

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“Relación estructura/función entre la  
proteína kinasa CK2 y la Enzima  
Convertidora de Endotelina - 1c, y  
evaluación de su efecto en la  
progresión tumoral de células de  
cáncer colorrectal”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:**

**IGNACIO ALFREDO NIECHI GAETE**

**Director de Tesis**

**Dr. Julio Tapia P.**

**SANTIAGO - CHILE  
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**IGNACIO ALFREDO NIECHI GAETE**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

**Director de Tesis:**

Dr. Julio Tapia P.

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Margarita Vega B. (Presidenta)

\_\_\_\_\_

Dr. Mario Chiong L.

\_\_\_\_\_

Dr. Alejandro Corvalán R.

\_\_\_\_\_

Dr. Ariel Castro A.

\_\_\_\_\_

# 1. Dedicatoria

A mis padres, a mi hermana y a Nataly.

## **2. Financiamiento**

- BECA CONICYT Doctorado Nacional #21120181 (I.N.G)
- BECA CONICYT Gastos operacionales # 20110181 (I.N.G)
- BECA CONICYT Pasantía en el extranjero (I.N.G)
- FONDECYT # 1120132 (J.C.T)

### **3. Agradecimientos**

Al Dr. Julio Tapia por su constante guía, apoyo y amistad.

Al Laboratorio de Transformación Celular por su ayuda en esta tesis.

A la comisión evaluadora por su guía y aportes en el desarrollo de esta tesis.

A mi familia por su constante apoyo.

A Nataly por comprenderme en los momentos de éxito y frustración.

A mis amigos por nada en especial.

# Índice

<b>1. Dedicatoria</b>	<b>I</b>
<b>2. Financiamiento</b>	<b>II</b>
<b>3. Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>4. Introducción</b>	<b>7</b>
4.1. Cáncer . . . . .	7
4.1.1. Cáncer: definición y epidemiología en Chile y el mundo . .	7
4.1.2. Biología del cáncer . . . . .	9
4.2. Cáncer colorrectal . . . . .	10
4.2.1. Epidemiología y aspectos clínicos . . . . .	10
4.2.2. Diagnóstico, pronóstico y terapia . . . . .	13
4.3. Rutas de señalización relacionadas con cáncer colorrectal . . . . .	15
4.3.1. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina o ruta Wnt/canónica . . . . .	15
4.3.2. La proteína kinasa CK2 y su papel en la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina	16
4.3.3. Rol de CK2 en estabilidad de proteínas . . . . .	19
4.4. Eje Endotelina-1 en cáncer . . . . .	19
4.4.1. Eje Endotelina-1 . . . . .	19
4.4.2. Alteraciones del eje ET-1 en cáncer . . . . .	21
4.4.3. Rol de ECE-1 en el Eje Endotelina-1 . . . . .	23
4.4.4. Isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina-1 . . .	25

4.4.5. Rol de ECE-1c en cáncer . . . . .	26
4.5. Hipótesis y Objetivos: . . . . .	29
4.5.1. Objetivos . . . . .	30
<b>5. Materiales y métodos</b>	<b>31</b>
5.1. Tampones y soluciones . . . . .	31
5.2. Construcción de los vectores . . . . .	32
5.2.1. Amplificación y purificación de la secuencia codificante del fragmento N-terminal de ECE-1c . . . . .	32
5.2.2. Subclonamiento en vector transportador pGEM-T-easy . . .	34
5.2.3. Subclonamiento en los vectores pGEX-2T y en pEGFP-N1 .	35
5.2.4. Generación de mutantes . . . . .	36
5.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes . . . . .	38
5.3.1. Inducción de la expresión . . . . .	38
5.3.2. Purificación . . . . .	39
5.4. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> . . . . .	39
5.5. Espectrometría de masas . . . . .	40
5.6. Cultivo celular y transfección . . . . .	40
5.7. Transcripción reversa y RT-qPCR . . . . .	40
5.8. Western blot . . . . .	41
5.9. Ensayo de fosforilación en células . . . . .	42
5.10. Ensayo de estabilidad . . . . .	42
5.11. Microscopía confocal . . . . .	43
5.12. Ensayo de ubiquitinación . . . . .	43
5.13. Ensayos de migración e invasión . . . . .	44
5.14. Ensayo de viabilidad . . . . .	44

5.15. Análisis estadístico . . . . .	45
<b>6. Resultados</b>	<b>46</b>
6.1. Objetivo específico 1 . . . . .	46
6.1.1. Análisis <i>in silico</i> de la región N-terminal de ECE-1c . . . . .	46
6.1.2. Clonamiento, expresión y purificación de proteínas recombinantes para ensayos <i>in vitro</i> . . . . .	48
6.1.3. Fosforilación <i>in vitro</i> de la región N-terminal de ECE-1c . . . . .	51
6.1.4. Fosforilación de ECE-1c en un contexto celular . . . . .	55
6.2. Objetivo específico 2 . . . . .	57
6.2.1. Regulación de la expresión de ECE-1 por CK2 . . . . .	57
6.2.2. Papel de la región N-terminal de ECE-1c en la regulación por CK2 . . . . .	61
6.2.3. Estabilidad de ECE-1c y su regulación por CK2 . . . . .	66
6.2.4. Degradación proteasomal de ECE-1c y su regulación por CK2 . . . . .	70
6.2.5. Ubiquitinación de ECE-1c y su regulación por CK2 . . . . .	75
6.3. Objetivo específico 3 . . . . .	77
6.3.1. Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la migración celular . . . . .	77
6.3.2. Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la invasión celular . . . . .	79
<b>7. Discusión</b>	<b>81</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>93</b>
<b>9. Referencias</b>	<b>94</b>

## Índice de figuras

1.	Tasa estimada de incidencia y mortalidad por cáncer . . . . .	8
2.	Modelo de progresión del cáncer colorrectal . . . . .	12
3.	Modelo de iniciación y progresión del cáncer colorrectal . . . . .	14
4.	Proteína kinasa CK2 . . . . .	17
5.	Biosíntesis de Endotelina-1 . . . . .	20
6.	Rutas de señalización activadas por ET-1 . . . . .	22
7.	Estructura de la Enzima Convertidora de Endotelina-1 . . . . .	24
8.	Estructura génica y peptídica de las distintas isoformas de ECE -1 .	25
9.	Localización subcelular de ECE-1c. . . . .	27
10.	Alineamiento de la secuencia N-terminal de ECE-1c de distintas especies . . . . .	47
11.	Subclonamiento de la secuencia codificante de la región N-terminal de ECE-1c . . . . .	49
12.	Expresión y purificación de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GST (GST-NT-ECE-1c), His-CK2 $\alpha$ , GST-CK2 $\beta$ y GST. . . . .	50
13.	Fosforilación <i>in vitro</i> de la región N-terminal de ECE-1c por CK2 . .	52
14.	Análisis de la fosforilación de ECE-1c por CK2 mediante espectrometría de masas. . . . .	54
15.	Fosforilación de ECE-1 a nivel celular . . . . .	56
16.	Regulación de los niveles de mRNA de ECE-1c por inhibición de CK2	58
17.	Regulación de los niveles proteicos de ECE-1 por inhibición de CK2 con CX-4945 . . . . .	59
18.	Regulación de los niveles proteicos de ECE-1 por inhibición de CK2 con TBB . . . . .	60

19. Localización celular de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP. . . . .	62
20. Niveles de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP (NT-ECE-1c-GFP) al inhibir la actividad de CK2 . . . . .	64
21. Niveles proteicos de GFP al inhibir la actividad de CK2 . . . . .	65
22. Estabilidad de la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP en células no tumorales HEK-293T . . . . .	67
23. Estabilidad de la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP en células de cáncer de colon DLD-1 . . . . .	68
24. Estabilidad proteica de GFP en células HEK-293T y DLD-1 . . . . .	69
25. Degradación proteasomal de ECE-1c y su regulación por CK2 . . . . .	71
26. Niveles endógenos de ECE-1 en líneas celulares no tumorales y de cáncer de colon. . . . .	73
27. Estabilidad de ECE-1c silvestre y mutantes . . . . .	74
28. Ubiquitinación de ECE-1c y su regulación por CK2 . . . . .	76
29. Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la migración celular . . . . .	78
30. Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la invasión celular . . . . .	80
31. Modelo propuesto . . . . .	92

## Índice de tablas

1. Partidores utilizados para subclonamiento . . . . .	33
2. Programa PCR convencional . . . . .	34
3. Partidores utilizados para mutagénesis . . . . .	37

## **Lista de abreviaturas**

**APC** Adenomatous Poliposis Coli

**Big-ET-1** Big Endotelina 1

**CIAP** Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fosfatasa alcalina del intestino de ternera)

**CCR** Cáncer Colorrectal

**CK1** Proteína Kinasa CK1

**CK2** Proteína Kinasa CK2

**COX-2** Ciclooxygenasa 2

**C-Terminal** Extremo Carboxilo Terminal de un péptido o proteína

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ECE-1** Enzima Convertidora de Endotelina -1

**End-1** Gen de Endotelina-1

**ET-1** Endotelina 1

**ETaR** Receptor de Endotelina tipo a

**ETbR** Receptor de Endotelina tipo b

**GSK3 $\beta$**  Glicógeno Sintetasa Kinasa 3 beta

**GFP** Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde)

**GST** Glutación S-Transferasa

**hECE-1c** Isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina - 1 humana

**HRP** Horseradish Peroxidase (Peroxidasa de rábano)

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

**LRP5/6** Proteína relacionada con receptores de LDL

**NT-ECE-1c** Extremo Amino Terminal de isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina 1

**N-Terminal** Extremo Amino Terminal de un péptido o proteína

**PCR** Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

**rpm** Revoluciones por Minuto

**RT-qPCR** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**SDS-PAGE** Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

**SFB** Suero Fetal Bovino

**TCF/LEF** T-cell factor/lymphocyte enhancer factor-1

**Wnt** Wingless-type MMTV integration site

**VEGF** Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular

## Resumen

La Enzima Convertidora de Endotelina - 1c (ECE-1c) es una metaloproteasa de membrana que participa en la síntesis de Endotelina-1 y se ha demostrado que tiene un rol en invasión en cáncer de mama, ovario y próstata. La región N-terminal de ECE-1c posee tres sitios putativos de fosforilación por la proteína kinasa CK2. En esta tesis se estudió la fosforilación de ECE-1c por CK2 y cómo esto afecta la migración e invasión celular en un modelo de cáncer de colon. La hipótesis de esta tesis fue “La proteína kinasa CK2 fosforila y estabiliza a ECE-1c, promoviendo la invasividad de células de cáncer colorrectal”. El objetivo general fue determinar si la proteína kinasa CK2 fosforila a ECE-1c en su extremo N-terminal afectando su estabilidad y si esto tiene un efecto en el potencial invasivo de células de cáncer colorrectal. Para responder a esto se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1. Determinar si CK2 fosforila a ECE-1c en su región N-terminal *in vitro* y en líneas celulares de cáncer colorrectal; 2. Estudiar si CK2 regula mediante fosforilación la estabilidad ECE-1c en células no tumorales y de cáncer colorrectal; y 3. Evaluar si CK2 regula vía ECE-1c la migración e invasividad *in vitro* de células de cáncer colorrectal.

Un análisis *in silico* mostró que la región N-terminal de ECE-1c contiene tres sitios putativos de fosforilación por CK2: Thr9, Ser18 y Ser20. En base a este antecedente se realizaron ensayos *in vitro* utilizando ATP radiactivo y la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GST como sustrato, mostrando que CK2 es capaz de fosforilar dicha región. Estos resultados fueron confirmados al analizar los sustratos fosforilados con espectrometría de masas, mostrando que los residuos fosforilados *in vitro* fueron Ser18 y Ser20. Para demostrar si la fosforilación ocurre en un contexto celular, se inmunoprecipitó ECE-1 en tratamiento con el inhibidor de CK2, TBB, desde células de cáncer de colon DLD-1. La marca de fosforilación se detectó con un anticuerpo antifosfo-S/T/Y, mos-

trando que la inhibición de CK2 disminuye la marca de fosforilación de ECE-1 total. Posteriormente se evaluó si los niveles de ECE-1 eran afectados por la inhibición de CK2 en células embrionarias HEK-293T y de cáncer de colon DLD-1. Tal como se esperaba, la inhibición de CK2 utilizando TBB o CX-4945 disminuyó los niveles proteicos de la ECE-1 endógena y de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP en ambas líneas celulares. Adicionalmente, se realizaron ensayos de estabilidad proteica utilizando cicloheximida y se mostró que la inhibición de CK2 con TBB disminuyó la estabilidad de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP en células embrionarias HEK-293T y de cáncer de colon DLD-1. Por otro lado, las mutantes de ECE-1c fosfomimética (DDD) y no fosforilable (AAA) por CK2 expresadas en células CHO-K1, demostraron tener mayor y menor estabilidad proteica, respectivamente. Finalmente, ensayos funcionales de migración-3D e invasión celular utilizando cámaras de transwell/matrigel, mostraron que ECE-1c es capaz de aumentar el potencial migratorio/invasivo de células de cáncer de colon DLD-1. Además, la sobreexpresión de la mutante no fosforilable por CK2 (AAA) no fue capaz de modificar la capacidad migratoria ni invasiva de esta línea celular. En conclusión, estos resultados sugieren que CK2, por fosforilación en el extremo N-terminal, aumenta la estabilidad de ECE-1c, lo que conduce a un aumento en la invasión de células de cáncer de colon. Estos hallazgos dan luces de un nuevo mecanismo por el cual CK2 promueve la progresión maligna de esta devastadora enfermedad.

## Abstract

Endothelin Converting Enzyme - 1c (ECE-1c) is a membrane metalloprotease involved in endothelin-1 synthesis and has been shown to have a role in invasion promotion in breast, ovarian and prostate cancer. N-terminal region of ECE-1c has three putative phosphorylation sites for CK2. In this thesis, we studied whether ECE-1c phosphorylation by CK2 affects cell migration and invasion in a colon cancer model. The hypothesis of this thesis was "CK2 protein kinase phosphorylates and stabilizes ECE-1c, thereby promoting invasiveness of colorectal cancer cells." The overall objective was to determine whether CK2 protein kinase phosphorylates ECE-1c at its N-terminal affecting its stability and whether this has an effect on the invasive potential of colorectal cancer cells. In order to answer this, the following specific objectives were considered; 1. To determine whether CK2 phosphorylates ECE-1c at its N-terminal region *in vitro* and in colon cancer cell lines; 2. To study whether CK2 phosphorylation regulates ECE-1c stability in non-tumor and colorectal cancer cells; and 3. To evaluate whether CK2 regulates migration and invasion of colorectal cancer cells via ECE-1c phosphorylation.

An *in silico* analysis showed that the N-terminal region of ECE-1c has three putative phosphorylation sites for CK2: Thr9, Ser18 and Ser20. Based on this background, we performed an *in vitro* phosphorylation assay using radioactive ATP and the N-terminal region of ECE-1c fused to GST as substrate, showing that CK2 phosphorylates this region. These results were confirmed by analyzing phosphorylated substrates with mass spectrometry, showing that the phosphorylated residues were Ser18 and Ser20. To show whether phosphorylation occurs in a cellular context, we performed an immunoprecipitation assay inhibiting CK2 with TBB in DLD-1 colon cancer cells, detecting ECE-1 phosphorylation mark. Phosphorylation was detected with an antifosfo-S/T/Y

antibody showing that CK2 inhibition decreases ECE-1 phosphorylation mark. Subsequently we assessed whether ECE-1 levels were affected by CK2 inhibition in HEK-293T cells and DLD-1 colon cancer cells. As expected, CK2 inhibition using TBB or CX-4945 decreased protein levels of endogenous ECE-1 and N-terminal region of ECE-1c fused to GFP in both cell lines. Additionally, assays of protein stability were performed using cycloheximide and showed that inhibition of CK2 with TBB decreased stability of the N-terminal region of ECE-1c fused to GFP in HEK-293T and DLD-1 colon cancer cells. In this context, ECE-1c mutants phosphomimetic and not phosphorylatable by CK2 expressed in CHO-K1 cells were shown to have more or less protein stability, respectively. Finally, functional assays and 3D-cell migration and invasion using Transwell chambers, showed that ECE-1c is capable of increasing the migration/invasiveness potential in DLD-1 cells. In addition, the non-phosphorylatable by CK2 mutant was not able to increase migration or invasive capacity. In conclusion, these results suggest that colon cancer cell invasion is promoted by protein kinase CK2 through the increase of endothelin-converting enzyme-1c protein stability by phosphorylation of its N-terminal end. These findings shed lights on a novel mechanism by which CK2 promotes malignant progression of this devastating disease.

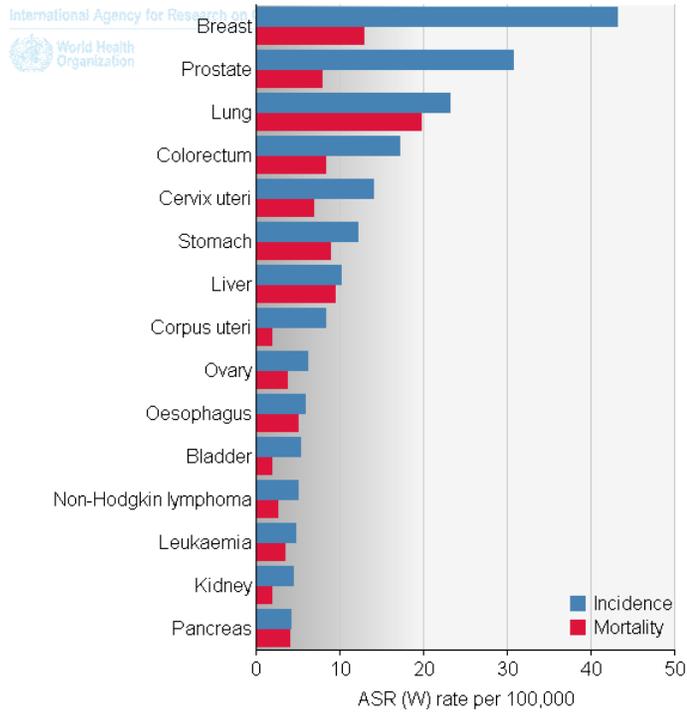
## **4. Introducción**

### **4.1. Cáncer**

#### **4.1.1. Cáncer: definición y epidemiología en Chile y el mundo**

El cáncer es una enfermedad multifactorial que consiste en la alteración de procesos celulares que conducen a la proliferación descontrolada de un determinado grupo de células. En muchos casos, estas células son capaces de migrar y colonizar otros órganos, estableciéndose y generando un daño muchas veces irreversible en el tejido, pudiendo incluso producir la muerte del individuo. Estas alteraciones son producidas por factores genéticos y epigenéticos que generan una desregulación del ciclo celular, dando lugar a células con un aumentado potencial proliferativo (Hanahan y Weinberg, 2011)

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares, con una tasa de mortalidad de 113 por cada 100.000 habitantes (GLOBOCAN, 2013). Aproximadamente, cada año hay 14,1 millones de nuevos casos, 8,2 millones de muertes por cáncer y se estima que hay más de 32 millones de personas viviendo con la enfermedad. Los cánceres más frecuentes en hombres son los de pulmón, próstata y colorrectal, mientras que en mujeres son los de mama, colorrectal y cuello del útero (GLOBOCAN, 2013). Por su incidencia y mortalidad estimada en ambos sexos, dentro de los cánceres más comunes se destaca el cáncer colorrectal (Figura 1).



**Figura 1: Tasa estimada de incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial.** En azul se muestra la tasa de incidencia y en rojo la tasa de mortalidad. *ASR (W) per 100.000*: Tasa estandarizada por edad por cada 100.000 habitantes a nivel mundial (GLOBOCAN, 2013).

En Chile el cáncer es la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares, con una tasa de mortalidad de 137 por cada 100.000 habitantes. En los últimos 10 años se ha observado una tendencia al alza, acercándose a la tasa de mortalidad provocada por las enfermedades cardiovasculares. Esto hace que el estudio de esta enfermedad sea importante, con el fin de mejorar el diagnóstico, evaluar el pronóstico y la creación de eventuales tratamientos (MINSAL, 2012).

#### **4.1.2. Biología del cáncer**

El cáncer se inicia por alteraciones epigenéticas y genéticas, como amplificaciones, traslocaciones cromosomales o mutaciones puntuales, tanto en las regiones codificantes como reguladoras de ciertos genes. Estos genes corresponden a dos grandes grupos: oncogenes y supresores de tumores. Los oncogenes favorecen la proliferación celular y/o inhiben la apoptosis, como por ejemplo Ras, c-Myc, ciclina-D1,  $\beta$ -catenina y Survivina. Los supresores de tumores son aquellos que frenan la proliferación y/o promueven la apoptosis, como por ejemplo APC, p53 y E-cadherina (Lee y Muller, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

En cáncer, los oncogenes se caracterizan por una ganancia de función y los supresores de tumores por una pérdida de función. Estas características pueden ser provocadas por cambios en actividad de las proteínas, cambios conformacionales, variaciones en sus niveles, alteraciones en localización subcelular, entre otros factores (Lee y Muller, 2010). También existe otro grupo de genes que codifican proteínas de la maquinaria de reparación de ADN, que al ser defectuosos puede aumentar la tasa de acumulación de mutaciones a medida que se producen divisiones celulares, haciendo aún más susceptible a la célula de heredar y generar alteraciones genéticas. Todas estas alteraciones pueden dar como resultado una célula con

alta inestabilidad genética, provocando una desregulación del ciclo celular, dando lugar a células con un aumentado potencial proliferativo (Lee y Muller, 2010).

A medida que se desarrolla el tumor, las células pueden adquirir un nuevo fenotipo con características tales como autosuficiencia de señales de crecimiento, resistencia a las señales inhibitorias del crecimiento, potencial replicativo ilimitado, capacidad de evasión de la apoptosis, angiogénesis sostenida, desregulación de la energética celular, evasión del sistema inmune y capacidad de invadir otros tejidos (Hanahan y Weinberg, 2011).

## **4.2. Cáncer colorrectal**

### **4.2.1. Epidemiología y aspectos clínicos**

A nivel mundial se calcula que existe aproximadamente un millón de nuevos casos de cáncer colorrectal al año, siendo los países desarrollados los más afectados, con una tasa de mortalidad anual de 25,1 por cada 100.000 habitantes (Jemal *et al.*, 2009). Se estima que cada año en el mundo se produce medio millón de muertes por causa de esta enfermedad (Meyerhardt y Saunders, 2008). Entre el 25 y 30% de los pacientes diagnosticados tendrá metástasis en el momento del diagnóstico inicial y otro 40-70% de los pacientes desarrollará metástasis hepática en el corto plazo (D'Errico y Moschetta, 2008).

En Chile los registros epidemiológicos de incidencia y mortalidad a nivel país han sido obtenidos sólo de un pequeño número de hospitales entre Antofagasta, Calama, Valdivia y Santiago. A pesar de este registro reducido, se estima que en nuestro país el cáncer colorrectal es el sexto cáncer prevalente en mujeres y el séptimo en hombres, y presenta una tasa de mortalidad de 6,2 por cada 100.000 habitantes (MINSAL, 2012; Zárate *et al.*, 2012; Donoso *et al.*, 2006).

Entre los factores de riesgo más comunes de cáncer colorrectal se encuentran el síndrome hereditario poliposis adenomatosa familiar (PAF), que se caracteriza por una mutación en el gen supresor de tumores *APC*, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la enfermedad de Crohn, diabetes y obesidad. También se considera como factor de riesgo la dieta elevada en carnes rojas, baja ingesta de ácido fólico, calcio y vitamina D (Meyerhardt y Saunders, 2008).

El cáncer colorrectal se presenta principalmente en forma de pólipos en el colon (70%), incluyendo en muchos casos el recto y el apéndice (30%). El desarrollo de la enfermedad comienza a partir de una proliferación descontrolada de células epiteliales que llevan a la formación de un pólipo adenomatoso, el cual muchas veces crece y genera una displasia de alto grado y, en último término, un carcinoma invasivo o un tumor maligno (Meyerhardt y Saunders, 2008). Este modelo fue propuesto por Jackman y Mayo en el año 1951 y actualmente se sigue utilizando como una aproximación teórica para el desarrollo de este tipo de cáncer (Figura 2).

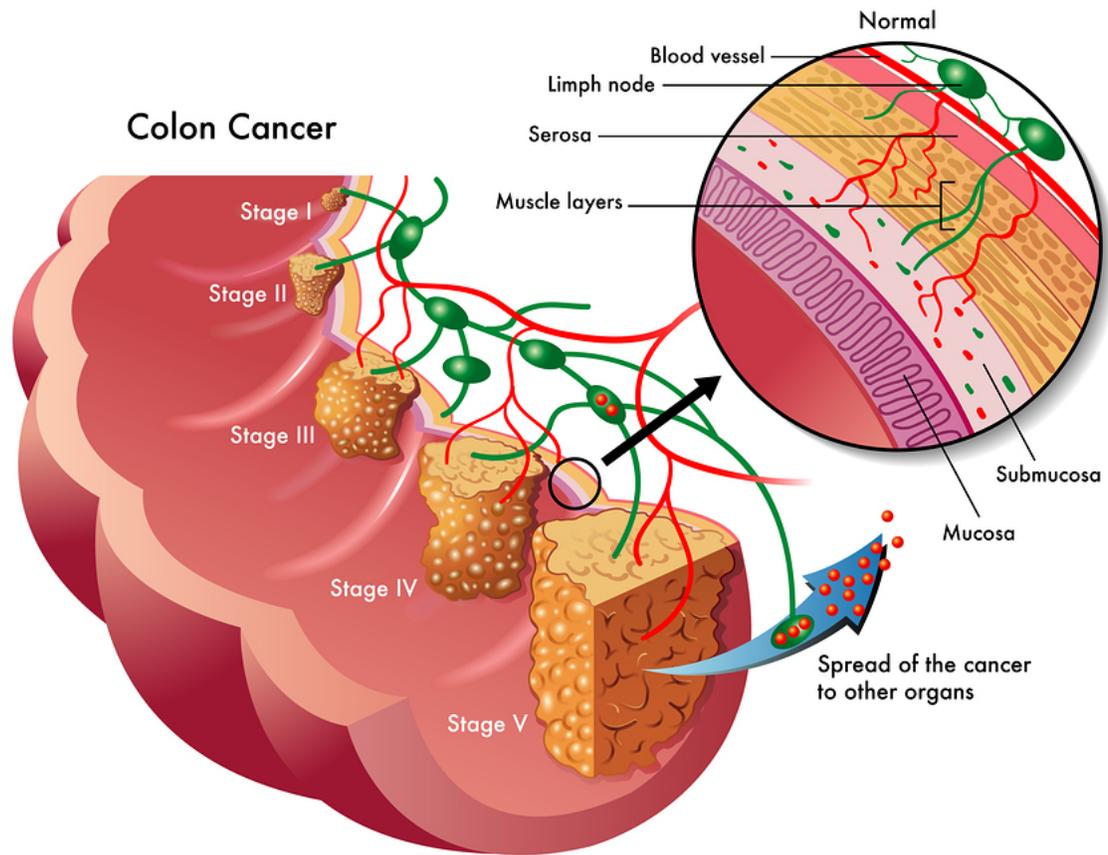


Figura 2: **Modelo de progresión del cáncer colorrectal.** Etapa I: el pólipo está contenido en las paredes del epitelio colorrectal. Etapa II: las células han traspasado el epitelio hasta las capas musculares. Etapa III: el tumor se encuentra vascularizado. Etapa IV: las células malignas han invadido linfonodos proximales. Etapa V: las células cancerosas metastizan otros órganos (Meyerhardt y Saunders, 2008).

#### 4.2.2. Diagnóstico, pronóstico y terapia

Las primeras etapas del cáncer colorrectal son generalmente asintomáticas, sin embargo, en etapas avanzadas las manifestaciones clínicas más recurrentes son la hemorragia digestiva intermitente, dolor cólico y obstrucción del colon. Es por esto que, en la mayoría de los casos, los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas, disminuyendo el porcentaje de supervivencia a medida que la enfermedad progresa (Meyerhardt y Saunders, 2008).

El diagnóstico clínico del cáncer colorrectal ocurre en primer lugar con una colonoscopia seguida de una biopsia del pólipo o del tumor. Esta consiste en evaluar la morfología del tejido con tinción clásica de hematoxilina/eosina y en algunos casos utilizando marcadores de citoqueratinas propias de tejido epitelial (Meyerhardt y Saunders, 2008). Sin embargo, la detección y pronóstico del cáncer de colon aún es deficiente, sobretodo en etapas tempranas, por lo que son necesarios nuevos marcadores que permitan mejorar estos procesos.

No obstante, se conoce mucho sobre la progresión del cáncer colorrectal, la cual coincide con la acumulación de alteraciones genéticas que incluyen la pérdida de función de supresores de tumores como *APC* y *p53*, así como la ganancia de función de oncogenes, como *cMYC* y *kRAS* (Rizk y Barker, 2012). El orden de aparición de algunas mutaciones puede variar, sin embargo, la acumulación de estas anomalías genéticas se relaciona directamente con la malignidad de la progresión neoplásica así como el mal pronóstico de la enfermedad (Figura 3).

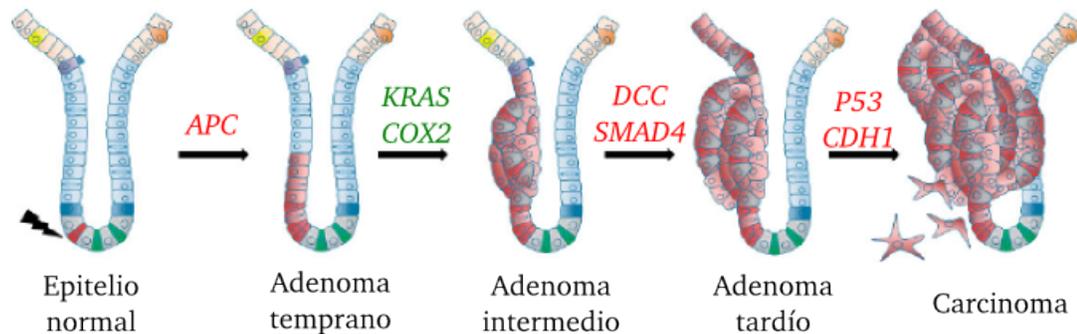


Figura 3: **Modelo de iniciación y progresión del cáncer colorrectal.** En rojo se muestran los supresores de tumores con pérdida de función y en verde los oncogenes que presentan ganancia de función (Rizk y Barker, 2012).

El tratamiento del cáncer colorrectal depende del estadio de la enfermedad, siendo las principales modalidades terapéuticas la cirugía (etapas I y II), la quimioterapia (adyuvante y neoadyuvante) y la radioterapia. Esta última es la modalidad menos utilizada, siendo la quimioterapia la alternativa más importante, sobretodo en pacientes metastásicos. Entre los fármacos quimioterapéuticos más utilizados están las fluoropirimidinas, irinotecán y oxaliplatino; aunque actualmente se están utilizando tratamientos más específicos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2) y contra el receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGFR) (Meyerhardt y Saunders, 2008).

Como no existe un tratamiento completamente efectivo ni un medio eficaz de detección y pronóstico del cáncer colorrectal, en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo por entender la biología molecular y celular de la enfermedad, así como los mecanismos que participan en su génesis y progresión.

### 4.3. Rutas de señalización relacionadas con cáncer colorrectal

#### 4.3.1. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina o ruta Wnt/canónica

La ruta Wnt/ $\beta$ -catenina es una de las rutas de señalización más importantes involucradas en varios cánceres, incluido el cáncer colorrectal. Existe una gran diversidad de moléculas relacionadas con esta ruta, como CK2, COX-2 y AKT, que tienen un papel muy importante en la tumorigénesis y progresión del cáncer colorrectal (Ponce *et al.*, 2011a; Ponce *et al.*, 2011b; McDonald *et al.*, 2009).

La ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina regula eventos importantes en el desarrollo y remodelamiento de algunos tejidos, teniendo implicancias directas en la proliferación y migración celular (McDonald *et al.*, 2009). Esta vía se encuentra normalmente activa en células epiteliales, tales como las del colon, que están en constante regeneración y muerte (Kim *et al.*, 2005). La proliferación, muerte y migración son características celulares claves en la progresión tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011) y se ha visto un aumento en la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en células de varios tipos de cáncer, incluido el colorrectal (Widelitz *et al.*, 2005).

La proteína central de esta vía es  $\beta$ -catenina que actúa como coactivador transcripcional de genes relacionados con proliferación, resistencia a la muerte e invasión celular. Cuando la ruta de señalización está inactiva, el receptor Frizzled y el co-receptor LRP5/6 se encuentran libres y  $\beta$ -catenina interactúa con un complejo citoplasmático compuesto por las proteínas Axina, APC, GSK3 $\beta$  y CK1 $\alpha$ . Estas últimas dos corresponden a Ser/Thr-quinasas que fosforilan a  $\beta$ -catenina, promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma.

Por el contrario, la activación por unión de un ligando Wnt a estos receptores, como por ejemplo Wnt1 o Wnt3a, impide que las fosforilaciones ocurran y  $\beta$ -catenina se estabiliza en el citoplasma, permitiéndose su estabilización y migra-

ción al núcleo, donde cumple su papel de coactivador transcripcional (Widelitz *et al.*, 2005). Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina es capaz de unirse a los factores de transcripción de la familia Tcf/Lef, promoviendo la expresión de genes responsables de la proliferación, invasión y migración celular, características aumentadas en cáncer. Entre estos genes podemos encontrar a los genes codificantes de Survivina, c-Myc, COX-2 y VEGF, los cuales contienen en sus regiones promotoras sitios de unión a los factores de transcripción Tcf/Lef (He *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007).

En cáncer, específicamente en cáncer colorrectal, la activación aberrante de la vía puede ser a través de la hiperactivación de componentes río abajo del receptor y no necesariamente a través de ligandos Wnt, como por ejemplo la mutación de APC, que impide la degradación normal de  $\beta$ -catenina. Asimismo, la sobreactivación de las kinasas CK2 y AKT promueven la estabilización  $\beta$ -catenina y su migración al núcleo, potenciando su papel como coactivador transcripcional (Widelitz *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2006; Ponce *et al.*, 2011a).

#### **4.3.2. La proteína kinasa CK2 y su papel en la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina**

Un conocido regulador positivo de la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina es la proteína serina/treonina kinasa CK2, que tiene un papel importante en varios procesos celulares relacionados con la expresión génica, proliferación y viabilidad celular (Trembley *et al.*, 2010; Niefind *et al.*, 2009; Tapia *et al.*, 2006)

CK2 está formada por dos tipos de subunidades, una catalítica ( $\alpha$  o  $\alpha'$ ) y una regulatoria ( $\beta$ ), estableciéndose un heterotetrámero que se puede encontrar en las combinaciones  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha'_2\beta_2$  o  $\alpha\alpha'\beta_2$  (Niefind *et al.*, 2001; Niefind *et al.*, 2009). Ambas subunidades regulatorias forman un dímero que favorece la unión de las subuni-

dades catalíticas, generando una estructura tipo mariposa que representa el estado máximo de activación (Figura 4). La secuencia consenso para fosforilación de los sustratos proteicos de CK2 es S/TXXD/E/<sup>P</sup>Y/<sup>P</sup>S/<sup>P</sup>T y se ha descrito que generalmente se encuentra próxima a regiones predominantemente acídicas, es decir, ricas en residuos D, E, o un residuo fosforilado (<sup>P</sup>) (Trembley *et al.*, 2010; Meggio y Pinna, 2003).

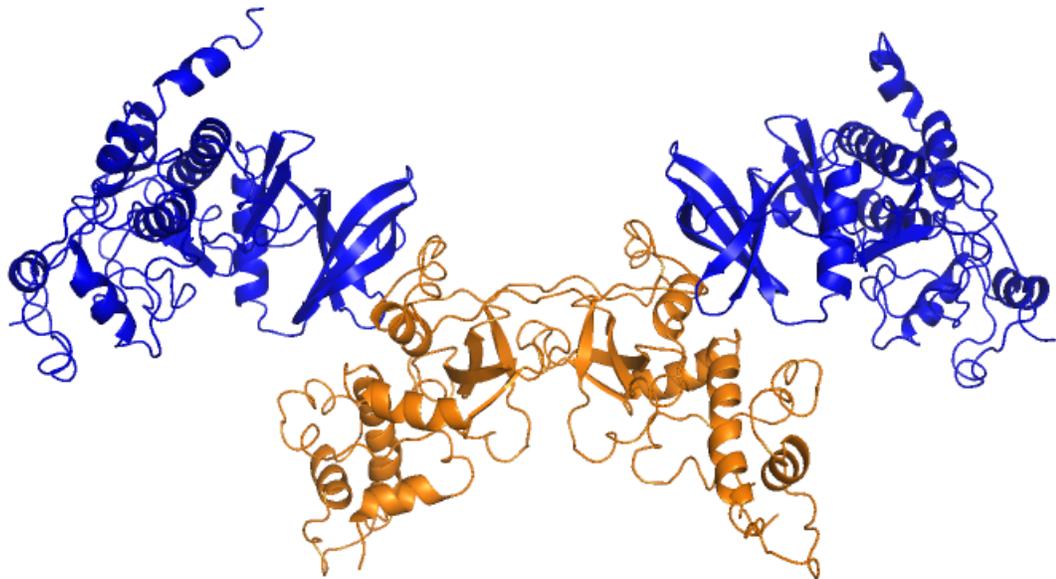


Figura 4: **Proteína kinasa CK2.** Representación de la estructura de CK2 obtenida por cristalografía. En azul se muestran las dos subunidades catalíticas  $\alpha$  y en naranja las subunidades regulatorias  $\beta$ . La figura se realizó con el programa PyMol 1.7.0.0-1 utilizando el archivo PDB IJWH obtenido por difracción de rayos X (Niefind *et al.*, 2001).

Los niveles proteicos de CK2, en particular de la subunidad catalítica  $\alpha$ , se encuentran aumentados en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer colorrectal, y su sobreexpresión en modelos celulares y/o animales se correlaciona con un aumento en proliferación y disminución de la apoptosis, entre otras características importantes en el desarrollo tumoral (Litchfield, 2003).

Se conocen más de 300 sustratos de CK2, lo que se relaciona con su rol en diversos procesos celulares, como por ejemplo replicación, transcripción, traducción, proliferación y muerte celular (Litchfield, 2003; Meggio y Pinna, 2003; Trembley *et al.*, 2010). Muchos de estos procesos están desregulados en cáncer, donde CK2 tiene un rol fundamental, por ejemplo, promoviendo proliferación mediante la fosforilación de proteínas reguladoras del ciclo celular, como p53, p27<sup>KIP1</sup>, p34<sup>cdc2</sup>, cdc34, Topoisomerasa II, entre otros (Litchfield, 2003).

En nuestro grupo de investigación se ha descrito que CK2 tendría un rol importante en la disminución de la muerte a través de la activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina y la subsecuente expresión de una proteína inhibidora de la apoptosis (IAP), Survivina, o regulando otras rutas de señalización, como la de PI3K/AKT (Tapia *et al.*, 2006; Ponce *et al.*, 2011a y 2011b). Asimismo, se ha descrito que CK2 puede promover la viabilidad de células de cáncer colorrectal mediante la regulación positiva de la expresión de la enzima COX-2 y la consecuente producción de PGE-2, lo que liga a CK2 con la progresión tumoral por la producción de factor soluble auto y paracrino (Yefi *et al.*, 2011). Estas características, sumada a muchas otras, han llevado a sugerir que en las células cancerígenas se produciría una suerte de “adicción” a CK2 (Ruzzene y Pinna, 2010).

### 4.3.3. Rol de CK2 en estabilidad de proteínas

Se ha descrito que CK2 regula negativamente la degradación proteasomal de ciertas proteínas. Por ejemplo la fosforilación de c-Myc por CK2 previene su degradación proteasomal, potenciando la transcripción de genes involucrados en la progresión del cáncer (Duncan y Litchfield, 2008).

Otros trabajos han demostrado que CK2 fosforila a  $\beta$ -catenina en residuos distintos a los residuos que favorecen su ubiquitinación, estabilizándola y protegiéndola de su degradación proteasomal a través de un mecanismo relacionado con el bloqueo de la unión de APC en el complejo de degradación (Song *et al.*, 2000). En este sentido, estudios realizados en nuestro grupo han mostrado que la estabilización de  $\beta$ -catenina por la Ser/Thr-kinasa AKT/PKB, también sería un evento regulado en parte por CK2, ya que esta última fosforilaría a AKT en Ser129, hiperactivándola, promoviendo la estabilización de  $\beta$ -catenina y favoreciendo su localización nuclear (Ponce *et al.*, 2011a y 2011b).

## 4.4. Eje Endotelina-1 en cáncer

### 4.4.1. Eje Endotelina-1

Uno de los genes blancos de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina y que últimamente ha recibido mucha atención por su participación como mitógeno es *EDN1*, que codifica el precursor de Endotelina-1 (ET-1), un péptido con variadas funciones celulares (Smollich y Wülfing, 2007). ET-1 se genera inicialmente a partir del precursor PrePro-Endotelina-1 (PrePro-ET-1) de 212 aminoácidos, el cual es procesado por una endopeptidasa a Big-Endotelina-1 (Big-ET-1), de 39 aminoácidos. Posteriormente, la generación del péptido (ET-1) activo se lleva a cabo por la Enzima Con-

vertidora de Endotelina-1 (ECE-1), la cual rompe el enlace entre el triptófano 21 y la valina 22, produciendo un péptido de 21 aminoácidos con actividad biológica (Shimada *et al.*, 1995; Valdenaire *et al.*, 1999a) (Figura 5).

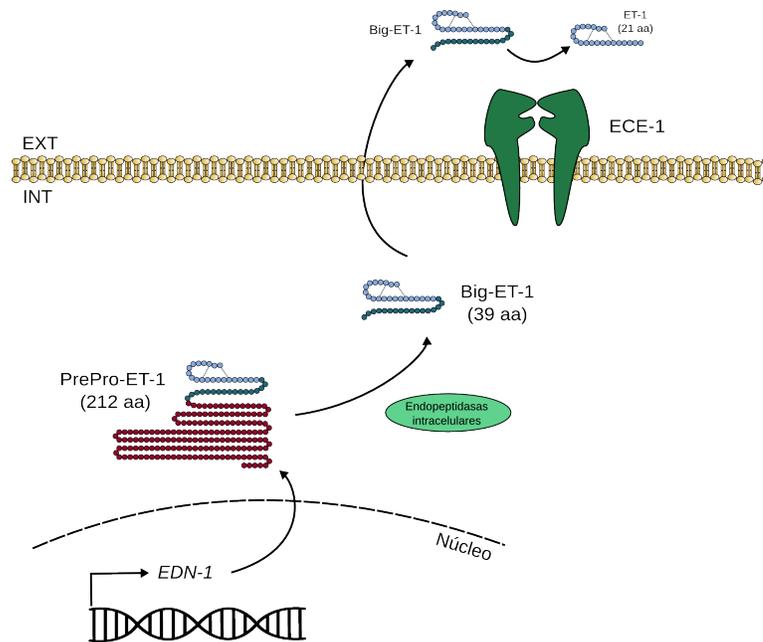


Figura 5: **Biosíntesis de Endotelina-1.** En la figura se muestra la expresión del gen *EDN1*, que codifica el precursor PreProEndotelina-1 (PrePro-ET-1), el cual es procesado intracelularmente por una endopeptidasa a Big-Endotelina-1 (Big-ET-1). Posteriormente, la Enzima Convertidora de Endotelina-1 (ECE-1), mostrada como un homodímero de membrana, produce el péptido activo (ET-1) de 21 aminoácidos (Shimada *et al.*, 1995).

La función celular de ET-1 es mediada por dos tipos de receptores acoplados a proteína G, ETaR y ETbR, desencadenando diversos eventos de señalización relacionados con su rol vasoactivo y en proliferación celular (Khimji y Rockey, 2010). Se ha descrito que ET-1 es un péptido altamente vasoactivo que tiene funciones importantes en la vasoconstricción y regulación cardíaca, por lo que su desregulación influye directamente en la generación de diversas enfermedades, como hipertensión y falla renal aguda (Khimji y Rockey, 2010).

Sin embargo, ET-1 también tiene una participación relevante en el crecimiento y proliferación celular, lo que significa que posee un alto potencial mitogénico y se ha sugerido que existe una estrecha relación entre alteraciones en el eje ET-1 y diversos tipos de cáncer, entre ellos el colorrectal (Rosanò *et al.*, 2013).

#### **4.4.2. Alteraciones del eje ET-1 en cáncer**

La expresión aberrante de ET-1 y sus receptores o la alteración de los elementos involucrados en esta vía de señalización, pueden contribuir a la iniciación y/o progresión tumoral, ya sea de forma autocrina o paracrina. En diferentes tipos de cáncer, incluido el colorrectal, se ha propuesto que la activación aberrante del eje ET-1 frecuentemente se relaciona con mal pronóstico. Esto se debe a que la señalización de ET-1 puede promover proliferación celular, sobrevivencia, transición epitelio-mesénquima, alteración de la respuesta inmune o resistencia a drogas (Rosanò *et al.*, 2013) (Figura 6). Es por esto que los receptores de ET-1 se han propuesto como blancos terapéuticos y se ha demostrado que el uso de antagonistas puede disminuir la progresión tumoral en modelos animales, sin embargo, estos estudios todavía no se han desarrollado en el área clínica, haciéndose necesario la evaluación de otros factores y proteínas del eje ET-1 (Rosanò *et al.*, 2013).

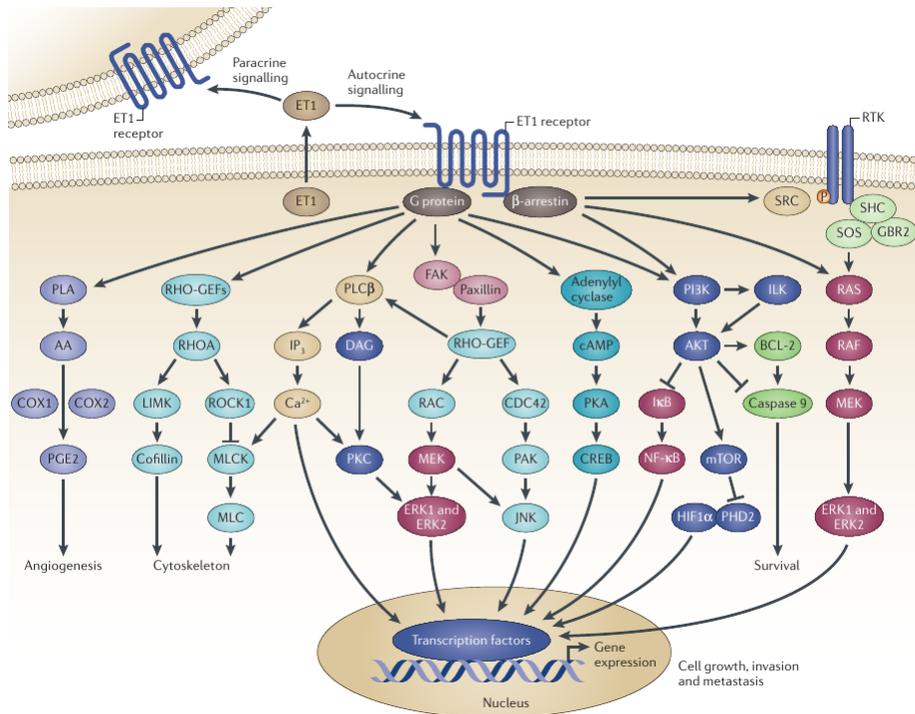


Figura 6: **Rutas de señalización activadas por ET-1.** El receptor de Endotelina-1, cuya isoforma predominante en cáncer es el tipo A ( $ET_A$ R), que se acopla a una proteína  $G\alpha$  (generalmente q) y/o a proteínas de andamiaje, como  $\beta$ -arrestina. Esto gatilla la activación de diversas rutas de señalización y proteínas, tales como  $PLC\beta$ , MAPK, PI3K, Adenilato ciclasa, Rho-GEFs, entre otras, así como la activación cruzada de receptores tirosina kinasa, activando las rutas de SRC y RAS. La activación de estas rutas puede conducir a un aumento en la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, angiogénesis y remodelación del citoesqueleto, todas estas características fundamentales en la progresión tumoral (Rosanò *et al.*, 2013).

#### 4.4.3. Rol de ECE-1 en el Eje Endotelina-1

El péptido activo ET-1 tiene una vida media de sólo 1 minuto, siendo procesado e inactivado por la enzima Neprilisina (NEP). En consecuencia, sus efectos biológicos son completamente dependientes de la continua conversión de Big-ET-1 a ET-1 por la Enzima Convertidora de Endotelina-1 (ECE-1) (Rosanò *et al.*, 2013).

La ECE-1 es una metaloproteasa integral de membrana tipo II, perteneciente a la familia M13 de metaloproteasas dependientes de zinc. Otros miembros de esta familia son NEP, el antígeno de grupo sanguíneo (Kell), la endopeptidasa neutra reguladora de fosfato (PHEX), la enzima convertidora X (XCE) y diversas endopeptidasas secretadas solubles (Pelayo *et al.*, 2011). La ECE-1 está constituida por un dominio catalítico extracelular (C-terminal), una región de transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático (N-terminal) de aproximadamente 60 residuos. Su localización en la membrana celular corresponde a un dímero unido por puentes disulfuros (Shimada *et al.*, 1996) (Figura 7). Su síntesis se inicia en el retículo endoplasmático y se glicosila en el complejo de Golgi, llegando finalmente a la membrana plasmática (Shimada *et al.*, 1996).

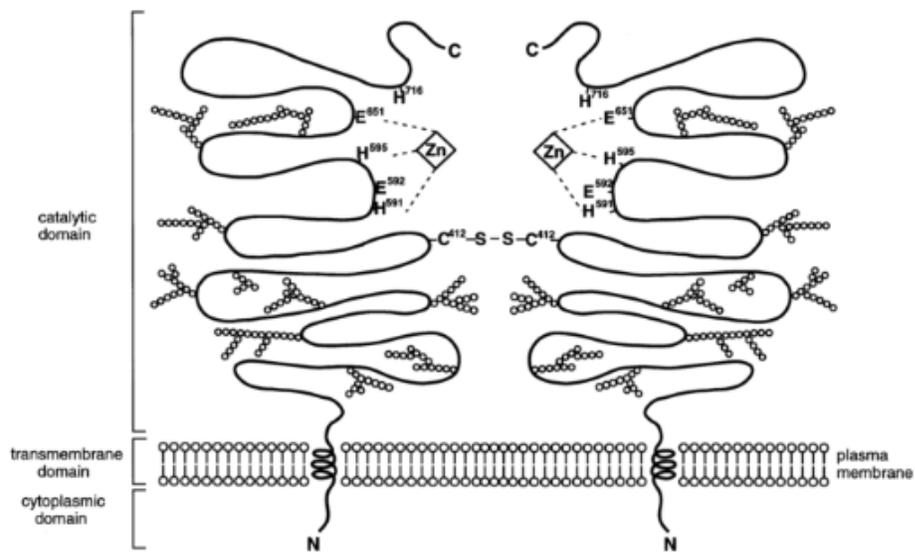


Figura 7: **Estructura de la Enzima Convertidora de Endotelina-1.** Esquema representativo de ECE-1 en la membrana celular formando un homodímero. Se muestra la coordinación de Zinc en el dominio catalítico extracelular, el puente disulfuro y los diez sitios putativos de glicosilación por subunidad (Shimada *et al.*, 1996).

#### 4.4.4. Isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina-1

Se ha descrito cuatro isoformas de ECE-1 (a, b, c, d) que difieren en la secuencia de la región N-terminal, localización subcelular y distribución en los tejidos, sin embargo, todas tienen propiedades catalíticas similares (Schulz *et al.*, 2009). El gen codificante de ECE-1c está ubicado en el cromosoma 1, compuesto por 19 exones. Las diferencias en la región N-terminal entre las cuatro isoformas se deben a variaciones de corte y empalme de los exones 1-4 y por la presencia de un promotor independiente para cada isoforma (Shimada *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 2003) (Figura 8).

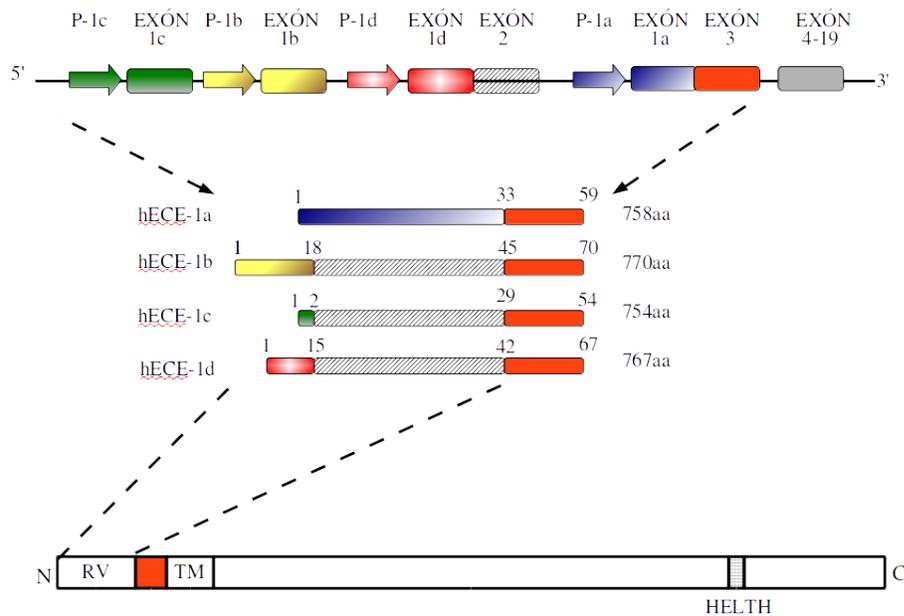


Figura 8: **Estructura génica y peptídica de las distintas isoformas de ECE-1.** Arriba, estructura del gen conteniendo los promotores alternativos para cada isoforma. Al medio, las variantes peptídicas de cada isoforma. Abajo, la estructura esquemática de ECE-1, en donde RV es la región intracelular variable de cada isoforma, en naranja la porción intracelular común, y TM la fracción transmembrana. HEALTH corresponde al motivo de unión a zinc. Modificado de MacLeod *et al.*, 2002.

Las variaciones en secuencia proteica son mínimas entre las isoformas b, c y d, diferenciándose en aproximadamente 15 aminoácidos. Por otro lado, la isoforma ECE-1a es la que presenta mayor variabilidad en la región N-terminal, con una porción intracelular de 32 aminoácidos totalmente distinta a las otras tres (MacLeod *et al.*, 2002). Todas las isoformas presentan la misma región transmembrana y dominio catalítico, y procesan Big-ET-1 con similar eficiencia catalítica, con un pH óptimo de 6,8 (Valdenaire *et al.*, 1999).

La localización subcelular de ECE-1 es diferente para cada isoforma: la variante ECE-1a se ha encontrado localizada principalmente en la membrana plasmática y nuclear; ECE-1b se localiza principalmente a nivel de Golgi; ECE-1c se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática y vesículas citoplasmáticas; y ECE-1d en la membrana plasmática, en vesículas endosomales y en Golgi (Schweizer *et al.*, 1997; Valdenaire *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2003; Jafri y Ergul, 2003; Kuruppu *et al.*, 2010) (Figura 9).

#### **4.4.5. Rol de ECE-1c en cáncer**

Se ha descrito que la expresión de la enzima ECE-1 es elevada en distintos tipos de cáncer, como pulmón, glioblastoma, boca, tiroides y colon (Awano *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2010). Interesantemente, la isoforma ECE-1c se ha descrito como la variante más importante en la progresión tumoral, ya que es la que presenta mayor expresión en tejidos y líneas celulares tumorales (Awano *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2010).

Distintos autores han planteado que la isoforma ECE-1c es importante en la progresión del cáncer mamario y prostático, ya que al ser sobreexpresada en líneas

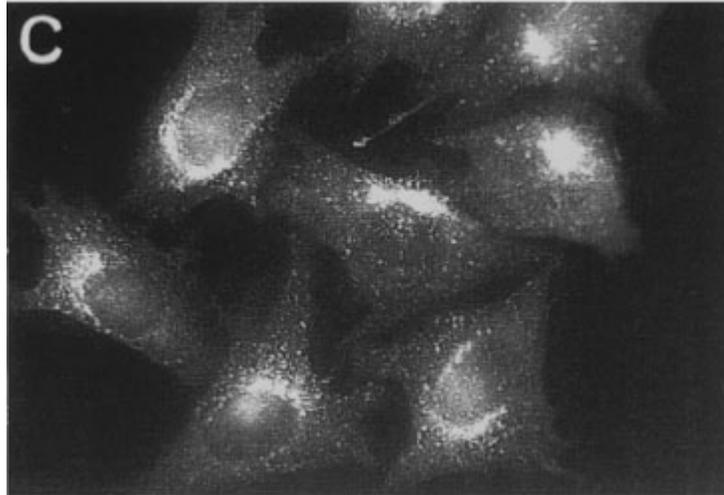


Figura 9: **Localización subcelular de ECE-1c.** Inmunofluorescencia de ECE-1c en células CHO-K1 (Modificado de Schweizer *et al.*, 1997).

celulares se ha observado un aumento de la invasión *in vitro* en cámaras de Transwell/Matrigel (Smollich *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008). En contraparte, se ha observado un rol totalmente distinto de la isoforma ECE-1a, ya que al ser sobreexpresada en células de cáncer prostático su potencial invasivo se ha visto disminuido a pesar de que también participa en la producción de ET-1 (Lambert *et al.*, 2008).

Si bien, los efectos de ET-1 en la progresión tumoral son dependientes de la acción catalítica de ECE-1, no existen evidencias sustantivas que demuestren que esta enzima tiene un rol en invasión celular de manera dependiente de la producción de ET-1. Incluso en un modelo de cáncer prostático se ha propuesto que los efectos de ECE-1, particularmente de ECE-1c, no serían dependientes de ET-1 (Lambert *et al.*, 2008). Estos mismos autores han propuesto que las isoformas ECE-1b y ECE-1d no presentan grandes variaciones en su expresión en células tumorales y tampoco se ha visto que su sobreexpresión incremente la invasión *in vitro*.

Como ya se ha mencionado, estas isoformas presentan distinta localización sub-

celular y su secuencia peptídica es sólo distinta en la porción N-terminal, lo que sugiere que esta fracción aminoacídica de ECE-1c es clave en su distribución y probablemente también en su función en invasión celular. Lo anterior reviste gran relevancia, ya que sólo un pequeño número de aminoácidos localizados en el extremo N-terminal de ECE-1c serían los responsables de la capacidad invasiva observada en células de cáncer de próstata (Lambert *et al.*, 2008). Al respecto, se ha descrito que ECE-1c es fosforilada en su extremo N-terminal por la proteína kinasa PKC en Thr4 y Ser35, lo que aumentaría su actividad catalítica y favorecería su localización en la membrana celular, pero hasta la fecha no se ha demostrado si este proceso tiene algún efecto directo en la progresión tumoral ni en su rol en invasión (Smith *et al.*, 2006; Kuruppu *et al.*, 2010; Kuruppu *et al.*, 2012a y 2012b).

En este sentido, un análisis *in silico* realizado en nuestro grupo mostró que la región N-terminal citoplasmática de ECE-1c (NT-ECE-1c) presenta tres sitios putativos de fosforilación por la proteína kinasa CK2, Thr9, Ser18 y Ser20. No obstante, no se ha descrito si estas fosforilaciones ocurren a nivel celular y, menos aún, si tienen un rol en su función promotora de la invasión celular. De ocurrir lo anterior, se podría sugerir a la ECE-1c como un potencial blanco de CK2 y eventualmente podría tener un papel en la progresión tumoral, específicamente en la invasión de células de cáncer de colon.

#### 4.5. Hipótesis y Objetivos:

En síntesis, la literatura indica que:

- CK2 fosforila a un gran número de proteínas, regulando diversos procesos involucrados en el desarrollo del cáncer de colon.
- CK2 promueve la estabilidad de diversas proteínas a través de su fosforilación.
- ET-1 es un mitógeno relevante en cáncer colorrectal y su activación depende de ECE-1.
- La expresión de ECE-1 está aumentada en distintos tipos de cáncer, incluido cáncer de colon.
- ECE-1c es la única isoforma capaz de incrementar el fenotipo invasivo en células de cáncer prostático.
- La región N-terminal de ECE-1c presenta tres sitios putativos de fosforilación por CK2.

En consecuencia, la hipótesis de esta tesis es:

**“La proteína kinasa CK2 fosforila y estabiliza a ECE-1c, promoviendo la invasividad de células de cáncer colorrectal”.**

#### 4.5.1. Objetivos

**Objetivo General** Determinar si la proteína kinasa CK2 fosforila a ECE-1c en su extremo N-terminal afectando su estabilidad y si esto tiene un efecto en el potencial invasivo de células de cáncer colorrectal.

#### **Objetivos Específicos**

**OE1.** Determinar si CK2 fosforila a ECE-1c en su región N-terminal *in vitro* y en líneas celulares de cáncer colorrectal.

**OE2.** Estudiar si CK2 regula mediante fosforilación la estabilidad ECE-1c en células no tumorales y de cáncer colorrectal.

**OE3.** Evaluar si CK2 regula vía ECE-1c la migración e invasividad *in vitro* de células de cáncer colorrectal.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Tampones y soluciones

1. **Medio de cultivo LB:** 10 g/L Triptona; 5 g/L Extracto de levadura; 5 g/L Cloruro de Sodio.
2. **Medio de cultivo LBA:** LB suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicilina.
3. **Buffer universal de digestión de DNA:** 1 M Acetato de Potasio; 250 mM de Tris pH 7,6; 100 mM Acetato de Magnesio; 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  albúmina sérica bovina.
4. **Buffer de Elución de DNA:** Acetato de Sodio, 0,3 M SDS, 0,1 % Cloruro de Magnesio, 10 mM Tris, 10 mM (pH 6.8).
5. **Solución de Tinción de proteínas:** 0,1 % Azul de Coomassie; 50 % Metanol; 10 % Ácido Acético.
6. **Solución Decolorante:** 20 % Metanol; 10 % Ácido Acético.
7. **Buffer PBS-T:** 1X PBS; 0,1 % Tween20.
8. **Buffer PBS-T-L5 %:** PBS-T; 5 % leche descremada.
9. **Buffer de lavado de columna:** 50 mM HEPES; 5 % Glicerol; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.
10. **Buffer de dilución de proteínas:** 10 mM HEPES; 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 20 % Glicerol.
11. **Buffer de diálisis de proteínas:** 50 mM Tris pH 8; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,01 % Tritón X-100; 150 mM Cloruro de Sodio, 10 % Glicerol.

12. **Buffer de fijación para inmunocitoquímica:** 4% Paraformaldehído; 100 mM PIPES pH 6,8; 40 mM Hidróxido de Potasio; 2 mM EGTA; 2 mM Cloruro de Magnesio.
13. **Solución de fosforilación 5X:** 250 mM HEPES; 37,5 mM Cloruro de Potasio; 35 mM Cloruro de Magnesio; 2,5 mM DTT; 0,25 mM ATP.
14. **Solución de fosforilación H-0:** 20 mM HEPES pH 7,9; 2 mM EGTA; 5 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 10% glicerol.
15. **Buffer de carga de proteínas 4X:** 0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 8% p/v SDS; 40% Glicerol; 0,04% p/v Azul de bromofenol; 20%  $\beta$ -mercaptoetanol.
16. **Buffer de lisis para IP:** 1% NP-40; 20 mM Tris pH 7,4; 50 mM Cloruro de Sodio; inhibidor de fosfatasas y de proteasas 1X.
17. **Buffer I ubiquitinación:** 6 M Cloruro de Guanidinio; 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8; 10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1% Triton-X 100; 5 mM Imidazol; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.
18. **Buffer II ubiquitinación:** 8 M Urea; 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_4\text{PO}_4$  pH 8; 10 mM Tris-HCl pH 8; 0,2% triton-X 100; 5 mM Imidazol; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.

## 5.2. Construcción de los vectores

### 5.2.1. Amplificación y purificación de la secuencia codificante del fragmento N-terminal de ECE-1c

Los partidores diseñados amplifican el extremo 5' de ECE-1c, correspondiente a los primeros 300 nucleótidos que codifican la región intracelular y la porción transmembrana de la proteína. Sus secuencias se detallan en la Tabla 1.

Para la reacción de PCR se utilizó la DNA polimerasa Taq Platinum HiFi de Invitrogen. Se amplificó la banda utilizando el vector pCDNA-3-ECE-1c como templado en un volumen total de 50  $\mu$ L y se verificó en un gel de agarosa al 1 % utilizando Gel Red para la visualización de las bandas de DNA en transiluminador UV. El programa de PCR se detalla en la Tabla 2. El producto de PCR se clonó entre los sitios *EcoRI/BamHI* del vector pGEX-2T (GE Healthcare, UK). La secuencia que codifica la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP se amplificó utilizando los partidores NT2 (Tabla 1) y se clonó en el vector pEGFP-N1 (Clontech, CA, USA).

Tabla 1: **Partidores utilizados para subclonamiento.** NT1 directo y NT1 reverso amplifican el cDNA del extremo 5' de ECE-1c (residuos 1 a 100) y se utilizaron para el subclonamiento en el vector pGEX-2T. NT2 directo y NT2 reverso amplifican el cDNA del extremo 5' de ECE-1c (residuos 1 a 100) y se utilizaron para el subclonamiento en el vector pEGFP-N1.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
NT1 Dir	ggatccatgatgtcgacgtacaagcgggcc
NT1 Rev	gcggccgctccatggagctcaagatggag
NT2 Dir	ccggaattccggatgatgtcgacgtacaagegg
NT2 Rev	cgggatcccgctccatggagctcaagatggag

Para la purificación del fragmento, el producto de PCR se cargó en un gel de acrilamida al 5 %, se incubó con Gel Red por 5 minutos y se visualizó en luz UV. Se cortó la porción correspondiente a la banda amplificada y se incubó con 1,2 mL de buffer de elución de DNA a 37°C por toda la noche en agitación fuerte. Luego, para eliminar los restos de acrilamida se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm a 4°C. Para precipitar el DNA, el sobrenadante se incubó con 0,7 volúmenes de isopropanol al 100 % por 30 minutos a -80°C y se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. El precipitado se lavó con etanol al 80 % y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones de velocidad y tiempo. El pellet se resuspendió en 10  $\mu$ L de

agua libre de nucleasas.

Tabla 2: Programa PCR convencional

Temperatura (°C)	Tiempo	N° Ciclos
94	3'	—
94	30"	30
60	45"	
72	45"	
72	5'	—

### 5.2.2. Subclonamiento en vector transportador pGEM-T-easy

Para el subclonamiento en vector pGEM-T-easy se siguió la misma metodología para el fragmento que fue clonado en pGEX-2T y en pEGFP-N1.

Ligación en pGEM-T-easy: por separado, se mezclaron 7  $\mu$ L de cada producto de PCR, 1  $\mu$ g de vector pGEM-T-easy, 3 unidades de Ligasa del fago T4, buffer de ligación, en un volumen final de 10  $\mu$ L y se dejó a temperatura ambiente por 48 horas. Luego, se electroporó 1  $\mu$ L del producto de ligación en 30  $\mu$ l de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes y se dejó creciendo en 1 mL de medio TB por 30 minutos a 37°C con agitación fuerte. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 4000 rpm a 4°C y se resuspendió el pellet en 200  $\mu$ L de LB. Se sembró dicho volumen en placas LBA/XGal y se incubó a 37°C por 12 horas.

Selección de colonias transformantes: se seleccionaron 5 colonias blancas y se crecieron toda la noche en 5 mL de medio líquido LBA a 37°C con agitación fuerte. Se extrajo el DNA plasmidial siguiendo el protocolo estándar de lisis alcalina y luego de liberar el fragmento con la enzima *EcoRI*, se analizaron a través de electroforesis en agarosa al 1 % en presencia de Gel Red.

### 5.2.3. Subclonamiento en los vectores pGEX-2T y en pEGFP-N1

Obtención de inserto desde pGEM-T-easy-NT-ECE-1c: Se seleccionó un clon positivo y se le extrajo el DNA plasmidial correspondiendo al constructo pGEM-T-easy-N-ECE-1c. Se realizó la digestión enzimática con *BamHI* utilizando 10 unidades de enzima y buffer universal de digestión a una concentración final de 1,5X en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , y se incubó a 37°C por 10 horas. Se verificó la linealización del vector y se agregaron 10 unidades de *EcoRI*. Finalmente, se verificó la liberación del inserto y se purificó a partir de un gel de acrilamida al 5 %, se eluyó y precipitó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Digestión de los vectores pGEX-2T y pEGFP-N1: Se realizó la digestión de ambos vectores por separado con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* en las mismas condiciones utilizadas en la digestión del inserto. Luego, se purificó en un gel de acrilamida al 5 % y se escindió la banda utilizando el mismo protocolo de purificación y precipitación de DNA descrito anteriormente. El plasmidio se resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

Ligación: Previo a la ligación, se cuantificaron las soluciones de DNA de inserto y vector. La reacción se realizó siguiendo los protocolos de Sambrook y Russell realizando además una ligación control de vector sin inserto. De cada muestra se electroporó 1  $\mu\text{L}$  del producto de ligación en 30  $\mu\text{L}$  de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes y se dejó creciendo en 1 mL de medio TB por 30 minutos a 37°C con agitación fuerte. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 4000 rpm a 4°C y se resuspendió el precipitado en 200  $\mu\text{L}$  de TB. Se sembró todo el volumen en placas LBA y se incubó a 37°C por 12 horas. El mismo procedimiento se realizó con la muestra de control negativo.

Selección de colonias transformantes: Se seleccionaron cinco colonias y se cre-

cieron toda la noche en 5 mL de LBA a 37°C con agitación fuerte por 12 horas. Se extrajo el DNA plasmidial de cada cultivo mediante el kit de miniprep Qiagen y la presencia del inserto se confirmó mediante el análisis de restricción y por PCR convencional.

#### 5.2.4. Generación de mutantes

Para todas las mutagénesis se utilizó el kit de mutagénesis *GeneArt Site-Directed Mutagenesis kit* de Life Technologies™ y se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. El protocolo general consiste en metilar el DNA templado y amplificar con partidores que contengan la mutación (Tabla 3).

Posteriormente el DNA metilado se degrada y se realiza una reacción de recombinación para recircularizar el vector lineal previamente amplificado. Finalmente se transforman bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes y se extrae el DNA plasmidial mediante miniprep, el cual es secuenciado.

En esta tesis se utilizó como templado el plasmidio pLVX-IRES-ZsGreen1-ECE-1c, construido previamente en nuestro laboratorio a partir del cDNA de ECE-1c humana extraído desde el vector pcDNA-ECE1c utilizando las endonucleasas *XbaI* y *EcoRI*. La secuencia fue insertada en el sitio de multiclonamiento del vector lentiviral pLVX-IRES-ZsGreen1, que posee el promotor de CMV y además una secuencia IRES para expresión bicistónica de GFP (Tesis de Pablo Cabello). En este escrito, se denominará pLVX-ECE-1c.

**Tabla 3: Partidores utilizados para mutagénesis.**

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
Fw-T9A	acgtacaagcgggccgctggacgaggagg
Rv-T9A	cctcctcgtccagcgcggcccgttgtagt
Fw-T9D	acgtacaagcgggccgatctggacgaggaggac
Rv-T9D	gtcctcctcgtccagatcggcccgttgtagt
Fw-S18,20A	gaggacctggtggacgcgctcgccgagggcgacgcat
Rv-S18,20A	atgcgtcgccctcggcgagcgcgtccaccaggtcctc
Fw-S18,20D	gaggacctggtggacgatctcgatgagggcgacgatac
Rv-S18,20D	gtatgcgtcgccctcatcgagatcgtccaccaggtcctc

### **pLVX-ECE-1c<sup>T9A,S18,20A</sup>**

Se utilizó el vector pLVX-ECE-1c como templado, el cual se amplificó utilizando los partidores Fw-T9A y Rv-T9A. Se eliminó el DNA metilado y se realizó la reacción de recombinación del DNA lineal previamente amplificado. De esta forma se obtuvo la mutante pLVX-ECE-1c<sup>T9A</sup>. Esta construcción se utilizó como templado para la segunda reacción de mutagénesis utilizando los partidores Fw-S18,20A y Rv-S18,20A.

### **pLVX-ECE-1c<sup>T9D,S18,20D</sup>**

Se utilizó el vector pLVX-ECE-1c como templado, el cual se amplificó utilizando los partidores Fw-T9D y Rv-T9D. Se eliminó el DNA metilado y se realizó la reacción de recombinación del DNA lineal previamente amplificado. De esta forma se obtuvo la mutante pLVX-ECE-1c<sup>T9D</sup>. Esta construcción se utilizó como templado para la segunda reacción de mutagénesis utilizando los partidores Fw-S18,20D y Rv-S18,20D.

## **5.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

Las construcciones para expresar las proteínas His-CK2 $\alpha$  (pT7-CK2 $\alpha$ ) y GST-CK2 $\beta$  (pGEX-2T-CK2 $\beta$ ) son parte de los insumos presentes en nuestro laboratorio y ya han sido publicados (Tapia *et al.*, 2002).

### **5.3.1. Inducción de la expresión**

La inducción de la expresión de His-CK2 $\alpha$  se realizó en *E. coli* BL21 utilizando 1 mM IPTG por 3 horas a 37°C. La inducción de la expresión de la variante de CK2 $\beta$

no fosforilable fusionada a GST (GST-CK2 $\beta$ <sup>S2,3G</sup>) y GST se realizó en *E. coli* DH5 $\alpha$  utilizando 0,3 mM IPTG por 1,5 horas a 25°C.

### 5.3.2. Purificación

Se cargaron 25 mL de la fracción soluble del lisado bacteriano en una columna de Ni<sup>+2</sup>-NTA (His-CK2 $\alpha$ ) o Glutación-Agarosa (GST-CK2 $\beta$  y GST-NT-ECE-1c). Se dejó fluir todo el volumen mediante gravedad y se lavó con siete volúmenes de buffer de lavado de columna. Posteriormente, se eluyó con 300 mM imidazol o 20 mM glutación reducido para las proteínas fusionadas a etiqueta de histidinas o GST, respectivamente. Se colectaron fracciones de 500  $\mu$ L, las que fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot. Finalmente, las fracciones con mayor concentración de proteína se dializaron en 500 mL de buffer de diálisis.

### 5.4. Ensayo de fosforilación *in vitro*

Se preincubaron 20 pmoles de His-CK2 $\alpha$  por 10 minutos a temperatura ambiente, en presencia o ausencia de 20 pmoles de GST-CK2 $\beta$ <sup>S2,3G</sup>. Luego se agregaron 15 pmoles de GST-NT-ECE-1c o GST como control. Se agregaron 5  $\mu$ L de solución de fosforilación 5X, 1  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP y se completó el volumen con solución amortiguadora H-0. La mezcla fue incubada 30 minutos a 30°C. La reacción se detuvo con 6  $\mu$ L de buffer de carga denaturante 4X. Las proteínas fueron cargadas en un gel SDS-PAGE, el cual se expuso en una película de revelado por 16 horas a -80°C. Se reveló la película y se obtuvo la autorradiografía. Para el ensayo de fosforilación se utilizó el inhibidor de CK2 $\alpha$ , TBB, a una concentración final de 100  $\mu$ M. En los otros ensayos se agregó DMSO como control.

## 5.5. Espectrometría de masas

Se realizó un ensayo kinasa *in vitro* utilizando GST-NT-ECE-1c como sustrato de CK2, tal como se detalla en el punto 5.4, pero en ausencia de ATP radiactivos. La muestra se trató con tripsina y los péptidos trípticos se separaron por cromatografía líquida (Waters 2695 Separation Module) acoplada a un espectrómetro de masas de ionización positiva por electrospray (ESI+/Waters Quattro Micro) en el centro de proteómica del Instituto Hospital del Mar, en Barcelona, España. Las secuencias obtenidas se analizaron *in silico* contra una base de datos de proteínas humanas (sp\_human\_2015\_04\_VDAH) utilizando el algoritmo Mascot v1.4.

## 5.6. Cultivo celular y transfección

Células embrionarias de riñón HEK-293T se crecieron en medio DMEM high glucose suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y antibióticos (10000 U/mL penicilina, 10 µg/mL estreptomicina). Células de cáncer DLD-1 se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 % y antibióticos. Ambas líneas celulares se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 %. Para transfección se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. En células HEK-293T se utilizó una relación 1:3 de µgDNA:Lipofectamina y la transfección se llevó a cabo por 4 horas. En células DLD-1 se utilizó una relación 1,5:8 de µgDNA:Lipofectamina y la transfección se llevó a cabo por 12 horas.

## 5.7. Transcripción reversa y RT-qPCR

Se utilizó el kit EZNA *Total RNA Kit I* (Omega Biotek) para la extracción y purificación del RNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizó

con 3 µg de RNA total, 1,5 µL de partidores degenerados (Invitrogen) y agua libre de nucleasas a 17 µL de volumen total. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos. Se agregó a cada muestra 5 µL de *M-MLV Reverse Transcriptase Buffer 5X* (Invitrogen), 1,25 µL mix dNTPs 10 mM, *RNAsa Out* (Invitrogen) 0,75 µL y 1 µL de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Las muestras se incubaron a 60°C por 37 minutos y finalmente a 90°C por 10 minutos. El cDNA amplificado se diluyó 5 veces en agua libre de nucleasas y se amplificó por qPCR utilizando el master mix *Kapa™ SYBR-FAST Master Mix 2X* (Kapa Biosystems). Los partidores utilizados fueron 5'agcacgcgagctatgatgt3' y 5'gggctgtggaagttcacct3' para ECE-1c y 5'ttgacggaagggcaccaccag3' y 5'gcaccaccaccacggaatcg3' para 18S (Tesis Doctoral de Pablo Cabello).

## 5.8. Western blot

El lisado celular se realizó con buffer RIPA suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas. Se cuantificó la concentración de proteínas y se agregó buffer de carga denaturante y se calentaron a 100 °C por 5 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones denaturantes y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con buffer PBS-T con leche descremada al 5 % y se incubaron con su respectivo anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo. Luego las membranas se lavaron 3 veces con PBS-T por 10 minutos y fueron incubadas con su respectivo anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido en PBS-T. Se lavaron 4 veces con PBS-T por 10 minutos cada lavado y la detección se realizó con un reactivo de quimioluminiscencia utilizando films fotográficos de revelado. Sólo en el ensayo de fosforilación en líneas celulares

los lavados se realizaron con TBS-T, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 3 % gelatina-TBS-T a 90°C y los anticuerpos se diluyeron en 1 % gelatina-TBS-T.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios con su respectiva dilución: anti-GFP policlonal de Sigma-Aldrich (1:2000), anti-GST policlonal de Sigma-Aldrich (1:2000), anti-ECE-1 de Abcam (1:2000), anti-fosfo S/T/Y de Abcam (1:500) y anti- $\beta$ -actina policlonal de Santa Cruz Biotechnology (1:2000). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios con su respectiva dilución: anti-cabra y anti-conejo, ambos IgG-HRP de Santa Cruz Biotechnology (1:2000).

## 5.9. Ensayo de fosforilación en células

Células DLD-1 fueron transfectadas con pLVX-ECE-1c y 16 horas post-transfección fueron tratadas con 100  $\mu$ M TBB por 24 h. Los lisados celulares fueron preparados con 500  $\mu$ L de buffer de lisis de IP. Se incubaron 500  $\mu$ g de proteína con 2,5  $\mu$ g de anti-ECE-1 (1 mg/mL) en rotación suave por 3 horas a 4°C. Posteriormente se agregó proteína A/G *plus* agarosa (1:1) por cada IP y se incubó por 12 horas en rotación suave a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 3500 RPM por 2 minutos a 4°C. El precipitado (fracción IP) y el sobrenadante se resuspendieron en buffer de carga 1X. Finalmente, las proteínas fueron separadas y analizadas mediante western blot con un anticuerpo anti-ECE-1 y anti-fosfoS/T/Y.

## 5.10. Ensayo de estabilidad

Células HEK-293T o DLD-1 fueron transfectadas con pEGFP-NT-ECE-1c o pEGFP. Luego de 16 horas post transfección, fueron incubadas con 20  $\mu$ g/mL cicloheximida (CHX) en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M TBB. El tratamiento se realizó con ambas drogas en conjunto por 0, 3 ,6 y 12 horas, luego de lo cual se cosecharon

las células y se prepararon para análisis de western blot.

### **5.11. Microscopía confocal**

Células DLD-1 ( $\sim 10^5$ ) se sembraron en una placa de 6 cm por 24 horas previo a la transfección con pEGFP-NT-ECE-1c o pEGFP vacío. Luego se tripsinizaron y se sembraron en cubreobjetos de 12 mm en placas de 24 pocillos y se crecieron en medio completo. Al día siguiente, fueron tratadas en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M TBB por 24 horas utilizando DMSO como vehículo. Terminado el tratamiento, las células se fijaron con buffer de fijación para inmunocitoquímica por 30 minutos.

Las células fijadas se lavaron con PBS, se utilizó 0,5 mg/mL DAPI para tinción nuclear. Se volvió a realizar un lavado con PBS y los cubreobjetos se montaron en un portaobjeto de vidrio con una solución de Mowiol al 10 % y DABCO al 2,5 %. Las muestras se visualizaron con un microscopio confocal (LSM Microsystems Pascal 5 confocal microscope (CarlZeiss, Thornwood, NY)). Las imágenes fueron procesadas con el programa computacional Image J 1.48.

### **5.12. Ensayo de ubiquitinación**

Células DLD-1 fueron co-transfectadas con pLVX-ECE-1c (o sus respectivas mutantes) y p1170-Ubi<sup>WT</sup>-His. Dieciséis horas post-transfección fueron tratadas con el inhibidor de CK2, CX-4945, a 25  $\mu$ M por 24 horas. Los lisados celulares fueron preparados con 500  $\mu$ L de buffer I desde placas de 10 cm y sonicados en hielo por 15 segundos a 15 % de potencia. Se adicionó resina de Ni<sup>+2</sup>-NTA previamente equilibrada y resuspendida en buffer I y se incubó por 2 horas en rotación suave a temperatura ambiente. Luego de centrifugación a 1300 rpm por 1 minuto, las muestras se lavaron con 1 mL de buffer I. Se centrifugaron nuevamente y se re-

pitió el lavado con 1 mL de buffer II. Se realizó un último lavado con 1 mL de PBS y se centrifugó. Para separar las proteínas unidas a la resina, se agregó 50  $\mu$ L de buffer de carga de proteínas 2X y se incubó a 95°C por 3 minutos. Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se analizó mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-ECE-1.

### **5.13. Ensayos de migración e invasión**

Para los ensayos de migración en 3D, la base externa de la cámara superior de transwell<sup>TM</sup> (Corning, México) fue incubada con 2  $\mu$ g/mL de fibronectina por 16 horas a 4°C. Posteriormente, se sembraron 50000 células DLD-1 con 200  $\mu$ L de RPMI y en el pocillo inferior se agregaron 500  $\mu$ L de RPMI con 10 % SFB. Las células se crecieron a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> por 5 horas. Las células que migraron se fijaron y tiñeron con 0,1 % cristal violeta y 20 % metanol disuelto en 0,15 M NaCl, por 1 hora a temperatura ambiente. Las células que no migraron fueron removidas con un hisopo de algodón. Para los ensayos de invasión, las células se crecieron en una cámara superior cubierta con matrigel (Biocoat<sup>TM</sup> Matrigel<sup>TM</sup>, BD) y tratada en las mismas condiciones que los ensayos de migración-3D, pero incubadas por 22 horas. Las células se fijaron y tiñeron con 1 % azul de toluidina y 1 % borax. En ambos ensayos, las células fueron contadas en siete campos para cada condición.

### **5.14. Ensayo de viabilidad**

Se sembraron 10000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y 16 horas post-transfección se realizó el ensayo de MTS<sup>TM</sup> (Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.15. Análisis estadístico**

Los resultados fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes y cuando fue requerido, los datos se analizaron usando las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar entre más de dos condiciones o t de Student para comparar entre dos condiciones. Se consideró como significativo un valor de P menor a 0,05.

## 6. Resultados

### 6.1. Objetivo específico 1: determinar si CK2 fosforila a ECE-1c en su región N-terminal

#### 6.1.1. Análisis *in silico* de la región N-terminal de ECE-1c

Se analizó la secuencia aminoacídica de ECE-1c humana para evaluar la existencia de sitios blanco de fosforilación por CK2. Interesantemente, el análisis *in silico* utilizando el programa NetPhosK 1.0 arrojó que la porción N-terminal citoplasmática de ECE-1c humana contiene tres sitios putativos de fosforilación por CK2 (Thr9, Ser18 y Ser20). Para evaluar si estos sitios se encuentran conservados, se realizó un alineamiento utilizando el programa ClustalX 2.1 entre las secuencias peptídicas humana, de ratón y rata. Se observó que efectivamente estos sitios se encuentran altamente conservados en este grupo de mamíferos, lo que podría dar cuenta de la conservación de su eventual función (Figura 10).

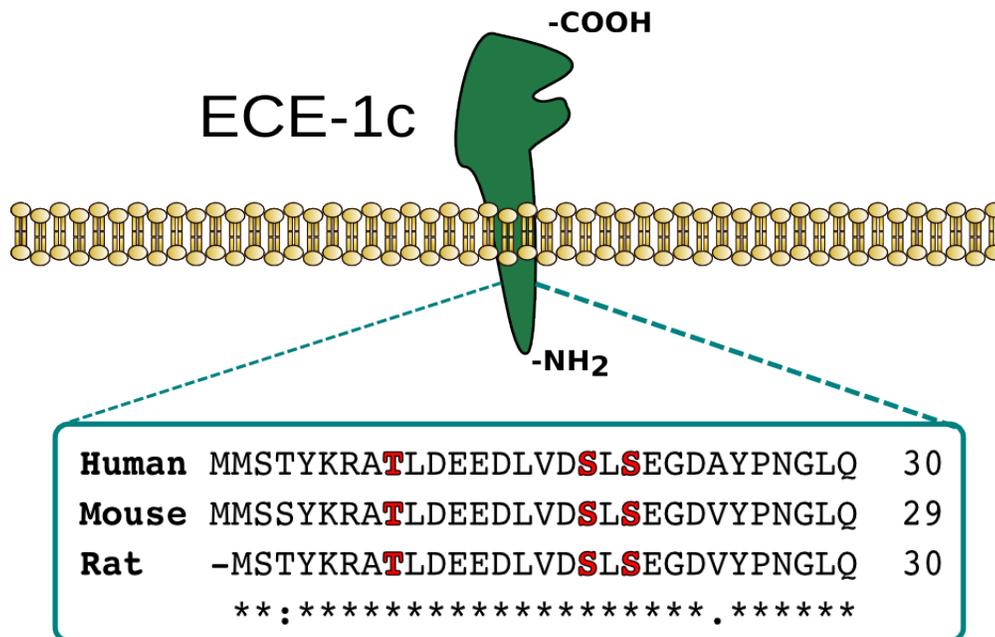


Figura 10: **Alineamiento de la secuencia N-terminal de ECE-1c de distintas especies.** Se compararon los primeros 30 residuos de ECE-1c humana, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* utilizando el programa ClustalX 2.1. La predicción de los sitios putativos de fosforilación por CK2, conservados en las tres especies (rojo), se realizó mediante el programa NetPhosK 1.0 Server (con score > 0,5). Simbología: (\*) residuos 100% idénticos, (:) sustituciones conservativas (.) sustituciones menos conservativas.

### 6.1.2. Clonamiento, expresión y purificación de proteínas recombinantes para ensayos *in vitro*.

Para estudiar la fosforilación de la región N-terminal de ECE-1c (NT-ECE-1c) por CK2 se expresaron los 100 primeros residuos de la proteína fusionados a GST (GST-NT-ECE-1c) para ser utilizada como sustrato de CK2. En la Figura 11 se muestra un esquema de las construcciones pGEX-2T-NT-ECE-1c (también se muestra el clonamiento del fragmento en el vector pEGFP-N1 que se utilizará en el Objetivo 2).

Para comprobar la presencia de los fragmentos clonados se realizó PCR de la secuencia codificante NT-ECE-1c en los vectores pGEX-2T y pEGFP-N1 (Figura 11). Para corroborar el clonamiento, se realizó un análisis de restricción de ambas construcciones utilizando las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI* (Figura 11). Ambas construcciones fueron secuenciadas y se comprobó el correcto marco de lectura y ausencia de otras mutaciones no deseadas.

La proteína de fusión resultante fue expresada y purificada mediante cromatografía de afinidad con resina de Glutación-Agarosa (Figura 12B). También fueron expresadas y purificadas desde bacteria las subunidades catalítica CK2 $\alpha$  y la reguladora CK2 $\beta$  fusionadas a etiquetas 6xHis y GST, respectivamente (Figura 12).

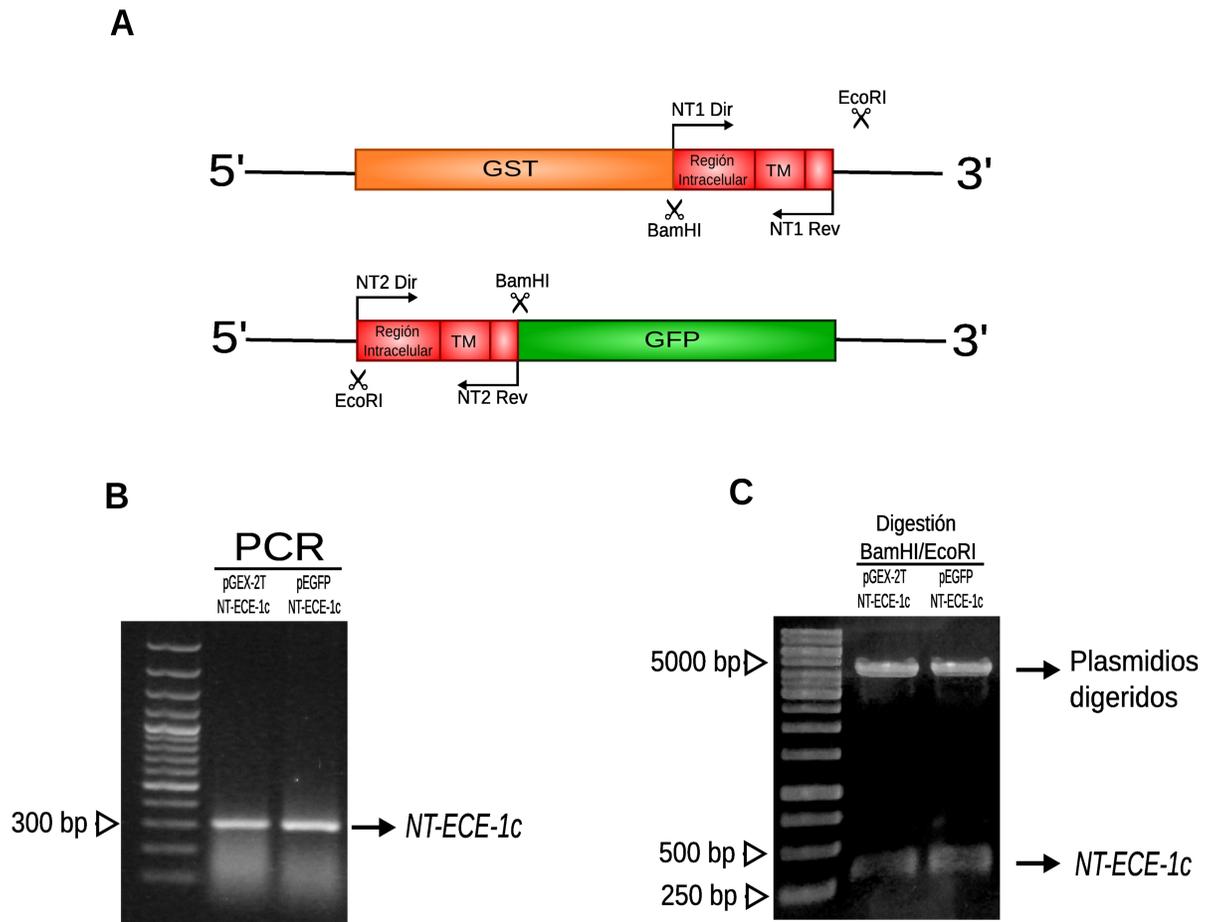


Figura 11: Subclonamiento de la secuencia codificante de la región N-terminal de ECE-1c (NT-ECE-1c) en los vectores pGEX-2T y pEGFP-N1. **A.** Esquema parcial de las construcciones pGEX-2T-NT-ECE-1c y pEGFP-N1-NT-ECE-1c. (TM: secuencia codificante de la región transmembrana). **B.** PCR del subclonamiento de la secuencia codificante NT-ECE-1c en los vectores pGEX-2T y pEGFP-N1. **C.** Análisis de restricción de ambas construcciones utilizando las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI*. Ambas construcciones fueron secuenciadas y se comprobó el correcto marco de lectura y ausencia de mutaciones.

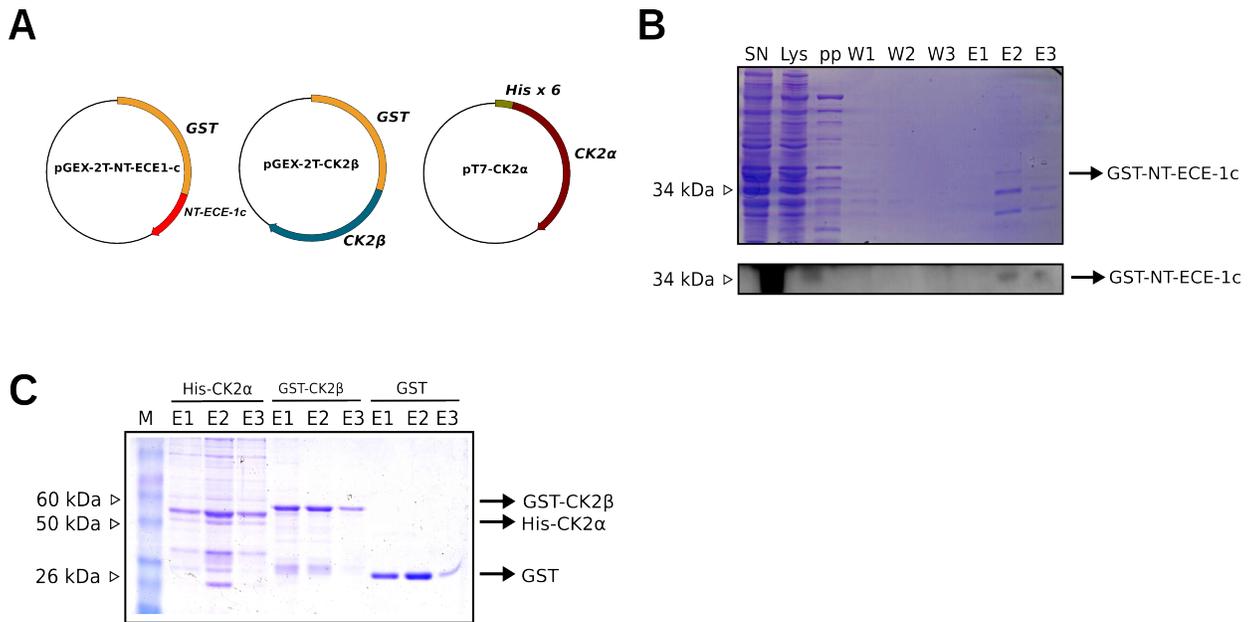


Figura 12: **Expresión y purificación de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GST (GST-NT-ECE-1c), His-CK2 $\alpha$ , GST-CK2 $\beta$  y GST.** A. Esquema de los vectores de expresión utilizados . B. La inducción de la expresión del péptido se realizó en *E. coli* DH5 $\alpha$  utilizando 0,3 mM de IPTG por 1,5 horas a 25°C. La fracción soluble se cargó en una columna de Glutación-Agarosa y se eluyó con 20 mM glutatión reducido. La purificación se comprobó mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-GST. M: Marcador de peso molecular. I: input, E: eluidos., L: lisado celular, SN: sobrenadante, pp: precipitado. C. La inducción de la expresión de His-CK2 $\alpha$  se realizó en *E. coli* BL21 (DE3) utilizando 1 mM IPTG por 3 horas a 37°C. La fracción soluble se cargó en una columna de Ni<sup>+2</sup>-NTA y se eluyó con 300 mM imidazol. La inducción de la expresión de GST-CK2 $\beta$ <sup>S2,3G</sup> y GST se realizó en *E. coli* DH5 $\alpha$  utilizando 0,3 mM IPTG por 1,5 horas a 25°C. La fracción soluble se cargó en una columna de Glutación-Agarosa y se eluyó con 20 mM glutatión reducido. M: marcador de peso molecular. E: eluidos.

### 6.1.3. Fosforilación *in vitro* de la región N-terminal de ECE-1c

Las proteínas recombinantes CK2 y GST-NT-ECE-1c fueron incubadas en presencia [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP por 30 minutos a 30°C. La reacción se detuvo con buffer de carga de proteínas, se analizó por SDS-PAGE y se reveló por autorradiografía a -80°C, tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Se observó que el N-terminal de ECE-1c es fosforilado tanto por la holoenzima ( $\alpha_2\beta_2$ ) como por la subunidad catalítica ( $\alpha$ ) sola (Figura 13, primer y tercer carril). Para inhibir la actividad catalítica de CK2 se utilizó el compuesto TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol), el cual se ha usado exitosamente para inhibir esta kinasa en distintos modelos de cáncer (Trembley *et al.*, 2010). En presencia de este inhibidor, la fosforilación no ocurrió (Figura 13, segundo carril). Como control negativo se realizó el ensayo con la proteína GST, la cual no es fosforilada por CK2 (Figura 13, cuarto carril).

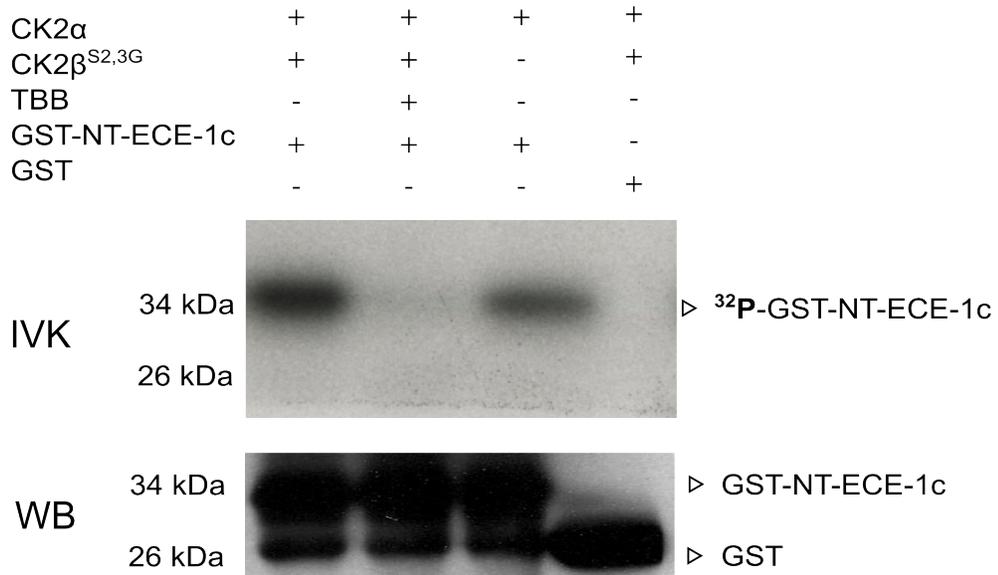


Figura 13: Fosforilación *in vitro* de la región N-terminal de ECE-1c por CK2. Ensayo kinasa *in vitro* (IVK, *in vitro kinase assay*). La región N-terminal de ECE-1c fusionada a GST fue incubada con CK2 (holoenzima o subunidad catalítica) en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. Se utilizó 100  $\mu$ M TBB como inhibidor específico de CK2. Las proteínas marcadas fueron visualizadas mediante autoradiografía. Abajo se muestra la presencia de los sustratos mediante western blot (WB) utilizando un anticuerpo anti-GST (N=3).

Para demostrar los sitios exactos de fosforilación, se realizó un ensayo kinasa *in vitro* utilizando CK2 recombinante ( $\alpha/\beta$ ) y GST-NT-ECE-1c como sustrato, en ausencia de radiactividad, tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. La muestra se trató con Tripsina y los péptidos trípticos se separaron por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de ionización positiva por electrospray (ESI+). Las secuencias obtenidas se analizaron *in silico* contra una base de datos de proteínas humanas (sp\_human\_2015\_04\_VDAH) utilizando el algoritmo Mascot v1.4. Los resultados mostraron con 100 % de probabilidad que las Serinas 18 y 20 de la región N-terminal de ECE-1c son efectivamente fosforiladas por CK2. Esto se ve reflejado en los picos que presentan un peso molecular mayor, correspondiente al grupo fosfato unido covalentemente (Figura 14).

Extracted from: C:\gespadas\VD\AH150715\_S\_VDAH\_01\_01\_Tryp.raw #4630 RT: 52.54  
 ITMS, CID@35.00, z=+3, Mono m/z=1123.50317 Da, MH+=3368.49497 Da, Match Tol.=0.5 Da

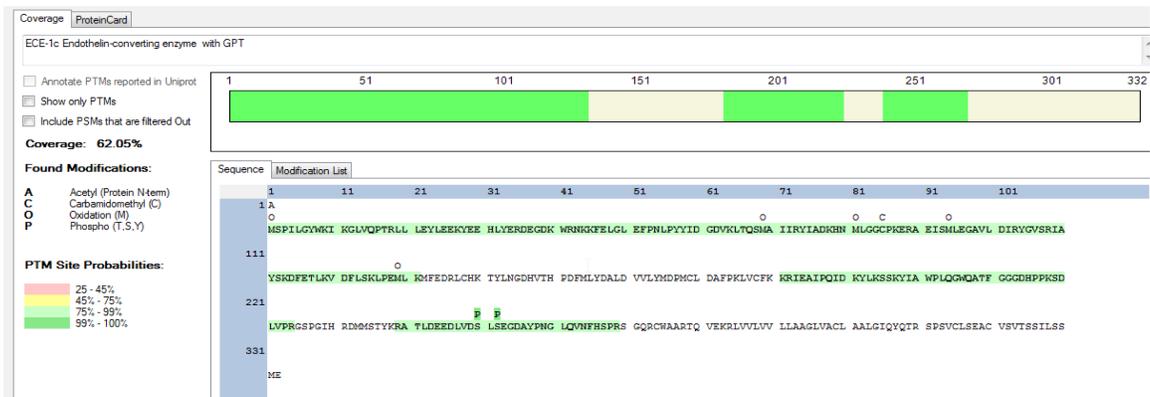
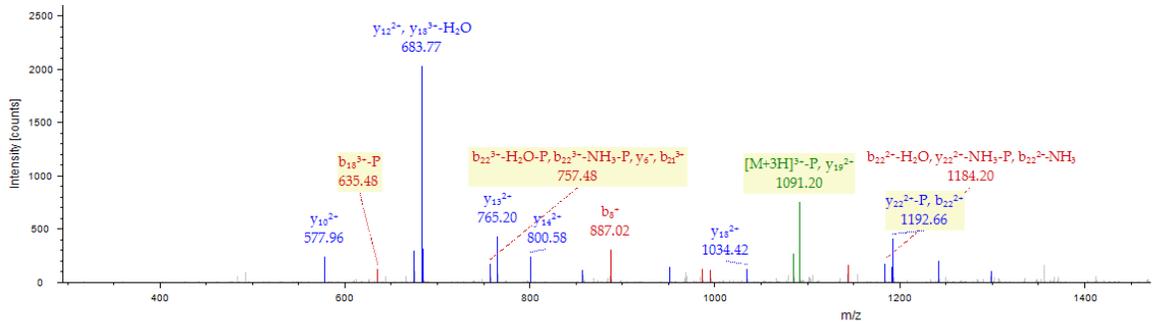


Figura 14: Análisis de la fosforilación de ECE-1c por CK2 mediante espectrometría de masas. Se realizó un ensayo kinasa *in vitro* utilizando CK2 recombinante y GST-NT-ECE-1c como sustrato, en ausencia de radiactividad. La muestra fue procesada con tripsina y los péptidos tripticos fueron analizados mediante espectrometría de masas ESI+. Arriba, se muestra un espectrograma representativo de uno de los péptidos tripticos y abajo se detalla la secuencia y los residuos de serina que arrojaron un 100 % de probabilidad de estar fosforilados (Ser18 y Ser20 de la región N-terminal de ECE-1c).

#### 6.1.4. Fosforilación de ECE-1c en un contexto celular

Para evaluar si CK2 fosforila el extremo N-terminal de la proteína completa ECE-1c, así como si esto ocurre a nivel celular, se expresó la proteína ECE-1c en células de cáncer de colon DLD-1 mediante transfección transitoria con el vector pLVX-ECE-1c. Las células transfectadas se incubaron en ausencia o presencia del inhibidor farmacológico de CK2, TBB. Se inmunoprecipitó la proteína con un anticuerpo específico anti-ECE-1 y se analizó la fosforilación con un anticuerpo que reconoce residuos fosforilados de Ser, Thr y/o Tyr. Se observó que la marca de fosforilación fue menor en células que habían sido incubadas con TBB (Figura 15), indicando que CK2 fosforila a ECE-1c en células de cáncer de colon.

Los resultados obtenidos *in vitro* (fosforilación y espectrometría de masas) mostraron que CK2 fosforila la región N-terminal de ECE-1c en Ser18 y Ser20. Además, la fosforilación también ocurriría en un contexto celular, específicamente en células de cáncer de colon DLD-1, que es la principal línea celular utilizada como modelo en esta tesis.

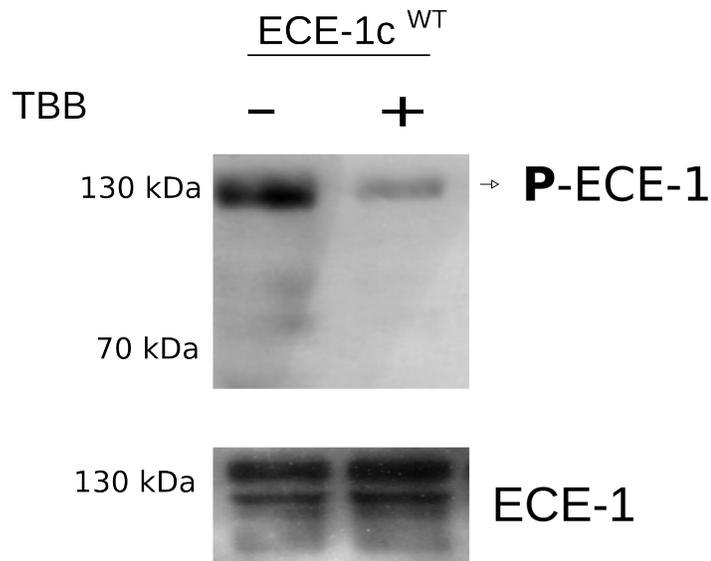


Figura 15: **Fosforilación de ECE-1 a nivel celular.** Células de cáncer de colon DLD-1 que expresaron de forma transitoria la proteína ECE-1c<sup>WT</sup> fueron tratadas en ausencia (ie, DMSO) o presencia de 100  $\mu$ M TBB por 24 horas. Las células fueron cosechadas y lisadas, luego 500  $\mu$ g de proteína fueron incubadas con un anticuerpo anti-ECE-1 y posteriormente con proteína A-G agarosa para favorecer la inmunoprecipitación. Las proteínas que inmunoprecipitaron fueron analizadas mediante western blot con un anticuerpo anti -<sup>P</sup>Ser/<sup>P</sup>Thr/<sup>P</sup>Tyr. Se utilizó ECE-1 como control de carga de la inmunoprecipitación. Se muestra la imagen representativa de un total de 3 experimentos.

## **6.2. Objetivo específico 2: estudiar si CK2 regula mediante fosforilación la estabilidad ECE-1c en células no tumorales y de cáncer colorrectal.**

### **6.2.1. Regulación de la expresión de ECE-1 por CK2**

Con el fin de determinar a qué nivel CK2 regula ECE-1 mediante la fosforilación previamente determinada, se realizaron ensayos en distintas líneas celulares de cáncer de colon (HT29 y DLD-1) y en una línea no tumoral (HEK-293T). Las células fueron crecidas en sus respectivos medios de cultivo, se inhibió CK2 y se evaluaron los niveles proteicos y de mRNA de ECE-1c, mediante western blot y RT-qPCR, respectivamente. Se observó que no existió una diferencia significativa en los niveles de mRNA de la isoforma ECE-1c en las líneas celulares de cáncer de colon (Figura 16).

En cambio, en la línea no tumoral HEK-293T se observó una diferencia significativa en los niveles de mRNA al inhibir CK2 (Figura 16). Esto puede ser explicado por resultados previos de nuestro grupo de investigación que demostraron la presencia de elementos Tcf en la región promotora de ECE-1c y la subsecuente participación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, que se regula positivamente por CK2 (Tesis de Pablo Cabello; Niechi *et al.*, 2015; Tapia *et al.*, 2006).

Por otro lado, al inhibir la actividad de CK2 con los inhibidores específicos TBB o CX-4945, disminuyeron los niveles proteicos ECE-1 total, tanto en líneas celulares de cáncer de colon DLD-1 y HT29, como en HEK-293T (Figura 17 y Figura 18). Como en las líneas celulares de cáncer de colon solo se ven cambios en niveles proteicos y no de mRNA de ECE-1c al inhibir CK2, se pensó que su regulación podría ser post-traducciona, por ejemplo, a través de la fosforilación por CK2 descrita

anteriormente.

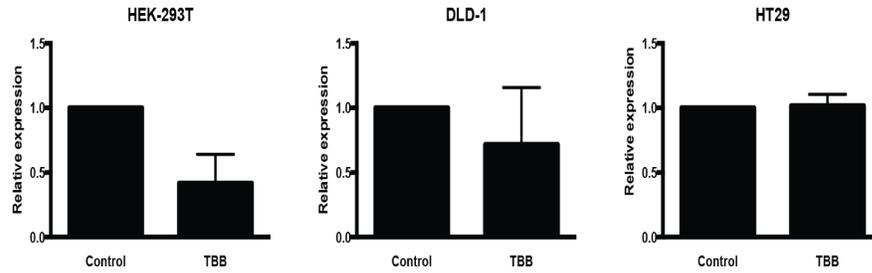


Figura 16: **Regulación de los niveles de mRNA de ECE-1c por inhibición de CK2.** Células de cáncer de colon HT29 y DLD-1, y embrionarias no tumorales HEK-293T fueron incubadas en ausencia (ie, DMSO) o en presencia de 100  $\mu$ M TBB por 24 horas. Los niveles de mRNA de la isoforma ECE-1c se midieron por RT-qPCR utilizando 18S rRNA para normalizar. Se graficó la expresión relativa del promedio de dos experimentos independientes (Modificado de Tesis de Doctorado de Pablo Cabello).

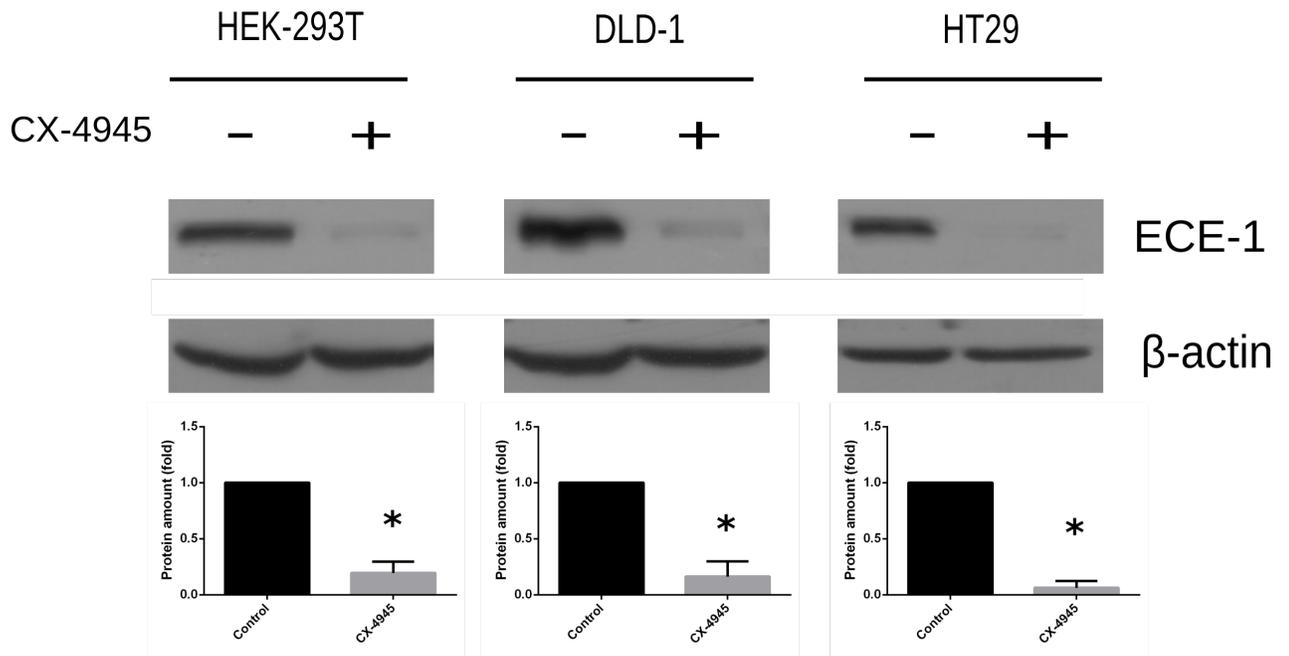


Figura 17: **Regulación de los niveles proteicos de ECE-1 por inhibición de CK2 con CX-4945.** Células de cáncer de colon HT29 y DLD-1, y embrionarias no tumorales HEK-293T fueron incubadas en ausencia (ie, DMSO) o en presencia de 25  $\mu$ M CX-4945 por 24 horas. La expresión de ECE-1 fue analizada mediante western blot con un anticuerpo anti-ECE-1, utilizando  $\beta$ -actina como control. Los pixeles de las bandas fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Los gráficos representan el promedio de los datos de tres experimentos independientes. Se utilizó el test *t de student* para comparar las muestras con tratamiento (CX-4945) respecto a su control (DMSO). (\* $p < 0,05$ ).

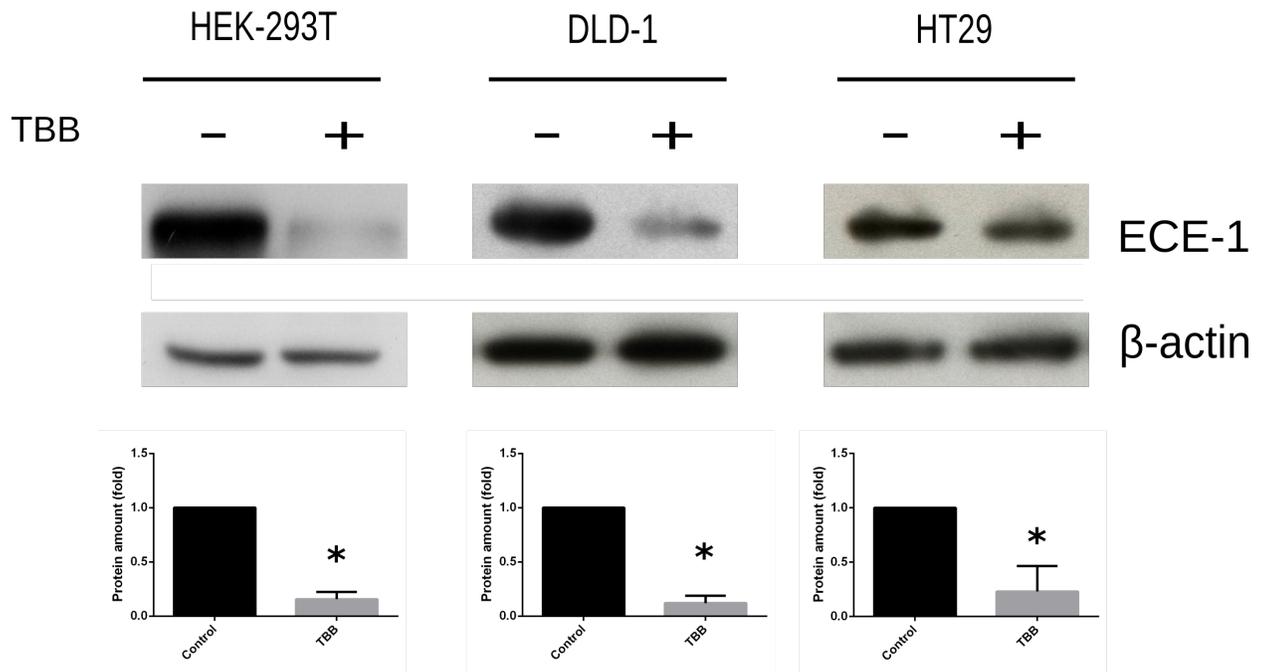


Figura 18: **Regulación de los niveles proteicos de ECE-1 por inhibición de CK2 con TBB.** Células de cáncer de colon HT29 y DLD-1, y embrionarias no tumorales HEK-293T fueron incubadas en ausencia (ie, DMSO) o en presencia de 100  $\mu$ M TBB por 24 horas. La expresión de ECE-1 fue analizada mediante western blot con un anticuerpo anti-ECE-1, utilizando  $\beta$ -actina como control. Los pixeles de las bandas fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Los gráficos representan el promedio de los datos de tres experimentos independientes. Se utilizó el test *t de student* para comparar las muestras con tratamiento (TBB) respecto a su control (DMSO). (\* $p < 0,05$ ).

### 6.2.2. Papel de la región N-terminal de ECE-1c en la regulación por CK2

Dado que el extremo N-terminal de ECE-1c es fosforilado por CK2, esta región fue fusionada a GFP y expresada en células de cáncer de colon DLD-1. Se fusionaron los primeros 100 residuos de ECE-1c a la proteína fluorescente verde GFP tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Para esto, se utilizó el vector de expresión eucarionte pEGFP-N1 y se generó una construcción que expresa la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP (Figura 19A). Se analizó su localización en células DLD-1 por microscopía confocal (Figura 19B).

Se pudo observar que la localización de la proteína de fusión presenta un patrón de distribución muy similar al descrito en la literatura para ECE-1c (Figura 9), lo que sugiere que la región N-terminal de ECE-1c es responsable de la localización de la proteína. Interesantemente, resultados preliminares de nuestro laboratorio no mostrados indicaron que esta proteína de fusión responde al estímulo con PMA, cambiando su localización subcelular desde regiones perinucleares hacia la periferia celular<sup>1</sup>, tal como está descrito para la proteína completa en un modelo celular endotelial (Kuruppu *et al.*, 2012).

---

<sup>1</sup>Tesis de Hernan Huerta, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile

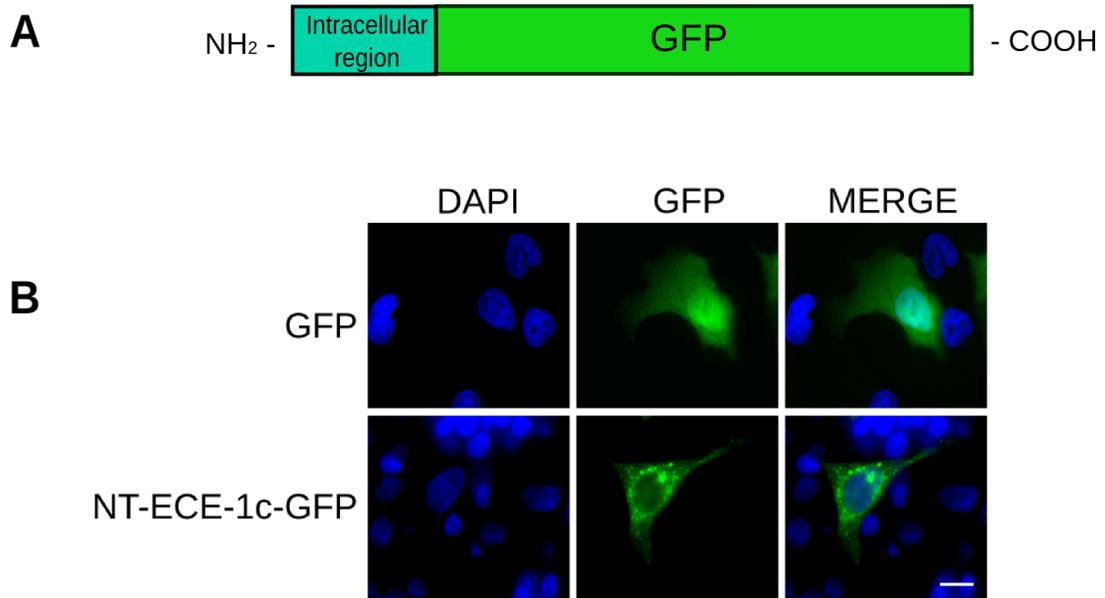


Figura 19: **Localización celular de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP.** **A.** Representación esquemática de los 100 primeros residuos de ECE-1c fusionados a GFP (NT-ECE-1c-GFP). Se incluye su región citoplasmática, región transmembrana (TM) y aproximadamente 40 residuos de la región extracelular. **B.** NT-ECE-1c-GFP o GFP fueron expresadas en células DLD-1 y visualizadas por microscopía confocal. Se utilizó DAPI como tinción nuclear (Barra = 20  $\mu$ M).

Decidimos evaluar si la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP responde a la inhibición de la actividad de CK2, tal como se demostró para GST-NT-ECE-1c en los ensayos de fosforilación *in vitro* (ver Figura 17 y 18). Para ello se expresó NT-ECE-1c-GFP en células DLD-1 y HEK-293T y se crecieron en ausencia o presencia de TBB y se analizaron sus niveles proteicos. Los resultados mostraron que la inhibición de CK2 llevó a la reducción de los niveles proteicos de la proteína de fusión (Figura 20). Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos con ECE-1 total, observándose que en distintos tipos celulares que los niveles proteicos disminuyeron significativamente en presencia de TBB.

Los resultados con GFP validaron de esta manera nuestro modelo de estudio. Cabe destacar que estos efectos fueron totalmente dependientes de la presencia de la porción N-terminal de ECE-1c en la proteína de fusión (Figura 20), ya que los niveles de GFP sola no cambiaron al inhibir CK2 en ambas líneas celulares (Figura 21). En conjunto, estos resultados permitieron validar la construcción NT-ECE-1c-GFP como un modelo apropiado para estudiar el efecto de la fosforilación de ECE-1c por CK2 en estudios posteriores.

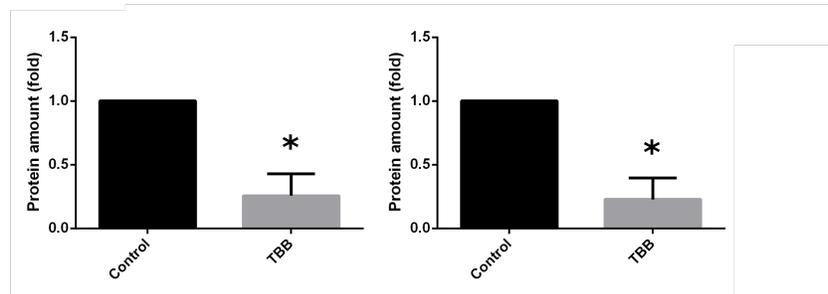
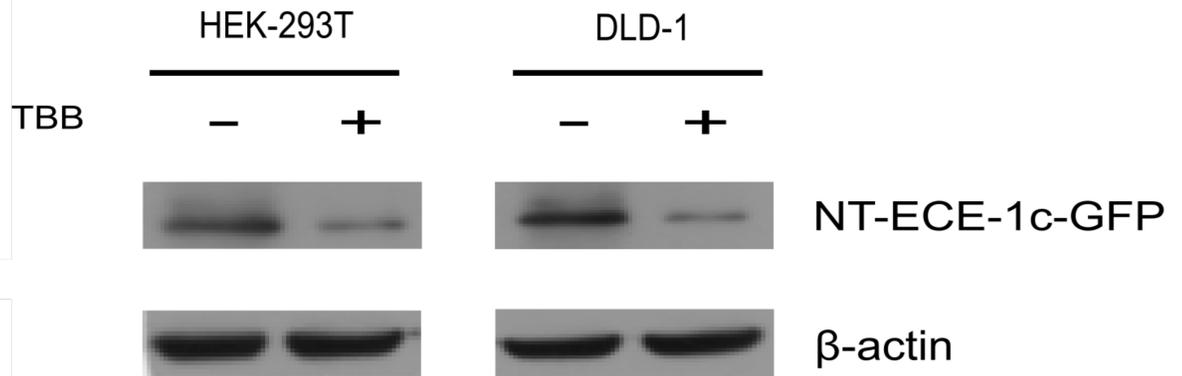


Figura 20: Niveles de la región N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP (NT-ECE-1c-GFP) al inhibir la actividad de CK2. Células HEK-293T y DLD-1 que expresaron de forma transitoria la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP, fueron tratadas con 100  $\mu$ M TBB por 24 horas. Los niveles proteicos fueron detectados mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. Los pixeles de las bandas fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Los gráficos representan el promedio de los datos de tres experimentos independientes. Se utilizó el test *t de student* para comparar las muestras con tratamiento (TBB) con respecto a su control (DMSO). (\* $p < 0,05$ ).

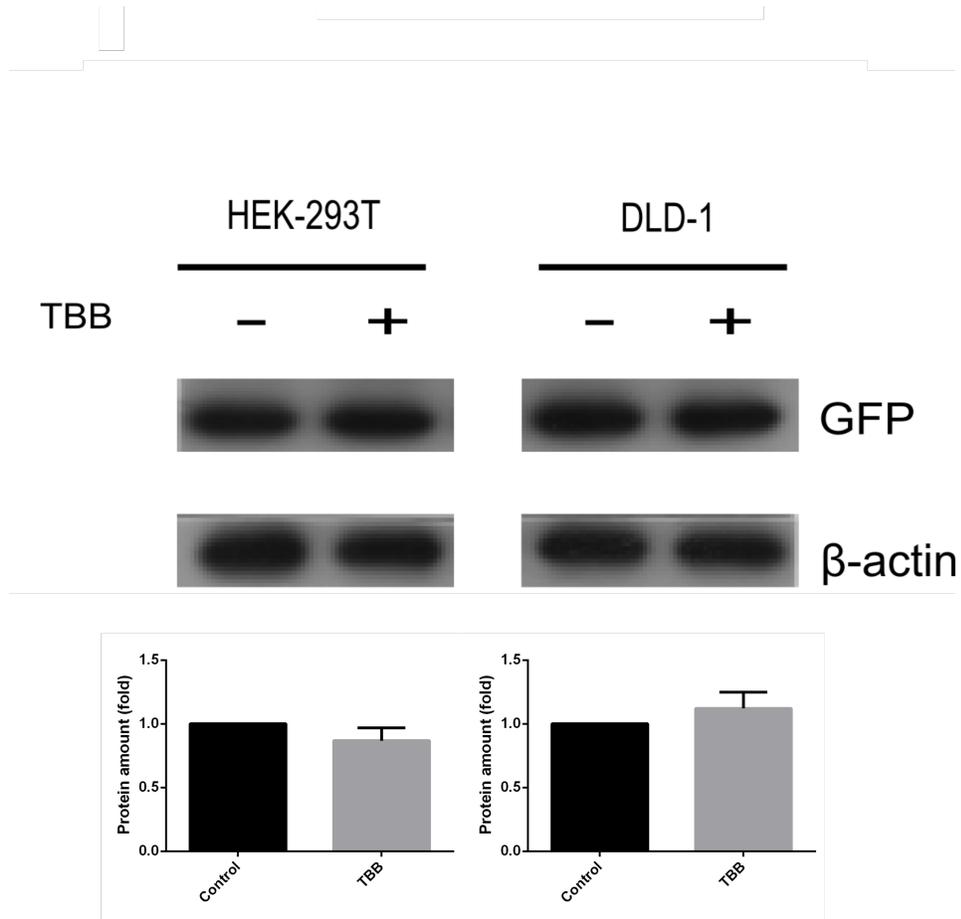


Figura 21: **Niveles proteicos de GFP al inhibir la actividad de CK2.** Células HEK-293T y DLD-1 que expresan de forma transitoria la proteína GFP, fueron tratadas con 100  $\mu$ M TBB por 24 horas. Los niveles proteicos fueron detectados mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. Los pixeles de las bandas fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Los gráficos representan el promedio de los datos de tres experimentos independientes. Se utilizó el test *t de student* para comparar las muestras con tratamiento (TBB) con respecto a su control (DMSO). (\* $p < 0,05$ ).

### 6.2.3. Estabilidad de ECE-1c y su regulación por CK2

Los resultados anteriores sugirieron que la fosforilación del extremo N-terminal de ECE-1c por CK2 podría eventualmente afectar la estabilidad de la proteína. Para evaluar si CK2 altera la estabilidad de ECE-1c, se expresó NT-ECE-1c-GFP en células no tumorales HEK-293T y de cáncer de colon DLD-1, en presencia del inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida (CHX) por un período entre 0 y 12 horas.

Se observó que al inhibir CK2 los niveles proteicos de NT-ECE-1c-GFP disminuyeron en función del tiempo en HEK-293T (Figura 22) y DLD-1 (Figura 23). Esto no ocurrió cuando se expresó sólo GFP como control, cuyos niveles fueron estables al incubar con CHX en presencia o ausencia de TBB, tanto en células HEK-293T como en células DLD-1 (Figura 24). Estos resultados indicaron que CK2 regula positivamente la estabilidad de ECE-1c a través de la fosforilación de su región N-terminal.

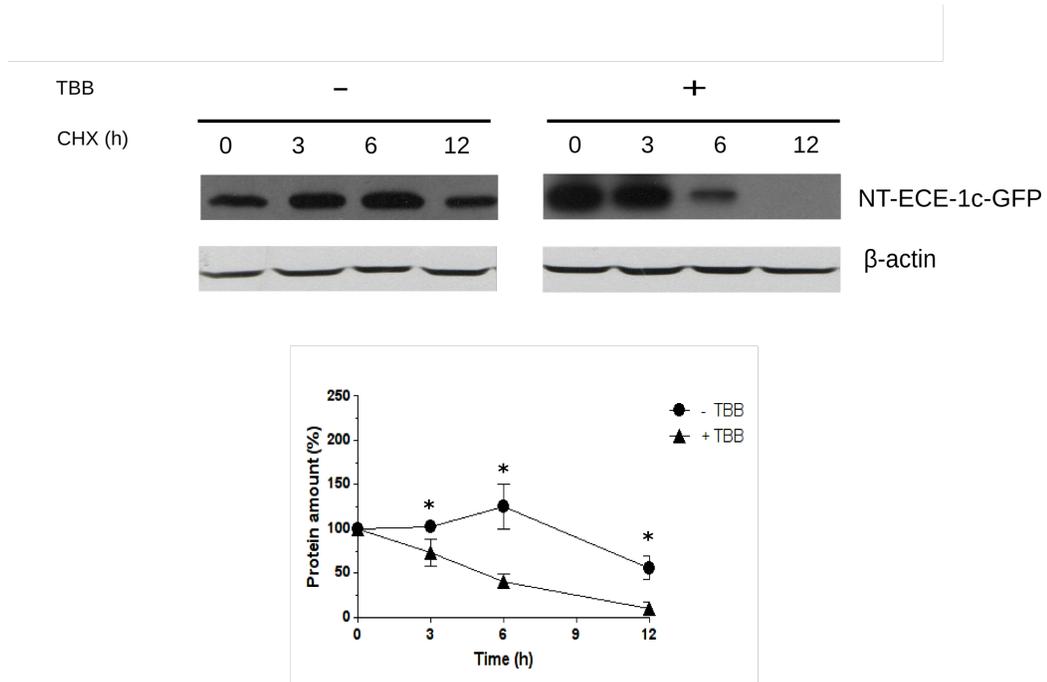


Figura 22: **Estabilidad de la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP en células no tumorales HEK-293T.** Células HEK-293T que expresaron NT-ECE-1c-GFP fueron tratadas con 20  $\mu$ g/mL cicloheximida (CHX) en ausencia (-) o presencia (+) de 100  $\mu$ M TBB durante 12 horas. Las proteínas fueron detectadas mediante western blot utilizando un anticuerpo específico anti-GFP. Los pixeles de las bandas de NT-ECE-1c-GFP fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Se graficó el promedio de los datos de tres experimentos independientes. En cada tiempo se comparó la condición con tratamiento (TBB) con la condición sin tratamiento (DMSO) utilizando el test *t* de student (\**p*<0,05).

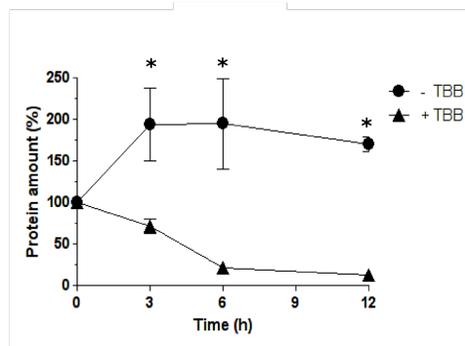
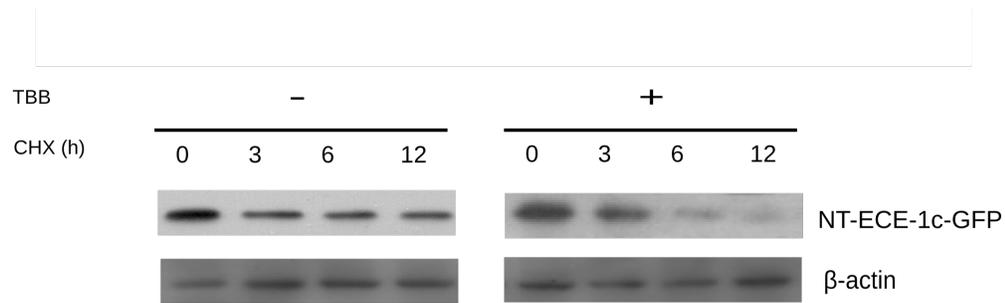


Figura 23: **Estabilidad de la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP en células de cáncer de colon DLD-1.** Células HEK-293T que expresaron NT-ECE-1c-GFP fueron tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cicloheximida (CHX) en ausencia (-) o presencia (+) de 100  $\mu\text{M}$  TBB durante 12 horas. Las proteínas fueron detectadas mediante western blot utilizando un anticuerpo específico anti-GFP. Los pixeles de las bandas de NT-ECE-1c-GFP fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Se graficó el promedio de los datos de tres experimentos independientes. En cada tiempo se comparó la condición con tratamiento (TBB) con la condición sin tratamiento (DMSO) utilizando el test *t* de student (\* $p < 0,05$ ).

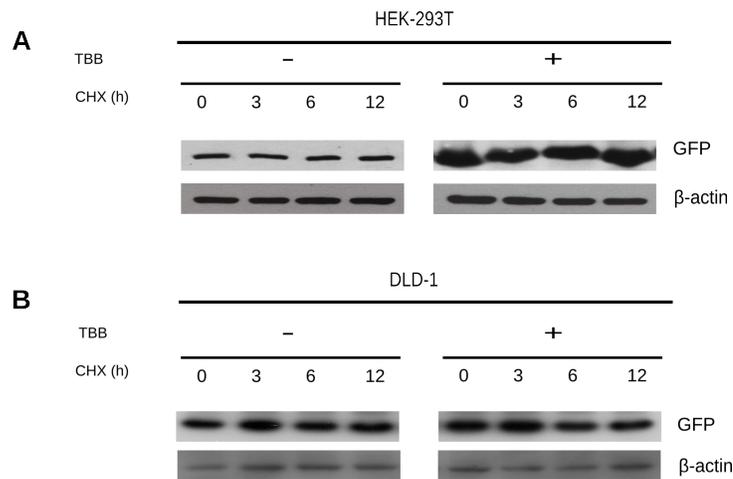


Figura 24: **Estabilidad proteica de GFP en células HEK-293T y DLD-1** **A.** Células HEK-293T que expresaron GFP fueron tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cicloheximida (CHX) en ausencia (-) o presencia (+) de 100  $\mu\text{M}$  TBB durante 12 horas. Las proteínas fueron detectadas mediante western blot utilizando un anticuerpo específico anti-GFP. **B.** Lo mismo que en A, utilizando células de cáncer de colon DLD-1. Se muestran los resultados representativos de dos experimentos independientes.

#### **6.2.4. Degradación proteasomal de ECE-1c y su regulación por CK2**

Se ha mostrado en la literatura que CK2 regula la estabilidad de diversas proteínas relacionadas con cáncer mediante su fosforilación (Ponce *et al.*, 2011a; Ponce *et al.*, 2011b; Ruzzene & Pinna, 2010). Para evaluar si la estabilidad y degradación de ECE-1c es por la vía proteasomal, células de cáncer colorrectal DLD-1 se incubaron con el inhibidor de CK2, TBB, y/o del proteasoma, MG-132 por 24 horas. Como se observa en la Figura 25, los niveles de la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP en células tratadas con el inhibidor de CK2 no disminuyeron al tratar adicionalmente con MG-132. En conjunto, estos resultados indican que la fosforilación de la región N-terminal de ECE-1c por CK2 de alguna forma protegería a esta proteína de la degradación proteasomal.

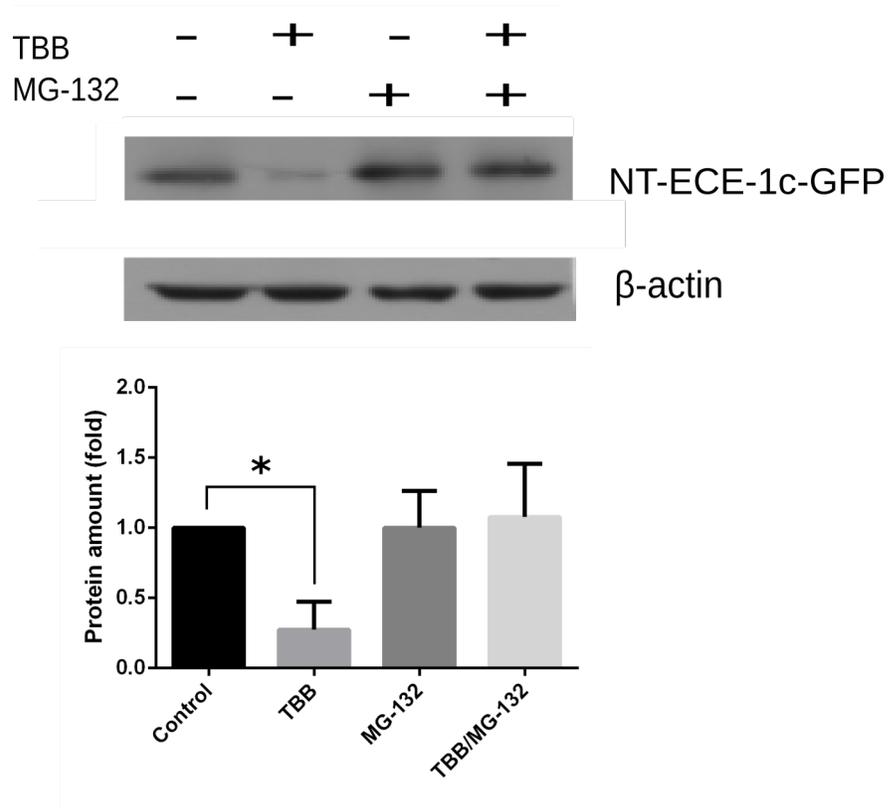


Figura 25: **Degradación proteasomal de ECE-1c y su regulación por CK2.** Células DLD-1 que expresaron NT-ECE-1c-GFP se incubaron en ausencia (ie, DMSO) o presencia de 100  $\mu$ M TBB y/o 10  $\mu$ M MG-132 por 24 horas para evaluar degradación proteasomal. Los píxeles de las bandas de NT-ECE-1c-GFP fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. El gráfico representa el promedio de datos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test de comparaciones múltiples de Dunnett (\* $p < 0,05$ ).

Para comprobar el efecto de la fosforilación por CK2 en la estabilidad de la proteína completa, se utilizaron células de hámster (CHO-K1) las cuales expresan niveles despreciables de ECE-1 (Muller *et al.*, 2003) con respecto a los otros modelos celulares utilizados en este estudio, HEK-293T y DLD-1 (Figura 26). Esto permitió que al sobreexpresar la isoforma ECE-1c pudiéramos detectarla con el mismo anticuerpo anti-ECE-1 y minimizar la interferencia de las otras isoformas.

Para evaluar el efecto directo de la fosforilación de ECE-1c en los sitios putativos ya descritos, se diseñaron las siguientes mutantes: no fosforilables por CK2, ECE-1c<sup>AAA</sup> (T9A, S18,20A), y fosfomimética, ECE-1c<sup>DDD</sup> (T9D, S18,20D). Las mutaciones se realizaron por mutagénesis sitiodirigida sobre el vector pLVX-ECE-1c y se secuenciaron tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Cabe destacar que se mutaron los tres sitios putativos, ya que al momento de realizar estos experimentos aún no se realizaban los ensayos de espectrometría de masas y se desconocían los sitios exactos de fosforilación (Ser18/Ser20).

Se expresó ECE-1c silvestre y las mutantes ECE-1c<sup>AAA</sup> y ECE-1c<sup>DDD</sup> en células CHO-K1. Se midieron los niveles de las proteínas en presencia de CHX entre 0 y 12 horas y se observó que la mutante no fosforilable ECE-1c<sup>AAA</sup> presentó una tasa de degradación mayor que la proteína silvestre ECE-1c<sup>WT</sup>, y ésta a su vez una degradación mayor que la variante fosfomimética ECE-1c<sup>DDD</sup> (Figura 27). Estos resultados mostraron que la fosforilación de la región N-terminal de ECE-1c por CK2 estabiliza la proteína, protegiéndola de su degradación proteasomal.

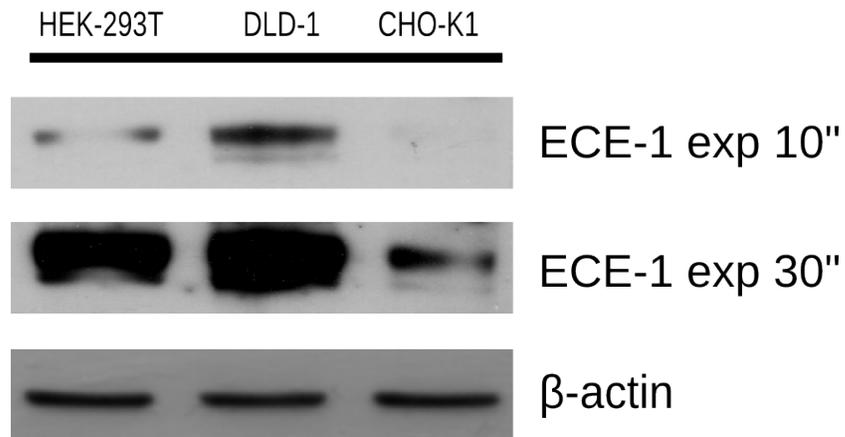


Figura 26: Niveles endógenos de ECE-1 en líneas celulares no tumorales y de **cáncer de colon**. Se midieron los niveles proteicos de ECE-1 total mediante western blot con lisados no tratados de células no tumorales HEK-293T y CHO-K1, y de cáncer de colon DLD-1. Se cargaron 40  $\mu$ g de proteína y se expuso la membrana por 10 o 30 segundos en la película fotográfica. Se muestran los resultados representativos de dos experimentos independientes.

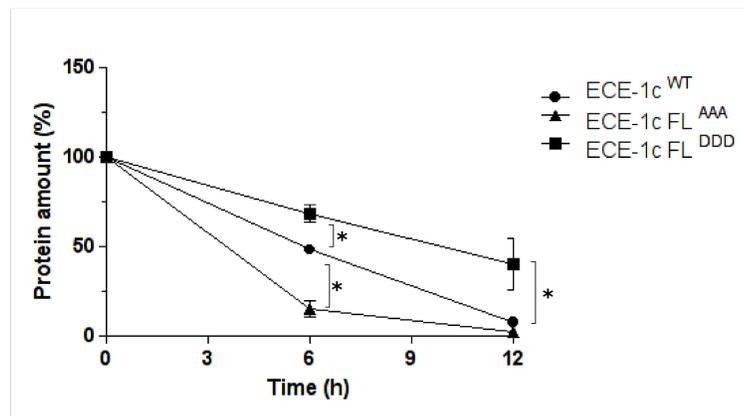
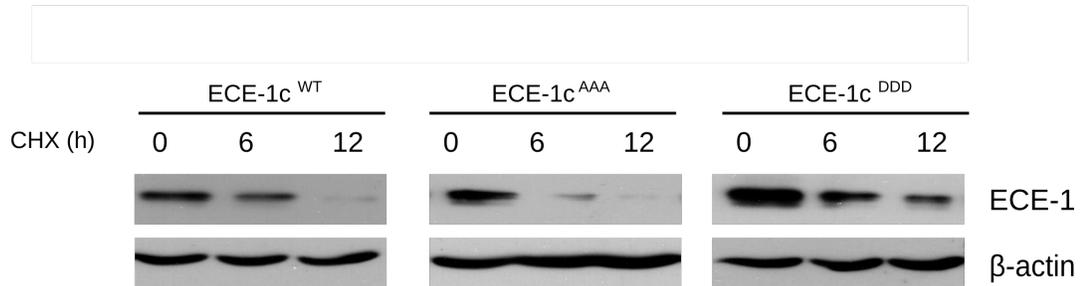


Figura 27: **Estabilidad de ECE-1c silvestre y mutantes.** Células CHO-K1 que expresaron ECE-1c silvestre (WT) y las mutantes no fosforilable (AAA) y fosfomimética (DDD) fueron tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cicloheximida (CHX) durante 12 horas. Las proteínas fueron detectadas mediante western blot utilizando un anticuerpo específico anti-ECE-1. Los pixeles de las bandas fueron cuantificados con el programa computacional Image J y normalizados por  $\beta$ -actina. Se graficó el promedio de los datos de tres experimentos independientes. A las 6 y 12 horas se compararon los datos correspondientes a las muestras de ECE-1c mutante (AAA o DDD) con respecto a su control (WT) utilizando el test *t* de student (\* $p < 0,05$ ).

### 6.2.5. Ubiquitinación de ECE-1c y su regulación por CK2

CK2 controla la degradación proteasomal de diversas proteínas a través de la regulación del proceso de ubiquitinación (Ruzzene & Pinna, 2010). Por lo tanto, se evaluó si la fosforilación de ECE-1c por CK2 regula la ubiquitinación de la proteína. Para ello se expresó ECE-1c y sus respectivas mutantes en células CHO-K1 en presencia o ausencia del inhibidor farmacológico de CK2, CX-4945. Este ensayo se realizó sobreexpresando la ubiquitina fusionada a una etiqueta de histidinas (Ub-His) y en presencia del inhibidor del proteasoma MG-132. De esta forma, se potenció la ubiquitinación, se inhibió la degradación proteasomal y se acumularon las proteínas ubiquitinadas.

Como se esperaba, la proteína silvestre ECE-1c se poli-ubiquitinó, proceso que fue más potente al inhibir la actividad de CK2 con CX-4945. Por otro lado, la mutante no fosforilable (ie, AAA) se ubiquitinó tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de CK2. Finalmente, la mutante fosfomimética (ie, DDD) no presentó un grado de ubiquitinación detectable, ni siquiera al inhibir CK2 (Figura 28).

En conclusión, la fosforilación de ECE-1c por CK2 la protege de ubiquitinación y degradación proteasomal, potenciando su estabilidad. Esto sugiere que dicha fosforilación podría aumentar el efecto de ECE-1c como promotor de la migración y la invasión.

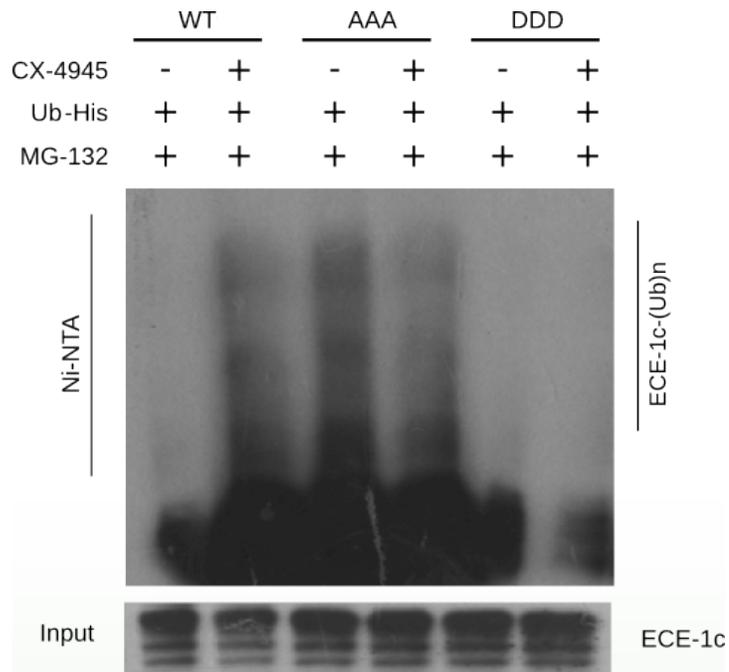


Figura 28: **Ubiquitinación de ECE-1c y su regulación por CK2.** Células CHO-K1 que expresaron ECE-1c silvestre (WT) y las mutantes no fosforilable (AAA) y fosfo-mimética (DDD) fueron co-transfectadas con p1170-Ubi<sup>WT</sup> (Ubiquitina-Histidina) y tratadas con 10  $\mu$ M MG-132 para inhibir degradación proteasomal. Las proteínas ubiquitinadas fueron separadas en una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA, separadas por SDS-PAGE y detectadas mediante western blot con un anticuerpo anti-ECE-1. Arriba, se muestran las bandas de ECE-1c poli-ubiquitinada. Abajo, se muestra un western blot de los niveles de ECE-1c detectados con el anticuerpo anti-ECE-1. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

### **6.3. Objetivo específico 3: evaluar si CK2 regula vía ECE-1c la migración e invasividad *in vitro* de células de cáncer colorectal**

Se ha descrito que la isoforma ECE-1c potencia la invasión en células de cáncer de próstata y mama (Lambert *et al.*, 2008; Smollich *et al.*, 2007). No obstante, se desconoce si ECE-1c está de algún modo relacionada con la migración e invasión de células de cáncer de colon, así como si la estabilidad de esta proteína por fosforilación está relacionada con dicho fenómeno. Para estudiar estos procesos, se sobreexpresaron las proteínas mutantes ECE-1c<sup>AAA</sup> y ECE-1c<sup>DDD</sup> en células DLD-1 y se evaluó su migración-3D y su invasión *in vitro*.

#### **6.3.1. Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la migración celular**

La migración es un proceso importante en la homeostasis celular y regeneración de tejidos, pero también es un fenómeno importante en la progresión de muchos cánceres, incluido el cáncer de colon, ya que es fundamental para la posterior invasión y metástasis (Parsons *et al.*, 2010). Es por esto que es necesario evaluar si ECE-1c, y en particular su fosforilación por CK2, está involucrada en este proceso.

Como se observa en la Figura 29, la sobreexpresión de la mutante fosfomimética ECE-1c<sup>DDD</sup> y la proteína ECE-1c silvestre produjeron un aumento significativo en la migración celular en comparación al control de células transfectadas con vector vacío (*mock*). Por otro lado, la mutante no fosforilable por CK2, ECE-1c<sup>AAA</sup>, al ser sobreexpresada no produjo un aumento significativo en la migración celular con respecto al control (Figura 29). Cabe destacar que esta diferencia no se debió al nivel de expresión de las proteínas ya que los niveles de transfección fueron simi-

lares para todas las isoformas, ni tampoco generó cambios en la viabilidad celular (Figura 29B y C).

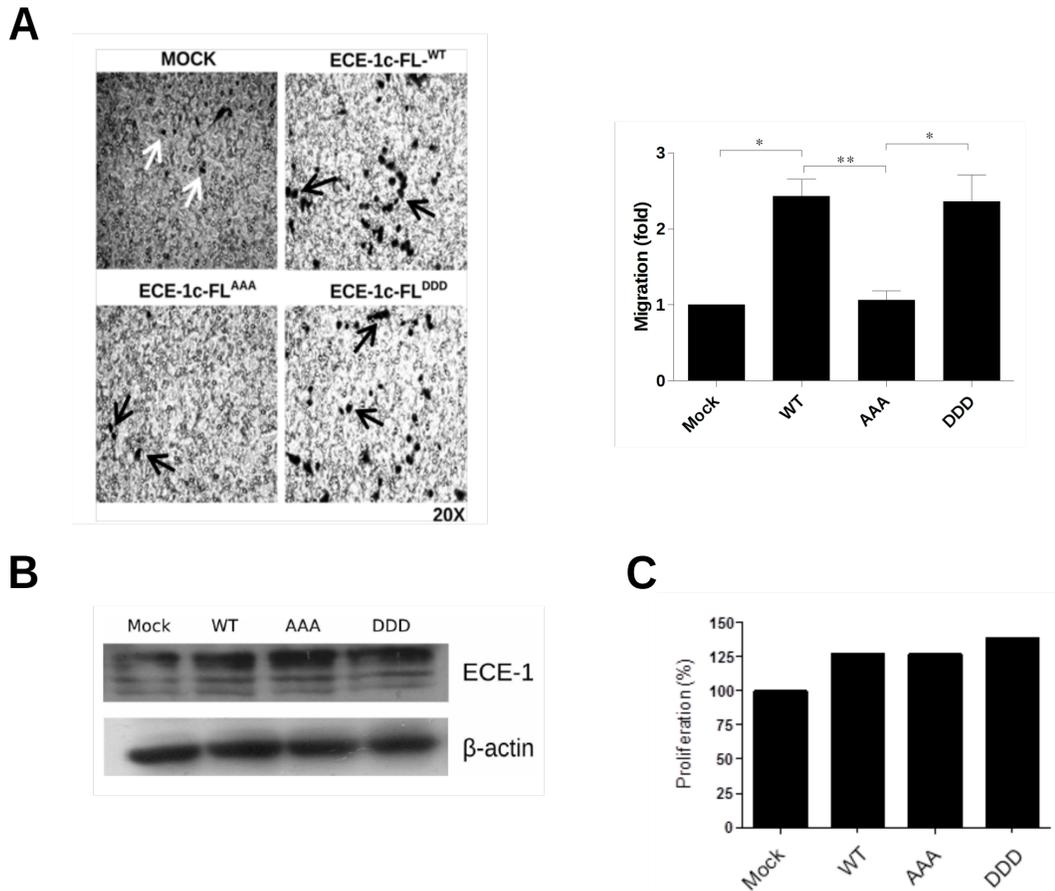


Figura 29: Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la migración celular. **A** Células de cáncer de colon DLD-1 que expresaron ECE-1 o las mutantes ECE-1<sup>AAA</sup> o ECE-1<sup>DDD</sup> o vector vacío (mock) fueron sembradas en cámaras de Transwell. Luego de 5 horas fueron teñidas, fijadas y contadas. A la derecha se muestra el gráfico del promedio de las veces de cambio (*fold*) del número de células que migraron con respecto al control. El análisis estadístico se realizó mediante el test de comparaciones múltiples de Dunnett. (N=3, \*p<0,05, \*\*p<0,01). **B** Niveles de las distintas isoformas de ECE-1 medidos por western blot y que se utilizaron en los experimentos de migración e invasión. **C** Viabilidad de las células que expresaron las mutante de ECE-1c medida por ensayo de MTS. Gráfico construido de dos experimentos independientes.

### 6.3.2. Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la invasión celular

La invasión es el proceso por el cual la célula tumoral penetra tejidos circundantes a través de la membrana basal y la matriz extracelular (Bonnans *et al.*, 2014). Para ello, es necesario que la célula migre, pero también que exprese proteínas extracelulares que degraden esta matriz, como metaloproteasas o MMPs, permitiendo que la célula pueda colonizar tejidos circundantes. Este proceso es fundamental para el inicio de la metástasis (Bonnans *et al.*, 2014; Deryugina *et al.*, 2006).

Como se esperaba, los resultados obtenidos en invasión (Figura 30) se correlacionaron con lo observado en los ensayos de migración en células de cáncer colon DLD-1. Se demostró que la fosforilación de ECE-1c por CK2 produce un aumento en el potencial invasivo de la célula, ratificando así la importancia de estas proteínas en la progresión del cáncer colorrectal.

Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio mostraron que el aumento en invasión producido por ECE-1c se correlaciona con un aumento en la actividad de la metaloproteasa de matriz MMP-9<sup>2</sup>. Asimismo, la inhibición de ECE-1c con un inhibidor farmacológico o su silenciamiento con un siRNA disminuye el potencial invasivo de células de cáncer colorrectal DLD-1<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup>Tesis de Hernan Huerta, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile

<sup>3</sup>Tesis de Pablo Cabello, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile

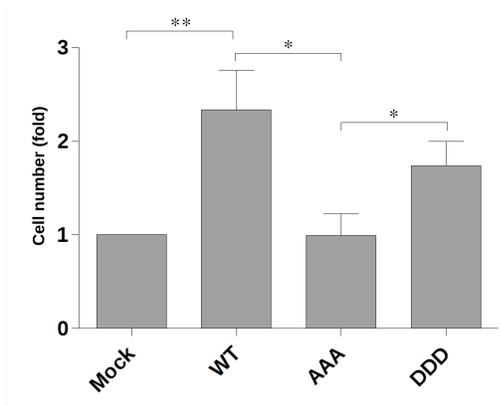


Figura 30: Efecto de la fosforilación de ECE-1c en la invasión celular . Células de cáncer de colon DLD-1 que expresaron ECE-1 nativa (WT) o las mutantes ECE-1<sup>AAA</sup> o ECE-1<sup>DDD</sup> o vector vacío (mock) fueron sembradas en cámaras de Transwell pre-tratadas con Matrigel. Luego de 22 horas fueron teñidas, fijadas y contadas. El gráfico representa un promedio de las veces de cambio (*fold*) de las células que invadieron la lámina de matrigel y atravesaron la membrana porosa. El análisis estadístico se realizó mediante el test de comparaciones múltiples de Dunnett. (N=3, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

## 7. Discusión

La proteína kinasa CK2 está involucrada en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer colorrectal y su sobreexpresión se relaciona directamente con propiedades celulares ligadas al cáncer (Ruzzene & Pinna, 2010). Por otro lado, el eje endotelina y la ECE-1 se han asociado a diversas patologías, tales como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y, más recientemente, cáncer. Las últimas investigaciones han sugerido un rol específico de la isoforma ECE-1c en la progresión del cáncer ovárico y prostático (Smollich *et al*, 2008; Lambert *et al*, 2008).

Hasta ahora no se conocía la relación entre la sobreexpresión de CK2 y la activación de ECE-1c, ni tampoco sus implicancias en la progresión del cáncer colorrectal. En esta tesis se ha demostrado que CK2 puede promover migración/invasión celular a través de la fosforilación y subsecuente estabilización de ECE-1c. Este es el primer estudio que relaciona a CK2 con ECE-1c y sus efectos en la progresión del cáncer de colon. Con esto, se abre un nuevo campo de estudio, proponiendo a ECE-1c como potencial blanco de diagnóstico, pronóstico o tratamiento de esta enfermedad.

### Regulación transcripcional de ECE-1c por CK2

El gen de ECE-1c posee sitios de unión a factores de transcripción de la familia Tcf/Lef en su región promotora. Estos factores modulan la transcripción de genes blanco de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, que se encuentra aberrantemente activada en cáncer de colon. Es por esto que investigaciones previas de nuestro grupo sugirieron que la activación de esta vía podría regular positivamente los niveles de

ECE-1c.

En este contexto, se construyó un reportero de luciferasa con el promotor de ECE-1c inhibiendo CK2 para regular negativamente la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina (Tapia *et al.*, 2006). Este estudio mostró que la inhibición de CK2 por el fármaco TBB disminuye la actividad reportera del promotor de ECE-1c sólo en células embrionarias HEK-293T, sugiriendo que la expresión de ECE-1c podría ser regulada positivamente por esta vía sólo en células no tumorales.

En relación con lo anterior, en esta tesis se realizó un análisis mediante RT-qPCR mostrando que la inhibición de CK2 no varía los niveles de mRNA de ECE-1c en células de cáncer de colon HT29 y DLD-1. Sin embargo, disminuye significativamente los niveles proteicos de ECE-1 en células no tumorales HEK-293T y de cáncer de colon HT29 y DLD-1 (Figura 17 y 18). Esto sugiere que al menos en nuestro modelo de cáncer de colon, CK2 promueve la expresión de ECE-1 probablemente por un mecanismo post-transcripcional e independiente de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina.

### **Fosforilación de ECE-1c por CK2**

La fosforilación de proteínas es un mecanismo que controla un gran número de procesos celulares. Se estima que esta modificación afecta a un 30 % del proteoma humano y es regulada por alrededor de 500 proteínas kinasas (Gyenis y Litchfield, 2008). En el caso particular de la proteína kinasa CK2, se conocen más de 300 sustratos, que regulan diversos procesos como transcripción, traducción, ciclo celular, apoptosis, entre otros (Trembley, 2010). En numerosos tipos de cáncer, CK2 se encuentra sobreexpresada, principalmente la subunidad catalítica  $\alpha$  y en algunos casos también la subunidad regulatoria  $\beta$  (Gyenis y Litchfield, 2008). Esta última aumenta la actividad catalítica de  $\alpha$  y modula su selectividad de sustrato, actuando

como una plataforma para la subunidad  $\alpha$  y manteniendo su estabilidad (Niefind *et al.*, 2010).

En esta tesis se demostró que la fosforilación *in vitro* de ECE-1c ocurre sin necesidad de la subunidad reguladora  $\beta$ , lo que ha sido demostrado también para otras proteínas, como calmodulina (Bidwai *et al.*, 1993). Por otro lado, existen proteínas que sí requieren de la subunidad  $\beta$  para ser fosforiladas por CK2, como es el caso de p27 (Tapia *et al.*, 2004) o Snail (Eshiere *et al.*, 2013), donde el sustrato interactúa directamente con la subunidad  $\beta$ , proceso que es esencial para la subsecuente fosforilación por la subunidad catalítica  $\alpha$ . Lo anterior sugiere que una célula con elevados niveles de CK2 $\alpha$ , como está ampliamente demostrado que ocurre en células cancerosas (Trembley, 2010), podría fosforilar a ECE-1c sin requerir necesariamente de la expresión elevada de la subunidad reguladora CK2 $\beta$ .

En esta tesis, se encontró que CK2 fosforila a ECE-1c en células de cáncer de colon DLD-1. Ésto se comprobó cuando la marca de fosforilación total disminuyó con el tratamiento con el inhibidor de CK2, TBB. Sin embargo, como no existe un anticuerpo que detecte la fosforilación por CK2 en los residuos específicos de fosforilación, este resultado no permitió determinar qué residuos están siendo fosforilados o si estos corresponden a los residuos putativos encontrados *in silico* (T9, S18 y S20). Por esta razón se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* y se evaluó por espectrometría de masas (ESI+), determinándose con certeza que los residuos fosforilados eran S18 y S20. Esto demostró por primera vez que CK2 es capaz de fosforilar a la región N-terminal de ECE-1c en los sitios anteriormente mencionados, sumando a esta proteína a la lista de sustratos de CK2 cuya fosforilación ha sido demostrada tanto *in vitro* como en un contexto celular.

## **Función de la región N-terminal de ECE-1c**

Se conocen cuatro isoformas de ECE-1 que presentan las mismas propiedades catalíticas, sin embargo difieren en su región N-terminal, lo que determina su localización subcelular (Muller *et al.*, 2003). En un modelo celular endotelial se demostró que la isoforma ECE-1c se localiza principalmente en la membrana plasmática y su actividad se incrementa mediante fosforilación por la kinasa PKC (Kuruppu *et al.*, 2012). Esto ratifica la importancia de la región N-terminal de ECE-1c, ya que la fosforilación por CK2 podría tener relación con cambios en su localización, actividad, estabilidad y un efecto en progresión tumoral.

En esta tesis se demostró que la inhibición de CK2 se traduce en una disminución los niveles proteicos de ECE-1 total. Sin embargo, no es posible demostrar lo que ocurre con la isoforma c, ya que no existe un anticuerpo comercial que la distinga de las otras variantes. Para tratar de resolver este problema, se construyó un plasmidio que codifica la región N-terminal de ECE-1c fusionada a la proteína fluorescente verde, GFP (NT-ECE-1c-GFP). La proteína GFP se fusionó en el extremo C-terminal, ya que anteriormente se había descrito que al estar fusionada en el extremo N-terminal de ECE-1c, GFP puede interferir e impedir las eventuales modificaciones post-traduccionales de esta región, como por ejemplo fosforilaciones (Kuruppu *et al.*, 2012).

Se evaluó la localización celular por microscopía confocal y se observó que presenta un patrón de distribución subcelular similar a la ECE-1c endógena descrita previamente (Schweizer *et al.*, 1997; Valdenaire *et al.*, 1999B; Kuruppu *et al.*, 2012). Aunque no se pudo distinguir la localización subcelular exacta, la proteína de fusión presenta un patrón granular citoplasmático y perinuclear, concordantes con una proteína de membrana que es sintetizada en el retículo endoplasmático,

procesada en Golgi y distribuida por la vía secretora. Además, resultados preliminares de nuestro laboratorio mostraron que la proteína de fusión NT-ECE-1c-GFP responde a estímulos con PMA (activador de PKC), cambiando su localización subcelular desde regiones perinucleares hacia la periferia celular, tal como había sido descrito para la proteína endógena (Kuruppu *et al.*, 2012).

Los datos anteriores demostraron que la sola presencia del extremo N-terminal de ECE-1c fusionada a GFP regula la localización de esta última a las regiones subcelulares donde teóricamente se encontraría la isoforma ECE-1c endógena. Por ende, se utilizó esta construcción para evaluar si al modular la actividad de CK2, esta proteína de fusión es capaz de imitar el comportamiento de ECE-1 total en líneas celulares no tumorales y de cáncer de colon. Interesantemente, la fusión de los 100 primeros residuos de la región N-terminal de ECE-1c fueron suficientes para disminuir los niveles de la proteína GFP cuando se inhibió CK2 utilizando TBB, lo cual no sucedió con GFP sola. Esto sugirió que la expresión de ECE-1c sería regulada por un mecanismo post-traducciona l a través de la fosforilación por CK2 en su región N-terminal, siendo uno de los candidatos la vía proteasomal.

Por otro lado, la inhibición de CK2 con TBB disminuyó la estabilidad de la región N-terminal de ECE-1c, observando un efecto más fuerte en células de cáncer de colon DLD-1 en comparación con células no tumorales HEK-293T. Esto fue consistente con los altos niveles proteicos y de actividad de CK2 descritos en diferentes modelos celulares de cáncer en comparación con células no tumorales, sustentando la hipótesis que las células de cáncer se harían “adictas a CK2” (Ruzzene & Pinna, 2010).

La estabilidad de ECE-1c mediada por fosforilación por CK2 se corroboró en un modelo celular que expresa niveles muy bajos de ECE-1 (CHO-K1), con el fin de

expresar la isoforma ECE-1c y detectarla con un anticuerpo genérico anti-ECE-1. Con esto se demostró que la proteína silvestre y en mayor grado la mutante fosfomimética (ECE-1c<sup>DDD</sup>) tuvieron mayor estabilidad que la mutante que no puede ser fosforilada por CK2 (ECE-1c<sup>AAA</sup>), dando cuenta de la importancia de CK2 en la fosforilación del N-terminal de ECE-1c en la regulación de su estabilidad proteica. La inhibición del proteasoma utilizando MG-132 dio luces sobre una posible degradación proteasomal de ECE-1c, sin embargo, queda pendiente determinar el mecanismo.

## Ubiquitinación y degradación de ECE-1c

CK2 regula la estabilidad de diversas proteínas y está directamente implicada en el proceso de degradación proteasomal. Por ejemplo, CK2 fosforila a la desubiquitinasa OTUB1 y favorece su actividad nuclear, desubiquitinando y estabilizando proteínas de unión a cromatina (Herhaus et al., 2015). Se sabe también que CK2 regula positiva o negativamente la degradación proteasomal de proteínas de forma directa. Es así como la fosforilación de c-Myc por CK2 previene su degradación proteasomal, potenciando la transcripción de genes involucrados en la progresión del cáncer. De esta manera, elevados niveles de actividad CK2 incrementarían los niveles de c-Myc estable, promoviendo la proliferación celular y contribuyendo al desarrollo tumoral (Duncan y Litchfield, 2008). Otro caso similar ocurre con  $\beta$ -catenina, que es fosforilada por CK2, estabilizándola y protegiéndola de su degradación proteasomal (Song *et al.*, 2000).

En esta tesis se mostró que CK2 fosforila a ECE-1c, impidiendo su degradación proteasomal, resultados que también son corroborados con la construcción NT-ECE-1c-GFP y el inhibidor del proteasoma MG-132. Al igual que c-Myc y  $\beta$ -

catenina, ECE-1c se estabiliza, por lo que elevados niveles de actividad de esta kinasa, tal como presentan las células de cáncer colorrectal, estarían aumentando los niveles de ECE-1c a través de un mecanismo desconocido promoverían la migración e invasión en células de cáncer colorrectal, así como posiblemente también en cáncer de próstata dado lo observado por Lambert y colaboradores con la misma isoforma (Lambert *et al.*, 2008)

Las proteínas al ser degradadas son marcadas con una cadena de poli-ubiquitinas que permite la identificación e interacción con el proteasoma. En la gran mayoría de los casos las proteínas son ubiquitinadas en un residuo de lisina (K). Efectivamente la región N-terminal de ECE-1c contiene un residuo de lisina (K6) bastante cercano a los residuos fosforilados por CK2 (ie., S18,S20).

Los resultados de esta tesis permiten sugerir que la degradación proteasomal de ECE-1c sería regulada por poli-ubiquitinación. Esto se confirmó en un modelo celular no tumoral, CHO-K1, donde se observó que ECE-1c sufre poli-ubiquitinación basal, la que es significativamente disminuida al inhibir la actividad de CK2. Asimismo, se demostró que la variante no fosforilable por CK2 (ECE-1c<sup>AAA</sup>) se poli-ubiquitina independiente de la inhibición de CK2, demostrando que la ausencia de fosforilación en esos sitios mantiene la ubiquitinación de la proteína. Finalmente, se observó que la mutante fosfomimética (ECE-1c<sup>DDD</sup>) no se ubiquitina, demostrando que la fosforilación en esos sitios previene la ubiquitinación y posterior degradación.

En relación al posible mecanismo que da cuenta de lo anterior, una posibilidad es que el N-terminal de ECE-1c fosforilado por CK2 podría interactuar con alguna proteína que impida la unión a su E3-ligasa específica, como por ejemplo una proteína de la familia de 14-3-3. Otra posibilidad es que fosforilación de estos resi-

duos provoque un cambio conformacional del dominio citoplasmático de ECE-1c, impidiendo la ubiquitinación.

El mecanismo de ubiquitinación también es desconocido, y poco se conoce de proteínas de membrana que son degradadas por el proteasoma. Esto se debe a que la gran mayoría, por su naturaleza, son degradadas por la vía lisosomal y/o autofagia. Sin embargo, un mecanismo posible es el de retrotranslocación, en el cual las proteínas integrales de membrana experimentan un proceso donde el dominio que originalmente se encuentra en el lumen del retículo endoplasmático, se retrotransloca hacia el citoplasma, pudiendo ser blanco del proteasoma (Baldrige & Rapoport, 2016). En muchos casos, la eliminación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico requiere de retrotranslocación hacia el citosol a través de complejos de ubiquitina ligasa unidas a la membrana, como lo es el caso de la proteína HDR1 (Zhang & Ye, 2016; Christianson & Ye, 2014 ).

## **Rol de ECE-1c en invasión celular**

Existe una extensa evidencia del rol de ET-1 en proliferación, angiogénesis y metástasis a través de la unión a su receptor ET<sub>A</sub>R (Rosanò *et al.*, 2013). Sin embargo, existe escasa literatura sobre el rol de ECE-1c en estos procesos característicos de células cancerosas. En este contexto se ha descrito que sus niveles son elevados en algunos modelos tumorales y se ha relacionado con progresión tumoral (Rayhman *et al.*, 2008). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de ECE-1c incrementa el fenotipo invasivo de células de cáncer de ovario, mama y próstata (Lambert *et al.*, 2008; Smollich *et al.*, 2008; Rayhman *et al.*, 2008). No obstante, no existen estudios que evalúen el efecto de ECE-1c en cáncer de colon ni tampoco si la estabilidad de esta enzima es regulada por fosforilación.

En este trabajo se mostró por primera vez que los niveles aumentados de ECE-1c por mayor estabilidad o sobreexpresión ectópica aumenta el potencial migratorio e invasivo de células de cáncer de colon DLD-1. Además, la sobreexpresión de una mutante fosfomimética y más estable de ECE-1c (ECE-1c<sup>DDD</sup>) incrementó la invasividad celular de la misma manera que ECE-1c silvestre. Por el contrario, la sobreexpresión de una mutante menos estable no fosforilable por CK2 (ECE-1c<sup>AAA</sup>) no tuvo un efecto significativo en la migración e invasión en estas células.

El valor similar en migración e invasión observado para la proteína silvestre y fosfomimética podría deberse a que las células de cáncer de colon presentan altos niveles proteicos y de actividad de CK2, lo que implica que la ECE-1 endógena se estaría fosforilando de manera excesiva, provocando el mismo efecto que la sobreexpresión de la mutante fosfomimética. Por otro lado, la sobreexpresión de ECE-1c no fosforilable (ECE-1c<sup>AAA</sup>) no produciría un aumento en la migración e invasión, puesto que CK2 no la fosforila en los residuos Ser18 y Ser20 de su extremo N-terminal.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio mostraron que la invasión celular disminuye al inhibir la actividad catalítica de ECE-1 con un inhibidor farmacológico, SM19712, en células de cáncer de colon DLD-1. No obstante, como el inhibidor SM19712 inhibe todas las isoformas de ECE-1, no se puede asegurar que el efecto se deba específicamente a ECE-1c, por lo que se utilizó un siRNA específico para ECE-1c, observándose que la invasión celular disminuyó significativamente. Estos resultados apoyan la idea de que la isoforma ECE-1c posee la capacidad potencial de promover invasión en células de cáncer de colon (Tesis Doctoral de Pablo Cabello; Niechi *et al.*, 2015).

Los resultados anteriores se pueden comparar con los descritos para líneas celu-

lares de cáncer ovárico, donde el silenciamiento de ECE-1c disminuyó significativamente la invasión celular, revirtió la transición epitelio-mesénquima y disminuyó casi un 90 % los niveles secretados de ET-1 (Rayhman et al, 2008). Interesantemente, estos efectos fueron completamente revertidos por la adición exógena de ET-1, lo que sugiere que en este modelo de cáncer, los efectos pro-tumorales de ECE-1c son dependientes de la producción continua de ET-1 y la interacción de este ligando con su receptor.

Por otro lado, en una línea celular de cáncer prostático (PC3), la sobreexpresión de ECE-1c potencia la invasión celular, mientras que su silenciamiento la disminuye. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en cáncer ovárico, la adición exógena de ET-1 al medio de cultivo no rescató los efectos del silenciamiento de ECE-1c en invasión (Lambert et al., 2008). Esto indica que podría existir un efecto de ECE-1c en invasión independiente de la producción de ET-1, al menos en cáncer prostático y posiblemente también en cáncer de colon.

El mecanismo por el cual ECE-1c potencia la invasión celular aún se desconoce. Sin embargo, se ha propuesto que puede ser a través de la producción de ET-1, o bien, a través de un mecanismo no canónico independiente de ET-1. Actualmente, esta línea de investigación es objeto de estudio de nuestro grupo y se ha propuesto que los efectos de ECE-1c no serían necesariamente a través de la señalización de ET-1, sino más bien por la activación indirecta de otras rutas alteradas en cáncer, como AKT y FAK, y la activación de metaloproteasas de matriz, específicamente MMP-9, que posee un conocido rol en invasión celular (Tesis doctoral de Hernan Huerta; Whyteside *et al.*, 2010).

En su conjunto, estos resultados permiten concluir que el aumento en la estabilidad de ECE-1c provocada por la fosforilación de CK2, está relacionada con un

aumento en la migración e invasión de células de cáncer de colon, dando luces de un nuevo mecanismo por el cual CK2 promovería la progresión maligna de esta enfermedad (Figura 31).

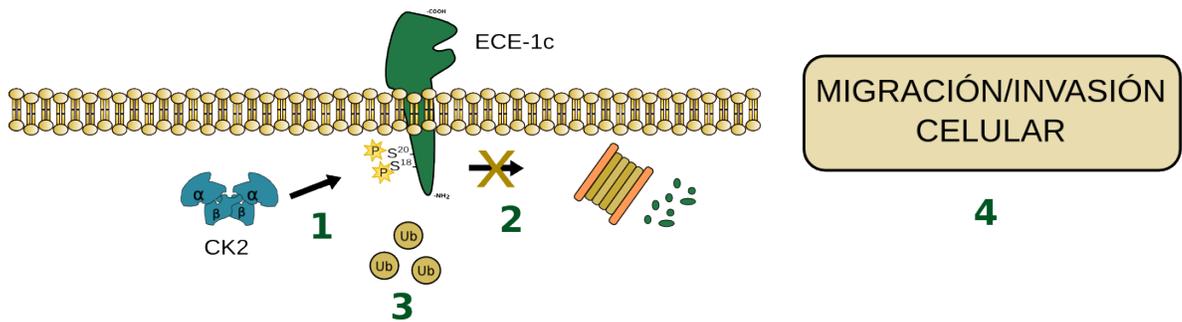


Figura 31: **Modelo de cómo CK2 podría promover la malignidad del cáncer colorrectal.** La proteína kinasa CK2 está aumentada en distintos tipos de cáncer, incluido el colorrectal. Los mayores niveles y actividad de esta kinasa podrían dar cuenta de una mayor fosforilación en los residuos Ser18 y Ser20 de la isoforma ECE-1c (1). Esta fosforilación promovería la unión de proteínas accesorias o cambios conformacionales que impedirían la ubiquitinación de ECE-1c y la subsecuente degradación proteasomal (2-3). Este proceso de degradación puede ser explicado por retrotranslocación, en el cual la ECE-1c se ubiquitina en su N-terminal y expondría su región C-terminal hacia el citoplasma, donde sería degradada por el proteasoma. Finalmente, la mayor estabilidad de ECE-1c potenciada por su fosforilación, promovería la migración y la invasión celular en células de cáncer de colon, seguramente por la mayor producción de ET-1 o por algún otro mecanismo independiente (4).

## 8. Conclusiones

1. CK2 fosforila *in vitro* a ECE-1c en los residuos Ser18 y Ser20.
2. La inhibición de CK2 disminuye la fosforilación de ECE-1 en líneas celulares de cáncer de colon DLD-1.
3. La fosforilación de ECE-1c por CK2 impide su poli-ubiquitinación y degradación proteasomal, promoviendo su estabilidad.
4. La estabilidad aumentada o la sobreexpresión de ECE-1c promueven migración e invasión en células de cáncer de colon DLD-1.

## 9. Referencias

Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G and Taylor I. (2011) Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer*. 85: 1759-1763.

Awano S, Dawson LA, Hunter AR, Turner AJ, Usmani BA. (2006). Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: specific siRNA targeting of ECE-1 blocks cell proliferation. *Int J Cancer*. 118(7):1645-52.

Baldrige RD, & Rapoport, TA, (2016). Autoubiquitination of the Hrd1 ligase triggers protein retrotranslocation in ERAD. *Cell*, 166(2), 394-407.

Bidwai, AP, Reed, J. C. & Glover C. V. (1993). Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(1), 265-270.

Bonnans, C, Chou, J, & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 786-801.

Christianson, JC, & Ye Y, (2014). Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. *Nature structural & molecular biology*, 21(4), 325-335.

D'Errico I, Moschetta A. (2008). Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol Life Sci*. 65(10):1523-43.

Deryugina, E, & Quigley, J. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(1), 9-34.

Deshiere A, Duchemin-Pelletier, E, Spreux E, Ciais D, Combes F, Vandembrouck Y, Couté Y, Mikaelian I, Giusiano S, Charpil C, Cochet C and Filhol O. (2013). Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction. *Oncogene*. 32, 1373–1383

Donoso A, Villarroel L, Pinedo G. (2006). Aumento de la mortalidad por cáncer de colon en Chile, 1990-2003. *Rev Med Chile*. 134:152-8.

Duncan J, & Litchfield D. (2008). Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(1), 33-47.

GLOBOCAN v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. (2013) [cited 2 May 2015]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-74

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281(5382):1509-12.

Herhaus L, Ana B. Perez-Oliva, Giorgio Cozza, Robert Gourlay, Simone Weidlich, David G. Campbell, Lorenzo A. Pinna, Gopal P. Sapkota. (2015). Casein kinase 2 (CK2) phosphorylates the deubiquitylase OTUB1 at Ser16 to trigger its nuclear localization *Sci Signal*. 8(372): ra35

Hong Y, Macnab S, Lambert LA, Turner AJ, Whitehouse A, Usmani BA. (2010). Herpesvirus saimiri (HVS)-based endothelin converting enzyme-1 (ECE-1) shRNA expression decreases prostate cancer cell invasion and migration. *Int J Cancer*. 129(3):586-98

Jackman RJ, Mayo CW. (1951). The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet*. 93(3):327-30

Jafri F, Ergul A. (2003). Nuclear localization of endothelin-converting enzyme-1: subisoform specificity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(12):2192-6

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. (2009) Cancer statistics 2009. *CA Cancer J Clin*. 59:225-49

Khimji AK, Rockey DC. (2010). Endothelin–biology and disease. *Cell Signal*. 2(11):1615-25

Kim TH, Xiong H, Zhang Z, Ren B. (2005).  $\beta$ -Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene*. 24(4):597-604

Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Smith AI. (2010). Role of Protein Kinase C in Endothelin Converting Enzyme-1 trafficking and shedding from endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 398(2):173-7

Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Smith AI. (2012) Protein Kinase C recognition

sites in the cytoplasmic domain of Endothelin Converting Enzyme-1c. *Biochem Biophys Res Commun.* 427(3):606-10

Kuruppu S, Smith AI. (2012). Endothelin Converting Enzyme-1 phosphorylation and trafficking. *FEBS Lett.* 586(16):2212-7

Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Ian Smith A. (2013). Applicability of green fluorescence protein in the study of endothelin converting enzyme-1c trafficking. *Protein Sci.* 22(3):306-13

Lambert LA, Whyteside AR, Turner AJ, Usmani BA. (2008). Isoforms of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) have opposing effects on prostate cancer cell invasion. *Br J Cancer.* 99(7):1114-20

Lee E, Muller W. (2010). *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes.* Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2(10), a003236.

Litchfield DW. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 369(Pt 1):1-15

MacLeod K, Husain R, Gage D, Ahn K. (2002). Constitutive phosphorylation of human endothelin-converting enzyme-1 isoforms. *J Biol Chem.* 277(48):46355-63

MacDonald BT, Tamai K, He X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 17(1):9-26

Manni S, Brancalion A, Mandato E, Tubi LQ, Colpo A, Pizzi M, Cappellesso R, Zaffino F, Di Maggio SA, Cabrelle A, Marino F, Zambello R, Trentin L, Adami F, Gurrieri C, Semenzato G, et al. (2013) Protein kinase CK2 inhibition down modulates the NF-kappaB and STAT3 survival pathways, enhances the cellular proteotoxic stress and synergistically boosts the cytotoxic effect of bortezomib on multiple myeloma and mantle cell lymphoma cells. *PLoS One.* 8: e75280.

Meggio F, Pinna LA. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2. *FASEB J.* 17:349-368

Meyerhardt J, Saunders M (2008). *Colorectal cancer.* New York : Mosby Elsevier

Ministerio de Salud (MINSAL), Gobierno de Chile. *Primer informe de registros poblacionales de cancer de Chile quinquenio 2003-2007.* (2012)

Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougard C.

(2003). Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J Biol Chem.* 278(1):545-55

Niechi I, Silva E, Cabello P, Huerta H, Carrasco V, Villar P, ... & Tapia, JC. (2015). Colon cancer cell invasion is promoted by protein kinase CK2 through increase of endothelin-converting enzyme-1c protein stability. *Oncotarget*, 6(40), 42749.

Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger OG. (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2holoenzyme. *EMBO J.* 20(19):5320-31

Niefind K, Raaf J, Issinger OG. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell Mol Life Sci.* 66(11-12):1800-16

Parsons, J, Horwitz, A, & Schwartz, M. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 633-643.

Pelayo JC, Poole DP, Steinhoff M, Cottrell GS, Bunnett NW. (2011). Endothelin converting enzyme-1 regulates trafficking and signalling of the neurokinin 1 receptor in endosomes of myenteric neurones. *The Journal of physiology.* 589(21):5213-30

Ponce DP, Yefi R, Cabello P, Maturana JL, Niechi I, Silva E, Galindo M, Antonelli M, Marcelain K, Armisen R, Tapia JC. (2011). CK2 functionally interacts with AKT/PKB to promote the  $\beta$ -catenin-dependent expression of survivin and enhance cell survival. *Mol Cell Biochem.* 356(1-2):127-32

Ponce DP, Maturana JL, Cabello P, Yefi R, Niechi I, Silva E, Armisen R, Galindo M, Antonelli M, Tapia JC. (2011). Phosphorylation of AKT/PKB by CK2 is necessary for the AKT-dependent up-regulation of  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *J Cell Physiol.* 226(7):1953-9

Rayhman O, Klipper E, Muller L, Davidson B, Reich R and Meidan R. (2008). Small interfering RNA molecules targeting endothelin-converting enzyme-1 inhibit endothelin-1 synthesis and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 68: 9265-9273.

Rizk P and Barker N. (2012). Gut stem cells in tissue renewal and disease: methods, markers, and myths. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 4(5):475-96.

Rosanò L, Spinella F, and Bagnato A. (2013). Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* 13, 637–651.

Ruzzene M and Pinna LA. (2010). Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? *Biochim Biophys Acta*. 1804: 499-504

Schulz H, Dale GE, Karimi-Nejad Y, Oefner C. (2009). Structure of human endothelin-converting enzyme I complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol*. 385(1):178-87

Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deuschle U, Edwards J, Stumpf J, & Löffler B. (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochemical Journal*, 328(3), 871-877.

Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K. (1995) Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 207(2):807-12

Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K. (1996). Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J*. 315 (3):863-7

Smith AI, Lew RA, Thomas WG, Tochon-Danguy N. (2006). Protein Kinase C Regulates the Cell Surface Activity of Endothelin-Converting Enzyme-1. *Int J Pept Res Ther*. 12(3):291-295

Smollich M, Wülfing P. (2007a). The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies. *Curr Vasc Pharmacol*. 5(3):239-48

Smollich M, Gotte M, Yip GW, Yong ES, Kersting C, Fischgrabe J, Radke I, Kiesel L and Wulfig P. (2007b). On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 106: 361-369.

Smollich M, Gotte M, Kersting C, Fischgrabe J, Kiesel L and Wulfig P. (2008). Selective ETAR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat*. 108: 175-182. 21.

Song DH, Sussman DJ, Seldin DC. (2000). Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*. 275(31):23790-7

Tapia JC, Bolanos-Garcia VM, Sayed M, Allende CC and Allende JE. (2004). Cell cycle regulatory protein p27KIP1 is a substrate and interacts with the protein kinase CK2. *J Cell Biochem.* 91: 865-879.

Tapia JC, Torres VA, Rodriguez DA, Leyton L, Quest AF. (2006). Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(41):15079-84

Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L, Quest AF. (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 27(21):7703-17

Trembley JH, Chen Z, Unger G, Slaton J, Kren BT, Van Waes C, Ahmed K. (2010). Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy. *Biofactors.* 36(3):187-95

Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem.* 264(2):341-9

Valdenaire O, Barret A, Schweizer A, Rohrbacher E, Mongiat F, Pinet F, & Tougard, C. (1999). Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *J Cell Sci,* 112(18), 3115-3125.

Widelitz R. Growth Factors. (2005). Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors.* 23(2):111-6

Whyteside A, Hinsley E, Lambert L, McDermott, & Turner A. (2010). ECE-1 influences prostate cancer cell invasion via ET-1-mediated FAK phosphorylation and ET-1-independent mechanisms. *Canadian journal of physiology and pharmacology,* 88(8), 850-854.

Yefi R, Ponce DP, Niechi I, Silva E, Cabello P, Rodriguez DA, Marcelain K, Armi-sen R, Quest AF, Tapia JC. (2011). Protein kinase CK2 promotes cancer cell viability via up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and enhanced prostaglandin E2 production. *J Cell Biochem.* 112(11):3167-75

Zarate, A, Alonso, F, Garmendia, M, & López-Köstner, F. (2013). Increasing crude and adjusted mortality rates for colorectal cancer in a developing South American country. *Colorectal Disease*, 15(1), 47-51.

Zhang, T, & Ye Y, (2016). Ever HRD a ubiquitin-gated channel?. *Cell Research*. 1-2.

**Tesis:**

Tesis de Hernan Huerta, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, En desarrollo.

Tesis de Pablo Cabello, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, 2014.