



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS DE LA DESREGULACIÓN
DE LA PROTEÍNA Bcl-3 EN
CÉLULAS HeLa

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Rubén Zamora Alvarado

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Jorge Meléndez Zajigla

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

Dr. Federico Martínez Montes

Por sus invaluable enseñanzas que han fortalecido mi formación como investigador y por todos sus comentarios y sugerencias que favorecieron el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A los miembros del jurado:

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dr. Alejandro García Carrancá

Dra. Patricia Talamás Rohana

Por todas sus sugerencias para el mejoramiento de esta tesis.

A si mismo agradezco a los investigadores Dr. Karen Manoucharyan y la Dra. Valeria Barrón Palma por todos sus comentarios y sugerencias que han servido para mi formación como investigador.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

Dedicatorias

A:

La persona que siempre me enseñó la gratitud, la confianza y la importancia del trabajo además de darme siempre todo su amor y apoyo, gracias Mamá por estar siempre a mi lado. (Luz Ma. Alvarado Garnica)

Mi hermana Vero que siempre me ha apoyado y creído en mi, gracias por tu amor y consejos.

A Valeria quien ha estado a mi lado por todo este tiempo, has sido mi mejor apoyo en todo momento, gracias por creer en mí y tener siempre un consejo, por todo tu Amor incondicional.

Todos mis amigos que han estado presentes en algún momento de mi vida y han sido guía : Toño Ríos, Ray Sanchez, Julia Mendoza, Laura Castrillón, Victor López, Ingrid Medina, Yui Rangsi, Moisés Martínez, Edgar Rangel, José Luis Hernández, HBB.

Y a todos los demás amigos y familia que no he mencionados pero que han marcado mi vida con su presencia.

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Ciclo celular	2
Progresión del ciclo celular	3
Check point del ciclo celular	4
Aneuploidía	6
Factor de transcripción NF- κ B	7
Participación de NF- κ B en el desarrollo del cáncer	9
Activadores y genes blanco de NF- κ B	10
Proteína I κ B	12
Proteína Bcl-3	14
Asociación de Bcl3 con homodimeros p50 y p52	15
Bcl-3 y correguladores transcripcionales	16
Bcl3 y su participación en el daño al DNA	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Establecimiento de células HeLa con Bcl-3 desregulado	21
Cultivos celulares	21
Construcción de un RNAi dirigido contra Bcl-3	21
Construcción de un sistema de sobreexpresión para la proteína Bcl-3	22
Transfección celular estable	22
Análisis por Western Blot	23
Análisis de la expresión de bcl-3 en HeLa por RT-PCR	23
CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS HELA CON Bcl-3 DESREGULADO	24
Morfología celular de HeLa con niveles de Bcl3 desregulados	24
Tinciones específicas	24
Tinción con Bromuro de etidio	24
Inmunofluorescencia en células HeLa RNAi Bcl-3	25
CARACTERIZACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CÉLULAS Y SENSIBILIDAD APOPTÓTICA	25

Ensayo de proliferación	25
Ensayo de sensibilidad apoptótica	26
Ensayo de clonogenicidad	26
Caracterización celular mediante ensayos citométricos	26
Ensayo de TUNEL	27
PARTICIPACIÓN DE BCL-3 EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	27
Formación del huso mitótico en células HeLa con los niveles de Bcl-3 desregulados y arrestadas con nocodazol	27
Determinación de ploidía en células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados	28
Inhibición del arresto celular por colcemida en células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados	29
RESULTADOS	30
Establecimiento de células HeLa con Bcl-3 desregulado	30
Caracterización de células HeLa con Bcl-3 desregulado	31
Ensayo de inmunolocalización de Bcl-3 en células HeLa RNAi bcl-3	35
Efecto de Bcl3 sobre la proliferación y la muerte por apoptosis	36
Ensayo de TUNEL	39
Ensayo de clonogenicidad celular	40
Caracterización celular mediante ensayos citométricos	42
Formación del huso mitótico en células HeLa con los niveles de bcl-3 desregulados arrestadas con nocodazol	43
Ploidía en células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados	45
Citometría de células HeLa con desregulación de Bcl-3 arrestadas con colcemida	46
Determinación de proteínas involucradas en el ciclo celular	48
Expresión de proteínas del ciclo celular en hela con Bcl-3 desregulado	49
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIÓN	54
REFERENCIAS	55
ARTICULO	

RESUMEN

La proteína Bcl-3 es un miembro de la familia de I κ B, el cual se une específicamente a los homodímeros p50-p50 y p52-p52 de NF- κ B promoviendo la actividad transcripcional por poseer dos dominios transactivacionales (Hitoshi O *et al.*, 1990; Kerr LD *et al.*, 1993).

El potencial oncogénico de Bcl-3 se ha asociado con su capacidad para aumentar la proliferación celular mediante la activación del promotor de la ciclina D1 (Westerheide S *et al.*, 2001). Su papel antiapoptótico es debido a que transcribe a mdm2, quien inhibe a p53 (Kashatus *et al.*, 2006). Nuestro interés se centra en la participación de la proteína Bcl-3, cuando los niveles de ésta se hayan disminuidos ó incrementados en células HeLa, y su participación en el desarrollo de eventos oncogénicos como la proliferación, apoptosis y la respuesta al daño al DNA. Para analizar la participación de Bcl-3 en estos eventos, se inhibió su expresión mediante la construcción de un RNA de interferencia (RNAi) dirigido al RNA mensajero de bcl-3 y su sobreexpresión se obtuvo mediante un sistema retroviral.

Los resultados mostraron que la disminución de la expresión de Bcl-3 en células HeLa induce una reducción en la proliferación y una sobrevivencia clonogénica asociada a un fenómeno de multinucleación y aneuploidía. Estos eventos están relacionados con una respuesta al daño al DNA, desregulación de las fases G2/M del ciclo celular y alteración en la amplificación de los centrosomas. Cuando se incrementa la expresión de Bcl3 los efectos anteriormente mencionados se revierten.

INTRODUCCIÓN

Ciclo celular

La división de las células es un proceso finamente regulado el cual implica coordinación tanto en el crecimiento celular como en la replicación del DNA asegurando que la célula hija contenga la información genética del progenitor de forma íntegra.

En eucariontes la maquinaria del ciclo celular está regulada por factores de crecimiento que controlan la proliferación celular haciendo que estas divisiones sean coordinadas.

En células eucariotas, el ciclo celular está dividido en cuatro estadios; G1, S, G2, M. G1 es la fase del ciclo donde la célula se prepara para el proceso de replicación del DNA, durante esta fase los estímulos mitogénicos son captados y la célula inicia el ciclo. En la fase S ocurre la síntesis del DNA. G2 es la fase en la que la célula prepara el material duplicado para entrar a la división celular, G2 cuenta con un check point el cual analiza la integridad del material que será transferido. Por último, la fase M da comienzo a la mitosis, ésta se subdivide en 4 etapas (profase, metafase, anafase y telofase). Durante la mitosis, los cromosomas se condensan, la envoltura nuclear se desintegra y hay reorganización del citoesqueleto para la formación del huso mitótico y los cromosomas migran a los polos. Una vez que los cromosomas han migrado a los polos se da la citocinesis, en esta fase la célula se constriñe para dividirse completamente y se forman los núcleos en la cual los cromosomas replicados son segregados para dar origen a dos células hijas que poseerán la misma información cada una de ellas.

La transición del ciclo celular está mediado por una familia de proteínas llamadas ciclinas, estas requieren de la unión a cinasas dependientes de ciclinas (cdk's) que actúan como subunidades regulatorias la acumulación de estos complejos y

su degradación a lo largo del ciclo celular permiten la transición de cada una de las fases.

La familia de las ciclinas comprenden a: Ciclina A, B1, B2, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1, T2. Todas las ciclinas contienen una región común de gran homología denominada caja de ciclinas, este dominio permite la unión de la ciclina con las cdk's (cdk1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9) y así conferir la actividad cinasa, no todas las cdk's y ciclinas participan en la regulación del ciclo y la expresión de ellas es contexto específico en la fase del ciclo (Jhonson D *et al.*, 1999; Vermeulen *et al.*, 2003).

Progresión del ciclo del celular

La expresión de las ciclinas tipo D se encuentran reguladas por la presencia de factores de crecimiento. El principal sustrato de la ciclina D/cdk4 es la proteína supresora de tumor retinoblastoma (Rb). Rb desempeña un papel crucial en la progresión de la fase G1 del ciclo celular, Rb mantienen secuestrado al factor de transcripción E2F, una vez fosforilado Rb por la ciclina D/cdk4 este libera al factor promoviendo la transcripción de genes necesarios para continuar con el ciclo celular y para la síntesis de DNA incluyendo a la ciclina E, ciclina A/cdk1, B-myb, DNA polimerasa alfa, entre otros. El complejo ciclina E/cdk2 mantiene el estado de Rb hiperfosforilado presentando un fenómeno de retroalimentación positiva reflejándose en la acumulación de E2F activo (Sage J *et al.*, 2010).

Ciclina A es también regulado por E2F acumulándose en la fase G1/S y se encuentra asociado con cdk1. El complejo ciclina A/cdk1 colocaliza en sitios de replicación de DNA sugiriendo así su participación en el evento de la síntesis de DNA o previniendo la inadecuada síntesis de DNA (Jhonson D *et al.*, 1999).

En la fase G2 del ciclo celular se encuentra el check point de respuesta al daño al DNA el cual puede causar arresto celular permitiendo que el daño al DNA sea reparado antes de entrar a la mitosis. La mitosis es regulada por cdk1 en asociación con ciclinas A, B1 y B2. En la salida de la mitosis ciclinas A y B son degradadas y la ciclina B es quien participa en la señalización para la

degradación. Después de la mitosis las células entran nuevamente a la fase G1 y el check point de fase G1 determina si se divide nuevamente o se detiene el ciclo.

Check point del ciclo celular

La función de los check point del ciclo celular es asegurar que se realice correctamente la transición del mismo y que los cromosomas dañados no sean replicados y transmitidos a las células hijas, de lo contrario se produciría una célula aberrante. Estos mecanismos de sensado de la información pueden arrestar la progresión del ciclo celular haciendo que la célula repare el daño detectado ó la mande a muerte celular mediante apoptosis. Existen tres check point, en la fase G1, en la G2 y otro en la fase mitótica (Andreassen P *et al.*, 2003).

Proteínas asociadas al check point al daño al DNA como ataxia telangiectasia mutada (ATM), son importantes para la señalización de p53 después de la exposición a radiación ionizante. Una vez activas, ATM y ATR fosforilan y activan a las Chk1 y Chk2 que a su vez fosforilan a proteínas relacionadas con la progresión del ciclo (Jhonson D *et al.*, 1999; Nelsen J *et al.*, 2005).

El check point de G2 previene la iniciación de la mitosis hasta que la replicación del DNA se haya completado, de esta forma el check point de fase G2 arresta la progresión del ciclo, esto se ha observado en DNA dañado por radiación, de esta forma se previene la iniciación de la fase M.

Las células de mamíferos poseen un check point que mantiene la actividad del complejo cdk1/ciclina B induciendo un arresto mitótico en presencia de inhibidores del ensamblaje mitótico.

La activación de p53 en respuesta al daño al DNA puede dirigir a un arresto celular o hacia la apoptosis. Así, el arresto puede ocurrir en la fase G1/S o G2 dependiendo del contexto celular en donde p53 posee una gran importancia.

Esta aparente diferencia de funcionalidad de p53 puede deberse a la variedad de mecanismos reguladores como modificaciones transcripcionales que estabilizan la unión al DNA, su degradación o su actividad transcripcional.

La vida media de p53 es de sólo unos minutos, como resultado de la actividad de mdm2, pero p53 puede ser rápidamente estabilizada por modificaciones transcripcionales que interrumpen la interacción con mdm2 permitiendo alargar su vida media e incluso tener actividad transcripcional.

Ante un estímulo específico, p53 se acumula y ejerce su efecto en núcleo activando gran número de genes blanco como al inhibidor de Cdk's p21, genes proapoptóticos como PUMA y Noxa (Ho C *et al.*, 2006).

La pérdida de la función de p53 ya sea por mutación o sobreexpresión de su inhibidor mdm2 conlleva a la desregulación del ciclo celular, protección contra la apoptosis e inestabilidad genómica promoviendo la acumulación de mutaciones secundarias (Minemoto Y *et al.*, 2003; Ho C *et al.*, 2006).

El daño al DNA es percibido por sensores como RAD1, RAD9, RAD17, Hus7 éstos señalizan hacia las cinasas ATM y ATR que a su vez fosforilan y activan a otras cinasas como Chk2 (Nelsen J *et al.*, 2005; Cetin B *et al.*, 2010; Li Q *et al.*, 2002).

La inestabilidad genómica es el resultado de fallas en uno o varios check point, ya que los cromosomas dañados son susceptibles a acumular alteraciones estructurales y segregarse de forma inadecuada.

Se ha observado que mutaciones en los genes que participan en el check point pueden promover inestabilidad genómica.

Mutaciones en las proteínas Bub1 y BubR1 que participan en check point mitótico promueven la inestabilidad cromosómica, también se ha relacionado a MAD1 y MAD2 (Mitotic spindle assembly checkpoint protein) en cáncer de mama y leucemias observándose que la pérdida de estos genes producen errores en la segregación de los cromosomas (Kienitz A *et al.*, 2005).

El descubrimiento de nuevas interacciones de proteínas involucradas en la pérdida de la regulación del ciclo celular puede ofrecer alternativas en la identificación de blancos terapéuticos los cuales pueden promover el arresto celular y señalar a las células a una muerte por apoptosis.

Las diferentes drogas terapéuticas intervienen en diversos mecanismos de acción y pueden exhibir una especificidad determinada en el estadio del ciclo celular.

Una de las actividades quimioterapéuticas con mayor aplicación es la inducción del daño al DNA y la señalización a apoptosis. Agentes como el cisplatino que forma aductos en el DNA causa un arresto en la célula tanto en G1/S como en G2/M. El arresto en G1 esta mediado por p53 quien induce un incremento en p21 inhibiendo a ciclina E/cdk2 y ciclina D/cdk4 evitando la hiperfosforilación de Rb y arretando así la progresión de G1/S.

El check point de G2/M es inducido por daño al DNA, este puede ocurrir dependiente o independiente de p53. Para entrar a mitosis es requerido tanto p21 como Ciclina B/cdk1 y participan en la señalización de la respuesta al daño al DNA. Se ha observado que tumores que presentan p53 inactivo pueden incrementar la sensibilidad a agentes que dañan al DNA, tal es el caso del cisplatino (Johnson D *et al.*, 1999; Andreassen P *et al.*, 2001).

Inhibidores de microtúbulos como el taxol disminuyen la polimerización y despolimerización de tubulina así como la formación del huso mitótico, como resultado, las células inician un arresto dependiente de p53 en el check point del ensamblaje del huso mitótico o continúan con la fase M, generando aneuploidía.

Aneuploidía

Las alteraciones más notables después de la transformación celular ocurren a nivel cromosomal. Las células cancerosas con frecuencia presentan variación en el número de cromosomas convirtiéndose en células aberrantes, esta alteración se denomina aneuploidía.

La presencia de aneuploidia en tumores correlaciona directamente con la progresión y la metástasis así como un pobre pronóstico.

Los fenómenos de tetraploidización pueden deberse a una salida de la mitosis del ciclo celular seguido de fallas en el ensamblaje del huso mitótico y fallas en la segregación cromosomal (Cetin B *et al.*, 2010).

Factor de transcripción NF- κ B

(Factor nuclear del gen de la cadena κ de células B)

El factor de transcripción NF- κ B está involucrado en diversas actividades biológicas tales como procesos inflamatorios, respuesta inmune, desarrollo celular y apoptosis. Las proteínas pertenecientes a esta familia modulan la transcripción por unión a distintas secuencias consenso del DNA que son conocidas como secuencias κ B. En mamíferos existen 5 polipéptidos homólogos que conforman a la familia NF- κ B: Rel-A (p65), c-Rel, Rel-B, p50 y p52. Comúnmente los polipéptidos NF- κ B poseen en la región amino terminal una secuencia de gran homología de aproximadamente 300 aminoácidos denominada "Dominio de Homología a Rel (RHD)". Este segmento posee tres secuencias: una responsable de la translocación nuclear, otra de la unión al dominio κ B del DNA y la última para la formación de un complejo dimérico con miembros de su familia. Los dímeros de NF- κ B pueden existir como homodímeros o heterodímeros y pueden estar formados por combinaciones de las cinco diferentes subunidades de NF- κ B, observándose frecuentemente la forma p65-p50. Los polipéptidos de NF- κ B se dividen en dos subgrupos dependiendo de la presencia o ausencia de un Dominio de Transactivación (TAD) ubicado en el C-terminal (Ghosh G *et al.*, 1999). (Fig 1)

El grupo I está formado por miembros proteicos maduros que contienen una potente actividad transcripcional; estos miembros son: Rel-A (p65), Rel-B y c-Rel. El grupo II consiste en miembros que son codificados por procesamiento proteolítico en unidades más pequeñas de aproximadamente 50 KDa (p50/p105) y 52 KDa (p52/p100). Estas unidades tienen la capacidad de unirse al DNA pero carecen de actividad transcripcional.

La activación de la vía de señalización de NF- κ B es regulada a varios niveles, la principal regulación es dependiente del complejo I κ B (proteína inhibitoria).

En determinados contextos celulares el principal complejo de NF- κ B está formado por el trimero p50-RelA-I κ B α que se localiza en citoplasma y es incapaz de unirse al DNA.

La activación de la vía canónica de NF- κ B responde a varias señales extracelulares, las cuales promueven la fosforilación de I κ B α en dos serinas del N-terminal (Ser-32 y Ser-36) y realizada por la cinasa IKK. Esto promueve la ubiquitinación de I κ B α por el complejo proteosomal y por consiguiente su degradación. Una vez degradado I κ B α , el complejo NF- κ B (p65/p50) se transloca al núcleo para ejercer su actividad transcripcional uniéndose a los sitios κ B del DNA (Fig 2). La actividad transcripcional de NF- κ B puede ser modulada por una variedad de modificaciones post transcripcionales e interactuar con otras proteínas como factores de transcripción o coactivadores.

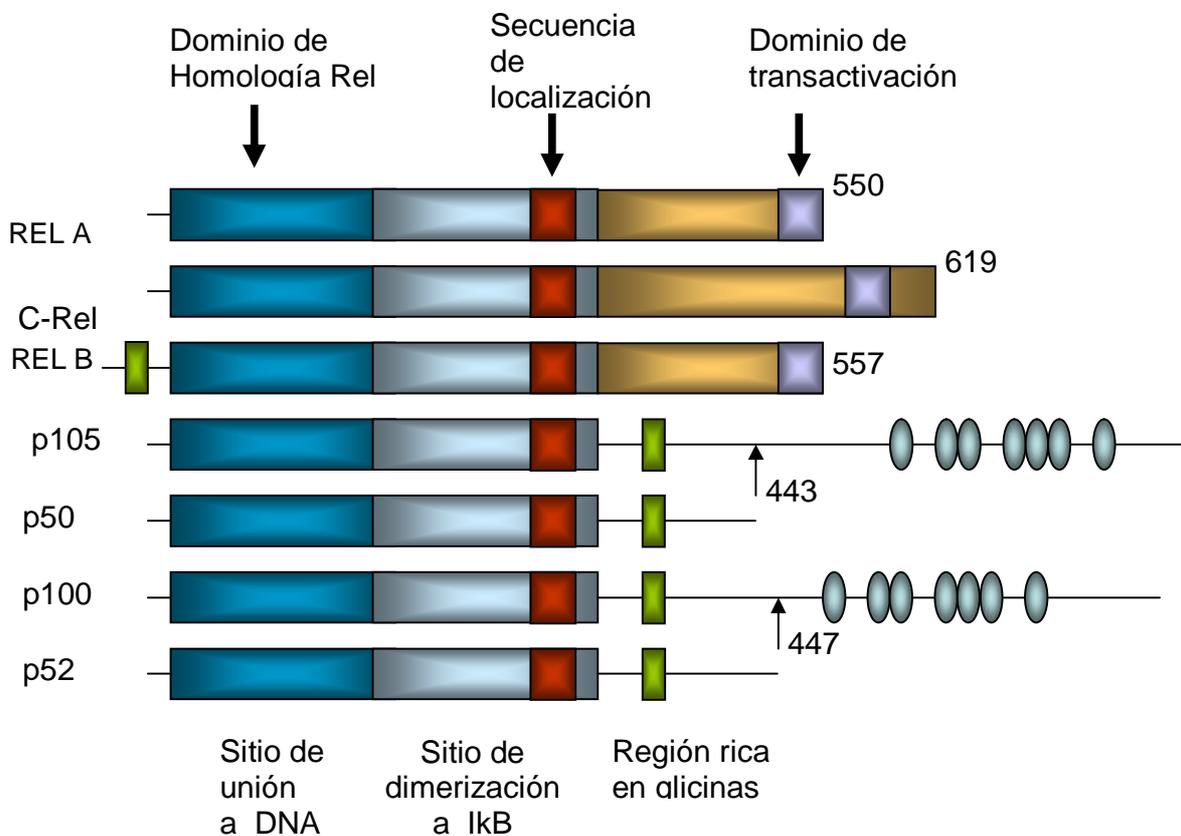


Fig 1. Familia NF- κ B

La familia NF- κ B comparte un Dominio de Homología Rel el cual posee secuencias para la unión al DNA y de dimerización tanto para NF- κ B como para I κ B. Se esquematizó los sitios de corte para la formación de p50 y p52 a partir de sus precursores p105 y p100 respectivamente, todos los miembros de la familia NF- κ B poseen un dominio de translocación ubicado en el C-terminal solo tres miembros de NF- κ B (p65, Rel-B y C-Rel) poseen actividad transcripcional, p50 y p52 carecen de este sitio.

Participación de NF- κ B en el desarrollo del cáncer

La expresión del factor NF- κ B ha sido utilizada como un marcador pronóstico en el desarrollo de tumores, se sabe que la sobreexpresión de esta familia de proteínas está directamente relacionada con el crecimiento y sobrevivencia de tumores y la elevada actividad se correlaciona a falla en los miembros inhibidores de NF- κ B (I κ B). Está claramente definido que NF- κ B participa en los eventos de transformación hacia la malignidad de las células (Franzoso G *et al.*, 1992).

NF- κ B induce la expresión de factores de crecimiento, citocinas y otros factores involucrados en la respuesta a estrés, proliferación celular y progresión del ciclo. Los genes involucrados en la proliferación incluyen a c-myc, ciclina D1 entre otros, por otra parte, la participación de p65 en la regulación del ciclo celular depende de la interacción con el complejo ciclina E- cdk 2 CBP/p300 y con el inhibidor de ciclinas p16 INK4 esto asociado con la transición del ciclo celular arrestándolo en la fase G1/S, de esta forma es como se relaciona a NF- κ B en el desarrollo de la oncogénesis promoviendo la progresión tumoral. Además NF- κ B activa la expresión de genes importantes para la invasión y metástasis incluyendo factores angiogénicos como VEGF, enzimas proteolíticas, metaloproteinasa y moléculas de adhesión (Westerheide S *et al.*, 2001; Meraldi P *et al.*, 2002).

Por otra parte se sabe que NF- κ B induce la expresión de varios inhibidores de la apoptosis como c-IAP1, c-IAP2, TRAF1, TRAF2, A20, BCLXL entre otros miembros clave de la apoptosis.

Activadores y genes blanco de NF- κ B

NF- κ B promueve la expresión de casi 150 genes, la mayoría de estos genes son transactivados por NF- κ B y las proteínas resultantes participan en la respuesta inmune, incluyendo citocinas, quimiocinas, receptores y moléculas presentadoras de antígeno.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina proinflamatoria, este factor se une al receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) activado por NF κ B y AP1 desencadenando la respuesta proinflamatoria. Por otra parte la activación de la vía de señalización de TNF α desencadena la transcripción del gen p53 que contiene un sitio κ B que lo convierte en blanco de NF- κ B; de esta forma p53 puede proteger a las células de agentes que dañan al DNA arrojando a las células en fase G1/S, también p53 puede participar en algunas respuestas antiapoptóticas mediadas por NF- κ B y p53, éstas respuestas son inducidas por estrés celular como el daño al DNA por radiación UV (Franzoso *et al.*, 1998).

Otra vía de señalización importante activada por NF- κ B es la vía de Fas, proteína cuyo gen también contiene un sitio κ B. Cuando esta vía se activa conduce a muerte celular (Hirano F *et al.*, 1998).

Se ha observado que miembros de la familia de I κ B como; Bcl3, I κ B α y ϵ están relacionados con el desarrollo del cáncer, observándose una hiperactivación de la señal de NF- κ B o algunas mutaciones de la misma inactivan a las subunidades regulatorias de I κ B.

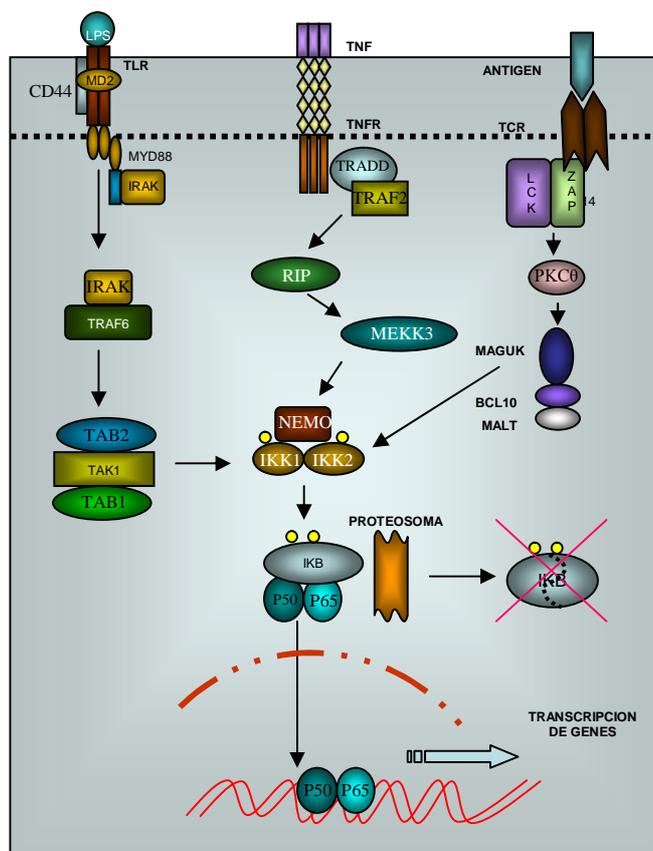


Fig 2. Activación de la vía de señalización de NF-κB

El esquema muestra diferentes señales que convergen en la fosforilación del complejo IKK el cual ejerce su actividad fosforilando a IκB el cual mantiene secuestrado a NF-κB en el citoplasma, una vez fosforilado IκB es ubiquitinado y degradado vía proteasoma. El NF-κB liberado se transloca al núcleo y transcribe los genes responsivos a la secuencia KB del DNA.

Los niveles de sobreexpresión de p50 y p52 son observados en células transformadas de colon, mama, cerebro, próstata y hueso; esta inapropiada expresión en los tumores contribuye al proceso de malignidad al formar heterodímeros con otros miembros de la familia de NF-κB.

Proteína IκB

(Inhibidor del factor de transcripción NF-κB)

La actividad de los dímeros de NF-κB es regulada por la familia de proteínas IκB la cual está conformada por cinco miembros: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, Bcl-3 (Fig 3), los cuatro primeros inhiben principalmente a los dímeros formados por el grupo I de la familia de NF-κB, mientras que Bcl-3 se une principalmente a los homodímeros del grupo II de la misma familia.

Los miembros de la familia de proteínas IκB contienen un dominio de 6 a 7 repeticiones de ankirina (ARDs), éstas son identificadas como repeticiones de 33 aminoácidos y actúan como elemento de interacción para la asociación específica con otras proteínas (Ghosh *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002; Jacobs M *et al.*, 1998). Todas las proteínas pertenecientes a la familia de las IκBs presentan una actividad inhibitoria de NF-κB del grupo I, por unión a la Señal de Localización Nuclear (SLN) ubicada en el C-terminal, al final del dominio de homología Rel (RHD). La asociación inhibe directamente la unión de NF-κB con el sitio consenso κB del DNA.

Varias señales fisiológicas y de desarrollo promueven la traslocación nuclear de la proteína NF-κB por remoción del inhibidor IκB α, β y/o ε. La IκB mejor caracterizada es IκB α, la cual es una proteína citosólica compuesta de 3 regiones: la N-terminal que regula la degradación dependiente de señal, un dominio repetido de ankirina y un C-terminal que contienen una secuencia PEST también reguladora para degradación la cual se encuentra unida al factor de transcripción NF-κB confiriendo el efecto inhibitorio. En respuesta a estímulos como citocinas, productos bacterianos (LPS) y/o virales, la proteína IκB-α es fosforilada por cinasas específicas en 2 sitios del extremo N-terminal (ser32, ser36). Una vez fosforilada, ésta se ubiquitina y la degradación es mediada por el proteasoma. Una vez removido el IκBα de la SLN, NF-κB es traslocado al núcleo ejerciendo su actividad transcripcional (Jacobs M *et al.*, 1998; Inoue J *et al.*, 1993).

Un miembro inusual de la familia IκB es la proteína Bcl-3, que contrario a los otros miembros de su familia, activa la transcripción de genes.

Las proteínas I κ B controlan la actividad de NF- κ B por dos vías: la primera muestra que I κ B puede secuestrar a NF- κ B en el citoplasma por bloqueo de la secuencia de localización nuclear inhibiendo así la secuencia consenso de unión al DNA. La familia I κ B contiene un dominio de repeticiones de ankirina (ARD's) que es suficiente para asociarse a NF- κ B y el cual se une al sitio de homología Rel de las I κ B's y a su vez al DNA.

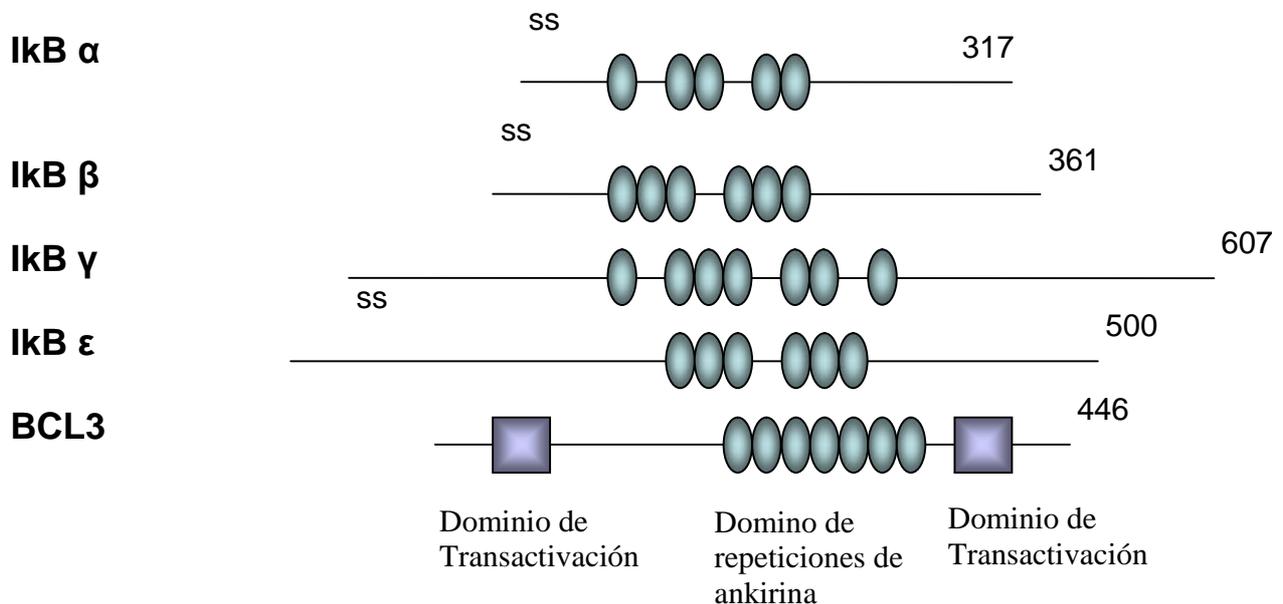


Fig 3. Familia I κ B

Miembros de la familia I κ B. Los Inhibidores de la familia NF- κ B (I κ B) presentan un dominio repetido de ankirina (ARD's) las cuales permiten la unión con miembros de la familia NF- κ B manteniéndolos secuestrados en el citosol e inhibiendo su actividad transcripcional. Bcl3 es el único miembro de I κ B que posee dos dominios transactivacionales (TAD), confiriendo así actividad transcripcional.

Proteína Bcl-3

Bcl-3 es un miembro de la familia de I κ B, originalmente aislado y descrito por Mc Keithan y Ohno como el producto del protooncogen *bcl-3*, el cual está sobreexpresado en varios casos de leucemia linfocítica crónica de células B, como consecuencia de la translocación cromosomal en el locus t(14:19) (q32.3;q13.1). La traslocación ocurre en la región α constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina H (Ohno H *et al.*, 1992; McKeithan T *et al.*, 1994).

La proteína Bcl-3 se expresa en diferentes órganos y tejidos tales como corazón, músculo esquelético, precursores eritroides, bazo, hígado, riñón, cerebro y pulmón. Se han creado ratones deficientes de Bcl-3 (knock-out), que demuestran la importancia de esta proteína en diversos procesos celulares. Esta proteína es requerida por células T y su ausencia se asocia con la deficiente producción de anticuerpos antígeno-específicos.

Bcl-3 también contribuye a la sobrevivencia de células B lo cual puede explicar el potencial oncogénico cuando ésta se expresa en altos niveles, como resultado de la translocación cromosomal. Se ha propuesto que la sobreexpresión de Bcl-3 contribuye al desarrollo de la leucemia linfocítica crónica y en la desregulación de genes involucrados en la proliferación y la diferenciación celular (Dechend R *et al.*, 1999; Franzoso G *et al.*, 1998). Bcl-3 es una proteína que contiene 7 copias en tandem de ankirina, un tamaño de 446 aminoácidos y un peso de 46.8 KDa.

El análisis de la proteína Bcl-3 revela 2 dominios con propiedades transactivacionales. La región N-terminal con 112 aa es rica en prolina (25%) y la región C-terminal con 90 aa es rica en serina y prolina (23% y 28% respectivamente) siendo así regiones altamente fosforiladas (Ohno H *et al.*, 1990). Tanto el amino terminal como el carboxilo terminal son requeridos para la actividad transcripcional. (Fig 4)

El mecanismo de Bcl-3 es complicado ya que la actividad de unión a p50 / p52 es dependiente del estado de fosforilación y concentración (Schmitz M *et al.*, 2001; Bours V *et al.*, 1993; Bundy I *et al.*, 1997).

Se ha descrito que Bcl-3 puede disociar a los homodímeros p50 de la unión al DNA en sitios represores (Dechend R *et al.*, 1999). Bcl-3 se localiza principalmente en el núcleo de muchos tipos celulares aunque también se le ha localizado en citosol.

Bcl3 es una proteína nuclear que se asocia a los miembros homodiméricos de NF-kB (p50 y p52). P50 y p52 son proteínas procesadas a partir de los precursores p105 y p100, los cuales sufren procesamiento proteolítico en la región C-terminal. Una vez procesada esta región por el proteosoma pueden unirse al DNA y funcionar como represores transcripcionales. Bcl3 puede remover a los heterodímeros de los sitios kB y unirse a secuencia homodiméricas para transactivar; de esta forma Bcl3 posee una función dual: una como represor y otra como transactivador (Brasier A *et al.*, 2001).

Asociación de Bcl-3 con homodímeros p50 y p52

Se ha demostrado la asociación de Bcl-3 con p50 y que la secuencia de localización nuclear de p50 es requerida para esta unión, manteniendo retenida a la proteína en el citoplasma. Los homodímeros de p50 no presentan actividad transcripcional pero sí poseen dominio de unión al DNA mediado por la secuencia kb, manteniendo el sitio sin actividad transcripcional. Se ha observado que Bcl3 puede promover la actividad transcripcional por poseer dos dominios de transactivación uno en cada extremo de la proteína, los cuales son responsables de conferir esta actividad a proteínas homodiméricas (p50-p50, p52-p52) y permitir la unión al DNA (Franzoso G *et al.*, 1993; Inoue J *et al.*, 1993).

Está demostrado que la actividad de Bcl3 es dependiente de su concentración en la célula así como del grado de fosforilación (Schmitz M *et al.*, 2001).

Bcl3 y correguladores transcripcionales

Las interacciones específicas con los homodímeros de p50 y p52 alteran la actividad de unión al DNA modulando la expresión de genes. La formación de Bcl-3/p50 puede ser inducida por TNF α , IL-1 β y PMA (Cressman E *et al.*, 1993; Heissmeyer V *et al.*, 1999).

Asimismo, Bcl-3 puede actuar como un adaptador entre NF- κ B p50/p52 y otros reguladores transcripcionales. Bcl-3 interactúa con proteínas nucleares como Jab-1, Tip-60, Bard-1 y Pirin, las cuales se unen a factores de transcripción que incluyen a c-Jun, c-Fos, NF1, HIV-1 Tat y Pol II. El complejo Bcl-3/p50 junto con Bard-1, Tip-60 y Pirin son secuestrados como complejos cuaternarios uniéndose al sitio κ B del DNA, también se ha reportado que la proteína Jab-1 incrementa la formación del complejo Bcl-3/p50 al sitio κ B del DNA (Li Q *et al.*, 2002; Dechend R *et al.*, 1999).

Bcl-3 se asocia directamente con AP-1, CREB/p300 y SRC favoreciendo la actividad mitogénica del factor AP-1 *in vivo*. Se ha clonado el promotor de Bcl-3 y la secuencia no muestra la existencia de caja TATA pero revela sitios de unión para AP-1, AP-1 like y SP-1 (Na Y *et al.*, 1999; Hirano F *et al.*, 1998; Rebollo A *et al.*, 2000).

Bcl-3 es transcripcionalmente sobrerregulado en células T por IL-9 e IL-4 por la vía JAK/STAT y AP-1. Se ha mostrado que la expresión de Bcl-3 se induce por estímulos mitogénicos en células B y T. Por ejemplo, en la inducción de Bcl-3 por el factor estimulante de colonias de macrófagos-monocitos (GM-CSF) y eritropoyetina (EPO), que están involucrados en la proliferación de precursores eritroides (Rebollo A *et al.*, 2000; Zhang Y *et al.*, 1998).

En células epiteliales de mama MCF-7 la proteína ciclina D1 se haya altamente expresada, Bcl-3 actúa como un cofactor con p52 uniéndose al promotor del gen de la ciclina D1 activando su transcripción y estimulando la transición de la fase G1 del ciclo celular (Westerheide S *et al.*, 2001).

Un dato sumamente interesante es que a Bcl-3 se le ha propuesto como una proteína que responde al daño al DNA (Na Y *et al.*, 1990).

Bcl3 y su participación en el daño al DNA

Muchos de los cánceres son producto de defectos en la respuesta al daño al DNA, un estudio de respuesta al daño al DNA en *C. elegans* muestra la relación de ORF implicado en el check point cuando hay daño al DNA, codificando un bcl3 ortólogo humano, el cual interactúa principalmente con la proteína MRT2. Este es el primer hallazgo donde se asocia a esta proteína con la respuesta al daño al DNA (Boukton S *et al.*, 2002).

Bcl3 es requerido para mantener la integridad del check point, un defecto en esta proteína podría poner en peligro la integridad de la célula, de esta forma se puede asociar el efecto de Bcl3 en la traslocación y amplificación en la leucemia linfocítica crónica (LLC) (Franzoso G *et al.*, 1998).

Ratones con disrupción en Bcl3 presentan una variedad de defectos inmunológicos, incluyendo anormalidad en los centros germinales, reducción en la formación de anticuerpos dependientes de células T y falla en el reconocimiento de patógenos sin mencionar falla en la arquitectura linfoide.

Niveles incrementados de Bcl3 son observados el LLC presentando un papel directo en la tumorigénesis, se ha demostrado que la sola expresión de Bcl3 promueve la transformación de fibroblastos NIH3T3.

Bcl3 en complejo con p52 promueve la transcripción de genes reguladores del ciclo celular como la ciclina D1, y proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl2 reafirmando así su papel oncogénico.

La ciclina D1 también es conocida como el oncogén Bcl1 el cual está asociado a la traslocación t(11;14) (q13;q32) en linfomas de células B. El gen de la ciclina D1 se encuentra amplificado en cáncer de mama, esófago, pulmón y carcinomas escamosos. Otro gen frecuentemente mutado en cáncer humano es p53, un papel importante de p53 es el de resguardar la integridad genómica durante el ciclo celular, la estabilización de p53 en respuesta al daño al DNA resulta en el arresto

en la fase G1 o G2 del ciclo y permitir la reparación del daño. En células que pierden la capacidad de responder al daño por fallas en p53 se genera inestabilidad genómica, esto favorece el incremento de mutaciones y alteraciones en los cromosomas (Johnson D *et al.*, 1999; Nelsen J *et al.*, 2005).

La actividad de p53 es regulada por su inhibidor Hdm2 quien la mantiene secuestrada en el citoplasma. Cuando existe un estímulo de daño al DNA, Hdm2 es degradada y una vez liberado p53 éste ejerce su actividad. Se sabe que el promotor del gen Hdm2 posee un sitio kB que está íntimamente relacionado con la actividad de Bcl3 (Westerheide S *et al.*, 2001)

Kashatu *et al.* Han estudiado la relación de Bcl3 y su participación en la respuesta al daño al DNA y han reportado que el incremento de la expresión de Bcl3 en células MCF7 induce una fuerte inhibición de muerte inducida por daño al DNA. Fibroblastos nulos de Bcl3 demuestran que Bcl3 es requerido para inducir la expresión de Hdm2 y limitar la actividad de p53 (Watanabe N *et al.*, 1994).

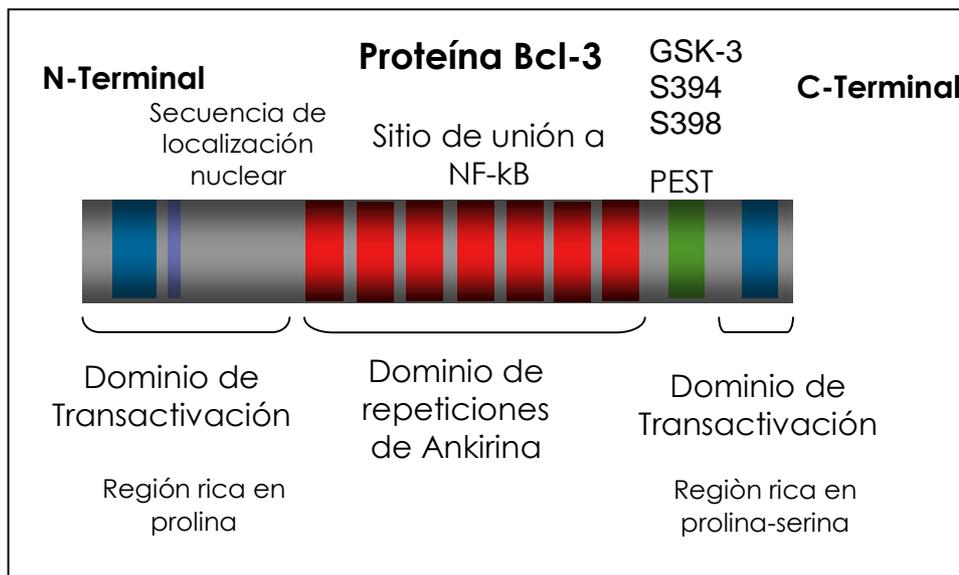


Fig 4. Estructura de la proteína Bcl-3.

Bcl-3 es una proteína de 446 aminoácidos que presenta dos dominios de transactivación en cada uno de los extremos, en la parte central contiene un dominio con 7 repeticiones de ankirina el cual es esencial para la interacción con p50 o p52, en el C-terminal posee dos serinas que son fosforiladas por la kinasa GSK-3, esta misma región presenta una secuencia PEST la cual es altamente fosforilada y confiere el tiempo de vida para la proteína, en la región N-terminal se encuentra el sitio de localización nuclear.

HIPÓTESIS

La desregulación de la expresión de Bcl-3 modificará eventos celulares como la proliferación y/o apoptosis en la línea celular HeLa.

OBJETIVO GENERAL

1. Analizar si la expresión diferencial de Bcl-3 repercute en el comportamiento celular asociado al cáncer.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar si la expresión diferencial de los niveles de Bcl-3 afectan la capacidad de proliferación, sensibilidad apoptótica y capacidad clonogénica en la línea celular HeLa.
2. Determinar la participación de Bcl-3 en procesos que involucran la respuesta al daño al DNA.

JUSTIFICACIÓN

La familia I κ B es un grupo de proteínas que inhiben la actividad transcripcional de la familia NF- κ B responsable de la transcripción de genes involucrados en los eventos de proliferación, apoptosis y respuesta inmune. La proteína Bcl3 es un miembro de la familia I κ B y comparten gran homología estructural pero a diferencia de los demás miembros de I κ B, Bcl3 posee una actividad atípica promoviendo actividad transcripcional por poseer dos dominios transactivacionales (Hitoshi O *et al.*, 1990; Kerr L *et al.*, 1992).

Se ha reportado que Bcl3 favorece la transcripción de la ciclina D1 promoviendo la proliferación celular, también se ha reportado a Bcl-3 como una proteína involucrada en el daño al DNA pero no se ha demostrado su participación en estos eventos, es por ello que creemos que es de interés conocer si Bcl3 puede estar asociado a eventos como la sensibilidad apoptótica y respuesta al daño al DNA (Westerheide S *et al.*, 2001).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTABLECIMIENTO DE CÉLULAS HeLa CON DESRREGULACIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-3

1.1 Cultivos celulares

La línea celular HeLa y MCF7 se adquirieron del American Type Culture Collection (ATCC), la línea celular HEK293 y PT67 son obtenidas de BD Bioscience, Clontech.

Todas las líneas celulares se mantuvieron para su crecimiento en medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (GIBCO) al 8% en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a una temperatura constante de 37°C.

1.2 Construcción de un RNAi dirigido contra Bcl-3

Para generar la línea celular HeLa deficiente de Bcl-3 (**Hela RNAi Bcl3**), utilizamos el sistema retoviral AmphoPack™ -293 cell line (Clontech) en el cual transfectamos células empaquetadoras HEK293 con el vector pSIREN (Clontech) el cual contiene la secuencia para producir un RNA de doble cadena de 23 pares de bases y esta dirigido contra el mensajero de bcl-3, (5...gatccGCACCGAGTGCCAAGAAACCTTCAAGAGAGGTTTCTTGGCACTCGGTGTTTTTGGT AGCg...3, 5...aattcGCTAGCAAAAAACACCGAGTGCCAAGAAACCTCTCTTGAAGTTTCTTGG CACTCGGTGCg...3) una vez transfectadas las células empaquetadoras HEK 293 fueron seleccionadas durante 4 semanas con 400 ug/ml de G418. 10x10⁶ células HeLa fueron infectadas con medio condicionado de HEK293 el cual contiene las partículas virales y fueron previamente tituladas, 48 hr después de la infección las células fueron seleccionadas con 3 ug/ml de puomicina. Las células Hela

deficientes de Bcl3 (HeLa RNAi Bcl-3) fueron propagadas para los posteriores ensayos y otras alicuotadas para resguardo en nitrógeno líquido. Como control del sistema de expresión del RNA de interferencia, fueron transformadas células HeK293 con un vector pSIRENT-RetroQ-ZsGreen y el cual fue utilizado para infectar células HeLa y obtener las células HeLa Mock las cuales fueron utilizadas en ensayos posteriores.

1.3 Construcción del sistema de sobreexpresión para la proteína Bcl-3

Para generar la línea celular HeLa que sobreexpresa la proteína Bcl-3 (**HeLa Bcl3 sentido**) utilizamos el sistema retroviral RetroPack™ PT67 Cell Line (Clontech), en el cual transfectamos células empaquetadoras PT67 con el vector pLXSN (Clontech) el cual contiene la secuencia del mensajero de bcl3, los extremos 5' y 3' de bcl3 fueron flanqueados con los sitios para las enzimas de restricción *Eco* RI y Bam H1 respectivamente. Una vez obtenida esta secuencia fue insertada en el vector viral pLXSN (Clontech) en los sitios de clonación *Eco* RI y BamH1. La secuencia resultante fue transfectada en células empaquetadoras PT67 (BD Bioscience, Clontech). Las células empaquetadoras PT67 con capacidad de formar partículas virales e infectar células de mamífero fueron propagadas durante 48 hr, el medio fue colectado, titulado y utilizado para infectar 10×10^6 células HeLa, 24 hr después de la infección, las células HeLa fueron seleccionadas con neomicina (2.5 ug/ml) durante 1 semana para obtener cultivos estables que sobreexpresen Bcl-3 (HeLa Bcl-3 Sentido).

1.4 Transfección celular estable

Todas las células (HEK293, PT67 y HeLa) fueron transfectadas con (1 µg) del vector correspondiente adicionando 6 µl de lipofectamina (Life Technologies, GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD), resuspendido en 800 µl de medio libre de suero en un pozo de 6 mm de diámetro. 24 hr posttransfección se realizó el cambio de medio, por medio fresco D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y

48 hr postransfección se seleccionaron las células con una concentración inicial de 400 ug/ml de G418 o 3 µg/ml de puromicina respectivamente.

1.5 Análisis por Western Blot

Los cultivos celulares fueron separados mecánicamente mediante varios pases a través de una jeringa de insulina, el lisado de las células se realizó en buffer Laemmli (0.2 mL SDS (pH 8.5), 22g Tris Base, 12 g ácido bórico y agua destilada) con inhibidor de proteasas. Los extractos de proteína fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) en concentraciones estandarizadas de 50 ug, la transferencia de las proteínas se realizó en una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia, UK), la cual fue bloqueada con 5% leche descremada en TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl), e incubada con el anticuerpo primario contra Bcl-3 (Santa Cruz Technology), en TBS-0.5% con leche descremada. La membrana se lavó con TBS y fue posteriormente incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa el cual se visualizó con un agente quimioluminiscente, posteriormente la membrana se expuso a una placa radiográfica.

Se determinó la expresión de proteínas involucradas en el ciclo celular así como de proteínas que responden al daño al DNA realizando el procedimiento anteriormente descrito, los anticuerpos utilizados para este fin fueron: Cdk1, p-Cdk1, Ciclina B, CHK1, p-CHK1, ATM, p-ATM, γ-H2AX y nucleolina, todos ellos fueron obtenidos de Santa Cruz Technology.

Diferentes anticuerpos fueron utilizados realizando el protocolo ya descrito.

1.6 Análisis de la expresión de bcl-3 en HeLa por RT-PCR

La extracción del RNA se realizó con la técnica de TRIzol (Invitrogen), células HeLa RNAi Bcl-3, HeLa Mock y HeLa Bcl-3 sentido son cultivadas a una confluencia de 1×10^6 , 24 hr después se colectaron y trataron de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. El RNA es cuantificado y analizada su

integridad en geles de agarosa desnaturalizante, este fue utilizado para sintetizar cDNA mediante la técnica RT (reverso transcriptasa), la amplificación del mensajero de bcl-3 se realizó con oligonucleótidos específicos, (Sentido 5'CCCCTATACCCCATGATGTGC3', Antisentido 5' ATAATTGCGGGCCTCCAGGTC3', como control de carga se amplificó GAPDH (Sentido 5'CCCCTTCATTGACCTCAACT3', Antisentido 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC3'). Los productos de PCR se analizaron en fase logarítmica en geles de agarosa.

2. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS HeLa CON Bcl-3 DESREGULADO

2.1 Morfología celular de HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados

Células HeLa Mock, Hela RNAi Bcl-3 y Hela Sentido fueron sembradas al 50% de confluencia con medio D-MEM enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 8%, 24 hr después se observaron al microscopio Carl zeiss, se toman fotografías con cámara digital (Nikon 4500) al 10X y 40X de aumento.

2.2 Tinciones específicas

2.2.1 Tinción con Bromuro de etidio

Se realizó tinción nuclear por incorporación de bromuro de etidio para determinar la morfología nuclear. Cultivos celulares fueron fijados con alcohol frío al 70%, una vez fijado el cultivo se realizó un pretratamiento con RNAsa 20 ug/ml por 60 min. Pasado este tiempo se incubó con Bromuro de etidio a una concentración de 5 ul/ml en PBS, posteriormente se realizaron lavados con PBS 1X para retirar el exceso de bromuro, las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia Carl Ziess, las fotografías tomadas fueron con una cámara digital Nikon 4500.

2.2.2 Inmunofluorescencia en células HeLa RNAi Bcl-3

Para determinar la localización celular de Bcl3 así como su grado de expresión, cultivos celulares de HeLa RNAi Bcl3 y HeLa Mock fueron sembrados a 30% de confluencia en laminillas para inmunofluorescencia, 48 hr después, las células fueron fijadas con etanol frío al 70% e incubados a 37°C durante 90 min en cámara húmeda con el anticuerpo primario dirigido contra Bcl-3 (Santa Cruz), pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo, a continuación se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón (Cell Signalling) a una dilución 1:1000 durante 90 min en cámara húmeda y en oscuridad, pasado el tiempo se realizó tres lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se montó y fijó la laminilla con glicerol/PBS 1X. Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, las fotografías tomadas fueron realizadas con una cámara digital Nikon 4500.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA SENSIBILIDAD APOPTÓTICA

3.1 Ensayo de proliferación

Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron cultivadas a una confluencia del 10% en cajas de 100 mm, las condiciones de cultivo se mantuvieron como se describió anteriormente. Tres tiempos fueron establecidos, 1, 10 y 16 días, pasado estos periodos, las células fueron fijadas con alcohol frío al 70% y teñidas con cristal violeta, se realizan varios lavados para quitar el exceso de tinción, una vez secas, las células se destiñen con ácido acético glacial, las lecturas para determinar el índice de proliferación fueron determinadas mediante un lector de ELISA, la lectura se realizó a 570 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

3.2 Ensayo de sensibilidad apoptótica

Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron cultivadas a una confluencia del 80%, 24 hrs después se realizó cambio de medio y se adicionaron Cisplatino (fármaco utilizado en la terapia contra el cáncer) y TNF α , las células fueron expuestas a dosis (DL50) obtenidas anteriormente e inducidas a apoptosis mediante la exposición a estos compuestos.

Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron radiadas con luz UV durante 45 seg, los cultivos fueron incubados 24 hr más y posteriormente se fijaron con alcohol 70%, se tiñeron con cristal violeta y se cuantificaron las células como ya se ha descrito. Los valores de viabilidad fueron expresados en porcentaje.

3.3 Ensayo de clonogenicidad

Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron incubadas a una densidad celular de 2.5×10^3 en cajas de 100 mm y mantenidas en las condiciones ya descritas. 16 días después las células fueron fijadas con alcohol frío al 70% y teñidas con cristal violeta, se realizan varios lavados para quitar el exceso de tinción, una vez secas, las células se destiñen con ácido acético glacial, las lecturas para determinar el índice de proliferación fueron determinadas mediante un lector de ELISA, la lectura se realizó a 570 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4 Caracterización de las fases del ciclo celular mediante ensayos citométricos

Se determinó si la inhibición de Bcl-3 modifica las fases del ciclo celular. Todos los ensayos citométricos se realizaron en el Facs Aria (BD- Biosciences).

1×10^6 Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron fijadas con etanol al 80% e incubadas a -20°C toda la noche, las células fueron lavadas e incubadas con Ioduro de propidio por 20 min. Posteriormente se leyó la muestra en el citómetro de flujo y los resultados se analizaron con el programa del citómetro (CellQuest).

3.5 TUNEL

El índice de núcleos apoptóticos se determinó por el método de marcaje in situ del DNA fragmentado (TUNEL, TdT), que tiene su fundamento en la detección del DNA internucleosomal fragmentado, fenotipo presente en la apoptosis. Los extremos 3-OH libres son generados por la fragmentación del DNA, es aquí donde son incorporados nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción de la enzima transferasa terminal (TdT).

Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron montadas en laminillas y cultivadas como se ha descrito, las células fueron radiadas con luz UV durante 45 seg., los cultivos fueron incubados 24 hr Posteriormente las células son incubadas con buffer TdT (200mM ácido cacodílico, 200 mM KCl, 25 mM Trizma base, pH 6.6) al que se le añadió 1.25 mg/ml de albumina sérica bovina y cloruro de cobalto a una concentración final de 1 mM. El dUTP biotinilado fue diluido en el buffer TdT (10 nmol/ml), la incubación se realizó en cámara húmeda durante 90 min a 37°C. La reacción se detuvo con buffer TB (300 mM NaCl, 30 mM citrato de sódico). Para bloquear la uniones inespecíficas del complejo éste se incubó con albúmina sérica bovina al 2%, el complejo avidina-biotina-peroxidasa fue adicionado e incubado en cámara húmeda a 37°C. El revelado se realizó con diaminobencidina 0.05% y H₂O₂ 0.05% en PBS. Las laminillas montadas con las células fueron observadas al microscopio calculando el índice apoptótico contando los núcleos positivos sobre el número de células totales.

4. Bcl-3 EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

4.1 Formación del huso mitótico en células HeLa con los niveles de Bcl-3 desregulados y arrestados con nocodazol

Células HeLa mock, HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Sentido fueron sembradas en laminillas para inmunofluorescencia al 50% de confluencia con medio D-MEM suplementado con 8% de SFB, 24 hr después se cambió el medio por medio

fresco sin SFB y se adicionó nocodazol a una concentración de 10 ug/mL, se incubó por 24 hr y después del tiempo de incubación fueron fijadas con alcohol al 70%, una vez fijas se realizó una tinción inmunofluorescente dirigida hacia el huso mitótico mediante la utilización de un anticuerpo dirigido contra γ - tubulina (Santa Cruz Technology), las células fueron bloqueadas con 100ul de PBS 1X/ suero 3%, e incubadas a 37°C durante 15 min en cámara húmeda asegurándose de cubrir perfectamente toda la superficie, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X, a continuación se adicionó el anticuerpo γ tubulina a una dilución 1: 2500 en PBS 1X incubándolo en cámara húmeda nuevamente durante 90 min, pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo, a continuación se montó y fijó la laminilla con glicerol/PBS 1X. Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, las fotografías tomadas fueron realizadas con una cámara digital Nikon 4500.

4.2 Determinación de aploidía en células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados

Células HeLa mock, HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Sentido fueron sembradas al 50% de confluencia con medio D-MEM suplementado con 8% de SFB, 24 hr después se cambió el medio por medio fresco sin SFB y se adicionó colcemida a una concentración final de 10 ug/mL, se incubó por 24 hr y posteriormente se fijaron con alcohol al 70%, después del tiempo de fijación se tiñeron con azul de toluidina que tiñe el material génico condensado, la muestra fue fijada por goteo en portaobjetos y se observó en un microscopio confocal donde se determinó el número de cromosomas presentes en cada célula, la cuantificación se realizó de forma manual y se determinó la frecuencia de cromosomas para cada una de las líneas celulares.

4.3 Inhibición del arresto celular por colcemida en células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados

Células HeLa mock, HeLa RNAi Bcl-3 son sembradas al 50% de confluencia con medio D-MEM suplementado con 8% de SFB, 24 hr después se cambió el medio por medio fresco sin SFB y se adiciona colcemida a una concentración final de 10 ug/mL, se incubó por 24 hr y posteriormente se determinó el número de células que no entraron al arresto celular por acción de la colcemida, la determinación se realizó contando un total de 100 células y diferenciando el número de eventos mitóticos presentes en la población analizada contra aquellas que no están en fase mitótica.

RESULTADOS

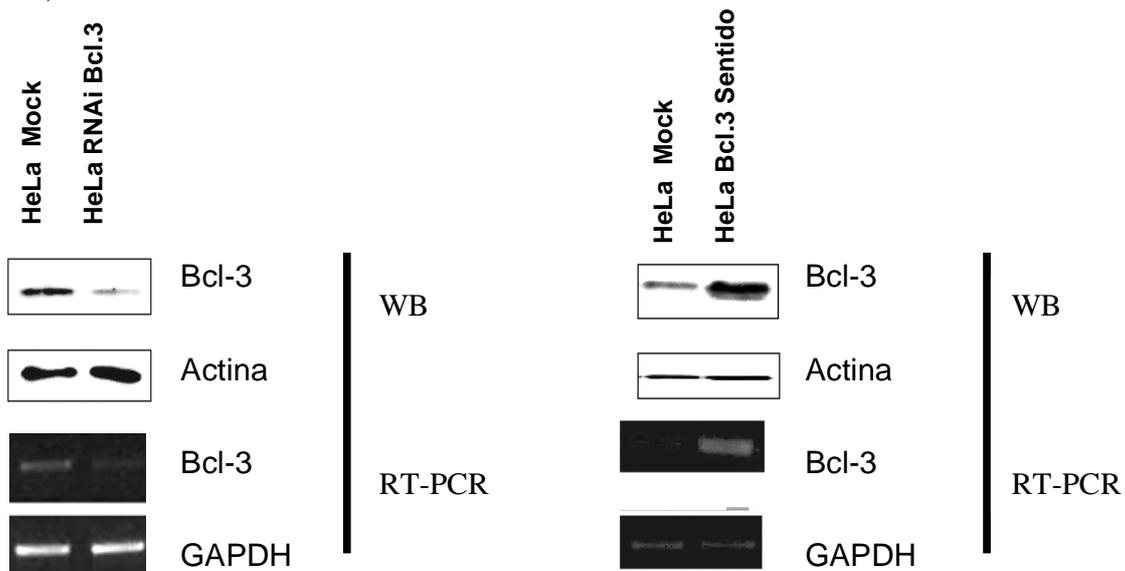
1. ESTABLECIMIENTO DE CÉLULAS HeLa CON Bcl-3 DESREGULADO

Una vez establecida la línea celular HeLa RNAi Bcl-3 se analizó la inhibición de la expresión de la proteína Bcl-3 mediante Western blot y del mensajero por RT-PCR. Los resultados muestran que la inhibición de Bcl-3 por el RNAi disminuyó en un 90% la expresión tanto del mensajero como de la proteína, esto se determinó por análisis densitométrico (Fig 5A).

Para obtener la sobreexpresión de Bcl-3 se realizó una construcción la cual contiene la secuencia de Bcl-3, esta fue insertada en el plásmido pLXSN y esta nueva construcción se utilizó para transfectar células empaquetadoras que producen partículas virales las cuales fueron utilizadas para infectar a células HeLa, una vez establecida esta línea con la sobreexpresión de Bcl-3 se comprobó la sobreexpresión de la proteína Bcl-3 mediante Western blot y del mensajero por RT-PCR.

Los resultados muestran que la sobreexpresión de Bcl-3 por el sistema retroviral incrementó en un 120 % la expresión tanto del mensajero como de la proteína, esto se determinó por análisis densitométrico (Fig 5B).

A)



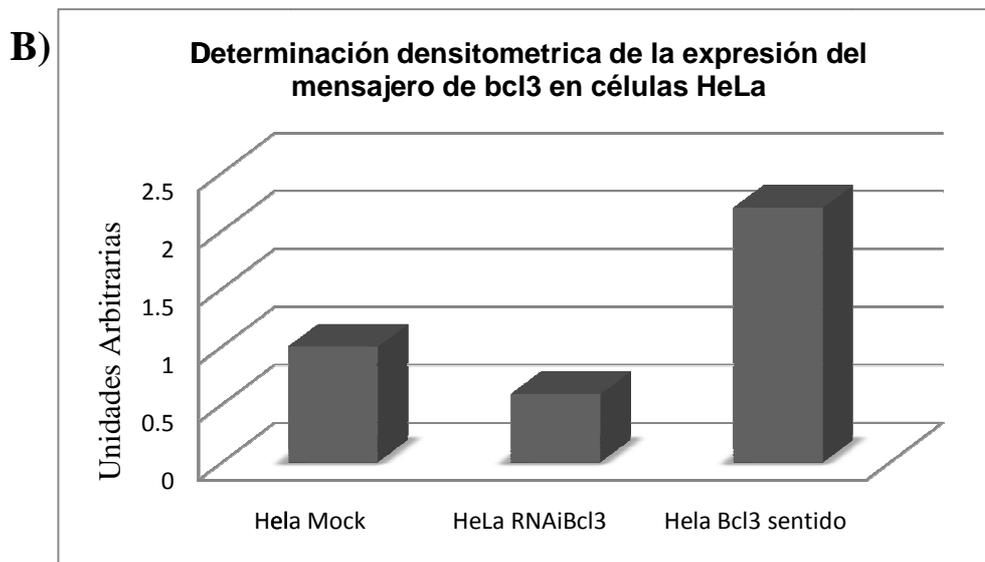


Fig. 5 Expresión de la proteína Bcl-3 en la línea celular HeLa RNAi y HeLa Sentido

A) La expresión de la proteína Bcl-3 en la línea HeLa se ve disminuida por efecto del RNA de interferencia, esto se comprueba por Western blot y la expresión del mensajero de bcl3 por RT-PCR. La sobreexpresión de la proteína Bcl3 como del mensajero fue comprobada por western blot y por RT-PCR respectivamente.

B) Se determinó cuantas veces se incremento o disminuyó la expresión del mensajero de bcl3 mediante análisis densitométrico, la expresión del mensajero en las HeLa RNAi disminuyó 0.5 veces con respecto a las HeLa Mock y en el caso de las HeLa Sentido incrementó dos veces con respecto al HeLa Mock.

2. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS HeLa CON Bcl-3 DESREGULADO

Una vez establecidas las líneas celulares HeLa con la regulación diferencial de Bcl-3 tanto sobreexpresión como de inhibición, estas fueron propagadas. Presentó cambios en su morfología, esto se observa en la línea HeLa RNAi Bcl-3 mostrando un incremento en el número de núcleos (multinucleación) así como en el tamaño y en su velocidad de duplicación la cual se vio disminuida; en cambio las células que sobreexpresan Bcl-3 son mononucleares, con morfología y velocidad de duplicación igual a las HeLa Mock (Control), estas observaciones inicialmente fueron realizadas por microscopía de luz visible (Fig 6).

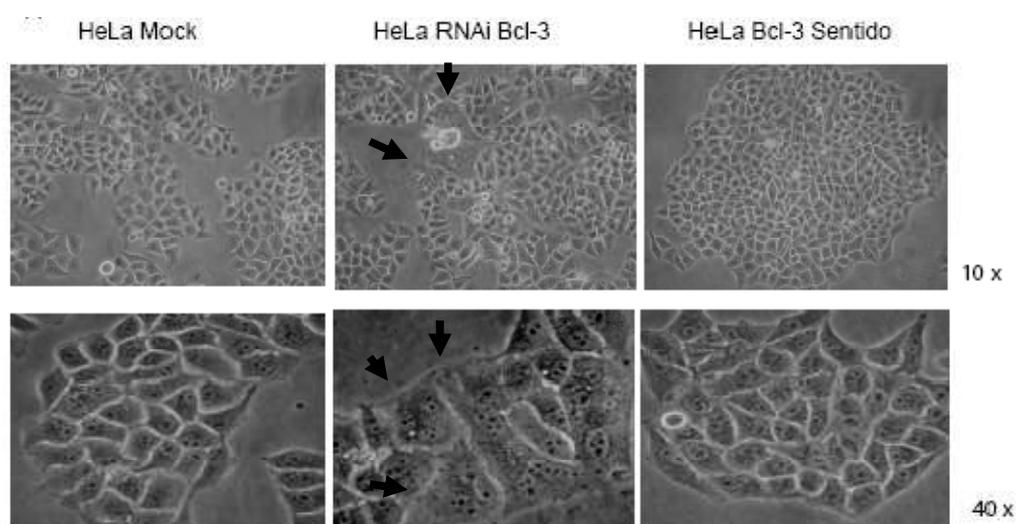


Fig 6. Presencia de micronúcleos cuando se disminuye Bcl-3

Observación de cambios morfológicos. Células HeLa RNAi Bcl-3 presentan un dramático cambio morfológico presentando aumento en el tamaño e incremento en el número de núcleos, en el caso de las células HeLa Bcl-3 Sentido y HeLa Mock presentan una morfología mononuclear. Las flechas indican células con presencia de más de un núcleo.

Para corroborar el aumento de núcleos por célula se realizó una tinción con bromuro de etidio, este compuesto se intercala en el DNA y puede ser observado mediante microscopía de fluorescencia, los resultados obtenidos mostraron que células con Bcl-3 disminuido incrementaron el número de núcleos por célula y presentan una mayor variabilidad en el tamaño de los núcleos (Fig 7A).

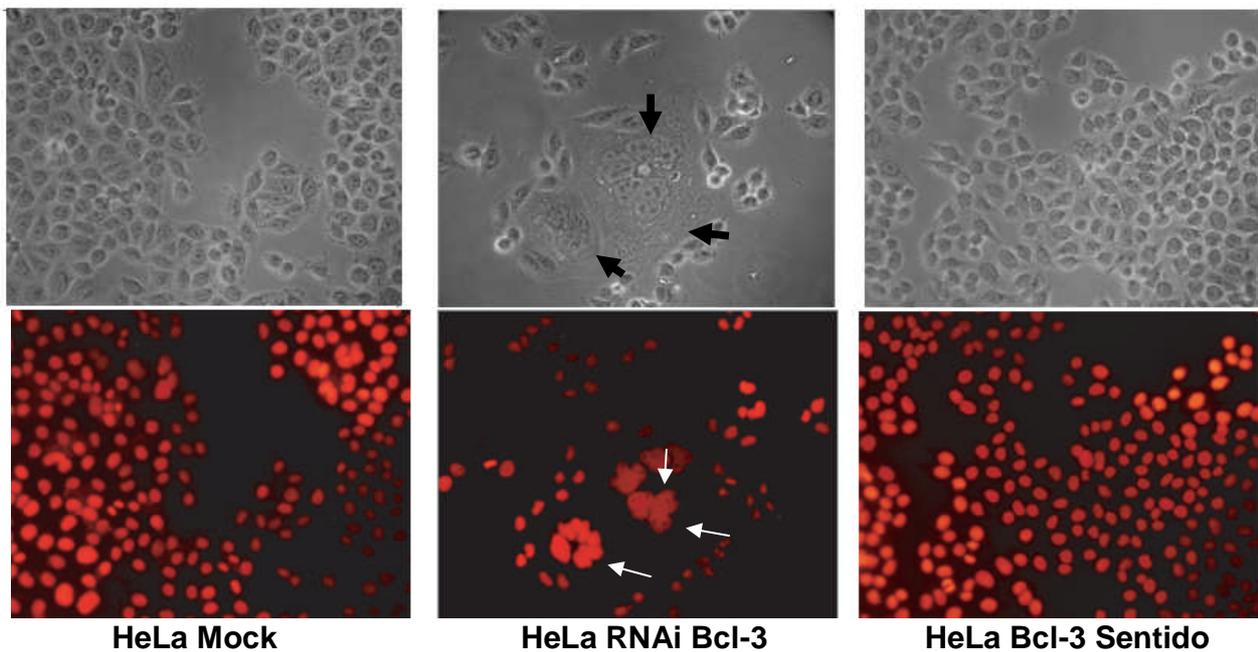
El análisis por densitometría realizado a una población de 1000 células de cada una de las tres líneas celulares establecidas determinó que la variabilidad nuclear de células HeLa RNAi Bcl-3 es significativa (Fig 7B). El fenómeno de aneuploidía puede deberse a que la inhibición de Bcl-3 está favoreciendo la inestabilidad genómica.

Para demostrar que la presencia de multinúcleos en células HeLa no es dependiente de p53 se transformó la línea celular de mama MCF7 con un vector pSIREN que expresa 21 pb de la secuencia de Bcl-3 (MCF7 RNAi Bcl3), como control se usó el vector pSIREN vacío (MCF7 Mock), las células MCF7 RNAi Bcl3 modificaron su morfología, se observaron células de mayor tamaño y con mayor número de núcleos comparadas con células MCF Mock. Este fenotipo es el

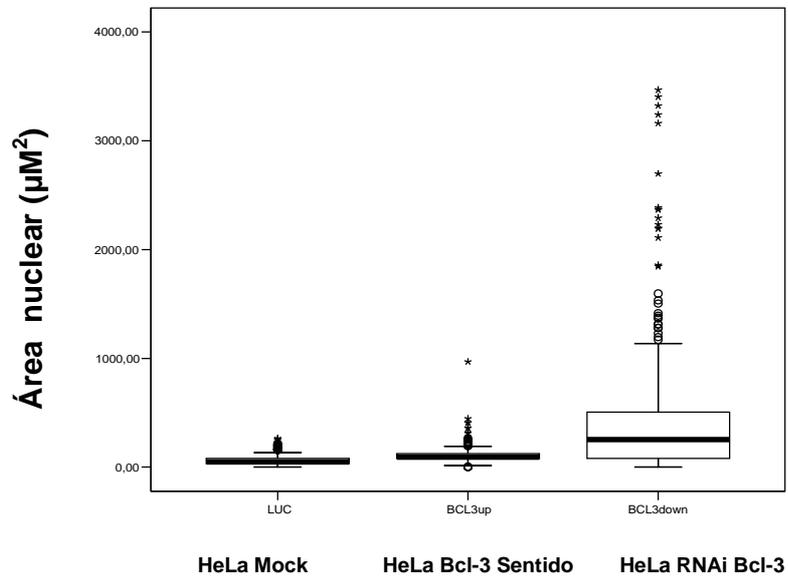
observado en las células HeLa RNAi Bcl-3, al parecer la desregulación negativa de Bcl-3 promueve la multinucleación (7C).

Se realizó otro ensayo para demostrar que la disminución de Bcl3 promueve la formación de células multinucleadas, por lo que células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido que codifica el RNAi de Bcl3 con un marcador de verde fluorescente (pSIREN-Zs Green/Bcl3), también se transfectaron HeLa con el plásmido control pSIREN-ZsGreen el cual produce solo fluorescencia. Las células fueron cultivadas como se ha descrito anteriormente y se analizó la expresión de Bcl3 mediante RT-PCR, la expresión de la proteína verde fluorescente fue realizada mediante la observación en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss. Los resultados obtenidos indican que la inhibición de Bcl3 promueve la formación de células multinucleadas y este fenotipo revierten a medida que se pierde la inhibición de Bcl3 a medida que se realizan los pases.

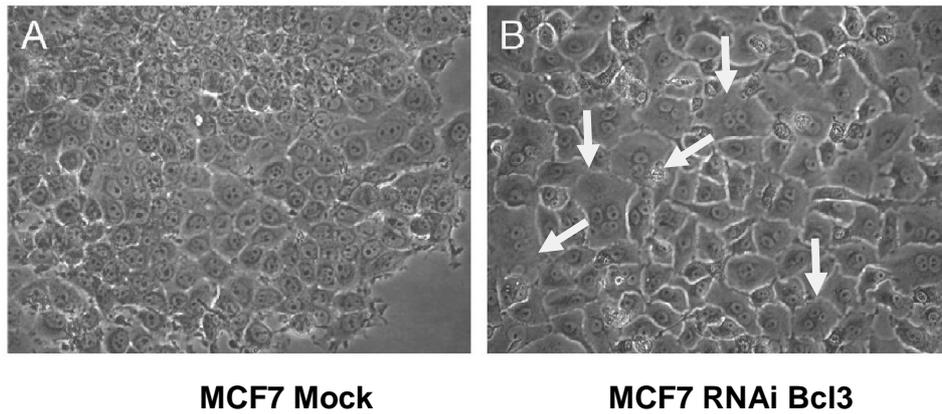
A)



B)



C)



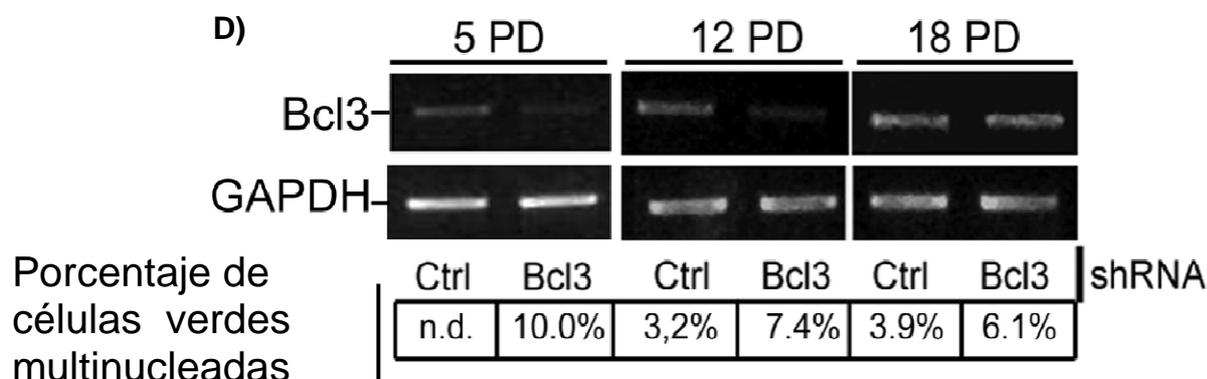


Fig 7. La disminución de Bcl3 modifica el fenotipo celular promoviendo la formación de células multinucleadas.

A) Se analiza la morfología nuclear de células HeLa con expresión de Bcl-3 desregulada mediante tinción con Bromuro de etidio. Se puede observar que células con Bcl-3 disminuido presentan mayor número de núcleos por célula mientras que las células con sobreexpresión de Bcl-3 presenta mononucleos así como las células HeLa Mock. Las flechas indican células multinucleadas. B) El tamaño de los núcleos se representa en esta gráfica, podemos observar que la disminución de Bcl-3 promueve el tamaño nuclear y que la sobreexpresión de Bcl-3 no promueve el incremento del tamaño nuclear. C) Morfología de células MCF7 con disminución en la expresión de Bcl-3 mediante la expresión de un RNA de interferencia (MCF7 RNAi Bcl-3), las flechas muestran células con incremento en el número de núcleos, Como control se transfectó células MCF7 con un RNAi ctl (MCF7 Mock). Las flechas indican células multinucleadas. D) Células HeLa fueron transfectadas con un RNAi dirigido contra Bcl-3, se analizó la expresión de la proteína al transcurso de varios pases celulares observándose una caída de la disminución del expresión a mayor número de pases.

3. ENSAYO DE INMUNOLocalIZACIÓN DE BCL-3 EN CÉLULAS HeLa RNAi Bcl-3

Se ha reportado que la localización celular de Bcl-3 es dependiente de la línea celular /47/, es por ello que decidimos determinar la localización de la proteína Bcl-3 en las células HeLa RNAi Bcl-3. Se realizó inmunolocalización utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la secuencia de la proteína Bcl-3.

La proteína Bcl3 en estas células HeLa RNAi Bcl-3 se localizó en el compartimiento nuclear y con una disminución de la expresión de Bcl-3 con respecto al control. Las células HeLa Mock presentaron la localización de Bcl-3 principalmente en el citosol (Fig 8).

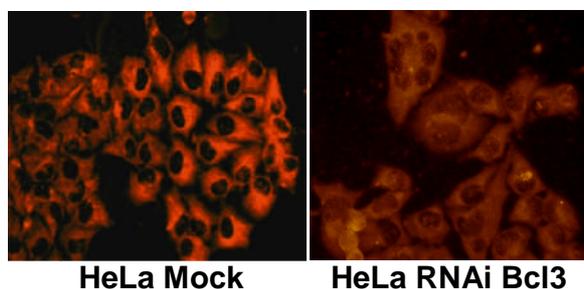


Fig 8. Inmunolocalización de Bcl-3

Se determinó la localización celular de Bcl3 en células HeLa Mock es principalmente citosólica, esto corresponde con reportes previos donde se describe la localización de Bcl3, sin embargo la localización de Bcl3 en las HeLa RNAi Bcl3 sigue siendo presente aunque en menor cantidad y colocaliza también en el núcleo.

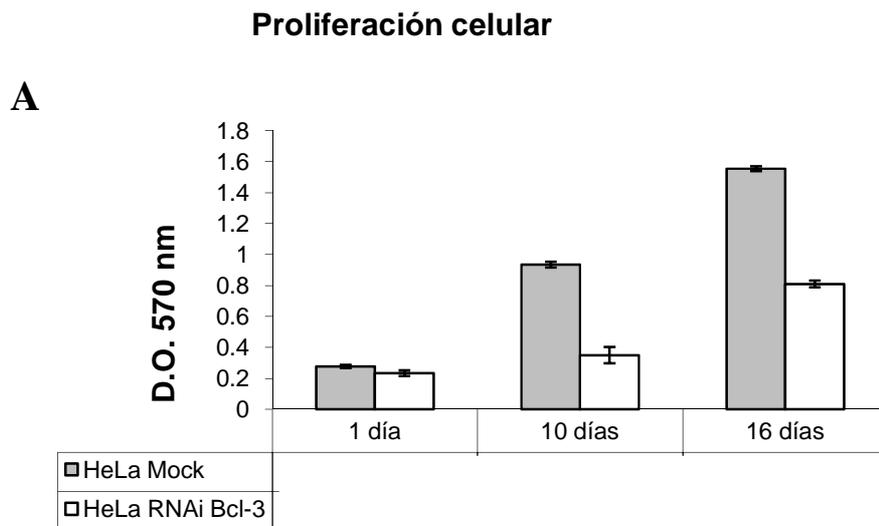
4. Efecto de Bcl3 sobre la proliferación y la muerte por apoptosis.

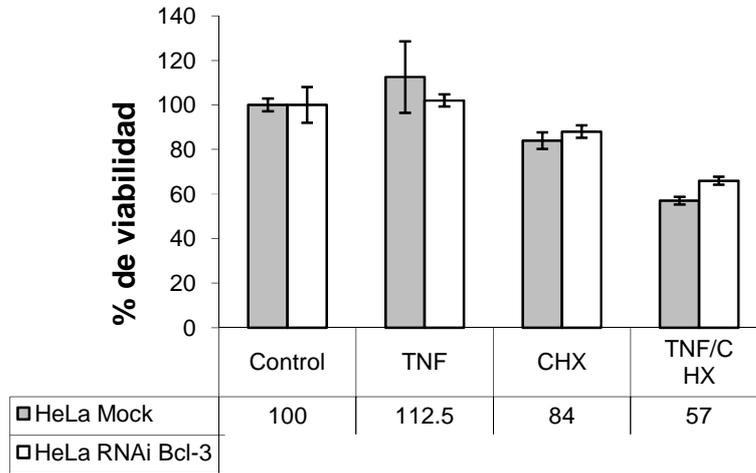
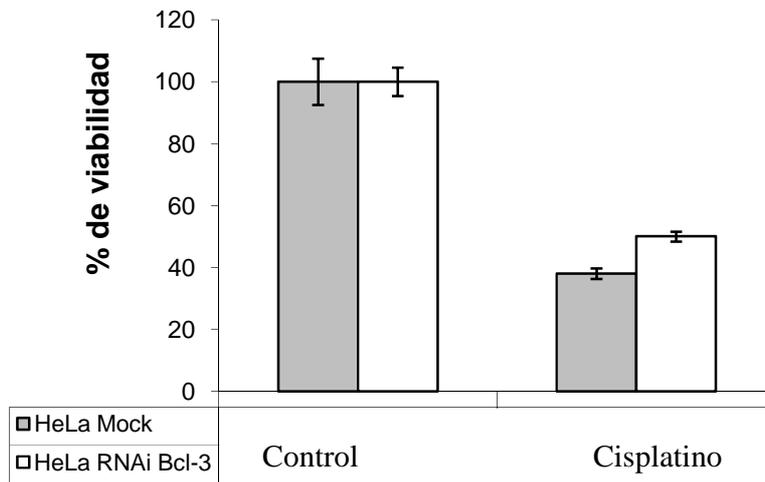
Los eventos de proliferación y la sensibilidad apoptótica son factores claves en cáncer, por ello es de gran importancia conocer si estos eventos celulares se modifican al ser desregulado Bcl-3.

Se ha reportado que la expresión de Bcl-3 favorece la transcripción de la ciclina D1 la cual está involucrada en la transición de la fase del ciclo celular G1-S incrementando la velocidad de duplicación celular, así que se analizó el efecto de la inhibición de Bcl-3 en la proliferación celular. Células HeLa mock y HeLa RNAi Bcl-3 fueron sembradas a la misma densidad celular y se programaron 3 puntos de análisis los cuales corresponden a 1, 10 y 16 días, las células de cada punto obtenido fueron teñidas y cuantificadas, los resultados obtenidos muestran claramente que la inhibición de Bcl-3 disminuye la proliferación celular esto se debe a la desregulación de proteínas involucradas en el ciclo celular como la ciclina D1, esta participación de ciclina D1 y Bcl3 en eventos de proliferación ha sido descrita por (Westerheide S. *et al.* 2001) (Fig 9A).

Para conocer si Bcl-3 tiene alguna participación en promover la apoptosis, células HeLa Mock y HeLa RNAi Bcl-3 fueron tratadas con compuestos pro-apoptóticos (TNF α , Cisplatino) y un tercer estímulo utilizado fue la luz ultravioleta B. Una vez obtenidos los IC50 para cada estímulo, las 2 líneas celulares se sometieron al

tratamiento y los resultados mostraron que no hubo cambio aparente con los compuestos pro-apoptóticos, sin embargo con la luz ultravioleta se presentó un incremento en la apoptosis de un 20%. Esto nos indicó que la disminución de Bcl-3 promueve la muerte por apoptosis cuando las células son sometidas a radiación ultravioleta (Fig 9B).



B**1****Sensibilidad apoptótica por exposición a TNF α** **2****Sensibilidad apoptótica por exposición cisplatino**

3

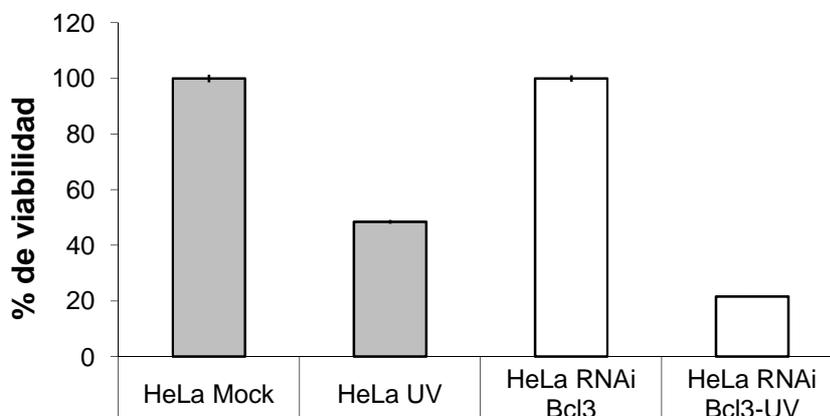
sensibilidad apoptótica por exposición a UV

Fig 9. La desregulación de Bcl3 en HeLa influye en la proliferación celular y muerte apoptótica

A) Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock son cultivadas en iguales condiciones, se determinan tres puntos para analizar su capacidad proliferativa (1, 10 y 16 días), las HeLa RNAi Bcl-3 presentaron una disminución de un 50% en la tasa de proliferación celular en comparación con las HeLa Mock. B) Ensayo de sensibilidad apoptótica. 1. Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron tratadas con TNF alfa con o sin Cicloheximida (CHX) a concentraciones y tiempos previamente determinados, ninguna de las líneas celulares presenta cambios en la sensibilidad apoptótica ante el estímulo farmacológico. 2. Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron tratadas con Cisplatino en concentraciones y tiempos previamente determinados, las células HeLa RNAi Bcl-3 presentan una ligera disminución en la sensibilidad apoptótica. 3. Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron radiadas durante 60 s con luz Ultravioleta, las células HeLa RNAi Bcl-3 presentaron una gran sensibilidad ante el estímulo en comparación con las HeLa Mock.

5. Apoptosis de células HeLa por exposición a UV y ensayo de TUNEL

Para determinar el incremento de muerte celular por apoptosis en células HeLa expuestas a radiación UV éstas fueron sometidas al ensayo enzimático de TUNEL. Células HeLa RNAi Bcl-3 presentaron una mayor sensibilidad a la radiación UV reflejándose en el incremento en la presencia de células apoptóticas comparada con células HeLa Mock. Se realizó cultivos celulares de HeLa Mock y HeLa RNAi Bcl3 las cuales fueron expuestas a radiación UV y teñidas con bromuro de etidio para observar la fluorescencia emitida mediante un microscopio de fluorescencia, células HeLa RNAi Bcl3 presentan un mayor número de núcleos apoptóticos en comparación a las HeLa Mock, para determinar el índice apoptótico, fueron contados 100 células y se determinó cuantos de ellas contenían

núcleos apoptóticos las células HeLa Mock al ser radiadas con UV incrementaron en un orden de 3 veces su índice apoptótico, mientras que las HeLa RNAi Bcl3 incrementaron 8 veces. (Fig.10A)

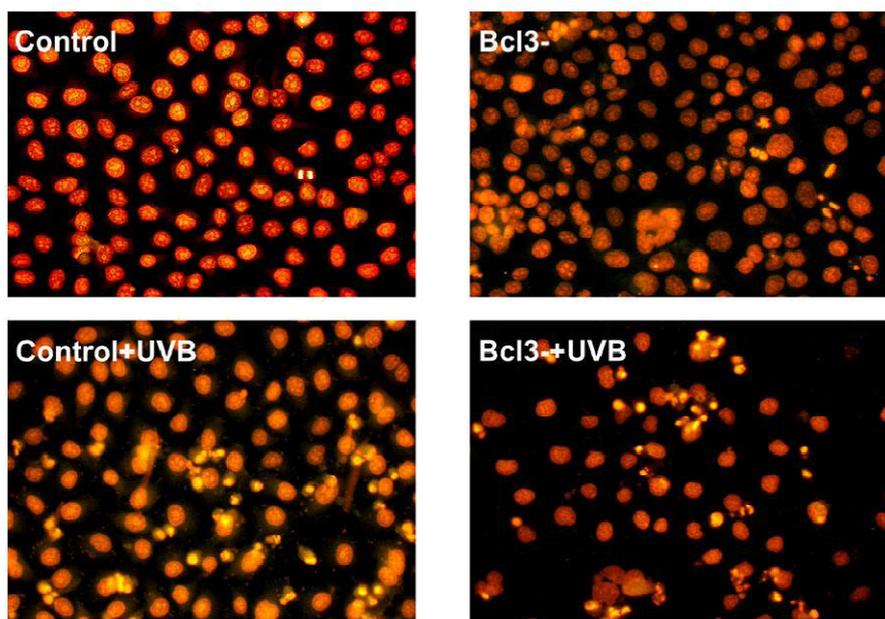


Fig 10. La disminución de Bcl3 en HeLa promueve la muerte apoptótica

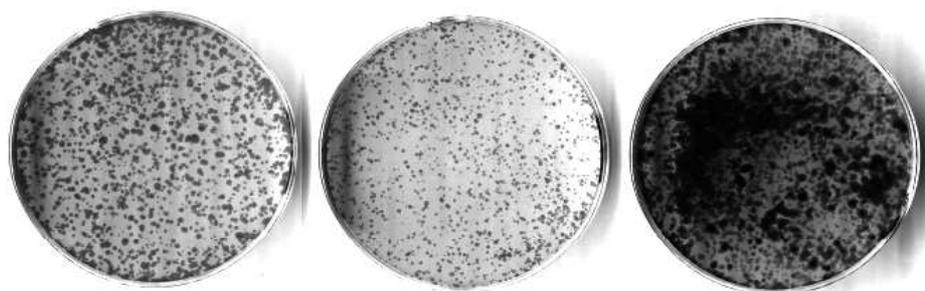
Células HeLa Mock y HeLa RNAi Bcl-3 fueron radiadas con luz UV la determinación del índice apoptótico fue obtenida mediante tinción nuclear con bromuro de etidio, se determinó que la disminución de Bcl3 incrementa la muerte apoptótica hasta 8 veces más cuando las células son radiadas con UV en comparación con el control.

6. ENSAYO DE CLONOGENICIDAD CELULAR

Para conocer la capacidad clonogénica de las líneas celulares establecidas, éstas fueron sembradas a una densidad de 1000 células por caja y fueron incubadas por un periodo de 14 días, los resultados obtenidos mostraron que las células que sobreexpresan Bcl-3 poseen una mayor capacidad clonogénica observándose un incremento en el número de colonias así como en su tamaño. En comparación con las células HeLa Mock, en cambio las células HeLa RNAi Bcl-3 presentaron una disminución en la cantidad de colonias así como en el tamaño, para corroborar

este resultado se empleó una metodología similar, la capacidad clonogénica (Fig 11).

A)



HeLa Mock

HeLa RNAi Bcl-3

HeLa Bcl-3 Sentido

B)

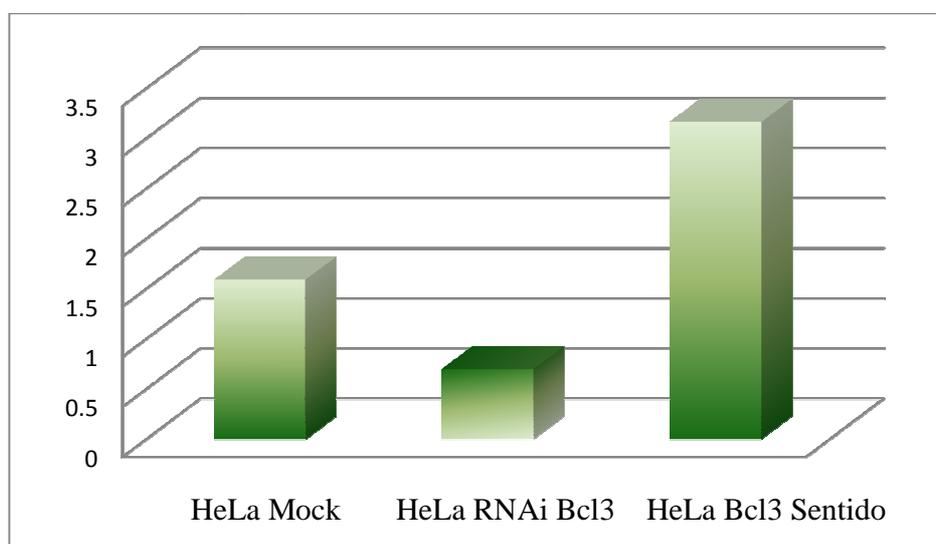


Fig 11. Determinación de la capacidad clonogénica de células HeLa con niveles de Bcl3 deregulados

Células HeLa RNAi Bcl-3, células HeLa Bcl-3 Sentido y células HeLa Mock fueron sembradas a baja confluencia y mantenidas en cultivo durante 2 semanas, la determinación de la confluencia celular mediante tinción con cristal violeta mostro que la disminución de Bcl-e inhibe el crecimiento celular y la formación de colonias de células HeLa a diferencia de aquellas células que sobreexpresa Bcl3 en las cuales observamos incremento en la formación de colonias.

7. CARACTERIZACIÓN CELULAR MEDIANTE ENSAYOS CITOMÉTRICOS

Se ha observado que la desregulación de Bcl-3 promueve cambios en la velocidad de duplicación celular, así que analizamos las fases del ciclo celular para conocer en cuál de ellas pudiera estar involucrada su actividad. Células HeLa de las 3 líneas establecidas fueron sembradas a la misma densidad e incubadas por 48 hr a este tiempo fueron colectadas y procesadas con yoduro de propidio, se analizaron por citometría de flujo y los resultados obtenidos mostraron que las células con sobreexpresión de Bcl-3 incrementan la proporción de células en la fase G2-M en un 20%, por lo contrario se observó que en el caso de las células con la disminución de Bcl-3 hay una reducción de la misma fase del ciclo de un 7% con respecto a las células control (Fig 12A).

Las células HeLa Bcl3 Sentido presentaron un tamaño similar a las HeLa Mock en cambio las células con Bcl-3 disminuido presentan un mayor tamaño y granularidad lo que indica que la disminución de Bcl3 promueve cambios en el fenotipo y genotipo celular (Fig 12B).

Esto comprueba que la modulación de Bcl-3 participa en la regulación de los eventos del ciclo celular, aunque no podemos saber si esta regulación es de forma directa o indirecta.

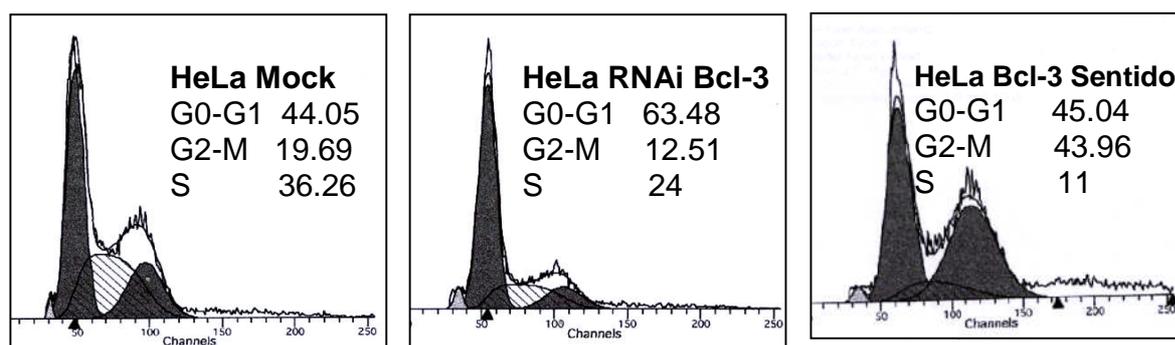


Fig 12. Determinación de las fases del ciclo celular cuando se desregula la expresión de Bcl3 en HeLa

El efecto de la desregulación de Bcl-3 en HeLa se ve reflejado en los eventos del ciclo celular. La disminución de Bcl3 promueve que más células se encuentren en la fase G1/S en cambio cuando se sobreexpresa Bcl3 se promueve la mitosis observándose un incremento en la fase G2/M.

8. FORMACIÓN DEL HUSO MITÓTICO EN CELULAS HeLa CON LOS NIVELES DE Bcl-3 DESREGULADOS ARRESTADAS CON NOCODAZOL

Hemos observado que la desregulación de Bcl-3 promueve la aneuploidía, y aunque se ha reportado que Bcl-3 participa como una proteína involucrada en el daño al DNA no se ha demostrado, sabemos que la relación existente entre la aneuploidia y el daño al DNA es dependiente de un gran número de factores, entre ellos la desregulación del check point mitótico. La integridad del huso mitótico es parte importante de la segregación cromosomal y su estabilidad es de suma importancia para la correcta división celular. Por ello nos interesó conocer como se encuentra estructuralmente y para ello sembramos células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa mock, transcurridas 24 hr las células fueron estimuladas con nocodazol por un período de 24hr, este compuesto sincronizó a las células en fase G2-M actuando como un inhibidor de tubulina. Una vez liberadas las células del nocodazol se procesaron para el ensayo de inmunofluorescencia contra tubulina, los resultados obtenidos mostraron que en las células con Bcl-3 disminuido promueve el incremento de husos mitóticos, en el ensayo pudimos observar células con 3 husos mitóticos pero sorprendentemente también observamos células hasta con 6 husos mitóticos, esto nos indica una gran falla en la regulación del check point mitótico, esto es solo un acercamiento en el que podríamos relacionar a Bcl-3 con la participación en el daño al DNA, con la finalidad de conocer el número de alteraciones de los centrosomas, se arrestaron células en metafase con nocodazol y se tiñeron con γ tubulina, una vez montadas las células se observaron en el microscopio de fluorescencia y se contabilizó el número de centrosomas en las HeLa RNAi Bcl3 y HeLa Mock. Observamos que la disminución de Bcl3 promueve el incremento en el número de centrosoma. (Fig 13).

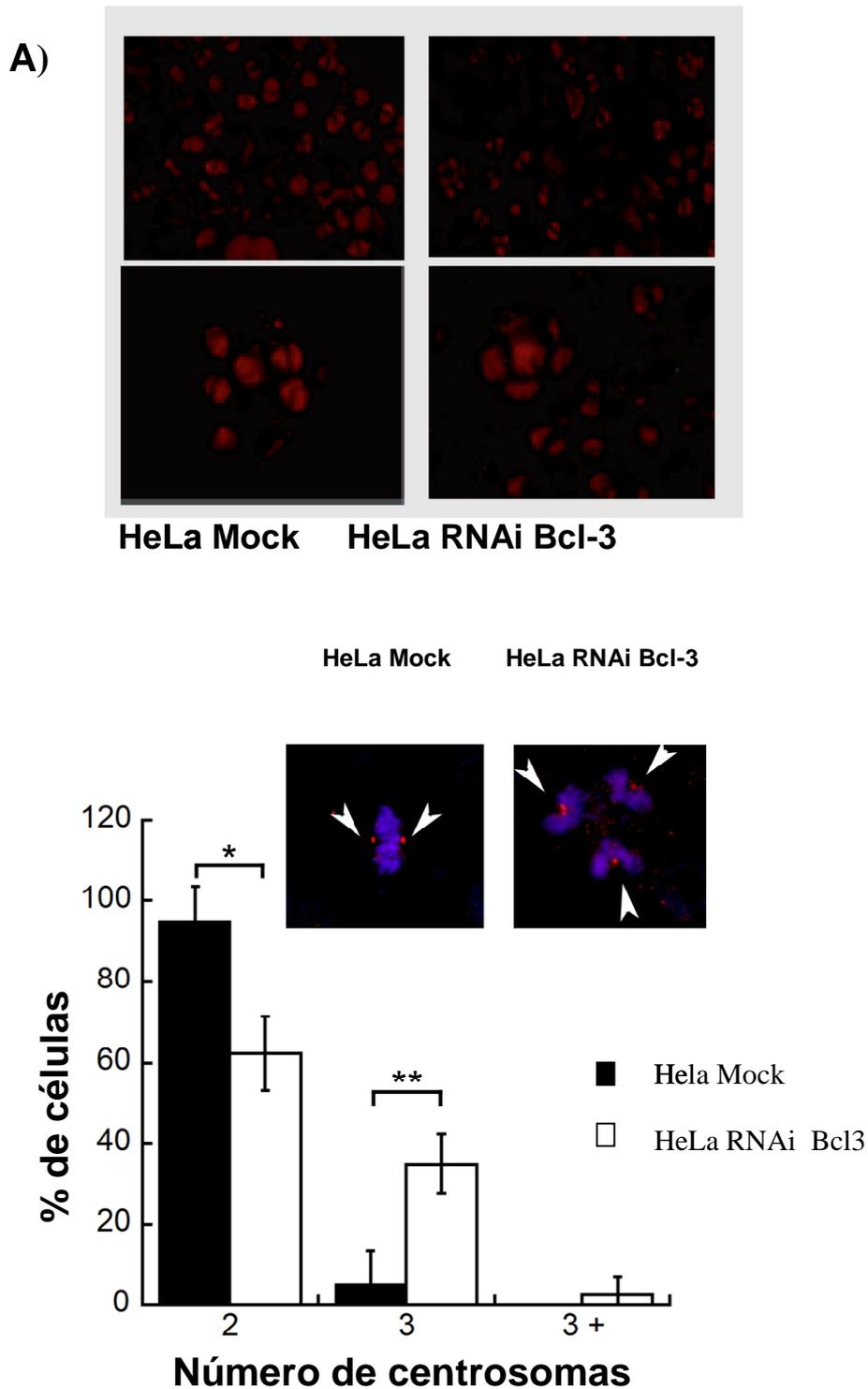


Fig 13. La disminución de Bcl3 en HeLa promueven la amplificación de centrosomas.

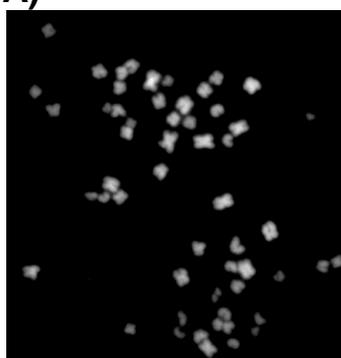
A, B) Arresto celular con Nocodazol. Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Moc fueron arrestadas con Nocodazol 1ug/ml durante 24 hr y liberadas posteriormente, las células fijadas son preparadas para inmunofluorescencia contra tubulina. Células HeLa RNAi Bcl-3 presentan una aberrante

organización del huso mitótico en el cual se pueden contar hasta 6 husos mitóticos por células en cambio las células Mock presenta una buena organización en el huso mitótico presentando un huso mitótico por célula.

9. PLOIDÍA EN CÉLULAS HeLa CON NIVELES DE Bcl-3 DESREGULADOS

Al observar que el número de husos mitóticos está incrementado en células con Bcl-3 disminuido decidimos analizar si el número de cromosomas también está modificado, así que se realizó un cariotipo, por lo que se sembraron las 3 líneas establecidas de células HeLa y fueron sincronizadas con colcemida a concentraciones ya establecidas, las células fueron procesadas y los cromosomas fueron montados en laminillas éstas se tiñeron con azul de toluidina para observación microscópica (Fig. 14A), se analizaron 50 eventos mitóticos de cada una de las líneas establecidas y los resultados mostraron que las células con Bcl-3 disminuido incrementaron el número de cromosomas por célula, el conteo cromosomal mostró que el número de cromosomas con mayor frecuencia en las células HeLa RNAi Bcl-3 fue de 120 cromosomas por célula, mientras que en las HeLa Bcl-3 sentido el número con mayor frecuencia se observó en 65 cromosomas, en el caso de las HeLa Mock la frecuencia se observa también en los 65 cromosomas, incluso células HeLa con sobreexpresión de Bcl-3 no presentan un conteo cromosomal mayor a 70 cromosomas, esto podría reforzar la propuesta de la participación de Bcl-3 en la reparación del DNA (Fig 14B).

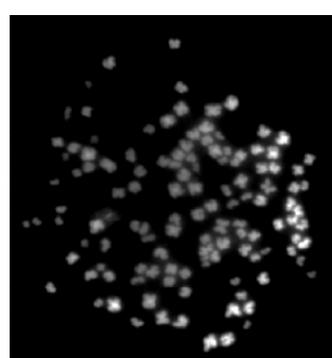
A)



HeLa Mock



HeLa Bcl3 sentido



HeLa RNAi Bcl3

B)

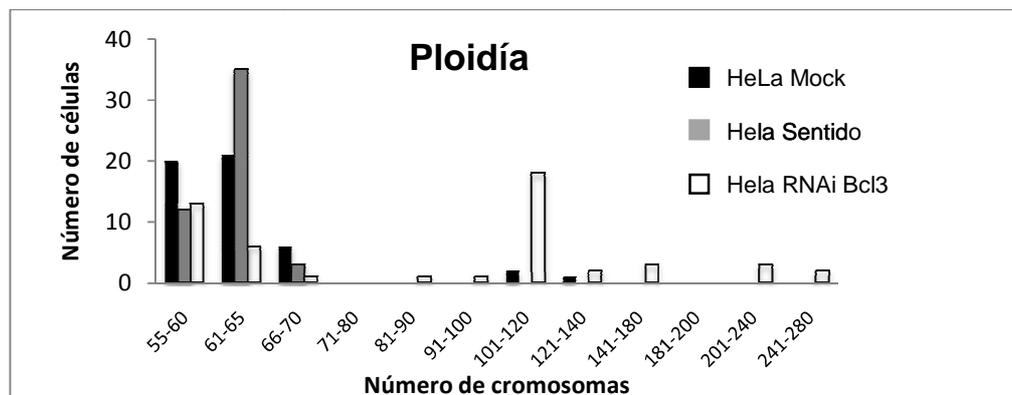


Fig 14. El número de ploidías se ve modificado por la desregulación de la expresión Bcl3

A) Células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados se someten a arresto celular con colcemida y se determina el número de cromosomas que contienen cada una de estas líneas. Se observó que células con disminución de Bcl-3 presentan un incremento de cromosomas. En cambio, cuando se sobreexpresa Bcl-3 disminuye el número de cromosomas comparado con el control en ambos casos. B) Se grafican el número de cromosomas que se encuentran en una población de 50 mitosis para cada una de las líneas celulares, incrementando el número de cromosomas en HeLa RNAi Bcl-3 y disminuyendo en el caso de sobreexpresar Bcl-3.

10. CITOMETRÍA DE CÉLULAS HeLa CON DESREGULACIÓN DE Bcl-3 ARRESTADAS CON COLCEMIDA

Se sabe que fallas en el check point mitótico desencadenan una serie de respuestas que pueden dar origen a la aneuploidía. Esta pérdida de control en la reparación del DNA es un mecanismo finamente regulado donde intervienen un gran número de proteínas. Cuando hay fallas en el check point mitótico y las células son estimuladas con colcemida para entrar al arresto celular las células, ésta no responden al estímulo y continúan la transición al ciclo.

Para determinar si las células HeLa RNAi Bcl-3 entran o no al arresto celular por efecto de la colcemida, se decidió analizar mediante citometría de flujo las fases del ciclo celular. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la fase G2-M en aquellas células en las que Bcl-3 está disminuido; en el caso de las células HeLa con Bcl-3 sobreexpresado así como en las células control no se presentó incremento en esta fase del ciclo celular por lo que se relaciona la morfología celular y los resultados de la citometría de flujo (Fig15).

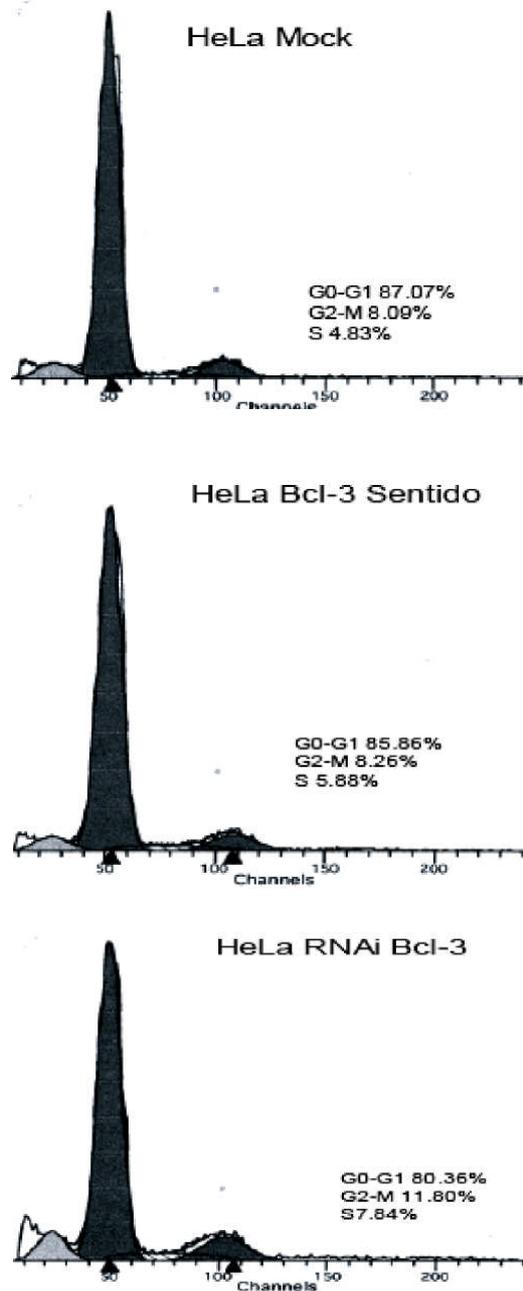


Fig 15. Determinación de las fases del ciclo celular en células HeLa con niveles de Bcl-3 desregulados y arrestadas con colcemida.

La desregulación de Bcl-3 sentido en HeLa promueve eventos a nivel de regulación del ciclo celular cuando las células son arrestadas con colcemida presentándose un ligero incremento en la fase G2-M para el caso de la inhibición de Bcl-3 por un RNA de interferencia, mientras que HeLa Bcl-3 sentido presentan niveles similares a los de HeLa Mock. La desregulación de Bcl-3 presenta un efecto en el cambio de la complejidad celular, tales cambios como la granularidad y el tamaño son evidentes en las HeLa RNAi Bcl-3 cuando son arrestadas con colcemida.

11. Determinación de las fases del ciclo celular en células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock.

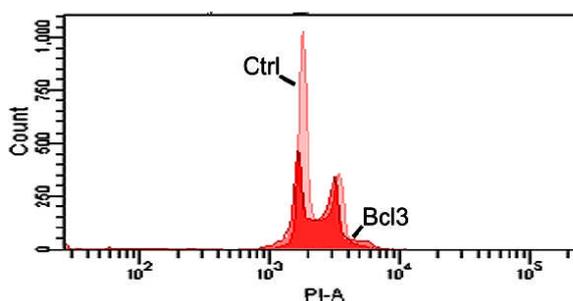
Células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock fueron cultivadas como se describió anteriormente a una confluencia de 1×10^6 , 24 hr después fueron tratadas para realizar ensayo citométrico y determinar el estadio en el que se encuentra la población.

Se observó que las células HeLa RNAi Bcl-3 se encuentran predominantemente en la transición de la fase G2/M mostrando la población una reducción en S, esto comparado con las células HeLa Mock. (Fig 16A)

Al observar que la fase G2/M esta favorecida en las células HeLa RNAi Bcl-3 se analizaron las subfases del ciclo celular. El análisis de las fases de M (Profase, Metafase, Anafase, Telofase, Citocinesis) mostró un aumento en la profase (4 veces más que el control), seguida de la metafase y anafase (2.6 y 2 veces mayor con respecto al control). (Fig16B)

A)

	G0/G1	S	G2/M
HeLa Mock	44.94 ± 6.1%	50.98 ± 2.2%	5.32 ± 1.2%
HeLa RNAi Bcl3	47.84 ± 5.2%	39.34 ± 3.1%	12.72 ± 0.9%



B)

	P	M	A	T	C	Total mitoses	
Ctrl shRNA	6	5	1	6	23	41	HeLa Mock
Bcl3 shRNA	28	13	2	5	23	71	HeLa RNAi Bcl3

FASE M	Hela Mock	Hela RNAi Bcl3	Índice
PROFASE	14.6%	39.4%	4.6
METAFASE	12.2%	18.3%	2.6
ANAFASE	2.4%	2.8%	2
TELOFASE	14.6%	7%	0.8
CITOCINESIS	56.1%	32.4%	1

Fig 16. La disminución de Bcl3 modifica las fases del ciclo celular

- A) Determinación de las fases del ciclo celular de un cultivo de HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock en condiciones normales. B) Análisis del número de eventos de fase M en células HeLa RNAi Bcl-3 y HeLa Mock.

12. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR EN HeLa CON Bcl-3 DESREGULADO

Para determinar si la disminución de la expresión de Bcl3 participa en la señalización al daño al DNA se realizó western blot de proteínas involucradas como: cdk1, CHK1, ATM, Ciclina B, H2AX.

La expresión de estas proteínas en contexto de Bcl3 disminuido marca una clara señalización de la existencia de una respuesta al daño al DNA, observándose un incremento en la cdk1 hipofosforilada así como de la ciclina B, esto nos indica que las células no paran el ciclo celular puesto que no está degradado el complejo Cdk1/Ciclina B el cual debe degradarse para terminar con la división celular y que el check point mitótico es el responsable del sensado. Por otra parte, ATM se encuentra incrementado en su forma fosforilada la cual señala directamente a la H2AX una proteína clave en la señalización al daño al DNA, esto sumado a la presencia de CHK1 fosforilada no hay un arresto celular activado por el check point después del daño al DNA. Así es como se relaciona la disminución de Bcl3 en la respuesta al daño al DNA aboliendo el arresto celular y creando fallas en la señalización (Fig 17).

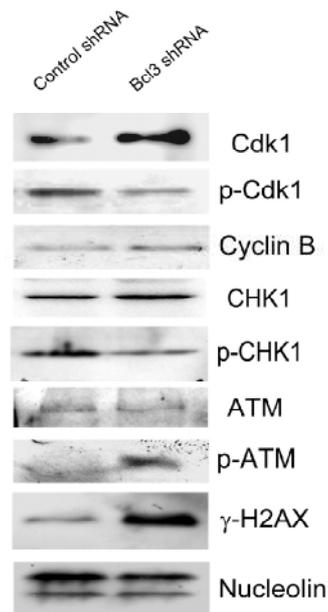


Fig 17 Señalización de la respuesta al daño al DNA en células HeLa con Bcl3 disminuido.

Se determinó la expresión de proteínas involucradas en la señalización al daño al ADN. El panel muestra proteínas asociadas con la respuesta al daño al DNA, el incremento en H2AX y ATM es evidencia de que la disminución de Bcl3 modula esta cascada de señalización a daño.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de evaluar la contribución de los efectos de Bcl3 tanto en la apoptosis como en la proliferación creamos líneas celulares estables con niveles de Bcl3 disminuidos mediante la generación de un RNA de interferencia expresado en un sistema retroviral. La disminución en la expresión de Bcl3 mostró una reducción en la tasa de crecimiento en comparación con sus controles. Los ensayos clonogénicos mostraron un 40% de reducción en el número de colonias formadas, para demostrar que este efecto no es a causa de muerte celular en el cultivo, se realizó un ensayo de TUNEL y se observaron diferencias a la sensibilidad apoptótica en las células con Bcl3 disminuido y las células control presentando mayor sensibilidad apoptótica cuando se disminuye Bcl3. Este resultado no fue el esperado, ya que se ha descrito que Bcl3 es capaz de suprimir la activación de p53 y apoptosis posterior al daño al DNA (Kashatus D *et al.*, 2006), pero esta discrepancia se puede deber a que la línea celular HeLa expresa el oncogén E6 del Virus del papiloma humano, el cual desestabiliza p53, además puede ser resistente a los efectos apoptóticos de Bcl3 (Dodson H *et al.*, 2004). Este resultado excluye a la muerte celular como un mecanismo observado por efecto de Bcl3 en el crecimiento y en la sobrevivencia clonogénica de células HeLa. Sin embargo ensayos posteriores de viabilidad, mostraron que la disminución de Bcl3 genera células más sensitivas a apoptosis inducidas por estrés.

Para investigar los posibles mecanismos de la disminución de crecimiento, realizamos ensayos de cultivo prolongados, los cuales mostraron incremento en el número de células nucleadas cuando los niveles de Bcl3 se encuentran disminuidos, estos resultados se corroboraron mediante ensayos con tinciones fluorescentes (tinción con Bromuro de etidio), los cuales mostraron diferencia significativa después de 5 pases, para comprobar que estos cambios son progresivos se utilizó un método diferente de inhibición mediante la expresión de un vector que codifica una secuencia dirigida hacia bcl3, así como un control de expresión. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de Bcl3 disminuye

progresivamente a medida que se continúa el número de pases en el cultivo, aunque es necesario un análisis más detallado de este fenotipo; sin embargo este otro método de inhibición descarta la posibilidad de que los efectos observados por el método de infección retroviral sean a causa de la infección *per se*.

Un hallazgo interesante fue que las células con Bcl3 disminuido presentaron cambios morfológicos observándose incremento del área nuclear, así como el número de núcleos por célula, sugiriendo por primera vez, que la disminución de Bcl3 promueve el fenómeno poliploide. Para analizar este fenómeno se realizó un ensayo de cariotipo, las células HeLa presentan normalmente aneuploidía observando un rango modal entre 51-60 cromosomas por célula, mientras que las células con Bcl3 disminuido presentaron un rango modal entre 102-120 cromosomas por célula, mostrando claramente que Bcl3 es un regulador clave de la mitosis en estas células.

El check point del ciclo celular es un mecanismo esencial para mantener la estabilidad genética. En respuesta al daño al DNA los check points de G1/S ó G2/M pueden arrestar a las células hasta realizar la reparación. Un arresto extendido en el check point de G2/M después de daño al DNA puede inducir amplificación de centrosomas, así como falla en la citocinesis por señalización dependiente ó independiente de ATM. Este fenómeno asegura una muerte reproductiva de las células que evaden el check point del ensamblaje del huso. Para evaluar si la disminución de Bcl3 en efecto arresta a las células en G2/M realizamos citometría de flujo, observando un incremento significativo de la población celular en la fase del ciclo G2/M.

Fue evaluado el índice mitótico en las células HeLa Bcl3 transfectadas con el plásmido observándose un incremento.

Se determinó si el efecto de la multinucleación puede estar mediado por fallas en el check point del ensamblaje del huso, observándose efectivamente que la disminución de Bcl3 incrementa los estadios de pro-metáfase y metafase.

Para asegurar que el arresto en G2/M en efecto induce amplificación de centrosomas, se tiñó el huso mitótico utilizando un anticuerpo anti-tubulina, demostrándose que la disminución de Bcl3 incrementa el número de centrosomas.

Para determinar si la disminución de Bcl3 participa en la respuesta al daño al DNA se realizó análisis de Western blot, demostrando un incremento en la fosforilación de la Histona 2AX, un marcador clave de daño al DNA (Reinhardt H *et al.*, 2009), así como un incremento en la fosforilación de la cinasa ATM, responsable de la modificación. La fosforilación de Chk1 la cual es requerida para el arresto del ciclo celular posterior al daño al DNA (Bartek J *et al.*, 2003), fue reducida por la disminución de Bcl3, estos resultados mostraron que la disminución de Bcl3 induce respuesta al daño al DNA.

Las células cancerosas frecuentemente muestran amplificación en el número de centrosomas y aneuploidía. Se ha demostrado que ambos procesos pueden estar ligados a la progresión del tumor, reversión tumoral y resistencia a drogas / 42 /. Las aberraciones en el número de centrosomas tienen como consecuencia fallas en la citocinesis, las cuales pueden ser inducidas por anomalías en la expresión o regulación de varias cinasas y múltiples aberraciones genéticas, en particular la pérdida de p53 (Meraldi PV 2002). En este sentido, es un hecho que la acumulación de daños al DNA o mutaciones en los genes de reparación del DNA son responsables de éste fenómeno (Bourke E *et al.*, 2007). La presencia de células cancerosas con más de dos centrosomas en muestras clínicas sugiere la existencia de mecanismos que permiten que las células sobrevivan a pesar de estas amplificaciones. En este trabajo evidenciamos que la disminución de la expresión de Bcl3 está asociada con la amplificación de centrosomas y el fenotipo poliploide, este fenotipo puede deberse a un efecto directo de este oncogén en la amplificación de centrosomas.

Además se ha comprobado que Bcl3 puede participar en la respuesta al daño al DNA, como se describió en el ortólogo de bcl3 en *C. elegans*, descrito por Boulton en el 2002 (Boulton S *et al.*, 2002; Watanabe N *et al.*, 2003).

El fenómeno de multinucleación también fue observado en células de cáncer de mama MCF7, con Bcl3 disminuido, demostrándose que el fenómeno de aneuploidía es independiente de p53.

En la sobreexpresión de Bcl3 mediante el sistema retroviral, solo se realizaron los primeros ensayos de la caracterización fenotípica por efecto de Bcl3, mostrando

que la sobreexpresión de Bcl3 promueve la proliferación celular que está mediada por incremento de la expresión de ciclina D1 (Westerheide S *et al.*, 2001). Otro fenómeno observado fue el incremento de la clonogenicidad, otro dato interesante a nuestro parecer fue la reducción en el número de cromosomas cuantificándose 61 a 65 cromosomas por célula, esto refleja claramente la participación directa de Bcl3 en el ciclo celular.

Conclusión

La disminución de Bcl3 en células HeLa induce una reducción en la proliferación celular, sensibilidad apoptótica por radiación UV, amplificación de centrosomas e incremento en la ploidía.

REFERENCIAS

Andreassen P, Lohez O, Lacroix B, Margolis R. (2001) Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell.* 12:1315-28.

Andreassen P, Lohez O, Margolis R. (2003) G2 and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutat Res.* 532:245-53.

Boulton SJ, Gartner A, Reboul J, Vaglio P, Dyson N, Hill DE, Vidal M. (2002) Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. *Science.* 295: 127-131.

Bartek J, Lukas J. (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell.* 3:421-429.

Bourke E, Dodson H, Merdes A, Cuffe L, Zachos G, Walker M, Gillespie D, Morrison CG. (2007) DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep.* 8: 603-609.

Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K and Siebenlist U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell.* 72: 729-739.

Brasier A, Lu M, Hai T, Lu Y and Boldogh I. (2001) NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence. *J Biol Chem* 276: 32080-32093.

Brinkley BR. (2011) Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11:18-21.

Bundy L and McKeithan W. (1997) Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF-kappaB p52 homodimer binding to DNA. *J Biol Chem.* 272: 33132-33139.

Cetin B, Cleveland W. (2010) How to survive aneuploidy. *Cell.* 143:27-9.

Ghosh G, Huang D, and Huxford T. (1999) Structural insights into NF-kB/IkB signaling. *Gene Ther Mol Biol.* 4: 75-82.

Cressman E and Taub R. (1993) I kappa B alpha can localize in the nucleus but shows no direct transactivation potential. *Oncogene.* 8: 2567-2573.

Dechend R, Hirano F, Lehmann K, Heissmeyer V, Ansieau S, Wulczyn G, Scheidereit C and Leutz A. (1999) The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene.* 18: 3316-3323.

Franzoso G, Bours V, Azarenko V, Park S, Tomita Yamaguchi M, Kanno T, Brown K and Siebenlist U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *EMBO J.* 12: 3893-3901.

Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores W, Epstein S, Leonardi A, Grinberg A, Tran T, Scharon Kersten T, Anver M, Love P, Brown and Siebenlist U. (1998) Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med.* 187: 147-159.

Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn G and Scheidereit C. (1999) NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J.* 18: 4766-4778.

Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I and Scheidereit C. (1998) Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol.* 18: 1266-1274.

Hitoshi O, Glenn T, and Timothy W. (1990) The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell.* 60: 991-997

Ho C, Siu W, Lau A, Chan W, Arooz T, Poon R. (2006) Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways. *Cancer Res.* 66:2233-41.

Inoue J, Takahara T, Akizawa T, and Hino O. (1993) Bcl-3, a member of the I kappa B proteins, has distinct specificity towards the Rel family of proteins. *Oncogene.* 8: 2067-2073.

Jacobs M and Harris S. (1998) Structure of an IkB/NF-kB complex. *Cell* 95: 749-75

Johnson D. and Walker C. (1999) cyclins and cell cycle checkpoints *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295-312

Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS. (2006) Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes Dev.* 20:225-35

Dodson H, Bourke E, Jeffers LJ, Vagnarelli P, Sonoda E, Takeda S, Earnshaw WC, Merdes A, Morrison C. (2004) Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *EMBO J.* 23: 3864-3873.

Kerr LD, Duckett CS, Wamsley P, Zhang Q, Chiao P, Nabel G, McKeithan TW, Baeuerle PA, Verma IM. (1993) The proto-oncogene bcl-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Dev.* 6:2352-63.

Kienitz A, Vogel C, Morales I, Müller R, Bastians H. (2005) Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene.* 24:4301-10.

Li Q and Verma I. (2002) NF.kB regulation in the immune system. *Nature Rev* 2: 725-734.

McKeithan T, Ohno H, Dickstein J and Hume E. (1994) Genomic structure of the candidate proto-oncogene BCL3. *Genomics* 24: 120-126.

Meraldi P, Honda R, Nigg EA: Aurora-A. (2002) overexpression reveals Tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* 21: 483-492.

Minemoto Y, Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Sasagawa T, Hirata M, Nakagama H, Ishizaka Y, Yamashita K. (2003) Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation. *Arch Biochem Biophys.* 412:13-9.

Mendoza J, Zamora R, Gallardo JC, Ceballos G, Aldana A, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. (2006) NF-kappaB does not influence the induction of apoptosis by Ukrain. *Cancer Biol Ther.* 5:788-93.

Na Y, Choi E, Kim J, Jhun H, Lee C and Lee W. (1999) Bcl3, an I κ B protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *J Biol Chem.* 274: 28491-28496.

Nelsen J, Kuriyama R, Hirsch B, Negron V, Lingle W, Goggin M, Stanley M, Albrecht H. (2005) Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *J Biol Chem.* 280: 768-76.

Ohno H, Takimoto G and McKeithan T. (1990) The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell.* 60: 991-997.

Ohno H. (1991) Isolation of a novel candidate proto-oncogene involved in human lymphoid neoplasm. *Rinsho Ketsueki.* 32: 655-659.

Rebollo A, Dumoutier L, Renauld C, Zaballos A, Ayllon V, and Martinez C. (2000) Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors. *Mol Cell Biol.* 20: 3407-3416.

Reinhardt HC, Yaffe MB. (2009) Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol.* ,21: 245-255.

Sage J and Straight A. (2010) RB's original CIN? *Genes Dev.* 24:1377-88

Schmitz M, Bacher S, and Kratch M. (2001) I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci.* 26: 186-190.

Vermeulen k, Van Bockstaele D and Berneman Z. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131–149

Watanabe N, Wachi S, Fujita T. (2003) Identification and characterization of BCL3-binding protein: implications for transcription and DNA repair or recombination. *J Biol Chem.* 278: 26102-26110.

Westerheide S, Mayo M, Anest V. Hanson L and Baldwin a. (2001) The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G1 transition. *Molecular and Cellular Biology.* 21: 8428-8436.

Zhang Q, Didonato JA, Karin M, McKeithan TW. (1994) BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Mol Cell Biol.* 14: 3915-26.

Zhang Y, Harhaj W, Bell L, Sun C and Miller, B. A. (1998) Bcl-3 expression and nuclear translocation are induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin in proliferating human erythroid precursors. *Blood.* 92: 1225-1234.

SHORT COMMUNICATION

Open Access

Depletion of the oncoprotein Bcl-3 induces centrosome amplification and aneuploidy in cancer cells

Ruben Zamora^{1,4}, Magali Espinosa², Gisela Ceballos-Cancino², Blanca Segura^{3,4}, Vilma Maldonado^{4*}, Jorge Melendez-Zajgla^{2,4*}

Abstract

Bcl-3 is an atypical member of the inhibitor of NF-kappa B family of proteins since it can function as a coactivator of transcription. Although this oncogene was described in leukemia, it is overexpressed in a number of solid tumors as well. The oncogenic potential of Bcl-3 has been associated with its capacity to increase proliferation by means of activating the cyclin D1 promoter and to its antiapoptotic role mediated by the inhibition of p53 activity. In the course of dissecting these properties, we found that depleting Bcl-3 protein using shRNAs induce a decrease of proliferation and clonogenic survival associated with the induction of multinucleation and increased ploidy. These effects were associated with a DNA damage response, a delay in G2/M checkpoint and the induction of centrosome amplification

Findings

The Bcl-3 oncogene was first identified in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the region adjacent to the t(14;19)(q32;q13) translocation [1,2]. Bcl-3 is a member of the NF-kappa B inhibitor family, which includes I-kappa B alpha, beta, epsilon and zeta. NF-kappa B is a pleiotropic transcription factor involved in several physiological and pathological processes such as inflammation, immune response and cancer. NF-kappa B inhibitory proteins act to suppress NF-kappa B activity by blocking the nuclear translocation of this factor, thus preventing the transcription of target genes. The protein encoded by Bcl-3 is atypical among inhibitory proteins because it is able to activate transcription [3-5]. This effect is mediated by its association with the NF-kappa B homodimers, p50 and p52, along with coactivators such as CBP/p300, SRC-1 and Tip60 [4,6]. While Bcl-3 overexpression was originally found to be associated with CLL and lymphomas, recent reports have shown that this oncogene is overexpressed

in several solid tumors, such as breast [7], nasopharyngeal [8] and endometrial [9] carcinomas.

Although some advances have been made in defining the cellular and molecular effects of Bcl-3, its precise role in carcinogenesis is still unclear. Earlier work by Westerheide et al. showed that in breast epithelial cells, Bcl-3 is able to act as a coactivator with NF-kappa B p52 homodimers to directly activate the cyclin D1 promoter, so direct effects on the cell cycle could be responsible for its oncogenic effects [10]. Also supporting this line of evidence is the finding that the tumor suppressor CYLD blocks cyclin D1 expression by inhibiting Bcl-3 signaling [11]. An additional role for Bcl-3 in carcinogenesis has recently been suggested by Kashatus et al., who demonstrated that after DNA damage, Bcl-3 is required for the induction of Hdm2 gene expression and the suppression of persistent p53 activity [12]. These results suggest that the oncogenic role of Bcl-3 could be mediated by a p53-dependent pathway, possibly by preventing the apoptosis of cells with damaged DNA.

In order to dissect the contribution of apoptosis and proliferation to the oncogenic effects of Bcl-3, we produced stable cell lines expressing small-interfering RNAs (siRNAs) directed toward the oncoprotein (Fig. 1a and

* Correspondence: vilmaml@gmail.com; jmelendez@inmegen.gob.mx

²Cancer Functional Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine. (Periferico Sur 4124), Mexico City (01900), Mexico

⁴Molecular Biology Laboratory, Instituto Nacional de Cancerologia, (Av. San Fernando 22) Mexico City (14080), Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

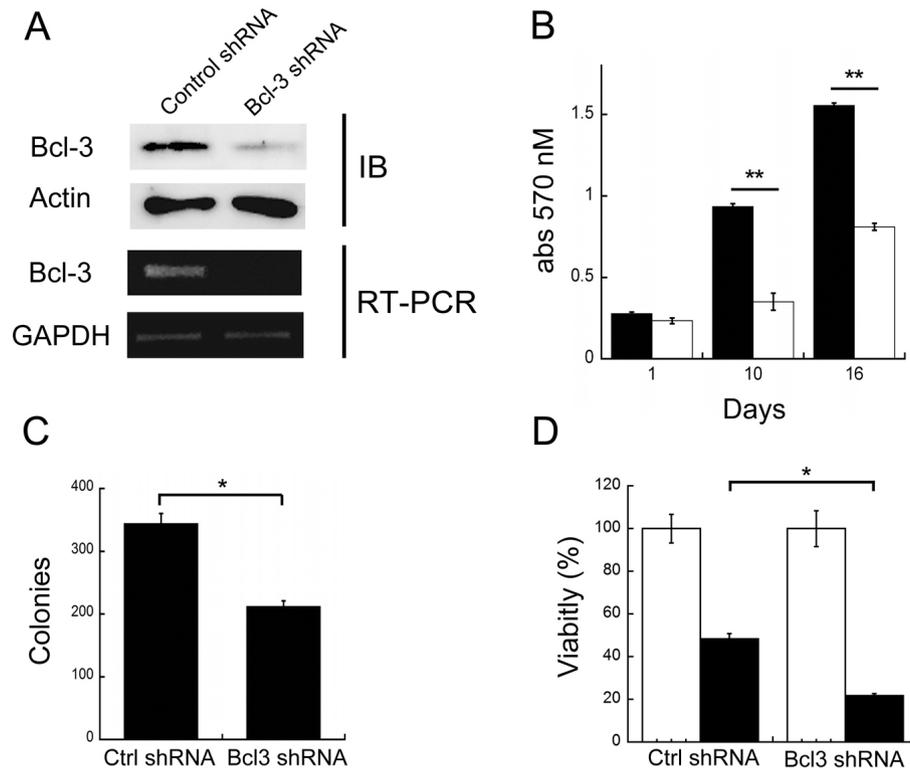


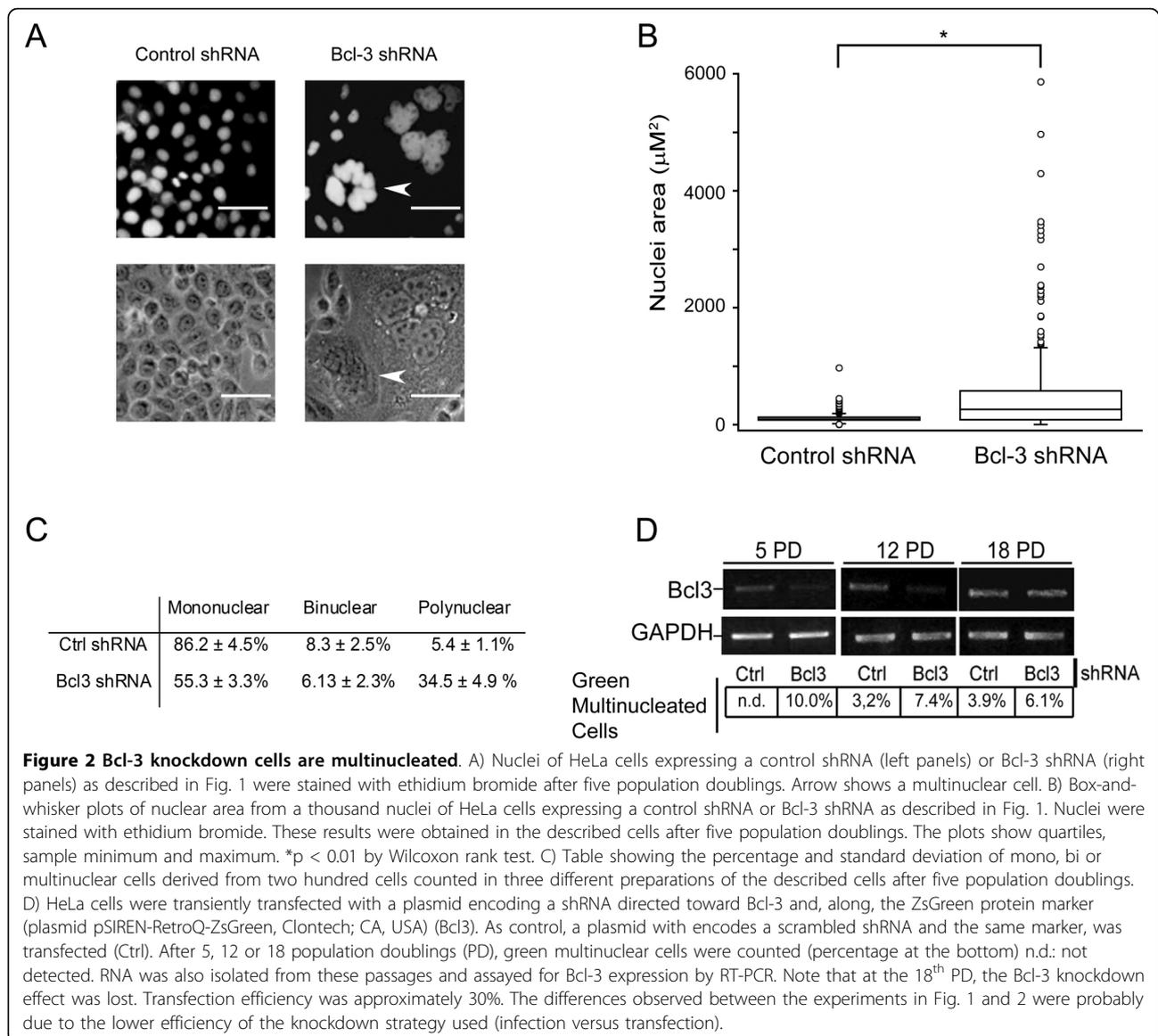
Figure 1 Knockdown of Bcl-3 in HeLa cervical cancer cells. HeLa cells were infected with retroviral particles packaged with constructs derived from pSIREN vector (Clontech). These vectors codifies for a double-stranded short hairpin RNA (shRNA) directed toward Bcl-3 under the human U6 promoter. Cells were selected with puromycin for 1 week and protein (upper panel A) or RNA (lower panel A) analyzed. B) HeLa cells were grown in DMEM plus 8% fetal bovine serum for the times shown and viability assessed with the crystal violet method. Mean and standard deviation of the optical absorbance are shown. Black bars: cells expressing a control (scrambled) shRNA, white bars: cells expressing a Bcl-3 shRNA. C) Clonogenic assays. 2.5×10^3 cells were seeded in 100 mm petri dishes, cultivated for 16 days, fixed and stained with crystal violet. Colonies were manually counted. D) HeLa cells were grown in DMEM plus 8% fetal bovine serum, exposed to ultraviolet B light (280 nm) for 45 seconds ($\approx 300 \text{ J/m}^2$) and viability assessed by crystal violet staining 24 hours later. Mean and standard deviation of the optical absorbance are shown. Black bars: cells expressing a control (scrambled) shRNA, white bars: cells expressing a Bcl-3 shRNA. All the assays were performed by triplicate in three separated experiments. Ctrl: control. IB: Immunoblot. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ using student's T test.

Additional file 1, Fig. S1). As expected, based on the previously mentioned reports, downregulation of Bcl-3 levels had a significant negative impact on the growth of these cells. Fig 1b shows a significant reduction in the number of Bcl-3 knockdown cells in a time course experiment (Fig. 1b). In addition, a clonogenic assay, which assesses the reproductive success of the cells, showed a 40% decrease in the number of colonies formed (Fig. 1c). Since the decrease in cellular growth and reproductive efficiency could also be due to cell death, we measured the rate of spontaneous apoptosis via annexin V (not shown) and TUNEL assays. Interestingly, we did not observe differences in apoptotic rates between cells with down regulated Bcl-3 and the control cells (Additional file 2, Fig. S2). This is an unexpected finding, since it has been shown that Bcl-3 is able to suppress p53 activation and apoptosis after DNA damage [12]. This discrepancy could be due to the fact that HeLa cervical cell line express the papillomavirus

E6 oncoprotein, which destabilizes p53 and, therefore, should be resistant to the apoptotic effects of Bcl-3 [13].

This result excluded cell death as the mechanism for the observed effect of Bcl-3 on the growth and clonogenic survival of HeLa cells. Nevertheless, further analyses showed that depletion of Bcl-3 rendered cells more sensitive to stress-induced apoptosis (Fig. 1D and Additional file 2, Fig. S2 A and C).

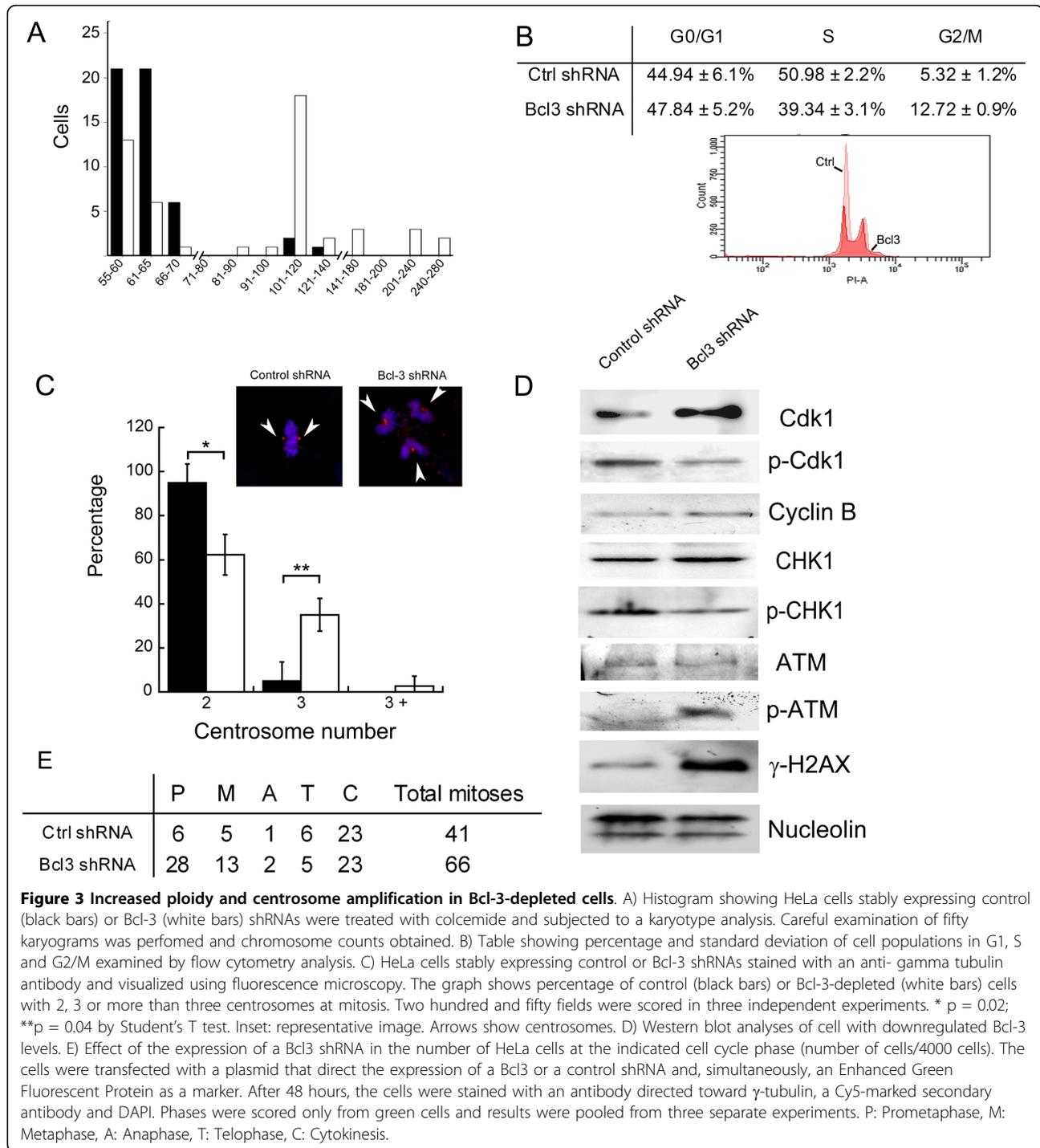
In order to investigate the possible mechanism of the decreased growth, we followed Bcl-3 knockdown cells and found, surprisingly, that more population doubling resulted in an increasing number of multinucleated cells, as assessed by fluorescent nuclear staining (Fig. 2a). The increase in multinuclear cells reached statistical significance after five passages (Fig. 2c). To assess if the changes were progressive and to provide additional support using a different expression approach, HeLa cells were transfected with plasmids encoding sequences for Bcl-3 and control shRNAs and followed for several



passages. We found that Bcl-3-depleted cells decreased progressively from the culture (Fig. 2d), perhaps by dilution by non-transfected cells, thus precluding a more detailed analysis of the phenotype. A more careful examination using image analysis of fixed cells showed that Bcl-3-depleted cells were not only polynuclear, but also demonstrated a larger nuclear area (Fig. 2b). The larger area is suggestive of an increased cellular ploidy in Bcl-3-depleted cells. To investigate this possibility, we performed karyotype analyses. Fig 3 shows that HeLa cells are aneuploid by nature, with a chromosome number range between 55 and 140 and a modal number between 51 and 60 (Fig. 3a). In sharp contrast, we found that the downregulation of Bcl-3 induced an increase of the chromosome number range to 55-280, with a modal number between 101 and 120 (Fig. 3a). These results

clearly showed that Bcl-3 is a key regulator of mitosis in HeLa cells.

Cell cycle checkpoints are essential for maintaining genetic stability. In response to DNA damage, cells arrest in G1/S or G2/M checkpoints for repair. Extended arrest in the G2/M checkpoint after DNA damage can induce centrosome amplification and failed cytokinesis by ATM-dependent and -independent signaling [13]. This phenomenon is thought to represent a mechanism for ensuring the reproductive death of cells that evade the spindle assembly checkpoint. To assess if Bcl-3-depleted cells were, indeed, arrested at the G2/M checkpoint, we performed flow cytometric analyses and found a significant increase in this population of cells relative to the control (Fig. 3b). In addition, we found a progressive increase in the mitotic index (4.27% in



control cells versus 7.42% in Bcl3-depleted cells at 12 population doublings; 3.00% in control cells versus 10.41% in cells deficient for Bcl-3 at 18 population doublings). To provide further insight, we then analyzed cells transiently-transfected with a plasmid that expresses a Bcl3 shRNA and a green fluorescent marker (EGFP). Fig 3E shows that Bcl-3 depletion increased the

number of cells in pro-metaphase and metaphase, suggesting that the multinucleation effect may be mediated by a failure to satisfy the spindle assembly checkpoint. In support of this result, we found that cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) was hypophosphorylated and cyclin B expression increased in Bcl-3-depleted cells, a result consistent with the mitosis-promoting effect of this

complex. In order to assess if G2/M arrest did, indeed, induce centrosome amplification, we stained the mitotic spindles using a tubulin antibody. As shown in Fig 3c, cells with downregulated Bcl-3 demonstrated a significant increase in centrosome numbers, thus, corroborating the amplification of centrosomes at mitosis. As expected, no differences were found at interphase in centrosome numbers (70% with 2 centrosomes and 30% with 1 centrosome in both Bcl-3 deficient and control cells). Finally, we assessed whether Bcl-3 depletion could induce a DNA damage response. As shown in Fig 3d, Western blot analysis demonstrated an increase in the phosphorylation of histone 2AX, a marker of DNA damage [14], as well as increased phosphorylation of the kinase responsible for this modification, ATM, in Bcl-3-depleted cells. Interestingly, phosphorylation of Chk1, an essential serine/threonine kinase required for the cell cycle checkpoint arrest after DNA damage [15], was reduced by Bcl-3 depletion. These results showed that Bcl-3 downregulation induces a DNA damage response that is uncoupled from the checkpoint-mediated cell cycle arrest.

Cancer cells frequently show amplification of centrosome number and aneuploidy. It has been shown that both processes could be linked to tumor progression, tumor regrowth and drug resistance [16]. Centrosome numeric aberrations arise as a consequence of failures in cytokinesis, which can be induced by abnormalities in the expression or regulation of several protein kinases and multiple genetic aberrations, in particular the loss of the tumor suppressor, p53 [17]. In this regard, it is thought that cumulative DNA damage or mutations in DNA repair genes are responsible for this phenomenon [18]. The presence of cancer cells with more than two centrosomes in clinical samples suggests the existence of mechanisms that allow cells to survive despite this amplification. In the present paper, we provide evidence that the depletion of Bcl-3 expression is associated with centrosome amplification and an endopolyploid phenotype. This phenotype could be due to a direct effect of this oncogene on centrosome amplification and cytokinesis aberrations or could be indirectly caused by an undescribed cell death function. In the latter case, the effects of Bcl-3 depletion should be due to the accumulation of aberrant cells in the culture. This is unlikely since we did not find evidence of increased cell death, and the growth and clonogenic potential of Bcl-3-depleted cells were also decreased. Alternatively, Bcl-3 could participate in the genesis of centrosome amplification and cytokinesis aberrations by disrupting the DNA damage response. This theory is supported by the findings of Boulton et al., who showed that the *C. elegans* Bcl-3 ortholog is involved in the DNA damage response [19]. In addition, Watanabe et al. showed that Bcl-3

binds to B3BP, a polynucleotide kinase with a MutS-related domain, which is thought to be involved in DNA repair [20]. Since Bcl-3 knockout mice do not show any gross defect in DNA damage response, the participation of this oncogene should be specific to cancer cells and probably requires *de novo* overexpression.

Recently, it has been postulated that the oncogenic potential of Bcl-3 could be related to the capacity of this proto-oncogene to suppress p53 activation. This finding implies that Bcl-3 action should be restricted to tumors harboring no p53 alterations. Although not exhaustively examined, our analyses of cultured cell lines do not show a correlation between p53 mutation status and Bcl-3 expression (Additional file 3, Fig. S3). In addition, the cell lines used in this study were derived from HeLa cells, which express papillomavirus protein E6 and, thus, have a disrupted p53 signaling pathway. Thus, Bcl-3 oncogenic potential could not only be limited to its effects on p53 activation, but to its effects on limiting cell cycle and chromosomal number abnormalities in p53-mutant cells. Additional experiments in mouse models are needed to explore this hypothesis.

In conclusion, the present paper shows that the depletion of Bcl-3 in cancer cells induces centrosome amplification and increases ploidy. Bcl-3 may be needed to overcome the deleterious effect of DNA damage on cancer cells with aberrant mitosis, and the importance of Bcl-3 could be exploited for the development of selective inhibitors of tumorigenesis.

Additional material

Additional file 1: Figure S1. Morphology of MCF-7 Breast Cancer cells expressing a Bcl-3 shRNA. Breast cancer cells present a similar morphology to HeLa cells after Bcl-3 depletion.

Additional file 2: Figure S2. Effects of Bcl-3 depletion on apoptosis. Cells with Bcl-3 knockdown are more susceptible to apoptosis induced by ultraviolet light, as assessed by nuclear morphology, viability assays and TUNEL.

Additional file 3: Figure S3. Analysis of Bcl-3 mRNA expression of breast cancer cell lines by RT-PCR. Bcl-3 steady-state levels in breast cancer cell lines with different p53 status (wild type or mutated) and expression.

List of abbreviations

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated; Bcl-3: B-cell CLL/lymphoma 3; Chk1: Checkpoint homolog-1; CYLD: Cylindromatosis.

Acknowledgements

This work was supported by grant C01-45728 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to J. Melendez-Zajgla. Ruben Zamora was supported by a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. The present work was part of Ruben Zamora doctoral thesis from the Universidad Nacional Autónoma de México (Biomedical Doctorate Program, Faculty of Medicine). We thank Varenka Martínez for her help in the karyotype analyses. We thank Linda Nelly Patiño for her help in Flow Cytometry Analyses.

Author details

¹Biotechnology Unit, Grupo Farmacéutico Neolpharma, (Boulevard de los Ferrocarriles 277), Mexico City (02300), Mexico. ²Cancer Functional Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine. (Periferico Sur 4124), Mexico City (01900), Mexico. ³Gene Therapy Laboratory, Laboratorios Alpharma, (Renato Leduc 363) Mexico City (14050), Mexico. ⁴Molecular Biology Laboratory, Instituto Nacional de Cancerología, (Av. San Fernando 22) Mexico City (14080), Mexico.

Authors' contributions

RZ produced transgenic cell lines and most experimental data, ME produced transgenic cell lines and provided molecular data, GC produced cell death analysis and molecular data, BS provided western blot analyses, VM conceived the study and participated in its design, JM-Z conceived and coordinated the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 20 July 2009 Accepted: 24 August 2010

Published: 24 August 2010

References

1. Crossen PE: **Cytogenetic and molecular changes in chronic B-cell leukemia.** *Cancer Genet Cytogenet* 1989, **43**(2):143-150.
2. Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW: **The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control.** *Cell* 1990, **60**(6):991-997.
3. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U: **The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers.** *Cell* 1993, **72**(5):729-739.
4. Dechend R, Hirano F, Lehmann K, Heissmeyer V, Ansieau S, Wulczyn FG, Scheidereit C, Leutz A: **The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators.** *Oncogene* 1999, **18**(22):3316-3323.
5. Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D: **The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers.** *Genes Dev* 1993, **7**(7B):1354-1363.
6. Na SY, Choi JE, Kim HJ, Jhun BH, Lee YC, Lee JW: **Bcl3, an I kappa B protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation.** *J Biol Chem* 1999, **274**(40):28491-28496.
7. Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS Jr: **Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3.** *Oncogene* 2000, **19**(9):1123-1131.
8. Thornburg NJ, Pathmanathan R, Raab-Traub N: **Activation of nuclear factor-kappaB p50 homodimer/Bcl-3 complexes in nasopharyngeal carcinoma.** *Cancer Res* 2003, **63**(23):8293-8301.
9. Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X: **Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma.** *J Pathol* 2004, **204**(5):569-577.
10. Westerheide SD, Mayo MW, Anest V, Hanson JL, Baldwin AS Jr: **The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(24):8428-8436.
11. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R: **Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling.** *Cell* 2006, **125**(4):665-677.
12. Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS: **Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation.** *Genes Dev* 2006, **20**(2):225-235.
13. Dodson H, Bourke E, Jeffers LJ, Vagnarelli P, Sonoda E, Takeda S, Earnshaw WC, Merdes A, Morrison C: **Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM.** *EMBO J* 2004, **23**(19):3864-3873.
14. Reinhardt HC, Yaffe MB: **Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2.** *Curr Opin Cell Biol* 2009, **21**(2):245-255.
15. Bartek J, Lukas J: **Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer.** *Cancer Cell* 2003, **3**(5):421-429.
16. Brinkley BR: **Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(1):18-21.
17. Meraldi P, Honda R, Nigg EA: **Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells.** *EMBO J* 2002, **21**(4):483-492.
18. Bourke E, Dodson H, Merdes A, Cuffe L, Zachos G, Walker M, Gillespie D, Morrison CG: **DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification.** *EMBO Rep* 2007, **8**(6):603-609.
19. Boulton SJ, Gartner A, Reboul J, Vaglio P, Dyson N, Hill DE, Vidal M: **Combined functional genomic maps of the C. elegans DNA damage response.** *Science* 2002, **295**(5552):127-131.
20. Watanabe N, Wachi S, Fujita T: **Identification and characterization of BCL-3-binding protein: implications for transcription and DNA repair or recombination.** *J Biol Chem* 2003, **278**(28):26102-26110.

doi:10.1186/1476-4598-9-223

Cite this article as: Zamora et al: Depletion of the oncoprotein Bcl-3 induces centrosome amplification and aneuploidy in cancer cells. *Molecular Cancer* 2010 **9**:223.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

