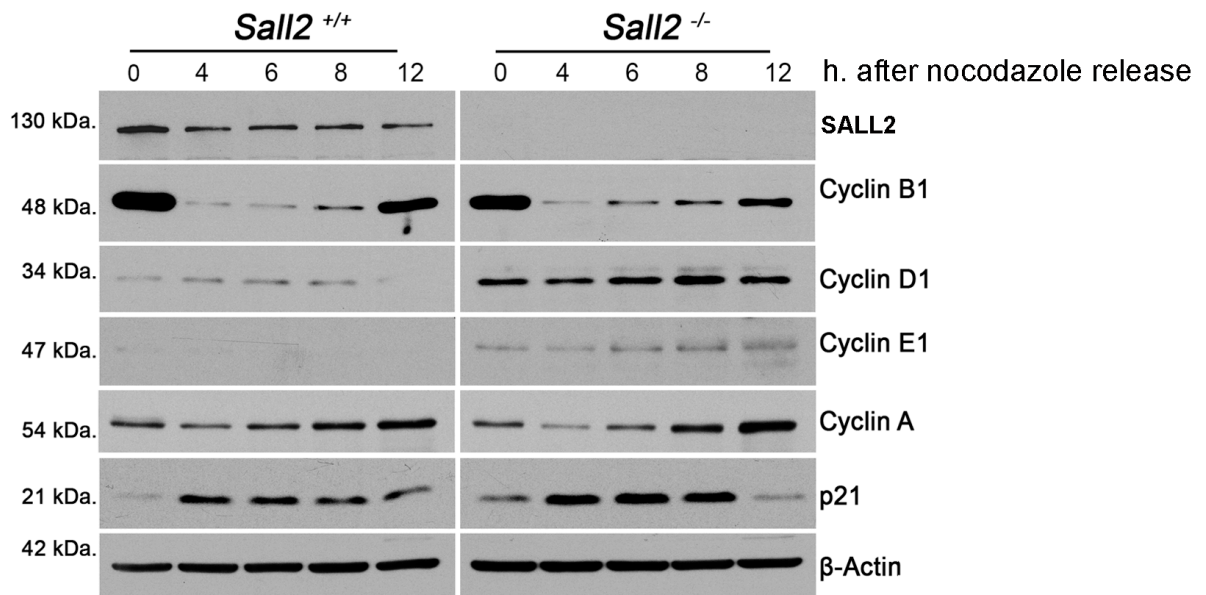


Figura 12. Deficiencia de *Sall2* es asociada al incremento en los niveles de marcadores de G1/S, Ciclina D1 y Ciclina E1. Células iMEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} se sincronizaron con Nocodazol y posteriormente se colectaron por “shake off”, para posteriormente ser reingresadas al ciclo celular con la estimulación de medio completo. Los lisados celulares fueron colectados a los tiempos indicados y las muestras posteriormente se analizaron mediante *Western Blot*. Resultado representativo de 5 experimentos independientes. Fuente: Elaboración propia.

Con el fin de profundizar en los cambios de los niveles de expresión de SALL2 observados durante el ciclo celular, se realizaron nuevamente experimentos de sincronización/liberación, colectando células para análisis de proteínas y de RNA. Figura 13 representa el análisis de los niveles de la proteína SALL2 de tres experimentos independientes. Como puede observar, nuevamente vemos la expresión dinámica de los niveles relativos de la proteína SALL2 en las primeras horas del ciclo celular, ya que se expresa en la hora 0h correspondiente a la fase G2/M, y posteriormente sus niveles decaen significativamente hacia la hora 4, donde las células están entrando a fase G1 temprana. Luego los niveles de SALL2 vuelven a aumentar modestamente hacia las 12 h donde las células progresan hacia la fase S (Figura 13).

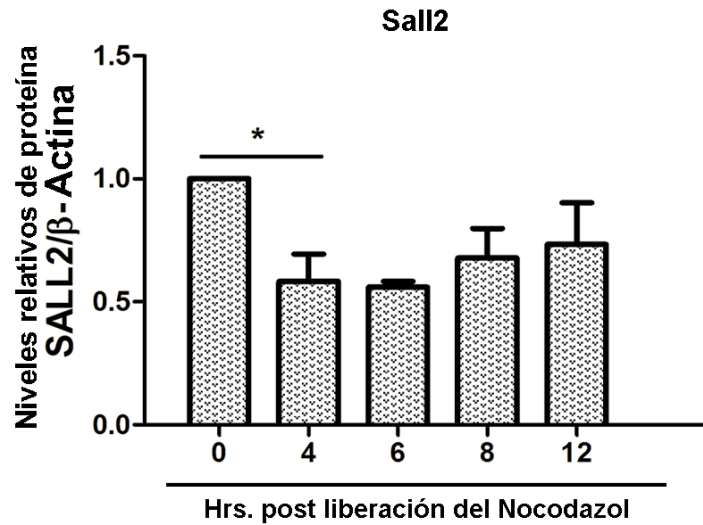


Figura 13. Expresión de SALL2 es diferenciada en la progresión del ciclo celular.

Los lisados celulares fueron colectados a las horas indicadas y posteriormente los niveles de SALL2 analizados por *Western Blot*. Densitometría de los niveles de proteína SALL2 utilizando el programa ImageJ de 3 experimentos independientes. La cantidad de cada proteína detectada por *Western blot* se normalizó por la cantidad de proteína Actina para cada condición de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a los niveles de ARNm de *Sall2*, se cuantificaron a través de PCR en tiempo real. Como se observa en la Figura 14, el ARN mensajero de *Sall2* tiene una dinámica de expresión similar a la de proteína vista anteriormente, donde se observa una alta expresión de *Sall2* en t=0 (correspondiente a G2/M). Luego los niveles del mensajero disminuyen rápidamente en las primeras horas del progreso y vuelven a aumentar hacia G1/S (t= 8-12 horas). El patrón de mRNA de *Sall2* es muy similar al patrón de la proteína, lo que sugiere una regulación de tipo transcripcional.

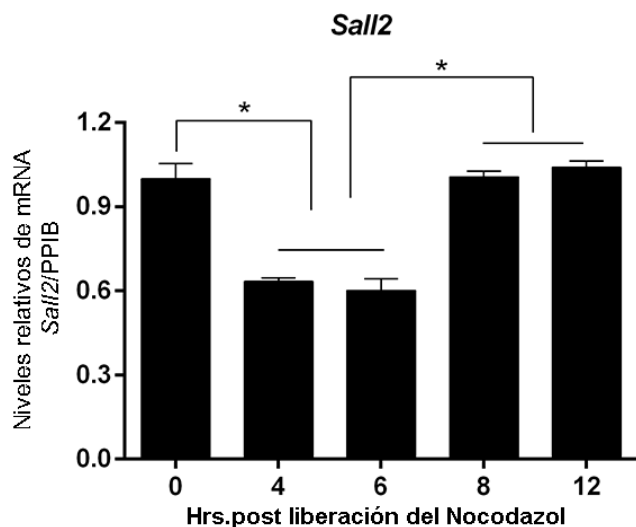


Figura 14. Los niveles de mRNA de *Sall2* son regulados de manera dependiente del ciclo celular. MEF *Sall2* *+/+* fueron sincronizadas por incubación con Nocodazol 125 μ M por 16h para generar el bloqueo mitótico. Las células fueron colectadas por agitación suave (“*mitotic shake-off*”), re- plaqueadas y liberadas al ciclo celular por adición de medio completo. Las células fueron colectadas a las 0, 4, 6, 8, y 12 h y posteriormente los niveles de mRNA fueron evaluados por PCR cuantitativo (qPCR) relativo a *PPIB*. En la cuantificación relativa, los niveles de mRNA al tiempo 0 h fueron definidos como 1. Los valores representan el promedio de la medición de tres experimentos independientes en triplicados. La significancia estadística fue determinada por el test no paramétrico, cada barra de error representa una significancia \pm S.D. *P <0.05. Fuente: Elaboración propia.

8.1.4 Evaluación del efecto de la deficiencia de *Sall2* en genes reguladores del ciclo celular.

El análisis de marcadores del ciclo celular evidencia diferencias en los niveles de Ciclinas E y D, los que estarían aumentados en células deficientes de *Sall2*. Con el fin de determinar una posible regulación transcripcional de estas Ciclinas mediada por *Sall2*, se procedió a evaluar sus niveles de mRNA a través de Q-PCR. Para esto,

nuevamente las células iMEF *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) se sincronizaron en G2/M con Nocodazol 125 ug/ mL durante 16 horas. Luego de seleccionar las células mitóticas mediante *shake off*, se liberaron al ciclo celular y aisló ARN post-liberación al tiempo 0, 4, 6, 8 y 12 horas. En primer lugar, para corroborar la correcta sincronización de las células en fase G2/M, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de Ciclina B1 (Figura suplementaria 2), ya que esta Ciclina se activa y aumenta sus niveles durante la fase G2 temprana, promoviendo la condensación cromosómica y el ensamblaje del huso mitótico, impulsando así la progresión celular hasta la metafase (Malumbres & Barbacid, 2009; Sherr et al., 2004). A veinte años de su descubrimiento, la Ciclina E sigue siendo foco obligado de estudio en el ciclo celular, ya que su sobreexpresión ha sido vinculada con el aumento de la agresividad tumoral (Hwang. HC & Clurman. BE, 2005). Es por este motivo que primero se evaluó la expresión de ARNm de las Ciclinas tipo E (Ciclina E1 y Ciclina E2), ya que ambas son a menudo reguladas de forma coordinada, comparten una fuerte similitud de secuencia en zonas funcionales, incluyendo el motivo “*cyclin box*” de unión a las subunidades reguladoras y la secuencia de localización centrosomal (Hwang & Clurman, 2005).

Como se observa en la Figura 15, la dinámica de variación de los niveles de proteínas de Ciclina E1 vista anteriormente (Figura 12) es similar a la de ARNm, con tendencia a ir en aumentando, alcanzando una mayor expresión entre las 8 - 12 horas donde normalmente estaría transcurriendo la fase G1/S. Sin embargo, tanto para la expresión relativa (Figura 15.A), como la expresión absoluta de los transcritos de ARNm de Ciclina E1 (Figura 15.B), es significativamente mayor que en células *Sall2* (-/-), teniendo diferencias más pronunciadas entre las 4 - 8 horas. Un patrón similar de expresión ocurre para la Ciclina E2, sin embargo, en este caso las células iMEFs *Sall2* (+/+) presentan una mayor expresión relativa (Figura 16) a lo largo del ciclo celular. Estos resultados apoyan la noción de que ambas proteínas, si bien exhiben una expresión solapada en el ciclo celular, su expresión transcripcional esta mediada por regulación independiente que pueden llevarlas a no tener roles equivalentes.

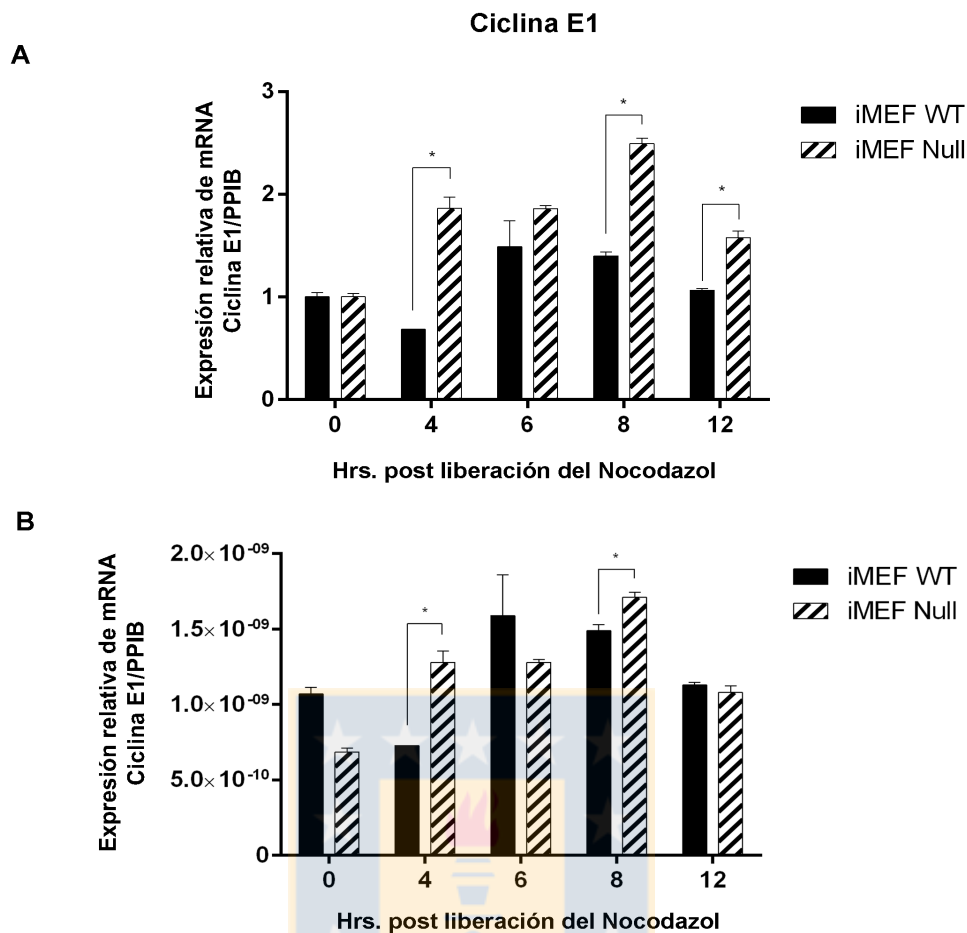


Figura 15. Deficiencia de *Sall2* induce una rápida entrada a G1/S asociada a un incremento en los niveles de Ciclina E1. iMEFs *Sall2* +/+ y -/- iMEFs fueron sincronizadas por incubación con Nocodazol 125 μ M por 16h para generar bloqueo mitótico. Células mitóticas fueron colectadas por agitación suave (“*mitotic shake-off*”), re- plaqueadas y liberadas hacia el ciclo celular con la adición de medio completo. Los lisados fueron colectados a las 0, 4, 6, 8, y 12 h posterior a la liberación. Las muestras fueron medidas mediante PCR cuantitativo (qPCR) relativo a PPIB. Los niveles relativos (**A**) y absolutos (**B**) de mRNA de Ciclina E1 incrementan durante la progresión del ciclo celular y se vuelve significativamente mayor en las 4 y 12 h en células *Sall2* -/-. En la cuantificación relativa, los niveles normalizados de mRNA al tiempo 0 h fueron definidos como 1. Los valores en triplicado son representativos de dos experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por test no paramétrico, cada barra de error tienen significancia \pm S.D. *P <0.05. Fuente: Elaboración propia.

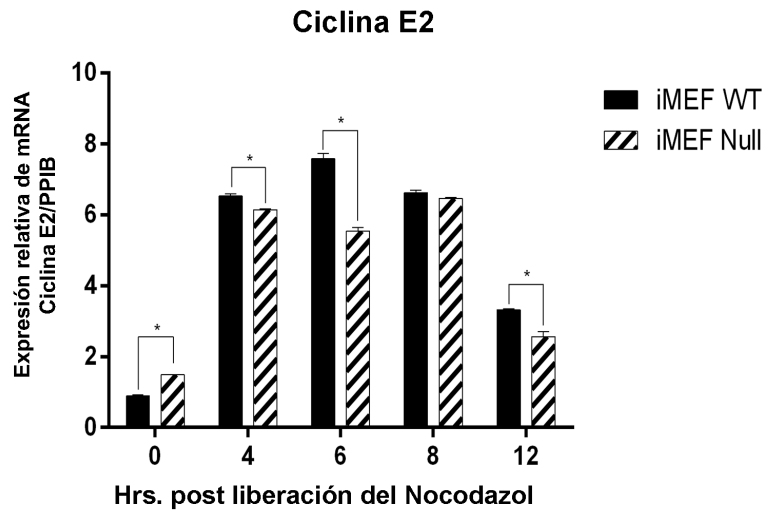


Figura 16: Deficiencia de *Sall2* es asociada con la disminución de los niveles del marcador G1/S Ciclina E2. iMEFs *Sall2* +/+ y -/- iMEFs fueron sincronizadas por incubación con Nocodazol 125 Mm por 16h para generar bloqueo mitótico. Células mitóticas fueron colectadas por agitación suave (“*mitotic shake-off*”), re- plaqueadas y liberadas hacia el ciclo celular con la adición de medio completo. Los lisados fueron colectados a las 0, 4, 6, 8, y 12 h posterior a la liberación. Las muestras fueron medidas mediante PCR cuantitativo (qPCR) relativo a PPIB. Los niveles relativos de mRNA de Ciclina E2 son menores a lo largo del ciclo celular en células *Sall2 null*. En la cuantificación relativa, los niveles normalizados de mRNA al tiempo 0 h fueron definidos como 1. Los valores en triplicado son representativos de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por test no paramétrico, cada barra de error tienen significancia \pm S.D. *P < 0.05. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, fueron evaluados de la misma manera los transcritos de las proteínas reguladoras maestras de la entrada al ciclo celular, las Ciclinas tipo D (Ciclina D1 y Ciclina D2). Como se muestra en la Figura 17.A, para la expresión relativa de los transcritos de ARNm tanto para células *Sall2* (+/+) como *Sall2* (-/-), existe la misma dinámica de aumento en la expresión una vez que las células son liberadas al ciclo celular desde la mitosis. Este aumento alcanza sus niveles más altos durante las primeras horas el ciclo, en fase G1 temprana (4-6 horas), y posteriormente los niveles

decaen hacia la entrada de fase S. Sin embargo, si consideramos los valores de expresión absolutos de ARNm para ambos genotipos (Figura 17.B), en las células *Sall2* (-/-) la expresión de los transcritos es significativamente mayor en todas las horas evaluadas. En el caso de la Ciclina D2, tiene un patrón de expresión diferente a Ciclina D1, teniendo sus niveles más aumentados en la fase mitótica y luego decaen a medida progresa el ciclo celular (Figura 18). Esto nos corrobora que ambas Ciclinas tienen una expresión coordinada y redundante en la misma fase del ciclo. Sin embargo, nuevamente se encontró la tendencia a que en células *Sall2* deficientes, un aumento significativo de la expresión en $t=6h$ de los transcritos tanto para Ciclina D1 como D2.

En resumen, el conjunto de estos resultados nos sugiere que el factor de transcripción SALL2, tendría un rol relevante en la regulación del ciclo celular, específicamente, SALL2 podría regular de forma negativa la expresión de Ciclinas tipo D1 y E1.



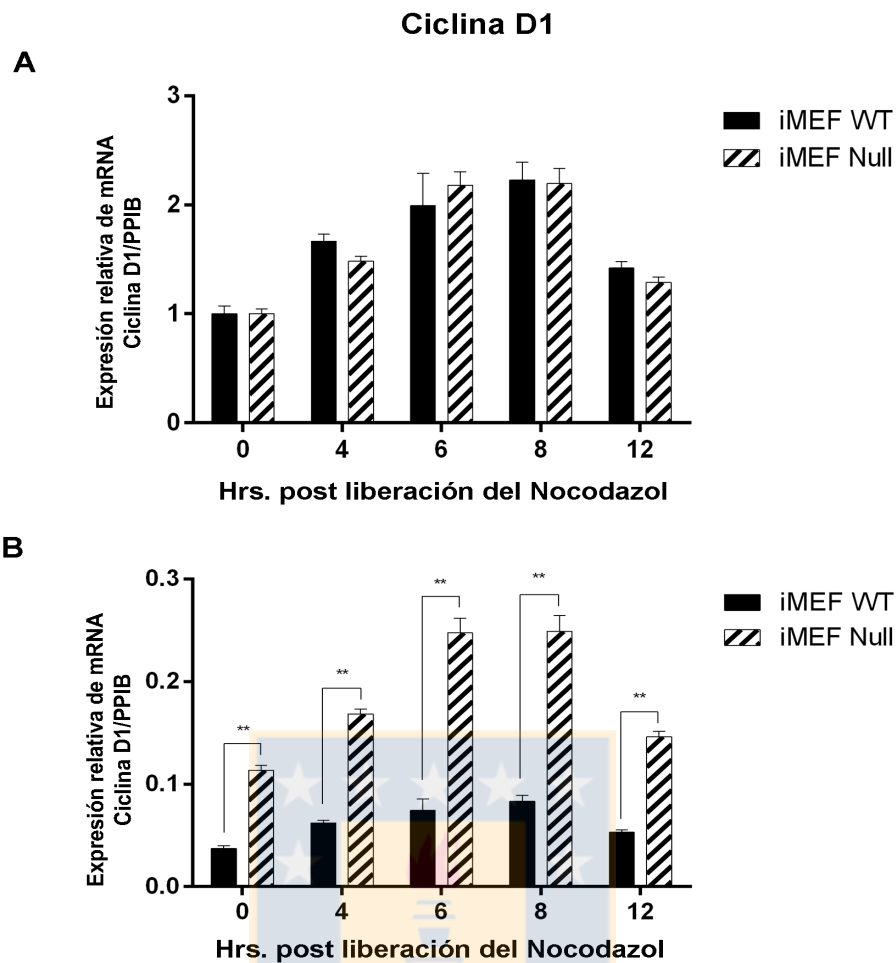


Figura 17. Deficiencia de *Sall2* induce una rápida entrada a G1/S asociada a un incremento en los niveles de Ciclina D1. iMEFs *Sall2* +/+ y -/- iMEFs fueron sincronizadas por incubación con Nocodazol 125 μ M por 16h para generar bloqueo mitótico. Células mitóticas fueron colectadas por agitación suave (“*mitotic shake-off*”), re- plaqueadas y liberadas hacia el ciclo celular con la adición de medio completo. Los lisados fueron colectados a las 0, 4, 6, 8, y 12 h posterior a la liberación. Las muestras fueron medidas mediante PCR cuantitativo (qPCR) relativo a PPIB. Los niveles relativos (A) y absolutos (B) de mRNA de Ciclina D1 incrementan durante la progresión del ciclo celular y son significativamente mayor en toda la progresión del ciclo celular. En la cuantificación relativa, los niveles normalizados de mRNA al tiempo 0 h fueron definidos como 1. Los valores en triplicado son representativos de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por test no paramétrico, cada barra de error tienen significancia \pm S.D. *P < 0.05. Fuente: Elaboración propia.

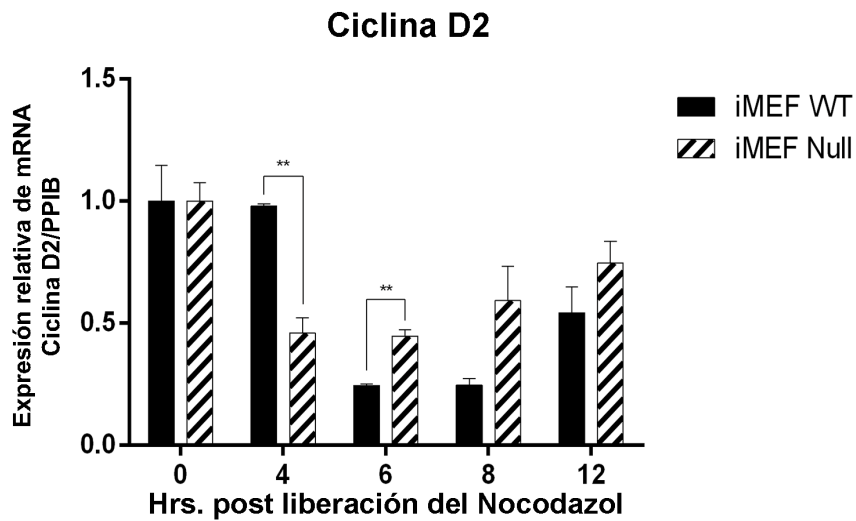


Figura 18. Deficiencia de *Sall2* modifica modestamente los niveles de mRNA del marcador de G1/S Ciclina D2. iMEFs *Sall2* +/+ y -/- iMEFs fueron sincronizadas por incubación con Nocodazol 125 μ M por 16h para generar bloqueo mitótico. Células mitóticas fueron colectadas por agitación suave (*mitotic shake-off*), re-plaqueadas y liberadas hacia el ciclo celular con la adición de medio completo. Los lisados fueron colectados a las 0, 4, 6, 8, y 12 h posterior a la liberación. Las muestras fueron medidas mediante PCR cuantitativo (qPCR) relativo a PPIB. Ambas líneas celulares exhiben similares veces de cambio de los niveles relativos de mRNA de Ciclina D2 durante la progresión del ciclo celular. En la cuantificación relativa, los niveles normalizados de mRNA al tiempo 0 h fueron definidos como 1. Los valores en triplicado son representativos de dos experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por test no paramétrico, cada barra de error tienen significancia \pm S.D. *P <0.05. Fuente: Elaboración propia.

8.2 Objetivo específico nº 2: Analizar el efecto de Sall2 sobre la actividad transcripcional de Ciclina E1.

8.2.1 Sall2 disminuye la actividad del promotor de Ciclina E1

Considerando que para los ensayos de luciferasa se utilizaron constructos de SALL2 humano (*hSALL-E1*) para evaluar la actividad promotora del gen de Ciclina E1 de ratón (*CCNE1*), primero se procedió a evaluar la similitud de secuencia entre el promotor de Ciclina E humano y de ratón. La Figura 19 muestra un alineamiento realizado con la herramienta bioinformática CLUSTAL 2.1, de las secuencias promotoras de Ciclina E1 humana y de ratón disponibles en la base de datos “*The Eukaryotic Promoter Database*” (EPD). Como se observa en esta Figura, ambas secuencias están altamente conservadas (79%) y basados en la secuencia consenso de unión al ADN identificada para Sall2 (Gu *et al.*, 2011; Li *et al.* 2004), estas comparten sitios putativos de unión al factor de transcripción.

Debido a que previamente se identificaron potenciales sitios de unión a SALL2 en el promotor del gen *CCNE1* que codifican para la Ciclina E1, sumado al hecho que la deficiencia de *Sall2* genera una inducción de los niveles de ARNm y de proteína de Ciclina E1 en el ciclo celular en las células MEF *Sall2* (-/-) comparado con las *Sall2* (+/+), es que se decidió evaluar si SALL podría regular la actividad del promotor de Ciclina E1. Para realizar este experimento, se utilizó el vector PGL2- *CCNE1* (*Addgene* #8458:10-4), el cual contiene 1400 nucleótidos de la secuencia promotora del gen *CCNE1* humano, donde están incluidos los 5 sitios putativos de unión a SALL2 y está unido al gen de luciferasa. Además, se utilizaron secuencias codificantes de SALL2 fusionadas en su extremo carboxilo terminal a la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP), para facilitar la determinación de su correcta expresión a través de microscopía de fluorescencia. Luego se procedió a evaluar si *Sall2* de ratón (Isoforma E1, E1A) y/o SALL2 humano (*HSALL2E1*) generan cambios en la actividad del promotor de *CCNE1*.

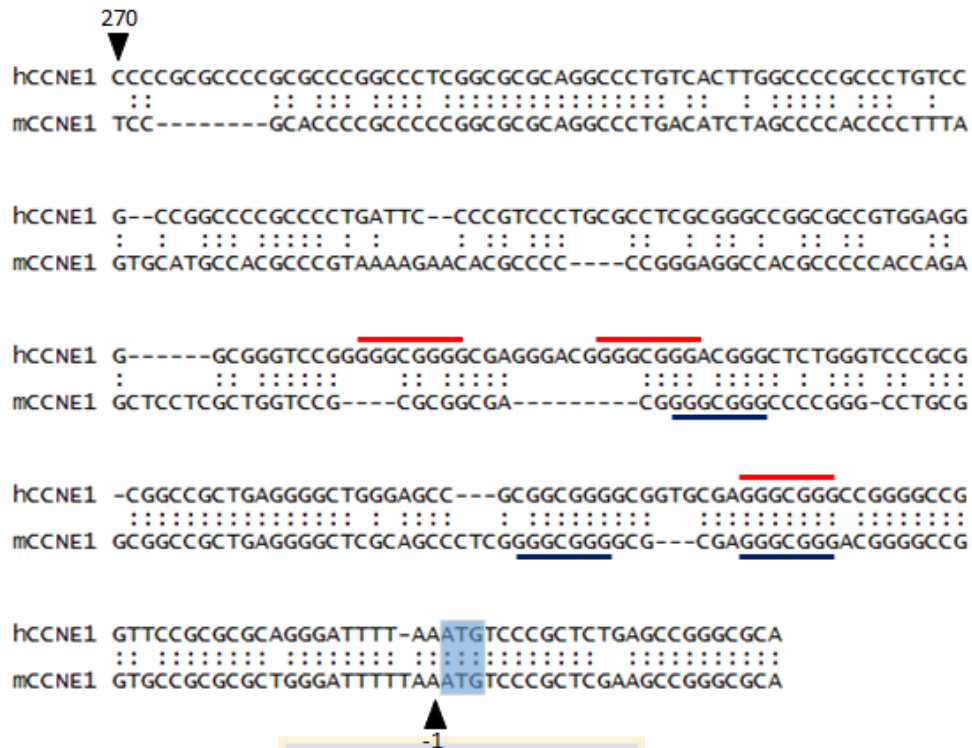


Figura 19. Alineamiento de secuencia de promotores de Cyclina E1 humana y de ratón. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos “*The Eukaryotic Promoter Database*” (EPD) y el alineamiento se realizó con la herramienta bioinformática CLUSTAL 2.1. Fuente: Elaboración propia.

Para corroborar la eficiencia de transfección y la correcta expresión del vector SALL2, se tomaron fotografías de microscopía de fluorescencia (Figura 20. A). La Figura 20.B, muestra la actividad luciferasa de las células HEK transfectadas con los diferentes vectores, graficada respecto a la actividad del vector pGL3-Basic.

Como muestra la Figura 20.B, se puede observar que la actividad transcripcional del promotor de Cyclina E1 humana es fuertemente reprimida en presencia de los tres constructos de *SalI2*, y que la disminución en la actividad promotora corresponde a una represión aproximada de 60 veces con respecto a la actividad del vector pGL2-CCNE1. Estos resultados sugieren que *SalI2* regula negativamente la actividad transcripcional del promotor de Cyclina E1 humana.

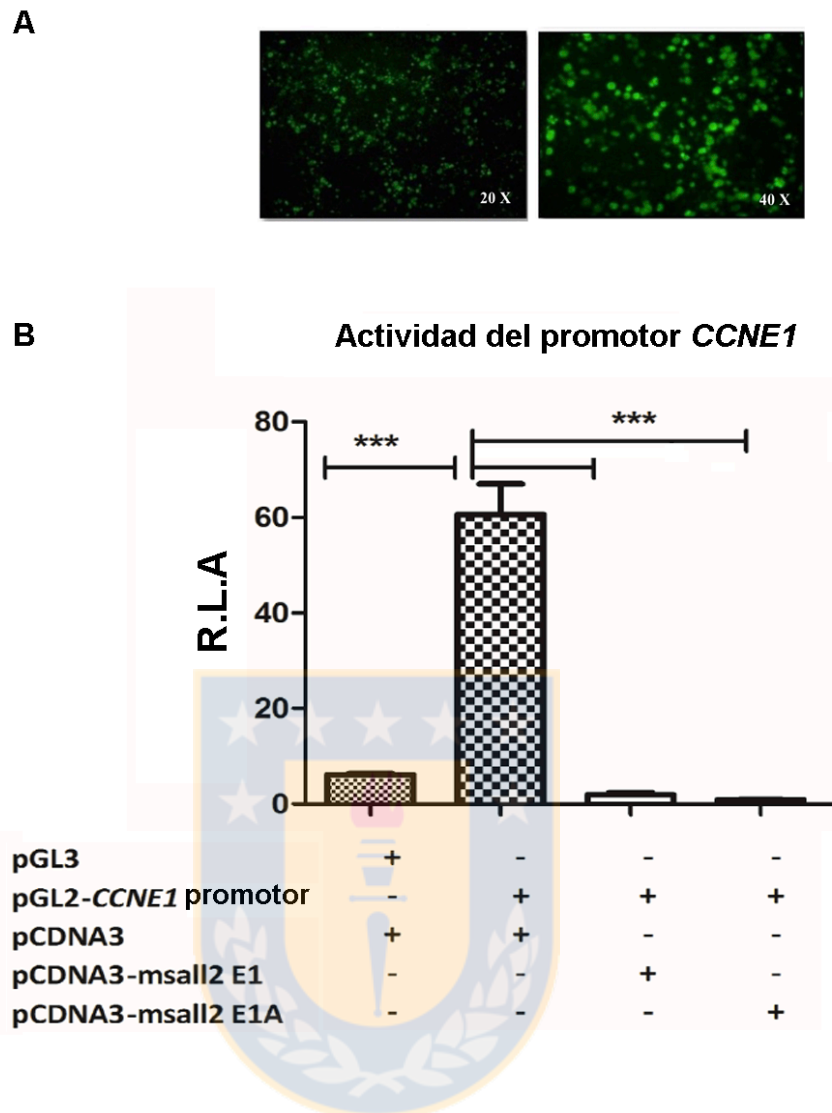
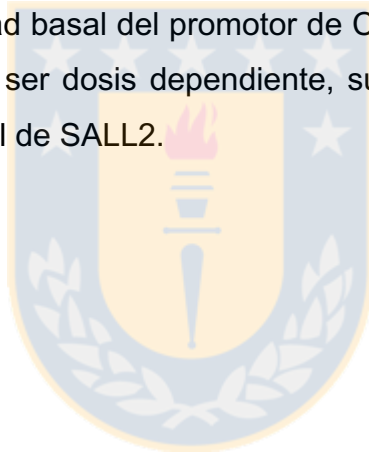


Figura 20: Actividad del promotor de *CCNE1* es negativamente regulado por *Sall2*. Se transfectaron células HEK 293T con el vector RSV β -Gal, pGL3 Basic, pGL2- *CCNE1*, PCDNA3, PCDNA3- *mSall2* E1, PCDNA3- *mSall2* E1A y PCDNA3- *mSall2* E1 (1000 ng), según corresponda. **(A)** Fotografías representativas de microscopía de fluorescencia (20X y 40X), mostrando la expresión de *Sall2* E1A-GFP. **(B)** Actividad relativa del promotor de *CCNE1* (Addgene #8458) co-transfectando con el vector vacío. Fuente: Elaboración propia.

Una vez que se corroboró la represión de la actividad promotora del gen de Ciclina E1 por SALL22, se realizó nuevamente un ensayo de reportero luciferasa, para evaluar si el efecto en el promotor es concentración- dependiente (PCDNA3- mSall2 E1A). Como se aprecia en la Figura 21.A, la actividad del promotor CCNE1 de ratón con respecto al control pGL3 disminuye significativamente al co-transfectar con 100 ng de *Sall2*-E1A. Esta misma tendencia se puede analizar, pero comparando la disminución de la actividad transcripcional en cada condición con respecto a la actividad basal del promotor, donde se observa que el promotor CCNE1 de ratón tiene una actividad aproximadamente 10 veces mayor a la del vector pGL3 vacío, y que al cotransfectarse con cantidades iguales o superiores a 100 ng de *Sall2*-E1A, la actividad luciferasa disminuye significativamente (Figura 21.B). Por lo tanto, estos resultados indican que SALL2 disminuye la actividad basal del promotor de Ciclina E1 (CCNE1) y a partir de los 100 ng de *Sall2* podría ser dosis dependiente, sugiriendo que Ciclina E1 es un nuevo blanco transcripcional de SALL2.



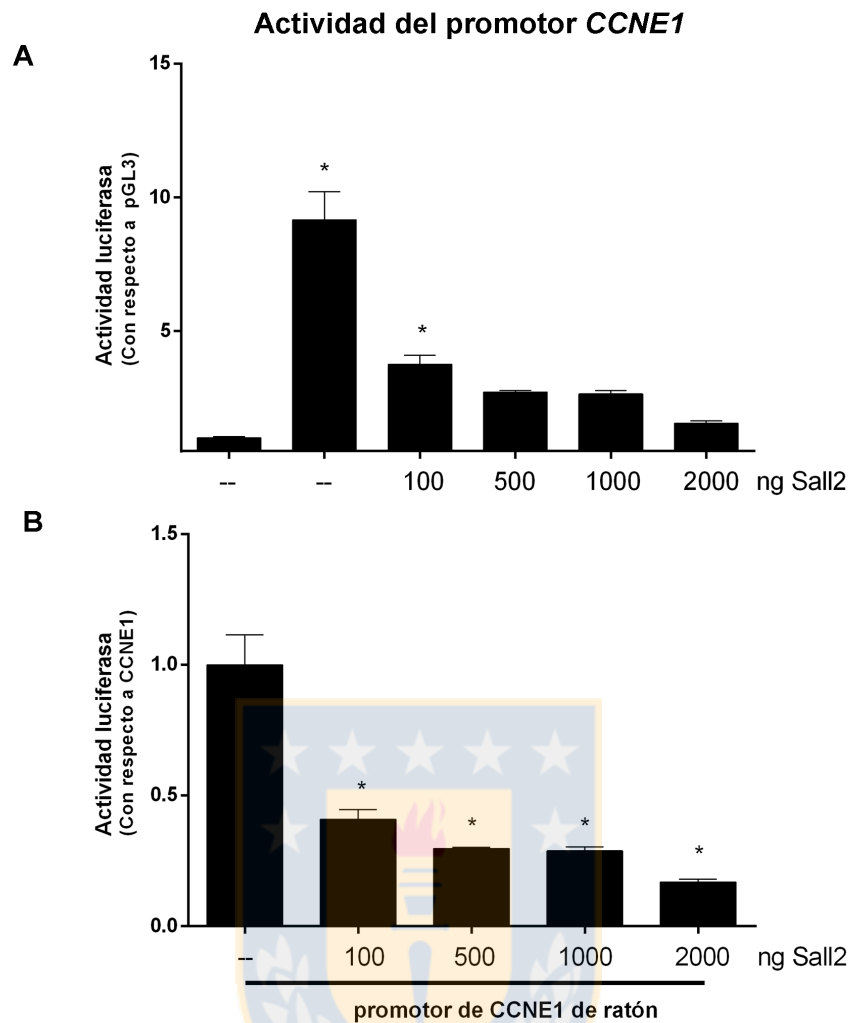


Figura 21. Actividad del promotor de *CCNE1* es negativamente regulado por *SALL2* de manera dosis dependiente. Se transfectó células HEK 293T con el vector RSV β -Gal, pGL3 Basic y con cantidades crecientes de PCDNA3- m*Sall2* E1A **(A)** Actividad relativa del promotor de *CCNE1* (Addgene #8458) cotransfectado con el vector vacío o con concentraciones crecientes de constructos codificantes de *SALL2* de ratón en células HEK 293T. Actividad determinada con respecto al control pGL3 y **(B)** con respecto al promotor *CCNE1*. Cada condición fue realizada por triplicado y se normalizó la actividad luciferasa por la actividad del reportero β -Galactosidasa. La significancia estadística fue determinada con prueba T de Student con la corrección de Welch * $p < 0.05$. Fuente: Elaboración propia.

8.3 Objetivo 2. Realizar análisis in Silico para correlacionar el efecto regulatorio de SALL2 sobre Ciclina E.

8.3.1 Correlacionar expresión de SALL2 y Ciclina E en cáncer.

La Ciclina E1 es una proteína bien caracterizada a la fecha y se conoce que su sobreexpresión, especialmente la forma hiperestable, permite el incremento en la incidencia de neoplasias (Bortner, 1997; Loeb *et al.* 2005; Ma *et al.* 2007), y en la susceptibilidad de otros oncogenes (Loeb *et al.* 2005). Considerando que nuestros resultados previos muestran que, bajo un contexto celular normal, células iMEFs *Sall2* deficientes muestran un incremento significativo de Ciclina E1 en la fase G1/S, se quiso determinar si la sobreexpresión de Ciclina E1 está correlacionada con la reducción de la expresión de *Sall2* en muestras tumorales. Para esto se accedió a la plataforma virtual R2: Plataforma de Análisis y visualización Genómica (<http://r2.amc.nl> <http://r2platform.com>). R2 le permite realizar todo tipo de análisis basados en un conjunto de secuenciaciones masivas. R2 contiene los datos anotados de los perfiles de expresión de mRNA para más de 70.000 muestras humanas individuales. De esta manera, R2 permite calcular la correlación de la expresión de *Sall2* con la expresión de un único gen (Ej. *CCNE1*), basado en el conjunto de datos actuales de secuenciación masiva disponibles en la plataforma.

De esta manera, se analizó la expresión diferencial de *SALL2* y Ciclina E1 en los distintos estudios de cáncer disponibles, donde se consideraron solo los estudios donde las muestras de pacientes no hayan sido intervenidos con drogas. Como muestra la Tabla 1, de todos los estudios disponibles, fueron seleccionados los cánceres que mostraban correlación negativa entre la expresión de *SALL2* y Ciclina E1. En paralelo, considerando que nuestros análisis previos mostraban una variación importante de los niveles de mRNA de Ciclina D1 en ausencia de *SALL2* en células iMEFs, también se realizó el mismo estudio con respecto a la expresión de *Sall2* y Ciclina D1 (Tabla 3 – Anexos).

Tabla 1. Análisis de correlación negativa entre la expresión de mRNA de SALL2 y Ciclina E1 en diversos estudios de cáncer. Datos obtenidos de análisis de secuenciación masiva disponibles en la plataforma r2.amc.nl. Fuente: Elaboración propia.

Tipo de Cáncer	r	p Value	n	GEO ID
Cáncer cervical	-0.440	4.0e-03	41	GSE7803
Cáncer cervical	-0.393	1.1e-03	66	GSE9750
Glioblastoma	-0.410	2.0e-05	101	GSE4536
Glioblastoma	-0.486	3.1e-07	100	GS34271
Leucemia	-0.373	4.6e-03	56	GSE4228
Leucemia	-0.026	0.24	2004	GSE13159
Leucemia	-0.056	0.20	525	GSE14468
Linfoma	-0.213	1.7e-03	215	GSE4475
Linfoma	-0.203	5.5e-04	287	GSE23120
Linfoma	-0.579	3.3e-04	34	GSE34771
Osteosarcoma	0.507	0.02	20	GSE14359
Tumor Vejiga	-0.016	0.90	60	GSE3167
Cáncer Ovario	-0.081	0.06	527	GSE68661
Cáncer Ovario	-0.313	0.04	45	GSE38666
Cáncer	-0.441	1.9e-03	47	GSE17891
Cáncer de mama	-0.494	8.0e-17	251	GSE3494
Cáncer de mama	-0.322	6.3e-10	351	GSE2109
Cáncer de mama	-0.407	4.9e-12	262	GSE 21653
Cáncer de mama	-0.349	1.3e-09	286	GSE2034
Tumor de C6lon	-0.275	3.4e-08	390	GSE 41258
Tumor de C6lon	-0.267	1.5e-06	315	GSE2109
Tumor de C6lon	-0.299	5.5e-04	130	GSE37892
Tumor de H6gado	-0.198	1.3e-03	261	GSE2109
Tumor de H6gado	0.262	0.01	90	GSE 15765
Tumor de Pulm6n	-0.439	7.5e-03	36	GSE 14018
Tumor de Pulm6n	-0.280	4.8e-03	100	GSE 33532
Tumor de Pulm6n	-0.255	1.6e-03	150	GSE43580
Tumor de Sarcoma	0.220	0.02	117	GSE 17679
Tumor de Tiroide	-0.340	0.05	34	GSE2109
Tumor de Wilms	-0.162	0.05	144	GSE10320

Una vez obtenidos estos datos, se procedió a realizar scatter plots de correlación basados en la expresión de *SALL2* con respecto a la expresión de *CCNE1*, de aquellos cánceres donde se encontró la mayor significancia estadística de correlación negativa. Estos incluyen Glioblastoma multiforme (GBM), Carcinoma de mama invasivo (BRCA), Carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC) y Cáncer de colon (HCC) (Li et al., 2001) (Figura 22).

Los gráficos resultantes representan la expresión de ambos genes analizados, cuya línea de tendencia corrobora la correlación negativa del conjunto de datos. Para poder contar con un indicador que nos permita establecer la correlación conjunta de dos variables, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r), que es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Para el caso de las correlaciones negativas, se establece que cuando $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa. Si $r = -1$, existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada *relación inversa*: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante. Además, para determinar si los resultados son estadísticamente significativos, se utilizó un p – Value (p) asociado al nivel de significancia menor a 0,05.

Como se observa en la Figura 22, en el caso del primer grupo de análisis que corresponde a 251 muestras biológicas de tumores derivadas de una cohorte de mujeres con distintos grados de Cáncer de mama (BRCA –GSE3494), exhiben una alta correlación negativa entre la expresión de *SALL2* y *CCNE1*, alcanzando un valor $r = -0.494$ y un $p = 8.0e-17$. Para el caso del análisis en Cáncer de pulmón (LUSC – GSE43580), las muestras corresponden a 151 tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas (adenocarcinoma, AC y carcinoma de células escamosas, SCC) en fase I y II. Como muestra la Figura 22.B, la correlación negativa alcanza un valor de $r = -0.494$ y un $p = 1.6e-03$. Para el tercer grupo de estudio (Figura 22.C), se realizó la correlación de 540 muestras obtenidas de pacientes con tumores de Glioblastoma (Base de datos no disponible en GSE ID). En este caso también es posible observar que en comparación con la expresión de *SALL2*, *CCNE1* tiene una expresión tan

elevada que la correlación negativa alcanza el valor de $r = -0.117$ y un $p = 6.3e-03$. Finalmente, el último grupo de estudio ($n=390$) corresponde a muestras biológicas obtenidas de pacientes con diversas neoplasias de colon, como: adenocarcinomas de colon primario, adenomas y metástasis en las mucosas (GSE41258). El análisis indica una alta correlación negativa en la expresión de *SALL2* y *CCNE1*, obteniendo valores de $r = -0.275$ y $p = 3.4e-8$.

A modo de complementar esta información, se realizó una búsqueda informática sobre la expresión de las proteínas *SALL2* y Ciclina E1 en tejidos de los cánceres estudiados previamente. Para estos efectos, se consultó en la base de datos *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>), que contiene información para una gran mayoría de los genes codificadores de proteínas humanas. En este caso, se centró la búsqueda en tejido de cáncer de colon, cáncer de mama, Glioblastoma y cáncer de pulmón. Fue posible notar que en muestras biológicas de todos los cánceres analizados, también existe correlación negativa entre *SALL2* y Ciclina E1, viéndose esto demostrado mediante la fuerte tinción inmunohistoquímica para Ciclina E1 en comparación con la baja expresión de *SALL2*. Cabe destacar que, las muestras de tejidos corresponden a distintos pacientes, por lo que un análisis más representativo de este estudio correspondería a tejidos de un mismo paciente, donde se pudiera analizar la expresión de la proteína *Sall2* y *CCNE1* en la misma muestra tumoral.

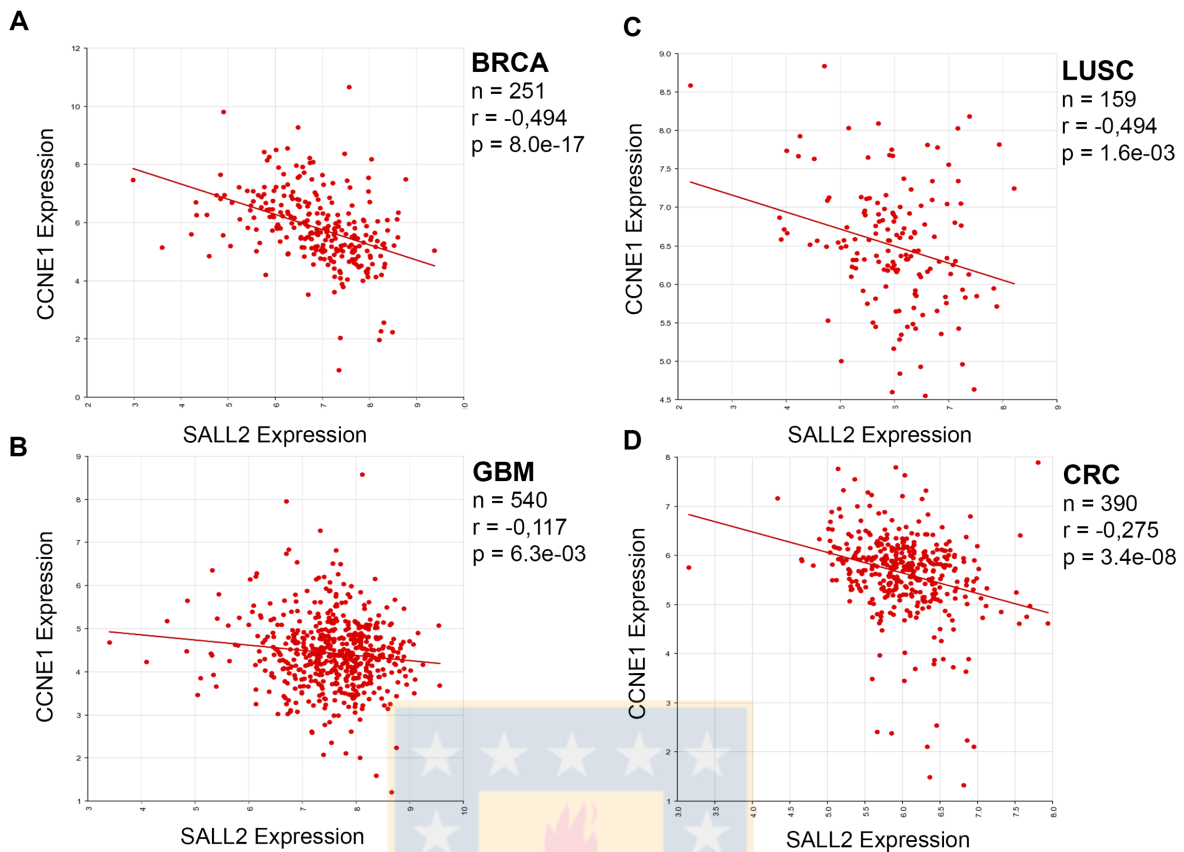


Figura 22: Scatterplots de correlación inversa de SALL2 y CCNE1 en diversas muestras de cáncer del servidor R2 (A) Perfil de expresión génica de 251 muestras de cáncer de mama en distintos grados del tumor. Base de datos corresponde a GEO ID: GSE3494. **(B)** Perfil de expresión transcripcional por Array de muestras de cáncer de Pulmón en distintos grados del tumor, correspondientes a 151 pacientes. Base de datos corresponde GEO ID: GSE43580 **(C)** Perfil de expresión génica de 540 muestras de Glioblastoma. Base de datos corresponde no disponible en GEO ID. **(D)** Perfil de expresión de 390 muestras de diversas muestras de cáncer de Colon en distintas fases de malignidad. Base de datos corresponde a GEO ID: GSE41258. n = número de muestras; R = coeficiente de correlación de Pearson; p= valor p de la correlación. Fuente: Elaboración propia.

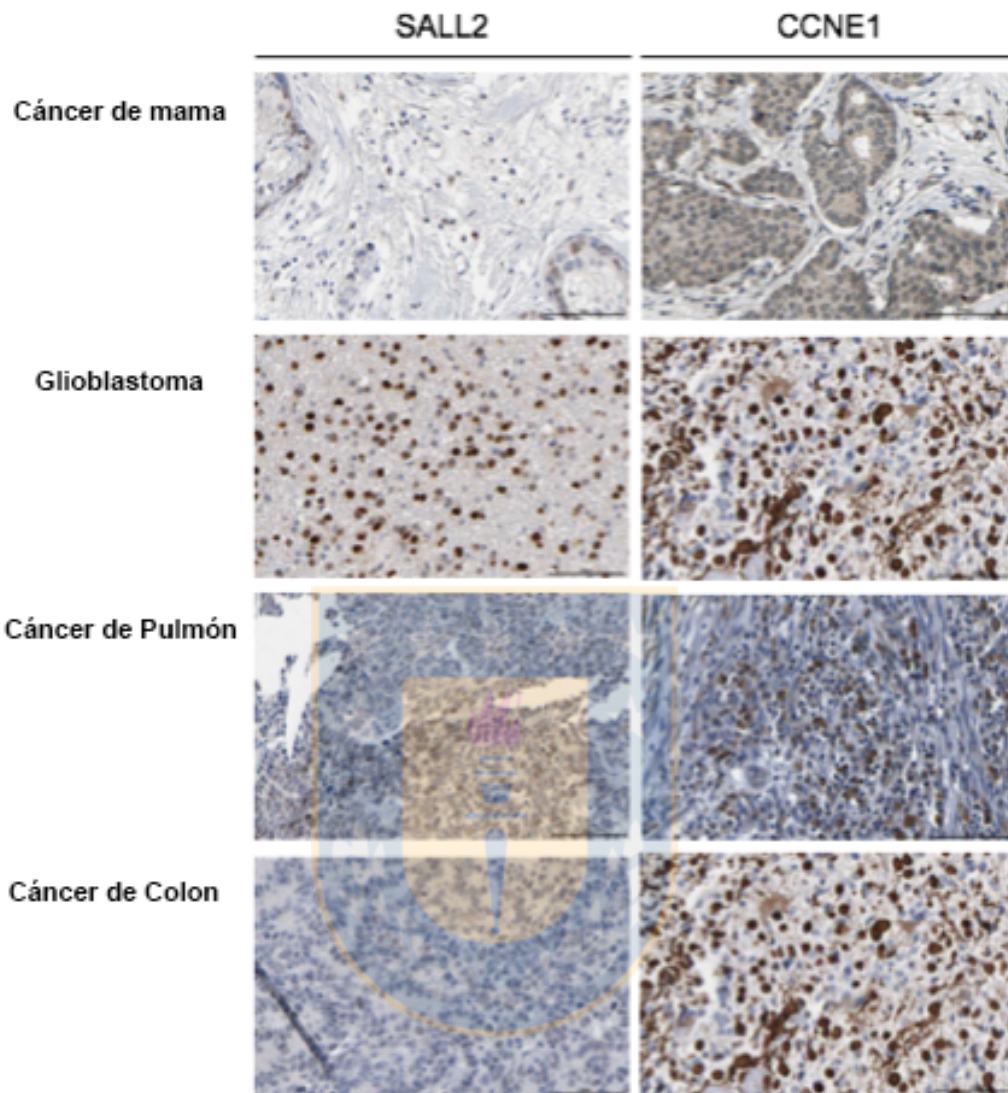


Figura 23: Proteína SALL2 presenta baja expresión en cortes histológicos con respecto a la expresión de Ciclina E1 en muestras de cáncer de Mama, Colon, Pulmón y Glioblastoma humano. Análisis de expresión inmunohistoquímica de SALL2 y Ciclina E1 en diversas muestras de cáncer disponibles en el servidor Human Protein Atlas. Al costado de cada imagen se visualiza la información correspondiente a cada corte histológico; edad del paciente, sexo, tipo de tumor y su grado de malignidad, finalmente la localización de la tinción (Nuclear o citosólica). Fuente: Elaboración propia.

Debido a que a lo largo de estos primeros análisis se encontró que el cáncer de mama presentaba diferencias más significativas de expresión de ambos genes, se focalizó el estudio más exhaustivo solo en este tipo de cáncer. Para esto, nuevamente se seleccionaron 3 experimentos independientes de Cáncer de mama disponibles en la base de datos R2, a modo de analizar si la correlación negativa entre Sall2 y Ciclina E1 es transversal en distintos estudios.

Como es posible ver en la Figura 24, este tipo de tumores de mama exhibe una alta significancia de correlación negativa entre la expresión de SALL2 y CCNE1, encontrándose correlaciones inversas de similar magnitud. En el caso del primer grupo de análisis (GSE3494), exhiben una alta correlación negativa con un valor $r = -0.494$ y un $p = 8.0e-17$ (Figura 24.A). Para grupo de análisis (GSE2109), la correlación negativa es de un $r = -0.322$ y un $p = 6.3e-10$ (Figura 24.B). Finalmente, las muestras correspondientes a grupo de análisis (GSE2034), de cáncer de mama metastásico, presentan una alta correlación negativa de expresión, obteniendo un valor de un $r = -0.349$ y un $p = 1.3e-09$ (Figura 24.C).

Con el objetivo de apoyar los resultados obtenidos del análisis de expresión de muestras tumorales de Cáncer de mama, también se consultó los perfiles de expresión de SALL2 y CCNE1 en la base de datos de microarray ONCOMINE (Rhodes *et al.* 2004). Este análisis revela 15 subtipos de cáncer de mama en distintos grados tumorales, en los que es posible ver la diferencia de expresión del mRNA de SALL2 con respecto al de CCNE1.

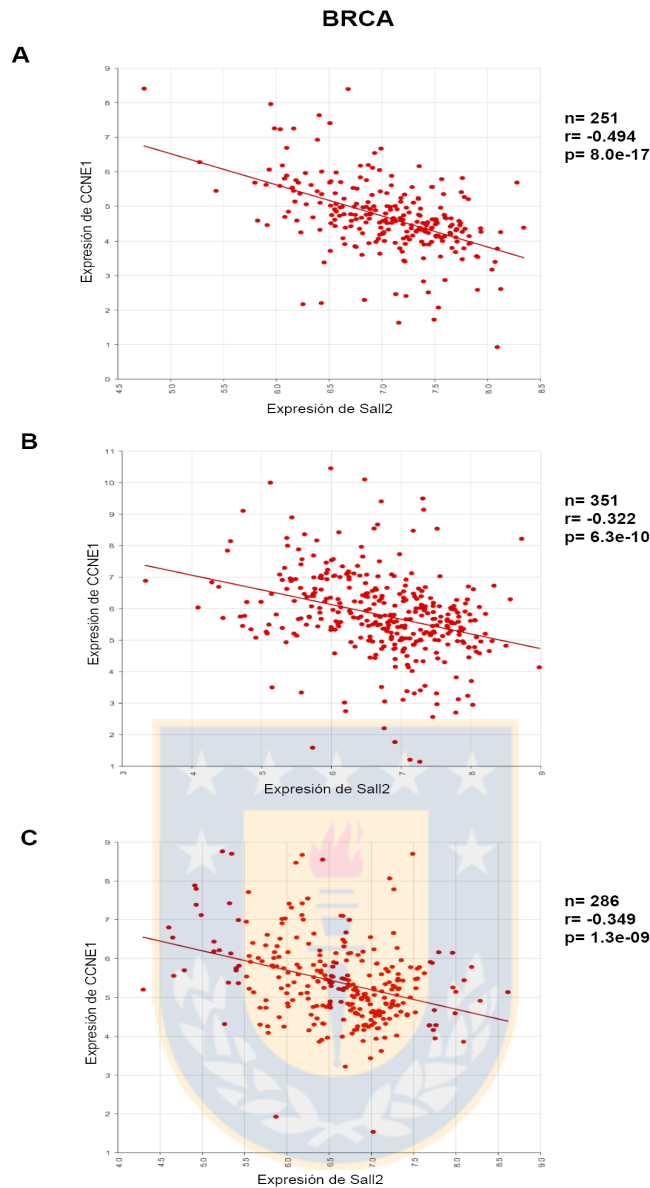


Figura 24: Scatterplots de correlación inversa de *SALL2* y *CCNE1* en muestras de cáncer de mama del servidor R2. **(A)** Perfil de expresión génica de 251 muestras de cáncer de mama en distintos grados del tumor. Base de datos corresponde a GEO ID: GSE3494. **(B)** Perfil de expresión transcripcional de muestras de cáncer de mama en distintos grados del tumor, correspondientes a 315 mujeres. Base de datos corresponde GEO ID: GSE2109. **(C)** Perfil de expresión génica de 286 muestras de cáncer de mama metastásico. Base de datos corresponde a GEO ID: GSE2034. n = número de muestras; R = coeficiente de correlación de Pearson; p= valor p de la correlación. Fuente: Elaboración propia.

El criterio de selección de las muestras fue filtrar por orden de significancia, considerando solo aquellos estudios en los que el p-value fuera superior a 1×10^{-4} . Además, se consideró el top 5% de muestras en las que las veces de cambio en la expresión del gen de interés, fuera por lo menos el doble a diferencia de la expresión en tejido normal. Como acotación final, fueron analizadas y comparadas las expresiones de mRNA de *SALL2* y *CCNE1* por separado, ya que en la plataforma Oncomine no es posible realizar la correlación de dos genes de interés. En la Figura 25, podemos observar la baja expresión de *SALL2* a través de 15 estudios independientes de cáncer de mama, de los cuales el rango promedio de comparación fueron 752.0 muestras y el p-value final de 3.02×10^{-6} , lo que nos indica una alta significancia en la baja expresión de *Sall2* con respecto a su expresión en tejidos normales. Sin embargo, al hacer la comparación de expresión de mRNA de *CCNE1* en otras 15 muestras de cáncer de mama (Figura 26), es posible ver que existe una sobre-expresión del gen en la mayoría de las muestras seleccionadas, siendo el rango promedio de muestras analizadas un 384.0 con un p-value final de 5.98×10^{-5} .

Estos resultados apoyan los análisis previamente realizados, donde se estimó que, en muestras de cáncer de mama de distintos grados de agresividad, existe una correlación negativa de expresión de ambos genes, siendo *SALL2* el gen que muestra una expresión disminuida con respecto al oncogen Ciclina E1.

Comparación de expresión de SALL2

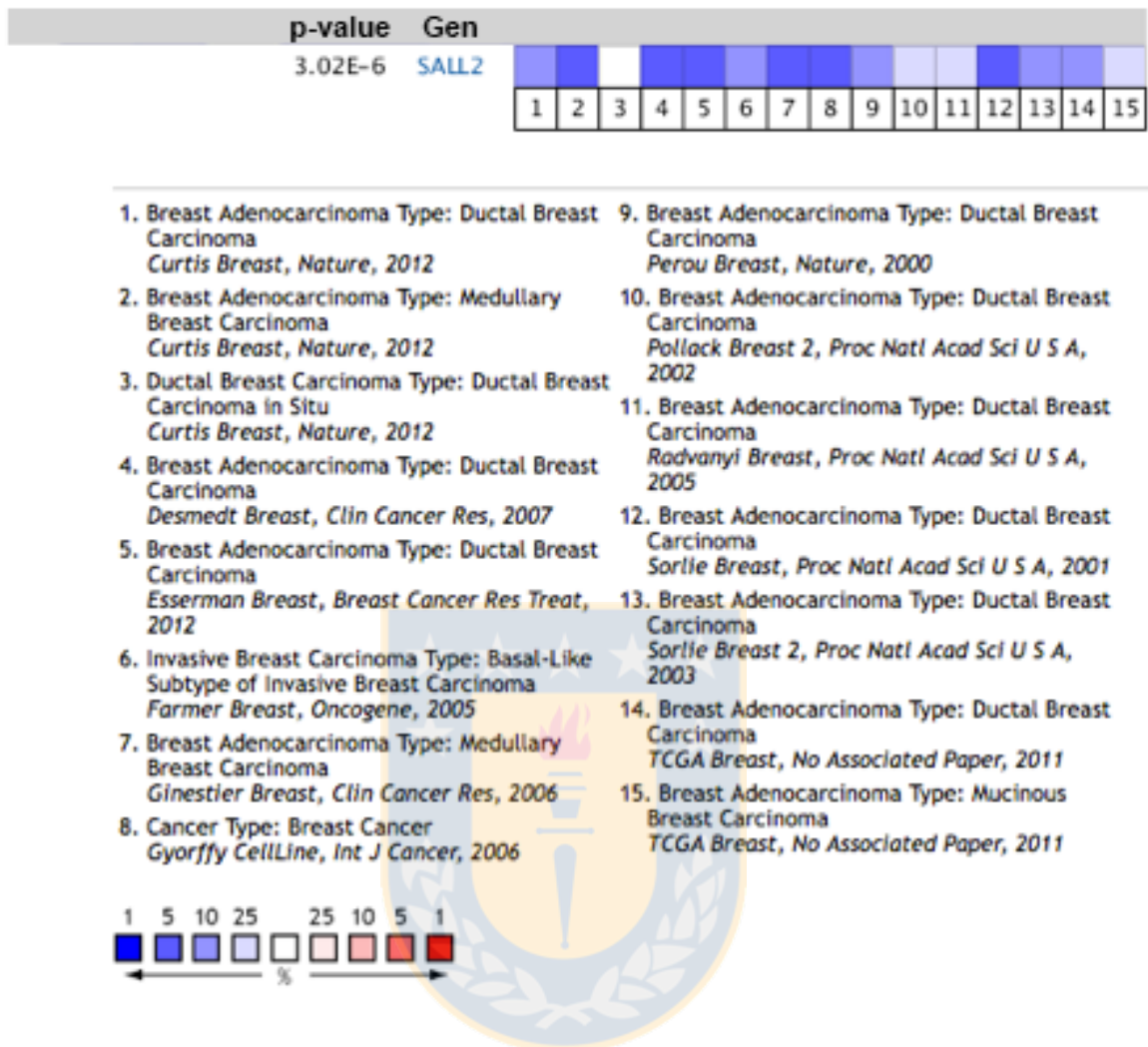


Figura 25: Análisis de expresión de mRNA de SALL2 en distintas muestras de cáncer de mama. Los datos de expresión fueron obtenidos de distintos estudios de secuenciación masiva disponibles en OncoPrint. Este corresponde a los datos de 2136 muestras analizadas cuyo análisis de expresión de mRNA se realizó a través de secuenciación masiva Illumina HumanHT-12 V3.0 R2 Array. Tanto para la expresión de Sall2 como la de Ciclina E1, los datos fueron filtrados a modo de obtener sobreexpresión significativa en el 5% superior de cada dataset. La escala de color indica la expresión del gen en cada tejido: hacia el color azul intenso indica baja expresión del gen y hacia el rojo intenso, sobreexpresión del gen. Fuente: Elaboración propia.

Comparación de expresión de CCNE1

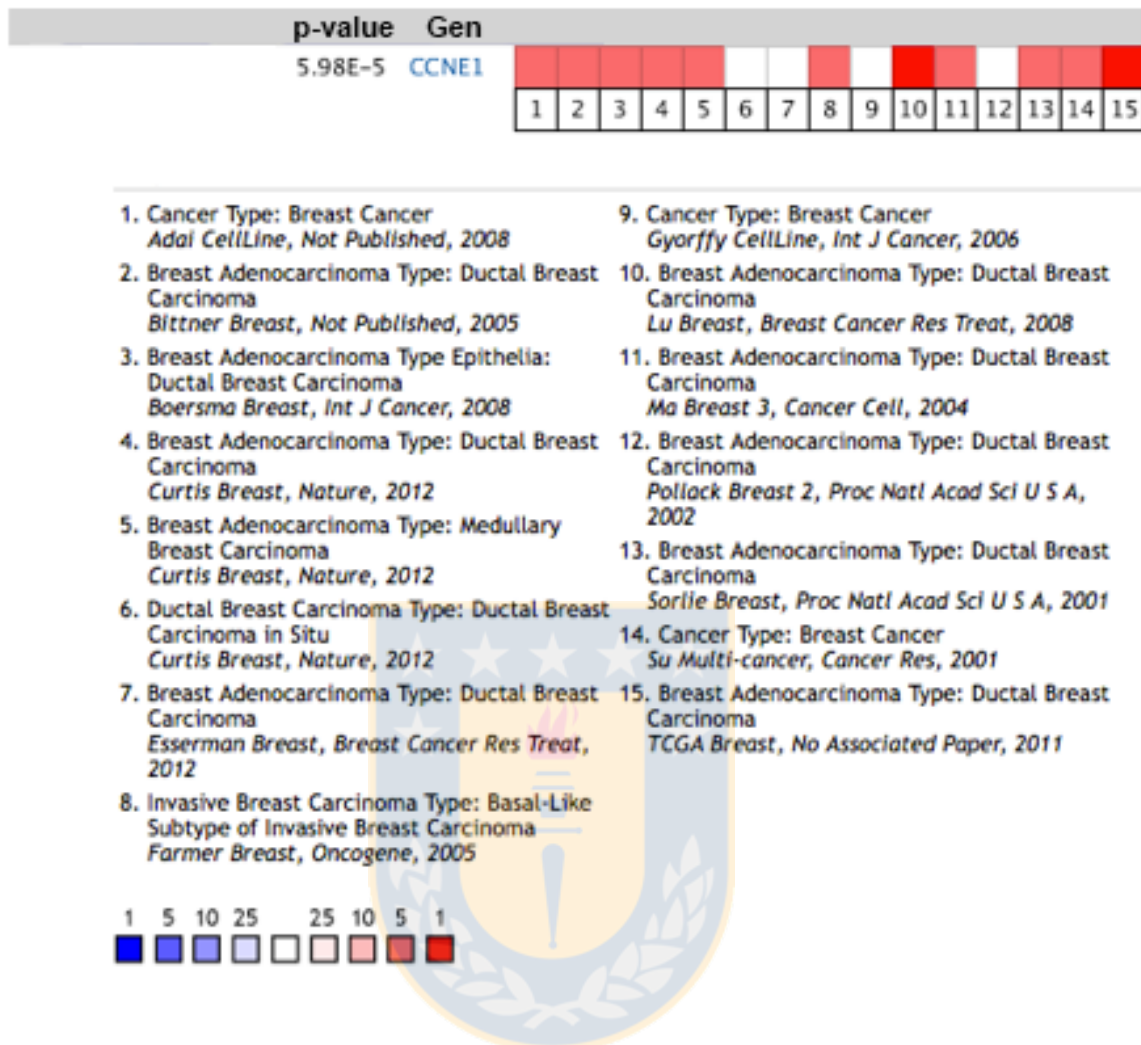


Figura 26: Análisis de expresión de mRNA de Ciclina E1 en distintas muestras de cáncer de mama. Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos publica Curtis Breast disponible en Oncomine. Este corresponde a los datos de 2136 muestras analizadas cuyo análisis de expresión de mRNA se realizó a través de secuenciación masiva Illumina HumanHT-12 V3.0 R2 Array. Tanto para la expresión de *SALL2* como la de Ciclina E1, los datos fueron filtrados a modo de obtener sobreexpresión significativa en el 5% superior de cada dataset. **(A)** Expresión de *SALL2* en distintas muestras de Cáncer de Mama. La escala de color indica la expresión del gen en cada tejido: hacia el color azul intenso indica baja expresión del gen y hacia el rojo intenso, sobreexpresión del gen. Fuente: Elaboración propia.

A modo de complementar el estudio, se evaluó el estado de *SALL2* en muestras tumorales, encontrándose que han sido descritas distintas alteraciones encontradas para el gen de *SALL2* (Figura suplementaria 3 – 5). Esta información podría resultar importante si consideramos que, si bien no todas las mutaciones tienen consecuencias funcionales a nivel proteico, se puede predecir cómo las mutaciones específicas pueden afectar la función de los genes individuales antes de iniciar estudios funcionales. Este análisis nos permite comprender de qué manera *SALL2* podría estar desregulado en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Figura suplementaria 5), ya que las mutaciones en el gen de *SALL2* podrían estar generando que la proteína sea trunca o mutada ejerciendo una función desregulada.

Posterior al estudio de la expresión de *SALL2* y *CCNE1* en muestras de Cáncer de mama mediante la plataforma Oncomine, se realizó un análisis de supervivencia con los mismos datos disponibles en las plataformas virtuales, tanto en cBioportal como en Oncomine. Con este estudio es posible realizar una comparación entre el tiempo de supervivencia de una cohorte de pacientes en cuyas muestras tumorales de mama se encuentra sobreexpresado tanto *SALL2* como *CCNE1*. Cabe mencionar que los análisis corresponden a los genes evaluados individualmente, ya que la plataforma no permite hacer el análisis correlativo de dos genes simultáneos. El análisis de supervivencia *Kaplan-Meier* es un área estadística en la que la variable respuesta es el tiempo que transcurre entre un evento inicial, en este caso el diagnóstico (que determina la inclusión del individuo en el estudio) y un evento final que ocurre cuando el individuo presenta la característica para terminar el estudio (muerte, alta de la enfermedad, etc.). Para generar un gráfico de *Kaplan meier* se utilizó la plataforma R2 mediante la opción expresión de un solo gen, ya que el análisis que se realiza en la plataforma separa las muestras de un conjunto de datos en dos grupos basados en la expresión génica de un gen. En este caso, se eligió la base de datos Bertucci ya que contiene mayor número de muestras para el estudio. Este estudio utilizó como plataforma de secuenciación masiva la herramienta u122p2 (Human Genome U133 microarray platform) y posteriormente, los datos fueron tomados para realizar el

análisis Kaplan Meier donde fueron separadas las muestras de un conjunto de datos en dos grupos basados en la expresión génica de un gen, en este caso, la alta y baja expresión de Sall2 en las muestras de cáncer de mama. Como se observa en la Figura 27, fueron evaluados 106 pacientes cuya expresión de Sall2 es elevada (*High*) y 146 que presentaban baja expresión de *SALL2* (*Low*) en las muestras tumorales de mama. El promedio de sobrevida de los pacientes, tanto como para los que presentan alta y baja expresión de *SALL2*, es de aproximadamente 100 meses. Sin embargo, existe una diferencia ($p= 0.021$) de sobrevivencia entre ambos grupos, pues los que presentan elevada expresión de Sall2 sobreviven aproximadamente 24 meses más.

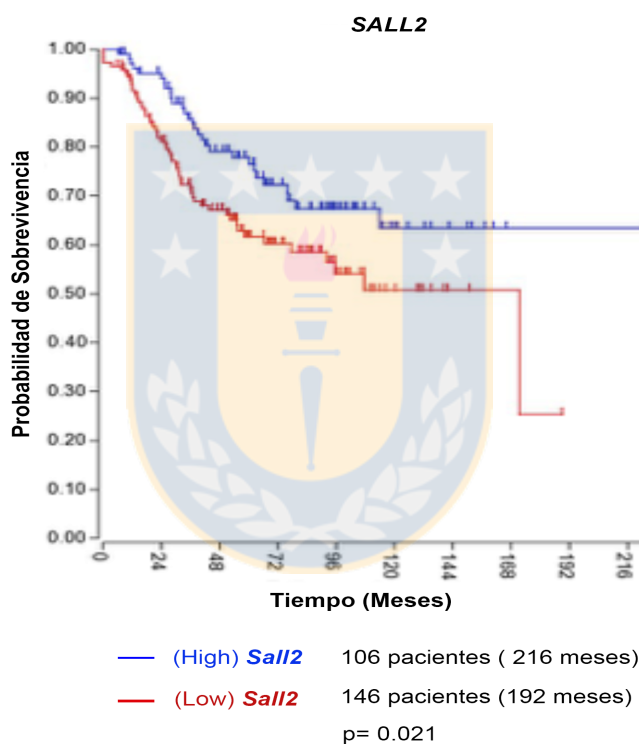


Figura 27: Análisis de sobrevivencia Kaplan Meier con respecto a la alta y baja expresión de *SALL2* en distintas muestras de cáncer de mama. Análisis de sobrevivencia de una cohorte de 266 muestras de pacientes con distintos grados de cáncer de mama. Comparación de las muestras con *SALL2* sobreexpresado (azul) y con baja expresión (rojo). Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos publica Bertucci disponible en la plataforma R2. Fuente: R2.

Del mismo modo evaluamos la supervivencia en el mismo grupo muestral pero consideramos la alta y baja expresi3n de Ciclina E1 y su repercusi3n en la supervivencia. Como se observa en la Figura 28, el promedio de supervivencia para ambos grupos es de aproximadamente 72 meses, sin embargo, los pacientes con Ciclina E1 sobreexpresada (N= 115) tienen 4 a1os menos de supervivencia promedio que aquellos que presentan baja expresi3n de Ciclina E1 (N=137), datos con un nivel de significancia de $p= 0.088$.

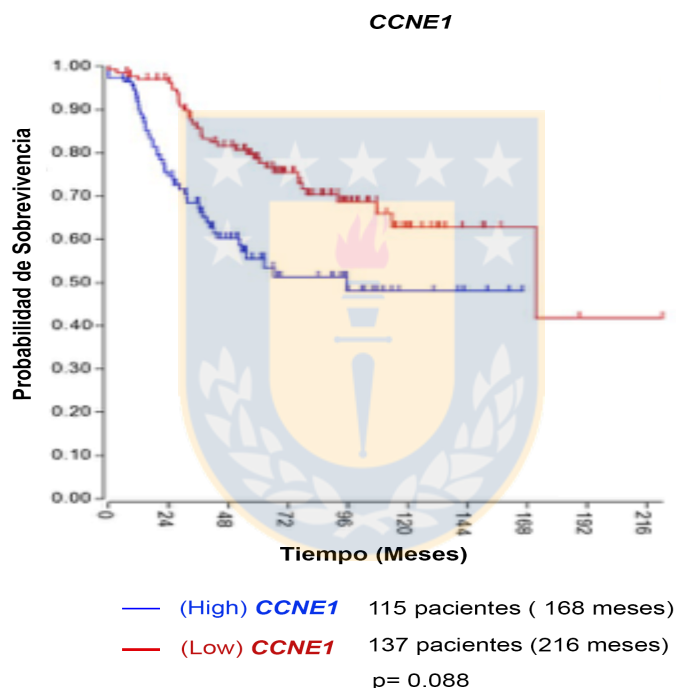


Figura 28: An3lisis de supervivencia *Kaplan Meier* con respecto a la alta y baja expresi3n de **CCNE1** en distintas muestras de c3ncer de mama. An3lisis de supervivencia de una cohorte de 266 muestras de pacientes con distintos grados de c3ncer de mama. Comparaci3n de las muestras con **CCNE1** sobreexpresado (azul) y con baja expresi3n (rojo). Los datos de expresi3n fueron obtenidos de la base de datos publica Bertucci disponible en la plataforma R2. Fuente: R2.

A modo de complementar, el mismo análisis se realizó en la plataforma cBioportal con diversas muestras de cáncer de mama (Breast Invasive Carcinoma-TCGA, Cell 2015; DOI:10.1016/j.cell.2015.09.033). A diferencia del análisis anterior, esta plataforma permite determinar la supervivencia entre grupo de pacientes con la base de datos del gen de interés alterado y no alterado (*SALL2* / *CCNE1*). Cabe destacar que en esta plataforma solo es posible evaluar los genes individuales. Como se observa en la Figura 29, los pacientes que presentan alteraciones en el gen de *SALL2* (n= 45) viven en promedio 5 años menos que aquellos donde *SALL2* no está mutado (n=769). En base a lo anterior, también se realizó el mismo estudio pero con respecto a pacientes que presentan el gen de Ciclina E1 alterado y sin alterar. Podemos observar en la Figura 30 que, el promedio de supervivencia de los pacientes tanto con Ciclina E1 normal como alterada, es de 160 meses aproximadamente, sin embargo, aquellos que presentan Ciclina E1 alterada (43), sobreviven en promedio 110 meses menos, por lo que su esperanza de vida se reduce en 9 años.

Considerando nuestros resultados previos, donde se pudo observar que, bajo condiciones normales de proliferación, la carencia de *SALL2* permite un aumento significativo de la expresión de *CCNE1*; estos resultados informáticos contribuyen a sugerir que en un contexto tumoral, la sobreexpresión de Ciclina E1 está directamente relacionada con la disminución de la expresión del factor de transcripción *Sall2*. En resumen, estos resultados sugieren que *SALL2* podría tener un rol regulatorio sobre el oncogen Ciclina E1 contribuyendo a la supresión de este tipo de cáncer, sin embargo, para corroborar este punto se necesita tener conocimiento sobre las funciones moleculares de *SALL2*.

SALL2

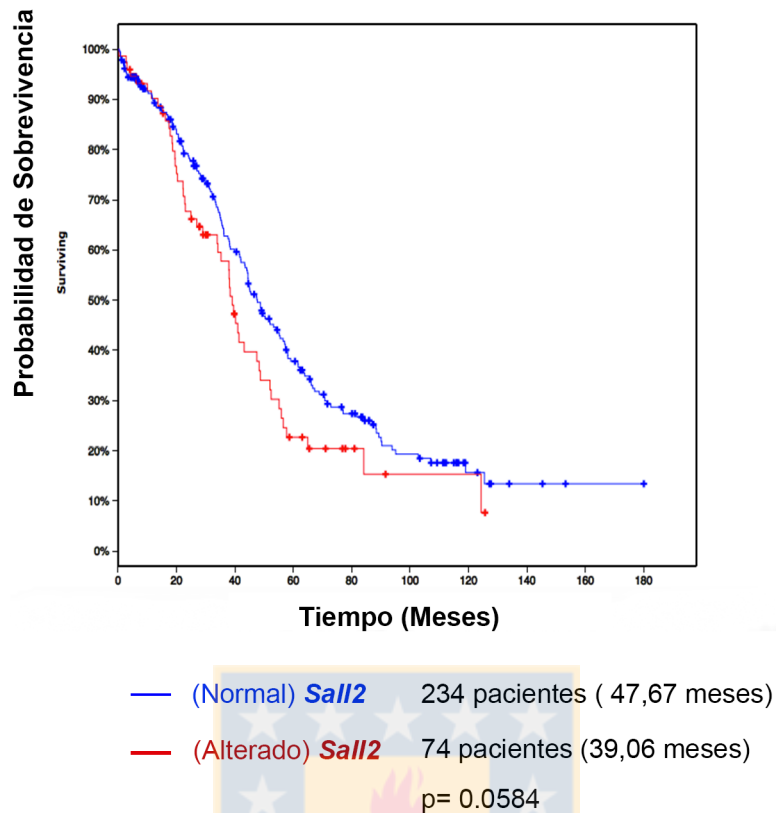
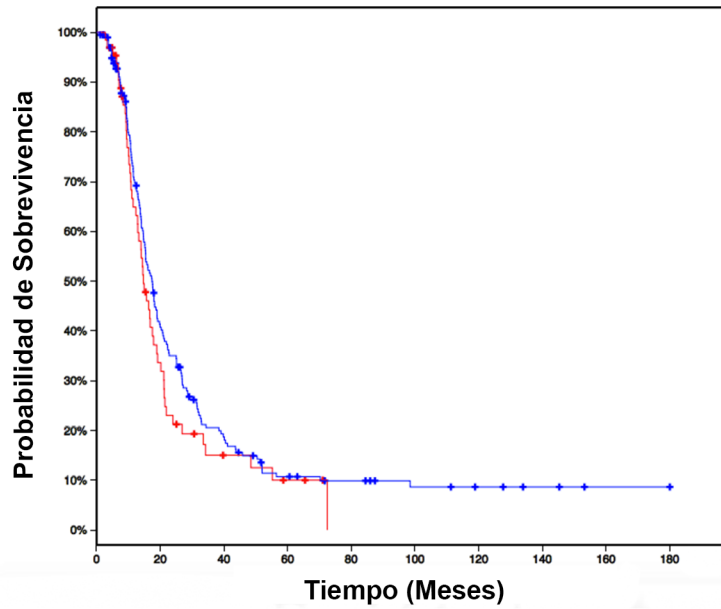


Figura 29: Análisis de supervivencia *Kaplan Meier* con respecto a muestras con el gen de *SALL2* en condiciones normales y alterado en distintas muestras de cáncer de mama. Análisis de supervivencia de una cohorte de 814 muestras de pacientes con distintos grados de carcinoma de mama. Comparación de las muestras con el gen de *SALL2* sin alteración (azul) y con alteración (rojo). Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos pública DOI:10.1016/j.cell.2015.09.033 disponible en la plataforma cBioPortal. Fuente: cBioPortal.

CCNE1



— (Normal) **CCNE1** 65 pacientes (14,78 meses)

— (Alterado) **CCNE1** 197 pacientes (17,61 meses)

$p= 0.233$

Figura 30: Análisis de supervivencia *Kaplan Meier* con respecto a muestras con el gen de *CCNE1* en condiciones normales y alterado en distintas muestras de cáncer de mama. Análisis de supervivencia de una cohorte de 740 muestras de pacientes con distintos grados de carcinoma de mama. Comparación de las muestras con el gen de *CCNE1* sin alteración (azul) y con alteración (rojo). Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos publica DOI:10.1016/j.cell.2015.09.033 disponible en la plataforma cBioPortal. Fuente: cBioPortal.

9. DISCUSIÓN

9.1 Regulación de los niveles de *Sall2* (*SALL2*) durante el ciclo celular; efecto de la deficiencia de la proteína *SALL2* en la capacidad proliferativa.

SALL2 es un factor de transcripción que ha sido pobremente caracterizado, su función normal, mecanismo de regulación y genes blanco han sido escasamente estudiados. Sin embargo, *SALL2* es el único miembro de su familia (Genes *SPALT*) que ha sido propuesto como un supresor de tumores. Publicaciones recientes han descrito a *Sall2* como un importante regulador del proceso de diferenciación neuronal (Pincheira *et al.*, 2009) y neurogénesis (Böhm *et al.*, 2008), asimismo otras investigaciones han demostrado la implicancia de este nuevo factor de transcripción en cáncer. Las evidencias de esta tesis sugieren una función celular, y un mecanismo a través del cual *SALL2* podría cumplir un rol como supresor de tumores.

Estudios previos a esta tesis indicaban que *SALL2* participaría en la regulación del ciclo celular. Se ha observado que la sobreexpresión de *SALL2* en células de carcinoma ovárico disminuye la proliferación celular acompañado de un aumento de la proteína p21 (Gu *et al.*, 2011) y p16 (Wu *et al.*, 2015), dos inhibidores de complejos Ciclina/quinasas de la progresión G1/S. Además, se conoce que *SALL2* es importante para el mantenimiento de la quiescencia, ya que aumenta sus niveles en respuesta a deprivación de suero en fibroblastos humanos (Lui., 2007), y el silenciamiento de *Sall2* en estas células induce su progresión hacia la fase S, aún en ausencia de suero (Lui., 2007). Por otro lado, estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio muestran que la proliferación celular aumenta en células carentes de *Sall2*. En base a estos antecedentes, se propuso que el factor de transcripción *SALL2* contribuye a la regulación del ciclo celular, mecanismo que, de ser deficiente se correlacionaría directamente con la tumorigénesis, progresión tumoral y metástasis.

Sincronización de MEFs con Nocodazol y posterior liberación al ciclo celular evidenció que, durante las primeras horas de liberación al ciclo, existe una diferencia considerable de la población de células *Sall2* (-/-) que ya se encuentra en fase G1 a diferencia de las células *Sall2* (+/+) que están aparentemente recién saliendo de la mitosis hacia la fase G1 temprana, y que esta tendencia se ve aumentada cuando las células continúan su progreso hacia la fase de síntesis de ADN. Del análisis obtenido se sugiere que SALL2 cumpliría una función regulatoria en las etapas tempranas de la progresión, ya que cuando las células son liberadas al ciclo celular desde la fase G2/M, las iMEFs *Sall2* (-/-) avanzan significativamente más rápido hacia la fase G1/S. Estos resultados apoyan estudios previos del laboratorio que muestran que la deficiencia de SALL2 en fibroblastos inmortalizados embrionarios de ratón, desencadena una proliferación descontrolada, lo que estaría asociado con la desregulación del ciclo celular, apoyando además otros estudios previamente publicados que relacionan a SALL2 con un rol importante en la regulación del ciclo celular.

En relación a esta posibilidad encontramos elevados niveles de *Sall2* (SALL2) en fase G2/M mediante ensayos de ARNm y proteína. La alta expresión de *Sall2* en el punto de control G2/M resulta un dato interesante considerando que no han sido reportado muchos factores de transcripción altamente expresados en esta fase del ciclo celular. Un ejemplo de ello es la expresión de dos miembros del complejo SWI / SNF (SMARCB1 y SMARCD1), presentes en el grupo de expresión M / G1, que tienen un rol importante en la remodelación de la cromatina y en la regulación transcripcional (Mucharadt & Yaniv, 2001; W. Wang et al., 1996). Es bien conocido que existen factores de transcripción que no solo se limitan a la regulación de la fase G1/S, sino también a la regulación de la transición G2/M. En el caso de los factores de transcripción p53 y E2F, su activación puede desencadenar respuestas funcionales diferentes como lo son la detención del ciclo celular, tanto en G1/S como en G2/M. La evidencia implica a p53 en el control de entrada a la mitosis cuando las células entran G2 con ADN dañado, de esta manera p53 bloquea las células en G2/M mediante la inhibición de

Cdc2, la quinasa dependiente de Ciclina necesaria para entrar en mitosis (Taylor & Stark, 2001).

En el caso de SALL2 se ha determinado que se une a promotores de genes como p21 (Gu *et al.*, 2011) y p16 (Wu *et al.*, 2015), lo que provocaría de manera preferencial la detención del ciclo en G1/S y G2/M bajo condiciones de estrés o daño al ADN. Luego de esto, SALL2 se uniría a promotores de genes proapoptóticos como Bax (Gu *et al.*, 2011) o Noxa (Li *et al.*, 2004; Escobar *et al.*, 2015), para darle curso a la respuesta de muerte celular en el caso que sea necesario. Sin embargo, no podemos descartar que el aumento en los niveles de SALL2 en G2/M se asocie a una respuesta al estrés inducido por el tratamiento con Nocodazol en lugar de la regulación positiva específica de SALL2 relacionada con la detención del ciclo celular en G2/M. Estudios previos mostraron que la expresión de SALL2 aumenta frente a otros tipos de estrés celular (Escobar, 2015; Sung, 2012; Li, 2004).

Es importante considerar también que, en un contexto de cáncer, se han identificado factores de transcripción altamente expresados en fase G2/M. Esto puede ser debido al daño en el DNA que presentan las células cancerígenas que generan ciclo celulares aberrantes. Como en el caso de células HELA donde se encuentran altamente expresados en G2/M los factores de transcripción Luca1, ISGF-3, RRN3 y NFATx4 (Chaudhry M.A., 2002).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran que las células carentes de Sall2 reingresan más rápido a un nuevo ciclo celular, también reveló que estas llegan a la fase de síntesis 4 horas antes que las células *Sall2 wild type*. Se estableció que en células iMEFs *Sall2 (+/+)* la fase de síntesis se alcanza a las 16 horas post liberación en G2/M. Junto a esto el leve aumento de la expresión de la proteína SALL2 hacia la fase S (t=12h) podría asociarse con estudios recientes que han demostrado que SALL2 ejerce una regulación positiva sobre los niveles de la proteína p21^{WAF} y p16^{INK4A} (Gu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015), las cuales son expresadas en la misma fase

del ciclo celular. De esta manera SALL2 estaría regulando negativamente la progresión de ciclo celular cuando existe injuria o estrés, a modo de resguardar la integridad celular antes del proceso de síntesis de ADN. Sin embargo, más allá de un aumento en sus niveles durante G1, SALL2 podía ser activado en esta etapa del ciclo por mecanismos aún desconocidos.

En su conjunto, nuestros datos son consistentes con investigaciones previas. Por ejemplo, se sabe que el silenciamiento de *SALL2* en células de epitelio ovárico HOSE, genera un aumento en la síntesis de ADN medido por incorporación de BrdU (Li, 2004). Además, fue reportado que *SALL2* es un gen clave en el mantenimiento del estado de quiescencia bajo condiciones de estrés metabólico en fibroblastos embrionarios de ratón, y que su expresión disminuye en el reingreso al ciclo celular mediante la adición de medio suplementado (Lui, 2007). Resultado que coincide con la dinámica de la expresión de *Sall2* en las primeras horas de la progresión del ciclo observado en esta tesis.

9.2 *Sall2* regula negativamente la expresión de Ciclina D1/E1

Como ya se describió al comienzo de la revisión, los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. En consecuencia, los puntos de control del ciclo celular representan una buena opción para la aplicación de los agentes quimioterápicos. Los controles moleculares de la progresión del ciclo celular pueden proveer nuevos blancos potenciales para la terapia contra el cáncer. En lo que respecta a la función que podría estar ejerciendo *Sall2* en las primeras fases del ciclo celular, nuestros estudios muestran por primera vez que *Sall2* reprime la expresión de Ciclina D1 y E1, lo que apoya un rol para *Sall2* durante la transición de G1/S. Esto toma relevancia si consideramos que las Ciclinas son altamente reguladas en momentos específicos del ciclo celular, mediante mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y post-traduccionales.

La importancia de una posible regulación de *Sall2* sobre la Ciclina D1, recae principalmente porque Ciclina D1 presentan una expresión periódica durante todo el ciclo celular. Esta característica de Ciclina D1 parece ser distintiva de las otras Ciclinas. Su expresión es baja en G0/G1 y tiene un pico de expresión al final de G1 y durante S. La periodicidad de esta proteína durante el ciclo celular está regulada en parte por el mecanismo de degradación dependiente de ubiquitina/proteasoma (Thullberg, Bartek, & Lukas, 2000). Experimentos realizados en el modelo de células MEF muestran que bajo condiciones normales de proliferación, SALL2 estaría regulando la expresión de Ciclina D1. Posterior a la liberación desde el arresto en G2/M, los niveles de mRNA y proteína de Ciclina D1 se mantienen a lo largo de toda la progresión del ciclo celular, sin embargo, en las células *Sall2* deficientes la expresión de Ciclina D1 es significativamente mayor. Considerando lo anterior, es conocido que SALL2 regula positivamente la expresión de la proteína p16, un inhibidor de complejos Ciclina D/CDK2 (Wu *et al.*, 2015); por lo que existirían al menos dos mecanismos a través de los cuales *Sall2* regularía negativamente la progresión a través de G1/S, estos son la inducción de p16 y la represión de Ciclina D1. Estos mecanismos podrían explicar la desregulación en las primeras fases del ciclo celular observada en células *Sall2* (-/-).

Si SALL2 efectivamente estuviese regulando negativamente la expresión de Ciclina D1, este resultado es interesante ya que se sabe que la sobreexpresión de Ciclina D1 está presente en muchas de las neoplasias humanas, incluyendo el cáncer de mama, como resultado de la amplificación o translocación de su gen. Se ha demostrado que la Ciclina D1 se traslada del núcleo al citoplasma cuando la célula está en fase G1 y entra en fase de síntesis. Por lo que la sobreexpresión de esta Ciclina en ausencia de SALL2, provocaría el acortamiento de las primeras fases del ciclo; lo que explicaría como las células iMEFs *Sall2* (-/-) entran y progresan más rápido al inicio del ciclo celular. Otro punto interesante a considerar, es que la Ciclina D1 es más frecuentemente desregulada que la Ciclina D2 o D3 en los cánceres humanos, y como tal, se ha caracterizado de forma más extensa. La sobreexpresión de la Ciclina D1 da como resultado una actividad CDK desregulada, un crecimiento rápido de las células

en condiciones de señalización mitogénica restringida, el desvío de los puntos de control y, en última instancia, el crecimiento neoplásico (Sicinski *et al.*, 1996; Malumbres *et al.*, 2004).

En resumen, el conjunto de estos resultados nos sugiere que el factor de transcripción SALL2, tendría un rol relevante en la regulación de la progresión del ciclo celular, específicamente, sobre la regulación de las proteínas Ciclinas tipo D, que son las que sensan las señales mitogénicas y posteriormente permiten el inicio y progreso de un nuevo ciclo celular, sin embargo, el mecanismo molecular por el cual Sall2 estaría ejerciendo su rol, es aún desconocido.

Con respecto a una posible regulación de SALL2 sobre Ciclina E1 es importante ya que esta proteína se expresa a partir de la fase G1 tardía hasta el término de la fase de síntesis de ADN. Ciclina E se une y activa a la quinasa dependiente de Ciclina (CDK2) y posteriormente fosforila distintos blancos que desencadenan en una cascada de eventos que permiten la expresión de genes específicos de la fase S (Golias *et al.*, 2004). Aparte de esta función específica en la entrada de la fase S, Ciclina E juega un papel importante en el inicio de la replicación del ADN, en el control de la estabilidad genómica y en el ciclo de los centrosomas (Mussman *et al.*, 2000).

La regulación transcripcional y post-traducciona de Ciclina E1 resulta en una fuerte expresión en fase G1 tardía y en el comienzo de la fase de síntesis (Luhtala, Staff, Tanner, & Isola, 2016). Considerando esto, nuestros estudios basados en análisis de Citometría en iMEFs sugieren que, la fase de síntesis ocurriría entre las 8 y 12 hrs post liberación del arresto en G2/M. Sumado a esto, un resultado interesante fue determinar que los niveles de mRNA y proteína de Ciclina E1 en células *Sall2* (-/-) son significativamente mayor que en células *Sall2* (+/+) en las horas t=8-12 post-liberación, concordando con la conocida expresión de Ciclina E en fase de G1 tardía y S. Considerando los roles que desempeña Ciclina E en la iniciación de la replicación del ADN, control de la estabilidad genómica y en el ciclo de los centrosomas (Mussman *et*

al., 2000), la regulación transcripcional de Ciclina E mediada por SALL2 resultaría relevante en un contexto fisiológico y fisiopatológico como lo es el cáncer.

La alta expresión de Ciclina E ha sido asociada con la iniciación o la progresión de diferentes cánceres humanos, por lo que su desregulación puede inducir la formación de tumores tanto *in vivo* como *in vitro* (Geng et al., 2003). Referente a esto, estudios *in vivo* en modelo de ratones transgénicos que expresan constitutivamente Ciclina E, se pudo ver que estos desarrollan enfermedades y tumores espontáneos, por lo que se considera a Ciclina E como una proteína con alto potencial oncogénico (Geng et al., 2003). Además, es sabido que una amplificación anormal de Ciclina E1 produce el acortamiento de la fase G1 del ciclo celular, lo que puede explicar nuestros resultados obtenidos mediante citometría de flujo, las células *Sall2* (-/-) alcanzan más rápido la fase de Síntesis, respecto a las *Sall2* (+/+). Sumado a esto, una desregulación de los niveles de Ciclina E1 en las primeras fases del ciclo celular, se asociaría con problemas en la progresión posterior hacia la Mitosis, generando la presencia de aberraciones cromosomales cuando existe sobre expresión de Ciclina E1 en células de glándulas mamarias (Caldon et al., 2013).

Nuestros estudios sugieren que SALL2 reprime la actividad transcripcional del promotor *CCNE1*, lo que conlleva a una disminución de los niveles de mRNA y proteína. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se determinó que en la secuencia del promotor de Ciclina E1 existe un motivo (GGGC|TGGG) para unir a SALL2. Sumado a esto, resultados obtenidos en esta tesis utilizando el gen reportero de luciferasa como indicador de la actividad de transcripcional del promotor de Ciclina E1, demostraron que SALL2 disminuye significativamente la actividad del promotor de Ciclina E1. Lo mismo se corroboró al evaluar si la actividad del promotor de Ciclina E1 humano disminuye en función de la concentración de SALL2 (PCDNA3- *mSall2* E1A). Sumado a todo lo anterior, estudios de otros laboratorios demostraron que SALL2 también reprime al oncogen Myc (Chang Kyoo Sung et al., 2012). Se conoce que Myc

induce la expresión de Ciclina E1 favoreciendo la proliferación celular, de manera que SALL2 podría inhibir indirectamente la Ciclina E1, disminuyendo la expresión de Myc.

Estos resultados sugieren que Sall2 regula negativamente la actividad transcripcional del promotor de Ciclina E1. Lo anterior hace suponer que una regulación negativa de Ciclina E1 mediada por SALL2, podría estar evitando una upregulación del oncogén en fases tempranas del ciclo celular, lo que evitaría una posterior inestabilidad genómica, causa primordial de la tumorigénesis (Hoeijmakers, 2001).

9.3 SALL2 se correlaciona negativamente con Ciclina E1 (CCNE1) en cáncer de mama.

Conforme a lo relacionado con los estudios bioinformáticos, en primer lugar, se realizó una búsqueda virtual en plataformas públicas de datos de secuenciación masiva, para conocer la expresión de genes de interés en un contexto tumoral. En relación a los estudios bioinformáticos, encontramos que existe una correlación negativa significativa entre SALL2 y CCND1/E1 en varios tipos de cáncer, pero principalmente en cáncer de mama. Los análisis realizados en distintos estudios masivos de cáncer de mama muestran que existe una correlación entre la baja expresión de ARNm de SALL2 con respecto a la alta expresión de CCNE1. Esta información complementa estudios donde ya ha sido reportado una sobreexpresión de Ciclina E1 en cáncer de mama (Hwang & Clurman, 2005). Además, existen dos estudios bioinformáticos independientes que identifican a Sall2 como un importante biomarcador de este tipo de cáncer (Liu, 2014; Zou, 2017).

En relación a los perfiles de expresión de SALL2 y CCNE1 en la base de datos de microarray ONCOMINE (Rhodes et al., 2004), nuestro análisis corroboró estudios previos (Etemadmoghadam et al., 2013; Luhtala et al., 2016), que indicaban una baja expresión del gen de SALL2 con respecto a la sobreexpresión de CCNE1 en este tipo de tumores. Complementando nuestro análisis el acceso a la plataforma cBioPortal for

Cancer Genomics nos permitió conocer el estado genómico de *SALL2* en este tipo de tumores. De los estudios de cáncer de mama disponibles, existe un consenso en mutaciones específicas encontradas en el gen de *SALL2*. Estas corresponden a 4 mutaciones sin sentido encontradas en el extremo N- terminal de la secuencia aminoacídica, donde comúnmente se encuentra un dominio de dedo de zinc del tipo C2HC y una región rica en glutamina. Este resultado nos sugiere de qué manera *SALL2* podría estar desregulado en cáncer de mama, ya que las mutaciones podrían estar generando una proteína Sall2 trunca o mutada, lo que conlleva a una función desregulada; en este caso en particular, puede que no esté ejerciendo su función supresora de tumores y le imposibilite la represión transcripcional de la Ciclina E1 en fases tempranas del ciclo celular. Además, como muestra la Figura Suplementaria 3, existen descritas algunas mutaciones en el gen del *SALL2* donde se ubica una secuencia PEST, que es una secuencia peptídica rica en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina, que se asocia con proteínas de vida media corta (Rechsteiner *et al.*, 1996). De manera que se estima que la secuencia PEST actúa como péptido señal para degradación proteolítica y en caso de mutaciones en esta zona del gen, podría provocar que *SALL2* no se degrade correctamente, lo que podría explicar su alta expresión en algunas neoplasias.

El análisis de la supervivencia de pacientes respecto a niveles de *SALL2* y *CCNE1* (alto *versus* bajo) utilizando la base de datos Bertucci disponible en R2 indica que existe una diferencia significativa ($p= 7.7 \text{ e-}5$) de supervivencia entre grupos, pues los que presentan elevada expresión de *SALL2* sobreviven aproximadamente 24 meses más que los con baja expresión de *SALL2*. Respecto a *CCNE1*, los pacientes con *CCNE1* sobreexpresada tienen 4 años menos de supervivencia promedio que aquellos que presentan baja expresión de *CCNE1*, datos con un nivel de significancia de $p= 3.7 \text{ e-}4$. Los resultados bioinformáticos contribuyen a sugerir que en un contexto tumoral, la sobreexpresión de *CCNE1* está directamente relacionada con la disminución de la expresión del factor de transcripción *SALL2*.

Al evaluar supervivencia de pacientes respecto al “estatus” mutacional de *SALL2* y *CCNE1* (normal *versus* mutado) utilizando la plataforma cBioportal se encontró que, los pacientes que presentan alteraciones en el gen de *SALL2* viven en promedio 9 años menos que aquellos donde *SALL2* es *wild type*. Respecto al gen *CCNE1*, aquellos que presentan Ciclina E1 alterada sobreviven en promedio 150 meses menos, por lo que su esperanza de vida se reduce en 12 años.

En conjunto nuestros análisis sugieren un rol supresor tumoral para *SALL2* regulando negativamente a Ciclina E1. La desregulación de *SALL2*, por disminución en sus niveles y/o mutaciones, podría llevar a una sobreexpresión de Ciclina E1 lo que se relacionaría con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, se requieren mayores estudios y análisis a partir de muestras comunes para determinar la asociación de *SALL2* y *CCNE1* en cáncer de mama.

Futuros estudios deberían enfocarse a determinar el mecanismo por el cual *SALL2* regula a Ciclina E1 y D1. Esto contribuiría a comprender la participación que tiene *SALL2* en procesos normales y en patológicos clínicamente relevantes como es la enfermedad del cáncer. De este modo se abriría la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos contra una de las principales causas de mortalidad en el mundo.

10. CONCLUSIONES GENERALES

- SALL2 controla la entrada a la fase G1 del ciclo celular en iMEFs.
- SALL2 regula negativamente la expresión del gen de Ciclina E1, disminuyendo su actividad transcripcional en iMEFs.
- La ausencia de Sall2 en iMEFs promueve la expresión de mRNA y proteína de la Ciclina D1.



11. ANEXOS

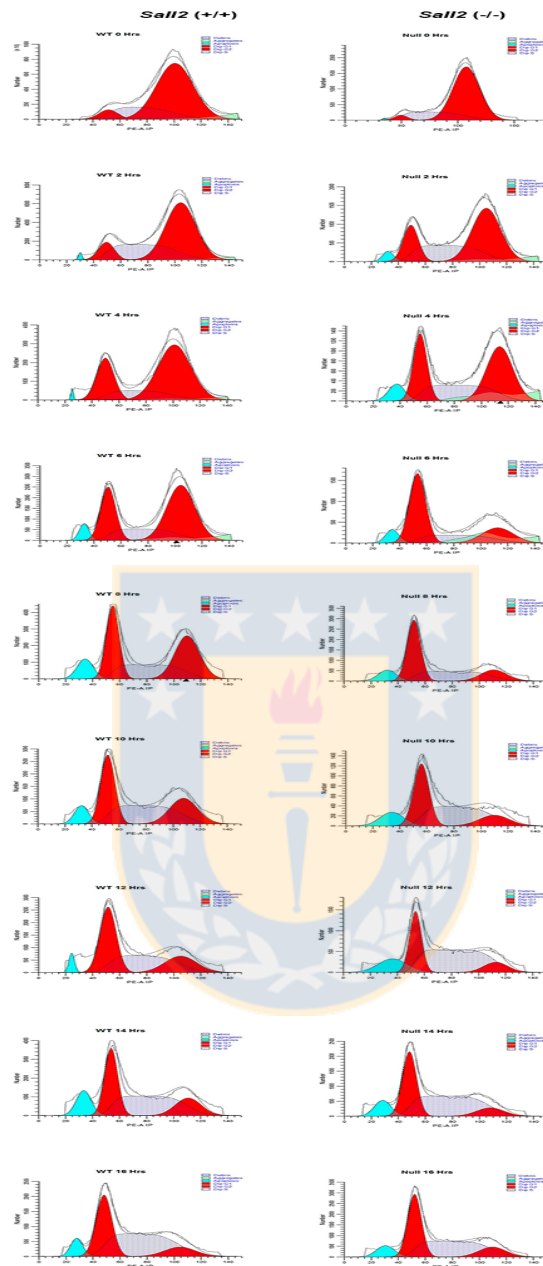


Figura Suplementaria 1. Efecto de la deficiencia de SALL2 en la progresión del ciclo celular. Análisis por citometría de flujo de las células *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) sincronizadas 16h con nocodazol 125 ng/mL y liberadas al ciclo, fijadas y teñidas con la solución de Yoduro de propidio **(A)** Progresión del ciclo celular de células *Sall2* (+/+). **(B)** Progresión del ciclo celular de células *Sall2* (-/-). Fuente: Elaboración propia.

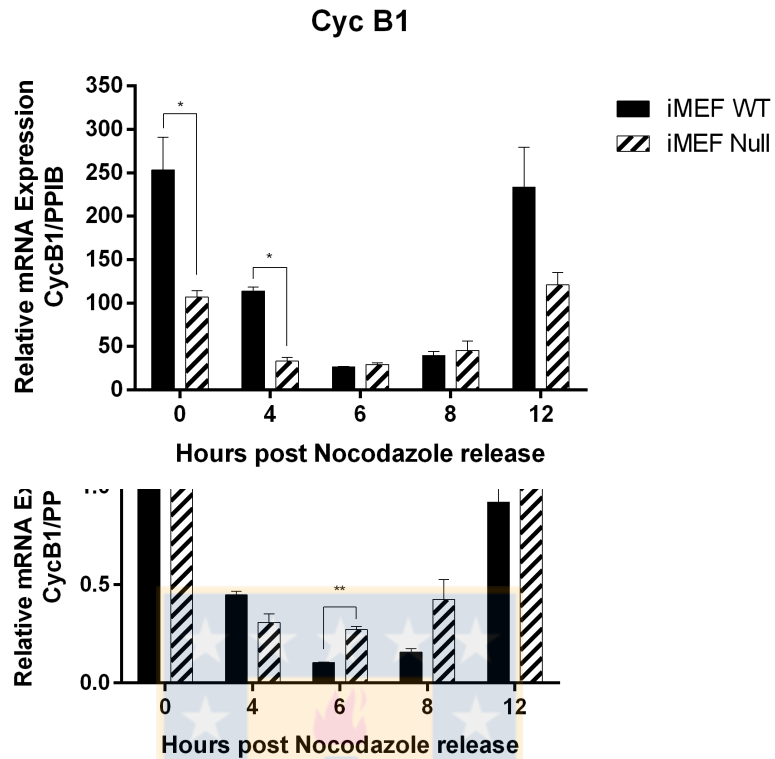


Figura suplementaria 2: Células sincronizadas *Sall2* (+/+) y *Sall2* (-/-) exhiben dinámicos niveles de cambio del marcador de G2/M la Ciclina B1 durante la progresión del ciclo celular. iMEFs *Sall2* +/+ y -/- iMEFs fueron sincronizadas por incubación con Nocodazol 125 μ M por 16h para generar bloqueo mitótico. Células mitóticas fueron colectadas por agitación suave (*“mitotic shake-off”*), re- plaqueadas y liberadas hacia el ciclo celular con la adición de medio completo. Los lisados fueron colectados a las 0, 4, 6, 8, y 12 h posterior a la liberación. Las muestras fueron medidas mediante PCR cuantitativo (qPCR) relativo a PPIB. Los niveles relativos (A) y absolutos (B) de mRNA de Ciclina B1 disminuyen después de la liberación con Nocodazol. En la cuantificación relativa, los niveles normalizados de mRNA al tiempo 0 h fueron definidos como 1. Los valores en triplicado son representativos de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por el test no paramétrico, cada barra de error tiene significancia \pm S.D. *P <0.05. Fuente: Elaboración propia.

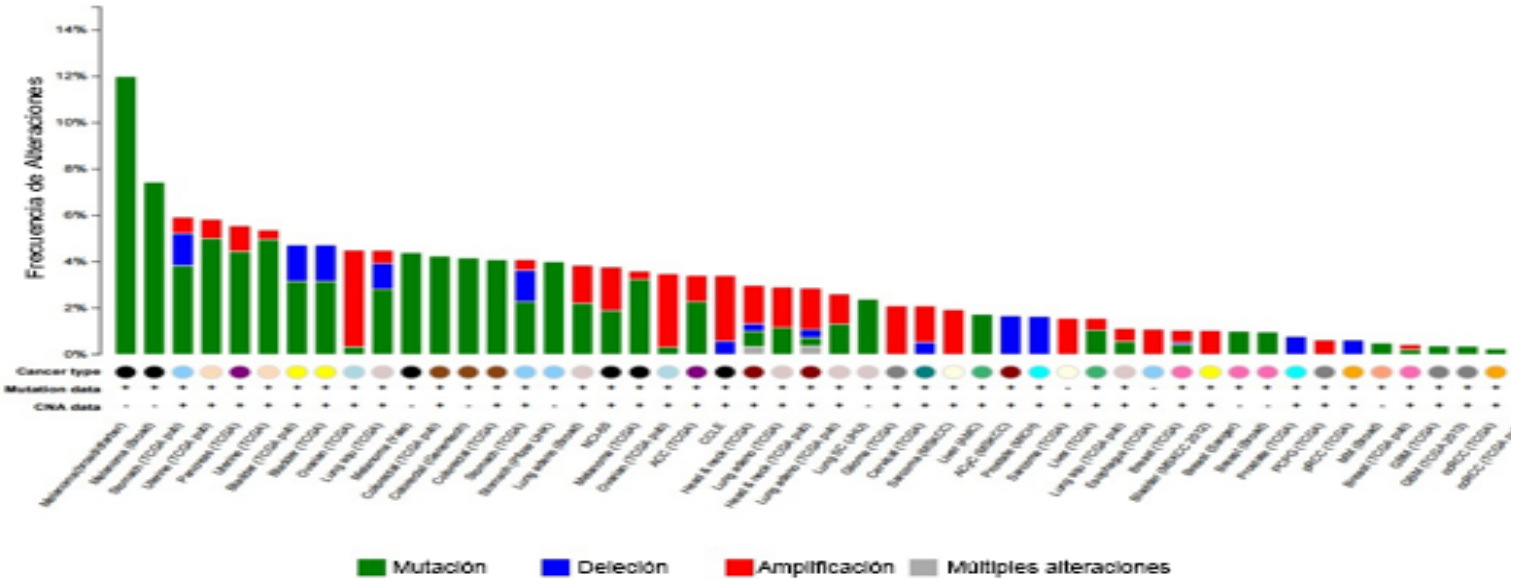


Figura suplementaria 3: Análisis *in Silico* de las distintas alteraciones encontradas para el factor de transcripción SALL2 en 148 estudios de diversas muestras tumorales. La búsqueda se realizó en todos los datos de secuenciación masiva disponibles en la plataforma cBioPortal. Barras en verde corresponden a la frecuencia de mutaciones, las rojas a amplificaciones del gen, las barras azules corresponden a deleciones y las grises a múltiples alteraciones sin especificar. Fuente: cBioportal

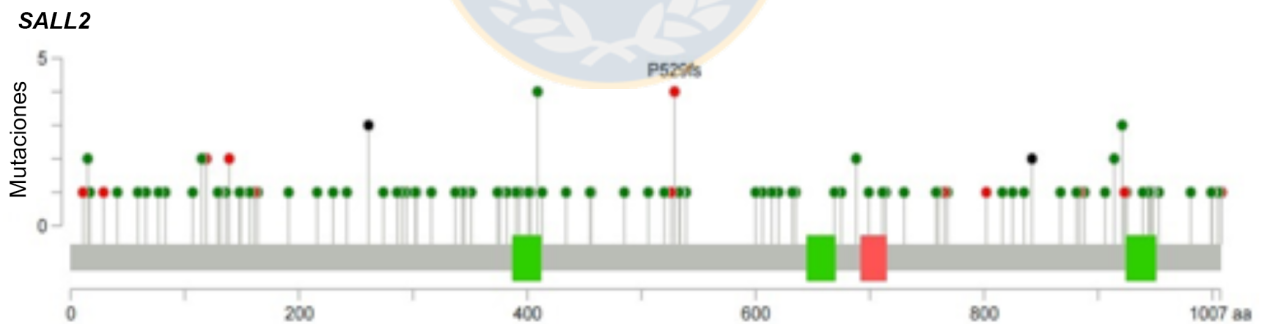


Figura suplementaria 4: Análisis *in Silico* de las mutaciones encontradas en el gen del factor de transcripción SALL2 en 148 estudios de diversas muestras tumorales. La búsqueda se realizó en todos los datos de secuenciación masiva disponibles en la plataforma cBioPortal. Los círculos verdes corresponden a 183 mutaciones sin sentido encontradas en el gen de SALL2 y los círculos negros corresponden a aminoácidos truncados. Fuente: cBioportal.

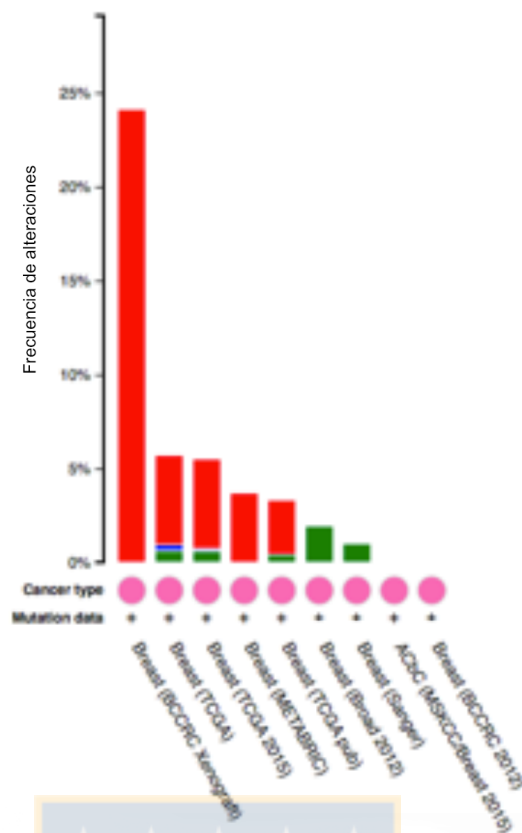
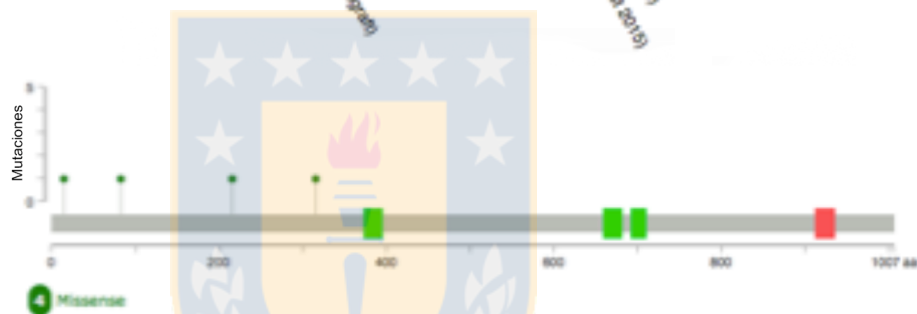
A**B**

Figura suplementaria 5: Análisis *in Silico* de las distintas alteraciones encontradas para el factor de transcripción SALL2 en muestras de Cáncer de mama. (A) Gráfico de frecuencia de alteraciones de Sall2 con respecto a distintas muestras de cáncer de mama. Barras en verde corresponden a la frecuencia de mutaciones encontradas para Sall2, las rojas a amplificaciones del gen, las barras azules corresponden a deleciones y las grises a múltiples alteraciones sin especificar. CNA corresponde al número de copias de la alteración encontrada (*Copy Number Alteration*). **(B)** Esquema correspondiente a la proteína SALL2 donde es posible diferenciar la ubicación de mutaciones puntuales encontradas entre los aminoácidos 15 y 316. La búsqueda se realizó en todos los datos de secuenciación masiva disponibles en la plataforma cBioPortal de Cancer Genomic (<http://www.cbioportal.org>). Fuente: cBioportal.

Citometría Ciclo celular	Todos los eventos	SALL2 (+/+)	SALL2 (-/-)
	G1	6,15	3.35
0 Hrs	S	22,35	21,9
	G2/M	71,5	74,75
	G1	9.37	18.14
2 Hrs	S	31.05	31.49
	G2/M	59.58	50.37
	G1	23.57	27.55
4 hrs	S	16.64	29.52
	G2/M	59.78	42.43
	G1	26.44	54.12
6 Hrs	S	21.84	23.25
	G2/M	51.72	22.63
	G1	33.32	48.31
8 Hrs	S	29.43	34.84
	G2/M	37.25	16.85
	G1	34.99	39.78
10 Hrs	S	39.43	46.79
	G2/M	25.57	13.43
	G1	41.44	29.97
12 Hrs	S	38.21	59.93
	G2/M	20.35	10.1
	G1	35.07	37.39
14 Hrs	S	47.03	53.17
	G2/M	17.89	9.41
	G1	36.8	40.9
16 Hrs	S	52.24	46.28
	G2/M	10.96	12.82

Tabla suplementaria 1. Datos de porcentaje de células en cada fase del ciclo celular posterior a la liberación de Nocodazol en células iMEFs *Sall2 wilt type (+/+)* y *Sall2 null (-/-)*. Los datos crudos del contenido de DNA fueron obtenidos del citómetro Becton Dickinson FACSCanto II. Fuente: Elaboración propia.

Apoptosis *Shake off's* tiempo 0H - Datos de Citometría de flujo

	SIN <i>shake off</i>		CON <i>shake off</i>	
	Sall2 +/+	Sall2 -/-	Sall2 +/+	Sall2 -/-
1er 8. Abril.16	1,5	1,6		
2do 15. Abril.16	1,37	1,33		
4to 2. Agosto.16			53,33	42,59
8vo 1. Sep.16	6,81	5,43	25,38	23,69
9no 21. Sep.16			46,09	38,71

Promedio	3,23	2,79	41,60	35,00
SD	3,10	2,29	14,51	9,98
%SD	96,20	82,29	34,87	28,52

Tabla suplementaria 2. Datos crudos del porcentaje de células apoptóticas en el tiempo 0H de todos los análisis de *shake off* considerados para análisis de Citometría de flujo. El tiempo 0H corresponde al punto posterior a la liberación del Nocodazol en células iMEFs *Sall2 wilt type* (+/+) y *Sall2 null* (-/-). Datos crudos del contenido de DNA fueron obtenidos del citómetro Becton Dickinson FACSCanto II. Fuente: Elaboración propia.

Tabla suplementaria 3. Datos de correlación entre *SALL2* – *CCNE1* y *SALL2* – *CCND1* en diversas muestras tumorales. Los datos crudos fueron obtenidos desde la plataforma web R2: Plataforma de Análisis y visualización Genómica (<http://r2.amc.nl> <http://r2platform.com>). Fuente: Elaboración propia.



Tipo de Cáncer	r	p Value	n	GEO ID
Cáncer cervical	0.390	0.01	45	GSE7803
Cáncer cervical	0.150	0.23	66	GSE9750
Glioblastoma	-0.611	1.2e-11	101	GSE4536
Glioblastoma	0.361	2.2e-04	100	GS34271
Leucemia	0.316	0.02	56	GSE4228
Leucemia	-0.110	7.5e-07	2004	GSE13159
Leucemia	0.157	3.2e-04	525	GSE14468
Linfoma	-0.040	0.56	215	GSE4475
Linfoma	0.043	0.46	287	GSE23120
Linfoma	0.372	0.03	34	GSE34771
Osteosarcoma	-0.049	0.84	20	GSE14359
Tumor Vejiga	-0.332	9.6e-03	60	GSE3167
Cáncer Ovario	0.074	0.09	527	GSE68661
Cáncer Ovario	-0.310	0.04	45	GSE38666
Cáncer Pancreático	-0.550	6.2e-05	47	GSE17891
Cáncer de mama	0.259	3.3e-05	251	GSE3494
Cáncer de mama	0.261	7.5e-07	351	GSE2109
Cáncer de mama	0.417	1.3e-12	262	GSE 21653
Cáncer de mama	0.382	2.4e-11	286	GSE2034
Tumor de C6lon	-0.227	6.2e-06	390	GSE 41258
Tumor de C6lon	0.054	0.34	315	GSE2109
Tumor de C6lon	-0.218	0.01	130	GSE37892
Tumor de H6gado	0.031	0.62	261	GSE2109
Tumor de H6gado	0.159	0.13	90	GSE 15765
Tumor de Pulm6n	-0.121	0.48	36	GSE 14018
Tumor de Pulm6n	-0.014	0.89	100	GSE 33532
Tumor de Pulm6n	0.037	0.65	150	GSE43580
Tumor de Sarcoma	0.727	1.7e-20	117	GSE 17679
Tumor de Tiroide	0.239	0.17	34	GSE2109
Tumor de Wilms	-0.150	0.07	144	GSE10320

12. REFERENCIAS

- Alagaratnam, S., Lind, G. E., Kraggerud, S. M., Lothe, R. A., & Skotheim, R. I. (2011). The testicular germ cell tumour transcriptome. *International Journal of Andrology*, 34(4 PART 2), 133–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01169.x>
- Attardi, L. D., de Vries, A., & Jacks, T. (2004). Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*, 23(4), 973–980. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207026>
- Basson, M., & Horvitz, H. R. (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene *sere-4* controls neuronal and mesodermal cell development and encodes a zinc finger protein. *Development*, 123(10), 1953–1965. <https://doi.org/10.1101/gad.10.15.1953>
- Beckerman, R., & Prives, C. (2010). Transcriptional Regulation by p53, 1–19.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & de Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- Bloom, K. S. (2008). Beyond the code: The mechanical properties of DNA as they relate to mitosis. *Chromosoma*, 117(2), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0138-0>
- Böhm, J., Buck, A., Borozdin, W., Mannan, A. U., Matysiak-Scholze, U., Adham, I., ... Barrionuevo, F. (2008). *Sall1*, *sall2*, and *sall4* are required for neural tube closure in mice. *The American Journal of Pathology*, 173(5), 1455–1463. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071039>
- Borozdin, W., Wright, M. J., Hennekam, R. C., Hannibal, M. C., Crow, Y. J., Neumann, T. E., & Kohlhase, J. (2004). Novel mutations in the gene *SALL4* provide further evidence for acro-renal-ocular and Okihiro syndromes being allelic entities, and extend the phenotypic spectrum. *Journal of Medical Genetics*, 41(8), e102. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.019505>

- Caldon, C. E., Sergio, C. M., Burgess, A., Deans, A. J., Sutherland, R. L., & Musgrove, E. A. (2013). Cyclin E2 induces genomic instability by mechanisms distinct from cyclin E1. *Cell Cycle*, *12*(4), 606–617.
<https://doi.org/10.4161/cc.23512>
- Chaudhry M.A., C. L. A. M. W. G. M. R. J. (2002). Gene expression profiling of HeLa cells in G1 or G2 phases. *Oncogene*, *21*(12), 1934–1942.
<https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205264>
- Chaudhury, I., & Koepp, D. M. (2016). Recovery from the DNA replication checkpoint. *Genes*, *7*(11). <https://doi.org/10.3390/genes7110094>
- Chibazakura, T., Kamachi, K., Ohara, M., Tane, S., Yoshikawa, H., & Roberts, J. M. (2011). Cyclin A Promotes S-Phase Entry via Interaction with the Replication Licensing Factor Mcm7. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(2), 248–255.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00630-10>
- Cui, W., Kong, N. R., Ma, Y., Amin, H. M., Lai, R., & Chai, L. (2006). Differential expression of the novel oncogene, SALL4, in lymphoma, plasma cell myeloma, and acute lymphoblastic leukemia. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *19*(12), 1585–92.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800694>
- De Celis, J. F., & Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *International Journal of Developmental Biology*, *53*(8–10), 1385–1398. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072408jd>
- Ekholm-Reed, S., Méndez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., & Reed, S. I. (2004). Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *Journal of Cell Biology*, *165*(6), 789–800.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200404092>
- Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Campos, T., Sodir, N. M., Morales, M., ... Pincheira, R. (2015). Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death and Disease*,

6(7), e1816. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.165>

Estilo, C. L., O-charoenrat, P., Talbot, S., Socci, N. D., Carlson, D. L., Ghossein, R., ... Singh, B. (2009). Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer*, 9, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-11>

Etemadmoghadam, D., Weir, B. a, Au-Yeung, G., Alsop, K., Mitchell, G., George, J., ... Bowtell, D. D. L. (2013). Synthetic lethality between CCNE1 amplification and loss of BRCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19489–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314302110>

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., ... Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, 114(4), 431–443. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00645-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00645-7)

Golias, C. H., Charalabopoulos, a., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control : a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, 58(12), 1134–1141. <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00284.x>

Gu, H. C., Li, D. W., Sung, C. K., Yim, H., Troke, P., & Benjamin, T. (2011). DNA-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor p150(Sal2). *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(4–6), 276–283. <https://doi.org/DOI.10.1016/j.bbagrm.2011.02.002>

Hartwell, L., & Weinert, T. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246(4930), 629–634. <https://doi.org/10.1126/science.2683079>

Hershko, A. (1999). Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 354(1389), 1571-5-6. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0500>

Hoeijmakers, J. H. J. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas*, 38(1), 17–22. <https://doi.org/S0378512200001882> [pii]

- Hwang, H. C., & Clurman, B. E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24(17), 2776–2786. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208613>
- Johnson, D. G., & Walker, C. L. (1999). Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39, 295–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295>
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature03097>
- Kelberman, D., Islam, L., Lakowski, J., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., ... Sowden, J. C. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2511–2526. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt643>
- Kohlhase, J., Altmann, M., Archangelo, L., Dixkens, C., & Engel, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of Msal-2. *Mammalian Genome*, 11(1), 64–68. <https://doi.org/10.1007/s003350010012>
- Kohlhase, J., Schuh, R., Dowe, G., Kühnlein, R. P., Jäckle, H., Schroeder, B., ... Stick, R. (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the Drosophila gene spalt. *Genomics*, 38, 291–298. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0631>
- Lauberth, S. M., & Rauchman, M. (2006). A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23922–23931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513461200>
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>
- Li, C.-M., Guo, M., Borczuk, A., Powell, C. a, Wei, M., Thaker, H. M., ... Tycko, B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *The American Journal of*

- Pathology*, 160(6), 2181–2190. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61166-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61166-2)
- Li, D., Dower, K., Ma, Y., Tian, Y., & Benjamin, T. L. (2001). A tumor host range selection procedure identifies p150(sal2) as a target of polyoma virus large T antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14619–14624. <https://doi.org/10.1073/pnas.251447198>
- Li, D., Tian, Y., Ma, Y., & Benjamin, T. (2004). p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3885–93. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.9.3885>
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079–3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., & Medema, R. H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 193–202. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812045>
- Liu, H., Adler, A. S., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. *PLoS Genetics*, 3(6), 0996–1008. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030091>
- Luhtala, S., Staff, S., Tanner, M., & Isola, J. (2016). Cyclin E amplification, over-expression, and relapse-free survival in HER-2-positive primary breast cancer. *Tumor Biology*, 37(7), 9813–9823. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4870-z>
- Lukas, J., & Bartek, J. (2004). Cell division: the heart of the cycle. *Nature*, 432(7017), 564–567. <https://doi.org/10.1038/432564a>
- Ma, Y., Cui, W., Yang, J., Qu, J., Di, C., Amin, H. M., ... Ritz, J. (2013). myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice SALL4 , a novel oncogene , is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice, 108(8), 2726–2735. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001594>
- Ma, Y., Li, D., Chai, L., Luciani, A. M., Ford, D., Morgan, J., & Maizel, A. L. (2001).

Cloning and Characterization of Two Promoters for the Human HSAL2 Gene and Their Transcriptional Repression by the Wilms Tumor Suppressor Gene Product. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48223–48230.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M106468200>

Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.

<https://doi.org/10.1186/gb4184>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). Milestones in Cell Division To Cycle or Not To Cycle: a Critical Decision in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 222–231.

<https://doi.org/10.1038/35106065>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166.

<https://doi.org/10.1038/nrc2602>

Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaría, D., Galán, J., Cerezo, A., Ortega, S., ... Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, 118(4), 493–504.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.002>

Muchardt, C., & Yaniv, M. (2001). When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene*, 20(24), 3067–3075. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204331>

Mussman, J. G., Horn, H. F., Carroll, P. E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. A., & Fukasawa, K. (2000). Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene*, 19(13), 1635–1646.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203460>

Nakayama, K. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27Kip1, polyploidy and centrosome overduplication. *The EMBO Journal*, 19(9), 2069–2081. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.9.2069>

Nebert, D. W. (2002). Transcription factors and cancer: An overview. *Toxicology*, 181–182, 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00269-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00269-X)

Nielsen, T. O., Hsu, F. D., O'Connell, J. X., Gilks, C. B., Sorensen, P. H. B., Linn, S.,

- ... van de Rijn, M. (2003). Tissue microarray validation of epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *The American Journal of Pathology*, 163(4), 1449–1456.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63502-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63502-X)
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(1), 21–32.
<https://doi.org/10.1038/35048096>
- Padmakumar, V. C., Aleem, E., Berthet, C., Hilton, M. B., & Kaldis, P. (2009). Cdk2 and Cdk4 activities are dispensable for tumorigenesis caused by the loss of p53. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2582–2593.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00952-08>
- Parrish, M., Ott, T., Lance-Jones, C., Schuetz, G., Schwaeger-Nickolenko, A., & Monaghan, A. P. (2004). Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7102–7112. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7102-7112.2004>
- Pincheira, R., Baerwald, M., Dunbar, J. D., & Donner, D. B. (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *The EMBO Journal*, 28(3), 261–273.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.274>
- Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., & Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication , DNA repair and mitosis. *Oncogene*, 21(October 2001), 437–46. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205102>
- Quezada, M. A. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS*, 65, 5–12.
- Rechsteiner M., Rogers S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, 21(7): 267-271.
- Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., ... Chinnaiyan, A. M. (2004). ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and

- Integrated Data-Mining Platform. *Neoplasia*, 6(1), 1–6.
[https://doi.org/10.1016/S1476-5586\(04\)80047-2](https://doi.org/10.1016/S1476-5586(04)80047-2)
- Salazar-Roa, M., & Malumbres, M. (2017). Fueling the Cell Division Cycle. *Trends in Cell Biology*, 27(1), 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.009>
- Sánchez, J., Talamillo, A., Lopitz-Otsoa, F., Pérez, C., Hjerpe, R., Sutherland, J. D., ... Barrio, R. (2010). Sumoylation modulates the activity of spalt-like proteins during wing development in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25841–25849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.124024>
- Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., ... Nishinakamura, R. (2003). Zinc Finger Protein Sall2 Is Not Essential for Embryonic and Kidney Development. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 62–69. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.62>
- Sherr, C. J., Roberts, J. M., Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, (Morgan 1997), 2699–2711.
<https://doi.org/10.1101/gad.1256504>
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., ... Weinberg, R. A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*, 82(4), 621–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90034-9)
- Smits, V. A. J., & Medema, R. H. (2001). Checking out the G2/M transition. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1519(1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00204-4)
- Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., ... Thomson, J. a. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13350–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235735100>

- Sung, C. K., Dahl, J., Yim, H., Rodig, S., & Benjamin, T. L. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150(Sal2). *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(4), 1275–83.
<https://doi.org/10.1096/fj.10-173674>
- Sung, C. K., Yim, H., Gu, H., Li, D., Andrews, E., Duraisamy, S., ... Benjamin, T. (2012). The Polyoma Virus Large T Binding Protein p150 Is a Transcriptional Repressor of c-MYC. *PLoS ONE*, 7(9), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046486>
- Sweetman, D., & Münsterberg, A. (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Developmental Biology*, 293(2), 285–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.009>
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803–1815. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204252>
- Thullberg, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2000). Ubiquitin/proteasome-mediated degradation of p19INK4d determines its periodic expression during the cell cycle. *Oncogene*, 19(24), 2870–2876. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203579>
- Ushiku, T., Shinozaki, A., Shibahara, J., Iwasaki, Y., Tateishi, Y., Funata, N., & Fukayama, M. (2010). SALL4 Represents Fetal Gut Differentiation of Gastric Cancer, and is Diagnostically Useful in Distinguishing Hepatoid Gastric Carcinoma From Hepatocellular Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(4), 533–540. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181d1dcdd>
- Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L., & Reiffers, J. (2001). Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: Aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiothérapie*, 5(2), 109–129.
[https://doi.org/10.1016/S1278-3218\(01\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S1278-3218(01)00087-7)
- Wang, B., Li, L., Xie, X., Wang, J., Yan, J., Mu, Y., & Ma, X. (2010). Genetic variation of SAL-Like 4 (SALL4) in ventricular septal defect. *International Journal of*

Cardiology, 145(2), 224–226. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.05.067>

Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B. R., & Crabtree, G. R. (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI / SNF complexes. *Genes & Development*, 4(17), 2117–2130. <https://doi.org/10.1101/gad.10.17.2117>

Wittenberg, C. (2005). Cell cycle Cyclin guides the way. *Nature*, 434(7029), 34–35. <https://doi.org/10.1038/434034a>

Wu, Z., Cheng, K., Shi, L., Li, Z., Negi, H., Gao, G., ... Li, D. (2015). Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element. *Cancer Science*, 106(3), 253–261. <https://doi.org/10.1111/cas.12606>

Zhu, J., Rice, P. W., Chamberlain, M., & Cole, C. N. (1991). Mapping the transcriptional transactivation function of Simian Virus 40 large T antigen. *J. Virol.*, 65(6), 2778–2790.

