

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Vías de degradación de las oncoproteínas Ski y SnoN independientes
del TGF-beta”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Jacqueline Hernández Damián

Director de Tesis: Dra. Marina Macías Silva

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 la Universidad, la casa de estudios que me ha formado desde mi formación preparatoria y ahora incluso más allá de la licenciatura, jamás dejaré que los colores azul y oro se borren de mi espíritu...

A la Facultad de Ciencias por erigirme como bióloga, como universitaria y como persona, por las cátedras, las experiencias de campo y de laboratorio.

Al Instituto de Fisiología Celular por acogerme en el campo de la ciencia e instituirme en esta etapa de mi formación académica.

A la Dra. Marina Macías Silva

Un profundo agradecimiento por haberme aceptado en su laboratorio, por las enseñanzas vertidas en mí, ya que prácticamente llegué al laboratorio sin saber nada y sobre todo por el apoyo constante hacia mi formación académica como profesional, aunque dicho camino es largo y perenne.

A los miembros del jurado la Dra. Eréndira Vázquez, la Dra. Laura Kawasaki, a la Biol. Paola Moreno y a la M. en IBB. Claudia Segal por la revisión minuciosa y las sugerencias vertidas de este trabajo.

Agradecimientos especiales

Indudablemente este es uno de los momentos de mi vida en los cuales agradecer a las personas que han estado involucrados en la realización de la tesis y de mi formación como biólogo, es incluso más difícil que hacer un *western* impecable. Sin embargo...

A mi madre

Tu entereza en lo que haces y constante dedicación han sido los moldes sobre los cuales me he basado para llevar a cabo lo que deseo en la vida, pero también tu cariño y tu apoyo han sido factores inherentes de tu personalidad que has depositado sobre mí desde que tengo razón... Siempre he pensado que tu figura ha pesado mucho en la familia, y ahora lo puedo corroborar... para ti un agradecimiento infinito pues gran parte de lo que soy con sus defectos y virtudes lo soy gracias a ti... te quiero mucho mamá

A mi padre

El interés y preocupación que pones en los proyectos que llevo a cabo, siempre me ha impresionado, a pesar de lo difícil que sea para ti comprenderlo... y gracias a ello estoy aquí, en este sendero, por el cual aunque no lo creas me has llevado... muchas gracias por los regaños, los consejos, pero sobre todo por haber estado conmigo... te quiero mucho papá

A mi hermana Ana Lilia

Gracias por estar a mi lado, por escucharme, por darme ánimos y por tu sentido del humor que constantemente viertes en los momentos más felices que recuerdo...gracias *trapos*

A Ariana

Los momentos que pasamos juntas, tu apoyo constante y tus regaños me ayudaron en los momentos más difíciles.

A Agustín y Claudia

Gracias por ser mis hermanos y acompañarme a lo largo de este camino...

Al laboratorio 225 Norte

Por dejarme adentrarme en su grupo de trabajo, por las lecciones, las reprimendas, las llamadas de atención, en fin por enseñarme a trabajar de manera rigurosa en el laboratorio y también por enseñarme a disfrutar cada experimento.

A Violet

Gracias por tu compañía en el laboratorio, por tu apoyo en los experimentos, por los momentos felices y tristes y por ser una inseparable amiga a pesar de todo.

A Cass, Yael y Angeles

Gracias por los momentos felices vertidos en el laboratorio a pesar de la gran carga de trabajo, por la ayuda en las clases y por ser parte de esta etapa.

A Myriam

Gracias por tu afecto, tus consejos y tu compañía en el Instituto, esta tesis jamás hubiera podido darse sin tu apoyo y tu valiosa presencia a mi lado.

A Diana

Por escucharme y por tu aprecio que me brindaste a lo largo de este tiempo, no tengo con que agradecerte todo ese tiempo que has derrochado en mí, sin pedir nada a cambio.

A Ere

Por las anécdotas de ciencia, que a veces parecían más de ciencia ficción, gracias por tu compañía Ere.

Al laboratorio 302 Oriente

Edith, Nancy, Rocio, Laurita Kawasaki, Alan, Emmanuel y al Dr. Roberto Coria gracias por la compañía y consejos, pero sobre todo por permitirme adentrarme en su grupo.

A los cuates de la Facultad:

Yadira, Tadeo, Melissa, Víctor, Chavita, Aarón, Yedhit, Eric, Raúl, Anaíd, Mónica, Diana, Dora, Nayeli gracias por haber formado parte de mi etapa en la licenciatura, por las fiestas y los buenos momentos en las clases y en las prácticas de campo.

A mis amigos de antaño

A Liz, Lalo, Lupe y Rocío por haberme brindado su amistad y no dejarla quebrantar incluso después de tantos años de habernos conocido en la prepa y la secundaria, las fiestas, las clases, las bromas y la compañía.

A los amigos eternos del transcurso de mi existencia

A Armando, Lupita, Cinty, Charlie, Dany, Diana, Mine, Santiago, Juanis, Alex y Alma por haberme brindado una amistad tan espontánea y encantadora, por el cine de todos los miércoles, el café de los viernes y por las fiestas y mesones frecuentados.

"Estas memorias o recuerdos son intermitentes y a ratos olvidadizos porque así precisamente es la vida. La intermitencia del sueño nos permite sostener los días de trabajo. Muchos de mis recuerdos se han desdibujado al evocarlos, han devenido en polvo como un cristal irremediabilmente herido.

Tal vez no viví en mí mismo; tal vez viví la vida de los otros.

De cuanto he dejado escrito en estas páginas se desprenderán siempre ?como en las arboledas de otoño y como en el tiempo de las viñas? las hojas amarillas que van a morir y las uvas que revivirán en el vino sagrado.

Mi vida hecha de todas las vidas: las vidas del poeta."

Confieso que He Vivido

Pablo Neruda

ÍNDICE

ABREVIATURAS.

1. INTRODUCCIÓN	
1.1.1 ¿Que es la transducción de señales?	1
1.1.2 Receptores de superficie celular	3
1.2 El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)	4
1.2.1 Vía de señalización del TGF- β	5
1.2.2 La estructura del TGF- β	6
1.2.3 Receptores del TGF- β	7
1.3 Los efectores intracelulares de la vía del TGF- β : las proteínas Smads	10
1.3.1 ¿Qué son las proteínas Smads?	10
1.3.2 Clasificación de las Smads	10
1.3.3 Mecanismo de acción de las Smads	12
1.3.4 Regulación de activación de las Smads	12
1.3.5 Complejos transcripcionales de las Smads	12
1.4 Vías de señalización de los TGF- β independientes de las Smads	13
1.4.1 La vía del proteosoma y el TGF- β	15
1.5 Correpresores y coactivadores	15
1.5.1 Ski y SnoN: correpresores de la vía de señalización del TGF- β	17
1.5.2 Mecanismo de acción de las proteínas Ski y SnoN	18
1.5.3 Regulación de la expresión de Ski y SnoN	19
2. ANTECEDENTES	23
2.1 Hipótesis	26
2.1.2 Objetivo general	26
2.1.3 Objetivos particulares	27

3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Líneas celulares	27
3.2 Ligandos	27
3.3 Anticuerpos	27
3.4 Cultivos celulares	28
3.5 Tratamiento celular con TGF- β y otros ligandos	28
3.6 Lisado de células	28
3.7 Inmunoprecipitación de extractos celulares	28
3.8 Western Blot	29
3.9 Ensayo de quimioluminiscencia	29
4. RESULTADOS	30
4.1 El inhibidor del receptor I del TGF- β bloquea la degradación del correpresor SnoN inducido por anisomicina	30
4.2 El SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por Anisomicina en forma dependiente de la dosis	32
4.2.1. El SB431542 revierte los efectos de degradación de la proteína Ski en células HeLa inducida por la anisomicina	33
4.3 El SB431542 bloquea los efectos de Anisomicina en forma dependiente del tiempo	34
4.4 Puromicina y cicloheximida causan la degradación de SnoN a través de un mecanismo similar a anisomicina	35
4.5 El ácido okadaico y el estrés osmótico también causan una regulación negativa en los niveles de la oncoproteína SnoN y el SB431542 también bloquea sus efectos	36
5. DISCUSIÓN	38
5.1 El inhibidor del receptor I del TGF- β bloquea la degradación de los corepresores Ski y SnoN inducida por la anisomicina	39

5.2 El SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por Anisomicina, en forma dependiente de la dosis y del tiempo	40
5.3 Puromicina y cicloheximida degradan a SnoN a través de un mecanismo similar al de anisomicina	41
5.4 El ácido okadaico y el estrés osmótico no causan una regulación negativa en los niveles de la oncoproteína SnoN	41
6. CONCLUSIONES	42
7. PERSPECTIVAS	43
8. BIBLIOGRAFÍA	44
9. APÉNDICE	47

Abreviaturas

ActR	Receptor de activina
ALK5	<i>Activine receptor like kinase</i>
ANISO	anisomicina
AMH	Hormona anti mulleriana
APC	Complejo Promotor de la Anafase
BMP	Proteínas Morfogenéticas del Hueso
C-terminal	Carboxilo Terminal
CDH1	<i>CDC20 homolog 1</i>
Co-Smad	Smad Común
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclinas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
CHX	cicloheximida
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ERK	Cinasa Relacionada a la Señalización Extracelular
HAT	Acetilasa de Histonas
HDAC	Desacetilasa de Histonas
I-Smad	Smad Inhibitoria
IP	Inmunoprecipitación
JNK	Cinasa de la Región NH ₂ -Terminal de Jun
MAD	Mothers Against Decapentaplegic
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MH1	Dominio 1 Homólogo a Mad
MH2	Dominio 2 Homólogo a Mad
MIS	Sustancia inhibidora Mülleriana
MEC	Matriz Extracelular
MeCP2	Proteína de unión a metil-CpG
MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
MKK	<i>MAPK Kinase</i>
NH₂-terminal	Amino Terminal

N-CoR	Correpresor de Receptor Nuclear
PBS	Solución de Buffer de Fosfatos
PDVF	Difluoruro de Polivinilideno
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomicina
PP2A	<i>Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A</i>
Puro	Puromicina
RAR	Receptor para Ácido Retinoico
R-Smad	Smad Regulada por Receptor
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RTKs	Receptor con actividad de tirosina cinasa
S6K	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase</i>
SAC	Complejo Activado de las proteínas Smad
Ski	<i>Sloan-Kettering Institute proto-oncogene</i>
SMA	Small body size
Smurf	<i>Smad ubiquitination-related factor</i>
SnoN	<i>Ski- related novel gene N</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SBE	Elementos de Unión a las Smad
SFB	Suero Fetal Bovino
SMA	Actina de Músculo Liso
SOCS	Supresores de la Señalización Mediada por Citocinas
TA	Temperatura Ambiente
Tβ	TGF- β
TAK1	<i>TGF-beta-activated kinase 1</i>
TβRI/II	Receptor de TGF- β tipo I/II
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TGIF	TG3-interacting factor
TNTE	Tris-NaCl-Tritón-EDTA
Ub	Ubiquitina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Transducción de señales

Tal vez nada es tan crítico para la sobrevivencia de los seres vivos, como la habilidad que posee una célula para sentir y responder a los estímulos externos del medio. En los organismos multicelulares para funcionar óptimamente es necesario que sus células se comuniquen unas con otras. El crecimiento celular, la migración, la diferenciación y la apoptosis son ejemplos de eventos celulares que son regulados por señales que las células reciben de su ambiente, a través de mecanismos como el contacto directo de unas células con otras, la interacción con moléculas de la matriz extracelular o vía estimulación por factores de señalización solubles.^{1,2,3,4}

En el ambiente extracelular existen cambios o estímulos que actúan directamente sobre una célula; estos deben ser detectados en la interfase de la célula y en su ambiente externo. Este estímulo crea la necesidad en la célula de llevar a cabo un tipo de respuesta adecuada, como pueden ser cambios en la expresión de un gen, a través del proceso de la transcripción (Figura 1). En este caso la señal sensada al nivel de la superficie celular debe ser comunicada a la maquinaria transcripcional en el núcleo, para lo cual se requiere la propagación o la transducción de la señal desde el citosol hasta el núcleo.^{1,2,3,4}

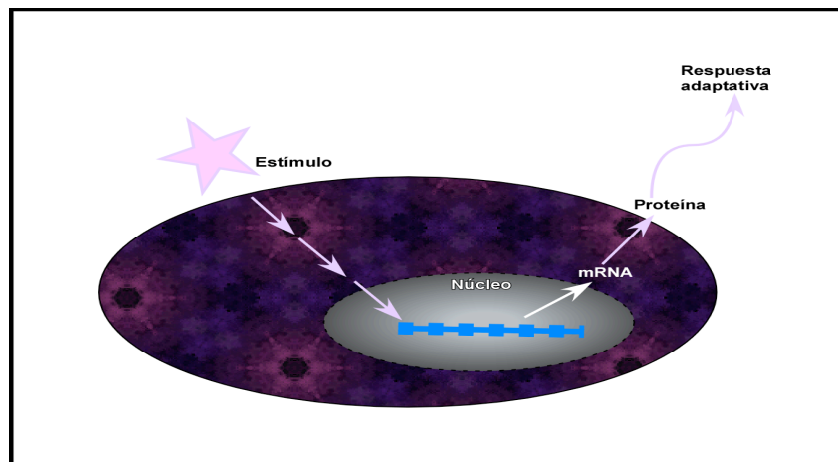


Figura 1. Esquema de un mecanismo de transducción de señales. El estímulo en una célula se traduce en una respuesta biológica. mRNA; RNA mensajero (Modificado de Cornell, et al 2005)

Las células han adoptado un amplio rango de vías de transducción de señales de una manera impresionante, lo cual hace más complejo este proceso biológico, sin embargo aunque algunos mecanismos generales se han conservado entre todos los organismos vivientes.^{1,2,3,4}

El proceso de transducción de señales involucra una serie de mecanismos conservados en una intrincada red de vías de señalización, que deben transmitir la señal a la maquinaria de la célula creando una respuesta celular, que en algunos casos resulta en una alteración de la expresión génica dentro del compartimiento nuclear.^{1,2,3,4}

El primer paso en este proceso involucra el inicio de una señal intracelular en respuesta a un evento extracelular o de membrana que generalmente requiere un *receptor* o un cambio en la membrana celular para sensar este estímulo. Después siguen una serie de eventos de *propagación de la señal* intracelular a través de interacciones proteína-proteína, donde el estímulo es llevado del citosol hasta el núcleo. En esta etapa existen numerosos efectores que son empleados justamente con el propósito de propagar la señal, esto incluye la fosforilación reversible de las proteínas, la movilización de iones calcio almacenados, la activación de mediadores derivados de lípidos, la acumulación o degradación de nucleótidos cíclicos y la estimulación de proteínas G. Finalmente la principal función de estas vías es permitir la regulación de o la expresión de novo de genes blanco, efectuando así la producción de proteínas que caracterizan la respuesta celular.^{1,2,3,4}

La transducción de señales es iniciada por cualquier número de estímulos que puedan influenciar las respuestas y actividades celulares. Entre los estímulos más relevantes podemos encontrar a los mediadores circulantes (citocinas, hormonas, factores de crecimiento), cambios osmolares, estrés mecánico y agentes patógenos.^{1,2,3,4}

1.1.2 Receptores de superficie celular

Dentro del contexto de la transducción de señales existen características básicas dentro de los sistemas de transducción de señales, existiendo cuatro mecanismos básicos de señalización (Figura 2). Los transductores más sencillos son los llamados canales iónicos de la membrana plasmática, que abren y cierran en respuesta a la unión de ligandos químicos o cambios en el potencial de membrana. El canal iónico del receptor de acetilcolina es un ejemplo claro de este mecanismo. El segundo mecanismo básico de señalización involucra a los receptores de membrana plasmática con actividad de enzima. Cuando uno de estos receptores es activado por su ligando extracelular, el receptor cataliza la activación de mediadores intracelulares. Este mecanismo es ilustrado con los receptores para el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que poseen actividad de cinasas de serinas y treoninas, y también por los RTKs que son receptores con actividad de cinasas de tirosinas. El tercer mecanismo de transducción puede ser ilustrado por el receptor β -adrenérgico que detecta la adrenalina, y que es mediado por su receptor de siete dominios transmembranales que activan indirectamente (a través de proteínas que unen GTP) enzimas que catalizan la producción de segundos mensajeros intracelulares. Por último existen en el núcleo muchas clases de receptores nucleares que al unirse a su ligando específico (como la hormona esteroidea estrógeno), alteran la tasa a la cual genes específicos son transcritos y traducidos a proteínas intracelulares.

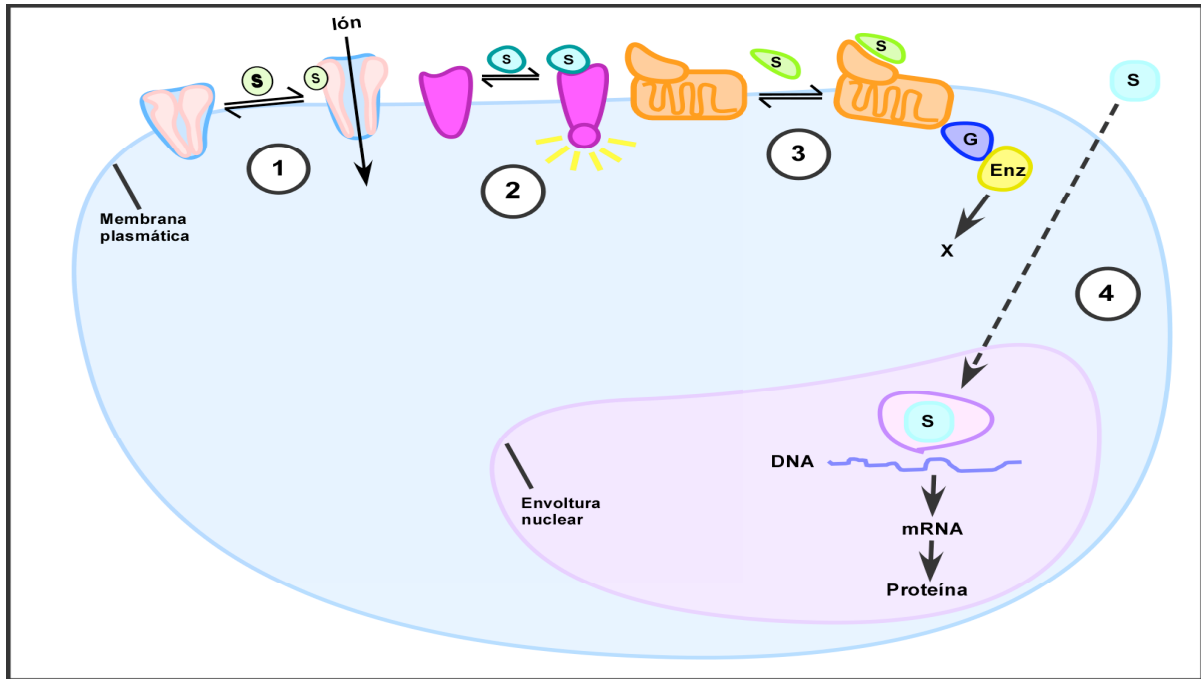


Figura 2. Cuatro mecanismos generales de la transducción de señales. 1) canales iónicos, 2) Receptores con actividad enzimática, 3) Receptores serpentina acoplados a proteínas G, 4) Receptores nucleares. (Modificado de Nelson & Cox 2000)

1.2 El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) comprende un grupo de citocinas multifuncionales que controlan muchos aspectos fundamentales de la conducta celular; como la migración, la adhesión, la diferenciación y la modificación del microambiente celular.^{3,4}

Esta familia comprende alrededor de 42 proteínas codificadas en el genoma humano, 7 en *Drosophila melanogaster*, y 4 en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, esto incluye al TGF- β en *stricto sensu*, las activinas y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs; *bone morphogenetic protein*), la hormona anti-mulleriana (AMH), la miostatina, y los nodales entre otras.⁵

En particular el TGF- β actúa como un potente inhibidor del crecimiento en la mayoría de los tipos celulares, incluyendo a las células epiteliales, las endoteliales, las hematopoiéticas y a los linfocitos. Además de esta función, el TGF- β actúa como un factor fibrogénico y es responsable de la fibrosis en órganos como el hígado, riñón pulmón, piel y otros tejidos.^{3, 4} Los miembros de esta superfamilia desempeñan papeles críticos y pleiotrópicos en el desarrollo y homeostasis del organismo, incluyendo distintos procesos celulares como la regulación de la proliferación celular, la remodelación de la matriz extracelular, la morfogénesis, participando en procesos como la angiogénesis y la vasculogénesis que ocurren durante el desarrollo embrionario^{3, 17}.

Los efectos que puede llevar a cabo el TGF- β son distintos y son dependientes del tipo celular sobre el cual actúa, por ejemplo el TGF- β promueve el crecimiento y el desarrollo durante la embriogénesis. Sin embargo en tejidos adultos en muchas células el TGF- β induce el arresto del ciclo celular o incluso la apoptosis. Entre estas células encontramos a las células epiteliales, endoteliales, hematopoiéticas, las células progenitoras neurales así como ciertos tipos celulares mesenquimales^{3, 4}.

Asimismo los miembros de la superfamilia del TGF- β pueden ser producidos por muchos tipos celulares como es el caso del mismo TGF- β , o bien ser sintetizados por unos cuantos tipos celulares como en el caso de la miostatina. La familia del TGF- β representa uno de los paradigmas más desconcertantes de la versatilidad regulatoria, pues por un lado el TGF- β puede llevar a cabo el crecimiento de tejidos, así como la morfogénesis en el embrión, sin embargo en los tejidos maduros el TGF- β favorece procesos de muerte celular para mantener la homeostasis⁴.

Como puede apreciarse el TGF- β despliega una gran variedad de funciones, esta multifuncionalidad característica del TGF- β depende del tipo y del estado celular, es decir del *contexto celular*.⁶

1.2.1 Vía de señalización del TGF- β

Hacia finales de la década de 1990 se delineó la vía de señalización central del TGF- β , involucrando a sus receptores de membrana y sus factores de transcripción SMAD.⁴ El TGF- β y sus factores relacionados son producidos como precursores diméricos, en los cuales la porción carboxilo terminal forma la porción activa del ligando al llevarse a cabo

un procesamiento proteolítico. Estos factores secretados se unen entonces a sus diferentes tipos de receptores con actividad de cinasa de serinas/treoninas: receptor tipo I y receptor tipo II.

El proceso de transducción de señales del TGF- β esta bien descrito y es básicamente el siguiente: cada ligando de la familia del TGF- β se une a pares específicos de sus receptores con actividad de cinasas de serinas y treoninas, formando complejos heteroméricos de estos receptores. El receptor tipo I es fosforilado y activado por el receptor tipo II, lo cual ha demostrado que determina la especificidad de la señalización del ligando dentro del complejo del receptor. La cinasa del receptor tipo II se encuentra constitutivamente activa, al unirse el ligando, el receptor tipo II activa la cinasa del receptor tipo I, a través de la fosforilación en el dominio yuxtamembranal GS (dominio rico en serinas y treoninas) del receptor tipo I. El receptor tipo I inicia el proceso de señalización intracelular a través de la activación de las proteínas Smads específicas que llevan la señal al núcleo, donde ahí junto con otras proteínas dirigen la respuesta transcripcional.^{19, 3}

Las Smads son una familia de proteínas que incluyen tres clases distintas: R-Smads, Co-Smads y las I-Smads. Las R-Smads se encuentran ancladas en la membrana celular, cuando las R-Smads interactúan directamente con y son fosforiladas por el receptor tipo I, forman complejos con las Co-Smads y migran hacia el núcleo, donde regulan la transcripción de genes blancos del TGF- β .³ (Figura 3).

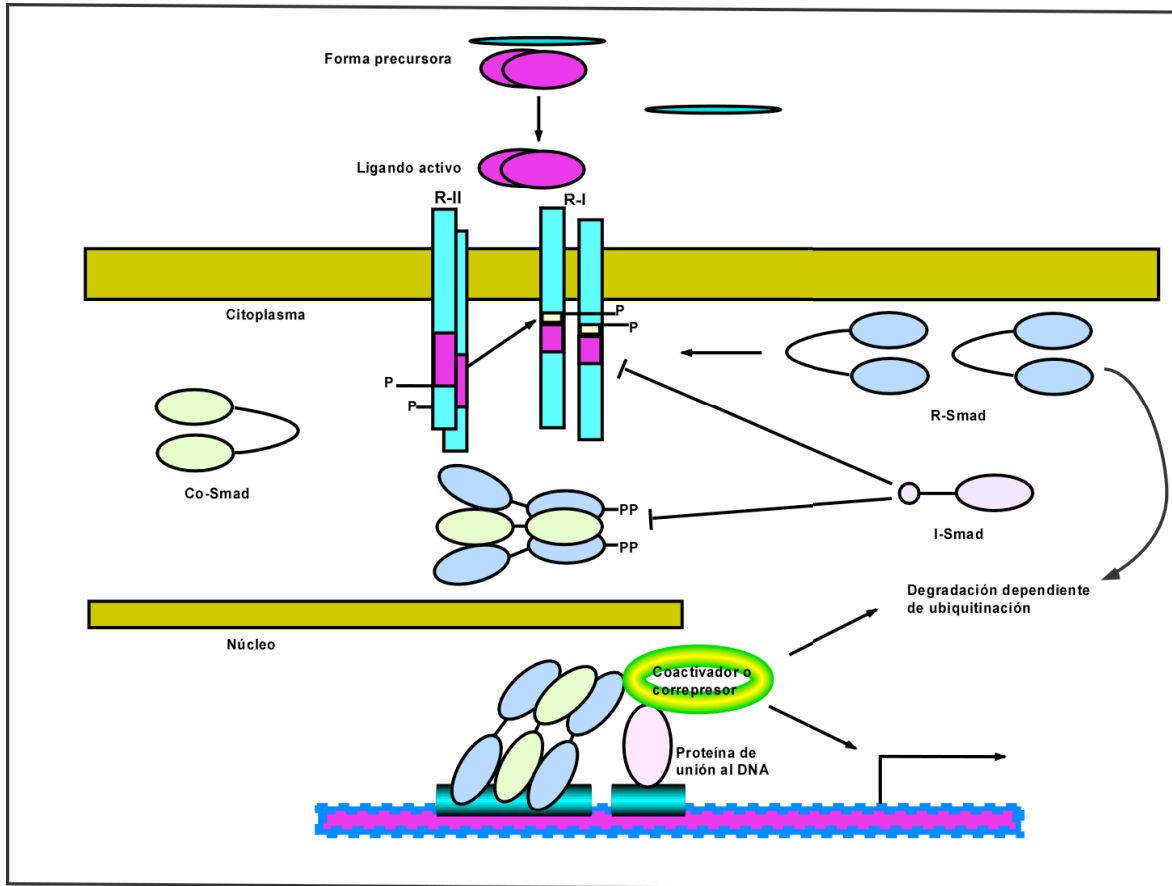


Figura 3. Vía de señalización del TGF- β a través de sus receptores con actividad de cinasas de serinas y treoninas y las proteínas Smads. RII y RI representan al receptor tipo II y tipo I respectivamente.

1.2.1 La estructura del TGF- β

El TGF- β es producido como un precursor dimérico inactivo (latente) dentro del espacio extracelular. Para que lleve a cabo sus funciones pleiotrópicas, el TGF- β latente requiere de una activación; como en muchas citocinas esta característica previene que se lleve a cabo una activación descontrolada de sus receptores. Se han descrito dos tipos de precursores latentes (pequeño y largo). El complejo *pequeño latente* (TGF- β -LAP) consiste de un dímero de TGF- β nativo (maduro) asociado con una proteína asociada a la latencia (LAP). El complejo *latente grande* contiene además del TGF- β -LAP más proteína de unión al TGF- β -latente (LTBP) que se une covalentemente a LAP. Las células de mamíferos expresan cuatro diferentes formas de LTBP, de las cuales solamente tres (LTBP-1, -3 Y -4) pueden asociarse con el TGF- β .

Se ha demostrado que la plasmina es uno de los activadores más importantes del TGF- β , pues disocia al TGF- β maduro de sus complejos latentes mediante un corte proteolítico. Otro de los activadores del TGF- β es la trombospondina (TSP) 1, que activa al TGF- β mediante cambios conformacionales en los complejos latentes.⁸ La forma activa del TGF- β esta conformada por un dímero estabilizado por interacciones hidrofóbicas, las cuales son reforzadas mediante puentes disulfuro, cada monómero comprende varias hojas plegadas β entrelazadas por puentes disulfuro, formando así una estructura llamada “nudos de cisteína”.⁹ (Figura 4).

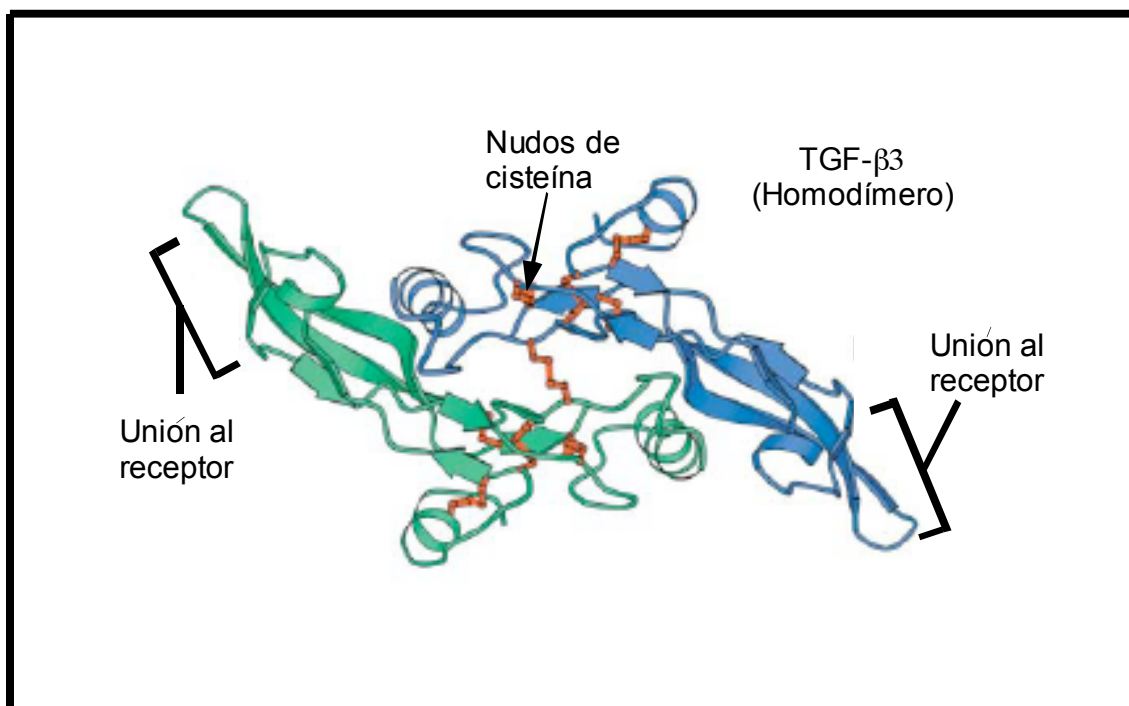


Figura 4. Estructura del ligando representativo del TGF- β , TGF- β 3. Los dos monómeros están coloreados de verde y azul respectivamente. Las cadenas de cisteínas y los puentes disulfuro están representados con color rojo. El ligando dimérico esta unido a través de puentes disulfuro (Tomado de Shi & Massagué, 2003).

1.2.3 Receptores del TGF- β

La gran variedad de respuestas del TGF- β son mediadas por la transducción de señales llevada a cabo por sus receptores transmembranales con actividad de cinasa de serinas y

treoninas, en el genoma humano codifica de 12 miembros (7 miembros de la familia de receptores tipo I y 5 miembros de la familia de receptores tipo II) todos dedicados a la señalización de la superfamilia del TGF- β . Ambos tipos de receptores poseen dominios de cinasa de serinas y treoninas, consistiendo en aproximadamente 500 residuos de aminoácidos, organizados secuencialmente en un dominio de unión al ligando extracelular N-terminal, una región transmembranal y un dominio de cinasas de serinas/treoninas en la región C-terminal.

Para llevar a cabo la señalización del TGF- β es necesaria la formación de complejos de estos receptores, con la característica de ser heteotetraméricos pues consisten de dos receptores tipo II (75-85 kDa), los cuales se unen al ligando y dos receptores tipo I (50-60 kDa) los cuales se encargan de transducir la señal y que en la mayoría de los casos no puede unirse al ligando directamente y por lo tanto se considera que actúan río abajo del receptor tipo II.

El ensamble de este complejo heterotetramérico es iniciado por la unión del ligando y es estabilizado por interacciones entre los dominios citoplasmáticos de los receptores tipo I y II. Se han propuesto dos modelos para explicar el ensamble en dos pasos del complejo de señalización funcional para el TGF- β . En el modelo alostérico la unión del ligando al receptor tipo II es requerida para inducir un cambio conformacional en el ligando, lo cual permite la exposición del epítipo de unión para el receptor tipo I. Una de las evidencias que apoya este modelo es que el T β RII une a la isoforma TGF- β 3 y este sufre un gran cambio conformacional comparado con su forma inicial. Por otro lado en el modelo cooperativo, el ectodominio del receptor tipo I interactúa con una superficie que permite la formación del complejo receptor tipo II-ligando. La unión del ligando dimérico a ambos dominios extracelulares de los receptores induce un la proximidad y una conformación adecuada de los dominios de cinasa intracelular, facilitando la fosforilación y la subsecuente activación del receptor tipo I.⁹

El receptor tipo II posee la característica de ser una cinasa activa constitutivamente de serinas y treoninas, llevándose a cabo la activación del dominio de cinasa del receptor tipo I, mediante la fosforilación del receptor tipo II, en varios residuos del dominio yuxtamembranal rico en glicinas y serinas (Dominio GS) del receptor tipo I. Se han llevado a cabo experimentos donde la mutación de un solo residuo de treonina a un

residuo de aspártico en la interfase del receptor, entre el dominio GS y el dominio de cinasa del receptor tipo I del TGF- β , resulta en una activación constitutiva, demostrando así que la cinasa del receptor tipo I es suficiente para llevar a cabo la transducción de señales del TGF- β .¹⁰

En los mamíferos solamente se han identificado cinco receptores tipo II y siete receptores tipo I, mientras que por otro lado se han identificado 27 ligandos de la superfamilia del TGF- β .¹¹ Las señales de las tres isoformas del TGF- β parecen ser mediadas por un solo tipo de receptor tipo II llamado T β R-II y por un receptor tipo I, también nombrado T β R-I o ALK5 (*activine receptor like kinase*)¹⁰.

En ausencia del ligando, los receptores tipo I y II existen como homodímeros en la superficie celular. El TGF- β 1, el TGF- β -3 y las activinas se unen a sus receptores tipo II sin la necesidad de un receptor tipo I. Algunos ligandos del TGF- β (por ejemplo TGF- β -2) interactúan solamente con combinaciones de los receptores tipo I y II, lo cual sugiere que los complejos de receptor heteroméricos se forman en ausencia de ligandos, lo cual es consistente debido a la inherente afinidad de los receptores. Esta baja afinidad entre los complejos heteroméricos, puede sugerir que provean de una superficie de unión a ligando que estabilizaría conformacionalmente al complejo. Por otro lado la unión del ligando a cualquiera de los complejos homodiméricos de los receptores, no es suficiente para activar la señalización. Por el contrario la activación del dominio de cinasa del receptor tipo I y su consecuente activación requiere de la fosforilación de su dominio GS llevado a cabo por el receptor tipo II en el complejo heterotetramérico. Se ha reportado que la unión del ligando a los dímeros de receptor tipo II pueden inducir autofosforilación del dominio citoplasmático, pero la señalización del receptor tipo II en ausencia del receptor tipo I no está reportado.¹¹

Las diferentes combinaciones entre en el complejo heterotetramérico de receptores permiten la unión del ligando diferencial o incluso la señalización diferencial en respuesta al mismo ligando. Una cierta combinación del receptor permite la unión de diferentes ligandos y los patrones de la expresión del ligando y del receptor dictan cuales receptores son activados. Por ejemplo T β RII interactúa no solamente con el “clásico” receptor tipo I T β RI/ALK5, el cual activa a Smad2 y Smad3, sino que también interactúa con el receptor ALK1 que activa a Smad1 y Smad5. Esta activación diferencial de

cualquier receptor en las células endoteliales induce respuestas diferentes al TGF- β , lo cual sugiere que puede existir un balance entre los controles de activación de las proteínas Smads según el estado del endotelio.¹¹

1.3 Los efectores intracelulares de la vía del TGF- β : las proteínas Smads

1.3.1 ¿Que son las proteínas Smads?

Se trata de una familia de proteínas homólogas que median la transducción de señales del TGF- β . Algunas Smads son factores de transcripción que son activados y translocados al núcleo en respuesta al TGF- β . El término Smad se deriva de la fusión de los nombres de sus miembros proteicos fundadores de la familia, la proteína MAD en *Drosophila* (Mothers Against Decapentaplegic) y la proteína SMA (Small body size) del gusano *Caenorhabditis elegans*.^{12, 13}

La evidencia inicial de que las Smads funcionan río abajo de los receptores del TGF- β fue proveída, por la habilidad de las mutaciones MAD para inhibir la señalización en una construcción de un receptor hiperactivo llamado ALK7. Pero la evidencia más convincente fue a partir de la observación que las Smads son fosforiladas en el carboxilo terminal y translocadas al núcleo en respuesta al TGF- β .^{14, 15}

1.3.2 Clasificación de las Smads

Basándose en consideraciones estructurales y funcionales las proteínas Smads se dividen en tres subfamilias^{14, 12}

- a) Las Smads activadas por el receptor (R-Smads), pues son substratos directos de las cinasas de la familia de receptores del TGF- β . Para el caso del TGF- β Smad2 y Smad3 se encuentran en esta subfamilia.
- b) Las Smads comunes (Co-Smads) que participan en la señalización al asociarse con las Smads reguladas por el receptor (R-Smads). El único caso reportado hasta el momento es Smad4.

c) Las Smads antagonistas o inhibitorias (I-Smads), pues inhiben la señalización de las otras dos subfamilias.

Existen ocho proteínas Smads en los vertebrados: Smad1 a Smad8, las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8 (R-Smads) están relacionadas con la activación en respuesta a las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP's), factores de crecimiento y diferenciación (GDF's) y la hormona anti-mülleriana /sustancia inhibidora Mülleriana (AMH/MIS) a través de los receptores ALK-2, ALK-3 y ALK-6. Mientras que Smad2 y Smad3 (R-Smads) son activadas a través de la fosforilación de los receptores de activina y TGF- β : ALK-5 (T β RI) y ALK-4 (ActRIB).^{11, 12}

Smad4 es el único miembro conocido en los vertebrados que colabora en la señalización iniciada por las R-Smads. Smad4 se asocia con las R-Smads que han sido fosforiladas por sus receptores correspondientes. Aunque Smad4 es muy parecida estructuralmente a las R-Smads, no es fosforilada normalmente en respuesta al TGF- β .

Smad6 y Smad7 (I-Smads) son estructuralmente divergentes a las demás Smads pues su única función conocida es la inhibición de la función de señalización de las R-Smads.¹⁴

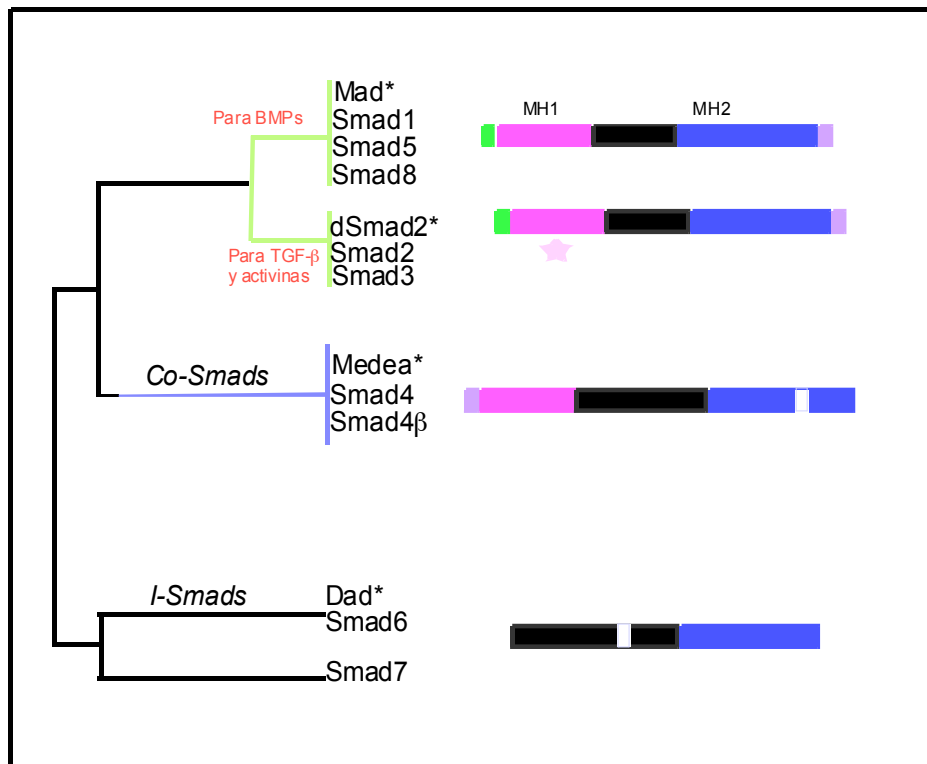


Figura 5. La familia de las proteínas Smad. Dendrograma simplificado representando la similitud en la secuencia entre las tres subfamilias Smad. Las Smads reguladas por el receptor (R-Smads) y las Smads comunes (Co-Smads) contienen un dominio N-terminal (MH1) y un dominio C-terminal

(MH2) separados por una región divergente. Solamente el dominio MH2 está conservado en las Smads inhibitorias (I-Smads). Las marcas en violeta representan la fosforilación mediada por el receptor en el carboxilo terminal de las R-Smads. La estrella representa el inserto alternativo de splicing en Smad2. Los asteriscos denotan los miembros representativos de *Drosophila*. (Tomado de Massagué & Wotton 2000)

1.3.3 Mecanismo de acción de las Smads

Las proteínas R-Smads activadas por fosforilación forman complejos heteroméricos con Smad4. Estos complejos son acumulados en el núcleo donde controlan la expresión de genes de una manera celular específica así como dependiente de la dosis del ligando, a través de la interacción con factores de transcripción, coactivadores y corepresores.^{3, 12}

1.3.4 Regulación de la activación de las Smads.

La interacción inducida por el ligando de las R-Smads con el receptor activado tipo I, da como resultado la fosforilación directa de dos serinas ubicadas en el C- Terminal de las Smads por la cinasa del receptor tipo I. Esta interacción es especificada por secuencias ubicadas tanto en el receptor como en la Smad. Los nueve aminoácidos en el asa 45 (L45) en la cinasa del receptor tipo I es el determinante mayor en la señalización del receptor y en la especificidad de unión de las Smads, pues interactúa directamente con el asa L3 del dominio MH2 de la R-Smad. Además el dominio GS (rica en glicinas y serinas) del receptor tipo I una vez fosforilada por la cinasa del receptor tipo II, provee una interfase con la secuencia río abajo del asa L3, estabilizando el acomodo y la interacción específica con las Smads.¹¹

1.3.5 Complejos transcripcionales de las Smads

Las proteínas Smads son efectores nucleares del TGF- β y pueden regular la transcripción tanto positiva como negativamente.^{3, 15} Smad2 y Smad3 tienen secuencias específicas con dominios de unión al DNA, aunque esta afinidad por el DNA es muy baja. En el estado basal los dominios MH1 y MH2 de las R-Smads y de Smad4 interactúan unos con otros, inhibiendo sus funciones entre si, pues el dominio MH2 reprime la unión al DNA

mediada por el dominio MH1, mientras que el dominio MH1 inhibe la función de transactivación del dominio MH2.¹⁶

Debido a que las Smads poseen una baja afinidad por el DNA, requieren de la cooperación de factores de transcripción que reconocen secuencias específicas en los promotores de los genes blancos del TGF- β . Los factores de transcripción actúan como determinantes en la especificidad de la respuesta, pues pueden ser específicos según el tipo celular. Estos factores de transcripción que interactúan con las Smads dictan la respuesta precisa de un ligando en diferentes tipos celulares, en cooperación con otras vías de señalización. Para regular la transcripción, los complejos activados de las Smads interactúan con coactivadores o corepresores.¹⁶ Es aquí donde las Smads deben llevar a cabo una importante “decisión” en el núcleo, donde deben decidir si los complejos activos de las Smads deben activar o reprimir la transcripción de genes blancos., las proteínas Smads pueden unirse a correpresores transcripcionales como TGIF (*TG3-interacting factor*), Ski (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*) y SnoN (*Ski-related novel gene N*).¹²

1.4 Vías de señalización del TGF- β independientes de las Smads.

El TGF- β puede llevar a cabo sus efectos a través de otras vías de señalización independientes de la vía clásica de las Smads, incluyendo la vía de las MAPK. Algunas de estas vías regulan la activación de las Smads, pero otras pueden inducir respuestas que no están relacionadas con la transcripción de genes blanco.

El TGF- β puede activar la vía de las MAPK tales como ERKs, JNKs y p38. La activación de estas vías parece ser muy rápida (5-15 minutos) lo que sugiere un mecanismo independiente de la transcripción de genes e independiente de las Smads. Existen estudios en células deficientes de Smad4 o expresando dominantes negativas de Smads, donde se ha observado la activación de las MAPK. Mientras que experimentos, donde se lleva a cabo una mutación que imposibilita al Receptor tipo I del TGF- β para la activación de las Smads, demostraron la activación de la MAPK p38 en respuesta al TGF- β . La rápida activación de Ras mediada por el TGF- β en células epiteliales, implica

a Ras en la activación de la MAPK ERK inducida por el TGF- β . El TGF- β pueden activar a TAK1 (*cinasa 1 activada por TGF- β*) un miembro de la familia de las MAPKKK, así como MEKK1, que podrían activar a JNK a través de un intermediario como la MAPK 4 (MKK4), y también activar a la MAPK p38 a través de MKK3 o MKK6. Sin embargo, estos mecanismos de la activación de MAPK como p38, ERK o JNK a través del TGF- β y sus consecuencias biológicas aún no se han estudiado con detalle.

Por otro lado, la activación de ERK y JNK también puede resultar en la fosforilación de las Smads y regular su activación. La actividad dual que posee el TGF- β de activar las Smads y la señalización de las MAPK posee un papel importante en la transdiferenciación epitelio- mesénquima inducida por el TGF- β . El TGF- β también puede activar a las GTPasas pequeñas de la familia de Rho (como RhoA, Rac y Cdc42), mediando cambios inducidos por el TGF- β , en la organización del citoesqueleto así como la transdiferenciación epitelio-mesénquima. La activación de RhoA y su cinasa efectora p160, así como Cdc24, p38 y la señalización mediada por las Smads están implicadas en la formación de fibras de estrés inducidas por el TGF- β , así como en la transición epitelio-mesénquima.¹¹

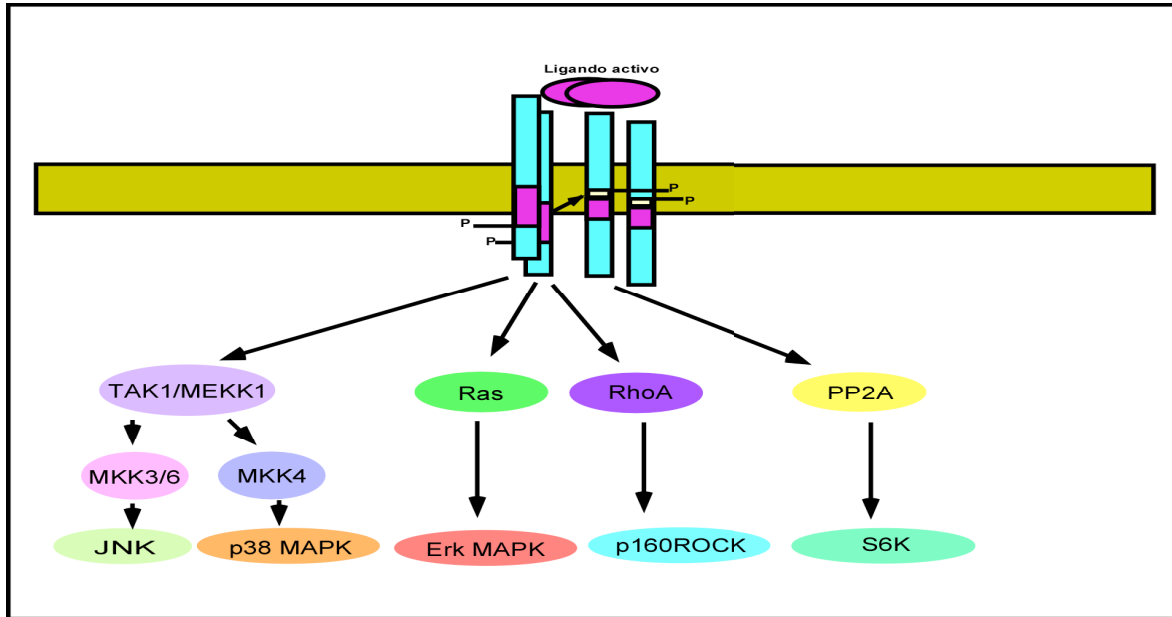


Figura 6. *Vías de señalización del TGF- β independientes de las proteínas Smads.* Existen proteínas que pueden asociarse con los receptores tipo I y tipo II y regular la señalización del TGF- β sin un efecto directo en la activación de las Smads. El complejo del receptor activo puede activar vías de señalización independientes de las Smads, como MAPK, PP2A, y TAK1/MEKK1. (Tomado y modificado de *Derynck & Zhang 2003*)

1.4.1 La vía del proteosoma y el TGF- β .

La vía del TGF- β /Smads es controlada por el sistema de ubiquitina-proteosoma.^{20, 21} La degradación vía el sistema del proteosoma es una cascada conservada evolutivamente. El nivel basal de proteínas Smads en las células no estimuladas y los niveles de Smads subsecuentes a la activación de la vía son controladas por la ubiquitinación, así como los receptores del TGF- β y los correpresores de la señalización del TGF- β ; Ski y SnoN.

Las ligasas de ubiquitina del tipo E3 son proteínas componentes del complejo de degradación del sistema del proteosoma, pues reconocen a las proteínas marcandolas para su degradación. Smurf2 (*Smad ubiquitination-related factor 1*) y SCF/Roc1 son ligasas de ubiquitina del tipo E3 que están involucradas en la degradación de las Smads. Las proteínas Smurfs son de particular importancia en la señalización del TGF- β .

Las Smads además de ser los efectores intracelulares del TGF- β también funcionan como adaptadores de las proteínas Smurf hacia varios componentes de la vía; incluyendo los complejos de receptores del TGF- β , el correpresor transcripcional SnoN, y por lo tanto, regulan la degradación de estas proteínas. Las proteínas Smurf al controlar los niveles de las Smads, así como de los reguladores positivos y negativos de la vía del TGF- β , controlan de una manera fina y compleja el apagado de la señal del TGF- β .²¹

1.5 CORREPRESORES Y COACTIVADORES

La expresión genética en los eucariotes en respuesta a estímulos del ambiente y del propio desarrollo del individuo es un fenómeno complejo que involucra la activación o represión de genes debido a la acción de represores o activadores transcripcionales. Recientemente se han identificado correguladores que interactúan con factores de transcripción de unión al DNA y juegan un papel esencial en la función de estos factores de transcripción. Estas proteínas correguladoras pueden reclutar complejos multiproteicos que pueden funcionar para modular la transcripción de genes blancos. Los correguladores transcripcionales pueden ser divididos en *coactivadores* que median la activación génica y los *correpresores* que median la represión de genes.

Los correpresores albergan una habilidad intrínseca para la represión de genes, pues reprimen activamente la transcripción, sin unirse al DNA directamente. Estos correpresores son reclutados por factores de transcripción que se unen a regiones reguladoras de genes blanco y que contribuyen a la habilidad represora de los represores transcripcionales o bien reprimen la actividad transcripcional de los activadores de genes. Los correpresores no son solamente reclutados por una pequeña selección de represores transcripcionales, pues ellos se unen y pueden mediar la función de un amplio espectro de reguladores transcripcionales. Existen correpresores específicos que son utilizados por represores transcripcionales particulares. Además interacciones específicas de correpresores particulares con represores pueden permitir el reclutamiento adicional de complejos de proteínas que también contienen una función intrínseca de represión, incrementando así la represión transcripcional.³⁶

Lo anterior tal vez podría ser mejor ilustrado por varios mecanismos utilizados para reclutar las enzimas desacetilasas de histonas (HDAC) que regularmente están asociadas con las funciones de los correpresores. El reclutamiento indirecto de la actividad de las HDACs involucra diferentes patrones de interacción dependiendo del regulador transcripcional. Algunos represores transcripcionales son capaces de unirse directamente a las HDACs o utilizar tanto el reclutamiento directo o indirecto de las HDACs para reprimir la transcripción.³⁶ (Figura 7)

Los correpresores han demostrado ser esenciales para un amplio rango de vías de señalización y mecanismos homeostáticos, incluyendo la diferenciación, el desarrollo, la proliferación celular y la apoptosis. La importancia de la interacción de los corepresores y su función son críticas para la acción de supresores de tumores, la regulación del ciclo celular, así como de proteínas involucradas en la regulación del estatus de metilación del DNA.³⁶

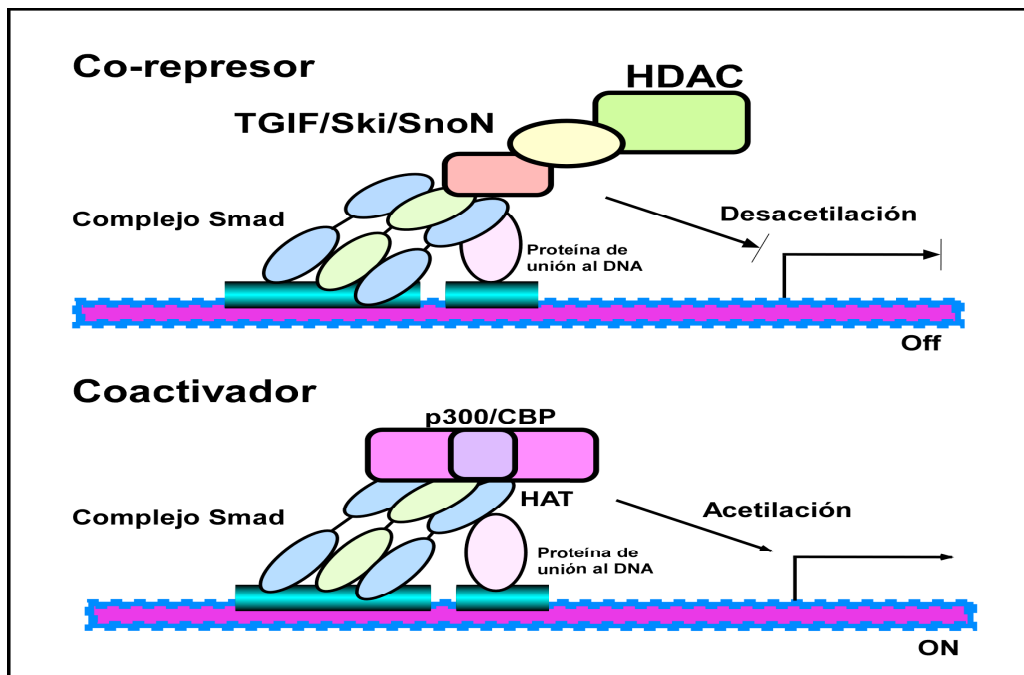


Figura 7. *Regulación transcripcional por el reclutamiento de coactivadores o correpresores transcripcionales.* A) Los coactivadores transcripcionales (p300/CBP) inducen la acetilación de las histonas a través del dominio de acetiltransferasa de histonas (HAT), activando así la transcripción. B) Los correpresores transcripcionales (TGIF, Ski, SnoN) reclutan desacetilasas de histonas (HDACs) vía directa o indirecta al unir moléculas como N-CoR y mSin3A. Juntos reprimen la transcripción de genes al desacetilar las histonas. (Tomado de Miyazono, 2000).

1.5.1 Ski y SnoN: Correpresores de la vía de señalización del TGF- β .

Ski y SnoN son proto-oncoproteínas, pues ambas pueden inducir tanto transformación oncogénica como la diferenciación en músculo terminal cuando están expresadas a altos niveles.¹² Los proto-oncogenes Ski (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*) y SnoN (*Ski-related novel gene N*) son correpresores de las proteínas Smads, al unir desacetilasas de histonas, cuyos efectos permiten la condensación de la cromatina y evitando la transcripción de los genes blancos.¹²

Ski y SnoN fueron identificados primeramente como proteínas transformantes, el primero fue v-Ski el retrovirus Sloan-Kettering de aves, que inducía la transformación oncogénica en células de embriones de pollo. Posteriormente fueron clonados los genes que codificaban para los homólogos celulares de humano, c-Ski y la proteína relacionada muy cercanamente c-SnoN, así como tres formas alternativas de splicing de SnoN (SnoN2, SnoI y SnoA). También se han identificado sus homólogas en el ratón, *Xenopus*, pollo, pez cebra y en tilapia. Tanto c-Ski y c-SnoN son proteínas nucleares de 728 y 684 aminoácidos respectivamente.¹⁷ (Figura 8).

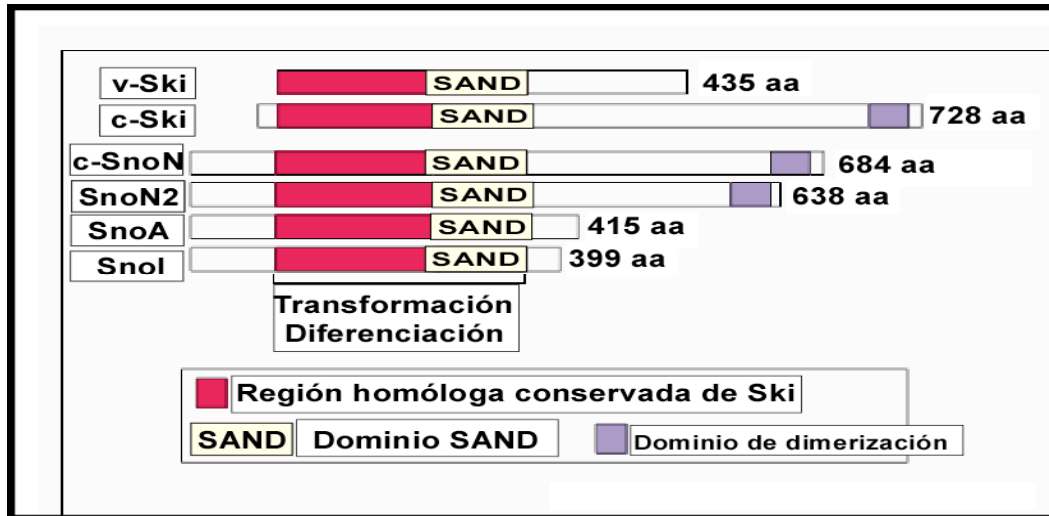


Figura 8. *Dominios estructurales de la familia de proteínas Ski*. El número de aminoácidos que los forman, esta indicado a la derecha de cada proteína. El dominio de alta homología conservada en Ski esta resaltado en rojo (Incluyendo el dominio SAND). Esta región es necesaria y suficiente para las funciones transformantes y de diferenciación de Ski y de SnoN. El dominio de dimerización del carboxilo terminal media la homo y heterodimerización entre Ski y SnoN. (Tomado de Luo, 2004)

1.5.2 Mecanismo de acción de las proteínas Ski y SnoN

Los correpresores Ski y SnoN no poseen alguna actividad catalítica intrínseca, por lo que su función debe ser a través de las interacciones que establecen con otras proteínas. Ski y SnoN pueden interactuar con Smad2, Smad3 y Smad4 y reclutarlas a los elementos de unión a Smads, los cuales están presentes en la mayoría de los genes responsivos al TGF- β . Esta interacción reprime la habilidad de las Smads para activar los genes blanco del TGF- β . Cabe señalar que Ski presenta una dominio de unión a Smad4, la cual empalma perfectamente con la superficie requerida para la unión del C- terminal fosforilado de las R-Smads. Como resultado tenemos que la unión de Ski o SnoN interfiere con la interacción entre Smad4 y las R-Smads. Este es uno de los principales mecanismos a través del cual Ski/SnoN reprimen la función de las Smads.

Además de la interacción con las Smads, Ski/SnoN también pueden interactuar con varios correpresores transcripcionales como N-CoR (correpressor del receptor nuclear a hormonas), mSin3A, HIPK2 y MeCP2 (proteína de unión a metil-CpG), que podrían ser componentes del complejo de desacetilasas de histonas.

Al unirse a las Smads, Ski y SnoN pueden reclutar este complejo de represores transcripcionales hacia los promotores de los genes blanco del TGF- β , reprimiendo así la transcripción de dichos genes. (Figura 9). Ski y SnoN también previenen la unión de los coactivadores p300 y CBP con las Smads.

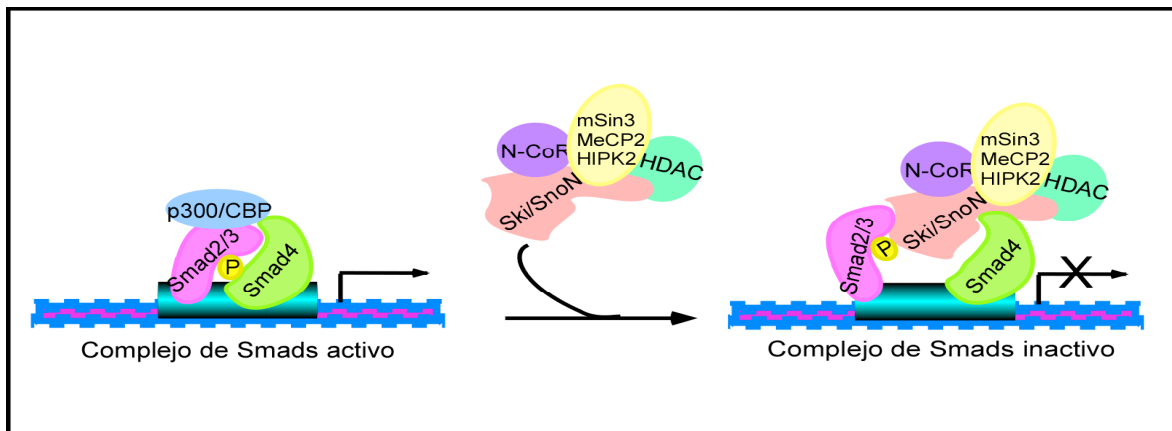


Figura 9. Mecanismo de represión de las proteínas Smad por Ski y SnoN. HDAC, complejo de desacetilasas de histonas. (Tomado de Luo, 2004)

1.5.3 Regulación de la expresión de Ski y SnoN

En contraste con la interacción entre las Smads y TGIF, la cual es inducida por la estimulación con TGF- β , la interacción de las Smads con Ski y SnoN es observada en condiciones basales y desaparece durante las primeras horas de la estimulación con TGF- β . Este efecto parece ser dependiente del tipo celular y TGF- β induce la degradación mediada por el proteosoma de estas proteínas.⁷

Ski y SnoN se encuentran prácticamente en todos los tejidos embrionarios y adultos pero en muy bajos niveles. La regulación positiva de la expresión de Ski y SnoN se detecta

solamente en tejidos específicos y en ciertos tipos celulares durante etapas definidas del desarrollo embrionario y en algunas células de cáncer humano.

Inmediatamente después de la estimulación con TGF- β , Smad2 y Smad3 se translocan al núcleo induciendo una rápida degradación de SnoN, permitiendo la activación de los genes blancos del TGF-beta.

La degradación de SnoN requiere de la ubiquitinación dependiente del proteosoma y puede ser mediado por dos tipos de ligasas de ubiquitina; el complejo promotor de la anafase (APC) y Smurf2. (Figura 10).

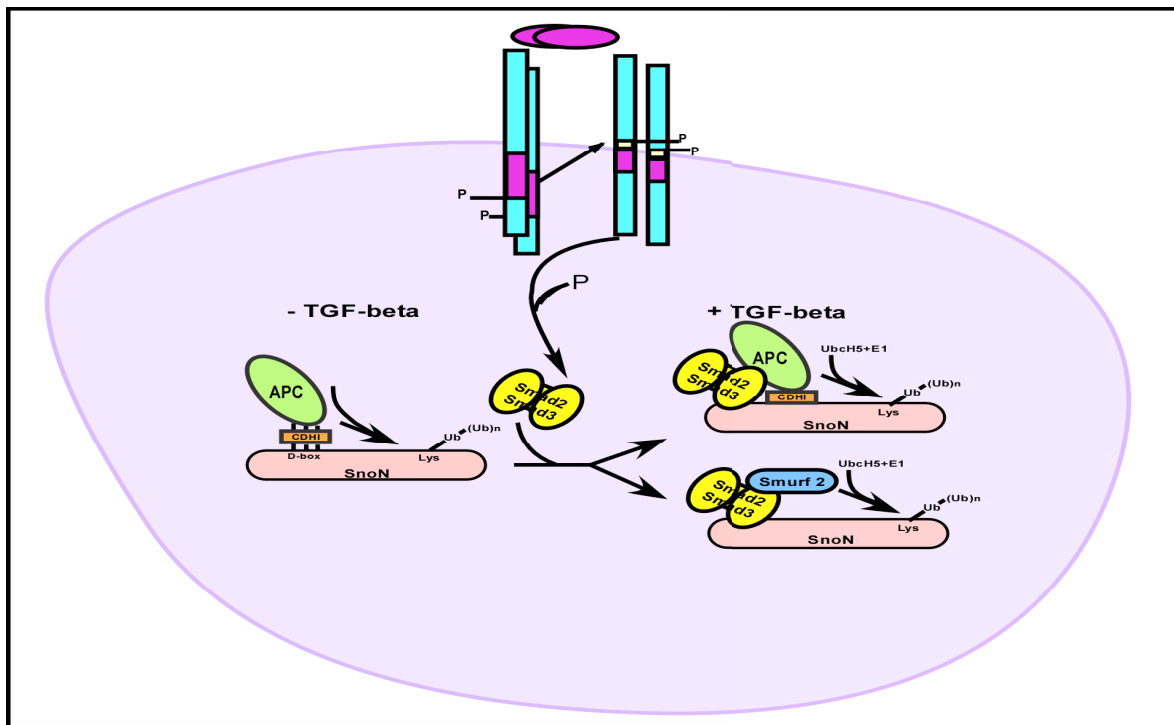


Figura 10. Mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por el TGF-beta mediante la vía del proteosoma 26S. Ski y SnoN se unen a los complejos de las Smads activos, y regulan de manera negativa su función. La interacción de Ski y SnoN con el complejo de las Smads activo, también promueve la degradación de los correpresores mediante la vía del proteosoma 26S. Smurf2 y APC (Complejo promotor de la anafase) son dos ligasas de ubiquitina del tipo E3 que interactúan con el correpresor SnoN. Para la degradación de SnoN es necesario que Smurf2 se una con el complejo Smad2/3. SnoN posee la secuencia *Dead box* que es reconocida a su vez por la proteína CDH1 que se une a APC. (Modificada de Stroschein et al, 2001).

Smad2 y Smad3 pueden reclutar por medio de una interacción directa, estas ligasas de ubiquitina a SnoN; lo cual da como resultado la ubiquitinación de SnoN en tres residuos de lisinas (Lys440, Lys446 y Lys449) y su subsecuente degradación. Se ha reportado que dentro de las siguientes dos horas el TGF- β induce un marcado incremento en el mRNA de *sno* al activar su transcripción. Una de las funciones de este incremento tardío en la expresión de *sno* puede ser el apagado de la señal del TGF- β a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Este mecanismo podría proveer una regulación coordinada y precisa de la duración, intensidad y potencia de la señalización del TGF- β .¹⁷

SnoN (*Ski-related novel gene N*) y Ski (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*) pertenecen a la familia de proteínas nucleares *Ski*. Se ha sugerido que Ski y SnoN poseen una actividad oncogénica, pues la sobreexpresión de Ski o de SnoN dispara la transformación oncogénica de fibroblastos de embriones de pollo. Estudios recientes han demostrado que las Smads reguladas por el TGF- β (Smad2, Smad3 y Smad4) interactúan y reclutan a Ski y a SnoN a los elementos de unión a Smads (SBE) dentro de los promotores de los genes blanco del TGF- β .

SnoN y Ski sobreexpresados actúan como represores transcripcionales de los genes inducidos por el TGF- β . La habilidad de Ski y SnoN sobreexpresados, para bloquear la expresión génica inducida por la señal inducida por el TGF- β y el arresto en el ciclo celular se piensa que explica cómo Ski y SnoN promueven la proliferación celular y la transformación. Un punto de vista generalmente aceptado, es que Ski y SnoN inhiben la actividad basal de los promotores de los genes responsivos al TGF- β .

La estimulación de las células con el TGF-beta permite la ubiquitinación de Ski y SnoN vía el reclutamiento dependiente de Smad2/Smad3 de las ligasas de ubiquitina Smurf2 y el complejo promotor de la anafase (APC). La ubiquitinación de Ski y SnoN y su subsecuente degradación es propuesta para remover la inhibición de Ski y SnoN en la vía de señalización del TGF- β .

Los efectos de la sobreexpresión de Ski y SnoN se encuentran muy bien caracterizados en la señalización del TGF- β , mientras que el papel de Ski y SnoN a nivel endógeno en la señalización del TGF-beta aún sigue en estudio. Sin embargo se sabe que los ratones que poseen el gen de SnoN deletado mueren desde la etapa embrionaria, mientras que los

ratones que poseen solamente una copia del gen de SnoN, es decir que son heterocigos, poseen una incidencia incrementada de linfomas espontáneos o inducidos carcinogénicamente. Además en las células T y en los fibroblastos de ratón del tipo SnoN +/- se observan tasas incrementadas en la proliferación, comparándolas con células T y fibroblastos de embriones de ratones silvestres. Estos datos sugieren que SnoN inhibe la proliferación celular a nivel endógeno y puede ser considerado un supresor de tumores, sin embargo estos datos contradicen lo que se conoce acerca de los efectos de la sobreexpresión de SnoN ya que en este caso favorece proliferación y por tanto se comporta como un oncogen.

En contraste, existen reportes de un segundo ratón knock-out, en el cual el exón 1 de SnoN fue deletado, observándose que estos ratones pudieron evadir los efectos letales en la etapa embrionaria. Existe evidencia en conjunto sugiriendo que la proliferación dependiente de las células deficientes de SnoN, es contradictoria con el incremento parcial en la sensibilidad al TGF- β endógeno.³⁴ Estos antecedentes nos dan un amplio panorama sobre las funciones que lleva a cabo SnoN que no han sido dilucidadas por completo.³⁴

2. ANTECEDENTES.

Existen distintos mecanismos mediante los cuales la transducción de señales del TGF- β puede ser regulada. La vía del TGF- β posee mecanismos de retroalimentación tanto negativa como positiva. Uno de los mecanismos de regulación positiva del TGF- β , es la inducción de la transcripción de ligandos y de sus componentes de señalización a través de la acción de factores relacionados con el TGF- β . Por ejemplo las tres isoformas del TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) en los mamíferos son auto-inducidas e inducidas entre sí por las diferentes isoformas del TGF- β .² Asimismo los factores de transcripción que funcionan como blancos del TGF- β son también inducidos por la estimulación con el ligando. Por ejemplo el TGF- β induce la producción del factor de transcripción Runx3 en los linfocitos B.³

La regulación negativa del TGF- β puede ser llevada a cabo por distintos mecanismos y a diferentes niveles celulares. Las Smads inhibitorias (I-Smads) funcionan como antagonistas de la señalización de las R-Smads y las Co-Smads, y también se ha reportado que compiten con las Co-Smads para la formación de los complejos con las R-Smads. Es importante recalcar que el estímulo del TGF- β es suficiente para regular positivamente la expresión de las I-Smads. En el caso particular de la vía del TGF- β , Smad7 es un potente inhibidor de esta vía de señalización. Así es como las I-Smads, Smad6 y Smad7, llevan a cabo una retroalimentación negativa en las vías de señalización activadas por la superfamilia del TGF- β .³

Cabe señalar que la señalización de las Smads también puede ser modulada de forma positiva o negativa por medio de una regulación cruzada con otras vías de señalización. Se ha reportado, que las Smads pueden ser activadas por las señales de los receptores con actividad de cinasas de tirosina, aunque solo en ciertas condiciones. Como ya habíamos mencionada anteriormente el TGF- β también puede activar a otras vías de señalización, distintas a la vía de las Smads, como a las tres vías distintas de las MAPK: Erk, JNK y p38.³

Por otro lado, dentro de los procesos que tienen gran repercusión en la regulación de la vía del TGF- β tenemos a la vía del proteosoma 26S, que actúa regulando negativamente la vía del TGF- β .³ La vía del proteosoma, así como otras vías de señalización como la vía

de las MAPK están implicadas en los mecanismos de regulación de la transducción de señales del TGF- β .^{3, 11, 20, 21} Por un lado las proteínas Smads, al ser mediadores críticos de la vía de señalización del TGF- β , son blancos para la vía del proteosoma 26S, regulando los niveles basales de estas proteínas. Tanto los receptores del TGF- β , como las R-Smads (Smad2/3) son degradados vía el proteosoma 26S, apagando de esta forma la señal. Mientras que los correpresores Ski y SnoN son degradados también vía el proteosoma, pero mediante un mecanismo dependiente de las Smads y de las ligasas de ubiquitina E3, Smurf2 o el complejo promotor de la anafase (APC), manteniendo de esta forma la señal del TGF- β encendida.^{21, 22}

Uno de los mecanismos de regulación negativa más importante dentro de la señalización del TGF- β ocurre dentro del núcleo y es llevada a cabo por los correpresores Ski y SnoN, como ya se había mencionado anteriormente, al interrumpir los complejos de las R-Smads y Co-Smad activos o secuestrar los complejos y llevarlos hacia el citoplasma.²²

La regulación de un correpresor de la vía del TGF- β hasta hace poco, era exclusiva del estímulo del propio TGF- β , sin embargo Wotton & Massagué en el 2001, observaron que el factor de crecimiento epidermal (EGF) por medio de la vía Ras-Mek-Erk fosforila y estabiliza a TGIF; reforzando los niveles basales *in vivo* de TGIF, así como los complejos formados por las Smads y TGIF inducidos por el TGF- β .²³ Con estas observaciones se identificó a la vía de Ras como el primer regulador conocido de TGIF, sugiriendo una conexión entre la vía de Ras y la vía de las Smads.

La vía de señalización del TGF- β también hasta hace poco, era la única señal conocida que llevaba a cabo una regulación negativa sobre los niveles de las oncoproteínas Ski y SnoN, mediada por la vía del proteosoma 26S.^{24, 22, 21} Esta degradación de los niveles basales de los correpresores Ski y SnoN es dependiente de las proteínas R-Smads, así como de las ligasas de ubiquitina del tipo E3, Smurf2 o el complejo promotor de anafase (APC).^{21, 22} Ski y SnoN participan en la modulación de la señalización del TGF- β , se tiene reportado que SnoN se une débilmente a Smad3 en ausencia del estímulo del TGF- β , pero se une fuertemente a Smad3 después de la fosforilación inducida por la cinasa del receptor tipo I.²⁴ Esta asociación reduce significativamente la habilidad de Smad3 de activar la transcripción. Esta degradación de los dos correpresores de la vía inducida por la señalización del TGF- β , nos habla de un mecanismo de regulación positiva, inducido

por el propio TGF- β . Sin embargo, Ski y SnoN pueden al mismo tiempo inducir un mecanismo de retroalimentación negativa con la señalización del TGF- β , pues se tiene reportado que después de una hora de estimulación con el TGF- β , los niveles de Ski y SnoN se recuperan, es decir Ski y SnoN muestran un comportamiento bifásico después del tratamiento con el TGF- β .

Recientemente Vázquez-Macías y colaboradores, publicaron un trabajo en donde encontraron otro mecanismo de degradación de los corepresores Ski y SnoN inducido por un compuesto llamado anisomicina. El proyecto partió desde la importancia que posee el proteosoma en la regulación de los corepresores Ski y SnoN, considerando investigar más acerca de otras vías de señalización que pudieran estar implicadas en los procesos que pudieran estar modulando el proteosoma y sus posibles efectos en los niveles de los corepresores Ski y SnoN.²⁷

La anisomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas y también es una herramienta típica para la activación de las MAPK, como c-jun NH(2)-terminal kinase (p46/54(JNK)) y p38(MAPK) en células de mamíferos. La anisomicina es un antibiótico aislado de varios cultivos de *Streptomyces*, que es tóxico para las plantas, ciertos protozoarios y también hacia algunas levaduras. Se sabe que la anisomicina inhibe la síntesis de proteínas, al inhibir la actividad de peptidil transferasa o el sistema del ribosoma 80S.²⁷

Vázquez-Macías y colaboradores pensaron en la posibilidad de encontrar un mecanismo por el cual los corepresores Ski y SnoN pudieran ser regulados mediante la vía de las MAPK. Para ello utilizaron el compuesto llamado anisomicina que causa la activación de la vía de las MAPKs; como p38, SAPK/JNK y ERK1/2. Utilizaron la anisomicina como una herramienta para activar la vía de las MAPK y elucidar de esa forma una regulación de Ski y de SnoN. Sin embargo los resultados fueron inesperados, pues la anisomicina por si misma regulaba de forma negativa los niveles de Ski y SnoN, de una manera dependiente del proteosoma, pero independiente de la activación de la vía de las MAPK, así como de los procesos de síntesis de proteínas y de la activación de las Smads.²⁷

A su vez reportaron que este mecanismo es dependiente del contexto celular, pues este efecto solamente es observado en las líneas celulares HeLa y A549, pero no en la línea celular HepG2. Este trabajo surge directamente del trabajo de Vázquez-Macías y

colaboradores, con el objetivo de profundizar en el estudio del mecanismo de degradación de los corepresores Ski y SnoN inducido por la anisomicina.

En este trabajo nos enfocamos en estudiar los efectos del inhibidor de la actividad de cinasadel receptor tipo I del TGF- β , sobre la regulación negativa de SnoN inducida por anisomicina.

Debido a que Ski y SnoN son correpresores exclusivos de la vía del TGF- β , se ideó inhibir la señalización del TGF- β mediante el bloqueo del receptor I del TGF- β (ALK5), y posteriormente observar el efecto de anisomicina. Para ello utilizamos al inhibidor SB431542 que inhibe la actividad de las cinasas de algunos de los receptores parecidos a activina (ALKs), que es un potente y selectivo inhibidor de los receptores filogenéticamente relacionados ALK4, ALK5 y ALK7, y que inhibe la señalización endógena del TGF- β y de las Activinas.^{33, 34}

Entre sus efectos fisiológicos, se ha reportado que este inhibidor puede regular los efectos promotores y supresores de tumores del TGF- β , incluyendo la transición epitelio mesénquima (EMT) inducida por el TGF- β , la motilidad celular, la migración, la invasión y la secreción de factores de crecimiento en el endotelio vascular, entre otros efectos.^{33, 34}

2.1 HIPÓTESIS

Si el inhibidor del receptor I del TGF- β (SB431542) esta bloqueando la degradación de los corepresores Ski y SnoN inducida por anisomicina, entonces ALK5 o una proteína análoga a la cinasa de ALK5 está implicada en la cascada de señalización que lleva a la degradación de SnoN por anisomicina.

2.1.2 OBJETIVO GENERAL

- Dilucidar el mecanismo mediante el cual la anisomicina esta induciendo la degradación de los corepresores Ski y SnoN.

2.1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto del SB431542 (inhibidor de la actividad de cinasa del receptor I del TGF- β) sobre la degradación de SnoN inducida por anisomicina, en células A549.
- Estudiar el efecto de otros inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida y la puromicina, sobre los niveles de SnoN en células A549, con el fin de mimetizar el efecto de anisomicina.
- Investigar los efectos de la inducción de vías de estrés, como son la hiperosmolaridad y la inhibición de fosfatasas, sobre los niveles de SnoN en células A549, con el fin de mimetizar el efecto de anisomicina.

3. Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares

Para los experimentos realizados en el presente trabajo se utilizaron las células A549 provenientes de un carcinoma de pulmón humano. Las células se cultivaron en medio Ham's F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) y los antibióticos estreptomicina y penicilina. Tanto el medio como los antibióticos utilizados fueron de la marca GIBCO.

3.2 Ligandos.

El TGF- β que se utilizó fue de la marca PrepoTech, la anisomicina, la cicloheximida y la puromicina fueron de Sigma, mientras que el ácido Okadaico fue de Tocris.

3.3 Anticuerpos.

Los anticuerpos de SnoN, Ski y Smad2/3 de conejo fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, mientras que el anticuerpo para p-p38 y p38 fueron de Cell Signaling. El anticuerpo para p-Smad2 y p-Smad3 fueron de la marca Chemicon.

3.4 Cultivos celulares

Las células A549 fueron cultivadas en medio Ham's F12 suplementado, hasta alcanzar el 100% de confluencia total en cajas petri de 100 mm de diámetro.

3.5 Estimulación celular con TGF- β y otros ligandos

Para la estimulación celular se retira el medio de cultivo y se hacen dos lavados con medio de ayuno Ham's F12 0.2% de FBS y antibióticos. Se ponen 5 ml de medio de

ayuno y se dejan toda la noche (o mínimo tres horas). Posteriormente se sustituye el medio de ayuno por 3 ml de medio Ham's F12 al 0.2% de FBS y antibióticos fresco. Transcurrido el tiempo se estimula con el TGF- β u otro ligando a la concentración final y por el tiempo de tratamiento indicado.

3.6 Purificación por inmunoprecipitación..

Debido a las bajas cantidades que se encuentran SnoN, Ski y las proteínas Smads en las células A549 y HeLa, se recurrió a la inmunoprecipitación de estas proteínas.

Mientras que para p-p38 y p38 no fue necesario pues se encuentran en cantidades lo suficientemente grandes para visualizarlas en un western blot de extractos totales.

Posteriormente a la estimulación, las células se lavaron con 5 ml de PBS 1X frío.

Las células se lisan con 0.4 ml de buffer de TNTE 0.5% frío con el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se mantuvieron en frío durante todo el proceso del experimento. Las células se rasparon y el extracto celular se transfirió a microtubos de 1.5 mL y se incubaron por 15 minutos a 4°C en agitación continua. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm en frío por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevo que contenían el anticuerpo de específico para la inmunoprecipitación y se incubaron en frío toda la noche en agitación continua.

Para la inmunoprecipitación se incubaron las muestras con 50 μ L de proteína G unida a la matriz sefarosa de la marca GIBCO en agitación continua a 4 °C por 2 horas. Las muestras se centrifugaron y los pellets se lavaron tres veces con TNTE 0.1% en frío. Posteriormente se resuspendieron los pellets en 25 μ L de solución Laemli 2x y se hirieron en seco por tres minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

3.8 SDS PAGE y Western Blot

Las muestras se sometieron a un SDS-PAGE (poliacrylamide gel electrophoresis) en geles al 7.5% en el caso de las inmunoprecipitaciones, y al 10% para los extractos totales. Los geles se corrieron a 100 Volts durante tres horas.

Las muestras de proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. El procedimiento se realizó en frío, en una cámara húmeda de BioRad a 100 Volts por una

hora. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche libre de grasas en TBST-1X por una hora en agitación continua a temperatura ambiente. Después se incubaron las membranas con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación continua a una temperatura de 4°C.

El revelado de las proteínas se hizo por quimioluminiscencia utilizando los reactivos de la marca Amersham, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

4. RESULTADOS

4.1 El inhibidor del receptor I del TGF- β bloquea la degradación del correpresor SnoN inducido por anisomicina.

Vázquez-Macías y colaboradores reportaron que Ski y SnoN son degradados por un mecanismo inducido por anisomicina, independiente de la señalización de las proteínas Smads.²⁵ Para poder llevar a cabo el objetivo general del presente trabajo, se decidió utilizar un inhibidor de la actividad de cinasa del receptor ALK5, como un control negativo de la activación de las Smads.

Para ello utilizamos células A549 (una línea celular proveniente de un carcinoma de pulmón de humano). Las células crecidas hasta alcanzar un 100% de confluencia, fueron preincubadas en ausencia o presencia de 10 μ M del SB431542 por media hora, y posteriormente se añadió anisomicina (Aniso) a una concentración de 10 μ M, o TGF- β a 0.3 nM., por media hora sin retirar el medio de la preincubación.

Sin embargo contrario a lo que esperábamos, la degradación inducida por anisomicina fue bloqueada por la presencia del inhibidor SB431542, incrementándose los niveles de SnoN, con respecto a los niveles observados en las células tratadas únicamente con anisomicina. (Figura 1, Panel A)

De acuerdo con lo reportado, se observó que tanto el TGF- β como la anisomicina causaban una degradación del correpresor SnoN, como ya había sido previamente reportado.^{25, 24, 26} Sin embargo contrario a lo que esperábamos, en las células preincubadas con el SB431542, no solamente se bloqueaba la degradación de los corepresores Ski y SnoN inducida por anisomicina o por TGF- β , sino que además se acumulan los niveles de SnoN, con respecto al control. En las células tratadas solamente con el SB431542 es notable que se acumularan los niveles del corepresor SnoN en comparación con las células control.

En cuanto al análisis de las proteínas Smads; provenientes de la inmunoprecipitación de las proteínas Smad2 y Smad3, obtuvimos que tanto p-Smad2 como p-Smad3, solamente se activan cuando las células son estimuladas con el TGF- β no preincubadas con el

inhibidor SB431542. Mientras que en el caso de p-p38 observamos que esta MAPK solamente se activa cuando estimulamos a las células con anisomicina, funcionando de esta manera como control positivo del estímulo con anisomicina.

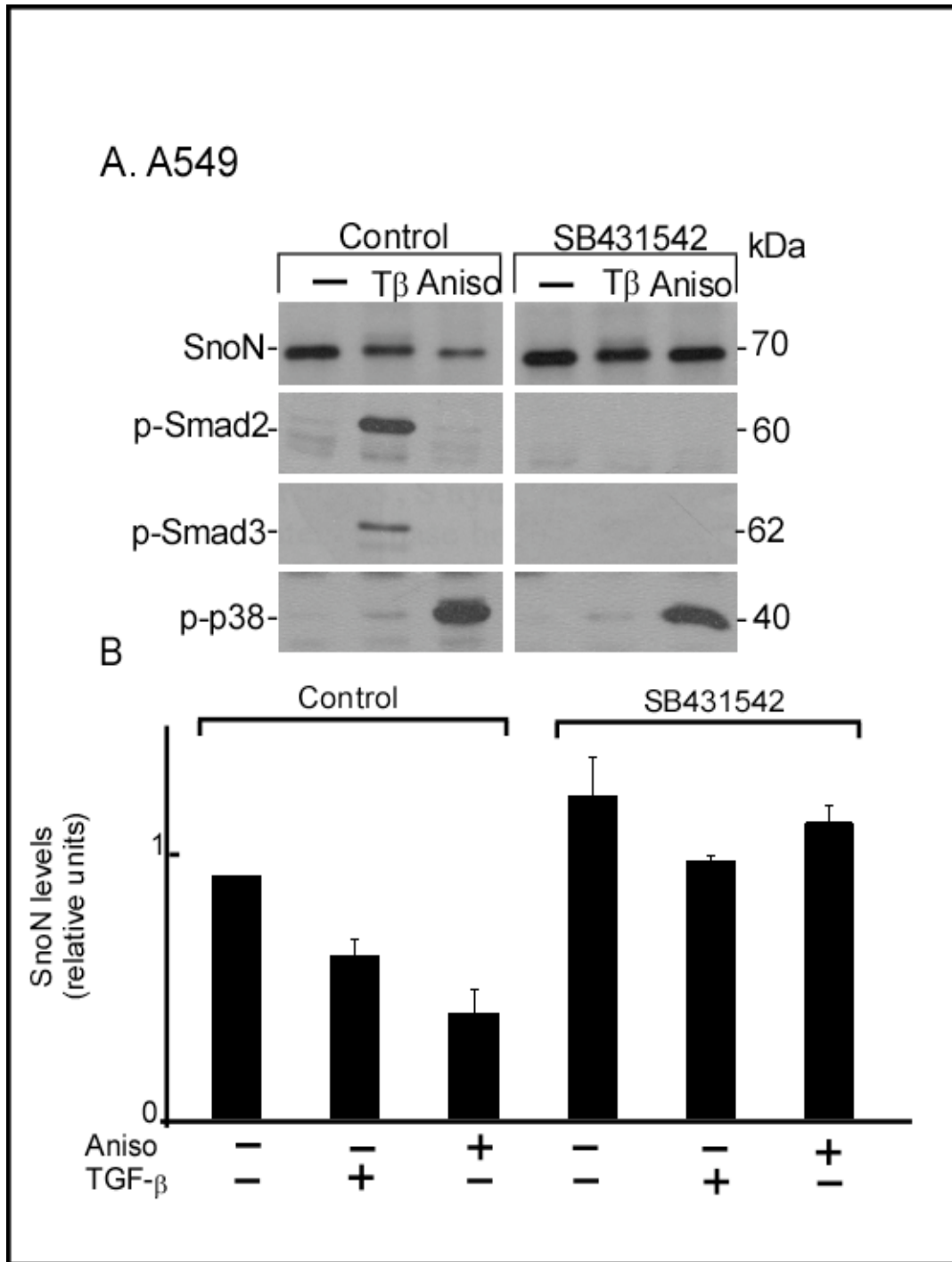


Figura 1. El SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina en las células A549. A) Western Blot de SnoN, p-Smad2, p-Smad3 y p-p38 en células A549 preincubadas 30 minutos en presencia o

ausencia del inhibidor SB431542 e incubadas 30 minutos con anisomicina 10 μ M o con TGF- β 0.3 nM. Para el Western Blot de SnoN y p-Smad2 y p-Smad3 se inmunoprecipito a SnoN y Smad2/3 respectivamente.

B) Histograma de la densitometría del efecto de bloqueo del SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida por anisomicina. En la gráfica se observa que en las células control tratadas con TGF- β o con anisomicina hay una degradación de SnoN; mientras que en las células tratadas con el SB431542 más TGF- β o anisomicina el efecto se bloquea. Las densitometrías se hicieron con el programa EDAS de Kodak y se graficaron los promedios \pm ES.

4.2 El SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por Anisomicina en forma dependiente de la dosis.

Después de observar los efectos que tiene el SB431542 sobre la degradación inducida por la anisomicina, se caracterizo el mecanismo del inhibidor del receptor ALK5 con un experimento de dosis-respuesta. Las células A549 en confluencia total, fueron preincubadas por 30 minutos en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del SB431542. Posteriormente las células fueron tratadas con anisomicina a una concentración de 10 μ M. En la figura 2A podemos observar que el SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina en una forma dependiente de la dosis, observándose claramente el efecto desde el rango de 0.1 μ M. En la figura 2B se presenta el histograma del análisis de densitometría. Para dicho análisis se utilizó el programa EDAS de Kodak y se graficaron los promedios \pm ES. Como puede apreciarse en la gráfica el SB431542 bloquea los efectos de la anisomicina sobre los niveles de SnoN, conforme se va incrementando la concentración del SB431542.

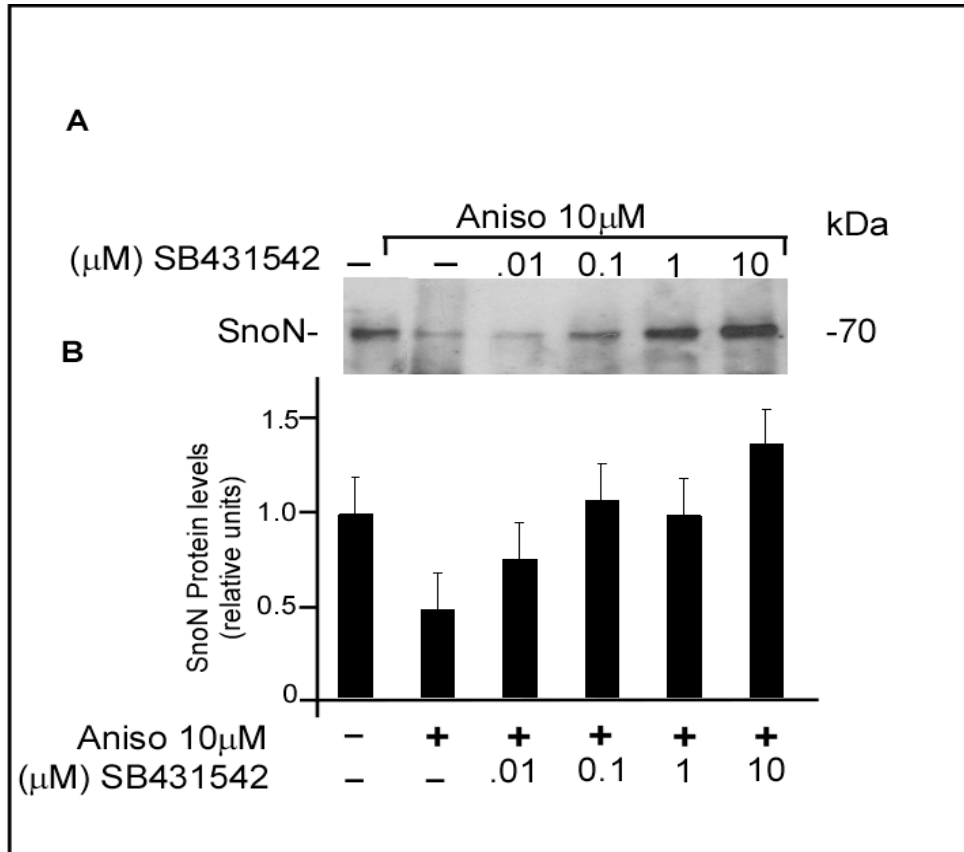


Figura 2. *El bloqueo de la degradación de SnoN purificada por inmunoprecipitación inducida por anisomicina, es dependiente de la concentración del SB431542.* A) Western Blot e IP de SnoN en células A549 mostrando el efecto de bloqueo por el SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida por Anisomicina. El SB431542 fue preincubado por 30 minutos a diferentes concentraciones y la Anisomicina fue incubada en las células indicadas por 30 minutos a una concentración de 10 μM . B) Histograma de la densitometría del efecto del SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida por Anisomicina. En la gráfica se observa que el efecto del SB431542 es dependiente de la concentración del inhibidor. La densitometría se realizó con el programa EDAS de Kodak. Se muestran los promedios \pm ES.

4.2.1 El SB431542 revierte los efectos de degradación de la proteína Ski en células HeLa inducida por anisomicina.

Habiendo probado los efectos del SB431542 sobre la degradación inducida por anisomicina en la oncoproteína SnoN decidimos estudiar los efectos del inhibidor SB431542 sobre los niveles del corepresor Ski en las células HeLa, debido a que las células A549 parecen no expresar a Ski²⁵. Vázquez-Macías et al reporto que la anisomicina causa una regulación negativa del corepresor Ski en células HeLa, donde probablemente también el SB431542 pudiera estar bloqueando la degradación inducida

por anisomicina en la oncoproteína Ski, pues pertenecen a la misma familia de oncoproteínas y tienen funciones análogas.

Para estudiar el efecto del inhibidor de ALK5 en la degradación del correpresor Ski realizamos una experimento de dosis respuesta en células HeLa con el SB431542 a concentraciones crecientes, que fueron del rango 0.01 μ M. A 10 μ M. en presencia o ausencia del estímulo de anisomicina 10 μ M. (Figura 3)

Se observó que el SB431542 también bloquea la degradación inducida por la anisomicina desde el rango de 0.01 μ M. Pero este efecto es óptimo a una concentración de 10 μ M.

Desafortunadamente el estudio de los efectos del SB431542 y el mecanismo de la degradación de anisomicina sobre los niveles de Ski no pudo continuarse, debido a problemas técnicos con la línea celular; por lo que nos enfocamos solamente a estudiar los mecanismos de degradación de SnoN en las células A549.

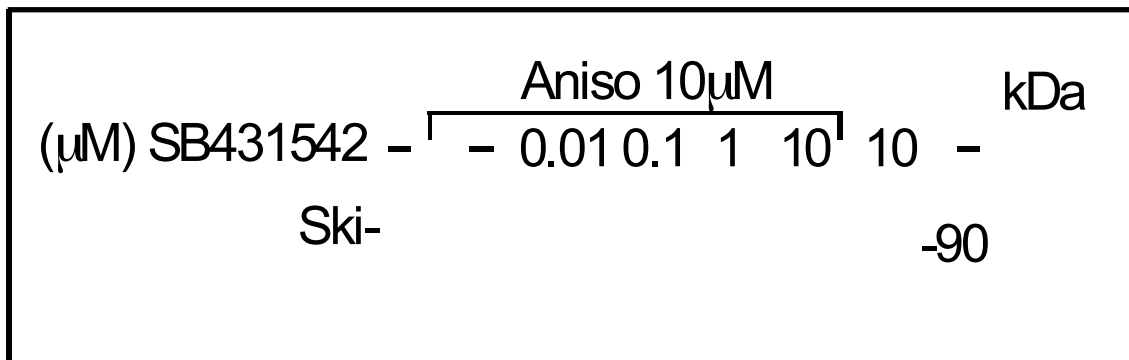


Figura 3. El SB431542 bloquea los efectos de degradación de la proteína Ski en células HeLa inducido por la anisomicina. Inmunoprecipitación de Ski en células A549 tratadas con diferentes dosis del inhibidor SB431542, en presencia o ausencia de anisomicina 10 μ M.

4.3 El SB431542 bloquea los efectos de Anisomicina en forma dependiente del tiempo

Además de probar los efectos del SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida por la anisomicina en parámetros dependientes de la dosis, quisimos probar los efectos del SB431542 sobre este efecto, pero en función del tiempo de estimulación con el inhibidor o de anisomicina. Para ello utilizamos a las células A549 a las que preincubamos con el inhibidor SB431542 por media hora y posteriormente estimulamos con anisomicina a diferentes tiempos (5, 15 y 30 minutos). Se hizo la inmunoprecipitación de la proteína SnoN con el anticuerpo policlonal α SnoN que posteriormente fue detectado por un ensayo de Western Blot. En la figura 4 panel A observamos que en el grupo control la

degradación de SnoN inducida por anisomicina es dependiente del tiempo y llega a casi a un degradación total a los 30 minutos, que ya estaba previamente reportado por Vázquez-Macías et al. Mientras que en las células tratadas con el SB431542 observamos el bloqueo del efecto de anisomicina.

Asimismo utilizamos a la proteína p-p38 como control positivo del efecto de de degradación inducido por anisomicina.

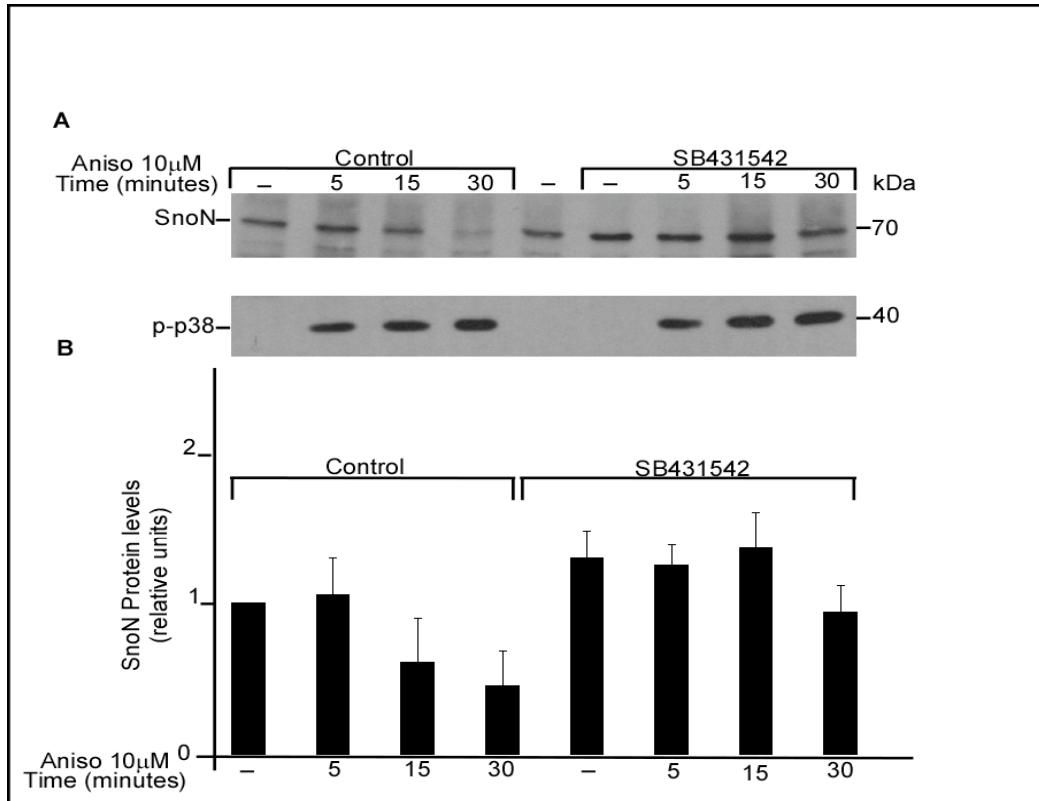


Figura 4. El SB431542 revierte los efectos de Anisomicina en forma dependiente al tiempo. Immunoprecipitación y Western Blot de SnoN en células A549 tratadas con Anisomicina 10 μ M a diferentes tiempos (5, 15 y 30 minutos) previamente incubadas con el SB431542 10 μ M a diferentes tiempos también (5, 15 y 30 minutos). En la figura se observa como el efecto de Anisomicina como del SB431542 es dependiente del tiempo. Como control de la acción de la anisomicina se utilizó a p-p38 para asegurarnos que la anisomicina este funcionando correctamente. **B** Histograma del mismo experimento. En la gráfica se observa que el S431542 bloquea los efectos de la degradación inducida por anisomicina a diferentes tiempos. Para la densitometría se utilizó el programa EDAS de Kodak y como medida de error se utilizó el ES.

4.4 Puomicina y cicloheximida causan la degradación de SnoN a través de un mecanismo similar a anisomicina.

Después de haber demostrado el efecto del inhibidor del receptor ALK5 (SB431542), pensamos en alguna otra forma para poder caracterizar el mecanismo de degradación de SnoN inducido por anisomicina, podría ser a partir de la utilización de otros inhibidores de la síntesis de proteínas, que pudieran activar a otras vías de señalización y que quizás el SB431542 no pudiera bloquear. La cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas al interferir con la actividad de peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional y es una herramienta utilizada ampliamente para inhibir la síntesis de proteínas en células eucariontes.³¹ La Puromicina es otro inhibidor de la síntesis de proteínas, que también es utilizado como antibiótico. Se trata de un aminonucleósido que inhibe específicamente la actividad de peptidil transferasa de los ribosomas procariontes y eucariontes.³²

Para este experimento utilizamos de nuevo a las células A549 crecidas hasta un 100% y las preincubamos media hora en presencia o ausencia de 10 μ M de SB431542 y después estimulamos con los inhibidores de la síntesis de proteínas cicloheximida y puromicina a una concentración de 100 μ g/ml, por media hora sin retirar el SB431542 del medio de incubación (Figura 5). Al igual que en los experimentos anteriores se purificó por una inmunoprecipitación a la proteína SnoN detectada por Western Blot. Como puede apreciarse en la figura 4 tanto la puromicina como la cicloheximida causan la degradación de SnoN, y en este caso también el SB431542 bloquea sus efectos, cuando las células son preincubadas durante 30 minutos con este inhibidor. Observamos que la anisomicina, la puromicina y la cicloheximida también activan a p38. Aunque la activación de p38 por la cicloheximida y puromicina es menor que la inducida por la anisomicina, la degradación de SnoN es muy parecida en los tres tratamientos. Es importante señalar que el SB431542 no bloquea los efectos de anisomicina, cicloheximida o puromicina sobre la activación de p38. Estos datos sugieren un mecanismo en común donde la anisomicina, la cicloheximida y la puromicina causan una regulación negativa en los niveles de la proteína SnoN y es bloqueada por el SB431542.

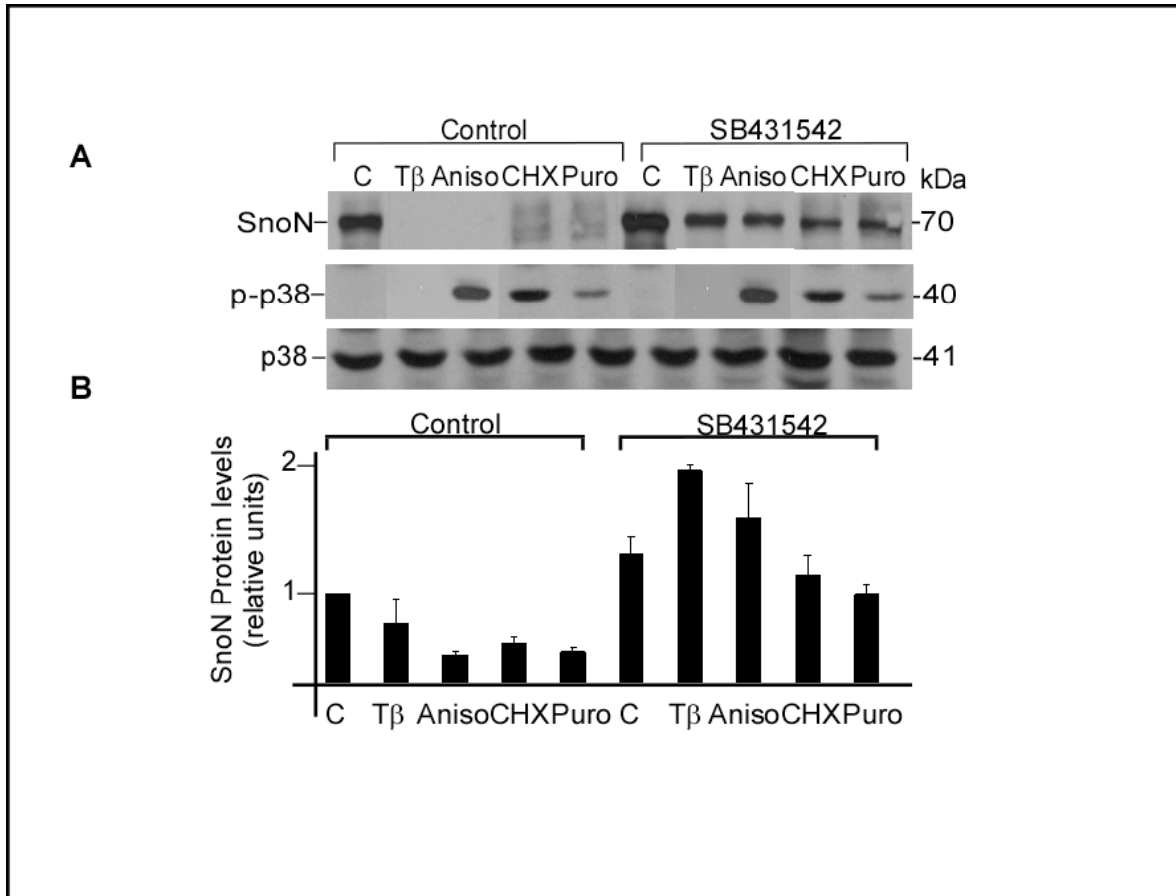


Figura 5. La cicloheximida y la puromicina causan una degradación de la proteína SnoN de manera similar inducida a la anisomicina. A) Western Blot de SnoN y p-p38 en células A549, con una preincubación de 30 minutos en ausencia o presencia del SB431542 y tratadas con Cicloheximida (CHX; 100µg/ml), Puromicina (Puro; 100µg/ml), Anisomicina (Aniso 10µM) o TGF-β (0.3 nM) por 30 minutos. B) Análisis cuantitativo del nivel de la proteína SnoN en las células A549. En la gráfica se observa la degradación de SnoN inducida por el tratamiento con TGF-β, Anisomicina, Cicloheximida y Puromicina; así como el bloqueo inducido por el SB431542, sobre los niveles de SnoN. Para el análisis cuantitativo se utilizó el programa EDAS de Kodak y se presentan los promedios ± ES.

4.5 El ácido okadaico y el estrés osmótico no llevan a cabo una degradación sobre los niveles de la oncoproteína SnoN.

Habiendo probado una gran variedad de inhibidores de la síntesis de proteínas y observando un efecto en común donde los compuestos activan en común p38, la cual es una proteína característica de la activación vías de estrés celular, pensamos en la inducción de dicho del estrés celular y que pudiera estar llevando a cabo una regulación negativa de los niveles de SnoN en las células A549, similar a la inducida por

anisomicina. Para ello probamos dos tipos de estrés celular uno inducido por el Ácido Okadaico que además de inhibir a las fosfatasa PP1A y PP2A, posee la capacidad de bloquear el ciclo celular en eucariontes³⁰ y el estrés osmótico que fue inducido por medio de altas concentraciones de NaCl (0.5M). Para el experimento utilizamos células A549 en confluencia total y fueron estimuladas con ácido Okadaico a una concentración de 1 μ M o con una solución de NaCl 0.5 M por media hora, previamente se realizó una preincubación en presencia o ausencia del SB431542 por media hora también. (Figura 6) Nuestros resultados muestran que el estímulo con el Ácido Okadaico así como el estrés osmótico no llevan a cabo una degradación de SnoN significativa.

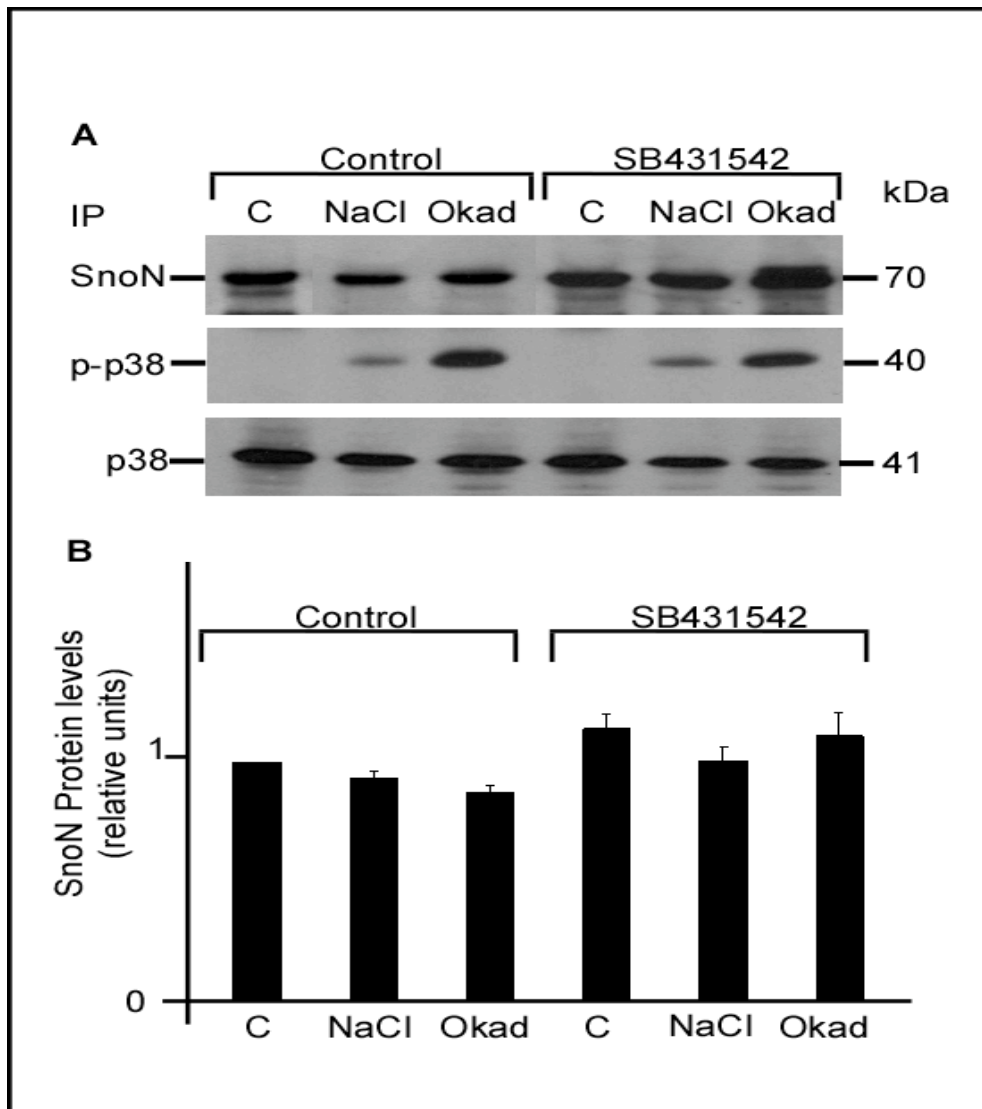


Figura 6. El estrés osmótico y el ácido okadaico no llevan a cabo un efecto de degradación sobre los niveles de SnoN. A) Inmunoprecipitación y Western Blot de la oncoproteína SnoN en células A549. Las células fueron estimuladas con ácido okadaico 1 μ M y con una solución de NaCl 5M por media hora, previamente una incubación de media hora con el inhibidor SB431542. En la autoradiografía se observa que existe un decremento en los niveles basales de SnoN, pero que no es significativa. El SB431542 bloquea este decremento en los niveles del corepresor SnoN. También se muestra el Western Blot de p-p38 y p38. B) Análisis cuantitativo del mismo experimento. En la gráfica se muestra que la disminución de los niveles de SnoN no es significativa. Para el análisis se utilizó el programa EDAS de Kodak se gráfico el promedio \pm ES.

5. Discusión

La degradación de proteínas es un proceso celular que regula los niveles de proteínas dentro de la célula, manteniendo de esta forma la homeostasis dentro del organismo. Las oncoproteínas Ski y SnoN son elementos clave en la señalización del TGF- β pues regulan negativamente la transducción de señales de esta citocina. Por ello es importante estudiar los mecanismos que regulan los niveles de estas proteínas.

Los mecanismos de degradación de los corepresores Ski y SnoN hasta hace poco eran exclusivamente dependientes de la señal del TGF- β ; es decir solamente podían llevarse a cabo en respuesta a la señalización del TGF- β y la consecuente activación de las proteínas Smads.^{11, 18, 21, 22} Este mecanismo documentado de la degradación de las oncoproteínas Ski y SnoN, es dependiente de la activación de las Smads y de su interacción con las ligasas de ubiquitina Smurf2 o el complejo promotor de la anafase (APC), así como de la degradación vía el proteosoma 26S.^{20, 22} Sin embargo, existe evidencia de la existencia de otras señales que tienen un efecto sobre los niveles de otros corepresores como TGIF, donde se ha reportado que el factor de crecimiento epidermal por medio de la activación de la vía de Ras ejerce un control sobre los niveles de este corepresor.²³

Recientemente fue publicado por Vázquez-Macías y colaboradores un nuevo mecanismo de degradación de los corepresores Ski y SnoN inducido por la Anisomicina, que es independiente de la activación de las Smads, así como de la activación de las MAPK y de la inhibición de la síntesis de proteínas, pero dependiente de la vía del proteosoma.

Ahora en el presente trabajo en un principio nos dimos a la tarea de dilucidar el mecanismo de la degradación de los corepresores Ski y SnoN inducido por Anisomicina, mediante la utilización del inhibidor de la cinasa del receptor ALK5; el SB431542. El SB431542 se utilizó puesto que Ski y SnoN son corepresores de la vía del TGF- β , el método más lógico para dilucidar el mecanismo que utiliza la anisomicina, sería mediante el bloqueo de la vía del propio TGF- β , esto para observar que vías pudieran estarse activando a pesar de la inhibición de la cinasa del receptor tipo I del TGF- β .

Sin embargo

5.1 El inhibidor del receptor I del TGF- β bloquea la degradación de los corepresores Ski y SnoN inducida por la anisomicina.

En este trabajo se demostró que el inhibidor selectivo del receptor I del TGF- β , el SB431542 es capaz de bloquear la degradación de los corepresores Ski y SnoN inducida por anisomicina. Esto se observa en el Western Blot, pues los niveles de SnoN aumentan, incluso más allá del nivel basal. Este efecto que lleva a cabo el SB431542 fue sorprendente e inesperado, pues a partir del trabajo de Vázquez-Macías y colaboradores, se había probado que la vía del TGF- β no estaba implicada en la degradación inducida por Anisomicina, así como la vía de las MAPK; que es una de las vías más conocidas que ejercen regulación cruzada con el TGF- β .

Esto nos da la oportunidad de pensar en dos alternativas que pudieran explicar el mecanismo que pudiera estar llevando a cabo la anisomicina en las células A549 y HeLa:

1. La anisomicina podría llevar a cabo un efecto sobre el receptor ALK5 y este como consecuencia activar alguna vía de transducción que este ejerciendo un efecto de regulación negativa sobre los niveles de los corepresores Ski y SnoN.
2. La anisomicina podría estar activando una cinasa o efector intracelular que induzca una cascada de señalización que finalmente llevará a una degradación de los corepresores Ski y SnoN. El SB431542 en este caso estaría inhibiendo a este efector intracelular de forma inespecífica, a pesar de ser un inhibidor específico para el receptor I del TGF- β .

Este efecto del SB431542 sobre la degradación de SnoN y Ski inducido por anisomicina, al parecer no es exclusivo de este inhibidor como se discutirá más adelante. Cabe señalar que el bloqueo que ejerce el SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida tanto por el TGF- β y por la anisomicina, es casi idéntico. Aunque no podemos dar una explicación definitiva a este resultado, se podría inferir que el SB431542 al revertir este efecto en

ambos casos, podría significar que el receptor I del TGF- β estaría involucrado en el mecanismo de degradación de SnoN y Ski inducido por anisomicina y evidentemente por el TGF- β . Este efecto aunque no podemos explicarlo por completo, suponemos que podría formar parte de la regulación de los niveles de Ski y SnoN en forma paralela al que lleva a cabo el propio TGF- β , pero por medio de una vía de transducción diferente a la llevada a cabo por parte de las proteínas Smads, ya que la anisomicina no activa a las proteínas Smad.

5.2 El SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina, en forma dependiente de la dosis y del tiempo.

También se demostró que el efecto de bloqueo por el SB431542 sobre la degradación de Ski y de SnoN inducida por la Anisomicina es dependiente de la concentración del inhibidor para el receptor ALK5. Este efecto del SB431542 es razonable pues el inhibidor actúa de forma competitiva con el ATP que utiliza la cinasa del receptor I del TGF- β .

Asimismo se demostró en este trabajo que el efecto del SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida por Anisomicina es también dependiente del tiempo de incubación con este inhibidor, lo cual es congruente con el efecto que tiene el SB431542 en forma dosis dependiente.

5.3 Puromicina y cicloheximida degradan a SnoN a través de un mecanismo similar al de anisomicina.

El razonamiento de haber utilizado otros tipos de inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida y la puromicina, residió en que al ser compuestos con propiedades compartidas con la anisomicina podían funcionar como herramientas para caracterizar el efecto de la anisomicina. Sin embargo, los resultados que obtuvimos fueron nuevamente inesperados, pues la cicloheximida y la puromicina también llevan a cabo la degradación de SnoN por medio de un mecanismo análogo al efectuado por la anisomicina. Al igual que anisomicina cicloheximida y puromicina degradan a SnoN y activan a p-p38. Estos resultados son aún más intrigantes pues estos inhibidores si llevan a cabo una inhibición de la síntesis de proteínas por medio de un mecanismo similar con la anisomicina, pues

inhiben la actividad de peptidil transferasa, pero con la diferencia de que la cicloheximida solo ejerce su efecto en células eucariontes, al igual que la anisomicina mientras que la puromicina lo lleva a cabo tanto en procariontes como en eucariontes.^{27, 31, 32} Además el SB431542 también bloquea los efectos de cicloheximida y puromicina sobre la degradación de SnoN, así como lo hace con el efecto de anisomicina.

Al parecer este efecto de regulación negativa que ejercen estos tres inhibidores, podría estar relacionado con el hecho de que la anisomicina, la cicloheximida y la puromicina llevan a cabo procesos similares de inhibición de proteínas, y por lo tanto tal vez ejercen un efecto análogo sobre la degradación del corepresor SnoN.

5.4 El ácido okadaico y el estrés osmótico también no causan una regulación negativa en los niveles de la oncoproteína Son.

Después de haber probado los inhibidores de la síntesis de proteínas sobre los niveles del corepresor SnoN en las células A549, decidimos probar el efecto del ácido Okadaico y el estrés osmótico sobre los niveles de SnoN. Los resultados demostraron que al estimular a las células con una solución 0.5M de NaCl y Ácido Okadaico 10 μ M. no hay una disminución significativa de los niveles de SnoN. Esto nos habla de que la vía que utilizan anisomicina y los demás inhibidores, es diferente a las vías de estrés inducidas por el ácido okadaico y la hiperosmolaridad.

Los resultados sugieren una vía en común que desencadenan los inhibidores de la síntesis de proteínas; anisomicina, cicloheximida y puromicina, que llevan a cabo la degradación de la oncoproteína SnoN, por medio de un mecanismo independiente de la señalización de las proteínas Smads. Este mecanismo de degradación de SnoN que se reporta en este trabajo es bloqueado por el inhibidor del dominio de cinasa del receptor I del TGF- β (ALK5).

6. CONCLUSIONES.

La regulación negativa de los niveles de SnoN inducida por anisomicina, es bloqueada por el inhibidor del dominio de cinasa del receptor I del TGF- β , el SB431542. El efecto de anisomicina, no es exclusivo de este inhibidor de la síntesis de proteínas, pues en este trabajo se demostró que la cicloheximida y la puromicina también llevan a cabo una regulación negativa de los niveles de SnoN en células A549, además de que su efecto también es bloqueado por el inhibidor SB431542.

El mecanismo de degradación de SnoN inducido por esta serie de inhibidores, es independiente de la activación de las Smads, pero sensible al efecto del SB431542.

Todos estos datos nos lleva a proponer dos mecanismos posibles sobre el mecanismo de anisomicina.

1. Que la anisomicina pudiera estar actuando sobre el receptor ALK5; iniciándose de alguna forma, una cascada de señalización que comience con ALK5 y que lleve a la degradación de SnoN. El SB431542 al bloquear ALK5, estaría inhibiendo el efecto de anisomicina, acumulándose como consecuencia los niveles de SnoN.
2. La anisomicina podría estar activando una proteína intracelular no identificada que lleve a cabo una señalización que llevaría finalmente a la degradación de SnoN. Esta proteína podría estar siendo afectada por el SB431542, bloqueándose el efecto de anisomicina como consecuencia.
3. Es probable que la anisomicina, la cicloheximida, la puromicina compartan el mismo mecanismo para causar la degradación de SnoN, ya que sus efectos son bloqueados por el SB431242.

7. PERSPECTIVAS.

- Probar el efecto de Anisomicina, en células que carezcan del receptor ALK5, sobre los niveles de los corepresores Ski y SnoN, para poder confirmar o descartar la participación del receptor I del TGF- β en este mecanismo de degradación.
- Probar el efecto de la anisomicina sobre formas mutantes de SnoN resistentes a la degradación reportada por el TGF- β y el proteosoma.
- Llevar a cabo ensayos de doble híbrido para identificar a una proteína que este interaccionando con SnoN, como resultado del estímulo de la anisomicina

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cornell TT, Shanley TP. (2005) *Signal transduction overview*. Crit Care Med. **33**, S410-3. Review.
2. Miyazono K. (2000) *Positive and negative regulation of TGF-beta signaling*. J Cell Sci. 2000 **113** 1101-9. Review.
3. Siegel PM, Massague J. (2003) *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer*. Nat Rev Cancer. **3**:807-21. Review.
4. Massague J, Gomis RR. (2006) *The logic of TGFbeta signaling*. FEBS Lett.**22**, 2811-20. Review.
5. Javelaud D, Mauviel A. (2004) *Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles*. Int J Biochem Cell Biol. **36**, 1161-5. Review.
6. Massague J, Wotton D. (2000) *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. EMBO J. **19**, 1745-54. Review.
7. Keski-Oja J, Koli K, von Melchner. (2004) *TGF-beta activation by traction?* Trends Cell Biol. **14**, 657-9. Review.
8. Shi Y, Massague J. (2003) *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell. **3**, 685-700. Review.
9. Roberts AB. (1999) *TGF-beta signaling from receptors to the nucleus*. Microbes Infect. **1**, 1265-73. Review.
10. Derynck R, Zhang YE. (2003) *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature. **9**, 577-84. Review.
11. Massague J. (2000) *How cells read TGF-beta signals*. Nat Rev Mol Cell Biol. **1**, 169-78.
12. Xu L, Massague J. *Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers*. Nat Rev Mol Cell Biol. **5**, 209-19.
13. Massague J. (1998) *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem. **67**:753-91. Review.

14. Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. (1996) *MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling.* Cell. **87**:1215-24
15. ten Dijke P, Hill CS (2004) *New insights into TGF-beta-Smad signalling.* Trends Biochem Sci. **29**:265-73.
16. Luo K. (2004) *Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling.* Curr Opin Genet Dev. **14**:65-70.
17. Sarker KP, Wilson SM, Bonni S. (2005) *SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor-beta responses.* J Biol Chem. **280**:13037-46.
18. ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH.(2000) *Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling.* Trends Biochem Sci.**25**:64-70.
19. Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K, Wrana JL. (2001) *TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation.*Nat Cell Biol. **3**:587-95.
20. Datto M, Wang XF. (2005) *Ubiquitin-mediated degradation a mechanism for fine-tuning TGF-beta signaling.* Cell.**121**:2-4
21. Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, Luo K. (2001) *Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN.* Genes Dev. Nov **15**:2822-36.
22. Luo K. (2004) *Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling.* Curr Opin Genet Dev.**14**:65-70.
23. Lo RS, Wotton D, Massague. (2001) *Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF.* J. EMBO J. **20**:128-36.
24. Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. (1999) *SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A. **96**:12442-7.
25. Vazquez-Macias A, Ruiz-Mendoza AB, Fonseca-Sanchez MA, Briones-Orta MA, Macias-Silva M. (2005) *Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin.* FEBS Lett. **579**:3701-6.

26. Briones-Orta MA, Sosa-Garrocho M, Moreno-Alvarez P, Fonseca-Sanchez MA, Macias-Silva M. (2006) *SnoN co-repressor binds and represses smad7 gene promoter*. Biochem Biophys Res Commun. **341**: 889-94.
27. Lochner A, Genade S, Hattingh S, Marais E, Huisamen B, Moolman JA. (2003) *Comparison between ischaemic and anisomycin-induced preconditioning: role of p38 MAPK*. Cardiovasc Drugs Ther. **17**:217-30.
28. Jin QH, Zhao B, Zhang XJ. (2004) *Cytochrome c release and endoplasmic reticulum stress are involved in caspase-dependent apoptosis induced by G418*. Cell Mol Life Sci. **61**: 1816-25.
29. Chen G, Branton PE, Shore GC. (1995) *Induction of p53-independent apoptosis by hygromycin B: suppression by Bcl-2 and adenovirus E1B 19-kDa protein*. Exp Cell Res. **221**:55-9.
30. Li Z, Tu X, Wang CC.(2006) *Okadaic acid overcomes the blocked cell cycle caused by depleting Cdc2-related kinases in Trypanosoma brucei*. Exp Cell Res. **312**:3504-3516.
31. Obrug TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. (1971) *The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes*. J Biol Chem. **246**:174-81.
32. De La Luna S. and J.Ortin (1992) Pac gene as efficient dominant marker and reporter gene in mammalian cells. Methods In Enzymology **216**:376-385
33. Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. (2005) *A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers.. Neoplasia*. **7**:509-21.
34. Sarker KP, Wilson SM, Bonni S. (2005) *SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor-beta responses*. J Biol Chem. **280**:13037-46
35. Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. (1999) Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. Science. **5440**: 771-4.
36. Burke LJ, Baniahmad A. (2000) Co-repressors 2000. FASEB J. **13**:1876-88.

9. Apéndice

Cultivos celulares

Medio HAM's F12 complementado

Para prepara un litro de medio *HAM's F12*, al que previamente se ha ajustado el pH entre 7.2 a 7.4 y se ha esterilizado por filtración se le agrega lo siguiente:

SFB	100 ml
Pen/Strep	10 ml
Aminoácidos esenciales	10 ml

PBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 10X

NaCl	134 mM
KCl	2.7 mM
Na_2HPO_4	4.3 mM
KH_2PO_4	1.4 mM

Inmunoprecipitación de proteína e inmunoblot

Buffer TNTE 0.1 % (100 ml)

10 ml	TN 10 X
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8)
1 ml	Tritón 10%
89 ml	H_2O

Buffer TNTE 0.5% (100 ml)

10 ml	TN 10 X
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8)
5 ml	Tritón 10%
85 ml	H_2O

TN 10 X (100 ml)

50 ml Tris 1 M

30 ml NaCl 5 M

20 ml H₂O

Inhibidores de fosfatasas y proteasas (1 ml)

10 µl Ortovanadato de sodio 100 mM (H₂O)

10 µl Pirofosfato de sodio 100 mM (H₂O + HCl 8 mM)

25 µl Fluoruro de sodio 1 M (H₂O)

5 µl PMSF 1 M (isopropanol)

2 µl β-glicerofosfato 0.5 M (TE pH 7.4)

2 µl Benzamidina 50 mg/ml (TE pH 7.4)

2 µl Inhibidor de tripsina 50 mg/ml (TE pH 7.4)

2 µl Dihidrocloreuro de antipaina 5 mg/ml (TE pH 7.4)

2 µl Aprotinina 5 mg/ml (DMSO)

2 µl Pestatina A 5 mg/ml (DMSO)

2 µl Leupeptina 5 mg/ml (TE pH 7.4)

Aforar en 1 ml de buffer TNTE 0.5%

Solución de acrilamida/bis-metil-acrilamida (30% / 0.8%)

87.6 g acrilamida

2.4 g bis-metil-acrilamida

300 ml de H₂O desionizada

1.5 M de Tris-HCl pH8.8

18.15 g Tris base

100 ml de H₂O

0.5 M de Tris-HCl pH6.8

6 g Tris base

100 ml de H₂O

Buffer de corrida 10X pH8.3 (1 litro)

Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS 10%	100 ml
H ₂ O	aforar a un litro

Buffer TBS 10X pH8.1-8.5

Tris base	30.3 g
Glicina	144.5 g
H ₂ O	aforar a un litro

Buffer TBS-T 0.1% (1 litro)

Buffer TBS 10X	100 ml
Tween	1 ml
H ₂ O	900 ml