

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“ Regulación de los correpresores Ski y SnoN  
por la citocina TGF-beta ”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:

CASSANDRE CALIGARIS BENOIT

TUTOR: DRA. MARINA MACÍAS



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.

## DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Caligaris

Benoit

Cassandre

55 70 51 95

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

402071374

### 2. Datos del tutor

Dra

Marina

Macías

Silva

### 3. Datos del sinodal 1

Dra

Claudia

González

Espinosa

### 4. Datos del sinodal 2

Dr

Alfonso

Torre

Blanco

### 5. Datos del sinodal 3

Dra

Laura

Kawasaki

Watanabe

### 6. Datos del sinodal 4

QFB

Criselda

Mendoza

Milla

7. Datos del trabajo escrito

Regulación de los correpresores Ski y SnoN por la citocina TGF-beta

70 p

2007

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme cumplir mis metas y por poner en mi camino gente tan culta y buena como lo han sido todos mis maestros.

A Marina Macías, por enseñarme lo que es la ciencia, brindándome su apoyo día tras día y transmitiéndome todos sus conocimientos; pero sobre todo por ser una persona realmente valiosa.

A Alfonso Torre-Blanco por ser un ejemplo a seguir, gracias por tu amistad.

A Claudia González, por ser tanto excelente investigadora como excelente persona, gracias por tus valiosos comentarios y sugerencias sobre este trabajo.

A Criselda Mendoza y a Laura Kawasaki por haber dedicado su tiempo a las correcciones de este trabajo.

A todo el laboratorio 225 Nte de Fisiología Celular:

A Marcela (por tu paciencia y simpatía), Marco (por los infinitos momentos de risas), Jack (por compartir miles de cosas y entre ellas la materia de Bioquímica!), Angelito, Genaro y Paola (por todos sus consejos y su apoyo), Liz, Paco y Adverqueydi por llegar.

A mis compañeros de la maestría Jack, Yael y Angeles por los buenos momentos dentro de todo el caos de la materia.

A **Sily** et **Nouche**, sin su apoyo y amor no hubiera sido lo mismo. Gracias de corazón por estar allí incondicionalmente y por ser los mejores papás del mundo.

A **Emilio**, porque realmente no hubiera sido lo mismo sin ti (this work would not have the same title, you know why). Gracias por todo lo que me enseñaste, por tus valiosos consejos, por tu apoyo en los momentos más difíciles y también en los más bonitos, por estar allí conmigo y por hacerme feliz. Te amo.

A **Aria**, por recibirme siempre con entusiasmo, saltos y besos. Gracias por los hermosos paseos por C.U.

A **Yves**, por ser la nonna más guapa y simpática del planeta.

A **Rutilio**, por creer en mí siempre.

A **Cinthia**, por estar en mi mente sin importar distancia o tiempo.

A **Humberto**, **Atenea**, **Maria José** y **Paulina**, por los momentos inolvidables pasados en la Facultad de Ciencias.

A **Gonzalo** (stem cell!), por las numerosas cosas que me enseñaste y que siempre recuerdo, por tus consejos y tu apoyo. Gracias, no te olvidaré tan fácilmente.

A **Brian**, porque me viste crecer, estuviste allí, estático, pero conmigo de lejos.

A la maravillosa **Naturaleza**, por permitirme vivir en ella y entender sus secretos más profundos.

## ÍNDICE

	Página
<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	3
1) Señalización celular.....	3
2) Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).....	5
a. Superfamilia de citocinas del TGF- $\beta$ .....	5
b. Vías de señalización del TGF- $\beta$ .....	8
c. Regulación de la vía de transducción del TGF- $\beta$ .....	11
d. TGF- $\beta$ y cáncer.....	14
3) Ski y SnoN : correpresores de la vía del TGF- $\beta$ .....	17
e. Familia de correpresores Ski.....	17
f. Ski y SnoN como proteínas oncogénicas.....	19
g. Ski y SnoN como correpresores de la vía del TGF- $\beta$ .....	21
h. Regulación de la expresión de Ski y SnoN.....	23
<b>Antecedentes</b> .....	24
1) Regulación de la función y la expresión de Ski y SnoN por TGF- $\beta$ .....	24
2) Regulación de la función y la expresión de Ski y SnoN por otras vías de transducción.....	26
<b>Planteamiento del problema</b> .....	27
<b>Hipótesis</b> .....	27
<b>Objetivo general</b> .....	27
<b>Objetivos particulares</b> .....	27

<b>Estrategia experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>54</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>58</b>

## ABREVIATURAS

<b>Angiotensina II</b>	Angiotensina II
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BMP</b>	Proteínas morfogenéticas óseas
<b>CDK</b>	Ciclinas dependientes de cinasas
<b>Células NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>Co-Smad</b>	Smad común
<b>C-terminal</b>	Carboxilo terminal
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>ERK</b>	Cinasa relacionada a la señalización extracelular
<b>FSK</b>	Forskolina
<b>GADPH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>HDAC</b>	Deacetilasas de histonas
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>I-Smad</b>	Smad inhibitoria
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>MAPK</b>	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos

<b>MH1</b>	Dominio 1 homólogo a Mad
<b>MH2</b>	Dominio 2 homólogo a Mad
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>N-terminal</b>	Amino Terminal
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>pSmad2</b>	Smad2 fosforilada
<b>PVDF</b>	Difluoruro de Polivinilideno
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPTK</b>	Receptor con actividad de cinasa de tirosinas
<b>R-Smad</b>	Smad regulada por receptor
<b>SBE</b>	Elementos de unión a las Smads
<b>Ski</b>	<i><u>S</u>loan-<u>K</u>ettering <u>I</u>nstitute proto-oncogene</i>
<b>Smad</b>	Nombre proveniente de la combinación de Sma ( <i>C.elegans</i> ) y Mad ( <i>Drosophila mothers against decapentaplegic, Drosophila</i> )
<b>SnoN</b>	<i><u>S</u>ki-related novel gene <u>N</u></i>
<b>TβRI</b>	Receptor tipo I del TGF-β
<b>TβRII</b>	Receptor tipo II del TGF-β
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante-beta
<b>TNTE</b>	Tris-NaCl-Tritón-EDTA

## INTRODUCCIÓN

### 1) Señalización celular

La transducción de señales dentro de una célula es un evento molecular importante en su fisiología y representa la respuesta a numerosos estímulos exteriores, todo con el fin de mantener la homeostasis celular.

Este proceso fisiológico involucra una serie de mecanismos conservados y ordenados dentro del marco de rutas específicas, que transmiten una señal hasta la maquinaria celular capaz de generar una respuesta, siendo ésta típicamente un cambio en el metabolismo intermediario que culmina en una alteración en la expresión génica.

La transducción de señales es iniciada por cualquier tipo de estímulo que influya en las actividades y respuestas celulares. Dentro de estos estímulos se encuentran mediadores solubles (hormonas, citocinas, factores de crecimiento), cambios osmolares, estrés mecánico y patógenos (Cornell et al., 2005).

Los procesos de señalización celular son clave en eventos tan importantes como la diferenciación, proliferación, apoptosis y ciclo celular, así como en la respuesta inmune, el metabolismo, la memoria y el aprendizaje.

Así, el estímulo o mensajero extracelular es reconocido por receptores específicos anclados o no a la membrana plasmática, que al unir su ligando, originan una cascada de señalización dada por diferentes mediadores intracelulares, que culmina en la expresión de genes y en la respuesta de la célula a su entorno (Figura 1).

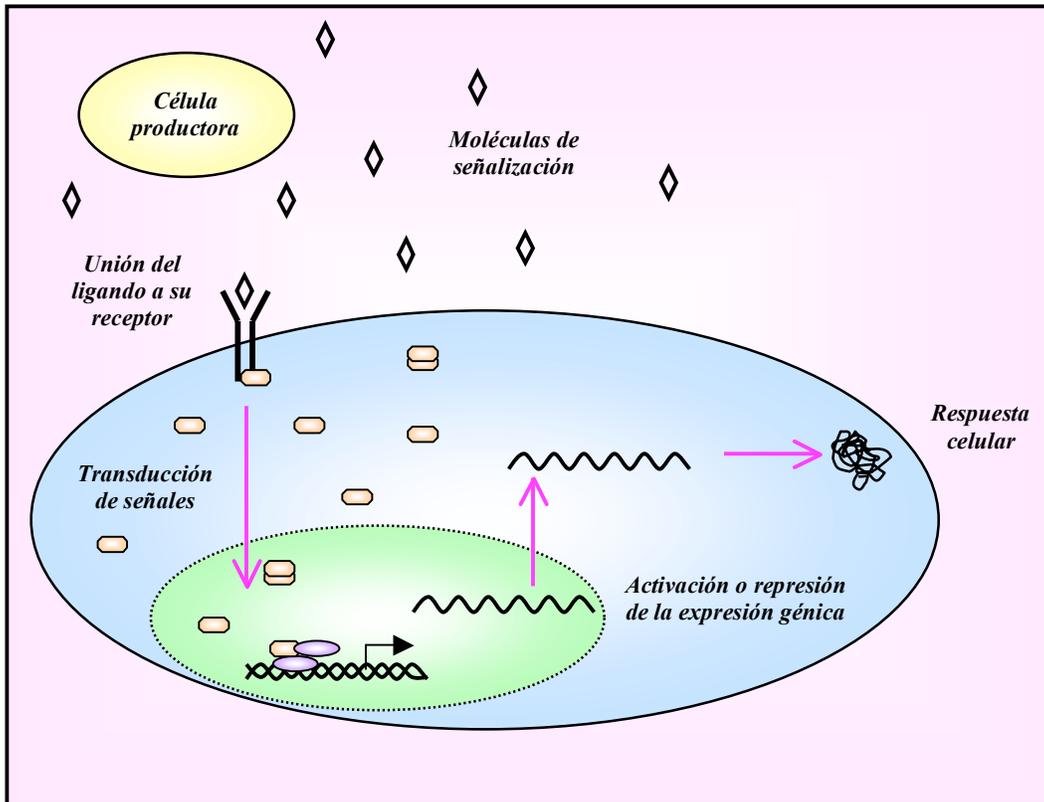
Probablemente el mecanismo más común para la propagación de la señal en células de mamíferos sea la fosforilación reversible de residuos de serinas, treoninas y tirosinas. Las cinasas, proteínas que forman parte de una de las familias más grandes de genes, catalizan la transferencia de un grupo fosfato proveniente del trifosfato de adenosina (ATP) a residuos aminoacídicos específicos presentes en las proteínas blanco.

La transmisión de la información se caracteriza tener las siguientes características : es específica (hay puntos de regulación o “checkpoints” y ligandos específicos para cada receptor) y económica (se suelen compartir elementos entre las diferentes vías de señalización); además tiene receptores de diferentes tipos (receptores iónicos, acoplados a

proteínas G, acoplados a enzimas o con actividad intrínseca de cinasa), transductores (proteínas que se unen al receptor y transducen la señal), adaptadores (proteínas sin actividad catalítica), proteínas de andamio o “scaffolds” (proteínas encargadas de mantener unidos complejos multiproteicos para que se dé la señalización) y proteínas amplificadoras o efectoras (enzimas que generan segundos mensajeros). Es importante mencionar que toda cascada de señalización celular tiene mecanismos de regulación negativa, con el fin de mantener la homeostasis celular.

Los esfuerzos de secuenciación del Proyecto del Genoma Humano revelan que más del 20% de los aproximados 32000 genes humanos (exones) codifican para proteínas involucradas en la transducción de señales incluyendo receptores transmembranales, proteínas G y enzimas efectoras. Entre éstas se encuentran más de 520 cinasas de proteínas y 130 fosfatasas encargadas de regular la fosforilación de proteínas, modificación de suma importancia en eventos de señalización (Blume-Jensen et al., 2001).

Como es de esperar, alteraciones en los procesos de señalización celular están involucradas en numerosas enfermedades. Un ejemplo bien conocido es el cáncer, enfermedad multifactorial en la que numerosas vías de señalización son propensas a sufrir mutaciones oncogénicas llevando a un descontrol en la proliferación. Las moléculas que controlan el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celulares se encuentran frecuentemente mutadas en diversos cánceres. Un buen ejemplo está dado por los receptores con actividad de cinasa de tirosinas (RPTKs). Cuando éstos se encuentran mutados o alterados estructuralmente, pueden actuar como potentes oncoproteínas causando transformación celular. Contrariamente, la actividad de los RPTKs en células no transformadas, está estrictamente regulada y los mecanismos de dicha regulación son importantes para entender los procesos que causan su activación oncogénica.



**FIGURA 1. Mecanismo general de transducción de señales.**

*Las células secretan numerosos factores o moléculas de señalización que les permiten comunicarse con su entorno y con otras células. Dichas moléculas de señalización tienen receptores específicos en las células blanco y al unirse a ellos inducen, en la célula receptora, una cascada de señalización que culmina en la expresión de genes responsivos al estímulo dado. De esta forma la célula responde a los mensajes extracelulares manteniendo así la homeostasis.*

## 2) Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )

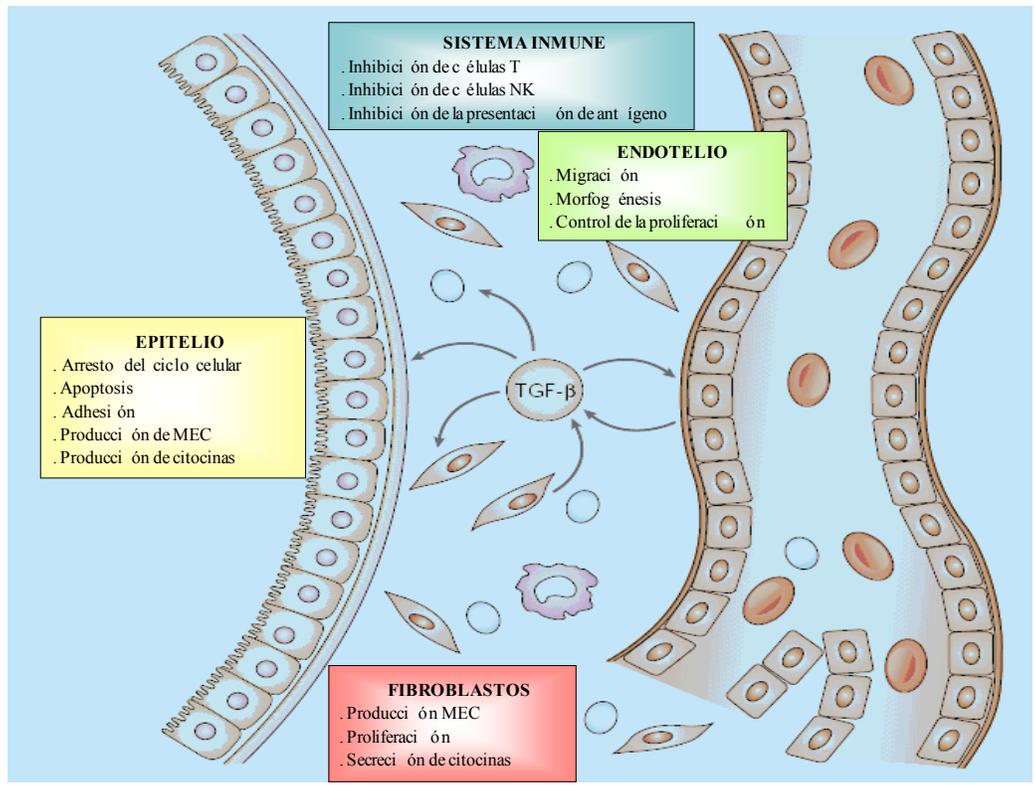
### a. Superfamilia de citocinas del TGF- $\beta$

Los miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes-beta (TGF- $\beta$ , del inglés *Transforming Growth Factor-beta*) que incluyen a TGF- $\beta$ , activinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), son citocinas de secreción, estructuralmente relacionadas y presentes en diferentes *phyla* de organismos (desde gusanos e insectos hasta mamíferos).

Estas citocinas regulan procesos fisiológicos importantes como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, la migración y la adhesión celular, así como el desarrollo embrionario (Massagué et al., 2006).

La señalización desregulada de miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  está implicada en varias enfermedades humanas tales como desórdenes autoinmunes, desórdenes vasculares y cáncer.

El TGF- $\beta$ , miembro representativo de la gran familia, en su función normal contribuye a la inmunomodulación, a procesos apoptóticos, a la vasculo y angiogénesis y a la producción de matriz extracelular (Figura 2). Sin embargo, si su función se encuentra alterada, está asociado a desórdenes autoinmunes, carcinogénesis, desórdenes vasculares y fibrosis de varios órganos.



**FIGURA 2. Funciones del TGF-β sobre los diferentes tipos celulares.**

El TGF-β contribuye al mantenimiento de la homeostasis controlando la proliferación de distintos tipos celulares entre los que destacan células epiteliales, endoteliales y células del sistema inmune. MEC : Matriz extracelular ; NK : células natural killer (Tomado de Siegel and Massagué, 2003. *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-β in homeostasis and cancer*).

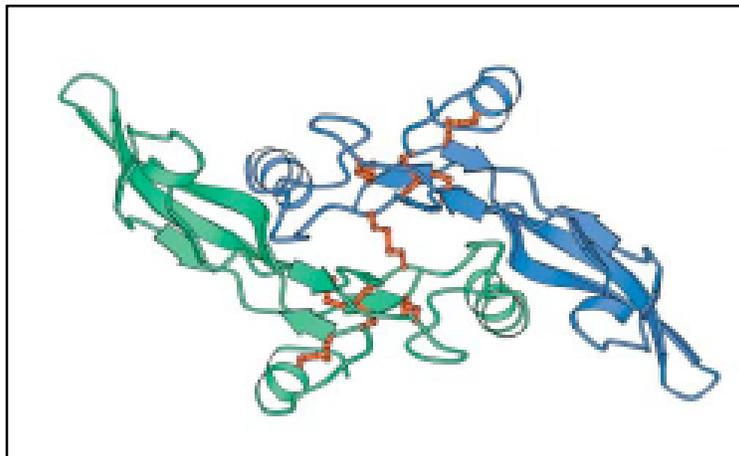
En ratones, el “knockout” del gen de TGF-β1 resulta en una inflamación letal proveyendo así un modelo importante para el estudio de las enfermedades autoinmunes. A las tres semanas de edad, los ratones TGF-β<sup>-/-</sup> desarrollan un síndrome inflamatorio progresivo y letal: los análisis histológicos muestran una importante infiltración de linfocitos y macrófagos además de una necrosis tisular en numerosos órganos como el bazo, los nodos linfáticos, el estómago, el hígado, el páncreas, el colon y las glándulas salivares. Estas lesiones se asemejan a las características de los desórdenes autoinmunes sugiriendo un papel prominente del TGF-β en la regulación de la proliferación de células del sistema inmune y su extravasación en tejidos (Dünker et al., 2000). De hecho, la función central del factor de crecimiento en el sistema inmune es el mantenimiento de la tolerancia inmunológica a través de la regulación de la proliferación, diferenciación y sobrevivencia

de linfocitos, células NK (natural killer), células dendríticas y macrófagos. Además, TGF- $\beta$  controla la iniciación y terminación de las respuestas inflamatorias mediante la regulación de procesos quimiotácticos (Li et al., 2006).

El TGF- $\beta$  también juega un papel importante en procesos carcinogénicos funcionando a la vez como factor antiproliferativo (supresor de tumores) y promotor de metástasis dependiendo de la etapa en la que se encuentre el tumor (Wakefield et al., 2002; Derynk et al., 2001).

En procesos de regeneración hepática, el factor de crecimiento controla la proliferación e inhibición del crecimiento de diferentes tipos celulares presentes en el hígado, regulando también la restauración de la matriz extracelular y siendo por tanto responsable de eventos fibróticos en enfermedades hepáticas (Neuman, 2003).

Todas estas diversas actividades han generado intensas investigaciones para el entendimiento de la señalización dada por los miembros de la familia del TGF- $\beta$ .



### ***Estructura del TGF- $\beta$ 3***

*Estructura del homodímero de TGF- $\beta$ 3: los dos monómeros están coloreados en azul y verde. Las cadenas laterales de cisteína y los puentes disulfuro están representados por líneas rojas. El ligando dimérico se encuentra unido por un enlace disulfuro.*

*(Tomado de Shi and Massagué, 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus)*

## b. Vías de señalización del TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es sintetizado como prohormona que puede ser almacenada en el espacio extracelular hasta ser activada por proteólisis. La activación permite al ligando su unión al receptor celular.

La vía de señalización más conocida de la familia del TGF- $\beta$  es sin duda la de señalización a través de las Smads (Figura 4), proteínas de unión a DNA que tienen la capacidad de reclutar coactivadores o correpresores de la transcripción con el fin de activar o reprimir genes blanco del TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  induce respuestas celulares mediante la formación de complejos heterotetraméricos de receptores específicos tipo I (T $\beta$ RI) y tipo II (T $\beta$ RII) con actividad de cinasa de serinas y treoninas. Estos receptores son proteínas transmembranales (atravesan una sola vez la membrana) que al activarse funcionan como tetrámero. El receptor tipo II es una cinasa constitutivamente activa que tiene mayor afinidad por el ligando que el receptor tipo I. Después de unirse el ligando al receptor tipo II, éste forma un complejo heterotetramérico con el receptor tipo I, al cual transfosforila en el dominio GS en residuos de serinas y treoninas. Así, el receptor tipo I activado es capaz de fosforilar y activar a su vez a sus principales proteínas efectoras: las proteínas R-Smad (*Receptor-activated Smad*), específicamente las Smad2 y Smad3 (Macías-Silva et al., 1996).

Al ser fosforiladas por el T $\beta$ RI en las últimas serinas del motivo conservado -SSXS-, las R-Smad activadas son capaces de formar dímeros entre ellas y posteriormente asociarse, formando un heterotrímero, con una Co-Smad (*Common-partner Smad* o Smad4). Es importante notar que, en ausencia de ligando, las R- y Co-Smad se encuentran en citoplasma pero al darse la estimulación con TGF- $\beta$ , éstas proteínas se acumulan en el núcleo.

De esta manera, el complejo trimérico de Smads activas viaja a través del citoplasma y penetra el núcleo, donde reconoce secuencias de DNA específicas denominadas SBE (*Smad-Binding Element*, GTCTAGAC) llevando a la regulación positiva o negativa de cientos de genes (Attisano et al., 2000; Itoh et al., 2000; Javelaud et al., 2004; Massagué et al., 2006; Moustakas et al., 2001; ten Dijke et al., 2000).

Unidas al DNA, las Smads pueden regular positivamente o negativamente la expresión de genes dependientes de TGF- $\beta$ : reclutando componentes de la maquinaria de transcripción como p300/CBP (co-activadores con actividad de acetiltransferasas de histonas que facilitan la transcripción por la descondensación cromosómica) inducen la transcripción génica; reclutando componentes de la maquinaria represora como Ski, SnoN y TGIF (co-represores con capacidad de reclutar deacetilasas de histonas) inducen la represión génica (ten Dijke et al., 2000; Moustakas et al., 2001; Izzi et al., 2004).

Las proteínas Smad consisten en dos dominios globulares MH1 y MH2 unidos entre sí por una región flexible conocida como región “linker” (región puente). En el estado basal los dominios MH1 y MH2 interactúan el uno con el otro inhibiéndose mutuamente; sin embargo, la fosforilación de las R-Smads por el T $\beta$ RI revierte esta inhibición permitiendo la función de los dos dominios.

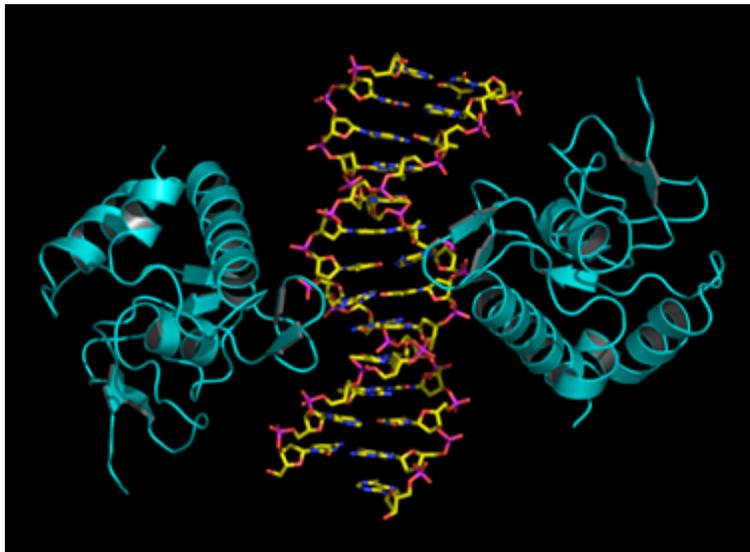
El dominio MH1 está involucrado en la importación nuclear, en la unión al sitio SBE presente en el DNA (Zawel et al., 1998; Figura 3) y en la asociación a otros factores de transcripción. El dominio MH2 permite la interacción con el receptor (específicamente mediante el asa o “loop” L3), con proteínas de andamiaje y facilita la formación de homo y heterodímeros, confiriendo también la actividad transactivadora (Itoh et al., 2000; Moustakas et al., 2001).

El dominio de unión a DNA se encuentra presente en las Smad3 y Smad4 en forma de una horquilla beta (“ $\beta$ -hairpin”) responsable del contacto directo con la secuencia SBE. Smad2 carece de la capacidad de unión a DNA porque contiene una secuencia adicional, codificada por el exón3, localizada junto a la horquilla beta. Secuencias tipo SBE han sido identificadas en los promotores de numerosos genes entre los cuales se encuentran *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), *IgA*, *junB*, *c-Jun* y el gen de la colágena tipo IV (ten Dijke et al., 2000).

Aunque la secuencia SBE es crítica para la inducción de la expresión génica dependiente de TGF- $\beta$  por las Smads, dicha inducción no se basa solamente en la unión específica al SBE: la combinación específica de Smads determina la región del DNA que será reconocida y si se reclutarán co-activadores o co-represores transcripcionales. Esto es porque la afinidad de las Smads por el DNA es baja y éstas proteínas requieren de otros

factores para unirse fuertemente a los promotores de los genes responsivos. De hecho los sitios SBE están frecuentemente localizados cerca de sitios de unión para otros factores transcripcionales como FAST-1, AP-1 (Jun-Fos), TFE-3, ATF-2 (ten Dijke et al., 2000), FOX, HOX, RUNX, E2F y CREB (Massagué et al., 2005; Feng et al., 2005). Así, las respuestas genéticas al TGF- $\beta$  son clasificadas según los grupos de genes controlados por una combinación específica de Smads/co-factores. La disponibilidad de estos co-factores depende del tipo y contexto celular, hecho que determina en gran parte la amplia gama de respuestas generadas por TGF- $\beta$  en cada célula.

A pesar de que se consideran a las Smads como los principales mediadores de las señales del TGF- $\beta$ , se ha observado recientemente que la citocina también tiene la capacidad de activar vías alternas (independientes de Smads) tales como las vías de las MAPK (específicamente Ras/Erk, JNK y p38), de PI3K/Akt y de GTPasas pequeñas como RhoA (Derynck et al., 2003).



**FIGURA 3. Estructura cristalizada del dominio MH1 de Smad4 unido al DNA**

*(Tomado de Shi et al., 1998. Crystal Structure of a Smad MH1 Domain Bound to DNA : Insights on DNA-binding in TGF-beta Signaling)*

### c. Regulación de la vía de transducción del TGF- $\beta$

Como cualquier vía de transducción, la vía del TGF- $\beta$  se encuentra estrictamente regulada tanto positivamente como negativamente. La regulación positiva es crítica para la amplificación de la señal por la citocina y para que se dé la respuesta celular al estímulo específico. La regulación negativa es crucial en la terminación de la señal y se manifiesta generalmente mediante un proceso de retroalimentación negativa.

#### Regulación positiva de la vía:

Se sabe que el TGF- $\beta$  puede inducir la expresión de su propio gen a manera de autorregulación positiva: las tres isoformas presentes en mamífero, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 son auto-inducidas por diferentes isoformas de TGF- $\beta$  (Kim et al., 1990).

Por su parte, las Smads son moduladas positivamente por el mismo TGF- $\beta$  (siendo activadas por el receptor después de la unión del ligando) y también por otras vías de señalización: el TGF- $\beta$  es capaz de activar a las MAPK como Erk, p38 y JNK (Derynck et al., 2003) y se ha visto que c-Jun y ATF-2 (factores transcripcionales activados por JNK y p38 respectivamente) tienen la capacidad de interactuar directamente con las Smad3 y Smad4 para inducir la expresión de genes blanco del TGF- $\beta$  (Zhang et al., 1998).

#### Regulación negativa de la vía:

La vía de transducción del TGF- $\beta$  se encuentra regulada por inhibidores y correpresores específicos.

La Smad inhibitoria (I-Smad o *Inhibitory Smad*) Smad7 actúa como inhibidor de la vía, y su gen es un blanco directo del TGF- $\beta$  por lo que la misma vía induce su expresión para participar como una asa de retroalimentación negativa. Al tener capacidad de unión al sitio catalítico del receptor tipo I, Smad7 inhibe su actividad de cinasa. El receptor I es entonces incapaz de fosforilar y activar a las R-Smad por lo que ningún complejo de Smads activo se formará, evitando así la transcripción de genes dictada por TGF- $\beta$ .

Esta proteína inhibitoria también recluta a las ligasas de ubiquitina Smurf-2 (*Smad Ubiquitination-Related Factor-2*) y APC (*Anaphase-promoting Complex*) promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación proteosomal de las Smads activas y de los

receptores tipo I y II. Así, Smad7 funciona como un adaptador para el reclutamiento de las Smurfs al complejo de receptores, mediando así la degradación de éstos y el apagado de la señal del TGF- $\beta$  (Izzi et al., 2004; Miyazono, 2000).

Es importante notar que además de ser inducida por TGF- $\beta$  (mediante efectos directos de Smad3 y Smad4 sobre el promotor de *smad7*), Smad7 puede ser inducida por otros estímulos extracelulares incluyendo factores de crecimiento peptídicos y estrés. Por ejemplo, se ha visto que las células tratadas con IFN- $\gamma$  (Interferon gama) se vuelven resistentes a los efectos de TGF- $\beta$  porque dicha citocina pro-inflamatoria, activando la vía de JAK/STAT, induce la expresión de *smad7*, hecho que conlleva a la inhibición de la señalización por TGF- $\beta$  (Ulloa et al., 1999).

Los correpresores de la vía del TGF- $\beta$  son, además de TGIF (*TG3-Interacting Factor*), las proteínas conocidas como Ski y SnoN. Estas proteínas nucleares con alta afinidad por las Smads, interactúan directamente con Smad2, 3 y 4 reprimiendo su capacidad de activar genes blanco de TGF- $\beta$ .

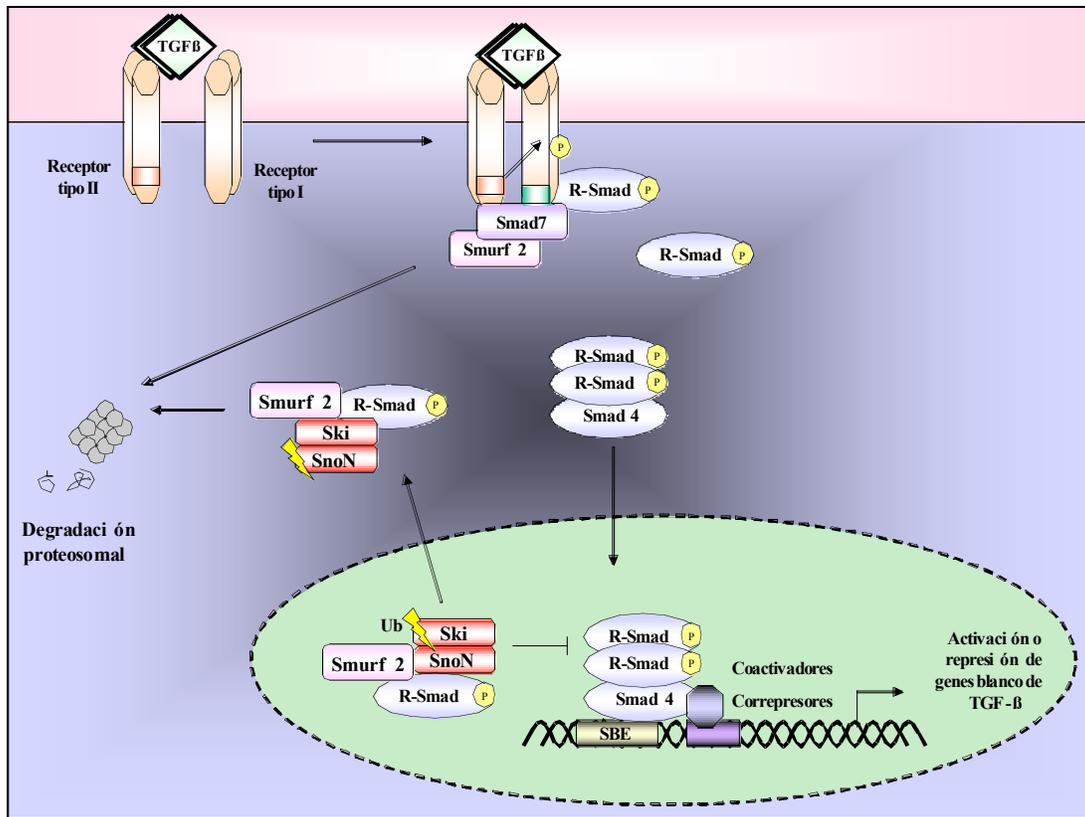
Mientras que los activadores transcripcionales se encuentran frecuentemente asociados a acetiltransferasas de histonas (HATs), los correpresores como Ski y SnoN, después de unirse a los heterotrímeros activos de Smads, son capaces de reclutar deacetilasas de histonas (HDACs) que existen a manera de complejos multiproteicos con otras proteínas correpresoras como Sin3, NcoR (*Nuclear hormone corepressor*) y SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor*). De esta manera Ski y SnoN logran reprimir la señal dada por TGF- $\beta$ .

Es importante mencionar que, para mediar la inhibición de la cascada del TGF- $\beta$ , Ski y SnoN también pueden unirse a los complejos activos de Smads, secuestrándolos en el citoplasma e impidiendo su translocación nuclear y la posterior transactivación genética (ten Dijke et al., 2000; Stroschein et al., 1999).

Sin embargo, los mismos correpresores de la vía del TGF- $\beta$  son regulados dinámicamente y estrictamente: al activarse la vía y para que el TGF- $\beta$  pueda señalizar, las Smads activas son capaces de unirse a Ski y SnoN, funcionando como adaptadores para reclutar ligasas de ubiquitina como Smurf2 y APC, que llevan a la ubiquitinación de éstos correpresores. Así, Ski y SnoN son degradados vía proteosomal permitiendo la señalización del TGF- $\beta$ .

Posteriormente, las mismas Smads inducen la transcripción del gen *smoN* y la acumulación de dicho correpresor lleva al apagado de la señal de TGF- $\beta$ , siendo este otro caso de un asa de retroalimentación negativa.

Resulta importante notar que la regulación de la vía es extremadamente estricta y se da a cada paso de la cascada de señalización. Hay regulación desde el nivel de la activación de las formas latentes del TGF- $\beta$ , a nivel del número de receptores para TGF- $\beta$  presente en una célula y a nivel de la cantidad o poza de Smads presentes (cuyos niveles son regulados por las Smurfs aún en condiciones basales). Además se sabe que algunas vías (independientes del factor de crecimiento transformante-beta) son capaces de regular negativamente la señal por TGF- $\beta$ : EGF e IFN- $\gamma$  inducen la expresión de Smad7, las Erks (activadas por EGF, HGF y también por el mismo TGF- $\beta$ ) son capaces de fosforilar a las R-Smads en la región “linker” inhibiendo su translocación nuclear (Massagué, 2000), y Ras, frecuentemente sobreactivado en tumores, conlleva a la inhibición de la acumulación nuclear de las Smads generando una no responsividad celular a los estímulos antiproliferativos del TGF- $\beta$  (Kretzschmar et al., 1999; ten Dijke et al., 2000).



**FIGURA 4. Vía de señalización de TGF-β dependiente de Smads**

En el espacio extracelular, el ligando dimérico se une al receptor tipo II ( $T\beta RII$ ), el cual induce la transfosforilación del receptor tipo I ( $T\beta RI$ ). El receptor tipo I activado es entonces capaz de activar a su vez a las R-Smad (Smad2 y 3), proteínas que forman complejos heterotriméricos con una Co-Smad (Smad4). Los heterómeros translocan al núcleo, donde regulan la transcripción de genes blanco mediante interacción física con el DNA (por el reconocimiento de la secuencia SBE) y con otros activadores (p300/CBP, FAST, Jun, Fos) o represores (TGIF, Ski y SnoN) transcripcionales. Al iniciarse la cascada de TGF-β, los correpresores de la vía Ski y SnoN (basalmente presentes en el núcleo) son degradados en un proceso dependiente de Smads y de proteosoma. De esta manera el factor de crecimiento es capaz de transmitir su señal. Pero posteriormente, a manera de autorregulación, TGF-β induce la expresión de proteínas inhibitorias como Smad7 y SnoN. Smad7 induce la degradación proteosómica de los receptores y de las Smads mientras que SnoN impide la transactivación de genes blanco de TGF-β dada por las Smads activas, todo esto con el fin de apagar la señal.

#### d. TGF-β y cáncer

El papel del TGF-β en el cáncer es complejo pues involucra tanto aspectos de supresión como promoción tumoral.

La habilidad de TGF- $\beta$  para inhibir de manera potente la proliferación de células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas y del sistema inmune es central para su acción supresora de tumores (Miyazono et al., 1994). Esta función es en parte dependiente de la inhibición de *c-myc* mediada por la unión de las Smads a un elemento inhibitorio de TGF- $\beta$  presente en el promotor del oncogen (Pietenpol et al., 1990; Chen et al., 2001). De hecho en los tejidos normales, la actividad supresora del factor de crecimiento es la que predomina, aunque durante procesos tumorigénicos, los cambios en la expresión del TGF- $\beta$  en el microambiente y en las respuestas celulares favorecen su actividad oncogénica (Wakefield et al., 2002).

Generalmente, los dos alelos de un gen supresor de tumores deben perderse o inactivarse para originar tumores. Sin embargo, en ratones, la pérdida de un alelo de TGF- $\beta$  es suficiente para inducir la promoción tumoral, lo cual sugiere que se da el fenómeno conocido como haploinsuficiencia.

De manera también interesante, un polimorfismo en el gen del factor de crecimiento asociado con una cantidad mayor de citocina circulante, está relacionado con una reducción en el riesgo de contraer cáncer de mama en mujeres caucásicas (Ziv et al., 2001).

Una característica de numerosos tipos de cáncer es la evasión a los efectos antiproliferativos o citostáticos de la citocina: muchos tumores se vuelven refractarios o no responsivos al TGF- $\beta$ , sea por pérdida genética o epigenética de los componentes de la vía (mutaciones en los receptores tipo I y II y en las proteínas Smad o cambios en su expresión) o más comúnmente por alteraciones en otras vías de señalización celular, hecho que afecta indirectamente la señalización por TGF- $\beta$  (Yingling et al., 2004; Caestecker et al., 2000)

La inactivación de la vía o alteraciones en ella han sido demostradas en muchos cánceres humanos representando cambios moleculares pro-tumorigénicos importantes. Por ejemplo, mutaciones en el receptor tipo II para TGF- $\beta$  son frecuentemente encontradas en cáncer de colon y mutaciones de pérdida de función de Smad4 están frecuentemente presentes en carcinomas pancreáticos (Maurice et al., 2001).

El cáncer de mama representa un caso muy interesante: la vía del TGF- $\beta$  se encuentra totalmente intacta (los elementos de la vía como receptores y proteínas Smad no están mutados) sin embargo las células crecen de manera exacerbada evitando los efectos antiproliferativos de la citocina. Una de las causas de esto es la incapacidad de las Smads para posicionarse en el elemento inhibitorio de TGF- $\beta$  en el promotor de *c-myc* (Chen et al., 2001). De esta manera se da la sobre-expresión del oncogen y por ende un descontrol del ciclo celular.

Frecuentemente, los tumores epiteliales tempranos todavía responden al TGF- $\beta$  pero al progresar las lesiones pre-malignas, los mecanismos de TGF- $\beta$  se ven alterados y el papel de éste cambia de supresor tumoral a oncogen.

TGF- $\beta$  puede funcionar como promotor tumoral, entre otras cosas, porque tiene la habilidad de convertir tumores epiteliales tempranos en tumores invasivos y metastásicos por un mecanismo conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT o *Epithelial to Mesenchymal Transition*). Este evento de transdiferenciación causa un incremento de la plasticidad celular permitiendo a las células separarse del tumor primario para llegar al flujo sanguíneo, lo cual resulta en procesos metastásicos.

Además, las células malignas secretan TGF- $\beta$ , que actúa en el organismo como un supresor de las respuestas inmunes antitumorales (dadas primordialmente por linfocitos TCD8+ citotóxicos), como estimulador de la producción de matriz extracelular y como potenciador de la angiogénesis. Estas funciones de TGF- $\beta$  en estados tumorales son semejantes a las funciones que esta citocina tiene durante el desarrollo embrionario por lo que la naturaleza de las células tumorales se asemeja a un tipo desdiferenciado.

Clínicamente, TGF- $\beta$  se encuentra elevado en el plasma de pacientes con cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma hepático y cáncer de próstata por lo que se ha postulado que los niveles de dicha citocina en plasma podrían funcionar como buen marcador predictivo de la progresión de la enfermedad (Teicher, 2001).

Mientras que las terapias citotóxicas atacan directamente las células malignas y la terapia anti-angiogénica se enfoca en las células endoteliales, se ha postulado que una terapia anti-TGF- $\beta$  podría revertir los efectos inmunosupresores, disminuir la

acumulación de matriz extracelular y la angiogénesis. Las terapias antitumorales deberían tener como propósito inhibir el fenotipo invasor inducido por TGF- $\beta$  sin perder entre tiempo sus efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos (Yingling et al., 2004).

### 3) Ski y SnoN: correpresores de la vía de TGF- $\beta$

#### e. Familia de correpresores Ski

La familia de correpresores nucleares Ski comprende dos miembros denominados *ski* y *sno*, proto-oncogenes muy importantes en procesos de desarrollo embrionario y capaces de inducir transformación y diferenciación celular estando sobreexpresados (Figura 5).

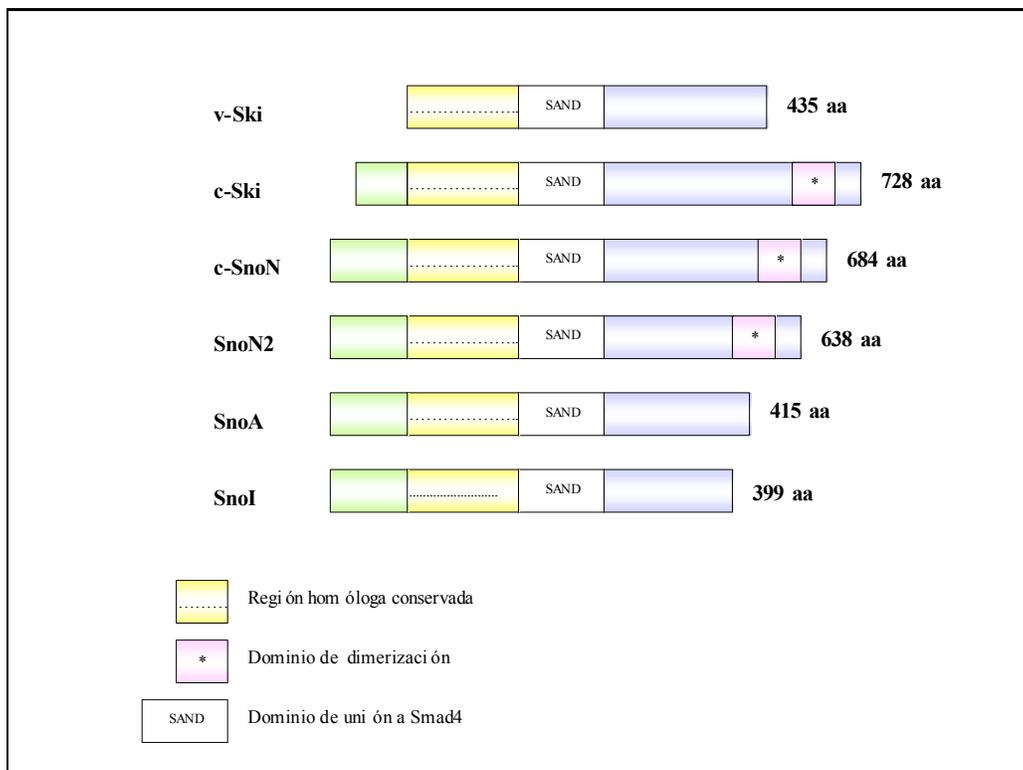
Ski (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*), y más específicamente v-Ski, fue la primera proteína transformante identificada del retrovirus aviario de Sloan-Kettering, capaz de inducir transformación oncogénica en células embrionarias de pollo (Li et al., 1986). Posteriormente se pudieron clonar el homólogo humano c-Ski y la proteína relacionada c-SnoN (*Ski-related novel gene N*) con sus tres isoformas derivadas de procesamiento o *splicing* diferencial (SnoN2, SnoI, SnoA).

El oncogen v-Ski es una versión truncada del proto-oncogen celular c-Ski (Colmenares et al., 1991). v-Ski carece de una región de 292 aminoácidos del extremo C-terminal presente en c-Ski pero conserva la región rica en cisteínas del extremo N-terminal responsable de la capacidad transformante de *ski* (Tokitou et al., 1999). La sobreexpresión de c-Ski o v-Ski induce transformación celular o diferenciación a tejido muscular en fibroblastos embrionarios.

Las proteínas nucleares humanas c-Ski y c-SnoN consisten de 728 y 684 aminoácidos respectivamente (Ski con peso molecular de 90 kDa y SnoN con peso molecular de 70 kDa). Su extremo N-terminal, contrariamente al C-terminal poco conservado, contiene una región de aproximadamente 270 residuos aminoacídicos muy conservada y con alto grado de homología entre v-Ski, c-Ski y c-SnoN.

La región conservada de Ski y SnoN es la que les permite ejercer su actividad transformante e inductora de diferenciación, mientras que la región C-terminal es la que posibilita procesos de homo y heterodimerización.

Es importante resaltar que Ski y SnoN tienen numerosas funciones, algunas siendo paradójicas: son capaces de promover tanto transformación oncogénica (caracterizada por un aumento en la proliferación celular) como diferenciación a músculo esquelético (caracterizada por un arresto en el ciclo celular). Así, por ejemplo, son capaces de afectar las respuestas de los mioblastos induciéndolos a proliferar o a diferenciarse (Pearson-White et al., 1997).



**FIGURA 5. Estructura de las proteínas de la familia Ski**  
(Modificado de Luo., 2004. *Ski and SnoN : Negative regulators of TGF- $\beta$  signaling*)

Las proteínas Ski y SnoN tienen importantes funciones en el desarrollo embrionario, la diferenciación y la proliferación celular, por lo que mutaciones en sus genes o alteraciones en las mismas proteínas están directamente ligadas a defectos del desarrollo embrionario y a procesos carcinogénicos.

### Ski:

Estudios *in vivo* en oocitos de *Xenopus* y en ratones demuestran que *ski* tiene un papel esencial en el desarrollo de tejidos neuronales y musculares (Berk et al., 1997). En *Xenopus*, la sobreexpresión de *ski* induce la formación de un segundo eje neural y la expresión de genes específicos de células neuronales en explantes de ectodermo. Se vió que esta habilidad de Ski para inducir un fenotipo neuronal se debe a su capacidad de interacción con proteínas Smad, puesto que mutantes de Ski defectuosas en la unión con Smads son incapaces de inducir la expresión de genes específicos de neuronas (Wang et al., 2000).

En ratones, *ski* se encuentra expresado a niveles bajos en todos los tejidos adultos. Su expresión se incrementa durante el desarrollo embrionario especialmente en el tubo neural y en músculo esquelético. De hecho, los ratones “knockout” para *ski* muestran defectos en el cierre del tubo neural craneal, problema causado por procesos apoptóticos exacerbados en dicho tejido, demostrando que Ski tiene un papel importante en la sobrevivencia celular. Además de las fallas en el desarrollo de tejidos del sistema nervioso, los ratones “knockout” para *ski* también muestran menor masa de músculo esquelético, probablemente debido a defectos en la proliferación o sobrevivencia de mioblastos (Luo, 2004).

### SnoN:

A pesar del alto grado de homología con Ski, SnoN tiene un papel muy diferente en el desarrollo embrionario. Ratones “knockout” para *sno* resultan letales antes del día 3 embrionario porque la proteína es esencial para el correcto desarrollo del blastocisto. Los ratones con deleciones en la región promotora del mismo gen son viables aunque muestran defectos en la activación de linfocitos T (Luo, 2004).

SnoN, al igual que Ski, puede convertir células embrionarias en células de músculo esquelético y su sobreexpresión induce la proliferación independiente de adhesión en fibroblastos embrionarios de pollo. Además, los niveles de ésta proteína se encuentran elevados en células cancerosas sugiriendo un papel de promotor tumoral.

Recientemente también se ha vinculado a SnoN con procesos de desarrollo de sistema nervioso, al observar la participación de dicho correpressor en la elongación de los axones neuronales (Stegmüller et al., 2006).

#### f. Ski y SnoN como proteínas oncogénicas

El papel de Ski y SnoN en procesos tumorigénicos es complejo. Estas proteínas son consideradas oncoproteínas porque su sobreexpresión resulta en la transformación oncogénica de fibroblastos de pollo y codorniz. Además, un incremento en la expresión de Ski y SnoN ha sido detectado en líneas celulares derivadas de numerosos tipos de cánceres humanos como melanoma, cáncer de mama, de esófago, de pulmón, de estómago y próstata, fenómeno que explicaría la resistencia de las células malignas a los estímulos antiproliferativos de TGF- $\beta$ .

Es importante notar que el aumento en la expresión de estas oncoproteínas puede tener diferentes orígenes: puede deberse a procesos de amplificación génica o alteraciones en la expresión génica a nivel transcripcional. Para el primer caso, en tumores esofágicos se ha observado una amplificación de la región 3q26 del cromosoma humano conteniendo al gen de *snoN*: este proceso de amplificación génica es responsable de la sobreexpresión de la oncoproteína en dicho proceso carcinogénico (Imoto et al., 2001). Sin embargo se ha visto que en cánceres pulmonares el aumento en la expresión de *snoN* ocurre a nivel transcripcional.

La progresión de tumores no solo se debe a una expresión exacerbada de *ski* y *snoN* sino también a la localización subcelular alterada de las proteínas. De manera general se considera a los correpresores como proteínas nucleares y se ha observado que células de tumores avanzados tienen a Ski y SnoN localizados citoplásmicamente (Zhang et al., 2003). Sin embargo y de manera opuesta, también se ha constatado que en células normales Ski y SnoN se encuentran localizados en citoplasma, adquiriendo una localización nuclear en células tumorales (Krakowski et al., 2005).

Con seguridad se sabe que la actividad transformante de Ski y SnoN depende de su capacidad de unión a las Smads porque las oncoproteínas mutantes en el sitio de unión a Smads son incapaces de inhibir la señal del TGF- $\beta$  y de inducir transformación celular (He et al., 2003). Además de su capacidad de interacción con las Smads, lo que caracteriza a Ski y SnoN como oncogenes es su capacidad de unión a proteínas supresoras de tumores tan importantes como Mad, Rb (Retinoblastoma) y p53. Tanto v-Ski como c-Ski pueden unirse (mediante N-CoR) a la proteína Mad, impidiendo que esta última ejerza sus efectos inhibitorios de la proliferación en forma del heterodímero Mad/Max. También pueden unirse a Rb e impedir el control que éste supresor tiene sobre el arresto de ciclo celular en G1/S (Tokitou et al., 1999; Prathapam et al., 2002).

Contrariamente a Ski, en el caso de SnoN se conocen muchas menos interacciones con otras proteínas pero, importantemente, se planteó un modelo cooperativo entre SnoN y p53 en la modificación de la cromatina y la represión transcripcional del gen de la alfa-fetoproteína (*AFP*), un importante marcador tumoral (Wilkinson et al., 2005). En este modelo SnoN estaría actuando más como supresor tumoral, cooperando con p53 en la represión de AFP.

Después de todo lo anteriormente mencionado, aunque *ski* y *sno* son generalmente considerados oncogenes, en un estudio realizado con ratones heterocigotos para *ski* (*ski*<sup>+/-</sup>) y *sno* (*sno*<sup>+/-</sup>), se vió que estos animales son más susceptibles a la tumorigénesis inducida por carcinógenos con respecto a los ratones silvestres, lo cual sugeriría un posible papel de estas proteínas como supresores tumorales (Luo et al., 2004; Shinagawa et al., 2001). Además, el ratón *sno*<sup>+/-</sup> desarrolla más linfomas de manera espontánea comparado con el ratón silvestre *sno*<sup>+/+</sup> (Pearson-White et al., 2003).

#### g. Ski y SnoN como correpresores de la vía del TGF- $\beta$

La expresión génica en eucariontes en respuesta a estímulos externos es un fenómeno complejo que necesita procesos coordinados de activación y represión génica mediados por activadores y represores transcripcionales, además de todos los complejos

proteicos que conforman la maquinaria de transcripción. Los reguladores transcripcionales pueden dividirse en coactivadores y correpresores.

Los correpresores, como Ski y SnoN, tienen por función reprimir la transcripción uniéndose al DNA con la ayuda de otros complejos multiproteicos como factores transcripcionales y deacetilasas de histonas entre otros, e impidiendo la actividad transactivadora de activadores génicos.

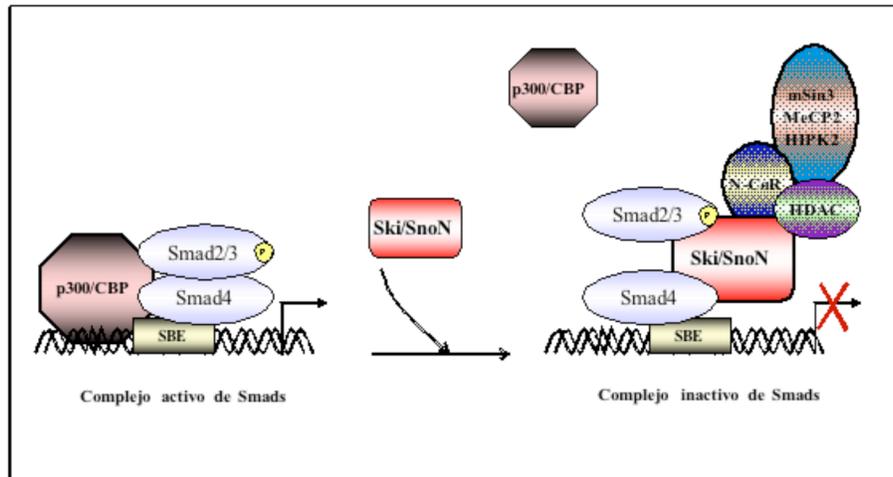
La regulación de la interacción de los correpresores con otros componentes de la maquinaria de represión es crítica para la función biológica normal, por lo que alteraciones en dichas interacciones dan lugar a trastornos fisiológicos de suma importancia (Burke et al., 2000).

La principal característica que hace de Ski y SnoN los reguladores negativos de la vía del TGF- $\beta$  es su capacidad de unión a las Smad2, 3 y 4 (Sun et al., 1999; Ueki et al., 2003). Los dos correpresores poseen una alta afinidad por los complejos heterotriméricos de Smads activos e interactúan directamente con ellos reprimiendo su habilidad para activar genes blanco de TGF- $\beta$  (Figura 6).

Ski y SnoN se encuentran en las células preferencialmente formando heterodímeros Ski:SnoN mediante su extremo C-terminal y se asocian al dominio MH2 de Smad3 y 4 (Cohen et al., 1999). En ensayos de co-inmunoprecipitación se comprobó la capacidad de unión de c-Ski a Smad2 y Smad3 (Ueki et al., 2003). Se sabe además que las oncoproteína mutadas y defectuosas en la unión con Smads son incapaces de inhibir el arresto del ciclo celular dado por TGF- $\beta$  y no muestran actividad transformante, por lo que su capacidad oncogénica está dada en gran parte por su capacidad de unión a las proteínas Smad (He et al., 2003). Además se sabe que la interacción de Ski y SnoN con Smad3 o Smad4 es necesaria y suficiente para la actividad represora de estas oncoproteínas (Ueki et al., 2003).

Ski y SnoN son capaces de reconocer secuencias SBE en el DNA a las cuales se unen mediante las proteínas Smad y ejercen sus mecanismos de represión mediante el reclutamiento de complejos de correpresores transcripcionales (como N-CoR/SMRT y mSin3A) y deacetilasas de histonas (HDACs). El reclutamiento de esta maquinaria de represión transcripcional impide la unión de los coactivadores transcripcionales

(p300/CBP entre otros) que normalmente se unen a los complejos de Smads permitiendo la expresión de genes blanco de TGF- $\beta$  (Zhu et al., 2005).



**FIGURA 6. Mecanismo de represión de las Smads por Ski y SnoN**

Los complejos activos de Smads reconocen secuencias SBE en el DNA y, junto con otros factores transcripcionales y coactivadores, regulan la expresión de genes blanco de TGF- $\beta$ . Los correpresores Ski y SnoN inhiben la actividad transactivadora de las Smads uniéndose directamente a ellas y reclutando elementos de la maquinaria de represión transcripcional entre los cuales se encuentran las deacetilasas de histonas (HDAC).

(Modificado de Luo., 2004. *Ski and SnoN : negative regulators of TGF- $\beta$  signaling*)

Como ejemplo específico de la represión mediada por Ski y SnoN, es importante mencionar que, en condiciones basales (sin estímulo de TGF- $\beta$ ), Ski y Smad4 se encuentran formando un complejo unido al promotor de *smad7* que reprime la expresión de dicha Smad inhibitoria (Denissova et al., 2004). A raíz de este hallazgo se descubrió, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, que SnoN también se encuentra regulando de manera negativa la expresión de *smad7* en condiciones basales (Briones-Orta et al., 2006). Al tratar las células con TGF- $\beta$ , Ski y SnoN son desplazados del promotor de *smad7* y son reemplazados por complejos activos de Smad2/Smad3. El desplazamiento de los correpresores puede explicarse por su degradación mediada por la citocina. Sin embargo, después de 2 horas de tratamiento se observa una nueva colocación de Ski y SnoN en el promotor de interés.

#### h. Regulación de la expresión de Ski y SnoN

La expresión de Ski y SnoN en células y tejidos normales se encuentra estrictamente regulada. Estas proteínas se expresan, aunque en niveles bajos, de manera ubicua en tejidos embrionarios y postnatales. La activación de su expresión se da durante algunos estadios de desarrollo embrionario en tejidos con una alta tasa de proliferación pero también se da en células cancerosas incluyendo tumores mamarios, esofágicos, pulmonares y musculares.

Según lo que se sabe hasta ahora, la expresión de los correpresores está regulada a distintos niveles : a nivel de activación transcripcional y estabilidad proteica. A nivel de estabilidad proteica se sabe que Ski y SnoN son degradados a tiempos cortos de estimulación por TGF- $\beta$  y de manera dependiente de Smads vía el proteosoma. A nivel de activación transcripcional, se sabe que la misma vía del TGF- $\beta$  es capaz de activar la transcripción de *snoN* dependiente de Smads a manera de autorregulación negativa. Sin embargo, los mecanismos de regulación de la expresión de *ski* permanecen desconocidos hasta el momento.

## CAPITULO 1

### **ANTECEDENTES**

#### 1) Regulación de la función y la expresión de Ski y SnoN por TGF- $\beta$

Como anteriormente se mencionó, Ski y SnoN se expresan de manera ubicua en numerosos organismos y en todos los tejidos. Sus niveles, como los de cualquier proteína, deben estar regulados estrictamente a nivel transcripcional y funcional, sin embargo todavía no se conocen claramente las vías o moléculas encargadas de regular la expresión de estas oncoproteínas en procesos de embriogénesis y cáncer (Luo, 2004).

En cuanto a la regulación de la expresión de los correpresores, se sabe hasta ahora que en etapas tardías de la señalización (a partir de las dos horas), la vía de TGF- $\beta$  induce su propia inhibición mediante la activación de la expresión del correpresor *snoN*, por lo que dicha oncoproteína es un gen blanco del factor de crecimiento.

Los análisis del gen de *snoN* han demostrado que el complejo Smad2/Smad4 es capaz de unirse a un elemento de respuesta a TGF- $\beta$  dentro del promotor de dicho gen, activando su transcripción. Contrariamente, el complejo Smad3/Smad4 inhibe la transcripción de *snoN* por la unión a un sitio inhibitorio de Smad descubierto recientemente (Zhu et al., 2005).

En modelos de regeneración hepática, al realizar hepatectomías o al inducir daño hepático con compuestos tóxicos como el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), se observó una inducción de la expresión tanto de *ski* como de *snoN* en hepatocitos, reflejada por un aumento de su mRNA. Sin embargo se notó que dicha inducción es diferencial: el incremento del mRNA de SnoN se da desde las 2 h post-hepatectomía, mientras que el incremento del mRNA de Ski se hace notorio sólo a partir de las 12 h post-hepatectomía (Macías-Silva et al., 2002). En este modelo se probó que durante procesos de regeneración hepática los correpresores de la vía de TGF- $\beta$  aumentan su expresión para permitir la proliferación de los hepatocitos. También se confirmó que el aumento en el mRNA de *snoN* es dependiente de TGF- $\beta$ .

En cuanto a la regulación de la función de los correpresores, se sabe que ante el estímulo de TGF- $\beta$  (en etapas tempranas de la señalización), Ski y SnoN son degradados en un proceso dependiente de Smads y ubiquitinación (Sun et al., 1999). Para que TGF- $\beta$  pueda señalizar, los correpresores de la vía deben ser degradados por las proteínas Smad con la intervención de ligasas de ubiquitina como Smurf2 y APC. Las Smads activas (específicamente Smad2 y 3) tienen la capacidad de unirse a Ski y SnoN y reclutar las ligasas de ubiquitina mencionadas induciendo la degradación proteosomal de los correpresores, permitiendo así la señalización eficiente de TGF- $\beta$  (Sun et al., 1999; Stroschein et al., 2001; Bonni et al., 2001).

En cursos temporales de estimulación celular con TGF- $\beta$  en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2, se observa una caída importante en los niveles de Ski y SnoN (comparado con los niveles basales) a partir de los 30 minutos y hasta 1 hora después de la incubación con el ligando. En la línea celular A549 (carcinoma pulmonar humano) se observa lo mismo, aunque solo puede detectarse SnoN porque los niveles de Ski en dicha línea celular parecen ser demasiado bajos para ser observados mediante la técnica de Western Blot (Briones-Orta et al., 2006).

Después de una hora de estimulación celular con el factor de crecimiento los niveles proteicos de SnoN se recuperan en los dos tipos celulares. Interesantemente, la recuperación de SnoN es distinta dependiendo del tipo celular: en HepG2 se detecta un aumento en el mRNA y en la proteína de SnoN desde la hora de tratamiento con TGF- $\beta$ , pero los niveles del correpresor no regresan al nivel basal aún después de 3 horas. En este mismo tipo celular no se observa ninguna recuperación de Ski aún después de 3 horas de tratamiento con TGF- $\beta$ . En células A549, a la hora de tratamiento con el ligando, SnoN alcanza niveles más altos que los basales, mismos que se mantienen hasta las 3 horas de tratamiento (Briones-Orta et al., 2006). En conjunto, estos resultados sugieren una regulación diferencial de los correpresores en distintos tipos celulares.

Como ya se ha reportado la caída en los niveles de las dos proteínas correpresoras corresponde a la regulación negativa a nivel de estabilidad proteica dada por la señalización temprana de las Smads por TGF- $\beta$ . El significado funcional de la

recuperación de SnoN es la regulación negativa de la vía, dada por la transcripción de *snoN* dependiente de TGF- $\beta$ , a manera de autorregulación. La no recuperación en los niveles proteicos de Ski da pie a una problemática interesante: ¿cómo es regulado este correpresor? Se recuperan los niveles de Ski a tiempos largos en líneas celulares transformadas? En caso de recuperarse los niveles del correpresor, tampoco se sabe si dicha recuperación podría deberse a una acumulación (ya sea porque no hay degradación de la proteína) o bien a la inducción de la activación transcripcional del gen dependiente de TGF- $\beta$  u otras vías.

## 2) Regulación de la función y la expresión de Ski y SnoN por otras vías de transducción

Hasta ahora se reconoce el papel del TGF- $\beta$  como regulador de la estabilidad proteica de Ski y SnoN y como inductor del gen *snoN*, sin embargo poco se sabe de la regulación de Ski y SnoN por otras proteínas o vías de señalización.

Los hepatocitos de ratón y las células HepG2 estimuladas una hora con TGF- $\beta$  muestran un incremento en el mRNA de *snoN*, indicando que este gen es regulado positivamente por el factor de crecimiento. La estimulación de ambos tipos celulares con IL-6 (interleucina pro-inflamatoria, activadora de la vía de JAK/STAT), 8-bromo-cAMP (activador de cinasas dependientes de AMP cíclico), PMA (activador de la proteína cinasa C o PKC), PDBu (activador de PKC), ácido retinoico (hormona derivada del retinol), anisomicina (activador de MAPK) y suero fetal bovino al 5% por una hora no parece inducir la expresión de *snoN*, sugiriendo que el correpresor es un gen blanco específico de TGF- $\beta$  (Macías-Silva et al., 2002). Sin embargo, no se han realizado estudios similares y tan específicos para Ski, por lo que se ignora si es inducido o regulado por alguna vía.

Existe un estudio, realizado en células humanas epiteliales de riñón (HKC), que explica que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, citocina antifibrótica) es capaz de bloquear la transición epitelio-mesénquima mediada por TGF- $\beta$ 1 induciendo específicamente la expresión del correpresor SnoN desde la hora hasta las seis horas post-

tratamiento (Yang et al., 2005). También se ha visto que TGIF (otra proteína correpresora de la vía del TGF- $\beta$ ) es inducido por la vía de las MAPK Erk (Lo et al., 2001).

Después de lo anteriormente mencionado, queda claro que todavía no se conocen bien todos los aspectos involucrados en la regulación transcripcional y post-transcripcional de los dos correpresores, por lo que resulta interesante ahondar más en esta problemática.

## CAPITULO 2

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Al no estar completamente dilucidados todos los posibles mecanismos de regulación de Ski y SnoN resulta interesante determinar la modulación de dichos correpresores por la vía del TGF- $\beta$  y por otras rutas de señalización, porque el estudiar la regulación de los correpresores ayudará al entendimiento de esta vía de señalización.

## CAPITULO 3

### **HIPÓTESIS**

Si los niveles proteicos del correpresor SnoN se recuperan después de una hora de tratamiento con TGF- $\beta$  puesto que *snoN* es un gen blanco del factor de crecimiento, entonces es posible que los niveles de Ski también se recuperen en algún momento.

Si los niveles proteicos de Ski se recuperan, entonces es probable que dicha recuperación se deba a una acumulación de proteína (por que no hay degradación) o a un proceso de inducción transcripcional.

## CAPITULO 4

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la regulación de los correpresores Ski y SnoN en respuesta a estímulos dependientes e independientes del TGF- $\beta$ .

## CAPITULO 5

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Describir la regulación de Ski y SnoN en células de carcinoma hepático (HepG2) y carcinoma pulmonar (A549) tratadas con TGF- $\beta$  a tiempos largos.
2. Relacionar la regulación de los correpresores con la señalización por TGF- $\beta$ , más específicamente con la activación de las proteínas Smad.
3. Analizar si otras vías de señalización como las vías de MAPK, JAK/STAT, PKC o PKA influyen en la regulación de los correpresores por TGF- $\beta$ .
4. Analizar si estas vías independientes de TGF- $\beta$  regulan de alguna manera (mediante inducción o inhibición) a los correpresores Ski y SnoN.

## CAPITULO 6

### **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

#### ***Cultivo celular***

En este proyecto se usaron como modelo diferentes líneas celulares de carcinomas humanos.

- La línea celular HepG2, derivada de un hepatocarcinoma humano, fue mantenida a 37°C en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomicina.
- La línea celular A549, derivada de un carcinoma pulmonar humano (células epiteliales), fue mantenida a 37°C en medio F-12 (HAM) con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina.

#### ***Estimulación celular***

Las células son ayunadas en 3-5ml de medio al 0.2% de suero fetal bovino durante al menos 3 horas, y posteriormente estimuladas los tiempos necesarios con los siguientes ligandos:

AGENTES	MECANISMO DE ACCIÓN	DOSIS UTILIZADA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Ligando del receptor tipo II (T $\beta$ RII)	0.2nM
<b>EGF</b>	Inductor de la MAPK Erk y de Akt	50ng/ml
<b>IL-6</b>	Citocina pro-inflamatoria inductora de la vía JAK/STAT	50ng/ml
<b>Forskolina (Fsk)</b>	Activador de la Adenilato ciclasa inductora de AMP cíclico	10 $\mu$ M
<b>MIX</b>	Inhibidor de las fosfodiesterasas que degradan el	10 $\mu$ M

	AMP cíclico	
<b>TPA</b>	Activador de la proteína cinasa C (PKC)	1μM
<b>Angiotensina II (AII)</b>	Inductor de las MAPK Erk y p38, de PKC, de la Adenilato ciclasa y de la vía JAK/STAT	1μM
<b>Cicloheximida (CHX)</b>	Inhibidor de la síntesis de proteínas	20μg/ml

***TABLA 1. Agonistas utilizados para la estimulación celular***

En algunos casos se realizaron preincubaciones de 20min con EGF, IL-6, Forskolina, MIX y CHX.

#### ***Extracción de proteínas***

Al finalizarse la estimulación celular a los tiempos deseados, se aspira el medio al 0.2% de suero fetal bovino, se lava la caja con 5ml de PBS frío y se lisan las células en 0.5-1ml de TNTE al 0.5% frío y con inhibidores de proteasas.

Después de una incubación de 5min en frío se raspan las células.

El lisado es transferido a tubos eppendorf y, después de una incubación de 15min en rotación y a 4°C, es centrifugado 5min a 14000 rpm para bajar los restos celulares. Finalmente se transfiere el sobrenadante conteniendo las proteínas a un microtubo nuevo. Las muestras deben permanecer a 4 °C todo el tiempo para evitar la degradación de las proteínas.

#### ***Inmunoprecipitación de extractos celulares***

Al tener los extractos proteicos celulares se puede cuantificar la cantidad de proteína presente mediante el método de Bradford. En esta técnica se utilizan 1-2μl de extracto en 800μl de agua desionizada y 200μl de Solución de Bradford. Las muestras se leen a una longitud de onda de 595nm y se interpolan los datos en una curva patrón.

Si no es necesaria la cuantificación proteica, entonces se procede a añadir a cada tubo de los extractos celulares (siempre mantenidos en hielo) 2-3µl del anticuerpo específico que reconoce la proteína de interés. Las muestras con el anticuerpo se incuban en rotación toda la noche.

Al día siguiente se procede a precipitar el complejo de proteína deseada/anticuerpo con la Proteína G acoplada a Sefarosa. Las muestras con la Proteína G se incuban en rotación y a 4 °C por 1-2 h.

Después de dicha incubación, se lava 3 veces el pellet de Proteína G con 1ml de buffer TNTE al 0.1% (en frío) y posteriormente se busca dejar el pellet de Proteína G/anticuerpo/proteína deseada seco, por lo que se remueve el exceso de líquido con una punta larga, cuidando de no remover la agarosa.

Finalmente se resuspende cada muestra en 25µl de solución de Laemmli 2X y se hierven las muestras a 100 °C durante 3min para separar la proteína deseada del anticuerpo y de la proteína G. Se guardan los tubos a -20°C hasta realizar la electroforesis.

### ***Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE***

Se elaboran geles de poliacrilamida al 7.5% para correr las muestras obtenidas puesto que las proteínas analizadas tienen un peso molecular de entre 70 y 90 kDa. Las muestras guardadas a -20°C son descongeladas a temperatura ambiente, centrifugadas 1 min a 14000 rpm y cargadas en el gel con la ayuda de una microjeringa. Se corre el gel a 120-150 Volts por 1-1.5 h hasta que el colorante salga del gel.

### ***Western Blot o Inmunoblot***

Después de correr las proteínas en el gel de poliacrilamida, éstas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un proceso conocido como Western Blot.

Esta técnica se caracteriza por transferir las proteínas del gel a una membrana de PVDF y, posteriormente, se incuba dicha membrana con un anticuerpo primario que reconoce la proteína de interés. Después de esto, la membrana es incubada con un anticuerpo

secundario acoplado a una enzima (en este caso la peroxidasa de rábano o HRP, del inglés “Horseradish Peroxidase”), el cual reconoce al anticuerpo primario unido a la proteína deseada.

Al poner a la membrana en contacto con el sustrato de la enzima acoplada al anticuerpo secundario, se induce una reacción de quimioluminiscencia que permite visualizar la proteína de interés mediante autoradiografía.

### ***Extracción de RNA***

#### *Lísis celular*

Para extraer los ácidos nucleicos celulares con el fin último de purificar el RNA, se lisan las células con Trizol, un compuesto a base de fenoles que permite preservar el RNA, ácido nucleico inestable y muy susceptible a la degradación por RNAsas.

El lisado disuelto en Trizol puede ser congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, para la subsecuente precipitación y purificación de RNA.

#### *Separación de fases y precipitación de RNA*

Al añadir cloroformo al lisado celular mantenido en Trizol y después de centrifugar el tubo a 3500 rpm (30-45min a  $4^{\circ}\text{C}$ ) se pueden distinguir tres fases: una fase acuosa (superior) conteniendo el RNA, una interfase conteniendo el DNA y una fase inferior de compuestos orgánicos.

Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo (cuidando de no acercarse demasiado a la interfase de DNA para no contaminar la muestra).

Posteriormente se procede a precipitar el RNA agregando isopropanol al tubo. Después de una centrifugación a 3500rpm, el sobrenadante se decanta y se conserva el pellet de RNA. Dicho pellet se lava varias veces (con el fin de remover todo el isopropanol) y se resuspende en agua libre de RNAsas (agua tratada con DEPC).

Finalmente el RNA purificado se cuantifica usando de 1-2 $\mu\text{l}$  de RNA en 1ml de agua tratada con DEPC, y leyendo a longitudes de onda de 260 y 280nm.

### ***Northern Blot***

Esta técnica permite visualizar la expresión de un RNA mensajero dado mediante el corrimiento del RNA celular purificado en un gel de agarosa, su subsecuente transferencia a una membrana de nitrocelulosa y la visualización del RNA mensajero deseado mediante su hibridación con una sonda marcada radioactivamente (o con biotina).

Ya que se cuenta con el RNA purificado y cuantificado, el primer paso es el corrimiento de éste en un gel de agarosa (1-2% de agarosa). El segundo paso, según el mismo principio que la técnica de Western Blot, consiste en realizar la transferencia del ácido nucleico del gel hasta una membrana de nitrocelulosa. A diferencia del Western Blot, en esta técnica la transferencia se realiza mediante un proceso de capilaridad (no de manera eléctrica), en el cual la acción capilar del agua (más específicamente del buffer empleado) induce la migración de las moléculas de RNA del gel hacia la membrana en la cual se quedarán atrapadas.

Al completarse la transferencia, el RNA unido a la membrana debe ser inmovilizado en ella covalentemente mediante un proceso denominado “crosslinking” o entrecruzamiento. En este proceso, la membrana es horneada a 80 °C o sometida a diferentes ciclos consecutivos de radiaciones UV. De esta manera el RNA queda anclado a la membrana y dicha membrana queda lista para ser utilizada en los siguientes pasos del Northern Blot.

El tercer paso consiste en marcar radioactivamente una sonda de DNA o RNA complementaria al RNA mensajero de interés. Mediante la reacción de Random Priming, se logra sintetizar una sonda con nucleótidos radioactivos integrados.

El cuarto paso se denomina hibridación: la sonda radioactiva previamente desnaturalizada es incubada con la membrana conteniendo el RNA de interés complementario a la sonda. De esta manera la sonda se une a su RNA complementario si éste está presente en las células.

Finalmente la membrana es incubada de 2 a 7 días (dependiendo de la vida media de la marca radioactiva) en un cassette especial para isótopos radioactivos. Posteriormente la pantalla del cassette se analiza con un aparato (Phosphorimager) denominado Storm o Typhoon.

Si el RNA mensajero de interés se encuentra expresado en las células lisadas, entonces se puede ver en el gel una señal radioactiva dada por la sonda complementaria al RNA.

### ***PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)***

Para generar la sonda de DNA complementaria al RNA deseado, realizamos una reacción de PCR. Se generaron amplificados de SnoN y GAPDH.

### ***Marcaje de la sonda***

La sonda obtenida por PCR es desnaturalizada, enfriada en hielo para impedir la unión de las dos hebras, y luego es colocada en un tubo de reacción de *Random Prime Labelling System* junto con la marca radioactiva ( $\alpha$  [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP). En este tubo de reacción se encuentran todas los componentes necesarios para que se lleve a cabo la generación de una cadena de DNA con nucleótidos radioactivos incorporados. Se incuba el tubo de reacción 15min a 37°C y posteriormente se purifica la sonda marcada con columnas de Sefadex G-50.

La eficacia de marcaje se comprueba cuantificando 1 $\mu\text{l}$  de sonda en el contador de centelleo.

## CAPITULO 7

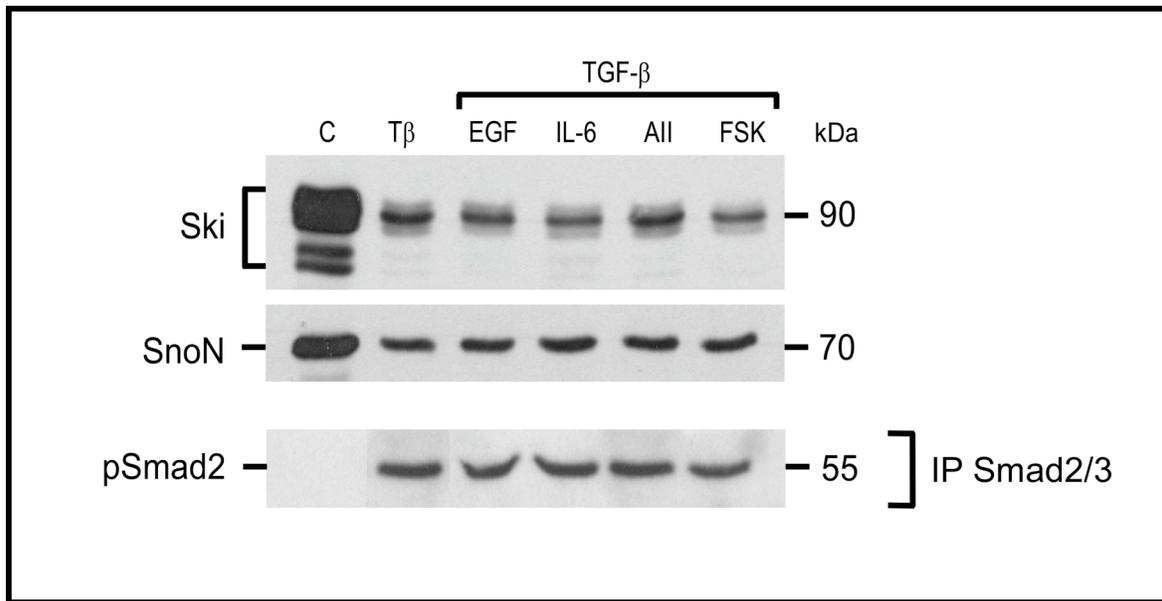
### **RESULTADOS**

Antes de profundizar en la regulación de Ski y SnoN por la citocina de nuestro interés (TGF- $\beta$ ), quisimos averiguar si otras vías de señalización de destacada importancia (como las rutas de MAPK, PKC, PKA y JAK/STAT) regulan de alguna manera la expresión o función de estos correpresores o afectan su regulación por TGF- $\beta$ .

***Las vías inducidas por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Interleucina-6 (IL-6), Angiotensina II (AII) y Forskolina (FSK) no alteran la degradación de Ski y SnoN dependiente de TGF- $\beta$ .***

Para analizar si algunas vías de señalización independientes de TGF- $\beta$  influyen de alguna manera en la regulación negativa inicial de la citocina sobre sus correpresores, preincubamos células HepG2 con EGF, IL-6, AII y FSK durante 20 min previo a la incubación de las mismas células con TGF- $\beta$  por 30 min. Sabemos por numerosos reportes, que desde los 15min y hasta la hora de tratamiento, el TGF- $\beta$  induce la degradación de los correpresores Ski y SnoN (Sun et al., 1999; Bonni et al., 2001; Stroschein et al., 2001; Briones-Orta et al., 2006). También sabemos que AII activa a PKC y a MAPKs, que EGF también activa a MAPK, que IL-6 activa la vía de JAK/STAT y que FSK induce un aumento de AMP cíclico, segundo mensajero activador de la PKA (ver la **TABLA 1** de la Estrategia Experimental).

Las proteínas Ski y SnoN son poco abundantes en la célula, por lo que para visualizarlas mediante la técnica de Western Blot es necesario primero inmunoprecipitarlas con anticuerpos específicos. De acuerdo con lo reportado, el Western Blot que realizamos revela claramente la degradación de ambos correpresores mediada por TGF- $\beta$  a los 30 min (Figura 1). Sin embargo, las células pretratadas con los diferentes ligandos e incubadas posteriormente con TGF- $\beta$  muestran la misma cantidad de Ski y SnoN.



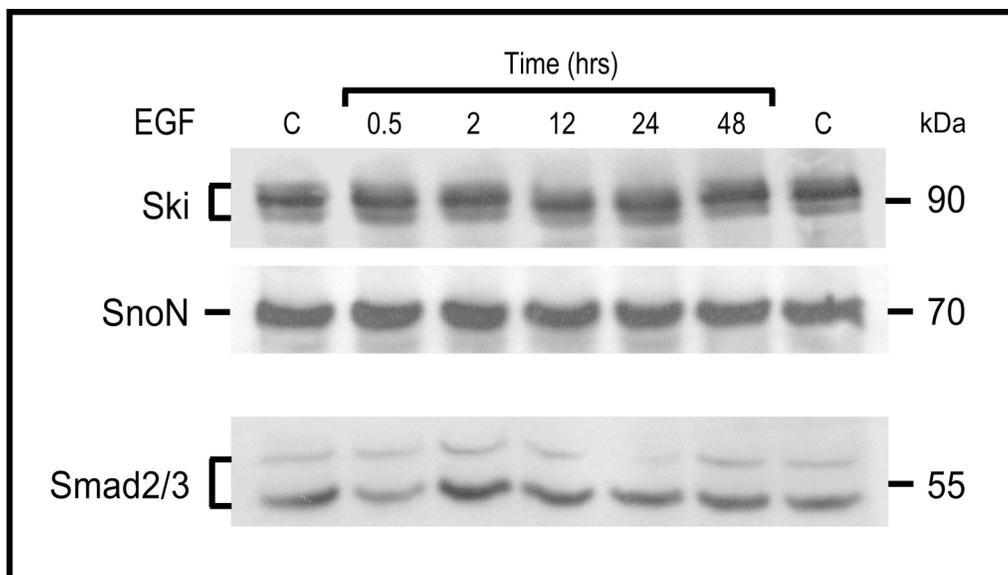
**FIGURA 1. Las vías inducidas por EGF, IL-6, AII y Forskolina no influyen en la regulación negativa de Ski y SnoN por TGF- $\beta$  en células HepG2.**

Se preincubaron las células con EGF (50ng/ml), IL-6 (50ng/ml), AII (1 $\mu$ M) y FSK (10 $\mu$ M) durante 20 min y posteriormente se incubó con TGF- $\beta$  (0.3nM) por 30 min. Posteriormente se inmunoprecipitaron las proteínas Ski y SnoN y se realizó un ensayo de Western Blot. C: control.

Por otro lado, también se inmunoprecipitaron a las proteínas Smad2 y Smad3 y se observó la fosforilación (activación) de Smad2 (pSmad2) como control de la activación de la vía del TGF- $\beta$ . En concordancia con lo reportado, pSmad2 se encuentra activa desde los 30min de tratamiento con TGF- $\beta$ , lo cual indica que la vía de la citocina se encuentra prendida. El inmunoblot revela que la preincubación con los ligandos arriba mencionados no afecta de ninguna manera la regulación negativa de los correpresores mediada por TGF- $\beta$ , es decir que los ligandos no potencian ni inhiben la degradación de los correpresores por TGF- $\beta$ . Además, los ligandos utilizados tampoco afectan la integridad de la vía de TGF- $\beta$  porque los niveles de pSmad2 se encuentran constantes, independientemente del tratamiento dado. Este resultado indica que las vías de MAPK, JAK/STAT, PKC y PKA no interfieren en la degradación de Ski y SnoN en respuesta a TGF- $\beta$ .

***La vía de señalización activada por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) no altera los niveles proteicos de Ski y SnoN en células de hepatocarcinoma.***

Como fue mencionado en los antecedentes, si los mecanismos regulatorios de Ski y SnoN por TGF- $\beta$  no están del todo dilucidados, tampoco lo están los procesos regulatorios dados por otras vías de señalización, si es que los hay. Considerando el estudio mencionado en los antecedentes en el cual se constata que HGF, activador de la MAPK Erk, es capaz de inducir un aumento de SnoN en células epiteliales de riñón, quisimos intentar ver si EGF, también activador de la vía de MAPK, producía un efecto similar en nuestra línea celular de hepatoma. De esta manera realizamos un curso temporal largo de estimulación con EGF (Figura 2). El Western Blot realizado contra Ski, SnoN y Smad2/3 revela que la estimulación con el factor de crecimiento no afecta ni positivamente ni negativamente los niveles de éstas tres proteínas por lo que podemos afirmar que, en células HepG2 la vía de señalización inducida por EGF no regula los niveles de los correpresores de la ruta del TGF- $\beta$ .



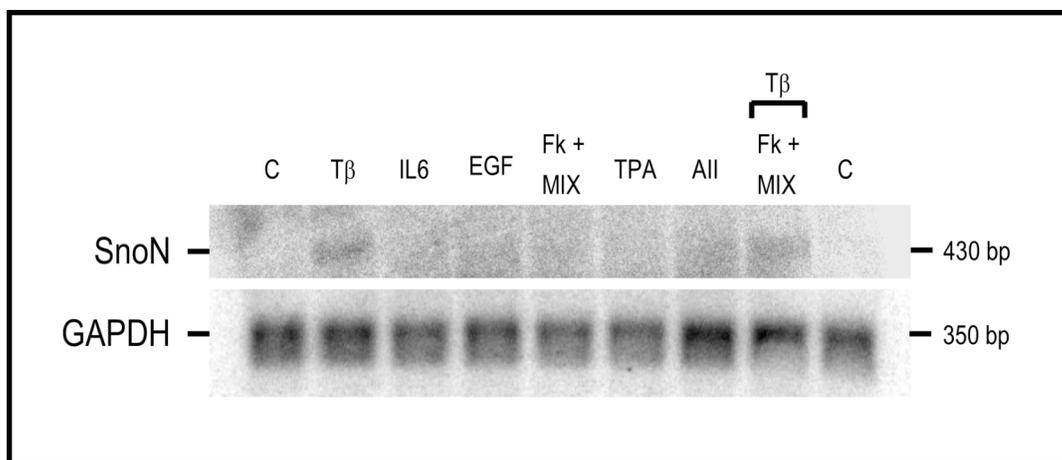
***FIGURA 2. EGF no altera los niveles proteicos de Ski y SnoN en células HepG2.***  
*Se incubaron las células con EGF (50ng/ml) durante los tiempos indicados (de 30 min hasta 48 h). Posteriormente se inmunoprecipitaron las proteínas Ski, SnoN y Smad2/3 y se realizó un inmunoblot.*

***Las vías inducidas por EGF, IL-6, AII y FSK no inducen a SnoN a nivel transcripcional ni afectan la inducción de su expresión por TGF- $\beta$ .***

Para continuar con el análisis de los efectos de múltiples vías sobre la regulación de los correpresores, quisimos averiguar si las vías de MAPK, JAK/STAT, PKC o PKA regulan al correpresor SnoN a nivel transcripcional, o si interfieren de alguna manera en su inducción mediada por TGF- $\beta$ . Para este propósito utilizamos las células A549 que contienen altos niveles de la proteína SnoN y en las cuales el TGF- $\beta$ , a partir de 1-2 horas de tratamiento, induce un notable aumento en el RNA mensajero (mRNA) de dicha proteína (Briones-Orta et al., 2006). Así, preincubamos a las células con cicloheximida durante 20 min con el fin de acumular el mRNA, y posteriormente estimulamos con diferentes agentes como AII, TPA, FSK, MIX, EGF, IL-6 y TGF- $\beta$  por 2 horas. En un caso preincubamos las células 20min con FSK y MIX añadiendo posteriormente al TGF- $\beta$  por 2 horas.

Después de la estimulación celular se extrajo el RNA y se realizó la técnica de Northern Blot para poder analizar los niveles del mRNA de SnoN, con la ayuda de una sonda de DNA obtenida por PCR y marcada con [ $^{32}$ P].

El Northern Blot revela que a las 2 h de tratamiento con TGF- $\beta$  hay una inducción de *snoN* a nivel transcripcional, reflejada por un aumento del mRNA de la proteína con respecto al control (Figura 3). Interesantemente, observamos que el mRNA de *snoN* sólo está presente cuando incubamos a las células con TGF- $\beta$  (carriles 2 y 8). Al estimular con los demás ligandos, en ausencia del factor de crecimiento, no se detecta inducción transcripcional del correpresor. También es interesante ver que cuando se preincuban a las células con activadores de la vía de PKA (FSK y MIX) y se estimula posteriormente con TGF- $\beta$  por 2 h, no se altera la inducción del correpresor SnoN por la citocina.



**FIGURA 3. Las vías inducidas por EGF, IL-6, AII, TPA, Forskolina y MIX no alteran la inducción de *snoN* por TGF- $\beta$  en células A549.**

Después de una preincubación de 20 min con cicloheximida, las células fueron tratadas con EGF (50ng/ml), IL-6 (50ng/ml), AII (1 $\mu$ M), FSK y MIX (10 $\mu$ M) por 20min y con TGF- $\beta$  (0.2nM) por 2h. Se extrajo el RNA y se realizó un Northern Blot con una sonda de DNA marcada con [ $^{32}$ P] con el fin de visualizar el mRNA de *snoN*. Como control se analizó también la presencia del gen constitutivo de la GAPDH.

Estos resultados nos indican primeramente, en concordancia con los antecedentes, que *snoN* ciertamente es un gen blanco de TGF- $\beta$  puesto que los niveles de su mRNA aumentan después de 2 h de tratamiento con la citocina. El ensayo también sugiere que la ruta de PKA no altera negativamente ni positivamente la inducción de *snoN* por TGF- $\beta$  (carril 8) y que las vías de MAPK, JAK/STAT, PKC y PKA no participan en la inducción transcripcional de *snoN* contrariamente a la vía del TGF- $\beta$ .

Después de haber esclarecido la regulación de los correpresores a nivel transcripcional y post-transcripcional por vías dependientes e independientes de TGF- $\beta$ , buscamos profundizar más sobre su modulación por la citocina de nuestro interés únicamente. Dado que no se conoce el comportamiento de las oncoproteínas a tiempos largos de estimulación con el ligando, fue necesario analizar dicho aspecto en distintos tipos celulares.

***La regulación de Ski y SnoN a tiempos largos de estimulación por TGF- $\beta$  es diferencial en células HepG2 y A549.***

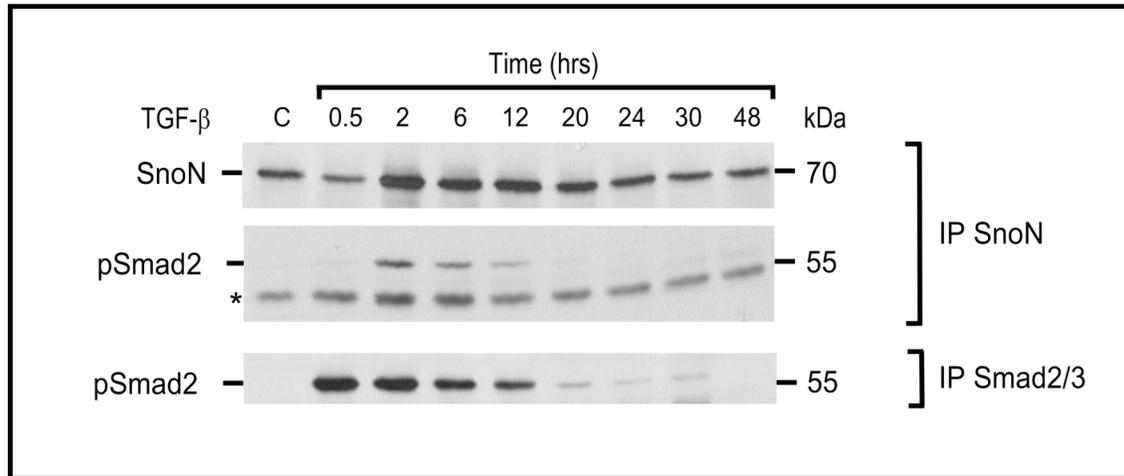
Al haber analizado los efectos dependientes e independientes de TGF- $\beta$  sobre Ski y SnoN a tiempos cortos de estimulación (de 30 min a 2 h), se decidió estudiar a fondo la regulación de los correpresores específicamente por TGF- $\beta$  y a tiempos largos de estimulación.

Por datos bibliográficos se sabe que el factor de crecimiento promueve la degradación de sus correpresores desde los 15 minutos y que, a partir de la hora de tratamiento, induce a su gen blanco *snoN* de manera dependiente de Smads. Pero lo que no se sabe es si los niveles del otro correpresor Ski se recuperan en algún momento, y si se recuperaran también se ignoran las razones de dicha recuperación. Además, no está clara la modulación de los dos correpresores por la citocina a tiempos más largos que 3 horas (Briones-Orta et al., 2006).

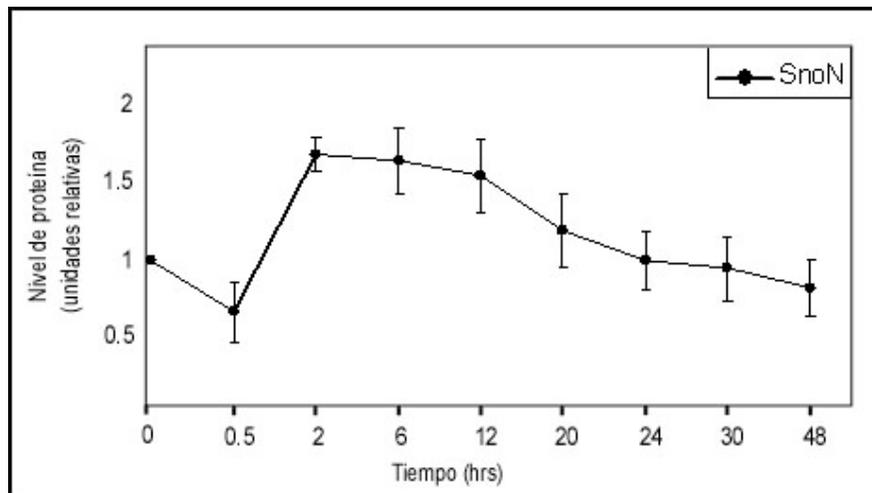
Para esclarecer los puntos arriba mencionados realizamos, en células HepG2 y A549, cursos temporales largos de estimulación con TGF- $\beta$ . Las células fueron estimuladas con el ligando desde 30 minutos hasta 48 horas, esto con el fin de determinar con exactitud el comportamiento de las proteínas en respuesta al factor de crecimiento y con respecto al tiempo. Se inmunoprecipitaron las proteínas Ski, SnoN y Smad2/3 y se realizó el blot con anticuerpos de Ski, SnoN y pSmad2 (como control de la activación de la vía de TGF- $\beta$ ). También se trató de visualizar la co-inmunoprecipitación de SnoN y pSmad2. La regulación de las oncoproteínas resultó ser muy diferente en los dos tipos celulares, y dentro de una misma línea celular, la regulación de cada correpresor también mostró ser distinta.

En células A549, como se esperaba, se observa la degradación de SnoN inducida por TGF- $\beta$  a partir de los 30 min de tratamiento y la recuperación del correpresor desde las 2 h alcanzando niveles más altos que los originales (Figura 4, PANEL A). Después del fuerte pico de inducción de SnoN a las 2 h (también representado en la gráfica del PANEL B), la cantidad de proteína va decreciendo a lo largo del tiempo, hasta recuperar los niveles basales a las 24 h. Recordemos que en estas células de cáncer pulmonar solo

podemos visualizar al correpresor SnoN porque aún realizando inmunoprecipitación, los niveles de Ski no pueden percibirse mediante la técnica de Western Blot.



A)



B)

**FIGURA 4. Comportamiento del correpresor SnoN en células A549 en respuesta a TGF-β.**

**PANEL A)** La línea celular de carcinoma pulmonar fue tratada con TGF-β (0.2nM) por diferentes tiempos (de 30 min hasta 48 h). Se inmunoprecipitaron las proteínas SnoN y Smad2/3. El Inmunoblot muestra la modulación de las dos proteínas a través del tiempo dada por TGF-β. \* Representa una banda de unión inespecífica.

**PANEL B)** Gráfica representativa del comportamiento de SnoN en respuesta a TGF-β en células A549.

En este experimento también se inmunoprecipitó a Smad2/3 realizando el blot contra pSmad2, con el fin de tener un control de activación de la vía del factor de crecimiento. pSmad2 permanece presente en las células hasta las 30 h, teniendo sus más altas concentraciones a la media hora de tratamiento, lo cual refleja la activación de las Smads por el receptor tipo I y por tanto la activación de los mediadores de la vía del TGF- $\beta$ . Podemos afirmar que, en este tipo celular, la señal de la citocina permanece activa durante numerosas horas (hasta 30 horas).

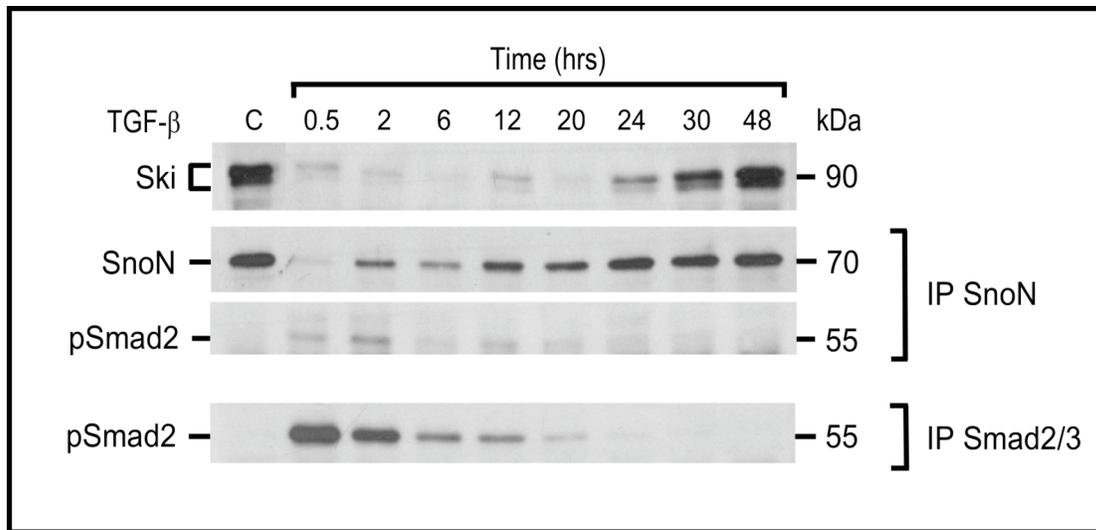
Por otro lado, también buscamos visualizar la co-inmunoprecipitación de pSmad2 y SnoN con el fin de entender las interacciones entre estas dos proteínas. La co-inmunoprecipitación revela una interacción muy fuerte a las 2 h, la cual puede sugerir la continua degradación del correpresor a pesar de su inducción.

El mismo curso temporal realizado ahora en células de hepatoma reveló un comportamiento diferente de los correpresores. En HepG2, como se esperaba según los antecedentes, se observa claramente la degradación de SnoN dependiente de TGF- $\beta$  a partir de los 30 min (Figura 5, PANEL A). En este tipo celular el correpresor se recupera parcialmente desde las 2 h. Es interesante ver que la oncoproteína alcanza nuevamente sus niveles originales solo hasta las 24 h post-tratamiento, justo cuando la señalización por TGF- $\beta$  comienza a decaer (reflejado por la disminución en los niveles de pSmad2).

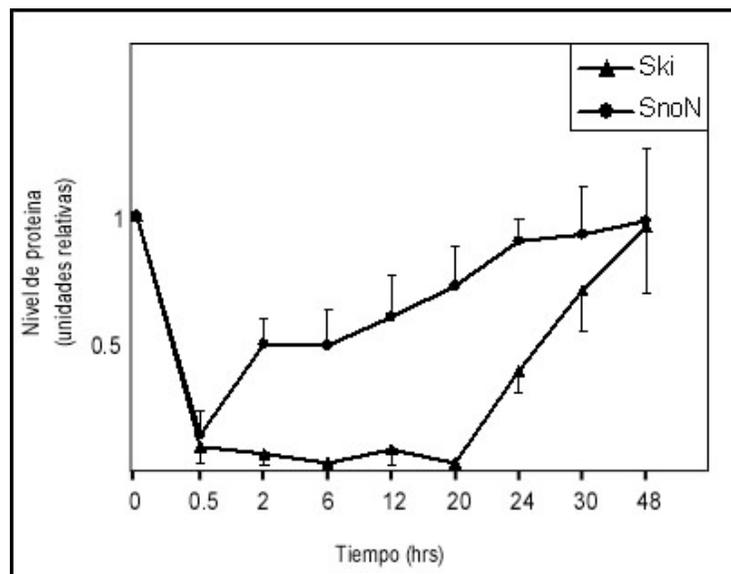
La degradación mediada por la citocina a los 30 min de tratamiento también se observó para el correpresor Ski. Un resultado sumamente importante es que los niveles proteicos de Ski se recuperan a partir de las 24 h de tratamiento, alcanzando nuevamente las cantidades basales a las 48 h post-tratamiento. Es importante notar que Ski reestablece sus niveles al mismo tiempo en que pSmad2 deja de estar presente en la célula, es decir cuando la señal del TGF- $\beta$  se apaga; la explicación de este hecho se discutirá más adelante. La gráfica (Figura 5, PANEL B) refleja el comportamiento diferencial de los dos correpresores en el tiempo: SnoN es inducido a las 2 h por TGF- $\beta$  y se recupera a lo largo del tiempo, mientras que Ski tarda 24 h en reestablecer sus niveles.

Como fue mencionado anteriormente, para este ensayo también analizamos a la proteína Smad2 activa (pSmad2) como control de activación de la vía del factor de crecimiento y también para poder relacionar el comportamiento de los correpresores con respecto al

estado de la ruta de señalización. Podemos ver que pSmad2 se encuentra activa desde los 30 min y hasta las 20 h, hecho que comprueba que también en este tipo celular, la vía de la citocina permanece activa por varias horas. El pico de activación de pSmad2 se correlaciona perfectamente con la fuerte degradación de Ski y SnoN en la primera media hora de tratamiento.



A)



B)

**FIGURA 5. Los correpresores Ski y SnoN exhiben una regulación diferencial en células HepG2.**

**PANEL A)** La línea celular de hepatocarcinoma fue tratada con TGF- $\beta$  (0.2nM) por diferentes tiempos (de 30 min hasta 48 h). Se inmunoprecipitaron las proteínas Ski, SnoN y Smad2/3.

El Inmunoblot muestra la modulación de las tres proteínas a través del tiempo dada por TGF- $\beta$   
**PANEL B)** Gráfica representativa del comportamiento de Ski y SnoN en respuesta a TGF- $\beta$  en células HepG2.

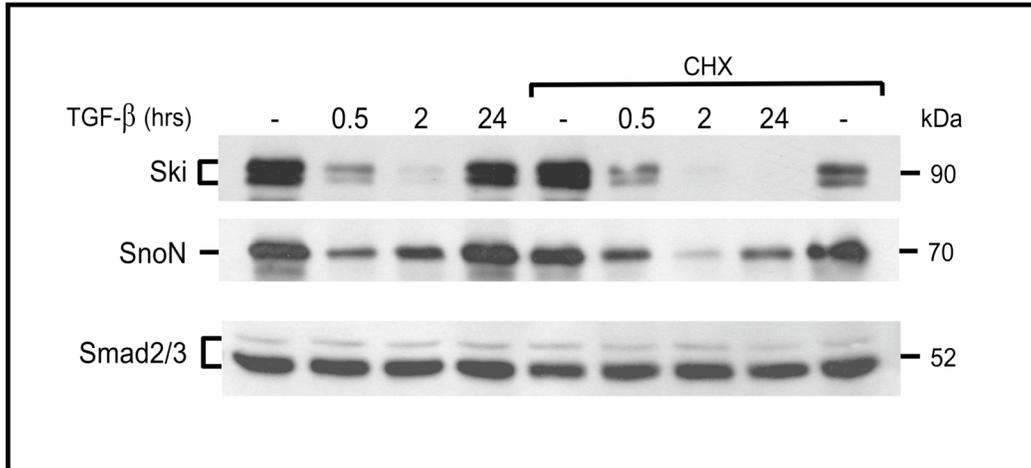
Gracias a la visualización de la co-inmunoprecipitación, se observa una interacción entre SnoN y pSmad2 desde la media hora, interacción que refleja el proceso de degradación

del correpresor dependiente de Smads activas. Es importante ver que hay una fuerte interacción a las 2 h post-tratamiento, sin embargo el significado de ésta última puede ser más complejo y lo discutiremos más adelante.

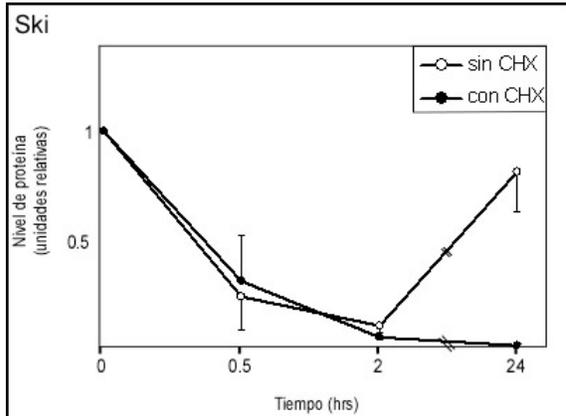
***El reestablecimiento en los niveles de Ski es dependiente de síntesis de novo de proteínas.***

Después de descubrir que la oncoproteína Ski recupera sus niveles a tiempos largos de estimulación con TGF- $\beta$ , pretendimos determinar si dicha recuperación representa una acumulación proteica (por la no degradación dependiente de Smads activas) o implica un proceso de síntesis *de novo* de proteína. Para ello, realizamos un curso temporal de estimulación con TGF- $\beta$  en células HepG2, preincubando las células, en algunas condiciones con cicloheximida (inhibidor de la peptidil transferasa del ribosoma 60S, por ende inhibidor de la elongación traduccional).

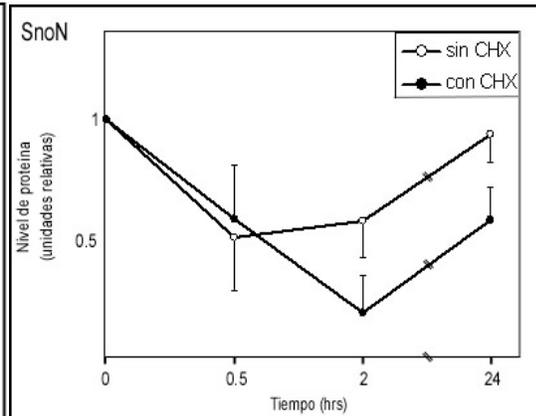
En las células tratadas solamente con la citocina, vemos la degradación de Ski y SnoN desde los 30min de tratamiento (Figura 6, PANEL A). A las 2 horas es clara la recuperación parcial de SnoN, que alcanza nuevamente sus niveles originales a las 24h de tratamiento (cuando la señal del TGF- $\beta$  ha finalizado). Ski, como en los ensayos anteriores, necesita más tiempo para recuperarse, pero lo hace a las 24 h post-tratamiento.



A)



B)



C)

**FIGURA 6. La recuperación en los niveles de Ski en células HepG2 es dependiente de síntesis proteica.**

**PANEL A)** Células HepG2 fueron estimuladas con TGF- $\beta$  (0.2nM) por diferentes tiempos (de 30 min hasta 24 h). En algunos casos (carriles 5-10) las células fueron preincubadas con cicloheximida (20 $\mu$ g/ml) y posteriormente tratadas con TGF- $\beta$  durante los tiempos deseados. Se inmunoprecipitaron las proteínas Ski, SnoN y Smad2/3 y se realizó el inmunoblot con los anticuerpos específicos.

**PANEL B)** Representación gráfica del comportamiento de Ski en células HepG2, en estimulaciones con TGF- $\beta$  en presencia o ausencia de CHX.

**PANEL C)** Representación gráfica del comportamiento de SnoN en células HepG2, en estimulaciones con TGF- $\beta$  en presencia o ausencia de CHX.

En las células pretratadas con CHX y tratadas posteriormente con TGF- $\beta$  por los tiempos indicados, vemos la degradación de ambos correpresores a los 30 min. La inducción de

SnoN por la citocina a las 2 h se ve afectada de manera negativa con el pretratamiento con CHX (comparar carriles 3 y 7) , lo cual es de esperarse puesto que se está bloqueando la síntesis de proteínas. Es importante notar que la cicloheximida está evitando que se dé la fuerte inducción de SnoN por TGF- $\beta$ , aunque no está bloqueando totalmente dicha inducción. Interesantemente, también podemos ver que los niveles de SnoN, que solían recuperarse totalmente a las 24 h post-tratamiento (control), no vuelven a alcanzar la cantidad original (comparar carriles 4 y 8). Esto sugiere que, aunque en éstas células la CHX no es capaz de inhibir totalmente la síntesis proteica de SnoN, interfiere de manera importante en su inducción y en su recuperación.

El correpressor Ski, degradado desde los 30 min de estimulación con la citocina, es incapaz de recuperar sus niveles a las 24 h cuando se pretratan las células con CHX (comparar carriles 4 y 8). Este resultado indica que la recuperación de Ski es totalmente dependiente de síntesis *de novo* de proteínas (representado también en la gráfica de la Figura 6, PANEL B). Como control de que la cicloheximida no altera de ninguna manera las cantidades basales de Ski y SnoN, incubamos las células con CHX a tiempos cortos o largos por 2 h y 24 h respectivamente (carriles 5 y 9).

Los resultados obtenidos en los dos tipos celulares dejan claro que la regulación de los correpresores Ski y SnoN es distinta según el tipo celular en cuestión y que las dos oncoproteínas, en un mismo tipo celular, son moduladas de manera diferencial por el factor de crecimiento transformante beta.

## CAPITULO 8

### **DISCUSIÓN**

La vía de señalización canónica del TGF- $\beta$  (vía dependiente de Smads) se encuentra bastante bien caracterizada aunque numerosos aspectos no han sido dilucidados todavía. Entre estos podemos mencionar que por ejemplo aun no se conocen muchos de los diferentes blancos génicos de la vía del TGF- $\beta$ , ni los mecanismos por los cuales el TGF- $\beta$  activa a otras vías de señalización alternas (JNK, p38, Erk, PI3K/Akt y GTPasas pequeñas), así como tampoco muchos de los diferentes aspectos regulatorios de la vía, entre los que destacan los mecanismos de regulación de las Smads (fue descubierta recientemente una fosfatasa encargada de defosforilar a estas proteínas, pero poco se sabe acerca de ella o de otros mecanismos que controlen la señal dada por las Smads) y la regulación negativa dada por los correpresores nucleares Ski y SnoN.

Por lo tanto, para entender cuales son los mecanismos precisos mediante los cuales Ski y SnoN ejercen sus acciones, debemos primero tener más información sobre estas proteínas: a la fecha todavía no se conocen sus mecanismos regulatorios o sus genes blanco, ni las interacciones de estos correpresores con otras proteínas.

#### ***Participación de las vías de señalización de MAPK, JAK/STAT, PKC y PKA en la regulación de los correpresores Ski y SnoN.***

En este estudio se demostró que las vías de MAPK (activadas por EGF, TPA y AII), JAK/STAT (activada por IL-6), PKC (activada por TPA y AII) y PKA (activada por FSK y MIX) no interfieren en la degradación de los correpresores Ski y SnoN ni en la inducción transcripcional de *snoN* mediadas por TGF- $\beta$ . Así, en las líneas celulares HepG2 y A549, las vías inducidas por los ligandos empleados no participan en la regulación de las oncoproteínas.

El Northern Blot realizado sugiere que en células A549 las vías arriba mencionadas no inducen la expresión de *snoN*, lo cual indica que no tienen participación alguna en la

regulación transcripcional del correpresor. Por ende, en este tipo celular, *snoN* no es un gen blanco de estas vías como lo es de la ruta de TGF- $\beta$ .

Es pertinente mencionar que en dos artículos se constató la acción inhibitoria de la proliferación de células HepG2 por PKC. En el primer reporte se observó que la estimulación de la línea celular HepG2 con ésteres de forbol (activadores de la PKC) inducía un arresto en la proliferación celular (Duronio et al., 1990). En el segundo reporte se constató la inducción de los inhibidores de las CDK (p15 y p16) por PKC en células HepG2, inducción que resulta en un arresto del ciclo celular (Wen-Sheng, 2005). Así, si TPA y AII inducen a PKC en nuestra línea de hepatoma, podríamos esperar una inhibición de la proliferación celular; por ende se podría entender que estos ligandos no inducen a Ski y a SnoN, puesto que los correpresores se encuentran generalmente asociados a procesos de proliferación. Por ejemplo, se sabe que Ski facilita la progresión del ciclo celular asociándose directamente con la proteína Rb reprimiendo su actividad antiproliferativa, e inhibiendo la inducción de p21 dependiente de Smads (Medrano, 2003). Ski también está relacionado con procesos proliferativos porque media la inhibición de la represión de *c-myc* por TGF- $\beta$  (Sun et al., 1999). También se ha visto, en modelos de melanoma, que Ski induce proliferación activando la vía de señalización Wnt y aumentando así la expresión de genes dependientes de beta-catenina (Chen et al., 2003).

En este trabajo también se pudo constatar que la estimulación de células de hepatoma con la citocina EGF no altera los niveles de Ski y SnoN. Aunque en un artículo previamente se menciona que HGF (inductor de la vía de MAPK al igual que EGF) es capaz de inducir al correpresor SnoN en células epiteliales de riñón (Yang et al., 2005), y en otro reporte se menciona que la vía de MAPK/Erk es capaz de inducir a ambos Ski y SnoN en una línea celular de melanoma HMB2 (Rothhammer et al., 2006), resulta muy probable que dicha inducción dependa totalmente del tipo celular.

En el primer caso la diferencia podría radicar en que la línea celular de riñón es normal, mientras que nuestra línea HepG2 es una estirpe maligna (es claro que el contexto celular debe diferir notablemente); además también podríamos atribuir la discordancia a que, debido al contexto celular, HGF no esté activando exactamente las mismas proteínas que

el EGF usado en este estudio, por lo que si las cascadas de señalización difieren entonces los efectos celulares serán distintos.

En el segundo caso ambos tipos celulares son malignos, pero como sabemos, el cáncer es un grupo de enfermedades etiológicamente distintas; por ende podemos afirmar que aunque dos tipos celulares sean cancerosos, sus características fisiológicas y genéticas difieren importantemente.

En el caso específico de las células HepG2, existe un reporte que afirma que HGF es capaz de inhibir la proliferación en dicha línea celular, induciendo un arresto en el ciclo celular en G1 reflejado por la inhibición de la fosforilación de complejos Ciclina A/Cdk2 (Tsukada et al., 2004). Basándose en este reporte podríamos tratar de explicar nuestros resultados: si EGF actuara de manera similar que HGF entonces induciría un arresto del ciclo celular en células HepG2; por ende resultaría entendible que EGF fuera incapaz de inducir a Ski y a SnoN puesto que los correpresores intervienen en procesos de proliferación.

Después de este análisis es importante señalar la similitud entre hepatocitos en regeneración y la línea celular de hepatoma: recordemos que en modelos de regeneración celular, hepatocitos de ratón fueron estimulados con TGF- $\beta$  y numerosos agentes entre los que destacan IL-6, PMA y AMPc, y se observó que solamente TGF- $\beta$  fue capaz de inducir la activación transcripcional de *snoN* (Macías-Silva et al., 2002). Esto coincide con los datos presentados aquí, donde queda claro que, en células de cáncer hepático, numerosos ligandos que activan vías diferentes a la del TGF- $\beta$ , no regulan los niveles de los correpresores Ski y SnoN.

Además es necesario enfatizar que, desde un punto de vista fisiológico, el hecho de que numerosos activadores de vías alternas no afecten la vía del TGF- $\beta$  significa que esta vía se encuentra muy conservada evolutivamente y que no está sujeta a regulaciones por mensajeros extracelulares de efecto rápido : esto parece ser de suma importancia porque una vía tan importante en numerosos procesos como el desarrollo, la proliferación, diferenciación y apoptosis debe estar estrictamente controlada. Así podemos afirmar que los procesos de regulación residen dentro de la vía misma, hecho que hace necesario conocer cada aspecto de ella.

### ***Regulación de los correpresores Ski y SnoN por TGF- $\beta$ a tiempos largos de estimulación.***

Fue interesante constatar que la regulación de las oncoproteínas dependiente de TGF- $\beta$  se da de manera diferencial dependiendo del tipo celular en cuestión. Si bien *snoN* es un gen blanco de este factor de crecimiento, en las células HepG2 no muestra una inducción transcripcional tan fuerte como en las células A549. Debido a la inducción diferencial en las células A549 y HepG2, el comportamiento de la oncoproteína en el tiempo es distinto, aunque en ambos tipos celulares está claro que el reestablecimiento de los niveles basales de SnoN es dependiente de la inactivación de las proteínas Smad y por ende del apagado de la vía del TGF- $\beta$ . Esto sugiere que el tipo y el contexto celulares, es decir que otros factores además de los complejos de Smads inductores de *snoN*, son determinantes en la regulación de *snoN*, como gen blanco de TGF- $\beta$ , y en la fuerza de su inducción.

El hecho de que los niveles de SnoN se recuperen a las 24 h justo cuando la señalización de la citocina finaliza (decremento de pSmad2), indica que aunque el gen sea inducido por la vía, la proteína sigue siendo degradada en todo momento por las proteínas Smad. Por esto, aún a pesar de su inducción, SnoN es incapaz de reestablecer completamente sus niveles hasta que las Smads dejan de estar activas. Este hecho sugiere que la regulación del correpresor es realmente estricta y se da en cualquier momento de la cascada de señalización, aún cuando el gen es inducido.

La co-inmunoprecipitación de pSmad2 y SnoN también revela que hay una interacción directa entre estas dos proteínas: la interacción a la media hora, post-tratamiento con TGF- $\beta$ , refleja la degradación proteosomal del correpresor dependiente de Smads activas. La fuerte interacción observada a las 2 horas podría reflejar el proceso de degradación (se observa más fuerte porque hay más cantidad de proteína SnoN), aunque no se debería descartar la posibilidad de que reflejara la actividad represora de SnoN (SnoN unido al DNA y a los complejos de Smads activos mediando la represión transcripcional de genes).

Una finalidad de este estudio era seguir el comportamiento del correpresor Ski a través del tiempo y en relación con la estimulación por TGF- $\beta$ . Este propósito resultó interesante por diferentes razones: se conoce que Ski y SnoN, correpresores de la vía del TGF- $\beta$ , son regulados negativamente por la citocina y que funcionan preferencialmente como heterodímeros para ejercer su función correpresora; también se conoce que *snoN* es un gen blanco de la vía de señalización del TGF- $\beta$  (porque su transcripción es inducida por complejos activos de Smad).

Al tomar en cuenta todo esto, y específicamente las similitudes entre los dos correpresores en cuanto a estructura y función, fue interesante averiguar que sucede con la proteína Ski: si SnoN recupera sus niveles es probable que Ski también lo haga, pero a qué tiempos? Y dependiendo de qué factores?

Es importante mencionar que en este estudio se pudo constatar que el correpresor Ski también recupera sus niveles basales, pero el reestablecimiento tarda mucho más que el de su contraparte SnoN. En células HepG2, la proteína Ski reaparece después de 24 h de estimulación con TGF- $\beta$ , reestableciendo totalmente sus niveles a las 48 h. La recuperación de Ski coincide con la desaparición de pSmad2, es decir con la inactivación de la vía. Probablemente, al no estar presentes las Smads activas y al no haber degradación proteosomal de Ski, la oncoproteína es capaz de acumularse nuevamente.

Como se mencionó previamente en los antecedentes, en los modelos de regeneración hepática se constató que en los hepatocitos en regeneración, SnoN vuelve a expresarse a partir de las 2 h post-hepatectomía y Ski también vuelve a expresarse a partir de las 12 h post-hepatectomía (Macías-Silva et al., 2002). Con base en esto, podemos trazar una similitud entre células normales (hepatocitos en proliferación) y células tumorales (células de cáncer hepático) en cuanto al comportamiento de los correpresores.

El experimento en el cual se usó a la ciclohemimida (CHX) como inhibidor de la síntesis de proteínas, revela que la reaparición de Ski es totalmente dependiente de síntesis *de novo* de proteínas, hecho que significa que para el reestablecimiento de los niveles de la oncoproteína, es necesario no solo que desaparezcan las Smads activas (causantes de su degradación) sino también que se dé un proceso de traducción del

mRNA de Ski. Las células preincubadas con CHX y tratadas posteriormente con TGF- $\beta$  por 24 h no muestran recuperación de la proteína Ski comparado con las células control estimuladas sólo con la citocina. Este hecho abre paso a un cuestionamiento interesante: la recuperación de Ski solo se debe a una acumulación del RNA mensajero, a una síntesis *de novo* de proteínas y a que no hay degradación inducida por las Smads? La recuperación de Ski necesita de una inducción transcripcional? Si esto último es cierto, entonces la transcripción estará mediada por las Smads (puesto que a las 24 h todavía están presentes aunque en bajos niveles) o será mediada por otros factores?

Existe un reporte que afirma que en células HepG2, TGF- $\beta$  es inductor del gen de TGIF, otro correpresor importante de la vía de señalización de la citocina (Chen et al., 2003). Al conocer que diferentes proteínas inhibitorias de la vía son genes blanco del TGF- $\beta$  (e.g. Smad7, SnoN y TGIF) es pertinente pensar en Ski como un posible gen blanco de la citocina, pero no hay datos disponibles hasta el momento.

Finalmente este estudio logró aportar mayor conocimiento acerca de los mecanismos regulatorios de Ski y SnoN por la vía del TGF- $\beta$  y otras vías independientes en diferentes tipos celulares, sugiriendo que dichas proteínas no son tan similares en función como se pensaba, puesto que sus mecanismos regulatorios dados por TGF- $\beta$  difieren significativamente.

En un contexto más general se puede constatar que en nuestras dos líneas celulares (A549 y HepG2), ambas derivadas de tumores humanos, la vía del TGF- $\beta$  se encuentra aparentemente íntegra y funcional, con los mecanismos de regulación intactos (inducción de los correpresores) lo cual refuerza la idea de que numerosos cánceres conservan la vía intacta a pesar de mostrar resistencia a los efectos antiproliferativos de TGF- $\beta$ . Sin embargo es de suma importancia recordar que, aunque los estudios *in vitro* con líneas celulares aportan información muy valiosa en transducción de señales, es crítico ser cuidadoso acerca del análisis de los datos, puesto que los experimentos se desarrollan en células tumorales en continua proliferación, claramente distintas de células normales no cancerosas.

## CONCLUSIONES

- Las vías de MAPK, JAK/STAT, PKC y PKA no parecen participar en la regulación de las oncoproteínas Ski y SnoN, por lo siguiente:
  1. Estas vías no inhiben ni potencian la degradación de los correpresores Ski y SnoN mediada por TGF- $\beta$ .
  2. Al no participar en la regulación transcripcional del gen *snoN*, podemos afirmar que el correpresor no es un gen blanco de dichas vías de señalización, al menos las líneas celulares transformadas A549 y HepG2.
  3. Al no participar en la regulación post-transcripcional de Ski y SnoN, podemos afirmar que, en las células HepG2 las vías de señalización anteriormente mencionadas no participan en la modulación de los correpresores de la vía del TGF- $\beta$ .
- El factor de crecimiento epidérmico (EGF) no interviene en la regulación de Ski y SnoN en células de hepatocarcinoma puesto que, en cursos temporales, no altera los niveles de las oncoproteínas.
- La regulación de las oncoproteínas Ski y SnoN es diferencial y distinta dependiendo del tipo celular. La modulación de Ski por TGF- $\beta$  es diferente a la de SnoN en células HepG2 (SnoN es inducido a las 2 h post-tratamiento y Ski se recupera hasta las 24 h post-tratamiento). La modulación de SnoN por TGF- $\beta$  (inducción transcripcional y comportamiento en el tiempo) es distinta en células HepG2 y A549

## PERSPECTIVAS

- Determinar si en condiciones *in vivo* (e.g. en hepatocitos) la regulación de Ski y SnoN por TGF- $\beta$  es similar a la observada en hepatocitos transformados (HepG2).
- Determinar si la recuperación en los niveles basales de la proteína Ski, después de haber sido degradada, es dependiente de un aumento en la transcripción génica.
- Si el caso anterior es afirmativo, entonces resulta importante dilucidar que factores participan en la inducción transcripcional del gen.
- Continuar con el estudio de los eventos y elementos que controlan la resistencia al TGF- $\beta$  y que pueden estar detrás de eventos de carcinogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Attisano L., Wrana JL.** (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 235-243.
- **Berk M., Desai S., Heyman H., Colmenares C.** (1997). Mice lacking the *ski* proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning and skeletal muscle development. *Genes Dev.* 11: 2029-2039.
- **Blume-Jensen P., Hunter T.** (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 411: 355-364.
- **Bonni S., Wang H., Causing C., Kavsak P., Stroschein S., Luo K., Wrana JL.** (2001). TGF- $\beta$  induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature Cell Biology.* 3: 587-595.
- **Briones-Orta MA., Sosa-Garrocho M., Moreno-Alvarez P., Fonseca-Sánchez MA., Macías-Silva M.** (2006). SnoN co-repressor binds and represses *smad7* gene promoter. *BBRC.* 341: 889-894.
- **Burke L., Baniahmad A.** (2000). Co-repressors 2000. *FASEB J.* 14: 1876-1888.
- **Caestecker P., Piek E., Roberts A.** (2000). Role of TGF- $\beta$  signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92: 1388-1402.
- **Chen CR., Kang Y., Massagué J.** (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells : a loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 992-999.
- **Chen F., Ogawa K., Nagarajan RP., Zhang M., Kuang C., Chen Y.** (2003). Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. *Biochem J.* 371: 257-263.
- **Cohen S., Zheng G., Heyman H., Stavnezer E.** (1999). Heterodimers of the SnoN and ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agents. *Nucleic Acid Res.* 27: 1006-1014.
- **Colmenares C., Sutrave P., Hughes S., Stavnezer E.** (1991). Activation of the c-ski oncogene by overexpression. *J Virol.* 65: 4929-4935.
- **Cornell TT., Shanley TP.** (2005). Signal transduction overview. *Crit Care Med.* 33: 410-413.
- **Denissova N.G., Liu F.** (2004). Repression of endogenous Smad7 by Ski. *J Biol Chem.* 279: 28143-28148.
- **Derynk R., Akhurst R., Balmain A.** (2001). TGF- $\beta$  signaling in tumour suppression and cancer progression. *Nature Genetics.* 29: 117-129.
- **Derynk R., Zhang Y.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. *Nature.* 425: 577-584.
- **ten Dijke P., Miyazono K., Heldin C.** (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\beta$  signaling. *TIBS.* 25: 64-70.
- **Dünker N., Krieglstein K.** (2000). Targeted mutations of transforming growth factor- $\beta$  genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem.* 267: 6982-6988.
- **Duronio V., Huber BE., Jacobs S.** (1990). Partial down-regulation of protein kinase C reverses the growth inhibitory effect of phorbol esters on HepG2 cells. *J Cell Physiol.* 145: 381-389.

- **Feng X., Derynck R.** (2005). Specificity and selectivity in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 659-666.
- **He J., Tegen S., Krawitz A., Martin G. Luo K.** (2003). The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *JBC.* 278: 30540-30547.
- **Imoto I., Pimkhaokham A., Fukada Y., Yang ZQ., Shimada Y., Nombra N., Iria H., Imamura M., Inazawa J.** (2001). SON is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem Biophys Res Commun.* 286: 559-565.
- **Itoh S., Itoh F., Goumans M., ten Dijke P.** (2000). Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* 267: 6954-6967.
- **Izzi L., Attisano L.** (2004). Regulation of the TGF- $\beta$  signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 23: 2071-2078.
- **Javelaud D., Mauviel A.** (2004). Mammalian transforming growth factor- $\beta$ s: Smad signaling and physio-pathological roles. *IJBCB.* 36: 1161-1165.
- **Kim S., Angel P., Lafyatis R., Hattori K., Kim K., Sporn M., Karin M., Roberts A.** (1990). Autoinduction of transforming growth factor  $\beta$ 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol.* 10: 1492-1497.
- **Kretschmar M., Doody L., Timokhina I., Massagué J.** (1999). A mechanism of repression of TGF- $\beta$ /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13: 804-816.
- **Li Y., Turck CM., Teumer JK., Stavnezer E.** (1986). Unique sequence, *ski*, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J Virol.* 57: 1065-1072
- **Li M., Wan Y., Sanjabi S., Robertson A., Flavell R.** (2006). Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 24: 99-146.
- **Lo RS., Wotton D., Massagué J.** (2001). Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J.* 20: 128-136.
- **Luo K.** (2004). Ski and SnoN : negative regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 14: 65-70.
- **Macías-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: 1215-1224.
- **Macías-Silva M., Li W., Leu J., Crissey M., Taub R.** (2002). Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- $\beta$  signals during liver regeneration. *J Biol Chem.* 277: 28483-28490.
- **Massagué J., Gomis R.** (2006). The logic of TGF- $\beta$  signaling. *FEBS Letters.* 580: 2811-2820.
- **Massagué J., Seoane J., Wotton D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19: 2783-2810.
- **Maurice D., Pierreux CE., Howell M., Wilentz RE., Owen MJ., Hill CS.** (2001). Loss of Smad4 function in pancreatic tumors: C-terminal truncation lead to decreased stability. *J Biol Chem.* 276: 43175-43181.

- **Medrano EE.** (2003). Repression of TGF-beta signaling by the oncogenic protein SKI in human melanomas: consequences for proliferation, survival, and metastasis. *Oncogene*. 22: 3123-3129.
- **Miyazono K.** (2000). Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling. *Journal of Cell Science*. 113: 1101-1109.
- **Miyazono K., ten Dijke P., Ichijo H., Heldin C.** (1994). Receptors for transforming growth factor- $\beta$ . *Advan Immunol*. 55: 181-220.
- **Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.** (2001). Smad regulation in TGF- $\beta$  signal transduction. *Journal of Cell Science*. 114: 4359-4369.
- **Neuman M.** (2003). Cytokines: central factors in alcoholic liver diseases. *Alcohol Res Health*. 27: 307-316.
- **Pearson-White S., Crittenden R.** (1997). Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucleic Acid Res*. 25: 2930-2937.
- **Pearson-White S., McDuffie M.** (2003). Defective T-cell activation is associated with augmented transforming growth factor  $\beta$  sensitivity in mice with mutations in the *sno* gene. *Mol Cell Biol*. 23: 5446-5459.
- **Peitenpol JA., Holt JT., Stein RW., Moses HL.** (1990). Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription : role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 3758-3762.
- **Prathapam T., Kühne C., Banks L.** (2002). Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acid Research*. 30: 5261-5268.
- **Rothhammer T., Bosserhoff AK.** (2006). Influence of melanoma inhibitory activity on transforming growth factor-beta signaling in malignant melanoma. *Melanoma Res*. 16: 309-316.
- **Shinagawa T., Nomuta T., Colmenares C., Ohira M., Nakagawara A., Ashii S.** (2001). Increased susceptibility to tumorigenesis of *ski*-deficient heterozygous mice. *Oncogene*. 20: 8100-8108.
- **Siegel PM., Massagué J.** (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nature Rev*. 3: 807-820.
- **Stegmüller J., Konishi Y., Huynh M., Yuan Z., DiBacco S., Bonni A.** (2006). Cel-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the Cdh1-APC target SnoN. *Neuron*. 50: 389-400.
- **Stroschein S., Bonni S., Wrana JL., Luo K.** (2001). Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev*. 15: 2822-2836.
- **Stroschein S., Wang W., Zhou S., Zhou Q., Luo K.** (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*. 286: 771-774.
- **Sun Y., Liu X., Ng-Eaton E., Lodish H., Weinberg R.** (1999). SnoN and ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor  $\beta$  signaling. *PNAS*. 96: 12442-12447.
- **Teicher B.** (2001). Malignant cells, directors of the malignant process : role of transforming growth factor-beta. *Cancer and Metastasis Reviews*. 20: 133-143.

- **Tokitou F., Nomura T., Khan MM., Kaul SC., Wadhwa R., Yasukawa T., Kohno I., Ishii S.** (1999). Viral ski inhibits retinoblastoma protein (Rb)-mediated transcriptional repression in a dominant negative fashion. *J Biol Chem.* 274: 4485-4488.
- **Tsukada Y., Tanaka T., Miyazawa K., Kitamura N.** (2004). Involvement of down-regulation of Cdk2 activity in hepatocyte growth factor-induced cell cycle arrest at G1 in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biochem.* 136: 701-709.
- **Ueki N., Hayman M.** (2003). Direct interaction of Ski with either Smad3 or Smad4 is necessary and sufficient for Ski-mediated repression of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J Biol Chem.* 278: 32489-32492.
- **Ulloa L., Doody J., Massagué J.** (1999). Inhibition of transforming growth factor- $\beta$ /SMAD signaling by the interferon- $\gamma$ /STAT pathway. *Nature.* 397: 710-713.
- **Wakefield L., Roberts A.** (2002). TGF- $\beta$  signaling : positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 22-29.
- **Wang W., Mariani F., Harland R., Luo K.** (2000). Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 14394-14399.
- **Wen-Sheng W.** (2005). Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett.* 239: 27-35.
- **Wilkinson D., Orden S., Stratton S., Piechan J., Nguyen T., Smulian G., Craig Barton.** (2005). A direct intersection between p53 and transforming growth factor  $\beta$  pathways targets chromatin modification and transcription repression of the  $\alpha$ -fetoprotein gene. *Mol Cell Biol.* 25: 1200-1212.
- **Yang J., Dai C., Liu Y.** (2005). A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 16: 68-78.
- **Yingling J., Blanchard K., Sawyer S.** (2004). Development of TGF- $\beta$  signaling inhibitors for cancer therapy. *Nature.* 3: 1011-1022.
- **Zawel L., Dai J., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K., Vogelstein B., Kern S.** (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell I.* 4: 611-617.
- **Zhang Y., Feng X., Derynck R.** (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-jun/c-Fos to mediate TGF- $\beta$ -induced transcription. *Nature.* 394: 909-913.
- **Zhu Q., Pearson-White S., Luo K.** (2005). Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor  $\beta$ -induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol.* 25: 10731-10744.
- **Ziv E., Cauley J., Morin PA., Saiz R., Browner WS.** (2001). Association between the T29-C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and breast cancer among elderly white women: the study of osteoporotic fractures. *JAMA.* 285: 2859-2863.

## APÉNDICE

### *Inmunoprecipitación de extractos celulares*

1. Después de estimular a las células durante los tiempos deseados, aspirar el medio y lavar con 5ml de PBS 1X frío. Aspirar el PBS.
2. Adicionar a las células entre 0.5-1ml de buffer TNTE 0.5% frío y con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Mantener las muestras en hielo todo el tiempo. Raspar las cajas y transferir el líquido a microtubos. Incubar 15min a 4 °C en agitación y luego centrifugar a 14000 rpm por 5min en frío. Transferir el sobrenadante a otros microtubos evitando el pellet.
3. Cuantificar la concentración de proteína de los extractos (solo si es necesario) por el método de Bradford. Utilizar 1-2µl de extracto en 800µl de H<sub>2</sub>O + 200µl de solución BioRad. Leer a 595nm e interpolar datos en una curva patrón.
4. Añadir 2-3µl del anticuerpo específico (stock 200 µg/ml) a cada tubo conteniendo el lisado celular.
5. Incubar en el rotador a 4 °C por 1-2 hr o toda la noche.
6. Añadir 60µl de proteína G (A)-sefarosa (diluida 1:5 en TNTE 0.1%).
7. Incubar en el rotador a 4 °C por 1-2hr.
8. Centrifugar los tubos a 14000 rpm por 1min.
9. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet 3 veces con 1 ml de buffer TNTE 0.1% frío cada vez. Entre cada lavada se centrifuga a 14000 rpm por 1 min y el sobrenadante se descarta.
10. Después del último lavado centrifugar los tubos a 14000 rpm por 1 min y remover el exceso de líquido con una punta larga, cuidando de no remover la agarosa.
11. Resuspender cada muestra en 25-30 µl de solución de Laemmli 2X.
12. Hervir las muestras 3-5 min, dejar enfriar y guardar a -20 o -70 °C (o inmediatamente cargar el sobrenadante en el gel después de centrifugar las muestras 1 min a 14000 rpm).

13. Descongelar las muestras a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 14000 rpm.
14. Cargar las muestras en geles de poliacrilamida al 7.5% con una microjeringa. Lavar la microjeringa con agua entre cada muestra.
15. Correr el gel a 120-150 Volts por 1-1.5 hr hasta que el colorante salga del gel,
16. Proceder a teñir el gel con azul de Coomasie o transferir las proteínas a una membrana PVDF.

### **Proteína G-agarosa (1:5)**

Tomar 2 ml del stock de proteína G agarosa y llevarlo a 10 ml con TNTE 0.1%. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.

Lavar la resina 3 veces, centrifugando a 1000 rpm por 1min y descartando el sobrenadante cada vez. Finalmente diluir 1:5 con TNTE 0.1%. Siempre resuspender antes de usar. Guardar a 4°C.

### **Inhibidores de Fosfatasas y Proteasas (1ml)**

10 µl	Ortovanadato de sodio 100 mM (H <sub>2</sub> O)
10 µl	Pirofosfato de sodio 100 mM (H <sub>2</sub> O + HCl 8mM)
25 µl	Fluoruro de sodio 1M (H <sub>2</sub> O)
5 µl	PMSF 1M (isopropanol)
2 µl	β-glicerofosfato 0.5M (TE pH 7.4)
2 µl	Benzamidina 50mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl	Inhibidor de tripsina 50mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl	Dihidrocloruro de antipaína 5mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl	Aprotinina 5mg/ml (DMSO)
2 µl	Pepstatina 5mg/ml (DMSO)
2 µl	Leupeptina 5mg/ml (TE pH 7.4)

Aforar a 1ml con buffer TNTE 0.5%

### **Buffer TE (100ml)**

1 ml Tris 1M (pH 7.4)  
0.2 ml EDTA 0.5M  
98.8 ml dH<sub>2</sub>O

Guardar a T.A.

**Solucion de Laemmli 2X (4ml)**

1 ml Tris 0.5 M pH 6.8  
0.8 ml Glycerol 100%  
1.6 ml SDS 10%  
0.2 ml Azul de Bromofenol 2%  
0.4 ml β-mercaptoetanol

Guardar a -20°C

**TN 10X (100 ml)**

50 ml Tris 1M  
30 ml NaCl 5M  
20 ml dH<sub>2</sub>O

Guardar a 4°C

**TNTE 0.5% (100 ml)**

10 ml TN 10X  
0.2 ml EDTA 0.5M (pH 8.0)  
5 ml Tritón 10%  
85 ml dH<sub>2</sub>O

Guardar a 4°C

**TNTE 0.1% (100 ml)**

10 ml TN 10X  
0.2 ml EDTA 0.5M (pH 8.0)  
1 ml Tritón 10%  
89 ml dH<sub>2</sub>O

Guardar a 4°C

**Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

<b>Soluciones</b>	<b>Gel concentrador (4%)</b>	<b>Gel Separador (7.5%)</b>
Acrilamida/bis (30%:0.8%)	2.7 ml	11.25 ml
1.5M Tris pH 8.8 (0.5M/pH6.8)	5 ml	11.25 ml
dH <sub>2</sub> O	11.9 ml	21.7 ml
SDS 10%	0.2 ml	0.45 ml
APS 10%	0.22 ml	0.35 ml
Temed	0.015 ml	0.025 ml
	<hr/>	<hr/>
Volumen final	20 ml	45 ml

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

87.6gr      Acrilamida  
2.3gr      Bis-methylene-acrilamida para  
300ml      dH<sub>2</sub>O

Filtrar y guardar en frasco ámbar a 4°C.

**1.5M de Tris-HCl pH 8.8** : 18.15gr Tris base / 100ml de dH<sub>2</sub>O

**0.5M de Tris-HCl pH 6.8** : 6gr Tris base / 100ml de dH<sub>2</sub>O

**SDS 10% (Dodecil sulfato de sodio)** : 100gr SDS en 1 litro de dH<sub>2</sub>O. Guardar a T.A

**APS 10% (Persulfato de amonio)** : 1gr APS en 10ml de dH<sub>2</sub>O. Guardar a 4°C.

## **Temed concentrado**

**Butanol 50%** : 50ml Butanol + 50ml dH<sub>2</sub>O

Agitar y dejar que se separen las fases. Utilizar la fase de arriba (alcohol).

## **Buffer de Corrida 10X pH 8.3**

30.2gr            Tris Base

144gr            Glicina

100ml            SDS 10%

Aforar a 1litro con dH<sub>2</sub>O y almacenar a T.A

No ajustar el pH.

Diluir a 1X antes de usar.

## **Elaboración de geles de poliacrilamida**

1. Preparar los vidrios y aluminas. Limpiar con alcohol para remover la grasa. Montar el “caster”.
2. Verter la solución del gel separador y adicionar a cada gel 300µl de butanol saturado en agua.
3. Dejar polimerizar 30min.
4. Una vez polimerizado el gel, lavar el butanol con agua de la llave.
5. Verter la solución del gel concentrador y colocar los peines cuidando de no formar burbujas.
6. Dejar polimerizar 45min y desarmar el “caster” y limpiar los geles de residuos de acrilamida. Quitar los peines y enjuagar los pozos con dH<sub>2</sub>O.
7. Almacenar los geles con sanitas húmedas en contenedores de plástico cerrados a 4°C.

## ***Western Blot***

1. Cortar la membrana PVDF del tamaño del gel e hidratarla en metanol por unos minutos. Ponerla en buffer de transferencia frío.

2. Remojar el papel filtro y las esponjas en buffer de transferencia.
3. Desmontar la electroforesis y poner el gel en buffer de transferencia (para quitar residuos de SDS).
4. Montar la cámara de transferencia con el buffer frío y una barra magnética.
5. Montar el sándwich de la siguiente manera : rejilla lado negro (polo -), esponja, papel filtro, gel, membrana PVDF, papel filtro, esponja, rejilla lado rojo (polo +).
6. Eliminar las burbujas (al poner PVDF sobre el gel y después de poner el filtro).
7. Cerrar el sándwich, colocarlo dentro de la cámara con la orientación adecuada y encender el agitador.
8. Transferir a 100V (1hr a 4°C).
9. Desmontar el sándwich.
10. Enjuagar PVDF con H<sub>2</sub>O llave.
11. Bloqueo : leche descremada 5% en TBS-T (1hr a T.A).
12. Enjuagar con H<sub>2</sub>O y luego con TBS-T.
13. Anticuerpo PRIMARIO (1:1000) en TBS-T con timerosal
  - En una bolsa de plástico con la membrana de PVDF, poner el anticuerpo diluído [3-5µl Ac: 3-5ml TBS-T]
  - Sellar la bolsa quitando las burbujas
  - Incubar 2-4h o toda la noche a 4°C en rotación
14. Enjuagar PVDF con H<sub>2</sub>O.
15. Tres lavados con TBS-T (5-10min c/u).
16. Anticuerpo SECUNDARIO (1: 10 000) en TBS-T
  - Poner la membrana en un contenedor y añadir el Ac (1hr ; T.A ; en agitador)
17. Enjuagar la membrana de PVDF con H<sub>2</sub>O.
18. Tres lavados con TBS-T (5-10min c/u).
19. Detección de proteínas con el Kit ECL Amersham
  - Mezclar 2-3ml de reactivo A con lo mismo de reactivo B [1:2]
  - Enjuagar previamente la membrana de PVDF con H<sub>2</sub>O
  - Verter reactivos sobre la membrana de PVDF y agitar; la cara de la membrana con las proteínas siempre hacia arriba (1min)

- Drenar excedente de reactivos
- Cubrir la membrana de PVDF con el plástico en el cassette (lado con proteínas hacia arriba)
- En el cuarto oscuro poner la placa, dejar de 3 a 5min, sacar la placa y pasarla por revelador/agua/fijador/agua

### ***Extracción de RNA con TRIZOL***

#### *Homogenización*

1. Aspirar el medio de la caja.
2. Lisar las células con 3ml de Trizol/caja.
3. Lavar bien la caja con el Trizol resuspendiendo numerosas veces hasta que la solución deje de verse viscosa.
4. Transferir los lisados a tubos de polipropileno nuevos y estériles.
5. Incubar los homogenados a temperatura ambiente por 5min.

Estos pasos se realizan fuera de la campana, a temperatura ambiente, con guantes y usando pipetas y puntas nuevas y estériles especiales para RNA.

Los lisados pueden usarse inmediatamente o almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### *Separación de fases*

1. Añadir a cada lisado 0.2ml de cloroformo/ml de Trizol y agitar vigorosamente por 15seg.
2. Incubar los tubos a temperatura ambiente por 2-3min.
3. Centrifugar las muestras a 3500 rpm por 30-45 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Transferir la fase acuosa (superior) a tubos nuevos cuidando de no acercarse demasiado a la interfase para prevenir contaminación por DNA.

#### *Precipitación de RNA*

1. A los tubos conteniendo la fase acuosa, añadir 0.5ml de isopropanol/ml de Trizol.
2. Mezclar suavemente.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
4. Centrifugar las muestras a 3500rpm por 30-45 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
5. Decantar el sobrenadante y conservar el pellet.

### *Lavados*

1. A los tubos con el pellet, añadir 1ml de etanol absoluto al 75% (diluído en agua DEPC)/ml de Trizol y mezclar muy bien.
2. Centrifugar a 3500 rpm por 5min a 4 °C.
3. Decantar el sobrenadante y centrifugar nuevamente.
4. Remover el resto de etanol con una punta nueva y estéril.

### *Resuspensión*

1. Después de remover el resto de etanol, invertir los tubos y dejar secar el pellet de 10 a 30min.
2. Añadir a cada tubo 50µl de agua tratada con DEPC.
3. Hervir los tubos 5min a 60°C para incrementar la solubilidad del RNA.
4. Resuspender bien el pellet y guardar a -80°C.

### *Cuantificación*

1. Tomar 1-2µl de muestra y diluirlo en 1ml de agua tratada con DEPC.
2. Leer a 260 y 280 nm.

Abs 260 = 1.00 corresponde a 40µg de RNA/ml

Abs 260/280 debe ser mayor a 1.4

### ***Northern Blot***

*Gel de agarosa (1%, 150ml)*

<b>Soluciones</b>	<b>Cantidad</b>
Agarosa	1.5 gr
dH <sub>2</sub> O	111 ml
MOPS 10X	15 ml
Formaldehído	24 ml
Bromuro de etidio	2-5 µl
	150 ml

**Procedimiento :**

1. Pesar la agarosa, verter el polvo en un matraz, agregar dH<sub>2</sub>O y calentar hasta la ebullición.
2. Agitar y dejar enfriar (asegurarse de que no haya grumos).
3. Agregar MOPS 10X, Bromuro de etidio y Formaldehído.
4. Agitar bien y verter en el molde (con los peines ya puestos) evitando las burbujas.
5. Dejar solidificar la agarosa por 30min.

*Preparación de muestras y electroforesis*

1. Descongelar las muestras de RNA a T.A.
2. En una serie de tubos nuevos poner la cantidad necesaria de RNA de cada muestra para tener 15-30µg de RNA.
3. Resuspender cada muestra en 30µl de Buffer de carga.
4. Hervir las muestras a 65°C por 4min para desnaturalizar el RNA y poner las muestras inmediatamente en hielo.
5. Poner el gel (sin quitar los peines) en la cámara y llenarla con MOPS 1X. Quitar los peines.
6. Cargar las muestras y correr a 60-100V.
7. Visualizar el gel con luz UV remojarlo 10min en agua para remover el exceso de bromuro de etidio.

Soluciones :

**Buffer de carga (300 $\mu$ l)**

166 $\mu$ l	Formamida
59 $\mu$ l	Formaldehido
37 $\mu$ l	MOPS 10X
37 $\mu$ l	Glicerol/Bromofenol

**MOPS 10X (1 litro)**

41.9gr	MOPS
4.1gr	Acetato anhidrido de Sodio
3.7gr	EDTA
500ml	dH <sub>2</sub> O

Ajustar el pH a 6.0-7.0 con Ácido acético o NaOH  
Aforar a 1litro con dH<sub>2</sub>O  
Guardar a T.A en botella ámbar  
Utilizar a 1X en la electroforesis

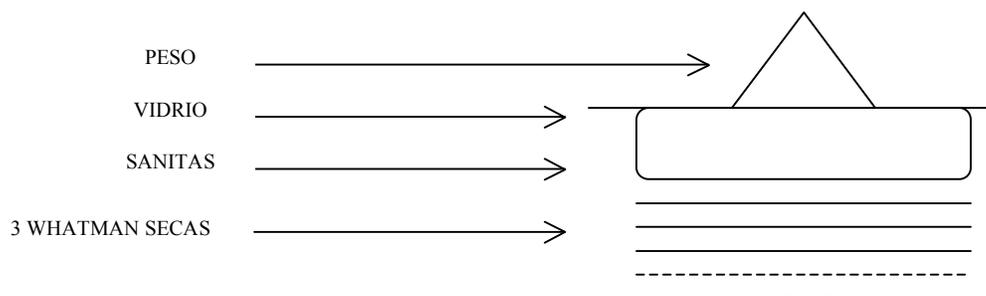
**Glicerol/Bromofenol**

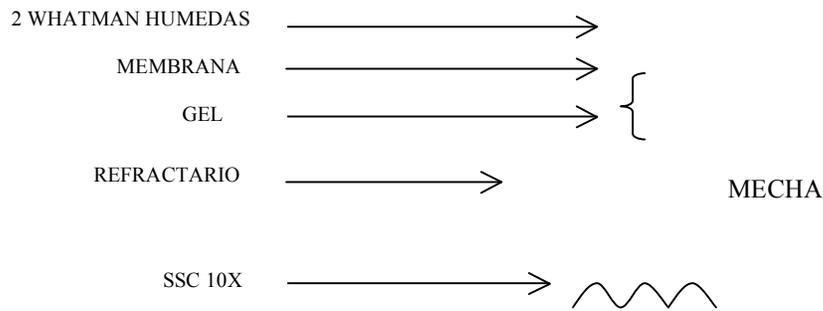
5 ml	Glicerol
0.125gr	Azul de Bromofenol
5 ml	dH <sub>2</sub> O

*Transferencia*

1. Cortar 5 piezas de papel filtro Whatman del tamaño del gel, 2 piezas del mismo papel para usarse como mecha y una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño del gel.

2. Llenar un refractario con 1/3 de buffer SSC 10X y colocar un vidrio encima del contenedor (que actúe como puente).
3. Remojar las tiras de papel usadas como mecha en el buffer SSC 10X y colocarlas encima del vidrio de tal manera que sus extremos queden remojándose en el buffer.
4. Asegurarse que no queden burbujas entre el vidrio y la mecha.
5. Depositar el gel sobre el vidrio y la mecha asegurándose de que no queden burbujas.
6. Colocar “kleenpack” alrededor del gel para evitar el fenómeno de “corto circuito”.
7. Colocar la membrana de nitrocelulosa sobre el gel evitando las burbujas.
8. Remojar 2 piezas de papel Whatman en buffer SSC 10X y colocarlas sobre la membrana quitando las burbujas.
9. Disponer 3 piezas de papel Whatman secas sobre las mojadas.
10. Poner una pila de sanitas dobladas (del tamaño del gel) sobre el papel Whatman y colocar un vidrio con un peso encima (~ 500 g).
11. Dejar montada la transferencia durante 3-4 días recambiando 2 veces al día las sanitas húmedas por sanitas secas para que se siga transfiriendo eficientemente.





### **SSC 20X (2 litros)**

350.6gr Cloruro de Sodio

176.4gr Citrato de Sodio

1750ml dH<sub>2</sub>O

Ajustar el pH a 7.0

Aforar a 2 litros con dH<sub>2</sub>O

### *Entrecruzamiento de RNA*

Hornear la membrana a 80°C durante 2 horas.

### *Generación de la sonda marcada*

1. La sonda de DNA puede obtenerse a partir de digestión de un plásmido o mediante una reacción de PCR.
2. En un tubo nuevo y estéril verter 45µl de buffer TE + 1µl de la sonda.
3. Desnaturalizar a 100°C por 5min.
4. Enfriar en hielo inmediatamente por 5min.
5. Centrifugar en frío a 14000rpm por 30seg.
6. Añadir el DNA desnaturalizado al tubo de reacción del *Kit Random Prime Labelling*.
7. Atrás del protector de acrílico, añadir al tubo de reacción 5µl de [<sup>32</sup>P]dCTP y mezclar muy bien.
8. Incubar el tubo de reacción 15 min a 37°C.

9. Parar la reacción con 5µl de EDTA 0.2M.
10. Purificar la sonda marcada mediante columnas de Sefadex G50 vertiendo gota a gota todo el contenido del tubo sobre la resina.
11. Centrifugar a 3000 rpm por 2min y recuperar el tubo conteniendo la sonda marcada purificada.
12. Tomar 1µl de sonda para cuantificar en el contador de centelleo.

### **Solución de hibridación**

50gr	Sulfato de dextrano
200ml	Formamida
100ml	SSC 20X
1.7ml	Tris 2M (pH 7.6-7.8)
8ml	Solución Denhardt's 50X
5ml	DNA de esperma de salmón (2mg/ml)
12.5ml	SDS 10%
Aforar a 500ml con dH <sub>2</sub> O	

### **Solución Denhart's 50X**

5gr	Ficoll400
5gr	Polivinilpirrolidona
5gr	BSA
Aforar a 500ml con dH <sub>2</sub> O	
Almacenar a -20°C	

### **Solución Fría (1 litro)**

100ml	SSC 20X
50ml	SDS 10%
Aforar a 1 litro con dH <sub>2</sub> O	

### **Solución Caliente (1 litro)**

5ml           SSC 20X

10ml          SDS 10%

Aforar a 1 litro con dH<sub>2</sub>O

### *Hibridación*

1. Poner la membrana a pre-hibridar en 20ml de solución de hibridación durante 1 hora a 42°C en rotación.
2. Añadir la sonda desnaturalizada.
3. Dejar hibridando toda la noche a 42°C en rotación.

### *Lavados*

1. Realizar 3 lavados de 15min cada uno con la solución fría.
2. Realizar 1 lavado de 15min con la solución caliente (a 55°C).
3. Revisar la membrana con el contador geiger: si está muy “caliente” realizar otro lavado con solución caliente.
4. Colocar la membrana en una bolsa de plástico y colocar todo en un cassette (desde 2 días hasta 1 semana). Es importante que la pantalla esté en contacto con la cara de la membrana con el RNA.
5. Analizar la placa en el Typhoon o en el Store (analizadores de imágenes).