

UCH-FC

Biotecnología

M445

c.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

LA PROTEÍNA KINASA CK2 REGULA LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR
Y ACTIVIDAD TRANSACTIVADORA DE β -CATENINA POR
FOSFORILACIÓN EN EL EXTREMO C-TERMINAL DE SU DOMINIO
ARM

Seminario de Título

Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

José Luis Maturana Galleguillos

Noviembre, 2011

Santiago, Chile

Director de Seminario de Título: Dr Julio Tapia Pineda

Patrocinante: Dra Lorena Norambuena



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. José Luis Maturana Galleguillos,

“LA PROTEÍNA KINASA CK2 REGULA LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR Y ACTIVIDAD TRANSACTIVADORA DE β -CATENINA POR FOSFORILACIÓN EN EL EXTREMO C-TERMINAL DE SU DOMINIO ARM”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Julio Tapia Pineda
Director Seminario de Título

Dra. Lorena Norambuena Morales
Prof. Patrocinante

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión

Dra. Verónica Palma Alvarado
Evaluadora



Biografía



Mi nombre es José Luis Maturana Galleguillos, nací en Santiago, ciudad donde he vivido hasta el día de hoy. Egresé de enseñanza media desde el Instituto Nacional, para después ingresar al Programa Académico de Bachillerato en la Universidad de Chile. Al terminar bachillerato, donde curse asignaturas de la carrera de Kinesiología me decidí por la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. En enero del año 2009 ingresé al Laboratorio de Transformación Celular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr Julio Tapia Pineda. Ahí realicé una unidad de investigación que posteriormente desembocó en el inicio de mi seminario de título. Durante el desarrollo de mi seminario, realicé dos estadias en distintos laboratorios. Una estadia en el laboratorio dirigido por el Dr Felipe Barros, perteneciente al CECS de Valdivia y otra en el laboratorio dirigido por el Dr Steffen Härtel, en la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile. Al finalizar mi trabajo en este último laboratorio se dio por finalizado mi seminario de título, el cual presento en las páginas venideras.

Agradecimientos

Al ingresar al Laboratorio de Transformación Celular, mi primer contacto con el trabajo práctico fue guiado principalmente por los dos alumnos pertenecientes al laboratorio en ese entonces: Rodrigo y Daniela. Ellos me enseñaron cuestiones básicas de laboratorio junto con quehaceres más específicos de mi trabajo. A ellos mis agradecimientos iniciales, por ser los que ayudaron en mi comienzo, periodo donde todo novato necesita mayor tui-ción y que por lo demás siempre mantuvieron una buena disposición durante el periodo en que compartimos nuestro lugar de trabajo.

Junto con ellos, agradecer a cuatro alumnos que se integraron al laboratorio poste-riormente: Roger, Pablo, Edu y Nacho. Ellos a menudo me escucharon y ayudaron si se los pedía y además, por sobre todo, contribuyeron a construir y mantener un ambiente de trabajo agradable, distendido y amable con todos sus integrantes.

Agradecer también a integrantes de los laboratorios vecinos, al Dr Mario Galindo y sus alumnos, principalmente a Hector y Mariana, quienes siempre tuvieron buena disposición al requerir de su consejo. Además a los integrantes del laboratorio del Dr Norbel Galanti, el Dr Gonzalo Cabrera y sus alumnos, quienes facilitaron en innumerables ocasiones su equipamiento científico y, si era necesario, prestaron su ayuda para resolver mis dudas.

Mi estadía en el CECS de Valdivia fue breve, pero importante. Estuve una semana en el laboratorio del Dr Felipe Barros, con quien trabajé codo a codo en el microscopio durante horas. Gracias a él por su dedicación, que pese a lo breve, fue y es trascendente para mí. También agradecer a Alex, quien me asistió con mis experimentos mientras estuve en dicho laboratorio y compartió conmigo los escasos momentos libres.

Gracias al Dr. Steffen Härtel, director del laboratorio SCIAN, donde estuve trabajando alrededor de 3 meses. Siempre tuvo una excelente disposición conmigo, para escuchar mis preguntas y prestarme guía, a pesar de estar todo lo ocupado que suele estar un jefe de laboratorio. También agradecer al Dr Omar Ramirez, quien me enseñó a utilizar las

herramientas que ocupe durante mi trabajo en aquel laboratorio.

Por supuesto agradecer al jefe del laboratorio donde realicé la mayor parte de este trabajo , el Dr julio Tapia. Primero por permitirme trabajar en su laboratorio y aceptar ser mi tutor y segundo, por todo el trabajo que realizó guiándome en mis primeros pasos como trabajador de la ciencia. Gracias por compartir conmigo extensas charlas, sobre ciencia u otros temas ajenos a ella, que finalmente permitieron una relación respetuosa, pero cercana y de confianza. Muchas gracias por su especial comprensión, la que debió tener en más de alguna ocasión conmigo. Gracias por valorar cosas ajenas al trabajo científico y hacer que estos valores trasciendan el espíritu de su laboratorio.

Finalmente, agradecer a mi familia, a mis dos hermanos por soportar mi carácter y sobre todo a mi padre y madre, quienes siempre han dado soporte a mi desarrollo, a mis inquietudes, independiente de cuales sean estas. Ellos me permitieron llevar a cabo este seminario de título brindándome todo lo que necesitase, como siempre lo han hecho y seguramente como siempre lo harán. Muchas gracias.

Índice

0.1. Lista de abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. La proteína kinasa CK2 y su relación con cáncer.	5
1.2. La ruta de señalización Wnt/ β -catenina y su papel en cáncer de colon . .	6
1.3. Translocación núcleo-citoplasmática de β -catenina	9
1.4. Papel de CK2 en la ruta de señalización Wnt/ β -catenina	12
1.5. Hipótesis	14
1.6. Objetivo general	14
1.7. Objetivos específicos	14
2. Materiales y métodos	15
2.1. Materiales	15
2.2. Cultivo celular	15
2.3. Transfección de células	15
2.4. Análisis de expresión mediante RT-PCR	17
2.5. Análisis de expresión mediante Western Blot	18
2.6. Microscopía confocal de Fluorescencia	19
2.7. Modelamiento de los gránulos nucleares	19
2.8. Recuperación de la fluorescencia después del blanqueamiento por luz (FRAP)	20
2.9. Análisis estadístico	21
3. Resultados	22

3.1.	Mutantes sitio dirigidas de β -catenina y análisis de su secuencia	22
3.2.	Efecto de la mutación del residuo S646 en la actividad transactivadora de β -catenina	23
3.3.	Efecto de la mutación del residuo S646 de β -catenina en la expresión de survivina	24
3.4.	Localización subcelular de las distintas formas de β -catenina	25
3.5.	Análisis de los gránulos nucleares formados por las distintas variantes de β -catenina	28
3.5.1.	Representación 3D de los gránulos nucleares	28
3.5.2.	Número y volumen total de los gránulos nucleares	29
3.5.3.	Distribución de los gránulos nucleares según su volumen individual	30
3.5.4.	Superficie total expuesta por los gránulos	32
3.6.	Movilidad de GFP- β -catenina en células vivas. (Resultados preliminares)	34
4.	Discusión	37
5.	Conclusiones	44
	Referencias	45

Índice de figuras

1.	Estructura cristalográfica de β -catenina humana	7
2.	Esquema de la ruta Wnt/ β -catenina	8
3.	Alineamiento de las secuencias de β -catenina mutantes y silvestre	22
4.	Actividad reportera luciferasa TOP/FOP flash	23
5.	Niveles de mRNA y proteicos de survivina en células HEK-293T	25
6.	Localización subcelular de β -catenina WT y sus variantes mutantes	27
7.	Modelo tridimensional de núcleos celulares de HEK-293T	28
8.	Número y volumen de los gránulos en el núcleo celular	29
9.	Distribución de los gránulos nucleares según su volumen	31
10.	Volumen individual de los gránulos nucleares	32
11.	Superficie total promedio de los gránulos nucleares	33
12.	Exportación de las distintas formas de β -catenina	36

Índice de cuadros

1.	Plasmidios utilizados en este trabajo	17
2.	Partidores utilizados en las reacciones de PCR	18
3.	Tabla resumen de los resultados del análisis 3D	34

0.1. Lista de abreviaturas

ARC	<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
APC	<i>Adenomatous Poliposis Coli</i>
ARM	Dominio estructural Armadillo
arm	Motivo estructural Armadillo
BCL9	<i>B-cell CLL/lymphoma 9</i>
CMV	Citomegalovirus
CRM1	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DVL	<i>Dishevelled</i>
FRAP	Recuperación de la Fluorescencia Después del Blanqueamiento por Luz
Fz	<i>Frizzled</i>
GADPH	Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GSK3 β	Glicogeno Sintasa Kinasa 3 β
HATs	Histonas Acetil Transferasa
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
I κ B	Proteína inhibitoria del Factor Nuclear B (NF- κ B)
Kaps	Carioporinas- β /Importinas- β

LRP5/6	Proteína 5/6 relacionada con receptores de LDL
NF-κB	Factor Nuclear B
NES	Señal de Exportación Nuclear
NLS	Señal de Localización Nuclear
NUPs	Nucleoporinas
MDM2	<i>Murine double minute clone 2 oncoprotein</i>
RanBP3	<i>Ran Binding Proteín 3</i>
R1-R12	Repetidos armadillo desde el 1 al 12
RNA	Ácido ribonucleico
ROI	Región de interés
S646	Serina 646
S646A	Serina 646 mutada por alanina
S646D	Serina 646 mutada por ácido aspártico
TCF/LEF	<i>T-cell factor/lymphocyte enhancer factor-1</i>
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site</i>
WREs	Elementos de Respuesta a Wnt
3D	Tridimensional

Resumen

La proteína kinasa CK2 está presente en todas las células eucariontes. Su actividad aumentada se asocia con la transformación de diversos tejidos, así como el comportamiento agresivo de los tumores. CK2 participa en la ruta de señalización Wnt/ β -catenina, la cual está implicada en procesos celulares que conducen al cáncer. Su componente principal es la proteína β -catenina, la que transactiva la expresión de genes específicos cuando se localiza en el núcleo. Sin embargo, el mecanismo que da cuenta de la localización nuclear de β -catenina aun se desconoce. En nuestro laboratorio, se ha propuesto que el residuo Ser-646 de β -catenina podría ser un blanco de CK2 y que, eventualmente, su fosforilación podría tener algún efecto en la localización nuclear y actividad transactivadora. Es así como la hipótesis de este trabajo fue que "La localización nuclear y actividad transactivadora de β -catenina son reguladas por CK2 a través de la fosforilación del residuo Ser-646 en el extremo C-terminal del dominio ARM". Así también, el objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de la naturaleza química del residuo 646 de β -catenina en su importación nuclear y actividad transactivadora. Se diseñaron dos mutantes puntuales de β -catenina, S646A y S646D, y junto con la forma silvestre se expresaron fusionadas a GFP en células HEK-293T. Luego, en una primera etapa se analizó: (i) la actividad transactivadora de β -catenina, mediante un ensayo reportero; (ii) la expresión de survivina, un blanco de la ruta Wnt/ β -catenina, mediante RT-PCR y western blot; y (iii) la localización subcelular de β -catenina, mediante microscopía confocal de fluorescencia. Posteriormente, en una segunda etapa se realizó lo siguiente: (iv) generación de modelos 3D de los núcleos y análisis del patrón de los gránulos; y (v) evaluación de la cinética de las variantes de β -catenina desde el núcleo al citoplasma, mediante la técnica de FRAP. Aunque las tres formas de β -catenina tenían actividad transactivadora, los resultados no mostraron diferencias significativas entre ellas en el ensayo reportero, ni tampoco en los niveles de mRNA y proteína de survivina. La localización de las mismas fue casi exclusivamente nuclear, presentando un notorio patrón granular. El

análisis 3D de estos gránulos mostró que a pesar de que el volumen total era el mismo en las 3 condiciones, estos presentaban diferencias significativas en su número, volumen y área expuesta. No obstante, los datos provenientes de la movilidad de las proteínas mediante la técnica FRAP no fueron suficientes para relacionarlos con los datos anteriores. Por lo tanto, la naturaleza química del residuo 646 de β -catenina no tiene efecto en su capacidad de transactivar genes, así como tampoco incide en su capacidad para localizarse en el núcleo, no obstante, pareciera tener un rol diferencial en la formación de los gránulos de β -catenina dentro de este compartimento. En consecuencia, estos datos sugieren que la fosforilación de β -catenina en S646 por CK2 podría tener un efecto en su capacidad para entrar o salir del núcleo, aunque para comprobarlo por FRAP habría que realizar un mayor número de experimentos.

Abstract

Protein kinase CK2 is present in all eukaryote cells. Its augmented activity is associated with transformation of various tissues, as well as aggressive behavior of tumors. CK2 is involved in Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is implicated in cellular processes leading to cancer development. The key component of this pathway is β -catenin, which transactivates specific genes once located into the nucleus. However, the mechanism explaining the β -catenin localization in this compartment is still unclear. In our laboratory, it has been proposed that β -catenin residue Ser-646 could be a CK2 target and, eventually, its phosphorylation could have an effect in nuclear localization and transactivation activity of β -catenin. Thus, the hypothesis of this work was "nuclear localization and transactivation activity of β -catenin are regulated by CK2 through phosphorylation at residue Ser-646". Accordingly, the general objective was to evaluate the effect of residue 646 mutation in nuclear import and transactivation activity of β -catenin. Two point mutants of β -catenin were designed, S646A y S646D, and with the wild type form were expressed as GFP fusion proteins in HEK-293T cells. In a first stage it was analyzed: (i) transactivation activity of β -catenin, by using a reporter assay; (ii) survivin expression, a target of Wnt/ β -catenina pathway, by using RT-PCR and western blot; and (iii) β -catenin subcellular localization, by using confocal fluorescence microscopy. In a second stage, it was done the following: (iv) Generation of 3D models of β -catenin expressing nuclei and analysis of the granules inside; and (v) kinetic analysis of the GFP- β -catenin mutants moving from the nucleus to the cytoplasm, by using FRAP. Although the three different forms of β -catenin did show transactivation activity, results with the reporter assay did not provide statistical significance, as in mRNA levels and survivin protein expression experiments. Subcellular localization was almost exclusively nuclear, showing a distinctive granular pattern for all forms. Tridimensional analysis of these granules showed same total volumes per cell, but significant difference in their number, individual volume and exposed area. Nevertheless, results of protein

mobility assessed through FRAP were not sufficient to relate them with our previous data. Therefore, we can conclude that chemical nature of residue 646 of β -catenin does not have an effect in its capacity to transactivate genes, neither affects its capacity to localize into the nucleus, however, it seems to have a differential role in β -catenin granules formation inside of this compartment. Accordingly, these data suggest that β -catenin phosphorylation at S646 by CK2 could have an effect in its capacity to shuttle between cytoplasm and nucleus, even though to ascertain this by FRAP it would need a larger number of experiments.

1. Introducción

1.1. La proteína kinasa CK2 y su relación con cáncer.

La enzima CK2 (antiguamente llamada Caseína Kinasa 2) es una serina/treonina kinasa presente en todas las células eucariontes. Generalmente se encuentra como tetrámero compuesto de subunidades α/α' y β con una estructura general de $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2'\beta_2$ o $\alpha\alpha'\beta_2$. Las subunidades α/α' poseen la actividad catalítica mientras que la subunidad β es sólo regulatoria [Allende y Allende 1995]. Se ha encontrado que CK2 tiene como sustratos a más de 300 proteínas, de las cuales alrededor de 60 son factores de transcripción, 50 afectan la estructura del DNA/RNA o están comprometidas en la síntesis o traducción de RNA [Meggio y Pinna 2003].

En relación al cáncer, la actividad catalítica aumentada de CK2 ha sido asociada con la transformación maligna de diversos tejidos, así como con el comportamiento agresivo de los tumores. La sobreexpresión de CK2 ha sido documentada en varios tipos de cáncer, incluyendo el de mamas, riñón, próstata y pulmón [Duncan y Litchfield 2008]. Los mecanismos moleculares que explican la capacidad de CK2 para promover la proliferación celular incluyen activación o inhibición por fosforilación de proteínas que participan en el control del ciclo celular, como por ejemplo p53, MDM-2 y p27/KIP1 [Hjerrild y col. 2001; Meggio y Pinna 2003; Ahmed y col. 2002; Tapia y col. 2004].

CK2 también está involucrada en la resistencia a la apoptosis, por ejemplo, fosforilando a la proteína anti-apoptótica ARC, la cual inhibe a la caspasa 8 [Li y col. 2002], o fosforilando a I κ B, lo cual activa a NF- κ B, cuyos genes blanco están relacionados con la resistencia a la apoptosis y proliferación celular, entre otros [Dominguez y col. 2009]. Asimismo, CK2 ha sido identificada como un regulador positivo de la transcripción de survivina [Tapia y col. 2006], una proteína anti-apoptótica cuya expresión se gatilla en el desarrollo embrionario y también en varios cánceres [Altieri 2004].

1.2. La ruta de señalización Wnt/ β -catenina y su papel en cáncer de colon

La ruta Wnt/ β -catenina está implicada en diversas etapas del desarrollo, diferenciación y reparación de los tejidos de individuos adultos. Las señales Wnt son pleiotrópicas, causando efectos que van desde la estimulación mitogénica, adopción de un determinado linaje celular y proliferación celular [Logan y Nusse 2004].

El componente principal de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina es la proteína β -catenina, debido a su actividad transactivadora sobre genes específicos. Además, esta proteína tiene un papel importante en las uniones celulares adherentes, donde une al dominio citoplasmático de E-cadherina y lo conecta, a través de α -catenina, con el citoesqueleto de actina [Hülsken y col. 1994]. La estructura primaria de β -catenina humana está constituida por 781 aminoácidos, de los cuales 137 forman su extremo amino terminal (NH_2 -terminal), 527 aminoácidos conforman su región central y 117 el extremo carboxilo terminal (COOH -terminal) [Xing y col. 2008].

La región central de β -catenina está compuesta por doce copias, repetidas secuencialmente, de un motivo estructural formado por 42 aminoácidos llamado armadillo (arm). Asimismo, estos doce motivos estructurales repetidos (R1-R12) forman un dominio estructural mayor conocido como DOMINIO ARMADILLO o simplemente ARM. Cada motivo, exceptuando el séptimo, está compuesto de tres α -hélices, una α -hélice corta de aproximadamente dos vueltas (H1), seguida de dos α -hélices más largas de 2 ± 3 vueltas (H2) y 3 ± 4 vueltas (H3), respectivamente (figura 1) [Huber y col. 1997].

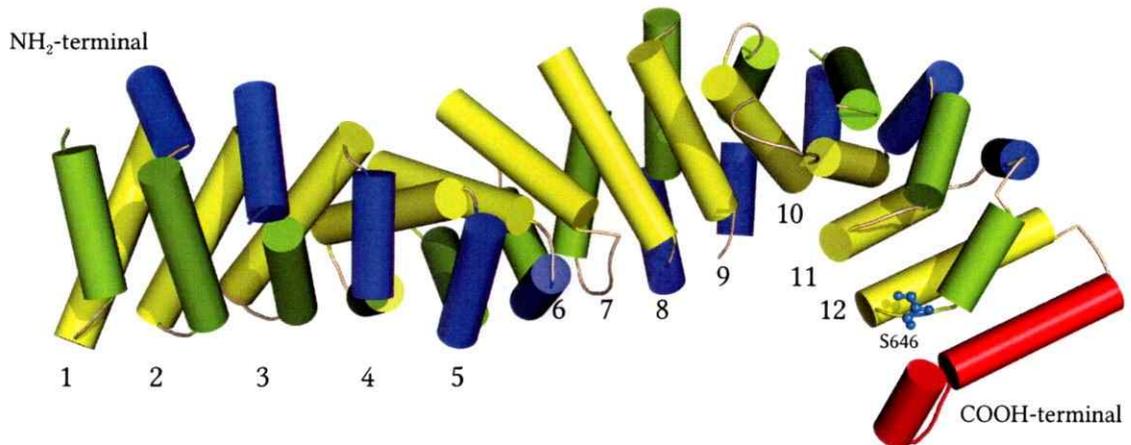


Figura 1: Estructura cristalográfica de β -catenina humana.

Se enumeran los 12 motivos armadillo, mostrándose las hélices H1, H2 y H3 en verde, amarillo y azul respectivamente. Además se indican los extremos amino terminal (NH_2 -terminal) y carboxilo terminal (COOH -terminal) y se destaca el aminoácido serina 646 (S646), el cual fue mutado en este trabajo. La estructura cristalográfica corresponde a la entregada por Xing y colaboradores y depositada en el Protein Data Bank bajo el código 2Z6H [Xing y col. 2008]. La imagen fue generada usando el programa Pymol (THE PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM, Version 1.3, Schrödinger, LLC).

En ausencia de ligandos Wnt la β -catenina es constantemente enviada a degradación proteasomal mediante un complejo citoplasmático de destrucción formado por las proteínas Axina, APC (*Adenomatous Poliposis Coli*), GSK3 β (*Glicogen Synthase Kinase 3 β*) y CK1 α . β -Catenina es secuencialmente fosforilada en su extremo NH_2 -terminal en residuos de serina y treonina por CK1 α y GSK3 β , resultando en el reconocimiento por β -Trecp, una subunidad de ubiquitina ligasa E3, con su consecuente ubiquitinación y degradación en el proteasoma. Esta continua eliminación de β -catenina evita que migre al núcleo y active la transcripción de sus genes blanco (figura 2A) [Logan y Nusse, 2004; Mosimann y col., 2009].

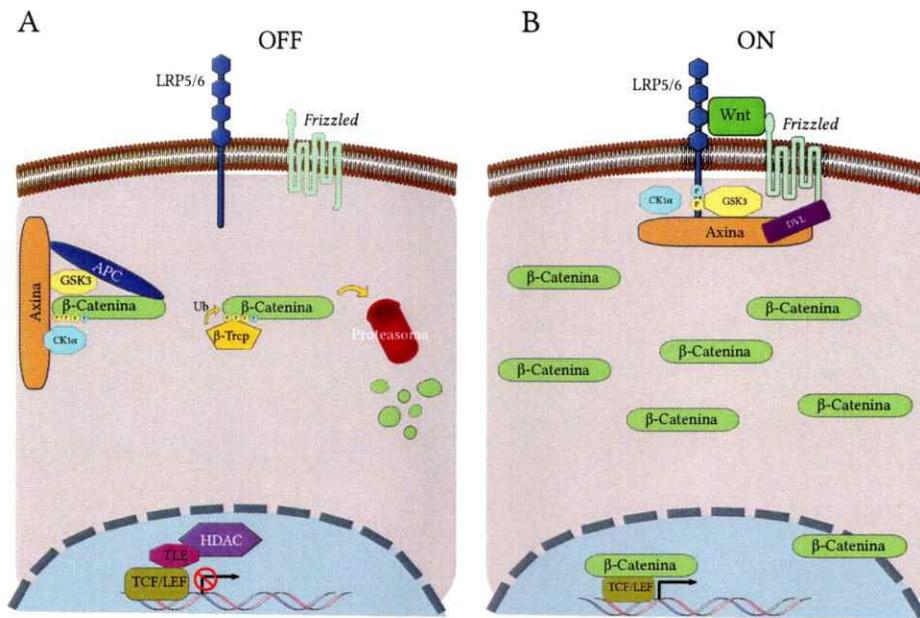


Figura 2: Esquema de la ruta Wnt/β-catenina.

En A se aprecia la ruta Wnt/β-catenina en ausencia de los ligandos Wnt, donde β-catenina es constantemente degradada mediante un complejo citoplasmático de destrucción. En B se aprecia la ruta en presencia de ligandos Wnt produciéndose la estabilización de β-catenina en el citoplasma y su posterior ingreso al núcleo donde actúa como cofactor uniéndose a los factores de transcripción de la familia TCF/LEF (modificado de Macdonald y colaboradores [Macdonald y col. 2009]). APC: proteína *Adenomatous Poliposis Coli*; CK1: kinasa CK1; DVL: proteína *Dishevelled*; GSK3β: kinasa Glicogeno sintasa 3β; LRP5/6: proteína 5/6 relacionada con receptores de LDL; Wnt: Ligando Wnt.

La vía Wnt/β-catenina se activa cuando los ligandos Wnt se unen al receptor Fz (*Frizzled*) y a su co-receptor LRP5/6 (proteína 5/6 relacionada con receptores de LDL), formando un complejo Wnt-Fz-LRP5/6 que recluta a la proteína citoplasmática de andamiaje DVL (*Dishevelled*). El reclutamiento de DVL desencadena el secuestro de la proteína Axina desde el complejo de destrucción, provocando finalmente la estabilización de β-catenina (figura 2B) [Logan y Nusse 2004; Mosimann y col. 2009]. Así, β-catenina no es degradada y se importa al núcleo, iniciando la activación de genes blanco de la ruta, tales como ciclina D1, c-myc, cox-2 y survivina¹, todos relacionados con progresión celular, viabilidad y resistencia a la apoptosis.

¹Una completa lista de genes puede encontrarse en www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html

Los efectos de la ruta Wnt/ β -catenina están relacionadas con procesos de proliferación, migración y diferenciación celular, es decir, eventos claves en el desarrollo del cáncer y, en particular, con cáncer de colon [Polakis 2000; Logan y Nusse 2004; Clevers 2006]. De hecho, el gen que codifica la proteína APC fue descubierto en pacientes con poliposis adenomatosa familiar, los cuales tienen normalmente un alelo mutado y desarrollan una gran cantidad de pólipos benignos en su epitelio colorectal a temprana edad, donde invariablemente algunos terminan desarrollando tumores. Posterior a este hallazgo, se encontraría que APC interactúa con β -catenina, estableciéndose así el primer nexo entre la ruta Wnt/ β -catenina y cáncer [Clevers 2006].

Una característica de las células de cáncer de colon es el aumento de la localización de β -catenina en el núcleo, lo cual explica la expresión aumentada de genes involucrados en progresión y sobrevivencia celular [Bienz 2000; Polakis 2000]. También se ha descrito que la acumulación nuclear de β -catenina es una característica de células de carcinoma hepatocelular, lo cual estaría asociado con una proliferación aumentada [Nhieu y col., 1999], algo similar a lo encontrado también en pacientes con leucemia mieloide crónica [Reya y Clevers, 2005]. De esta forma, los mecanismos que modulan la translocación de β -catenina hacia y desde el núcleo son importantes en el desarrollo de varios tipos de cáncer.

1.3. Translocación núcleo-citoplasmática de β -catenina

El intercambio de macromoléculas desde y hacia el núcleo se realiza a través del COMPLEJO DE PORO NUCLEAR (NPC, *nuclear pore complex*), una estructura que forma un canal a través de la envoltura nuclear. El NPC está formado por alrededor de 30 proteínas llamadas Nucleoporinas (NUPs), con un peso total mayor a 60 MDa en vertebrados [Tran y Wente, 2006].

El movimiento de moléculas menores a 40 kDa ocurre vía difusión pasiva a través

del NPC, mientras que moléculas superiores a dicha masa requieren un transporte dependiente de energía. Dicho transporte reside en la capacidad intrínseca de la molécula de interactuar directamente con el NPC o, como ocurre generalmente, requiere de receptores específicos de transporte que reconocen señales en la molécula cargo. Estas señales son conocidas como SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR (*nuclear localization signal*, NLS) para la importación o SEÑAL DE EXPORTACIÓN NUCLEAR (*nuclear export signal*, NES). La clase más grande de receptores de transporte está formada por miembros de la familia de cariorinas- β /importinas- β o Kaps, que incluyen diferentes importinas, exportinas y transportinas. Dichas proteínas tienen un sitio conservado de unión a Ran, una proteína GTPasa cuya actividad es crucial para el transporte dependiente de Kaps [Tran y Went 2006; Terry y col. 2007].

Se han sugerido diversos mecanismos que dan cuenta del transporte de β -catenina hacia o desde el núcleo, pero aún no existe un modelo ampliamente aceptado y que explique consistentemente cómo ocurre. Con respecto a su exportación nuclear, se ha propuesto que β -catenina es activamente exportada mediante la unión a la proteína APC, la cual contiene por lo menos 5 NESs, de una manera dependiente del receptor de exportación CRM1, un miembro de los transportadores Kaps [Henderson 2000; Neufeld y col. 2000]. Por otra parte, en dos estudios utilizando Leptomomicina B, un inhibidor específico de la exportina CRM1, se mostró que β -catenina sale del núcleo por sí misma, de una manera independiente de CRM1 [Wiechens y Fagotto 2001; Eleftheriou y col. 2001]. Un posterior estudio mostró que β -catenina une al cofactor de Ran-GTPasa, Ran-BP3, lo que aumentaría su exportación desde el núcleo independientemente de CRM1 pero estimulada por Ran-GTPasa [Hendriksen y col. 2005]. Contrario a lo anterior, utilizando un ensayo de pull-down, se observó que β -catenina puede unirse directamente a la exportina CRM1 y que esto afecta su exportación nuclear sin mediar APC [Ki y col. 2008].

Sobre su importación nuclear se ha postulado que β -catenina puede entrar al nú-

cleo sin mediar otras proteínas transportadoras, en una forma similar a como lo haría la importina- β , cuyo dominio formado por los repetidos HEAT se asemeja estructuralmente al dominio ARM de β -catenina [Yokoya y col. 1999; Wiechens y Fagotto 2001; Koike y col. 2004]. En otro estudio se encontró que β -catenina no interactuaría directamente con nucleoporinas en la forma que lo hace importina- β [Suh y Gumbiner 2003]. Se ha señalado que otros factores que podrían importar a β -catenina hacia el núcleo son Pygopus (homólogo de BCL9 en moscas) [Townesley y col. 2004], Axina [Wiechens y col. 2004; Cong y Varmus 2004] o algunos factores de transcripción de la familia TCF/LEF [Molenaar y col. 1996; Huber y col. 1996].

Mediante una aproximación experimental diferente a las utilizadas anteriormente, Kriehoff y colaboradores analizaron el transporte bidireccional núcleo-citoplasmático de β -catenina mediante la técnica de RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DESPUÉS DEL BLANQUEAMIENTO POR LUZ (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP). FRAP es una técnica de microscopía de fluorescencia utilizada en células vivas, basada en eliminar la fluorescencia (blanquear) de una zona y posteriormente medir la recuperación de la fluorescencia en esa misma zona, la cual está dada por el movimiento de moléculas fluorescentes desde otras zonas. En ese trabajo se propuso que diferentes proteínas capaces de unir a β -catenina la retendrían en un compartimento subcelular particular más que transportarla a dicho compartimento. A saber, TCF4 y BCL9 retendrían a β -catenina en el núcleo, mientras que APC y Axina harían lo mismo en el citoplasma [Kriehoff y col. 2006].

En otro estudio sobre la translocación de β -catenina hacia y desde el núcleo, Koike y colaboradores analizaron la secuencia aminoacídica necesaria para que β -catenina pudiese realizar dicho movimiento entre ambos compartimentos. Utilizando varias mutantes truncadas de β -catenina fusionadas a GFP, encontraron que una mutante formada exclusivamente por los motivos arm 10-12 más el extremo COOH-terminal (ie, β -catenina

R10-C), podía entrar y salir del núcleo sin mediar otros factores. Además, al cuantificar los niveles relativos de importación y exportación, la mutante β -catenina R10-C tuvo un comportamiento similar a la silvestre [Koike y col. 2004].

En consecuencia, tomando en cuenta todos los antecedentes presentados aquí, aún es incierto cómo β -catenina se transloca bidireccionalmente entre el núcleo y el citoplasma, aunque los datos sugieren que podría depender de su extremo C-terminal.

1.4. Papel de CK2 en la ruta de señalización Wnt/ β -catenina

Del gran número de sustratos que CK2 tiene, hay tres proteínas que son esenciales dentro de la ruta Wnt/ β -catenina. CK2 inmunoprecipita y fosforila a armadillo (homólogo de β -catenina) y DSH (homólogo de DVL) desde extractos de embriones y cultivos celulares de *drosophila* [Willert y col. 1997]. Resultados similares fueron encontrados en una línea celular de epitelio de mama establemente transfectada con Wnt-1 [Song y col. 2000] y en ratones transgénicos que expresan la subunidad CK2 α en el mismo tejido [Landesman-Bollag y col. 2001], lo cual provoca un aumento en la proliferación celular e hiperplasia debido a los altos niveles proteicos tanto de CK2 α como de β -catenina. APC es otra proteína de la ruta Wnt/ β -catenina que es sustrato de CK2, la cual es fosforilada por esta enzima en una de sus NLS afectando su importación nuclear [Zhang y col. 2001a]. Además, CK2 y APC inmunoprecipitan en extractos de cultivos celulares de carcinoma colorectal [Homma y col. 2002].

En el año 2003, Song y colaboradores analizaron posibles sitios de fosforilación de β -catenina por CK2 que correspondieran a la secuencia consenso S/T-XX-D/E. Este grupo encontró que CK2 fosforila a β -catenina principalmente en el residuo T393 (dentro del motivo arm 7) y, utilizando una mutante de β -catenina no fosforilable en dicho residuo (β -catenina T393A), hallaron que presentaba una degradación más rápida y actividad transcripcional dependiente de LEF-1 menor a la mostrada por β -catenina silvestre. Sin

embargo, al comparar *in vitro* la fosforilación por CK2 de una β -catenina truncada (residuos 1-421) con la forma completa, se pudo observar que ésta todavía ocurría en residuos posteriores al 421, aunque este grupo no analizó cuales eran [Song y col. 2003]. Es posible observar que dentro de la secuencia de aminoácidos que corresponden a esta región, se encuentran dos que cumplen con la secuencia consenso de fosforilación por CK2, las serinas 605 y 646, cuya potencial fosforilación podría explicar la diferencia significativa en los niveles de fosforilación observados en este trabajo.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores, es posible sugerir que el residuo serina 646 (S646) de β -catenina podría ser un blanco de fosforilación por CK2 y que además podría tener relevancia en la translocación de la proteína hacia y desde el núcleo, puesto que está ubicado en una zona de la estructura (arm 12) de reconocida importancia en este proceso [Koike y col. 2004]. Por lo tanto, en este seminario de título se planteó estudiar el papel de la serina-646 de β -catenina en su translocación hacia y desde el núcleo, así como se evaluaron sus efectos en la localización subcelular y función como transactivador de genes blanco de la ruta Wnt/ β -catenina. Para esto se generaron mutaciones sitio-dirigidas de este residuo por uno que imita su fosforilación, S646D, u otro que la evita, S646A.

1.5. Hipótesis

“La localización nuclear y actividad transactivadora de β -catenina son reguladas por CK2 a través de la fosforilación del residuo S646 en el extremo C-terminal del dominio ARM.”

1.6. Objetivo general

Evaluar la función del residuo S646 en la importación nuclear y actividad transactivadora de β -catenina.

1.7. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la mutación del residuo S646 en la actividad transactivadora de β -catenina.
2. Determinar el efecto de la mutación del residuo S646 en la expresión de genes blanco de la ruta Wnt/ β -catenina.
3. Estudiar si la mutación de β -catenina en la serina 646 modifica su localización subcelular.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Medio de cultivo celular D-MEM high glucose (Hyclone). Suero Fetal Bovino (Biological Industries). L-Glutamina, Penicilina, Estreptomocina, antifúngico, medio independiente de CO₂ (Gibco). Reactivo de transfección SuperFect (Qiagen). Reactivo para extracción de RNA TRIZOL, Random Primers, transcriptasa reversa M-MLV, inhibidor de RNasa RNasa OUT, Kit de cuantificación RNA y DNA Qubit, Mowiol (invitrogen). Detergente RIPA (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS) Inhibidores de proteasa (Roche). Kit de quimioluminiscencia EZ-ECL (Biological Industries). Anticuerpo monoclonal anti-β-catenina humana, anticuerpo policlonal de conejo anti-survivina humana (RyD systems). Anticuerpo policlonal de cabra anti-actina, anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conejo y cabra (Santa Cruz Biotechnology). Triton X100, PBS x10 (Winkler). DAPI (Sigma).

2.2. Cultivo celular

Todos los experimentos fueron realizados en la línea celular embrionaria de riñón humano HEK-293T, que fue cultivada y mantenida con medio D-MEM suplementado con 10 % de SFB, L-Glutamina (2 mM, Gibco), antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomocina, Gibco) y antifúngico (0,5 µg/ml de fungizona anfotericina, Gibco), mantenidas a 37°C con 5 % CO₂ y en ambiente humidificado.

2.3. Transfección de células

Todos los experimentos realizados en este trabajo fueron siguiendo el mismo esquema base de transfecciones. En cada experimento se analizaron cuatro condiciones, donde cada condición fue dada por el plasmidio transfectado, es decir pEGFP-C1, pEGFP-β-catenina,

pEGFP- β -catenina-S646A y pEGFP- β -catenina-S646D (ver detalles en tabla 1). Se utilizaron placas de 60 mm de diámetro (p60) para análisis mediante RT-PCR y Western Blot, placas de 6 pocillos (p6poc.) para realizar el ensayo de actividad reportera β -catenina TCF/LEF y para análisis de microscopia de fluorescencia placas de 24 pocillos (p24poc.). El día previo a la transfección, se sembraron 800.000, 400.000 ó 70.000 células en placas p60, p2poc. o p24poc. respectivamente, con la finalidad de que al momento de la transfección no sobrepasaran una confluencia del 70 %. En el momento de la transfección, se mezclaron en tubos de 1,6 ml, 2 ó 5 μ g de DNA con 100 ó 150 μ l de D-MEM sin suplementar (libre de suero y antibióticos) para placas p6poc ó p60, respectivamente. Luego se le agregó el reactivo Superfect (SF) para que quedara en una relación de $1/5$ de DNA/SF. La mezcla se peleteó y se agitó para obtener una solución homogénea y luego se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de formación del complejo DNA/SF, se procedió a agregar 600 o 1000 μ l de D-MEM suplementado a cada tubo, se mezcló el contenido y se agregó suavemente a las placas inmediatamente después de haber aspirado el medio antiguo. Las células se incubaron durante 3 horas y posteriormente se procedió a aspirar la mezcla de transfección, reemplazándose por medio D-MEM suplementado fresco para permitir la expresión de las proteínas codificadas en cada vector durante 24 horas.

Cuadro 1: Plasmidios utilizados en este trabajo.

Se presenta la lista de plasmidios utilizados en este trabajo, junto con sus principales características

Plasmidio	Proteína codificada
pEGFP-C1	Proteína fluorescente verde (GFP) ^a .
pEGFP-β-catenina WT	β-catenina humana silvestre (WT).
pEGFP-β-catenina-S646A	β-catenina humana, con la serina 646 mutada por alanina.
pEGFP-β-catenina-S646D	β-catenina humana, con la serina 646 mutada por aspartato.
pTOP-FLASH [Van De Wetering y col. 1991, 1997]	Luciferasa bajo un promotor mínimo de Cfos el cual contiene 3 repeticiones en serie del motivo de unión de los factores de transcripción TCF/LEF.
pFOP-FLASH	En este caso el promotor posee 3 repeticiones mutadas del motivo de unión de los factores de transcripción TCF/LEF. Se utiliza como control de especificidad de los factores TCF/LEF.

^a En el presente texto se evita utilizar el prefijo pGFP o GFP por motivos de simplificación. Se entiende que todas las variantes de β-catenina utilizadas en este trabajo están fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP).

2.4. Análisis de expresión mediante RT-PCR

El RNA total se cuantificó utilizando un método fluorimétrico (Qubit, Invitrogen). El DNA complementario (cDNA) se sintetizó en una mezcla de reacción de 25 µl. Inicialmente se agregó 3 µg de RNA total por cada muestra, 0,5 µl de random primers (3 µg/µl) y H₂O/DEPC suficiente para 16,5 µL, esta mezcla se calentó durante 5 minutos a 70°C y se enfrió otros 5 minutos en hielo. Luego se agregó buffer, dNTPs, RNasa OUT y la enzima transcriptasa reversa MMLV, para quedar a concentraciones finales de 0,5 mM dNTPs, 2 U/µl RNasa OUT

y 8 U/ μ l M-MLV. Finalmente, el cDNA fue incorporado en una mezcla de reacción de PCR de 20 μ L, conteniendo buffer 1X, 0,6 μ l de MgCl₂ (50mM), 0,4 μ l de dNTPs (10mM), 0,24 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l), 1 μ l de partidor forward y 1 μ l de reverse (10uM). El PCR fue realizado bajo las siguientes condiciones: una etapa de preincubación durante 3 min a 94°C; 20-28 ciclos de denaturación a 94°C durante 30 seg; alineamiento durante 45 seg a la temperatura específica (ver tabla 2) y extensión durante 45 seg a 72°C; finalmente, una etapa de extensión durante 5 minutos a 72°C. La secuencia de los partidores específicos y la temperatura de alineamiento (TA) para amplificar survivina o GAPDH se muestran en la Tabla 1. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1,5 % en TBE 1X y visualizados por tinción con bromuro de etidio 0.06 μ g/mL. La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría utilizando el programa ImageJ y todas fueron normalizadas por los niveles de GAPDH.

Cuadro 2: Partidores utilizados en las reacciones de PCR.

Se indica la temperatura de alineamiento y el gen amplificado (especificidad).

Partidor	TA (°C)	Especificidad
FW 5'-CCGACGTTGCCCCCTGC-3' RV 5'-TCGATGGCACGGCGCAC-3'	61	survivina
FW 5'-CCTTCATTGACCTCAACTA -3' RV 5'-GGCCATCCACAGTCTTCT-3'	60	GADPH

2.5. Análisis de expresión mediante Western Blot

Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y luego se lisaron agregando tampón RIPA (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % desoxicolato de sodio, 0.1 % SDS) y una mezcla de inhibidores de proteasa 1X. Luego, las proteínas fueron sonicadas con un pulso de unos 10-15 segundos con la máxima potencia (10) y después se centrifugaron durante 15 min a 14.000 X g. Todos los pasos fueron realizados en hielo. Las muestras se

separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron (350 mA por 90 minutos) a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó durante 2 horas con buffer PBST-L (PBS + 0,1 % Tween20 + 5 % de leche descremada). Luego, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario respectivo diluido en PBST-L, durante toda la noche a 4°C con agitación orbital, posteriormente se lavaron 3 veces por 10 min con PBST y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano para, finalmente, detectar la quimioluminiscencia con el kit EZ-ECL.

2.6. Microscopía confocal de Fluorescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos depositados en placas de 24 pocillos. Luego de 24 horas postransfección, las células fueron lavadas con “buffer universal” (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, 10 % Azida) 3 veces antes de ser fijadas con paraformaldehído al 16 %. Luego fueron permeabilizadas con detergente Triton X 100 al 0.5 % por 10 min. para posteriormente ser lavadas 2 veces con buffer universal. Posterior a estos lavados, los cubreobjetos fueron sacados desde los pocillos e incubados con 1 µl de DAPI durante 5 min para ser montados sobre 5 µl de mowiol depositado sobre un portaobjetos. Las células fueron analizadas por lo menos 24 horas después mediante microscopía confocal en un equipo Olympus IX81 equipado con una unidad de disco giratorio IX2-DSU. Se tomaron fotografías utilizando un lente 60X y otro 100X, ambos de inmersión en aceite, excitando con luz de 488nm (GFP) y 572nm (DAPI). En el caso de las fotografías tomadas con el lente 100X, se obtuvieron una serie de 20 planos en el eje z (z-stacks) por célula, cada plano distanciado por 30 µm.

2.7. Modelamiento de los gránulos nucleares

Los z-stacks adquiridos por microscopía confocal de fluorescencia se analizaron con la plataforma de desarrollo de software IDL. Cada plano del z-stack fue segmentado utili-

zando filtros digitales y posteriormente se generó un modelo 3D para cada célula. Desde los modelos 3D el programa entregó el número de elementos (gránulos) existentes en el núcleo junto con el volumen y área individual de cada gránulo. El volumen y área total por núcleo se calculó sumando los volúmenes y áreas individuales respectivamente.

2.8. Recuperación de la fluorescencia después del blanqueamiento por luz (FRAP)

Células HEK-293T fueron traspasadas desde el medio de cultivo D-MEM a medio independiente de CO₂ y analizadas en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 5 Pascal. Las células fueron blanqueadas con un láser de 488nm utilizando el 100 % de potencia durante 1 minuto. Las curvas de pre-blanqueado se construyeron midiendo la intensidad de fluorescencia durante 5 minutos mientras se iluminaba toda la célula con una potencia de láser igual a la utilizada para visualizar la muestra (potencia de adquisición). Luego de un minuto de blanqueamiento en la zona indicada, se cuantificó la recuperación de la fluorescencia durante 5 minutos, datos que se utilizaron para construir las curvas de post-blanqueado. Todos los puntos de medición se obtuvieron en intervalos de 2 segundos y se les restó el ruido de fondo. Para construir las curvas de recuperación el promedio de la intensidad de la fluorescencia en el pre-blanqueamiento se estableció como 1. Los valores de intensidad de las curvas de post-blanqueado se normalizaron por el promedio de la intensidad de la fluorescencia del pre-blanqueado. Al primer punto de la curva de post-blanqueado (I_0) se le asignó el tiempo 0 y a todos los puntos se les restó el valor de I_0 . Las curvas de post-blanqueado se ajustaron a la ecuación exponencial $y(t) = A(1 - e^{-\tau t})$ obteniéndose el valor de t y τ (tau). El valor de $\tau_{1/2}$ (tau medio), correspondiente al 50 % de la recuperación de la fluorescencia, se calculó mediante la fórmula $\frac{\ln 0,5}{-\tau}$.

2.9. Análisis estadístico

Los valores fueron expresados como promedio \pm error estándar (SE). La comparación de dos grupos de datos independientes que tuvieran una distribución paramétrica se realizó mediante el test t-student. Para dos grupos independientes que tuvieran una distribución no paramétrica se utilizó el test de Wilcoxon. Estos análisis se realizaron con el programa estadístico JMP 8.0.2. Se consideró como criterio de significancia un valor de P menor o igual a 0,05.

3. Resultados

3.1. Mutantes sitio dirigidas de β -catenina y análisis de su secuencia

La capacidad de imitar la función de aminoácidos en su estado fosforilado a través de la sustitución de éstos por aminoácidos cargados negativamente, como lo son el aspartato y el glutamato, ha sido probada en diversos estudios [Thorsness y Koshland 1987; Dean y Koshland Jr 1990; Hurley y col. 1990; Huang y Erikson 1994; Léger y col. 1997].

De esta manera, se diseñó una mutante que imita la fosforilación en la serina 646 de β -catenina, sustituyéndola por un aspartato (β -catenina-S646D). Asimismo, se diseñó otra mutante que impide ser fosforilada por CK2 en la serina 646, sustituyéndose este residuo por una alanina (β -catenina-S646A). Dicho trabajo se realizó previamente al inicio de este seminario de título.

Posteriormente, para comprobar la presencia de las mutaciones en los sitios elegidos, se realizó la secuenciación de las 2 mutantes (β -catenina-S646A y β -catenina-S646D), y luego su alineamiento y comparación con la secuencia nativa. El análisis mostró que ambas construcciones contenían la mutación sitio dirigida esperada.

β -catenina-S646A	G	C	T	C	C	C	T	G	A	C	A	G	A	G	T	T	A	C	T	C	C	A	C	G	C	C	A	G	G	A	A	T	G	A	A	G	G	C	G	T	G	G	C	A	A	C
β -catenina-S646D	G	C	T	C	C	C	T	G	A	C	A	G	A	G	T	T	A	C	T	C	C	A	C	G	A	C	A	G	G	A	A	T	G	A	A	G	G	C	G	T	G	G	C	A	A	C
β -catenina-WT	G	C	T	C	C	C	T	G	A	C	A	G	A	G	T	T	A	C	T	C	C	A	C	T	C	C	A	G	G	A	A	T	G	A	A	G	G	C	G	T	G	G	C	A	A	C

Figura 3: Alineamiento de las secuencias de β -catenina mutantes y silvestre.

Se realizó un alineamiento con CLUSTALW2 de las tres secuencias de β -catenina utilizadas en este trabajo. Se destaca con un rectángulo rojo el codón mutado.

3.2. Efecto de la mutación del residuo S646 en la actividad transactivadora de β -catenina

Para medir la actividad transactivadora de β -catenina dependiente de los factores TCF/LEF, se utilizó un ensayo reportero de luciferasa. Se cotransfectaron los plasmidios codificantes para β -catenina silvestre (WT) o β -catenina mutantes (β -catenina-S646A o β -catenina-S646D) junto a los plasmidios reporteros pTOP-FLASH o pFOP-FLASH.

Se encontró que todas las formas de β -catenina expresadas presentaron una actividad reportera notoriamente mayor al control con vector vacío pEGFP-C1 o mock (figura 4). Aunque no se encontraron diferencias significativas al comparar la actividad reportera de la proteína silvestre (WT) con las proteínas mutantes, se observó una actividad levemente mayor con la proteína β -catenina-S646A.

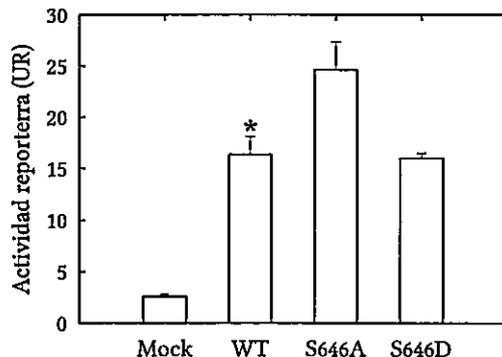


Figura 4: Actividad reportera luciferasa TOP/FOP flash.

Células HEK-293T fueron cotransfectadas con los plasmidios pTOP-FLASH o pFOP-FLASH y uno de los plasmidios codificantes para β -catenina, ya sea pEGFP- β -catenina WT o mutantes (S646D o S646A). Como control se utilizó pEGFP (Mock). Los valores corresponden al promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes y fueron estandarizados calculando la razón de la actividad TOP/FOP para cada condición. Las barras de error corresponden al error estandar de tres experimentos independientes. UR = unidades relativas.

3.3. Efecto de la mutación del residuo S646 de β -catenina en la expresión de survivina

β -Catenina, en su rol de cofactor transcripcional de la ruta Wnt/ β -catenina, tiene como blanco genes tales como ciclina D1, c-myc, cox-2 y survivina, todos relacionados con progresión celular, viabilidad y resistencia a la apoptosis. Se ha demostrado que survivina aumenta su expresión cuando la vía se encuentra activada [Zhang y col. 2001b], o cuando β -catenina es activada por CK2 [Tapia y col. 2006], por lo cual se utilizó este gen como indicador de la actividad endógena de la ruta Wnt/ β -catenina.

Para analizar los niveles de RNA mensajero (mRNA) de survivina se realizó un RT-PCR semicuantitativo en células HEK-293T transfectadas con los plasmidios de β -catenina fusionados a GFP, ya sea β -catenina WT o una de las dos mutantes, β -catenina-S646A o β -catenina-S646D, utilizándose como control el plasmidio pEGFP-C1 (Mock).

Se encontró que los niveles de mRNA de survivina en las células transfectadas con alguna variante del plasmidio que codifica para β -catenina, fueron significativamente superiores a los niveles encontrados en el control (Mock), pero a su vez entre ellos no hubo diferencias significativas (figura 5A).

Además, se analizaron los niveles proteicos de survivina mediante western-blot. Las proteínas totales fueron obtenidas del mismo experimento anterior, separándose una porción de células previo a la lisis celular. Al igual que en el RT-PCR, en el western-blot no se apreciaron diferencias significativas entre la proteína WT y sus variantes mutantes (S646A y S646D), ni tampoco al compararlas con Mock (figura 5B).

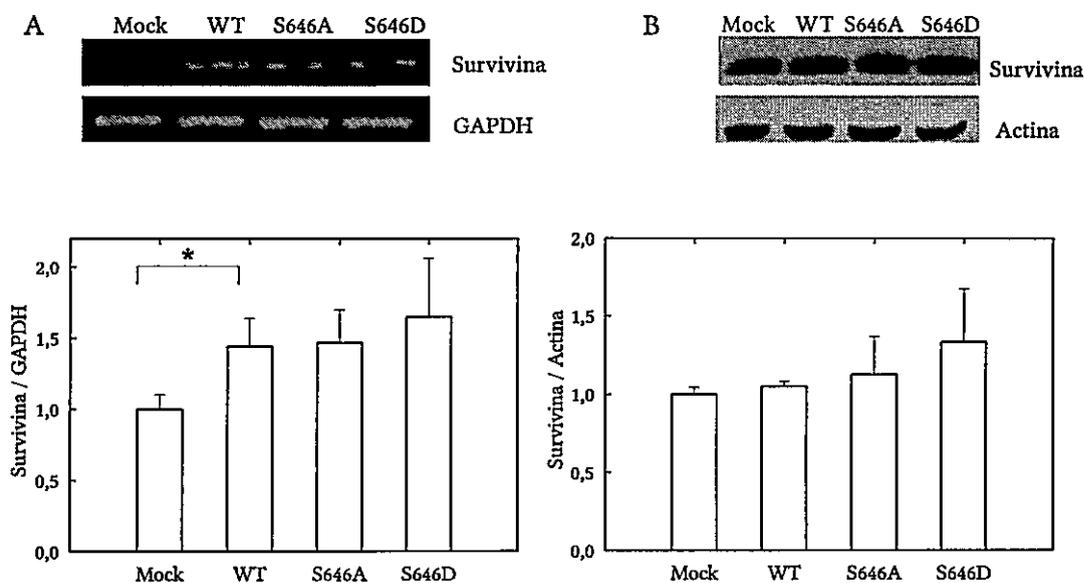


Figura 5: Niveles de mRNA y proteicos de survivina en células HEK-293T.

Células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con variantes del plasmidio pEGFP vacío (Mock) o codificante para β -catenina nativa o mutantes (S646D/S646A). En (A) se aprecia el RT-PCR del gen survivina, mientras que en (B) se muestra el western-blot contra la proteína survivina. En ambos casos se grafica la densitometría del gel respectivo y los niveles mostrados se normalizaron contra el nivel de GAPDH (A) en el caso del RT-PCR o con el nivel de actina (B). Se expresan los niveles de mRNA y proteína en relación al número de veces de la transfección con el plasmidio pEGFP-C1 (Mock). Las barras de error corresponden al error estándar de tres experimentos independientes.

3.4. Localización subcelular de las distintas formas de β -catenina

Para investigar la localización subcelular de la GFP- β -catenina silvestre y sus variantes mutantes, se utilizó la técnica de microscopía confocal de fluorescencia. Se llevó a cabo el mismo esquema de transfecciones que en los análisis anteriores, transfectando con β -catenina WT o alguna de las dos mutantes (S646A/S646D) y utilizando el plasmidio pEGFP-C1 como control.

Al visualizar las muestras en el microscopio confocal, se observó que el control presentó una distribución de GFP relativamente homogénea en toda la célula, similar a lo descrito en otros lugares (figura 6A). Analizando en más detalle, se logró observar que en

los núcleos existió una mayor cantidad de fluorescencia, pero no se apreció una intensidad y patrón tan marcados como en el resto de las condiciones.

Al observar las células transfectadas con el plasmidio pEGFP- β -catenina WT o con pEGFP- β -catenina-S646A/D (figura 6 B-D), se apreció un marcado patrón granular que coincidió exactamente con la zona de los núcleos. Junto con ello, se observó escasa fluorescencia en el citoplasma, mostrando que la acumulación proteica se presentó exclusivamente en este compartimento. Debido a que el análisis del patrón granular observando sólo un plano focal resulta inadecuado si se quiere caracterizar de forma precisa el número, volumen y área de los gránulos, se realizó un modelamiento 3D de las células en las distintas condiciones, lo que se presenta en la siguiente sección.

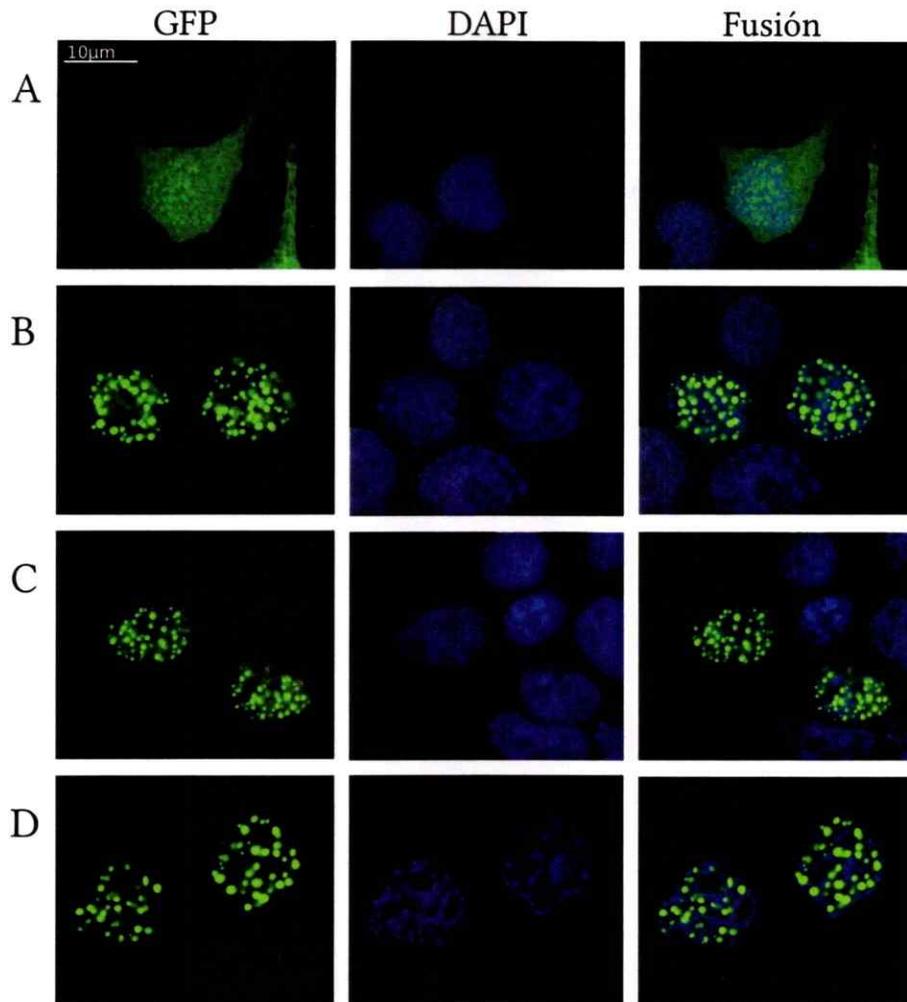


Figura 6: Localización subcelular de β -catenina WT y sus variantes mutantes.

Células HEK-293T fueron transfectadas con variantes del plasmidio pEGFP o codificante para β -catenina nativa o mutantes (S646D/S646A), visualizándose la fluorescencia mediante microscopía confocal con un aumento de 60X. En verde se observa GFP y en azul el DNA teñido con DAPI. La columna del extremo derecho presenta la imagen compuesta por ambas fluorescencias en células transfectadas con el plasmidio pEGFP (A), pEGFP- β -catenina (B), p-EGFP- β -catenina-S646A (C) y pEGFP- β -catenina-S646D (D).

3.5. Análisis de los gránulos nucleares formados por las distintas variantes de β -catenina

3.5.1. Representación 3D de los gránulos nucleares

La microscopía confocal de fluorescencia otorga la principal ventaja de poder aislar parcialmente la fluorescencia proveniente de planos distintos al plano focal, mejorando así la nitidez de las imágenes al ser comparadas con la microscopía de epifluorescencia. Por otro lado, estos microscopios permiten obtener imágenes a lo largo del eje axial de la muestra (eje z), pudiéndose así adquirir series de distintos planos focales a lo largo del eje (z-stack). De esta forma, con la información obtenida en un z-stack, se puede realizar una reconstrucción tridimensional (3D) del objeto visualizado.

Se obtuvieron z-stacks de las tres condiciones que presentaron el patrón granular, a saber, las células transfectadas con pEGFP- β -catenina WT, pEGFP- β -catenina-S646A y pEGFP- β -catenina-S646D. Estos z-stacks fueron procesados con el programa IDL², generando una representación 3D del núcleo y los gránulos en su interior (figura 7), lo que permitió cuantificar el número de gránulos, su volumen y el área ocupada por éstos.

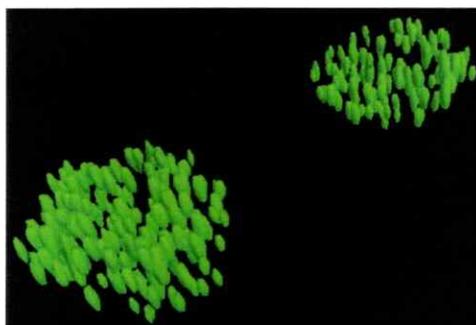


Figura 7: Modelo tridimensional de núcleos celulares de HEK-293T.

Células HEK-293T transfectadas con pEGFP- β -catenina WT o sus variantes mutantes se analizaron mediante microscopía confocal como se indicó en la sección 3.4. Z-stacks compuestos de 20 planos distanciados por 30 μ m entre ellos fueron procesados con el programa IDL, generándose un modelo 3D. En la imagen se observan dos núcleos de células que expresan GFP- β -catenina WT.

²<http://www.itvis.com/language/en-us/productsservices/idl.aspx>

3.5.2. Número y volumen total de los gránulos nucleares

Los primeros datos obtenidos fueron el número y volumen total de los gránulos nucleares por célula (figura 8). Se encontró que el mayor número de gránulos se presenta en las células que expresan β -catenina-S646D (con 92 gránulos en promedio), seguido por las células que expresan β -catenina-S646A y β -catenina-WT (64 y 59 gránulos, respectivamente). Se encontraron diferencias significativas al comparar el número de gránulos nucleares de la mutante β -catenina-S646D, tanto con β -catenina-WT como con β -catenina-S646A (figura 8A). Por otro lado, al cuantificar el volumen total de los gránulos nucleares por célula, no se observaron diferencias significativas (figura 8B). Esto sugiere que el volumen individual de los gránulos debería presentar diferencias, pues el volumen total por célula se conserva en las tres condiciones, no así el número de gránulos.

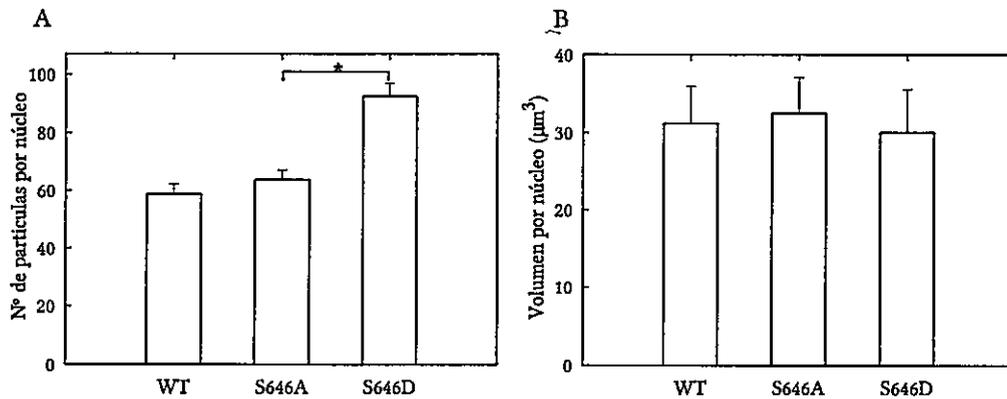


Figura 8: Número y volumen de los gránulos en el núcleo celular.

(A) Se presenta el número de gránulos promedio por núcleo celular. Al comparar las células transfectadas con β -catenina-S646D contra las otras dos condiciones se encontraron diferencias significativas. (B) Se muestra el volumen promedio por célula (μm^3) ocupado por los gránulos nucleares. No existieron diferencias significativas entre estos valores. Todos los valores fueron calculados con el promedio de 30 células por condición.

3.5.3. Distribución de los gránulos nucleares según su volumen individual

Como se esperaba, la distribución de los volúmenes de gránulos individuales resultó diferente (figura 9). Las células que expresaban β -catenina WT mostraron una distribución de volúmenes más amplia que las otras dos condiciones, siendo ésta más homogénea en el rango de volúmenes medidos, alcanzándose volúmenes de hasta $0,6 \mu\text{m}^3$ (figura 9A). Asimismo, se observó en esta misma condición una población cercana al 10 % que presentó gránulos con un volumen igual o mayor a $0,4 \mu\text{m}^3$, porcentaje considerablemente mayor que las otras dos condiciones analizadas (figura 9D).

Por su parte, las células que expresaban β -catenina-S646A presentaron una distribución de volúmenes intermedia, alcanzándose volúmenes de hasta $0,5 \mu\text{m}^3$ (figura 9B). Se apreció que alrededor del 60 % de los gránulos poseían un volumen igual o menor a $0,2 \mu\text{m}^3$, y que cerca del 3 % de los gránulos tuvieron un volumen igual o mayor a $0,4 \mu\text{m}^3$ (figura 9D).

Finalmente, al analizar la distribución de volúmenes de los gránulos en células que expresaban β -catenina-S646D, se observó una distribución mucho más acotada que las anteriores (figura 9C), es decir, más del 80 % de las partículas poseían un volumen menor o igual a $0,2 \mu\text{m}^3$ y que además no se observaron gránulos de volúmenes mayores a $0,4 \mu\text{m}^3$ (figura 9D).

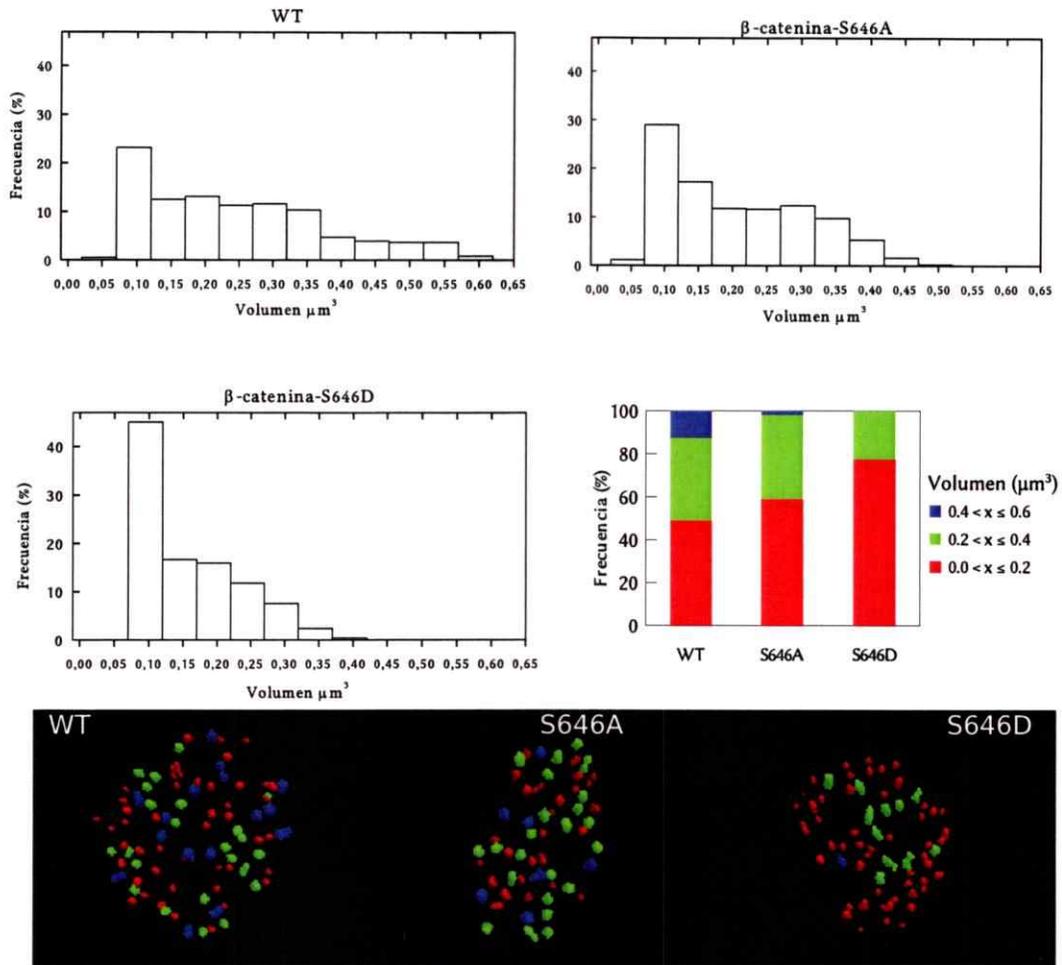


Figura 9: Distribución de los gránulos nucleares según su volumen.

Células HEK-293T fueron transfectadas y visualizadas por microscopía confocal de fluorescencia obteniéndose z-stacks y generándose modelos 3D. En A, B y C se muestran las distribuciones de los volúmenes encontrados con las distintas transfecciones. En D se dividió el rango total de volúmenes encontrados en cada núcleo celular en tres grupos: $0 < x \leq 0,20$; $0,2 < x \leq 0,4$ y $0,4 < x \leq 0,6$. En E se muestra un modelo 3D representativo de cada transfección, donde se colorearon los gránulos de acuerdo a su volumen, siguiendo el mismo código de colores que en el gráfico D.

En base a los datos anteriores, se calculó el volumen promedio de los gránulos individuales (figura 10). El menor valor fue encontrado en las células transfectadas con β -catenina-S646D ($0,13 \mu\text{m}^3$), seguido por β -catenina-S646A ($0,18 \mu\text{m}^3$) y β -catenina WT ($0,22 \mu\text{m}^3$). Todas las condiciones presentaron diferencias significativas al compararse entre ellas.

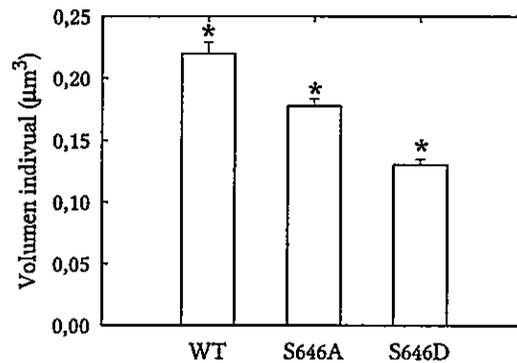


Figura 10: Volumen individual de los gránulos nucleares.

Se muestra el volumen individual promedio. Las barras indican el error estándar. Se encontraron diferencias significativas entre todas las células comparadas entre ellas lo cual fue calculado con los datos de al menos 600 gránulos para cada condición. * indica un valor de $p \leq 0,05$.

3.5.4. Superficie total expuesta por los gránulos

A diferencia del volumen de los gránulos, que representa el espacio ocupado por éstos, el área de los gránulos representa la superficie expuesta (o cubierta) por los mismos. Así, dos gránulos que suman el mismo volumen que otro gránulo individual, presentarán una mayor área expuesta que este último. De esta forma, se evaluó la relación existente entre el número de gránulos promedio y el área promedio ocupada por éstos.

Como se observa en la figura 11, se encontró que los gránulos de las células que expresaron β -catenina-S646D fueron los que expusieron una mayor área promedio ($223 \mu m^2$), concordante con el hecho de que estos núcleos presentaron el mayor número de gránulos promedio. Esta condición presentó diferencias significativas con las células que expresaron tanto β -catenina-S646A como β -catenina-WT (figura 11).

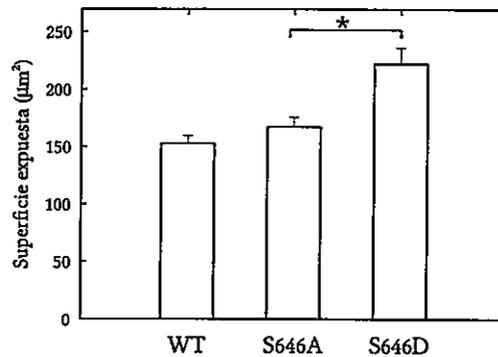


Figura 11: Superficie total promedio de los gránulos nucleares.

Células HEK-293T fueron transfectadas con β -catenina-WT o mutante (S646A o S646D) y visualizadas por microscopía confocal de fluorescencia, obteniéndose z-stacks y generándose modelos 3D. De estos modelos se obtuvo el valor de la superficie de los gránulos. Se encontraron diferencias significativas al comparar las células transfectadas con β -catenina-S646D con las dos condiciones restantes. Todos los valores fueron calculados con el promedio de 30 células por condición. * indica un valor de $p \leq 0,05$.

Como vemos en la tabla 3, donde se presenta un resumen de los resultados de estos análisis, se observa que el número de gránulos por núcleo (segunda columna) se relaciona de forma inversa con el volumen promedio del gránulo individual (tercera columna). Esta información concuerda con el hecho de que el volumen total de los gránulos por célula se mantiene constante a través de las 3 condiciones (cuarta columna). Asimismo, el área

promedio que exponen estos gránulos por núcleo (quinta columna), está directamente relacionada con su número, lo que concuerda con lo esperado.

Cuadro 3: Tabla resumen del análisis 3D de los gránulos nucleares.
 Junto a los valores promedio, se indican los errores estandar (\pm).

Plasmidio transfectado	N° gránulos por núcleo (μm^3)	Volumen de gránulos individuales (μm^3)	Volumen total por núcleo (μm^3)	Área gránulos por núcleo (μm^2)
β -catenina-WT	$59 \pm 3,4$	$0,22 \pm 9,3 \times 10^{-3}$	$32,52 \pm 4,8$	$152 \pm 6,74$
β -catenina-S646A	$64 \pm 3,4$	$0,18 \pm 5,7 \times 10^{-3}$	$30,01 \pm 4,5$	$167 \pm 8,3$
β -catenina-S646D	$92 \pm 4,4$	$0,13 \pm 4,2 \times 10^{-3}$	$31,18 \pm 5,6$	$223 \pm 13,78$

3.6. Movilidad de GFP- β -catenina en células vivas. (Resultados preliminares)

Dado que el análisis de los gránulos nucleares mostró la existencia de diferencias significativas entre las tres variantes de β -catenina (WT, S646A y S646D), tanto en número promedio de gránulos por célula como en el volumen individual y área total cubierta por éstos, se analizó si estas diferencias podrían dar cuenta de variaciones en la movilidad de cada forma de β -catenina.

Para ello se utilizó la técnica de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), la cual consiste en eliminar la fluorescencia (blanquear) de una zona determinada con el mismo láser que se ilumina la muestra, pero utilizando una potencia mayor, para posteriormente medir la recuperación de la fluorescencia en esa misma zona, la cual estará dada por el movimiento de nuevas moléculas fluorescentes desde otra región subcelular. Mediante FRAP se puede obtener el tiempo de difusión característico de la proteína, τ , el cual está asociado al coeficiente de difusión de la proteína fluorescente [Reits y Neeffjes 2001].

Originalmente, se planteó blanquear el núcleo para poder medir la cinética de entrada de GFP- β -catenina desde el citoplasma hacia dicho compartimento. Esto no pudo llevarse a cabo dada la excesiva cantidad de GFP- β -catenina en el núcleo, haciéndose imposible eliminar la fluorescencia. Como alternativa, se eliminó la fluorescencia de todo el citoplasma³, lo que permitió obtener el tiempo de salida de GFP- β -catenina y sus variantes mutantes desde el núcleo hacia el citoplasma.

Células HEK-293T se transfectaron de la misma forma que en los experimentos anteriores, utilizando β -catenina WT o las variantes mutantes (S646A/S646D), utilizando el plasmidio pEGFP-C1 como control. Los resultados obtenidos fueron sólo preliminares y en la figura 12B se muestra un análisis representativo de uno de los experimentos (figura 12B).

Se pudo observar que la proteína mutante S646A presentó un tiempo de salida desde el núcleo levemente mayor (56 segundos) que las proteínas WT y S646D. Por otro lado, estas dos últimas presentaron valores prácticamente iguales (50 y 49 segundos respectivamente).

³En FRAP se blanquea un compartimento subcelular apuntando el láser excitador durante un tiempo suficiente como para eliminar totalmente la fluorescencia en todo el volumen del compartimento. Compartimentos celulares tales como el citoplasma o el núcleo de células eucariontes tienen un área considerablemente mayor que el área del láser incidente, pero si la proteína tiene una movilidad suficiente, se logra blanquear todo el compartimento.

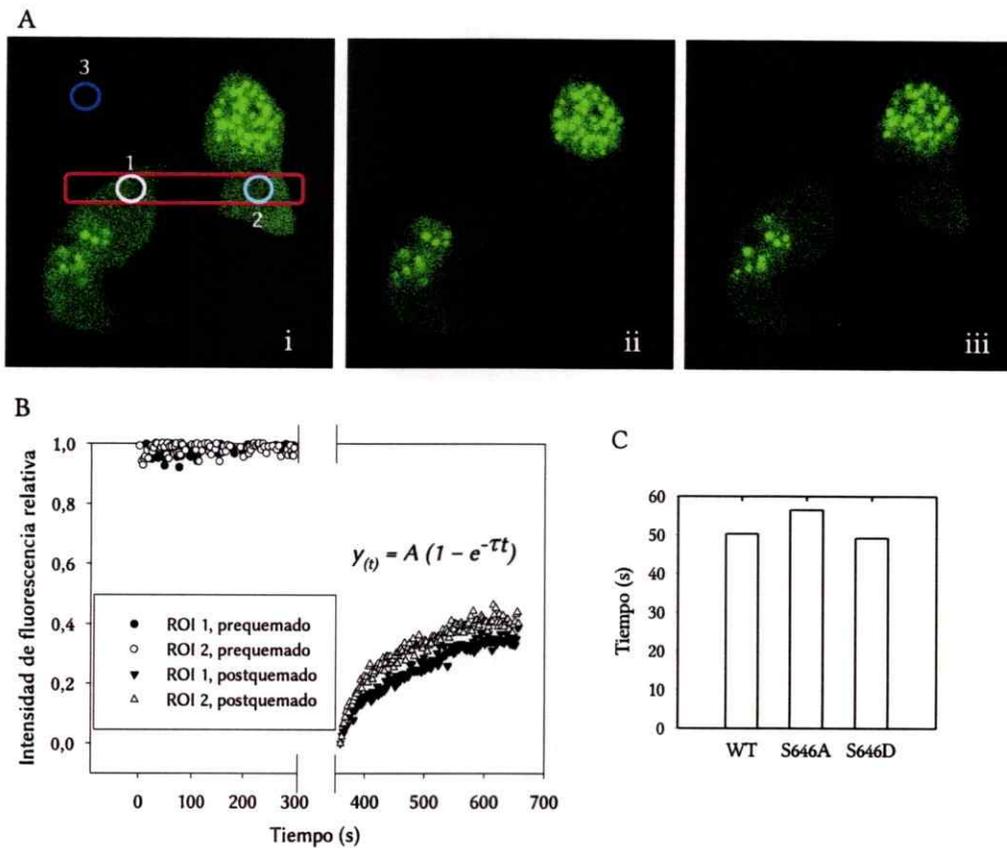


Figura 12: Exportación de las distintas formas de β -catenina.

Se utilizó la técnica de recuperación de la fluorescencia después del blanqueamiento por luz (FRAP), para medir el tiempo de salida desde el núcleo hacia el citoplasma de las distintas variantes de β -catenina fusionadas a GFP. (A) Con un rectángulo rojo se señala la zona blanqueada mientras que en círculos las regiones de interés (ROIs) donde se midió la fluorescencia. (i) Fotografía tomada previo a realizar el blanqueo. (ii) Célula blanqueada. (iii) Célula en el momento final de la medición de la recuperación de la fluorescencia. (B) Gráfico que representa la curva de intensidad de fluorescencia en el pre y postblanqueado. En la curva postquemado, que empieza después del corte en el eje X, se observa la recuperación de la fluorescencia. Esta curva se ajustó a la ecuación exponencial presentada en el gráfico. (C) Se presentan los valores de $\tau_{1/2}$ promedio para cada forma de β -catenina. $\tau_{1/2}$ representa el tiempo (s) en donde la curva de recuperación de la fluorescencia alcanza el 50 % del máximo de su intensidad. Mientras menor es el valor de $\tau_{1/2}$ más rápida es la recuperación de la fluorescencia. Los resultados presentados son el promedio de medición en 6 células para S646A, 4 células para S646D y 2 para WT.

4. Discusión

En este trabajo se estudió el efecto que pudiese tener la naturaleza química del residuo en la posición 646 de β -catenina tanto en su actividad transactivadora de genes como en su localización subcelular. Este residuo, posible blanco de fosforilación por la kinasa CK2, se mutó por ácido aspártico buscando imitar su estado fosforilado, o por alanina, haciendo imposible su potencial fosforilación.

Todas las variantes de β -catenina (WT, S646A y S646D) fueron expresadas y al parecer tuvieron un plegamiento funcional, pues presentaron una actividad significativamente mayor al control negativo (ie. pEGFP-C1) (figura 4). En cuanto a la actividad transactivadora de β -catenina, lo esperado era que ésta dependiese de la potencial fosforilación de la serina 646, es decir que la actividad transactivadora fuese mayor en el caso de la mutante β -catenina-S646D, seguida por la proteína silvestre para obtener el menor valor con la mutante S646A. Contrario a esto, la mutante β -catenina-S646A fue la que presentó mayor actividad (alrededor del 10 % superior), mientras que la mutante S646D tuvo niveles similares a los de la proteína silvestre, aunque ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente significativas al compararlas con la proteína WT. Estos datos sugieren que la naturaleza química del residuo 646 no tiene influencia en la actividad transactivadora de β -catenina.

Otra manera de analizar la capacidad de β -catenina de regular la expresión de genes es a través de RT-PCR. Consecuente con los resultados del ensayo reportero, no hubo diferencias significativas en los niveles de mRNA de survivina detectados (figura 5A). Aunque hubo diferencias significativas con respecto al control negativo, éstas no fueron tan marcadas como se esperaba, indicando nuevamente que β -catenina WT y sus variantes están siendo expresadas y tienen actividad transactivadora sobre un gen endógeno como survivina.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se esperaba obtener un resultado simi-

lar con respecto a los niveles proteicos de survivina. Contrariamente a lo esperado, estos niveles no presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo, aunque sí se apreció una leve tendencia al aumento del nivel proteico de survivina versus el control.

Esta disparidad entre los niveles de mRNA y proteína pueden ser explicados por diversos motivos:

1. La diferencia entre el mRNA de survivina y el control negativo puede no ser suficiente como para que esto se traduzca en una mayor síntesis proteica. De hecho, la diferencia en los niveles de mRNA entre el control y el resto de las condiciones es de una magnitud relativamente moderada.
2. El mRNA de survivina puede sufrir una degradación, aunque desconocemos alguna razón por la que el mRNA de survivina producido en las células transfectadas con el vector vacío sea diferente al mRNA producido en las células transfectadas con el vector de β -catenina WT o una variante mutante. Si bien, el mRNA de survivina en las células transfectadas con el vector vacío proviene de la acción de la β -catenina endógena mientras que en los otros casos la transcripción es activada por la proteína endógena y la exógena, se espera que en ambos casos se produzca el mismo mRNA de survivina y, por lo tanto, no debería existir una diferencia en las modificaciones post-trascripcionales que a la postre provoquen que un mRNA sea más estable que el otro.
3. La cuantificación de films también puede ser un motivo. Si bien se realizó mediante un procedimiento estándar a través del escaneo del soporte (gel/film) y luego la cuantificación de las imágenes obtenidas mediante el programa imageJ [Abràmoff y col. 2004], esta es una metodología de cuantificación propensa al error y el valor que entrega debe ser analizado sólo como un valor "semicuantitativo". Como ejemplo

específico de una fuente de potenciales errores en esta metodología se encuentra el CONTROL AUTOMÁTICO DE GANANCIA (*Automatic Gain Control*), proceso por el cual la información de cada uno de los puntos del elemento escaneado es procesada dependiendo de su entorno, es decir, la información obtenida y que es finalmente cuantificada es modificada por el *scanner* de acuerdo a ciertos parámetros internos. Esta característica es inherente a todos los *scanners* de oficina (como el usado en este trabajo) y no puede ser deshabilitada. Este es uno de los motivos por los que esta metodología de cuantificación puede incidir en los resultados, sobretodo cuando las diferencias son relativamente leves, como fue en este caso⁴.

Cabe señalar, además, que en más de una ocasión los niveles de mRNA y proteína en las células transfectadas con el vector control (ie, pGFP-C1) presentaron valores de survivina prácticamente iguales al resto de las transfecciones, lo cual podría indicar que el reactivo de transfección causó un efecto nocivo en la célula, lo que pudo gatillar un aumento de la expresión de survivina. Survivina es una proteína perteneciente a la familia de inhibidores de la apoptosis, cuya expresión se ve aumentada bajo estímulos de muerte celular [Johnson y col. 2004; Knauer y col. 2010].

Por otro lado, se ha documentado que el uso de agentes de transfección puede tener efectos tóxicos sobre las células⁵ [Haensler y Szoka 1993; Gao y col. 2007] y si bien la expresión de este gen es indicador de la actividad de la vía Wnt/ β -catenina en otras líneas celulares [Zhang y col. 2001b; Torres y col. 2007] y ha sido corroborado en ensayos preliminares del laboratorio utilizando células HEK-293T, es posible que esta expresión elevada de survivina este dada, al menos parcialmente, por el daño impuesto a las células por el reactivo de transfección.

⁴Un trabajo que analiza extensamente las potenciales fallas de esta metodología de adquisición de imágenes y posterior cuantificación es revisada por Gassmann y colaboradores [Gassmann y col. 2009]

⁵El reactivo utilizado en este trabajo, Superfect®, es un dendrímero de poliamidoamina. El trabajo de Haensler analiza particularmente dendrímeros de esta naturaleza.

Como se mostró en la sección 3.4, la localización subcelular de β -catenina fue casi exclusivamente nuclear y las 3 variantes expresadas presentaron la formación de gránulos. Esto sugiere que la naturaleza química del residuo 646 de β -catenina no afecta su localización subcelular. Además se observó que los gránulos se caracterizaron por tener una intensidad de fluorescencia elevada y estar densamente distribuidos en el núcleo (observable en los modelos 3D), lo cual indica que existió una alta concentración de proteína en dicho compartimento.

Aunque existen diversos trabajos donde se transfectan vectores que codifican para β -catenina fusionada a proteínas fluorescentes de una manera similar a la realizada en este trabajo, no fue posible observar resultados que mostrasen algo similar. El hecho de que β -catenina esté siendo sobreexpresada en las células puede provocar que el complejo de destrucción citoplasmático (Axina/APC/GSK3 β /CK1 α) no sea capaz de degradarla con suficiente eficiencia, favoreciendo la localización de β -catenina en el núcleo dada su conocida capacidad de entrar a este compartimento.

Relacionado a este exceso de expresión de β -catenina, se probó transfectar cantidades de DNA menores, obteniéndose menos células transfectadas en vez de células con menor expresión. Cuando se analizó células disminuyendo el tiempo post-transfección, se observó que dentro del núcleo había menos gránulos, pero notablemente más grandes. Por otro lado, la fuerza de expresión que tiene el plasmidio utilizado en este trabajo, pEGFP-C1, dada por el tipo de promotor que contiene (ie, CMV) y la replicación episomal del plasmidio, dada por el origen de replicación del virus SV40⁶, ciertamente pudieron haber incidido, aunque un plasmidio similar utilizado en otros trabajos (pEGFP-N1), cuya única diferencia es que el cDNA de β -catenina se ubica en el extremo NH₂-terminal de la proteína GFP, no

⁶Las células HEK-293T producen endógenamente el ANTIGENO T GRANDE del virus SV40 (SV40 *Large T-antigen*), el cual se une al origen de replicación del mismo virus permitiendo la replicación del plasmidio independiente del DNA endógeno de la célula [Tsui y col. 1982].

mostró generar un patrón similar al encontrado [Johnson y col. 2009; Jamieson y col. 2011].

Un motivo para explicar esta notoria acumulación de GFP- β -catenina en el núcleo puede relacionarse a la notable capacidad de β -catenina de unir otras proteínas en este compartimento. Una vez en el núcleo, β -catenina se une a los factores de transcripción TCF/LEF formando un activador transcripcional bipartito [Logan y Nusse 2004]. Además, β -catenina une diversos factores proteicos que ayudan al remodelamiento de la cromatina, como CBP y p300, dos histona acetil transferasas (HATs), ISW1 y BRG1, proteínas pertenecientes a la familia SWI2/SNF2, subunidades catalíticas de complejos remodeladores de DNA, SWI/SNF, y la proteína MLL, que posee un dominio con actividad metil-transferasa, entre otros [Mosimann y col. 2009]. Además, se ha demostrado mediante experimentos de FRAP que diversas proteínas retendrían a β -catenina en el núcleo, como LEF-1 [Jamieson y col. 2011], TCF4 y BCL9 [Krieghoff y col. 2006] lo que sugiere que muchas otras proteínas que la unen en este compartimento pueden causar un efecto similar de retención.

Con respecto a la composición de estos gránulos, creemos que deberían estar formados por acumulaciones de β -catenina unidos a factores de transcripción TCF/LEF, junto con otros factores que se unen a β -catenina. Se sabe que la proporción de la unión entre β -catenina y los factores TCF/LEF es 1:1, por lo que se esperaría que donde existe una acumulación de β -catenina haya también una acumulación de factores TCF/LEF, aunque no se descarta que sea en una proporción distinta. La sobreexpresión de β -catenina nos podría sugerir que el factor limitante son los factores TCF/LEF, pero por otro lado se ha documentado que estos factores son positivamente regulados por β -catenina [Roose y col. 1999; Hovanes y col. 2001], haciendo probable que también se encuentren sobreexpresados en las células, aunque nuevamente no necesariamente en la misma proporción que β -catenina.

Referido a la localización específica de β -catenina dentro del núcleo, pensamos que debería estar unida a la cromatina en puntos específicos. β -Catenina se une a los factores

TCF/LEF mediante una extensa región de su estructura, que comprende los motivos repetidos 3 al 10 (ie, R3-R10), los cuales a su vez son capaces de unirse al DNA en secuencias conocidas como ELEMENTOS DE RESPUESTA A WNT (*Wnt Reponse Elements*, WREs) [Mosi-
mann y col. 2009]. El residuo mutado en este trabajo (S646) yace en el motivo R12 y, analizando la estructura cristalográfica de β -catenina unida al dominio de unión a β -catenina de TCF3⁷ [Graham y col. 2000], se espera que no se altere la capacidad de β -catenina de unirse a estos factores. Así, una posibilidad cierta es que estos gránulos nucleares estén efectivamente unidos a la cromatina vía TCF/LEF y localizados en los diferentes WREs.

Sin embargo, en este trabajo no se realizaron experimentos para comprobar que estos gránulos están efectivamente unidos a la cromatina. Una forma de comprobarlo sería exponiendo las células a un detergente que permeabilice la membrana nuclear, para posteriormente tratarlas con DNasa. Después de fijarlas es de esperar que si los gránulos están unidos a la cromatina éstos no se puedan observar en el núcleo⁸

Como se ha mencionado, β -catenina interactúa con diversas proteínas tanto en el núcleo como en el citoplasma, muchas de las cuales podrían tener un papel en el tráfico bidireccional núcleo-citoplasmático de esta proteína. En este trabajo, el área expuesta por los gránulos tiene gran relevancia pues este parámetro podría dar cuenta de la accesibilidad de otras proteínas hacia estos gránulos y la posterior interacción con β -catenina.

Al respecto, el análisis del movimiento de β -catenina mediante FRAP permitió determinar que las células que expresaban β -catenina-S646A presentaron un valor de $\tau_{1/2}$ levemente mayor que las otras dos variantes de β -catenina (figura 13), pero esto no tuvo una correlación con el resto de los resultados obtenidos. En particular, el área expuesta por los gránulos de las células transfectadas con β -catenina-S646A mostró un valor prácticamente igual al de la proteína β -catenina WT (tabla 4), lo que no permite explicar las diferencias en

⁷Dos residuos clave de β -catenina en esta unión con XTFC3 (homólogo de TCF3 en *Xenopus*) son las lisinas 312 y 435.

⁸Un experimento similar al sugerido lo realiza Jamieson y colaboradores [Jamieson y col. 2011].

la cinética como un producto del área expuesta por sus gránulos. Es preciso destacar que estos resultados son sólo preliminares, puesto que el número de células donde se logró realizar FRAP es insuficiente y es probable que otros detalles en el protocolo experimental deban ser mejorados.

5. Conclusiones

- La naturaleza química del residuo 646 de β -catenina no tiene efecto en su capacidad para transactivar genes, lo que se demostró sobre la expresión de un gen exógeno (ie, ensayo reportero) o uno endógeno (ie, niveles de mRNA y proteína de supervivencia).
- La naturaleza química del residuo 646 de β -catenina no tiene efecto en la localización subcelular de esta proteína, como se demostró mediante el análisis por microscopía confocal de fluorescencia.
- La naturaleza química del residuo 646 de β -catenina tiene efecto en la formación de un distinto número de gránulos nucleares, los cuales además poseen un volumen individual diferente.
- La naturaleza química del residuo 646 de β -catenina podría tener efecto en la cinética de exportación de esta proteína desde el núcleo, lo que se evaluó a través de la técnica de FRAP; sin embargo, es necesario hacer un número mayor de experimentos para demostrarlo.

Referencias

- Abràmoff, M., P. Magalhaes, S. Ram (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophot inter* 11(7):36–43.
- Ahmed, K., D. A. Gerber, C. Cochet (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* 12(5):226–30.
- Allende, J. E., C. C. Allende (1995). Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J* 9(5):313–23.
- Altieri, D. C. (2004). Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 92(4):656–63.
- Bienz, M. (2000). Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell* 103(2):311–20.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3):469–80.
- Cong, F., H. Varmus (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):2882–7.
- Dean, A., D. Koshland Jr (1990). Electrostatic and steric contributions to regulation at the active site of isocitrate dehydrogenase. *Science* 249(4972):1044–6.
- Dominguez, I., G. E. Sonenshein, D. C. Seldin (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci* 66(11-12):1850–7.
- Duncan, J. S., D. W. Litchfield (2008). Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim Biophys Acta* 1784(1):33–47.
- Eleftheriou, a., M. Yoshida, B. R. Henderson (2001). Nuclear export of human β -catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Biol Chem* 276(28):25883–8.

- Gao, X., K.-S. Kim, D. Liu (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS journal* 9(1):E92–E104.
- Gassmann, M., B. Grenacher, B. Rohde, J. Vogel (2009). Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30(11):1845–55.
- Graham, T. A., C. Weaver, F. Mao, D. Kimelman, W. Xu (2000). Crystal structure of a β -catenin/Tcf complex. *Cell* 103:885–896.
- Haensler, J., F. C. Szoka (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate chemistry* 4(5):372–9.
- Henderson, B. R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2(9):653–60.
- Hendriksen, J., F. Fagotto, H. van Der Velde, M. van Schie, J. Noordermeer, M. Fornerod (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active β -catenin independently of CRM1. *J Cell Biol* 171(5):785–97.
- Hjerrild, M., D. Milne, N. Dumaz, T. Hay, O. Issinger, D. Meek (2001). Phosphorylation of murine double minute clone 2 (MDM2) protein at serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells. *Biochem J* 355(Pt 2):347–56.
- Homma, M. K., D. Li, E. G. Krebs, Y. Yuasa, Y. Homma (2002). Association and regulation of casein kinase 2 activity by adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9):5959–64.
- Hovanes, K., T. Li, J. Munguia, T. Truong, T. Milovanovic, J. Marsh, R. Holcombe, M. Waterman (2001). β -catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 28(1):53–7.
- Huang, W., R. Erikson (1994). Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19):8960–3.

- Huber, A. H., W. J. Nelson, W. I. Weis (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell* 90(5):871–82.
- Huber, O., R. Korn, J. McLaughlin, M. Ohsugi, B. G. Herrmann, R. Kemler (1996). Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59(1):3–10.
- Hülsken, W., W. Birchmeier, J. Behrens (1994). E-Cadherin and APC Compete for the Interaction with β -Catenin and the Cytoskeleton. *J Cell Biol* 127(6):2061–9.
- Hurley, J., A. Dean, J. Sohl, D. Koshland Jr, R. Stroud (1990). Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249(4972):1012–6.
- Jamieson, C., M. Sharma, B. R. Henderson (2011). Regulation of β -catenin nuclear dynamics by GSK-3 β involves a LEF-1 positive feedback loop. *Traffic* 12:1–17.
- Johnson, E. a., S. I. Svetlov, B. R. Pike, P. J. Tolentino, G. Shaw, K. K. W. Wang, R. L. Hayes, J. a. Pineda (2004). Cell-specific upregulation of survivin after experimental traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 21(9):1183–95.
- Johnson, M., M. Sharma, C. Jamieson, J. M. Henderson, M. T. S. Mok, L. Bendall, B. R. Henderson (2009). Regulation of β -catenin trafficking to the membrane in living cells. *Cell Signalling* 21(2):339–48.
- Ki, H., M. Oh, S. W. Chung, K. Kim (2008). β -catenin can bind directly to CRM1 independently of adenomatous polyposis coli, which affects its nuclear localization and LEF-1/ β -catenin-dependent gene expression. *Cell Biol Int* 32(4):394–400.
- Knauer, S. K., U.-R. Heinrich, C. Bier, N. Habtemichael, D. Docter, K. Helling, W. J. Mann, R. H. Stauber (2010). An otoprotective role for the apoptosis inhibitor protein survivin. *Cell death dis* 1(e51):1–9.
- Koike, M., S. Kose, M. Furuta, N. Taniguchi, F. Yokoya, Y. Yoneda, N. Imamoto (2004). β -Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores. *J Biol Chem* 279(32):34038–47.

- Krieghoff, E., J. Behrens, B. Mayr (2006). Nucleo-cytoplasmic distribution of β -catenin-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* 119(7):1453–63.
- Landesman-Bollag, E., D. H. Song, R. Romieu-Mourez, D. J. Sussman, R. D. Cardiff, G. E. Sonenshein, D. C. Seldin (2001). Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem* 227(1-2):153–65.
- Léger, J., M. Kempf, G. Lee, R. Brandt (1997). Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* 272(13):8441–6.
- Li, P.-F., J. Li, E.-C. Müller, A. Otto, R. Dietz, R. von Harsdorf (2002). Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol Cell* 10(2):247–58.
- Logan, C., R. Nusse (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20(1):781–810.
- Meggio, F., L. Pinna (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17(3):349–68.
- Molenaar, M., M. van De Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destree, H. Clevers (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86(3):391–9.
- Mosimann, C., G. Hausmann, K. Basler (2009). β -catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(4):276–86.
- Neufeld, K. L., F. Zhang, B. R. Cullen, R. L. White (2000). APC-mediated downregulation of β -catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO rep* 1(6):519–23.
- Nhieu, J., C. Renard, Y. Wei, D. Cherqui, E. S. Zafrani, M. A. Buendia (1999). Nuclear Accumulation of Mutated β -Catenin in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Increased Cell Proliferation. *Am J Pathol* 155(3):703–10.

- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes dev* 14:1837-51.
- Reits, E. a., J. J. Neefjes (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 3(6):E145-7.
- Reya, T., H. Clevers (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434(7035):843-50.
- Roose, J., G. Huls, M. Beest, P. Moerer, K. Horn, R. Goldschmeding, T. Logtenberg, H. Clevers (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the β -catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285(5435):1923-6.
- Song, D. H., I. Dominguez, J. Mizuno, M. Kaut, S. C. Mohr, D. C. Seldin (2003). CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of β -catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* 278(26):24018-25.
- Song, D. H., D. J. Sussman, D. C. Seldin (2000). Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 275(31):23790-7.
- Suh, E.-K., B. M. Gumbiner (2003). Translocation of β -catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins. *Exp Cell Res* 290(2):447-56.
- Tapia, J., V. Torres, D. Rodriguez, L. Leyton, A. Quest (2006). Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced β -catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(41):15079-84.
- Tapia, J. C., V. M. Bolanos-Garcia, M. Sayed, C. C. Allende, J. E. Allende (2004). Cell cycle regulatory protein p27KIP1 is a substrate and interacts with the protein kinase CK2. *J Cell Biochem* 91(5):865-79.
- Terry, L. J., E. B. Shows, S. R. Wentz (2007). Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318(5855):1412-6.
- Thorsness, P. E., D. E. Koshland (1987). Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J Biol Chem* 262(22):10422-5.

- Torres, V. a., J. C. Tapia, D. a. Rodriguez, A. Lladser, C. Arredondo, L. Leyton, A. F. G. Quest (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced β -catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Molecular and cellular biology* 27(21):7703–17.
- Townsend, F. M., A. Cliffe, M. Bienz (2004). Pygopus and Legless target Armadillo/ β -catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* 6(7):626–33.
- Tran, E. J., S. R. Wentz (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125(6):1041–53.
- Tsui, L. C., M. L. Breitman, L. Siminovitch, M. Buchwald (1982). Persistence of freely replicating SV40 recombinant molecules carrying a selectable marker in permissive simian cells. *Cell* 30(2):499–508.
- Van De Wetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. V. Beest, J. V. Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin, H. Clevers, C. Hill, N. Carolina (1997). Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the Drosophila Segment Polarity Gene dTCF. *Cell* 88(c1):789–99.
- Van De Wetering, M., M. Oosterwegel, D. Dooijes, H. Clevers (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J* 10(1):123–32.
- Wiechens, N., F. Fagotto (2001). CRM1-and Ran-independent nuclear export of β -catenin. *Curr Biol* 11(1):18–28.
- Wiechens, N., K. Heinle, L. Englmeier, A. Schohl, F. Fagotto (2004). Nucleo-cytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt- β -catenin Pathway. *J Biol Chem* 279(7):5263–7.
- Willert, K., M. Brink, A. Wodarz, H. Varmus, R. Nusse (1997). Casein kinase 2 associates with and phosphorylates Dishevelled. *EMBO J* 16(11):3089–96.

- Xing, Y., K. Takemaru, J. Liu, J. Berndt, J. Zheng, R. T. Moon, W. Xu (2008). Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Structure* 16(3):478-87.
- Yokoya, F., N. Imamoto, T. Tachibana, Y. Yoneda (1999). β -Catenin Can Be Transported into the Nucleus in a Ran-unassisted Manner. *Molecular Biology of the Cell* 10(April):1119 -1131.
- Zhang, F., R. White, K. Neufeld (2001a). Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell Biol* 21(23):8143-56.
- Zhang, T., T. Otevrel, Z. Gao, Z. Gao, S. M. Ehrlich, J. Z. Fields, B. M. Boman (2001b). Evidence That APC Regulates Survivin Expression : A Possible Mechanism Contributing to the Stem Cell Origin of Colon Cancer. *Cancer Res* 61(24):8664-67.