



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Clonación y análisis del promotor del
oncogen *snoN* humano”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

ANGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ

Tutor: DRA. MARINA MACIAS SILVA



MÉXICO, D. F.

MARZO 2008



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225N del Departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El proyecto fue apoyado por los donativos del CONACYT 49493 y DGAPA-PAPIIT IN2142206.

CLONACIÓN Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL ONCOGEN *snoN* HUMANO

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225N del Departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

- Dra. Patricia Coello Coutiño (Facultad de Química)
- Dra. Victoria Chagoya de Sánchez (Instituto de Fisiología Celular)
- Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular)

El jurado de Examen para optar por el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas) estuvo constituido por:

PRESIDENTE Dr. Roberto Coria Ortega
VOCAL Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
SECRETARIO Dr. Alfonso León del Río
SUPLENTE Dra. Bertha González Pedrajo
SUPLENTE Dra. Herminia Loza Tavera

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Marina Macias Silva por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, asesorarme e incluso tomar parte de su tiempo en enseñarme ciertas técnicas y estar siempre con disposición de apoyarme en el desarrollo de mi proyecto. Agradezco por escuchar mis inquietudes y propuestas como estudiante y guiarme para mi crecimiento profesional.

A la Bióloga Marcela Sosa, por su paciencia y enseñarme la mayoría de las técnicas experimentales que he empleado en este trabajo. Por asesorarme y corregirme para hacer las cosas adecuadamente.

Al Dr. Marco Briones por asesorarme en la técnica de ChIP.

A la Bióloga Jacqueline Hernández Damián por contribuir a mi trabajo proporcionándome cajas de células y los medios para trabajar.

Agradezco a la Unidad de Biología Molecular, por los equipos empleados, oligonucleótidos sintetizados y la secuenciación de los promotores clonados.

A M en C. Minerva Mora Cabrera por su asesoría en el empleo de los equipos de la Unidad de Biología Molecular.

Al laboratorio del Dr. García Sáinz, por permitir la utilización de equipo y reactivos.

Agradezco mucho al laboratorio del Dr. López Casillas, en especial a Médico Cirujano Valentín Mendoza por permitir la utilización de diversos equipos, aparatos y reactivos.

Al laboratorio del Dr. Ruy Perez Montfort, particularmente a la Bióloga Nallely Cabrera por su amable asesoría y por permitir usar algunos de sus equipos.

Al laboratorio del Dr. Jaime Mas-Oliva, principalmente a la M. en C. Blanca Delgado, por la síntesis de oligonucleótidos, algunos de ellos empleados en este trabajo, y facilidad que otorgo para el uso de sus equipos.

A mi comité tutorial compuesto por la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y la Dra. Patricia Coello, por sus aportaciones, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales

A la Dra Patricia Coello, quien me asesoró en todo el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Roberto Coria por sus interesantes preguntas y recomendaciones.

Al Dr. Alfonso León del Río por sus importantes sugerencias y explicaciones.

A la Dra. Bertha González Pedrajo, por su muy completa revisión de este trabajo y material bibliográfico proporcionado para mi mejor entendimiento de algunos conceptos.

A la Dra Herminia Loza, que además fue mi profesora de bioquímica de la facultad y del posgrado, por su asesoría, correcciones y clases de español y su punto de vista acerca de mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás. Gracias por todos sus consejos, por la confianza y la libertad que desde siempre me han dado para decidir, ser y hacer lo que yo consideraré mejor. Gracias por estar a mi lado, por apoyarme. Gracias, porque por todo ello logro un escalón más de una escalera que yo me he fijado.

A mis hermanos y mis sobrinas... A mis hermanos Miguel Angel, Julio César, Rodolfo Valentín, Enrique Arturo, y a ti en especial Marco Antonio. A mis sobrinos Michel, Linett, Beyda y Jahir. Los quiero mucho. Me hacen reír y enojar ¿cómo no quererlos?

A Javier Macías Arreola, que puedo decirte que tu no sepas... Mi amigo y compañero. Gracias por tu cariño, por tratar siempre de ayudarme, por alegrarte conmigo por mis logros y darme ánimo para seguirlo intentando cuando las cosas no salen como uno quiere.

A Carlos Hernández Vargas, Carlitos... Por alguna extraña razón tú has estado en vivo y a todo color en mis momentos más difíciles... y no sabes como lo agradezco. Me siento tan afortunada por tener un amigo como tú... gracias por estar a mi lado, desde hace mucho.

A mis mejores amigas de siempre: Miriam y Bertha. Muchas gracias, porque a pesar del tiempo y la distancia están pendientes de mí, y por compartir sus alegrías y sus logros conmigo. Por recordar y reírnos juntas de lo en el pasado soñamos y lo que ahora estamos haciendo...

A mi amiga Jacqueline Larracilla. Por ser mi amiga incondicional desde la Facultad y continuar conmigo en el posgrado.

A mi amiga y confidente José, por escucharme y ayudarme en todo esta etapa de mi vida.

A mi Chuchis, por apoyarme y ser mi amigo inseparable y estar dispuesto a ayudarme siempre, desde la Facultad.

A mi amigo "cara de bola" QFB. Jorge Donato. Por sus consejos, y controversia que siempre provoca en mi su punto de vista, pero que en algunas ocasiones tiene mucha razón.

A Fernando Suaste, agradezco haberte encontrado en mi camino y haber contado con tu apoyo, sobre todo al principio de esto. Muchas gracias por tus consejos que mucho me han ayudado.

A mis amigos de la Facultad de Química: Jacqueline, Cadillita, Yolanda, Yuri, Lupita, y super Martín
A mis amigos del posgrado: Miguel Angel gracias por las pláticas, las comidas y los aventones al IFC. Laura y Fabiola del conjunto E, Cassandra Villava del IFC, gracias por el tiempo que compartimos y lo ánimos que mutuamente nos hemos dado durante la maestría.
A Miriam "Coria" por su apoyo y asesoría en los pasillos y alrededores del IFC.

Agradezco a Jack y a Violeta por ser las primeras en ayudarme a integrarme al laboratorio por su confianza, apoyo y sus historias. Jack por sus consejos que desde ahora escucharé, por las cosas graciosas que hace, su particular estilo y sus locuras y a Cass por hacer el ambiente mucho más ameno. Además, a Elisa por su atención y paciencia tanto en las clases de alemán como en mis explicaciones sobre el tema.

Gracias a Marcela Sosa, por ser tan sincera y conocerme y darse cuenta que no soy **tan** payasa como pensaba.... Gracias por compartir su comida, tiempo, experiencias, por enseñarme tantas cosasjj...

A Marco Briones, agradezco mucho haberte conocido, habernos enojado, dejarnos de hablar y luego decirnos lo que pensábamos uno del otro... la verdad solo de esa forma pude conocer a una persona sincera, honesta, directa y que siempre dice y hace lo que piensa. Te agradezco mucho, el ánimo y la confianza que me diste.

Agradezco a los miembros del laboratorio 225 N, por los agradables momentos que he pasado con ellos..... Bueno.... de cierta forma han contribuido mucho a mi crecimiento personal y profesional.

Agradezco en especial a algunos de mis compañeros por enseñarme algunas técnicas básicas del laboratorio y por tanto importante en todo lo que he hecho.

Gracias a Blanquita, a Nayelli y a Valentín por colaborar en mi trabajo, por su amable asesoría, pero sobre todo por su compañía tan genuina.

A Chayito por sus consejos y su sonrisa constante.

A Lety por su asesoría en toda esa horrible serie trámites que he tenido que hacer y que francamente no se como lo hace ella!!!...

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).....	4
Estructura del TGF- β	5
Vía de señalización.....	5
Proteínas Smad.....	7
Regulación transcripcional por las Smads de los genes blanco del TGF- β	9
SBE (Elementos de unión a Smad).....	9
Activación y represión transcripcional por TGF- β	9
Regulación de la señal del TGF- β	11
SNON.....	12
Características estructurales de Ski y SnoN.....	12
El papel de SnoN.....	13
SnoN en la tumorigénesis.....	14
SnoN en la regeneración hepática.....	15
SnoN en la fibrosis.....	15
SnoN en la diferenciación muscular.....	16
Mecanismos de regulación de la vía del TGF- β por SnoN.....	16
Regulación de la expresión de SnoN.....	19
Regulación de la expresión de SnoN por TGF- β	19
Otros mecanismos de regulación de SnoN.....	20
Regulación de la vía del TGF- β por SnoN.....	22

2. ANTECEDENTES.....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	27
Objetivo	
general.....	27
Objetivos	
particulares.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Bioinformática. Análisis del genoma y	
secuencias promotoras de <i>snoN</i> y <i>smad7</i>	29
Diseño de oligonucleótidos específicos.....	30
Extracción de DNA genómico.....	30
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
Clonación del promotor de <i>smad7</i> y <i>snoN</i>	32
Clonación del promotor de <i>smad7</i> humano.....	33
Clonación del promotor de <i>snoN</i> de ratón y de humano.....	33
Líneas celulares.....	33
Ensayo de luciferasa.....	33
Inmunoprecipitación de cromatina.....	35
7. RESULTADOS.....	38
Bioinformática	
Obtención de la secuencia que responde al TGF- β del promotor del gen de	
<i>snoN</i> de humano y de ratón	38
Análisis del patrón de restricción del promotor del gen de	
<i>snoN</i>	42
Diseño de oligonucleótidos.....	43

Análisis de los factores transcripcionales que podrían unirse al promotor del gen de <i>snoN</i>	44
Análisis del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>snoN</i>	50
Resultados experimentales.....	52
DNA genómico de ratón y de humano.....	52
Reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del fragmento que contiene las SBEs para ratón y el humano.....	52
Clonación del promotor del gen de <i>snoN</i> y <i>smad7</i>	57
Regulación transcripcional del promotor de <i>snoN</i> humano y ratón por TGF- β	62
Inmunoprecipitación de cromatina.....	67
8. DISCUSIÓN.....	69
9. CONCLUSIONES.....	77
10. PERSPECTIVAS.....	78
11. APÉNDICE.....	79
12. BIBLIOGRAFÍA.....	81

ABREVIATURAS

APC	Complejo promotor de la anafase
bp	Pares de bases
BMP	Proteínas morfogenéticas de hueso
cDNA	DNA complementario
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
C-terminal	Carboxilo terminal
Co-Smad	Smad común
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FTs	Factores transcripcionales
HAT	Acetilasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
LAP	Proteína asociada a la latencia
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
I-Smad	Smad inhibitoria
IP	Inmunoprecipitación
MH1	Dominio 1 homólogo a Mad
MH2	Dominio 2 homólogo a Mad
MKK	MAPK kinase
mSin3A	Mammalian transcriptional represor Sin3A
N-Cor	Nucler receptor corepresor
NH₂-terminal	Amino terminal
N-CoR	Correpresor de receptor nuclear
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAi	RNA de interferencia
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R-Smad	Smad regulada por receptor
RI/II	Receptor de TGF- β tipo I/II
SBE	Elementos de unión a las Smads
Ski	Sloan-Kettering Institute
SFB	Suero fetal bovino
SIE	Elemento inhibitorio de las Smads
Smurf	Factor relacionado a la ubiquitinación de Smads
SnoN	Ski-novel related gene
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAK1	TGF-beta-activated kinase 1
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta

RESUMEN

La señal del TGF- β regula diversos procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular, a través de la activación de Smad2/3, las cuales forman un complejo con la proteína Smad4 que capaz de regular la transcripción de genes dependientes del TGF- β . SnoN y Smad7 son dos genes blanco del TGF- β . Se sabe que las proteínas Smads pueden regular a nivel transcripcional la expresión de *smad7*, pero poco ha sido estudiado acerca de la regulación de *snoN*. En este trabajo se clonó y analizó la región del promotor de *snoN* humano, que es regulada por TGF- β . Estudios bioinformáticos muestran que el promotor de *snoN* presenta cuatro regiones de respuesta a TGF- β que se encuentran altamente conservadas en rata y ratón. El análisis *in silico* de factores transcripcionales potenciales indica la posible participación de Pax 1, 2, 5 y 6, p53, YY1, Sp1, entre otros como reguladores de la expresión de *snoN* en ciertos contextos celulares. Estos sitios consenso están sobrelapados o aledaños a los SBEs presentes en el promotor de *snoN*. Ensayos con genes reporteros muestran que TGF- β activa al promotor de *snoN* en las células HepG2, Hek293T y A549. Mediante la técnica de CHIP se demostró el reclutamiento de Smad2/3 y Smad4 al promotor de *snoN* humano en respuesta al estímulo de TGF- β . Por lo tanto *snoN* es un gen blanco de las proteínas Smads, regulado positivamente por TGF- β .

ABSTRACT

TGF- β regulates diverse cellular processes such as the proliferation and differentiation through the activation of Smad2/3, which forms a complex with Smad4 protein, in order to regulate the transcription of TGF- β dependent genes. *SnoN* and *Smad7* are two TGF- β targets genes. It is known that Smad proteins can regulate at transcriptional level the expression of *smad7*, but little has been studied about the regulation of *snoN* gene. In this work we cloned and analyzed the human promoter *snoN*. Bioinformatics analysis shows that the *snoN* contains four regions responsive to TGF- β , which are highly conserved in rat and mouse. Furthermore, our *in silico* studies identified sites for several of potential transcriptional factors in *snoN* promoter such as Pax1, 5, and 6, p53, YY1 y Sp1. These factors could be regulators of the expression of *snoN* in certain cellular context. Consensus sites for that FTs are overlapping or bordering to SBEs in the *snoN* promoter. Assays using reporters genes show that TGF- β activate the *snoN* promoter in the HepG2, Hek293T and A549 cells, while using of CHIP assays was demonstrated the binding of Smad2/3 and Smad4 to the human *snoN* promoter region sensitive to TGF- β . Therefore, this work shows that human *snoN* is a target gene of Smad proteins, and it is regulated positively by TGF- β .

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

La superfamilia del Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) está integrada por más de 60 miembros, que han sido identificados en diferentes organismos desde nemátodos e insectos hasta mamíferos. En general, los miembros de la superfamilia del TGF- β se caracterizan por ser citocinas relacionadas estructuralmente con un amplio espectro de funciones celulares tales como proliferación, apoptosis, diferenciación y migración. Dentro de esta familia se incluyen a los TGF- β s, las activinas y las proteínas formadoras de hueso (BMPs), entre otros, siendo el TGF- β el miembro prototipo mejor estudiado (10, 20, 22, 23).

Existen cinco isoformas del TGF- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3, - β 4 y - β 5) en diferentes organismos. En aves y anfibios se han reportado las isoformas TGF- β 4 y TGF- β 5 respectivamente y en mamíferos las isoformas TGF- β 1, - β 2 y - β 3 (18, 21, 29). Las tres isoformas del TGF- β en mamíferos son codificadas por genes independientes pero presentan una alta similitud en la secuencia de aminoácidos (poseen entre sí el 80% de identidad). El TGF- β 1 es altamente conservado, ejemplo de ello, es que los ratones presentan una isoforma con la diferencia de un solo aminoácido con respecto a los humanos, razón por la que la isoforma más estudiada es el TGF- β 1 (23).

A pesar de su estrecha similitud estructural, funcional y de vía de señalización, se ha demostrado mediante estudios en ratones knockout, que cada isoforma tiene funciones específicas y relevantes durante el desarrollo embrionario, debido a que la carencia de cada una de las tres isoformas del TGF- β presenta diferentes fenotipos, todos ellos son letales (20, 23, 28). Las isoformas del TGF- β se expresan temporal y espacialmente durante la embriogénesis y presentan un patrón de expresión distinto durante la morfogénesis. El TGF- β se expresa en la mayoría de los tejidos en el adulto, pero con una expresión diferente de una o de las tres isoformas (18, 20).

El TGF- β participa en la regulación de un gran número de procesos celulares durante la embriogénesis, así como también en el tejido adulto. De esta forma, el TGF- β , dependiendo del tipo y contexto celular, regula funciones celulares como son la

proliferación, diferenciación, apoptosis, respuesta inmune, migración y reparación tisular, entre otras. Es por ello que alteraciones en la señal del TGF- β para cumplir con dichas funciones pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades de tipo autoinmune, de la fibrosis y del cáncer (28, 29).

1.1.1 Estructura del TGF- β

El TGF- β es sintetizado como una molécula inactiva unida a una secuencia de aminoácidos conocida como péptido asociado a la latencia (LAP), que tiene que ser proteolíticamente separado para que el TGF- β maduro pueda unirse a su receptor. Esta forma activa o madura del TGF- β es un polipéptido dímérico de 25 KDa (112 aminoácidos), cuya estructura corresponde a dos unidades monoméricas que están unidas por un solo puente disulfuro y por interacciones hidrofóbicas. Cada unidad está conformada por 7 residuos altamente conservados de cisteína que establecen un anillo cerrado conectado por tres puentes disulfuro intracatenarios denominado “nudo de cisteínas”, mediante el cual se unen dos pares de cadenas plegadas tipo beta antiparalelas (18, 20) (Fig.1).

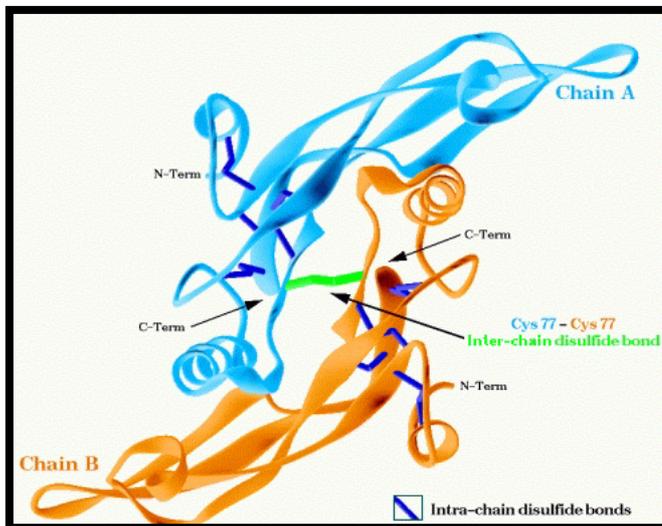


Figura 1. Estructura del TGF- β .
La forma activa del TGF- β es un dímero que es estabilizado por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro.

1.1.2 Vía de señalización

El TGF- β utiliza dos receptores, denominados tipo I o ALK-5 (RI) y tipo II o T β RII (RII), en cuya región intracelular presentan un dominio con actividad de cinasa de residuos de serinas y treoninas. La principal diferencia entre ellos, radica en que la cinasa RII es constitutivamente activa. Inicialmente el TGF- β se une al RII para reclutar al RI, y

formar un complejo heterotetramérico de receptores. La cinasa de RII, fosforila la región GS (región rica en residuos de glicinas y serinas) del RI, activando su dominio de cinasa, a través del cual son fosforiladas las R-Smads, que entonces se unen a la Co-Smad (Smad4). El complejo R-Smad/Co-Smad se transloca al núcleo celular e interactúa con otros reguladores transcripcionales modulando positiva o negativamente la expresión de genes regulados por el TGF- β (18).

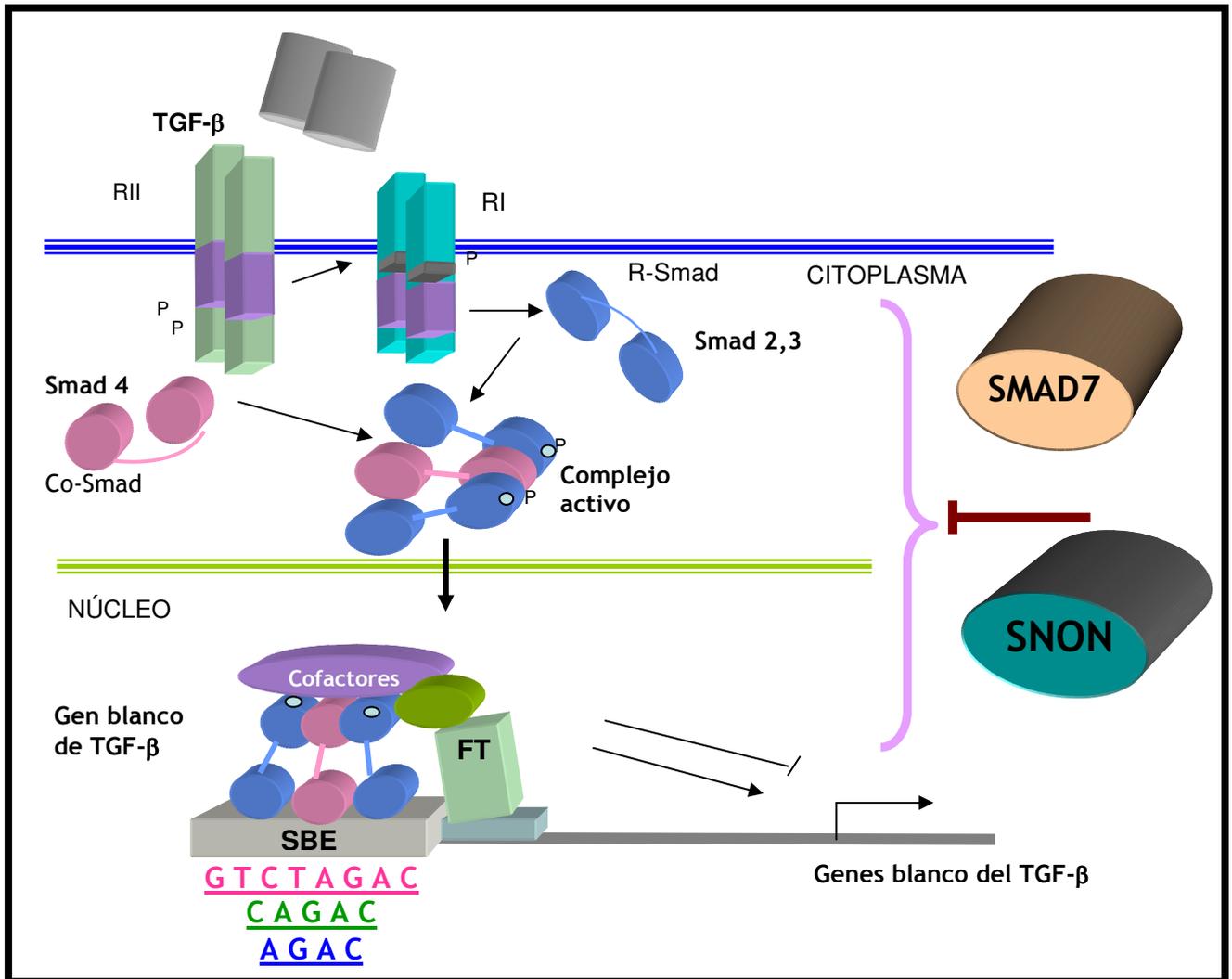


Figura 2. Vía de señalización canónica del TGF- β

TGF- β se une a los receptores tipo II y I, a través de los cuales activa a los intermediarios de la vía, las proteínas R-Smads, las cuales se unen a la Co-Smad para formar complejos activos capaces de translocarse al núcleo y regular la expresión de genes blanco del TGF- β , al unirse a secuencias de unión a Smads (SBEs). Las Smads regulan positiva o negativamente la expresión de sus genes blanco dependiendo de su asociación con FT, coactivadores o correpresores. La vía del TGF- β tiene diferentes mecanismos de control, dos de ellos son ejercidos por las proteínas Smad7 y SnoN, las cuales además son genes blanco de TGF- β , participando en un asa de retroalimentación negativa para el control de dicha señal.

1.1.2.1 Smads

Las proteínas Smad son las mediadoras de las señales de los miembros de la familia del TGF- β . El término "Smad" es el resultado de la fusión de los nombres Mad y Sma que reciben las proteínas homólogas presentes en *Drosophila* y *C. elegans* respectivamente, donde inicialmente fueron identificadas.

De acuerdo a su estructura y funcionalidad han sido clasificadas en tres tipos:

- R-Smad o Smads activadas por el receptor (Smad 1,2,3,5 y 8)
- Co-Smad o Smad común (Smad 4)
- I-Smad o Smad inhibitorias (Smad 6 y 7)

En la señal del TGF- β participan la Smad 2 y Smad3, la Smad4 y la Smad7. Las R-Smads y la Co-Smad presentan en su estructura dos dominios conservados denominados MH1 y MH2. El MH1 está localizado en el extremo amino terminal (N-terminal) y el MH2 en el carboxilo terminal (C-terminal). Ambos dominios están conectados por una región menos conservada llamada linker o puente. Las I-Smads posee solamente una mínima secuencia similar con el MH1, contrario a esto, el dominio MH2 es altamente conservado entre todas las Smads (19-21).

El dominio MH2 de las R-Smads presenta el motivo SXS en el extremo carboxilo, el cual es fosforilado por la cinasa del RI. Por otro lado, la Co-Smad y las R-Smads se unen a secuencias de DNA vía su dominio MH1, a través de una estructura β -hairpin u horquilla beta, con excepción de la Smad2 que no tiene la capacidad de unirse a DNA, debido a que posee una inserción del exón 3 que codifica para un péptido de 30 aminoácidos en el dominio MH1, y que se localiza entre la β -hairpin de unión al DNA y la hélice H2 (19, 21, 27).

El dominio MH2 es una región multifuncional que permite el reconocimiento con diferentes proteínas. En este dominio se presenta una asa L3, que difiere en sólo dos aminoácidos entre las R-Smad, y que interacciona con el asa L45 localizada en el dominio de cinasa del RI. A través del dominio MH2, es posible además la oligomerización de las Smads activadas formando un heterotrímero. También

mediante su dominio MH2, así como con el MH1, las Smads pueden interactuar con una diversidad de factores transcripcionales (28, 29).

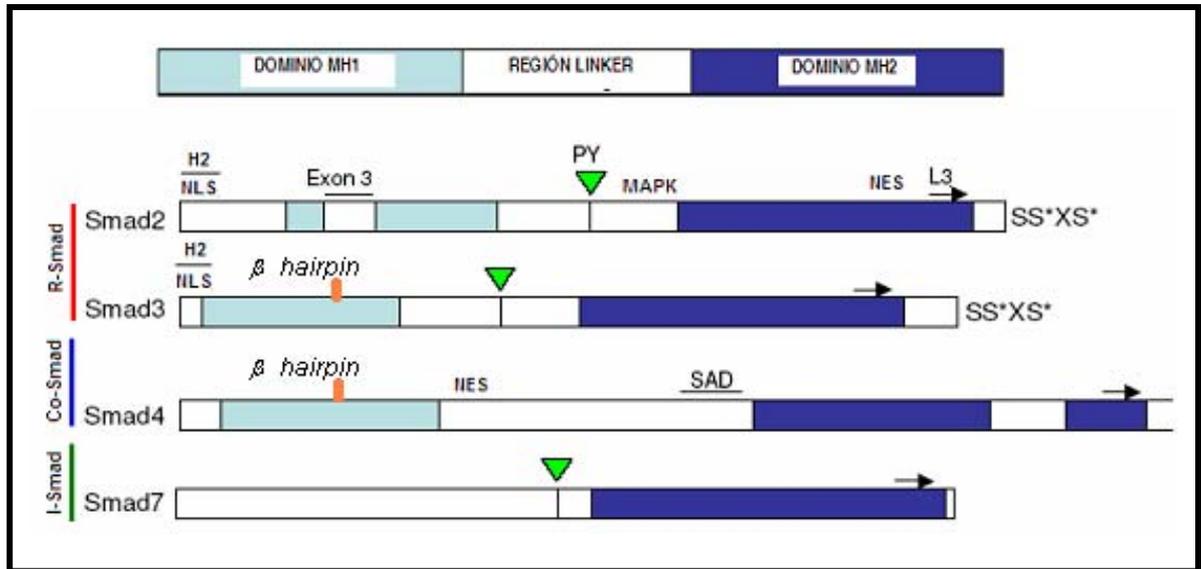


Figura 3. Representación de los diferentes dominios estructurales y motivos de las Smads
 En el MH1 de Smad3 y Smad4 se observa el dominio de unión a DNA (beta-hairpin u orquilla beta). En el linker se encuentran el motivo de interacción con la ligasa de ubiquitina Smurf (PY) y sitios de fosforilación para MAPKs. En el caso de Smad4 se identifica una señal de exportación nuclear (NES, Nuclear export signal), mientras que las R-Smad presentan secuencias de localización nuclear (NLS, Nuclear localization sequence). En Smad4 hay una región de interacción con activadores y represores transcripcionales (SAD, Smad4 activation domain). El MH2, es multifuncional debido a que presenta una asa L3 (loop L3), a través de la cual interactúa con el RI del TGF- β , y se encuentra el motivo SXS en las R-Smads que es fosforilado por la cinasa del RI, además el dominio MH2 es importante para la activación transcripcional y la oligomerización con Smad4. Modificado de Kaivo-oja et al, 2006.

La región linker es rica en residuos de prolina y serina, lo cual es importante porque un motivo PY (prolina-tirosina) presente en esta región en las R-Smads y en las I-Smads permite la interacción con los dominios WW de las ligasas de ubiquitina Smurf1 y Smurf2, lo cual es importante para la degradación vía el sistema ubiquitina-proteosoma (11, 13, 18).

Otros motivos estructurales son las señales de localización nuclear (NLS) en el dominio MH1 de las R-Smads, y señales de exportación nuclear (NES) en el dominio de MH2 de las R-Smads y algunas en la región linker de las Co-Smads (19).

1.2 Regulación transcripcional de genes blanco del TGF- β

1.2.1 SBE (Elementos de unión a las Smad)

La acción transcripcional de las Smads activadas es posible debido a que en la región promotora de los genes de respuesta al TGF- β se encuentra una secuencia consenso a la cual se une el complejo de Smads denominada *Elemento de unión a Smad* y conocido por sus siglas como **SBE** (Smad Binding Element). Los SBEs consisten en secuencias palindrómicas que inicialmente fueron identificadas como CAGATCTG, sin embargo, se ha demostrado que las Smad pueden unirse óptimamente con la secuencia de 5 bp CAGAC e incluso son suficientes las 4 bp CAGA (9,18,19).

Se ha calculado que la secuencia CAGAC está presente cada 1024 bp en el genoma o por lo menos una vez en la región de regulación de un gran número de genes. En general los genes que responden a TGF- β presentan uno o más SBEs en sus promotores. Sin embargo, cabe mencionar que existen estudios, que señalan que no todos los genes blanco de las Smad presentan SBEs en su promotor, tal es el caso del gen *gooseoid* en ratones. Además, se ha reportado, aunque de forma limitada, que las Smads pueden unirse a secuencias ricas en guaninas y citosinas y no necesariamente a secuencias SBEs (18-20).

A pesar de que las Smads pueden unirse a SBEs, esta unión exclusiva no puede llevar a cabo la activación de los genes blanco del TGF- β , debido a que se caracteriza por ser una unión débil por su baja afinidad y selectividad. Bajo estas circunstancias, la asociación de factores transcripcionales, juega un papel muy importante, al dar una mayor afinidad y especificidad a la unión de las Smads con el DNA (20-21).

1.2.2 Activación y represión transcripcional por TGF- β

El TGF- β puede activar o reprimir la expresión de ciertos genes. La activación transcripcional mediada por TGF- β se debe principalmente a la unión del complejo activo Smads a los SBE, con la participación de factores transcripcionales activadores y ciertos coactivadores.

La represión de la expresión de un gen puede darse de diferentes formas, una de ellas, consiste en que el complejo de Smads activadas se una a los SBEs y la presencia o ausencia de factores transcripcionales específicos medie la inhibición de la expresión de ese gen. Además se ha observado el reclutamiento de correpresores como SnoN y Ski que pueden a su vez reclutar toda una maquinaria represora que contribuyen a la compactación de la cromatina reprimiendo por tanto la expresión de dichos genes.

No obstante, se han propuesto secuencias diferentes a los SBEs llamadas TIE, (elementos inhibitorios del TGF- β) o recientemente los SIE (elementos de inhibición de las Smads), a los cuales se ha visto que se unen Smad3/Smad4 y diversos factores transcripcionales, teniendo un efecto inhibitorio en la expresión del gen, ejemplo de ello es la unión de Smad3/4, E2F4 y p107 al TIE del promotor del gen *c-myc*, que confiere una represión transcripcional en respuesta a TGF- β (24).

En los últimos años, se han incrementado las evidencias de otro mecanismo por el cual el TGF- β regula la expresión de algunos genes, a través de su vía canónica, en donde proteínas del complejo de Smads interactúan con dominios de ciertos factores transcripcionales clave para la activación de cierto gen, liberándolo de su unión al DNA. Ejemplo de ello es como el TGF- β reprime la expresión del gen Pax-6 al prevenir la autorregulación de su propio promotor por la interacción de Pax-6 con Smad3 en el núcleo (35).

Se han caracterizado diversos factores de unión a DNA con los que interaccionan las Smads, para la regulación transcripcional de genes específicos en respuesta a TGF- β (Tabla 1). Las R-Smads usan diferentes factores, muchos de los cuales son expresados solamente en ciertos tipos celulares, confiriendo especificidad celular para respuestas mediadas por TGF- β , además de que un mismo factor transcripcional puede ser multifuncional y dependiendo de su unión con otros coactivadores o correpresores se determina la especificidad de su respuesta (20).

Algunos ejemplos de la importancia de la asociación de las Smads con ciertos factores transcripcionales para regular la expresión de genes blanco son los siguientes: La

autorregulación de TGF- β 3, en donde CREB-1, ATF-2 y c-Jun se unen constitutivamente al sitio CRE en el promotor de TGF- β 3 y son requeridos para la expresión basal de éste. Después de la estimulación con TGF- β 3, Smad3 fosforilada es también reclutada al sitio CRE, y junto con los otros factores aumenta la transactivación de este promotor, incrementando la producción de TGF- β 3. Otro ejemplo interesante es el complejo formado de Smads con el factor transcripcional Sp1, que media la inducción transcripcional temprana de Smad7 por el TGF- β en células de cáncer pancreático (36).

Cofactor	Gen Blanco
FAST	<i>Mix2, Nodal, Lefty2</i>
Mixer	<i>Goosecoid</i>
TFE3	<i>PAI-1</i>
CBFA3	<i>IgA</i>
Jun	<i>c-Fos</i>
Lef1/TCF	<i>Xtwn</i>

Tabla 1. Ejemplos de diferentes cofactores utilizados con Smad 2 y 3 para regular la expresión de algunos genes blanco del TGF- β .

1.3 Regulación de la señal del TGF- β

La vía de transducción del TGF- β es regulada por diferentes mecanismos a varios niveles de la cascada de señalización, como por ejemplo:

- 1) Degradación de diferentes componentes de la vía, a través de la ubiquitinación y la vía del proteosoma.
- 2) Smad7, una Smad inhibitoria que bloquea la activación de las R-Smad.
- 3) Interacción de Smads con correpresores transcripcionales como Ski y SnoN.

Las proteínas Smad2/3 activadas y los receptores del TGF- β , son degradados mediante el proteosoma, que constituye un importante mecanismo de control, ya que detiene la vía de señalización. La degradación de estos componentes requiere que éstos sean ubiquitinados mediante ligasas E3 de ubiquitina, que pueden ser Smurf2 (Smad ubiquitin regulatory factor) o APC (Anaphase-Promoting Complex), las cuales pueden actuar sólo cuando las Smads están fosforiladas. De esta forma, cuando las

proteínas Smads interactúan con otros componentes de la vía como son los receptores y con las mismas Smads, las ligasas E3 de ubiquitina realizan su función conduciéndolos a degradación vía proteosoma. Cabe señalar que el proteosoma puede degradar a correpresores de la vía, como Ski y SnoN, pero en este caso manteniendo la señal encendida (11,13).

Con relación a Smad7, a pesar de no poseer un motivo de fosforilación, ésta puede unirse al RI, evitando la asociación de éste con las R-Smad y por lo tanto también con Smad4. Otro aspecto importante, es que Smurf2 interacciona constitutivamente con Smad7, a través del motivo PY, pero la activación del TGF- β resulta en un reclutamiento de Smurf2 dependiente de Smad7 al receptor de TGF- β para promover la degradación a través del proteosoma (9, 11). A nivel transcripcional un mecanismo de regulación de la vía, es la inhibición de la función transcripcional de las Smads por los correpresores Ski y SnoN.

1.4 SNON

1.4.1 Características estructurales de Ski y SnoN

Ski y SnoN son dos miembros altamente conservados de la familia de protooncoproteínas Ski. Fueron identificadas por su homología con el producto del oncogen retroviral Sloan Kettering (v-ski) que causa la transformación de fibroblastos embrionarios de pollo e hipertrofia muscular en ratón. Ski y SnoN se han identificado en ratón, *Xenopus*, pollo, tilapia y humano, entre otros (5, 15). En el caso de *sno* se han descrito cuatro isoformas en humano que corresponden a SnoN, SnoN2, SnoA y Sno1, resultado de "splicing" alternativo, mientras que en el ratón se presentan sólo dos isoformas que son SnoN y SnoN2 (5).

En general, todos los miembros de la familia Ski, muestran una región altamente conservada en el extremo N-terminal de aproximadamente 270 aminoácidos, mientras que la región C-terminal muestra una mínima homología, presentando en algunos casos los dominios necesarios para la homo o heterodimerización de varios miembros de la familia. No obstante, sólo la región homóloga es necesaria y suficiente para su

actividad de transformación y diferenciación. Dentro de esta misma región, se exhibe además el dominio conservado SAND, el cual mediante una asa llamada I-loop interactúa con el asa L3 de Smad4 constitutivamente (4-9, 15). Ski y SnoN tienen la capacidad de interactuar, a través de una secuencia de aproximadamente 97 aminoácidos en la región N-terminal, con el dominio MH2 de Smad2 y Smad3 de manera dependiente de la señal del TGF- β , es decir con Smad2 y 3 activadas (12,13, 16,19).

A pesar de que SnoN y Ski son altamente similares, su expresión es regulada por diferentes mecanismos y al parecer no siempre tienen la misma función, sino que en ciertos contextos cada una de estas proteínas puede tener funciones específicas.

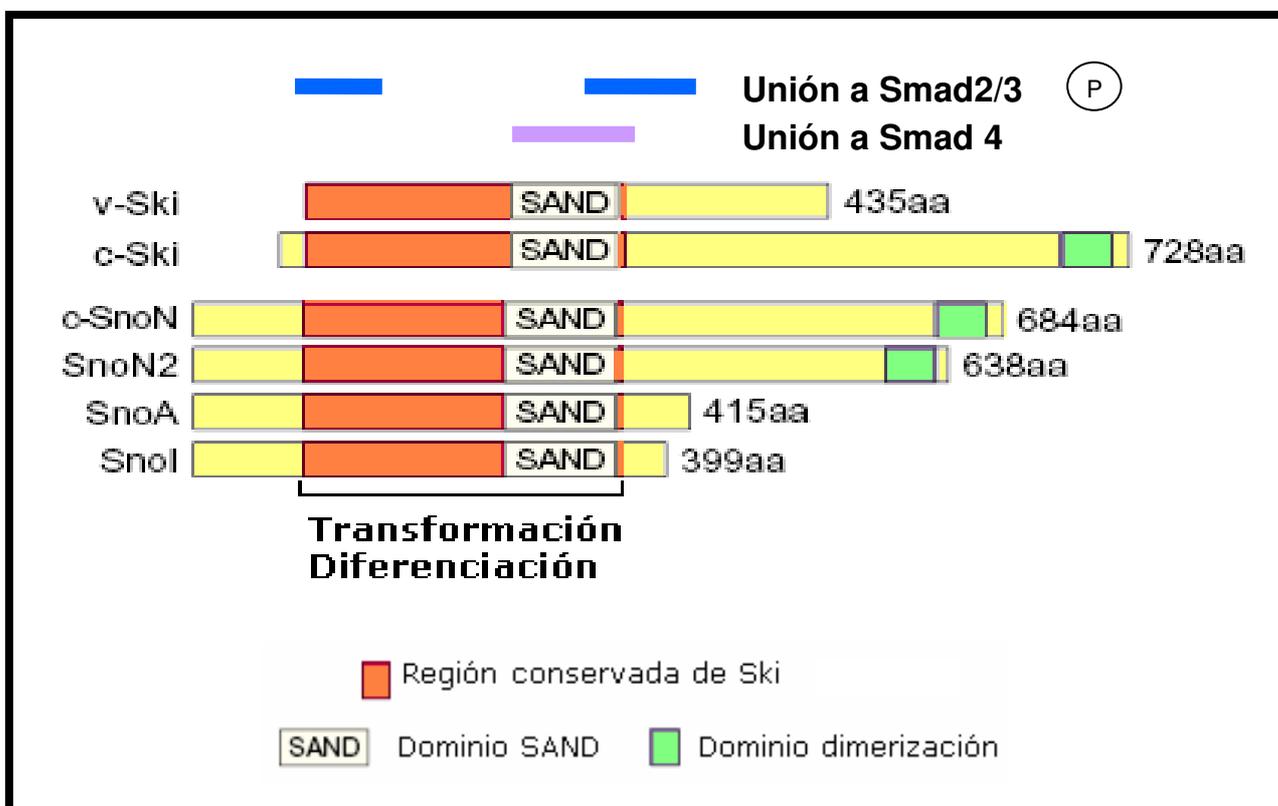


Figura 4. Representación de la estructura de los miembros de la familia de protooncoproteínas Ski.

Todos los miembros de esta familia tienen su región N-terminal altamente conservada y presentan una secuencia suficiente para la actividad transformante de estas proteínas. En la región C-terminal existen dominios de homo-heterodimerización. (Modificada de Luo, 2004)

1.4.2 El papel de SnoN

SnoN es una proteína expresada en bajos niveles virtualmente en todos los tejidos adultos y embrionarios, sin embargo, existe una desregulación de sus niveles de expresión en algunos estados fisiológicos específicos y en diversas patologías.

1.4.2.1 SnoN en la tumorigénesis

La función de SnoN en la tumorigénesis ha sido discutida, debido a que varios estudios muestran que SnoN es una oncoproteína, porque su sobreexpresión resulta en una transformación oncogénica de fibroblastos embrionarios de pollo, además de que también se observa su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer y líneas celulares tumorales humanas derivadas de melanoma, de cáncer de seno, pulmón, esófago, estómago y próstata (3, 22, 24, 26).

Estudios con ratones deficientes del gen *snoN*, muestran un incremento en la susceptibilidad a carcinógenos químicos, mientras que en ratones knockout la ausencia de *snoN* es letal para la embriogénesis (2, 4, 5, 15). Tales resultados indican el papel dual que SnoN puede tener como oncogen o supresor de tumores dependiendo del tipo celular, y por tanto su relevancia en mantener la homeostasis celular.

Recientemente se ha demostrado dicho papel dual de SnoN en la tumorigénesis. En experimentos con ratones desnudos, se ha visto que la inyección de células A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) que presentan niveles elevados de SnoN, favorece la formación de un tumor, mientras que esto no ocurre en ratones a los que se les inyectan las mismas células con los niveles de SnoN abatidos por RNAi. Sin embargo, a pesar de que la ausencia de SnoN evita el desarrollo del tumor, favorece la metástasis de estas células hacia hueso y pulmón (45).

La complejidad de la función de SnoN se ha relacionado con el rol dual que también presenta el TGF- β , debido a que se sabe que en células no transformadas y en estados tempranos de oncogénesis, las Smads inhiben el crecimiento, pero en presencia de mutaciones en los receptores del TGF- β o cuando hay una sobreexpresión de oncogenes tales como *ras*, disminuye la respuesta inhibitoria del

TGF- β y da pie al crecimiento del tumor. Además las células tumorales pierden su habilidad para responder al TGF- β y progresan a un estado maligno. La estimulación por TGF- β causa en estas células una transición de epitelio a mesénquima conduciendo a un incremento de la metástasis e invasión. En estos eventos la regulación de los niveles de Ski y SnoN puede estar implicada (10, 22).

La razón por la cual existe la sobreexpresión de SnoN en diversos tipos de cáncer, ha tratado de ser esclarecida. Se ha reportado que en líneas celulares de cáncer de esófago resistentes a la inhibición del crecimiento por TGF- β , se presenta una asociación de SnoN con Smad3 sobre el elemento TIE del promotor del gen *c-myc*. SnoN evita la represión de la expresión de *c-myc* inducida por TGF- β . Al parecer en este tipo de cáncer existe una resistencia a la degradación de SnoN, lo cual evita la represión causada por TGF- β de la transcripción de *c-myc* (24). La resistencia a la degradación de SnoN podría ser un mecanismo para explicar la resistencia a la disminución de crecimiento inducida por TGF- β en cáncer esofágico (24), y posiblemente en otros tipos de cáncer.

Por otra parte también se ha observado la amplificación del gen *snoN* en el cáncer esofágico, lo cual puede contribuir a los altos niveles de SnoN. Hasta ahora, no se sabe como puede estar siendo regulado el promotor del gen *sno* en diversos tipos de cáncer.

1.4.2.2 SnoN en la regeneración hepática

Interesantemente, miembros de nuestro laboratorio, empleando un modelo de proliferación celular diferente al de cáncer, que consiste en la regeneración hepática, han mostrado una regulación de los niveles de Ski y SnoN principalmente durante la fase de proliferación celular, indicando que estas protooncoproteínas son capaces de inhibir la actividad de las Smads en esta fase, con el objetivo de permitir la proliferación celular en el proceso de regeneración del hígado ante las señales antiproliferativas del TGF- β (17).

1.4.2.3 SnoN en la fibrosis

Otro aspecto relevante, es el efecto profibrótico del TGF- β que puede conducir a distintas patologías, tales como alteraciones renales crónicas. Investigaciones actuales muestran que la disminución de los correpresores Ski y SnoN ocurre progresivamente con el curso de algunos modelos de fibrosis renal, es decir, que inicialmente en un riñón normal se encuentran niveles elevados de SnoN y Ski, los cuales son marcadamente reducidos en el riñón en un estado fibrótico inducido en ratón, lo que indica que estos correpresores de las Smads antagonizan la acción del TGF- β 1 y su disminución puede jugar un papel importante en la patogénesis de la fibrosis renal crónica (25).

1.4.2.4 SnoN en la diferenciación muscular

Se sabe que la sobreexpresión de SnoN conduce a la diferenciación muscular de células embrionarias de codorniz, además el ratón transgénico de SnoN conduce a alteraciones en las fibras musculares tipo I, indicando la relevancia de SnoN en el proceso de diferenciación muscular (47). En nuestro laboratorio se ha observado, que la expresión basal de SnoN es mayor en miotubos (células musculares diferenciadas) que en mioblastos (células musculares no diferenciadas). Estos estudios indican que SnoN al parecer se regula diferencialmente cuando la célula está o no diferenciada.

1.4.3 Mecanismos de regulación de la vía del TGF- β por SnoN

Ski y SnoN son reguladores negativos de las señales del TGF- β , ya que homo o heterodímeros de éstos, pueden interactuar con las proteínas Smads y reprimir su actividad transcripcional (15).

Se ha demostrado que SnoN es una proteína localizada en el citoplasma de tejidos normales, así como células no malignas, sin embargo en líneas celulares y tejidos malignos, algunos autores muestran que es una proteína exclusivamente nuclear (14), mientras que otros muestran además altos niveles de SnoN en el citosol bajo estas condiciones (46). Es probable que en ciertos tipos de tumores haya un cambio en la localización subcelular de SnoN predominantemente hacia el núcleo, o bien que SnoN se encuentre tanto en citoplasma como núcleo, inhibiendo a las Smads en ambos niveles.

Los mecanismos que se han descrito, por los cuales SnoN inhiben las señales del TGF- β son:

a) Secuestro de proteínas Smads.

Se ha demostrado que SnoN puede asociarse con Smad4, Smad3 y Smad2, y se ha propuesto que SnoN interfiere con la interacción entre Smad4 y R-Smad como lo hace Ski (5). Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de SnoN silvestre mantiene su localización nuclear y no afecta la acumulación de las proteínas Smads en el núcleo, mientras que la sobreexpresión de la mutante de SnoN cuya secuencia de localización nuclear fue deletada, permanece y retiene a las Smads en el citoplasma en presencia del TGF- β . Lo anterior sugiere que SnoN es capaz de secuestrar a dichas proteínas en el citoplasma y/o en el núcleo, con el objetivo de impedir que los complejos activos de las proteínas Smad se unan a sus promotores blancos y evitar la activación de genes que responden al TGF- β (Fig. 5).

b) SnoN como correpresor.

SnoN puede unirse a las Smads ya posicionadas en sus promotores blanco y reclutar una serie de correpresores transcripcionales como N-CoR, mSin3A, HIPK2 y MeCP2, que a su vez reclutan desacetilasas de histonas, con lo cual previene la unión de coactivadores como p300/CBP y de esta forma reprimen la expresión de genes blanco del TGF- β (5,8, 15,16). Este tipo de regulación se ha descrito recientemente en nuestro laboratorio para el gen de Smad7 (12,16) (Fig.5).

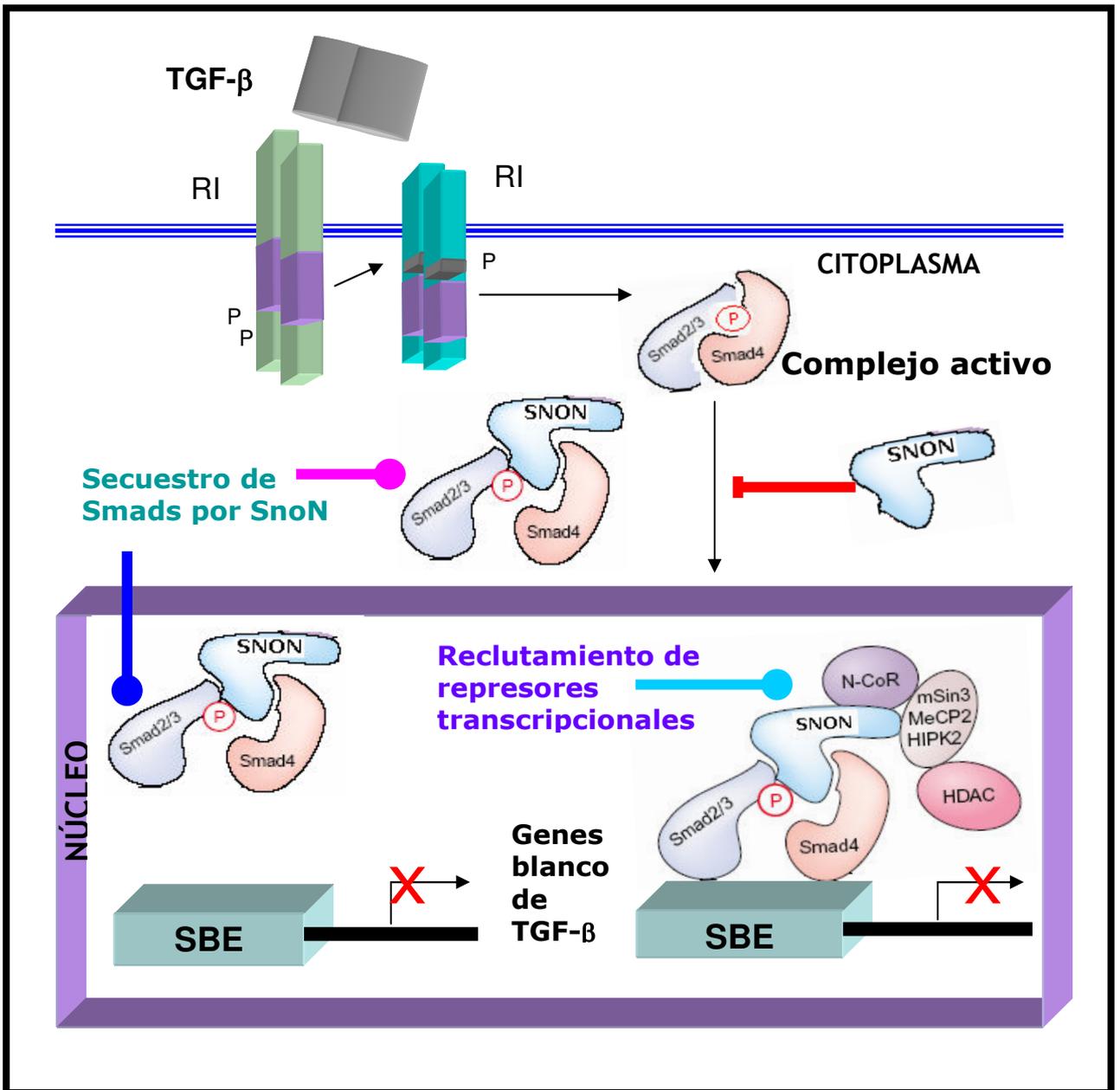


Figura 5. Representación de los mecanismos propuestos de regulación de la actividad de las Smads por SnoN.

SnoN puede unirse a las Smads y alejarlas de sus genes blanco, o bien asociarse con las proteínas Smad posicionadas en los promotores de genes responsivos a TGF- β y reclutar una maquinaria represora para evitar la expresión de dichos genes.

1.4.4 Regulación de la expresión de SnoN

1.4.4.1 Regulación de SnoN por TGF- β

Como anteriormente se mencionó, a pesar de que Ski y SnoN, muestran gran semejanza estructural y funcional, existen diferencias importantes en la regulación de su expresión. A diferencia de Ski, SnoN es regulado a nivel de RNAm y proteína por el TGF- β .

El gen *snoN* está localizado en el cromosoma 3q26, y se ha demostrado que posterior a 1 ó 2 horas de estímulo con el TGF- β hay un incremento en los niveles de su RNAm. Sin embargo hasta hace poco tiempo nada se sabía acerca de su regulación transcripcional, lo cual justifica el objetivo de este trabajo.

El TGF- β regula además los niveles de proteína de SnoN, debido a que induce la degradación de SnoN vía el sistema ubiquitina-proteosoma, a través de la directa interacción de SnoN con las proteínas R-Smads activadas, que sirven de adaptadores para las ligasas de ubiquitina APC y Smurf2, y recientemente se ha reportado para la ligasa de ubiquitina Arkadia (fig.6).

Para la ubiquitinación y degradación de SnoN en respuesta a TGF- β , se requieren al menos tres regiones de esta proteína:

- Dominios de unión a Smad2/3
- Residuos de lisina que son ubiquitinados
- Caja D que es blanco de CDH1-APC

Mutaciones de cualquiera de estas regiones bloquea la degradación de SnoN, inducida por TGF- β .

El dominio MH2 de las R-Smad pueden asociarse con la región N-terminal de SnoN, y al mismo tiempo puede asociarse mediante su motivo PY con el dominio WW de Smurf2. De esta forma Smad2 recluta a Smurf2 a SnoN, permitiendo que el dominio HECT de Smurf2 ubiquitine la región C-terminal de SnoN para su subsiguiente degradación. La caja D (caja de destrucción) es reconocida por CDH1-APC y esta

interacción es favorecida por Smad3 o Smad2. El dominio MH2 de R-Smads se ha encontrado que interacciona con los componentes de APC, Cdc27 y Cdc16.

SnoN es un importante regulador de las señales del TGF- β que funciona para mantener el estado de represión de genes blanco en la ausencia del ligando y en el control por retroalimentación negativa de la señal del TGF- β . La degradación de SnoN inducida por TGF- β es un paso trascendental inicial para la activación de la señal. Recientemente se ha demostrado que la estabilidad de SnoN es regulada por la fosforilación llevada a cabo por la proteína cinasa TAK1, la cual se une y fosforila a SnoN. Al inactivar TAK1 se evita la degradación de SnoN inducida por TGF- β , lo cual afecta la inducción de genes blanco de las Smads (46). La fosforilación de SnoN es una modificación postraduccional llevada a cabo por TAK1, al parecer necesaria para mediar su degradación en respuesta al estímulo de TGF- β , para permitir la expresión de genes responsivos a esta citocina (46).

1.4.4.2 Otros mecanismos de regulación de SnoN

SnoN es un gen blanco del TGF- β (50) y recientemente se ha mostrado que también lo es del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La citocina antifibrótica HGF, que antagoniza la acción del TGF- β 1, induce la expresión del RNAm y de la proteína del correpressor transcripcional SnoN en células HKC, pero no de otros correpresores incluyendo a Ski, lo cual podría contribuir a abatir la acción profibrótica del TGF- β 1 (22).

Otros estudios sugieren que el gen *snoN* es un gen blanco de EVI1 (la proteína asociada a la leucemia), la cual podría jugar un papel crítico en la transformación inducida por EVI1. Además es posible que EVI1 inhiba la señal del TGF- β a través de un incremento en la expresión de Ski y SnoN, aunque esto no ha sido completamente demostrado (23).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas y potente activador de las vías de MAPKs, es capaz de inducir la degradación de ambos correpresores por un mecanismo independiente de Smads, de la activación de MAPKs y de la inhibición de la síntesis

de proteínas. Un punto relevante al respecto, es que esto sugiere que existen mecanismos alternos que pueden regular los niveles de las proteínas Ski y SnoN, y que son independientes de la vía del TGF- β (12). Aunado a lo anterior, cabe recalcar la importancia que tiene la degradación de SnoN, ya que este evento es el primer paso para la expresión de genes blanco de Smads y en algunos tipos de cáncer existe una resistencia a la degradación de dicho correpressor.

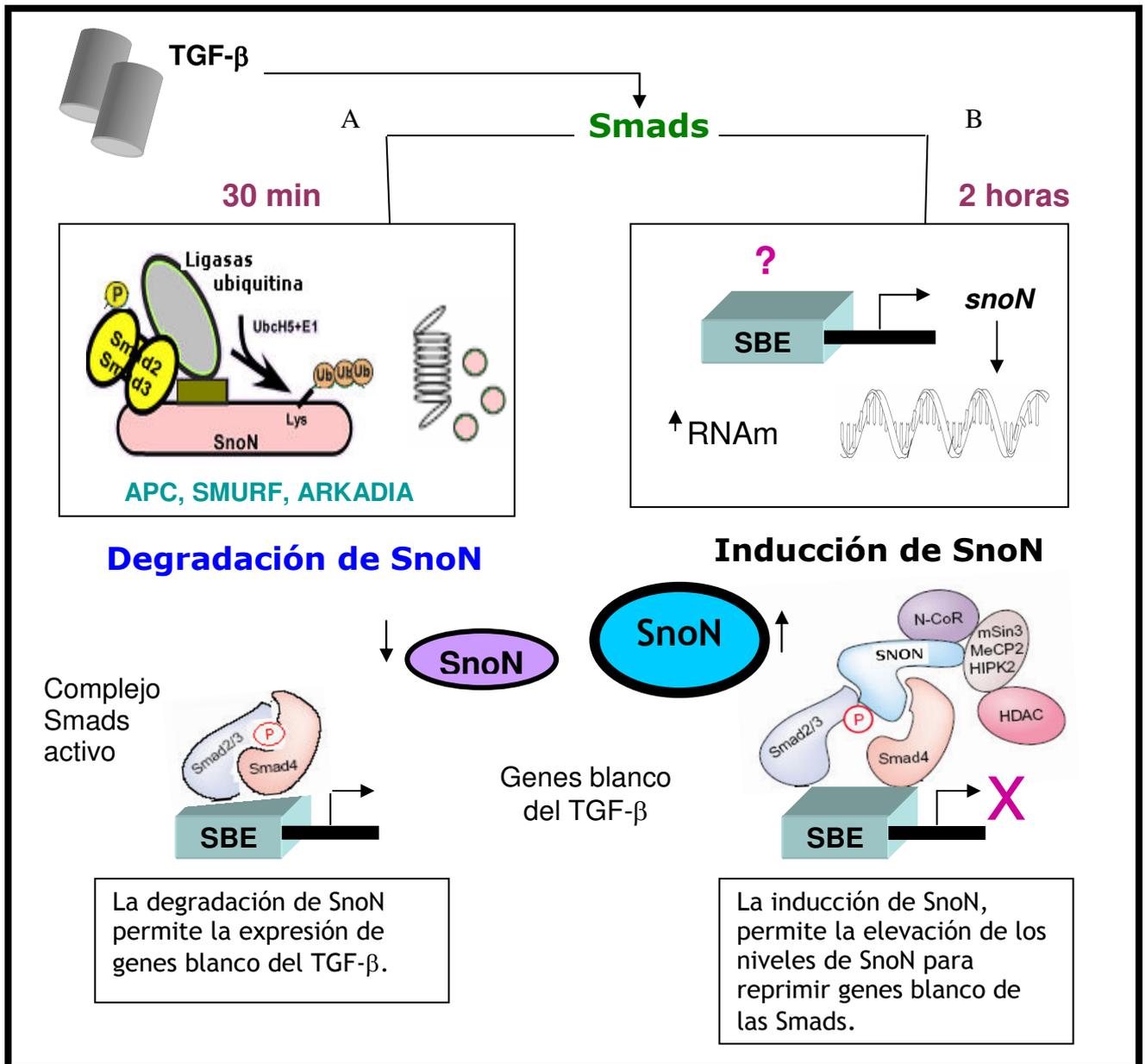


Figura 6. Regulación de la expresión de SnoN por TGF- β .

SnoN mantiene reprimidos genes blanco de las Smads en estado basal. A) TGF- β induce la degradación de *SnoN* para mediar la expresión de sus genes blanco vía el sistema ubiquitina-proteosoma mediante la unión de Smads fosforiladas que sirven de reclutadoras y adaptadoras para las ligasas de ubiquitina APC, Smurf y Arkadia. B) Para reprimir nuevamente a los genes blancos de las Smads y regresarlo a un estado basal, el TGF- β induce la expresión de *SnoN*, con lo cual se incrementan los niveles de RNAm y proteína de *SnoN*, para que medie la represión de dichos genes.

1.4.5 Regulación de la vía del TGF- β por SnoN

En nuestro laboratorio se comprobó que el TGF- β induce la expresión del RNAm de *snoN*, además de demostrarse la regulación por TGF- β de los niveles de la proteína SnoN en una manera dependiente del tiempo (6, 50). De esta forma, se sabe, que SnoN funciona para mantener un estado de represión de genes blanco del TGF- β en ausencia del ligando, pero que en presencia de éste ocurre una rápida degradación de SnoN vía el sistema ubiquitina-proteosoma, mediada por la unión de Smad3 o Smad2 activadas.

La degradación de SnoN permite a las Smads activar la transcripción de genes de respuesta a TGF- β . Además, se ha visto que a tiempos largos (1 h o más), el TGF- β induce un incremento del RNAm y de la proteína SnoN, con el objetivo de apagar la señal del TGF- β como una asa de retroalimentación negativa (4, 7).

Al respecto, *smad7*, es un gen blanco del TGF- β y en el laboratorio se demostró en células HepG2 y A549, éste gen es reprimido por SnoN y Ski en el estado basal, por la interacción de estos correpresores con Smad4 y su unión a dicho promotor. Sin embargo, tras el estímulo de TGF- β , la degradación de Ski y SnoN, causa una disminución de los niveles de estas proteínas, lo que permite la expresión de Smad7, para que posteriormente a 2 horas del estímulo, la inducción de SnoN por TGF- β permita el incremento del RNAm y de la proteína SnoN, que entonces reprimirá la expresión del gen de *smad7* para regresarlo nuevamente a su estado basal (Figura 6 y 7). Es probable que esto conduzca a mantener bajos niveles de Smad7 con lo cual se facilite la propagación de la señal del TGF- β (4). Este es un ejemplo de la importancia de la regulación de la expresión de SnoN por el TGF- β , que repercute en el control que el correpresor SnoN tiene sobre la vía del TGF- β para regular la expresión de genes blanco de las Smads, tales como el gen de *smad7*.

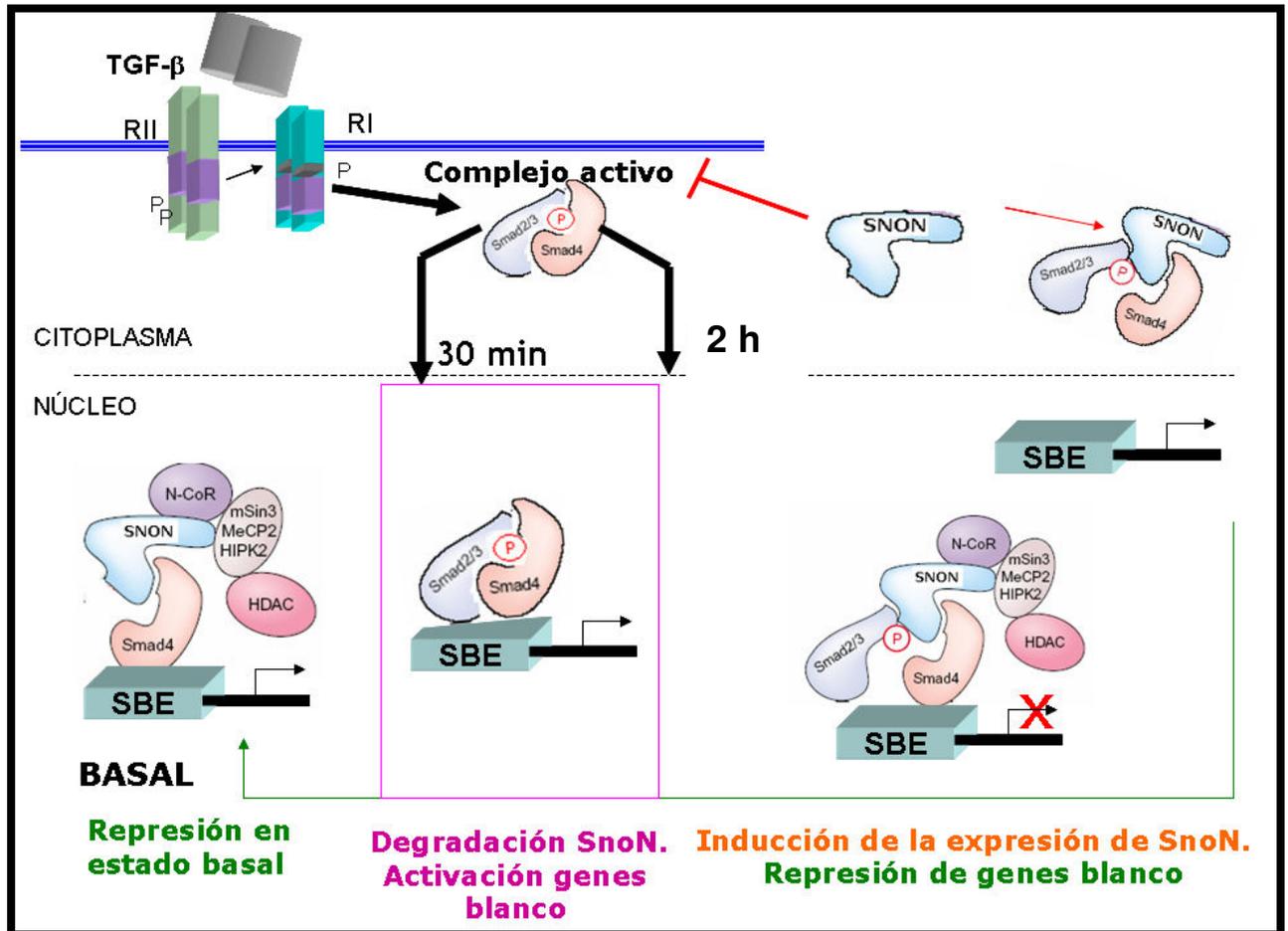


Figura 7. Regulación de la vía del TGF- β por SnoN

La expresión de Smad7 en estado basal es reprimida por SnoN, tras el estímulo de TGF- β se media la degradación de SnoN y la activación del gen smad7. A las dos horas del estímulo del TGF- β se incrementan los niveles de RNAm y proteína de SnoN. SnoN reprime la expresión de smad7. Este mecanismo puede llevarse a cabo para otros genes blanco de SnoN y las Smads.

2. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio y en otros, se ha investigado el control que puede ejercer el TGF- β sobre la expresión de *snoN* a nivel de RNAm y de proteína. El efecto del TGF- β sobre la expresión de *snoN* hace posible que se regule dicha señal mediante retroalimentación negativa. Ante estas circunstancias un hecho importante es conocer como el TGF- β regula la expresión de *snoN* a nivel transcripcional, siendo un punto clave el analizar y caracterizar al promotor de este gen.

En nuestro laboratorio se comenzó a analizar la secuencia promotora del gen *snoN* en ratón, sin embargo a finales del 2005, fue reportada la clonación del promotor del gen *snoN* de ratón, por Luo y cols (1). A pesar de ello, no reportan la secuencia promotora de *snoN*, pero señalan la presencia de una zona de respuesta al TGF- β comprendida en la región promotora de aproximadamente 400 bp. Los ensayos de footprinting que realizaron muestran que las proteínas Smad se unen al promotor de *sno*, en 4 secuencias específicas que denotaron como SBE1, 2, 3 y 4. Por otro lado, a través de geles de retardo (EMSAs), se observó que mutaciones específicas en estas secuencias SBE, sitios consenso de unión a Smads, afectan la interacción de las Smads con el promotor.

	Secuencia 5'-3'	
SBE1	atcctGTCTgagccgggcaccgcAGACagcgccgt	35
SBE2	ccagccgcccAGACggcgcGCCggg	25
SBE3	ccacaataggcCAGAcggcgcgcgcg	26
SBE4	cggccggAGACggcgcGcggcGTCTgcgga	30

Tabla 2. SBEs detectados en la zona de respuesta al TGF- β del promotor de *snoN* de ratón. La tabla muestra las secuencias de los oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia promotora de *snoN* de ratón por Luo y cols, para los EMSA realizados. En mayúsculas se muestran las bases mutadas que afectaron la unión de las Smads. Estas son las únicas secuencias reportadas en relación al promotor de *snoN*.

Por medio de estudios con genes reporteros, se observa que mutaciones independientes en cualquiera de los SBE no influye considerablemente en la actividad promotora, mientras que si los cuatro SBE son mutados se abate significativamente dicha actividad. Otro dato interesante que arrojó este estudio, fue que Smad2 y Smad3 juegan papeles diferentes en la regulación del gen *snoN*. Por su parte, Smad2 se une a

los SBEs, para inducir la expresión de SnoN, pero no así Smad3. Al parecer *snoN* es un gen blanco del TGF- β cuya inducción es dependiente exclusivamente de Smad2/4, mientras que Smad3/4 se une a una secuencia de DNA diferente a SBE, denominada SIE (elemento inhibitorio de Smad), causando un efecto inhibitorio sobre la activación de la expresión del gen *snoN* (1) (fig.8).

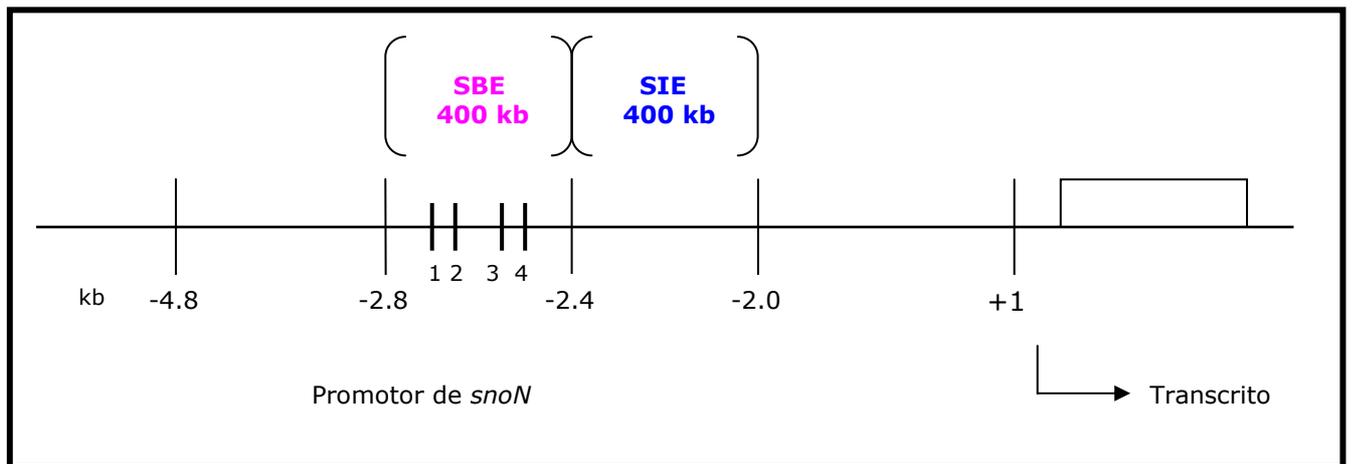


Fig. 8 Representación del promotor de *snoN* de ratón, realizada con base en lo descrito por Luo y cols 2005

Esta acción opuesta entre algunas R-Smads, es un hecho interesante, ya que en pocos casos se ha reportado, como por ejemplo en el gen *gooseoid* murino que se expresa durante la embriogénesis y que también muestra una regulación diferente por las R-Smads. Smad3 compete con Smad4 por la unión a la misma secuencia en el promotor de *gooseoid* y previene la unión al DNA del complejo Smad2/4 y de otros coactivadores como FAST2 (26).

Es importante mencionar que pocos artículos han reportado la presencia de SIE o TIE en los promotores de genes blanco del TGF- β y en algunos de éstos al parecer la unión de Smad3 es importante. Por lo tanto, es probable que Smad3/4 pueda cumplir una función de regulador negativo y que esta acción pueda verse alterada como resultado de mutaciones en Smad4, lo cual afectaría la oligomerización con Smad3, y además podría ocurrir en diferentes tipos de cáncer en donde se han reportado mutaciones en Smad4 (1, 4, 7, 26). Sin embargo, hacen falta más estudios al respecto.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

SnoN es un importante regulador de las señales del TGF- β . Para cumplir con su función, la expresión de SnoN es regulada por TGF- β a nivel de RNAm y de proteína. SnoN mantiene reprimidos a genes blanco de las Smad en ausencia del ligando, pero TGF- β induce la degradación de SnoN unos minutos después de la estimulación e induce un incremento en los niveles de su RNAm y de su proteína posterior a las dos horas del estímulo, para detener la expresión de genes blanco del TGF- β y regresarlos a un estado basal. De esta forma, SnoN participa en un asa de retroalimentación negativa para controlar dicha señal (1, 6, 50).

TGF- β está implicado en la regulación de una serie de procesos celulares, en los cuales la participación de los reguladores de dicha señal, como Ski y SnoN, es transcendental. El mantenimiento de los niveles de SnoN es primordial en la homeostasis celular y su patrón de expresión parece ser característico en distintos eventos fisiológicos y puede encontrarse alterado (sobrexpresión o disminución de sus niveles) en distintas patologías. Es por ello que se ha descrito la participación de SnoN en diversos eventos celulares como la tumorigénesis, la regeneración hepática, la diferenciación muscular y , la fibrosis renal, entre otros (17, 25, 26, 45, 47).

Ante este panorama resulta interesante saber como el TGF- β modula la expresión del gen *snoN*. Además, es significativo estudiar si su expresión es regulada de forma independiente o dependiente de las Smads, y si a pesar del hecho de que es un correpresor y responde al TGF- β , se regula como otros promotores típicos de respuesta a dicho factor. Recientemente se han reportado algunos aspectos relacionados con el promotor de *snoN* de ratón, sin embargo, es necesario hacer más estudios al respecto que confirmen tales resultados, pero además es fundamental comparar si esta misma regulación sobre la actividad promotora de *snoN* es igual entre el ratón y el humano, o bien si existen diferencias que pudieran repercutir en la función de SnoN y en el control sobre TGF- β .

La caracterización del promotor de *snoN* permitirá entender como está siendo regulada la expresión de SnoN en los diversos contextos celulares en los que hasta ahora se

sabe está involucrado, y reconocer si es posible que mediante su regulación transcripcional, se controlen algunas de sus acciones.

4. HIPÓTESIS

Si en la secuencia del promotor de *snoN* humano se identifican regiones como los SBEs entonces el TGF- β podría regular positivamente la expresión del gen *snoN* humano de forma dependiente del complejo activo de las Smads (S2/4), el cual se uniría a los SBEs localizados en el promotor de dicho gen.

5. OBJETIVOS

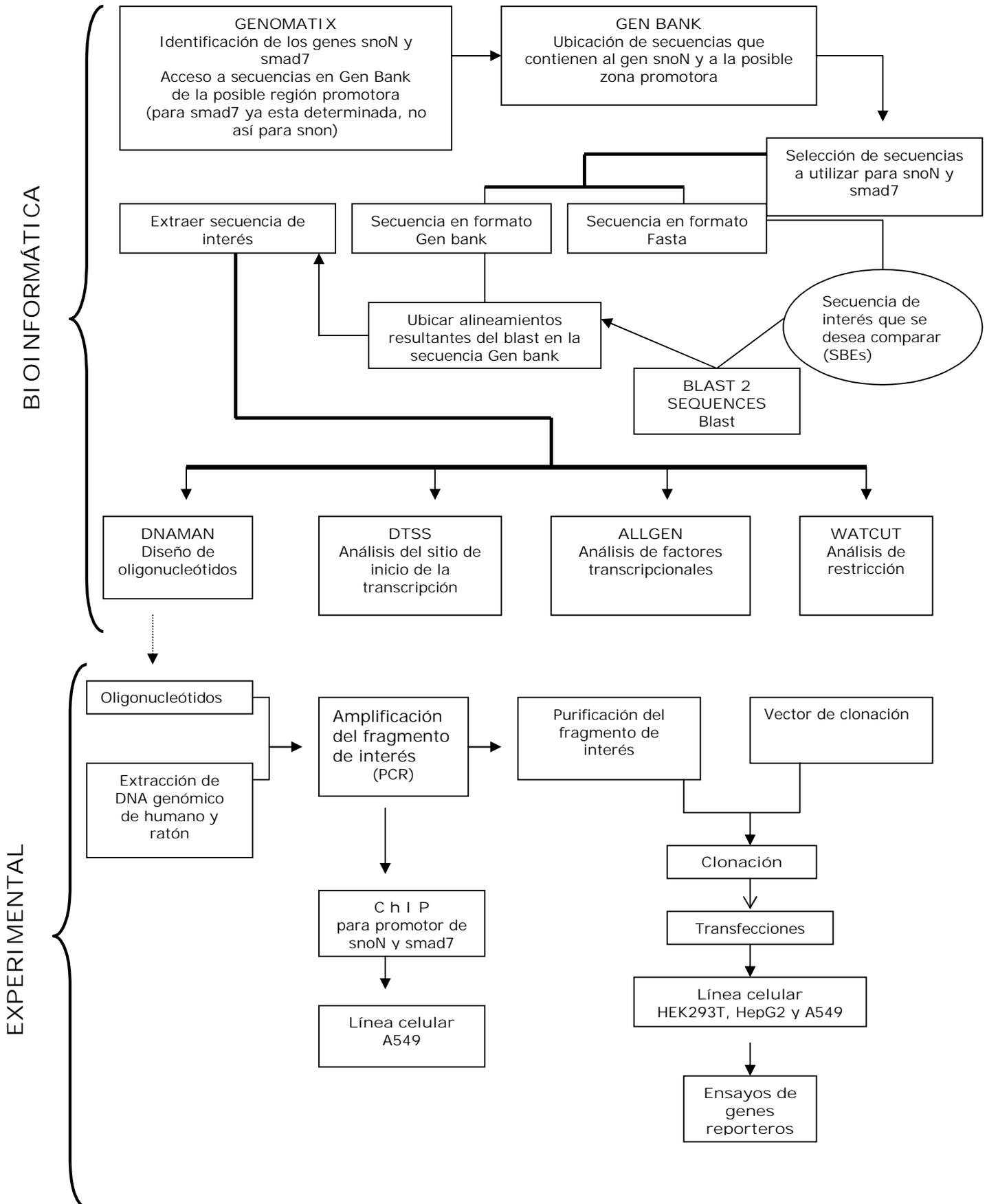
Objetivo general

- ❑ Clonar y caracterizar la región del promotor del gen *snoN* humano que responde al TGF- β .

Objetivos particulares

- ❑ Definir la secuencia promotora del gen *snoN* que contiene las regiones de respuesta a TGF- β .
- ❑ Clonar la región del promotor del gen *snoN* humano que responde al TGF- β y generar un gen reportero en donde esta región promotora regule la expresión de la luciferasa, para analizar la respuesta del promotor *snoN* humano al TGF- β .
- ❑ Establecer posibles sitios de unión de factores de transcripción potenciales para regular la región del promotor del gen *snoN* humano que responde al TGF- β .

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Bioinformática. Análisis de genomas y secuencias

El análisis por bioinformática consistió en la identificación y ubicación del gen *snoN* en el genoma de ratón, de rata y en el de humano, utilizando el software Genomatix. A partir de estos resultados, fue posible la localización y obtención de las secuencias del Gen Bank correspondientes al cromosoma 3, en el cual se encuentra el gen *snoN* de ratón y de humano y en el caso de la rata en el cromosoma 2. Para el ratón se utilizó la secuencia AC117590 y para el humano y la rata se emplearon las secuencias AC073288/ NT_005212 y NW_047625, respectivamente. Posteriormente para delimitar la zona de respuesta a TGF- β se realizó un blast, con el software BLAST2 Sequences, de las secuencias de las clonas mencionadas, y de cada una de las secuencias de los 4 SBEs detectados en la región de respuesta al TGF- β del promotor del gen de *snoN* de ratón reportadas por Luo y cols. De esta forma, se determinó si realmente los SBEs reportados están presentes en el promotor del gen *snoN* de ratón y la presencia o ausencia de éstos en el humano, así como la semejanza y diferencias entre las secuencias de las tres especies. La secuencia del promotor de *Smad7*, se obtuvo directamente del Gen Bank: AF254791, AF167314, [AF156727](#) para el ratón, rata y humano respectivamente.

Con estos resultados fue posible delimitar secuencias más cortas de las regiones promotoras de interés que presentan los SBEs para el ratón y el humano, ya que son las secuencias de interés en este trabajo por responder a TGF- β , y a partir de las cuales, se realizó el análisis *in silico* de posibles factores transcripcionales que pudieran estar involucrados en la interacción de las Smads con el DNA. Para el análisis de factores transcripcionales que se unen al promotor de los genes *snoN* y *smad7*, se utilizaron los programas Genomatix, Consite, y ALGGEN (*Algorithmics and Genetics Group*).

Además, se identificó el probable sitio de inicio de la transcripción en el gen de *snoN*. Para ello, se efectuó un blast con la secuencia del gen que codifica para la proteína SnoN obtenida del Gen Bank y la clona correspondiente. Para el humano se utilizó la secuencia de RNAm U70730.1 y para el ratón U10532.1. Con la misma finalidad, se

utilizó también el programa DTSS HOME (*Data base transcriptional start sites*) y los posibles sitios de inicio de la transcripción fueron comparados.

Se realizó el análisis de restricción, con lo que se escogieron las enzimas de restricción (ER) adecuadas para la clonación de dicho promotor y para la comprobación de los fragmentos esperados de PCR. Además, con base en dichas secuencias que contienen a los SBEs, fue posible el diseño de oligonucleótidos específicos para el PCR. El análisis de restricción se llevó a cabo con el programa WATCUT, y finalmente los oligonucleótidos diseñados fueron analizados por el software DNAMAN, determinando la T_m , la formación de hairpin, el %GC y la longitud de los oligonucleótidos.

6.2 Diseño de oligonucleótidos específicos

Los oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de interés del promotor *snoN* (de 400 y 770 bp para el ratón y de 430 y 670 bp para el humano) por PCR, fueron diseñados con base en la secuencia del promotor del gen de *snoN* que contiene los 4 SBEs, extraída del análisis de bioinformática llevado a cabo. Todos los oligonucleótidos contienen el sitio de restricción para la enzima *KpnI* en el extremo 5', y para la enzima *SacI* en el extremo 3', cuyos sitios de restricción están también presentes en el sitio de multiclonación del vector pGL3-Basic. De esta forma, el sitio de restricción para dichas enzimas se adicionó a los oligonucleótidos con el propósito de que sirvan para la clonación posterior del producto de amplificación. Para la amplificación del promotor de *smad7* se utilizaron los oligonucleótidos S7 sense y antisense, que no tenían ningún sitio de restricción integrado.

6.3 Extracción de DNA genómico

En general, para el desarrollo experimental de este proyecto se emplearon reactivos de la compañía Sigma-Aldrich (se especifica qué proveedor en caso contrario). La preparación de las soluciones empleadas se anexa en el apéndice.

La extracción de DNA genómico se efectuó con solventes orgánicos mediante la técnica fenol-cloroformo modificada (30, 31), a partir de hígado en el caso de ratón y de sangre total para el humano. En el caso del ratón, se extrajo el hígado, se pesó y se agregaron diez volúmenes de amortiguador de lisis por cada gramo de tejido. Se incubó en agitación 2 horas a 37 °C. Se adicionó proteinasa K a una concentración final de 100

µg/ml y se incubó 2 horas a 50 °C en agitación. Se adicionó un volumen de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (Invitrogen) y se mezcló por 5 minutos, y a continuación se centrifugó a 6000 xg a temperatura ambiente por 15 minutos para obtener la fase acuosa, y luego se repitió el procedimiento dos veces más. Se agregó al sobrenadante final, 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100%, y se dejó reposar a temperatura ambiente 30 minutos. Se obtuvo el DNA y se enjuagó con 4 ml de etanol al 70%. El DNA se resuspendió en amortiguador TE y se determinó su concentración y pureza.

En el caso del humano, la sangre obtenida se mezcló con 3.5 mL de anticoagulante (ACD) y se centrifugó 15 minutos a 4 °C. Se obtuvo con cuidado la capa de leucocitos y se transfirió a un tubo para repetir la centrifugación bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se resuspendió en 15 mL de amortiguador de lisis y se incubó 1 hora a 37 °C. Los pasos subsiguientes corresponden a los ya descritos para la extracción del DNA de ratón (30, 31).

6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las diferentes PCRs se realizaron empleando como cebadores a los oligonucleótidos diseñados. Se utilizó 1 µg de DNA genómico por reacción. Se usó el Kit Master mix Taq PCR (Qiagen) para amplificar el gen de *smad7* y para amplificar el gen *snoN* murino y humano se utilizó el kit AccuPrime GC-Rich DNA pol (Invitrogen). El perfil de PCR para cada par de oligonucleótidos fue estandarizado para definir condiciones de amplificación. El programa empleado se muestra en la tabla 3.

PCR Ciclos	<i>smad7</i>	<i>snoN</i> ratón 400 bp	<i>snoN</i> humano/ ratón (670/770)	<i>snoN</i> humano 430 bp
1	5 minutos 95°C	5 minutos 95°C	5 minutos 95°C	5 minutos 95°C
30	1 minuto 95°C	30 segundos 95°C	30 segundos 95°C	30 segundos 95°C
	1 minuto 65°C	30 segundos 58°C	30 segundos 65°C	30 segundos 63.5°C
	1 minuto 75°C	1 minuto 75°C	1 minuto 75°C	1 minuto 75°C
1	5 minutos 75°C	5 minutos 75°C	5 minutos 75°C	5 minutos 75°C
Fin de la reacción	4°C	4°C	4°C	4°C

Tabla 3. Programa utilizado para la amplificación del promotor de *smad7* y *snoN*.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 o 2 %, y se aislaron y purificaron mediante el método de QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Este método consiste en fundir el pedazo de gel de agarosa que contiene el fragmento de interés y mediante una columna que contiene una resina con alta afinidad por el DNA, este ácido nucléico se purifica de la agarosa y otras impurezas, al ser retenido por la columna y finalmente eluido para su purificación.

6.5 Clonación de los promotores del gen *smad7* y del gen *snoN*

El vector de clonación utilizado fue pGL3-Basic (Promega). Este vector se eligió porque está diseñado para el análisis cuantitativo de los factores que regulan la expresión génica en los mamíferos, como son los promotores. El vector pGL3-Basic carece de una región promotora eucariota y de cualquier otra secuencia amplificadora, por lo que es posible clonar secuencias reguladoras de la transcripción hipotéticas. Este vector contiene el gen de resistencia a ampicilina, y una secuencia modificada de cDNA del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* denominada Luc⁺. También contiene un sitio de multiclonación con sitios para las enzimas de restricción *KpnI*, *Sac I*, *Mlu I*, *Nhe I*, *Sma I*, *Xho I*, *Bgl II* y *Hind III* (Fig. 9).

Figura 9. Mapa del vector pGL3-Basic

Con este plásmido se transformó, la cepa DH5 α de bacterias competentes de *E. coli* (Invitrogen). En condiciones de esterilidad se colocaron en un tubo eppendorf 20 μ l de células competentes DH5 α de *E. coli* y 1 μ l del plásmido pGL3-Basic (Promega). Se

llevó a cabo el choque térmico, que consistió en la incubación de 25 segundos a 37 °C, seguido de otra incubación de 2 minutos a 4 °C. Se agregaron 500 µl de medio LB y después de mezclar se efectuó la última incubación de 30 minutos a 37 °C. Las muestras se centrifugaron a 13K rpm 3 minutos. El sobrenadante se eliminó dejando aproximadamente 100 µl, con los cuales se resuspendió la pastilla y posteriormente se sembraron en cajas petri con medio agar LB/amplicilina. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se eligió una de las colonias obtenidas, la cual se inoculó en 150 mL de medio LB/ amplicilina a una concentración de 200 µg/ml y se dejó en agitación toda la noche a 37 °C. La purificación de DNA plasmídico se hizo a través del Plasmid Mini Kit (Qiagen). El vector pGL3-Basic obtenido fue linearizado con las enzimas de restricción correspondientes para la clonación y posteriormente desfosforilado con la fosfatasa alcalina (Roche) para clonar los productos de PCR.

6.5.1 Clonación del promotor de *smad7* humano

La región promotora del gen *smad7* humano que presenta un SBE obtenida por PCR ya purificada, se clonó directamente en el plásmido pCR4 (Topo-cloning TA), de acuerdo con la metodología que recomienda el proveedor. El plásmido resultante se denominó pCR4-TOPO-*smad7*, el cual se sometió a digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, para la liberación del inserto, el cual se subclonó en el vector pcDNA3 y se nombró pcDNA-*smad7*, para posteriormente efectuar su digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*, para liberar el inserto de interés. Dichas enzimas se utilizaron para la digestión del vector pGL3-Basic, que enseguida fue desfosforilado. De esta forma el inserto de *smad7* proveniente de las subclonaciones descritas se ligó finalmente en pGL3-Basic digerido con *KpnI* y *XhoI* para obtener el gen reportero pGL3-*smad7* (Fig. 10).

6.5.2 Clonación del promotor del gen *snoN* de ratón y de humano

Dado que los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *snoN* tenían integrado el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI*, se efectuaron digestiones del producto de PCR purificado y del vector pGL3-Basic con estas enzimas. Los productos de la digestión se purificaron y ligaron con T4 ligasa al igual que los casos anteriores. De esta manera se obtuvo el gen reportero pGL3-SnoN (Fig. 10).

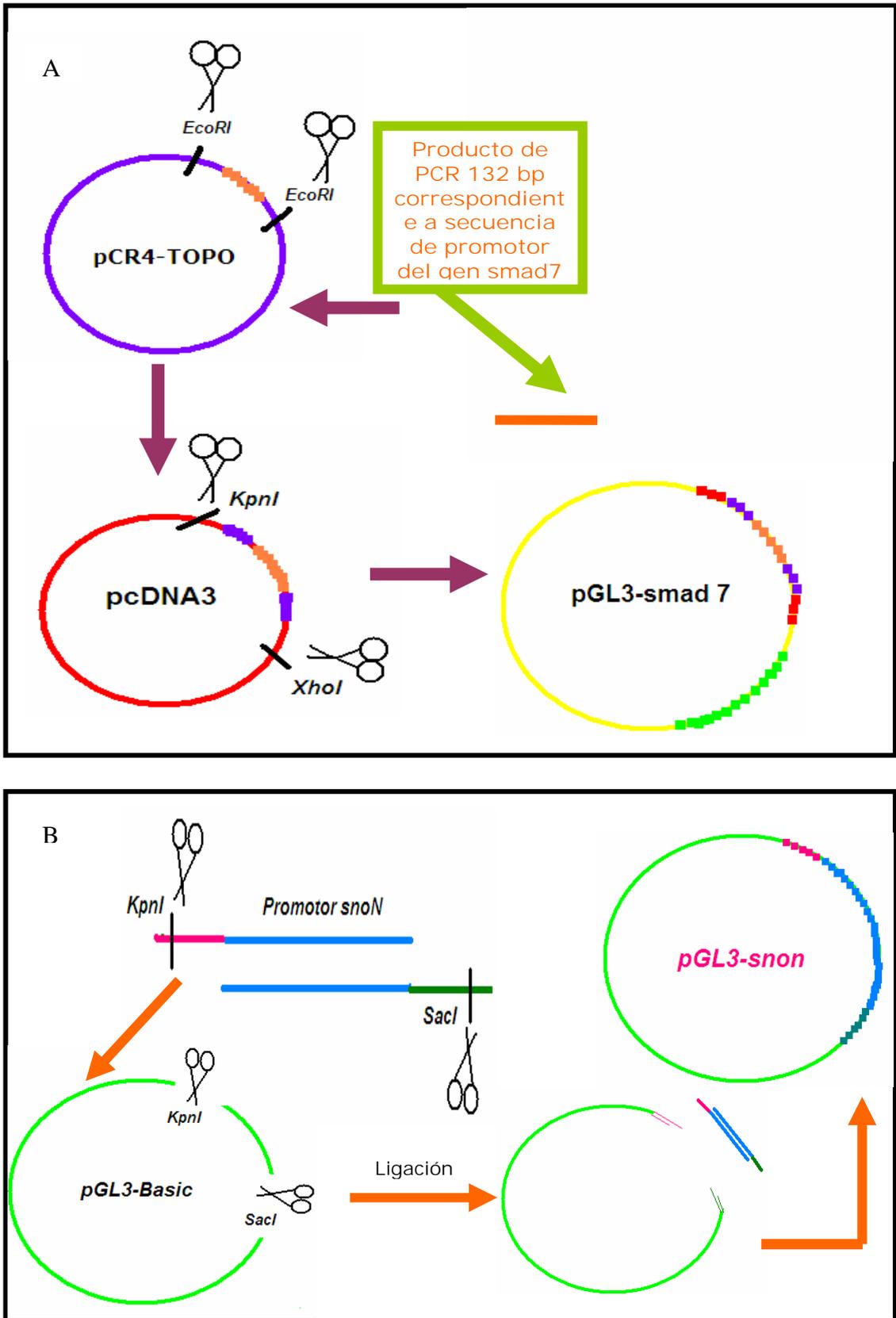


Figura 10. Representación de la estrategia efectuada para clonar al promotor de smad7 (A) y de snoN (B), en el gen reportero pGL3-basic.

6.6 Líneas celulares

Se utilizaron las células A549 (adenocarcinoma de pulmón humano), las HepG2 (hepatoma de humano) y las Hek293T (línea celular de riñón embrionario humano). Las células A549 se cultivaron en medio F12-Ham's (Gibco BRL) y las HepG2 y HEK293T en DMEM (Gibco BRL). En todos los casos el medio se complementó con 10% suero bovino fetal (Multicell, Wisent), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, y las células se cultivaron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Las células se ayunaron 2 horas o una noche previa con 0.2% de suero fetal bovino, con el objetivo de evitar que se enmascare el efecto de TGF-β por los factores de crecimiento del suero. La concentración utilizada de TGF-β fue de 200-300 pM (0.2-0.3nM), excepto en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina donde se utilizó una concentración de 0.5 nM.

6.7 Ensayo de Luciferasa

Para el ensayo de luciferasa, las células A549 y HepG2 fueron transfectadas transitoriamente usando lipofectamina (Invitrogen) y por el método de fosfato de calcio respectivamente. Los plásmidos transfectados incluyen a los genes reporteros de la luciferasa, uno bajo el control de una región del promotor de *smad7* que contiene al SBE de 132 bp, y otro con una región del promotor de *snoN* de 400 y 770 bp que contiene cuatro SBEs en el caso del ratón y de 430 y 670 bp para el humano, clonados para el desarrollo de este trabajo. Para estos ensayos, las células se cotransfectaron con los plásmidos que contenían al gen de la β-galactosidasa bajo el promotor CMV (pCMV-βgal) que sirvió para normalizar la actividad de luciferasa.

6.8 Inmunoprecipitación de Cromatina

Preparación de la cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó con las células A549 a un 70 % de confluencia y en ayuno desde una noche previa al experimento. Las células fueron tratadas con formaldehído 11 % a 37 °C por 20 min, con el fin de entrecruzar a las proteínas con el DNA. La reacción se detuvo con la adición de glicina 0.2 M dejando las células en hielo durante 5 min. Las células se recolectaron y lavaron en PBS y se centrifugaron a 2000 rpm. La extracción de núcleos se efectuó al resuspender la pastilla de células con 5 ml de amortiguador de lisis incubando durante 10 min a 4 °C en

agitación, centrifugando a continuación a 2000 r.p.m. La pastilla obtenida se agitó 10 min a 4 °C y se resuspendió en 4 ml de amortiguador 2. La pastilla, conformada por los núcleos de las células, se resuspendió con 3 ml de amortiguador 3. En el amortiguador 3 se sonicó 10 veces en hielo, con ciclos de 30 s de sonicación y 1 min de descanso, con una potencia del sonicador Fisher Sonic Dismembrator 300.

La cromatina obtenida se preincubó con 30 µl de proteína G bloqueada previamente como se indica en el apéndice, mezclándola toda la noche a 4 °C. Al otro día se centrifugó a 13,200 rpm, y se transfirió el sobrenadante (cromatina “limpia”) a un tubo nuevo, y después se guardó a -70 °C, o se continuó con el protocolo.

Inmunoprecipitación de cromatina

Con la cromatina “limpia” se realizó la inmunoprecipitación de proteínas de interés, utilizando 250 µl de cromatina, 250 µl de amortiguador de precipitación y 5 µl del anticuerpo correspondiente. Se reservaron 100 µl de cromatina en un tubo adicional por cada condición experimental, para cuantificar la cantidad inicial de cromatina (input). Esta mezcla se incubó toda la noche a 4 °C en agitación, al día siguiente se agregaron 20 µl de proteína G y se incubó a 4 °C durante 3 h en agitación.

Las muestras se centrifugaron a 13,200 r.p.m por 10 s, se eliminó el sobrenadante y se agregó el amortiguador de lavado, lavando las perlas 7 veces. La pastilla de proteína G se resuspendió en 100 µl de TE y se agregó también 1 µl de RNasa, 5 µl de SDS 10 % y 1 µl de proteinasa K a 20 mg/ml. Las muestras se incubaron a 55 °C por 3 h, después se cambió a 65 °C y se incubó toda la noche.

Recuperación del DNA

Las muestras se centrifugaron 5 s a 15 000 r.p.m. y se recupera el sobrenadante, al cual se añadió 1 vol de fenol-cloroformo-isoamílico y se agitó por 10 s, y se centrifugó a 13,200 r.p.m. a temperatura ambiente por 5 min. La fase acuosa se trató agregando 1 volumen de cloroformo y nuevamente se centrifugaron a 13 200 r.p.m. a temperatura ambiente por 5 min. La capa acuosa obtenida se recuperó y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -70°C

por 30 min. La pastilla de DNA se resuspendió en 20 μ l de H₂O y se guardó a -20 °C, hasta su uso.

PCR

Las muestras de DNA obtenidas se amplificaron con las condiciones antes descritas para el promotor de *snoN* y *smad7*. Las muestras se corrieron en un gel nativo de acrilamida al 6 %, y al finalizar la corrida se tiñó con bromuro de etidio. Al gel se le tomó una fotografía bajo luz ultravioleta, para identificar las bandas correspondientes al producto de interés.

7. RESULTADOS

7.1 Bioinformática

7.1.1 Obtención de las secuencias del promotor de *snoN* de humano y de ratón que responden al TGF- β

La caracterización del gen *snoN* se realizó empleando las secuencias del Gen Bank y el programa Genomatix. Este análisis mostró que el gen *snoN* se localiza en el cromosoma 3 en el caso del humano y del ratón y en el cromosoma 2 para la rata.

Para delimitar la zona promotora del gen *snoN* de ratón que contiene a los SBEs, se llevó a cabo el alineamiento de cada SBE reportado con la clona AC117590 de ratón que contiene la secuencia del cromosoma 3. Como se esperaba, se localizaron los 4 SBEs reportados para el promotor del gen *snoN* de ratón. Sin embargo es importante señalar que aunque Luo denominó a cada una de estas regiones como “SBE”, en realidad estas son regiones de respuesta a Smad y cada una de ellas presenta dos sitios consenso de unión a Smad, es decir 2 SBEs, con excepción de la tercera secuencia que presenta 1 SBE. No obstante manejando su misma terminología, en este trabajo se denominó a cada una de estas secuencias como SBEs.

La región del promotor del gen *snoN*, que contiene los SBEs, obtenida del análisis bioinformático para el ratón y para el humano respectivamente se muestra en las figuras 11, 12 y 13.

Usando estas secuencias SBEs reportadas para el ratón, se efectuaron alineamientos simples con las secuencias donde se localizaba el gen *snoN* de interés para el humano y rata. Se realizó además el alineamiento múltiple de las posibles secuencias promotoras del gen *snoN* de ratón, humano y rata. De esta manera fue posible delimitar la región promotora del gen *snoN* de humano, ratón y rata responsiva a TGF- β las cuales no han sido reportadas. Este análisis demostró por tanto que los SBE son secuencias altamente conservadas en estas especies.

Las regiones promotoras obtenidas para cada especie, a través del reconocimiento de SBEs muestran entre sí una gran similitud. El SBE4 es igual para las tres especies, mientras que el SBE2 es igual para ratón y rata. Los SBE1 y 3 difieren en algunas bases

como se observa en la tabla cuatro, estas diferencias se presentan en algunas bases que no intervienen con el sitio consenso de unión a las Smads (SBEs). En seguida se muestra la tabla comparativa de los SBEs de ratón, rata y humano (Tabla 4).

Luo y cols, reportan una región de 400 bp que contiene a los SBEs. Los análisis que nosotros hemos llevado a cabo señalan que el fragmento que contiene a los SBEs reportados corresponde a una región de 340, 349 y 325 bp en el caso del ratón, la rata y el humano respectivamente. Las posiciones de los SBEs en las secuencias promotoras son similares para ratón y rata, y diferente sólo para el SBE3 del humano, el cual se localiza aproximadamente 20 bp río arriba de alineamiento múltiple donde está el SBE3 ratón. Esto se debe a que la región que comprende a los SBE en el caso del humano es menor (325 bp) que la de ratón y de rata (340 bp).

Especie		Secuencia 5'-3'	#	%
SBE1	H	atcctgtctg cg ccggg tg caccgcagacag cg ccg	36	92
	R	atcctgtctg cg ccggg -- caccgcagacagt g ccg	34	94
	M	atcct GTCT g agccggg -- caccgc AGAC ag cg ccg	34	100
SBE2	H	ccagc tt cccagacggcgcgc g ggg	25	88
	R	ccagc cg cccagacggcgcgc g ggg	25	100
	M	ccagc cg ccc AGAC ggcgc GCC ggg	25	100
SBE3	H	ccacaataggccagacggc a cgcgcg	26	96
	R	ccacaataggccagacggc g cgcgcg	26	100
	M	ccacaataggg CAGA cggc g cgcgcg	26	100
SBE4	H	cggccggagacggcggcggcgtctg cg ggga	30	100
	R	cggccggagacggcggcggcgtctg cg ggga	30	100
	M	cggccgg AGAC ggcgc GcggcGTCT g cg ggga	30	100

Tabla 4. Comparación de la secuencias SBEs de ratón y de humano. La tabla muestra las secuencias SBEs de ratón (M), rata (R) y de humano (H). En amarillo se resalta a la(s) base(s) diferentes en los SBEs entre ambas especies. # indica el número de bases de cada SBE. "%" es el porcentaje de similitud entre ambas secuencias SBEs que como se observa es de 88-100%. En mayúscula se muestran las bases mutadas por Luo, que afectan la unión de Smads a SBEs en geles de retardo (EMSA). Las diferencias entre los SBEs de estas dos especies son mínimas, y están presentes en zonas que aparentemente no interaccionan con las Smads. Luo, definió a estas regiones como SBE1,2,3,4 pero en cada una de estas regiones presenta 2 sitios consenso SBEs, excepto la región 3 que sólo presenta 1 SBE (mayúsculas azules).

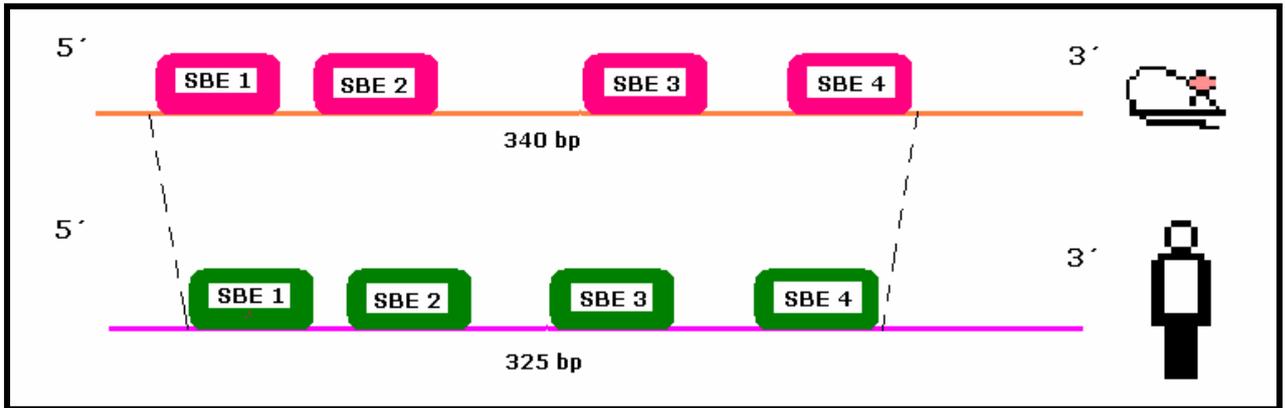


Figura 11. Comparación del promotor del gen *snoN* de ratón y de humano. Existe una alta similitud entre ambos promotores y los SBEs se encuentran altamente conservados entre estas especies. Hay 4 SBEs para el ratón (arriba) y el humano (abajo). El fragmento de la secuencia que contiene a los SBEs es de aproximadamente 340 para el ratón y 325 para el humano. La distancia entre una y otra SBE es diferente entre ambas especies.

Mediante alineamientos de dos secuencias fue posible localizar al SIE reportado en el promotor de *snoN* de ratón, pero también en el caso del humano y rata, teniendo una similitud de 93% y 100% respectivamente.

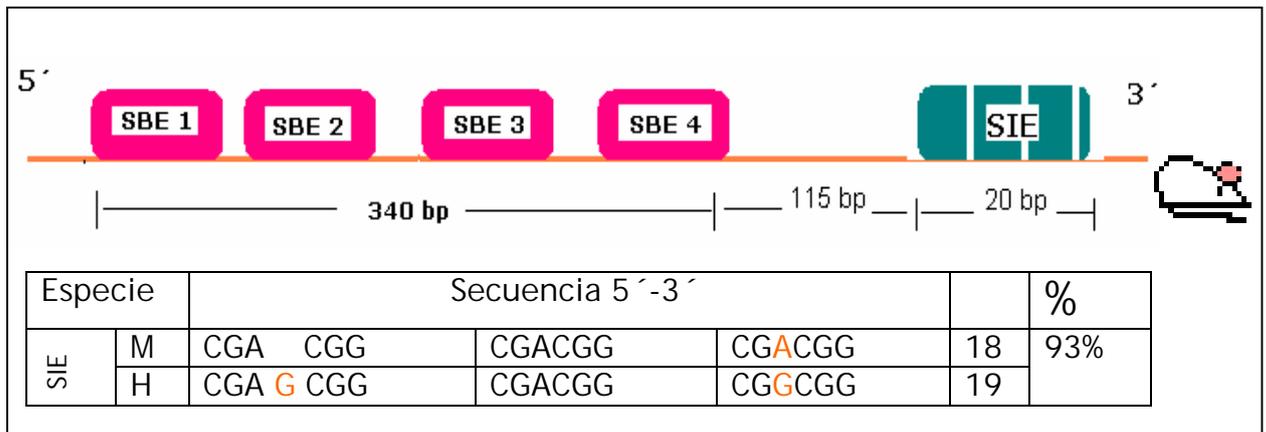


Figura 12. Localización del SIE en el promotor de *snoN* de ratón y su similitud en el humano

M GCGG-----CCCCAGACAGCCGGCTGAGCGACTCGAGGAAGGAAGGAGGG-----
R NNNN-----NNNGAGGG-----
H CGCGGGCGGTGCCCCAGACAGCCGGCTGGGCGACTAGAGGAAGGAAGGAGGGAGGGCGG

SBE1

M CGGCGGGGTGGGGCCG--AGGGAACATCCTGTCTGAGCCGGG--CACCGCAGACAGCGC
R CGGCGGGGTGGGGCCG--AGGGAACATCCTGTCTGCGCCGGG--CACCGCAGACAGTGC
H CGGTGAGGGTGGGGTGGGAGGGAACATCCTGTCTGCGCCGGGTGCACCGCAGACAGCGC
*** * ***** * ***** ***** ***** ***** * *

M CGTGCGCCAGCCGCCAGACGGCGCGCCGGGCCAGC---AGCGCGGGGTACGCGCGAG-
R CGTGCGCCAGCCGCCAGACGGCGCGCCGGGCCAGCCAGCAGCGGGGCACGCGCGGGA-
H CGCGCGCCAGCTTCCCAGACGGCGCGGGGCCAGA---AGCGCGGGCGCGCCCTG-
** ***** ***** ***** ***** ***** ** * *

SBE2

M GGGGGCGGGGAGCGGGAG-----CACGCGCTGCGCGGCCGAGGCCAGGCGCGCG
R GGGGGCGGGGAGCGGGAGACCGCGCACGCGCTGCGCGCGGAGGCACCAGGCGCGCG
H GGGGAGGGG-----CACGCGCGGAGACGCGGGGCCAGGGGGCGG
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

M CCCCAGTTCGGGCTGGGGACGCGCGCGCAGCCTGCA-GTGTGC-AGCCCGCCGGGAGCCA
R CCCCAGTTCGGGCTGGGGACGCGCGCGCAGCCTGAA-GCGCGC-AGCCCGGAGGAGCCA
H CTCTGA--GGAGCCACAATAGGCCAGACGGCACGCGCGTCCACGAGGGGGCCGGGAGCCG
* *

SBE3

M CAATAGGCCAGACGGCGCGCGCGCCCGAGGGGCTGGCTGGCGCGGGGCCGCG-CGGCGCC
R CAATAGGCCAGACGGCGCGCGCGCTCGAGGGACTGGCTGGCGCGGGGCCGCG-CGGCGCC
H CGAAGTGGC-GGCGCG--GCGAC--GACGCGCGCGGGCCCGCGCGCGCGCGCC
* *

M GCTGGCTTCGTTCCCT-CCCCTCCCCGCCC-GCCGCCCTCGTGTCCCCGGGCGGCCG
R GCTGGCTTAGTTCCCT-CCCCTCCCCGCCC-GCCGCCCTCGTGTCCCCGGGCGGCCG
H GCTGGCTTCGTTCCCTTCCCCTCCCCCTCCCCGCGCCCTCGTCTCCCCGGGCGGCCG
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

M GAGACGGCGCGCGCTGCGGGAAGCCGTGT--CTCCGAGTGACGTGGGCGGGCCGCG
R GAGACGGCGCGCGCTGCGGGAAGCCGTGT--CTCCGAGTGACGTGGGCGGGCCGCG
H GAGACGGCGCGCGCTGCGGGAAGCTGTGTGTTCCGAGTGACGTGGGCGGGCCGAG
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

SBE4

M GGCCGGGTGACGTCAGAGG-CTGTGTGTAGCGATGTGTGTGGGGTTCGGAGCGGCGCCGG
R GGCCGGGTGACGTCAGAGG-CTGTGTGTAGCGATG-GTGTGGGGTTCGGAGCGGCGCCGG
H GACTCGGTGACGTCAGAGGGCTGTGTGTAGCGATGTGTGTGGGGTTCGGAGCGGCGCCGG
* * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

M CACAGC-GAAGGCGGCTGGCGAGCGACGGCGACGGCGACGGCGGGCACAGGTGCGGCCGC
R CACAGC-GAAGGCGGCGGGCGAGCGACGGCGACGGCGACGGCGGGCACAGGTGCGGCCGC
H CACAGCCGAAGGAGCGGGCGAGCGGCGACGGCGGGCGGGCGGGCACAGGTGCGGCTCC
***** ***** ** ***** ** * ***** ***** ***** *****

SIE

M AGGTCGCGAGGG-GACGCGA--GGGGCGTGC GGCCCTCTGGGGCGCTGA-----
R AGGTCGCGAGGG-GACGCGA--GGGGCGTGC GGCCCTCTGGGGCGCTGA-----
H GGCTTACGGCGCGACGCGGGGAGGCGGGGAGGCCAGAGGCGCTCACCTCCTAGGA
* *

M ---GGCGGCGGCGGGGGTATGGGGAGGGCACAGAGCCCGG-GGGTCTGCCCGGGC
R ---GGCGGCGGCGG-GGGGTTATGGGGAGGCCACAGAGCCCGT-GGGCTGTCCGGGC
H CCCCAGCGGCGGACAGGGGCGGTGGGGAATCACAAGCTCGTTCGAGCTTACCCGGGC
* ***** ** * ***** ***** ***** ***** * * * *****

M GCGGAGGGCCTGAGTGGGGCGTCCGGATGCGTGGGGTCCCGGGCGGGTTCGCGGGCAC
R GCGGAGGGCCTGAGTGGGGCGTCCGGATGCGTGGGG-TCCCGGGCGGGTTCGCGGGC--
H ACCGAGG-CCCAGTAGGGGTTTGG-ATGCGCGGG--TCCCGGGTGGGGTTCGCGGGCAG
* *

Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia delimitada de la clona AC_117590, NW_047625 y AC073288 para el ratón, la rata y el humano respectivamente a partir de las SBEs reportadas. En rojo se muestra la región de respuesta al TGF- β para el ratón por contener a los SBEs reportados. En azul se muestra la localización del SBE3 para el humano, el cual es similar al SBE3 de ratón y de rata, pero no se localiza en la misma posición. En distintos tonos verde se muestra el SIE. En amarillo y en gris se muestran las

Se utilizó como control positivo para una serie de experimentos que se muestran a continuación al promotor del gen *smad7*, el cual es otro gen blanco del TGF- β , que presenta un SBE perfecto en su región promotora. En la figura 14 se muestra un alineamiento múltiple de 132 bp del promotor de *smad7* de ratón, rata y humano, en el que se observa su similitud y la conservación del SBE entre estas especies.

RATON	TAGAAACCCGATCTGTTGTTTGCGAAACACAATCGCTTTTTTTTTTTTTT--AAAGCGACA	58
HUMANO	TAGAAACCCGATCTGTTGTTTGCGAAACACAATCGCTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCGACA	60
RATA	TAGAAACCCGATCTGTTGTTTGCGAAACACAATCGCTTTTTTTTTTTTTT--AAAGCGACA	57

RATON	GGGTGTCTAGACGGCCACGTGACGAGGCCGGAGCCGGGCGCGC- ACTGCGCAGT GGAACC	117
HUMANO	GGGTGTCTAGACGGCCACGTGACGAGGCCGGAGCCGGGCGCGCCACTGCGCAGT GGAACC	120
RATA	GGGTGTCTAGACGGCCACGTGACGAGGCCGGAGCCGGGCGCGCCACTGCGCAGT GGAACC	117

RATON	AGCCGAGCAGAGG	130
HUMANO	AGCCGAGCAGAGG	133
RATA	AGCCGAGCGGAGG	130

Figura 14. Región promotora del gen *smad7* de 132 bp.

Este promotor se utilizó como control positivo por ser un gen blanco de *Smads* y por conocer como se regula por TGF- β . En este alineamiento se observa la conservación de la secuencia promotora entre las distintas especies.

7.1.2 Análisis de restricción

Mediante el análisis de restricción de las regiones promotoras se eligieron las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* para ser utilizadas en la clonación del promotor *snoN*, para no cortar la región que contiene a los SBEs y para tener un sitio de corte en la zona de multiclonación del plásmido pGL3-Basic que se utilizará como vector de clonación. También se seleccionaron diferentes enzimas de restricción (tanto para el ratón como para el humano) capaces de cortar la secuencia que contiene a los SBEs, para emplearla en ensayos de digestión de los posibles fragmentos de interés que se obtengan, y con el fin de demostrar que es el fragmento buscado a través de los fragmentos generados de la digestión, así como para descartar que se trate de otro fragmento aparentemente del mismo tamaño.

7.1.3 Diseño de oligonucleótidos

Con base en la secuencia del promotor *snoN* de humano y de ratón, obtenida como se describió anteriormente, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos para la región que comprende a los SBEs (Fig 15 y tabla 5).

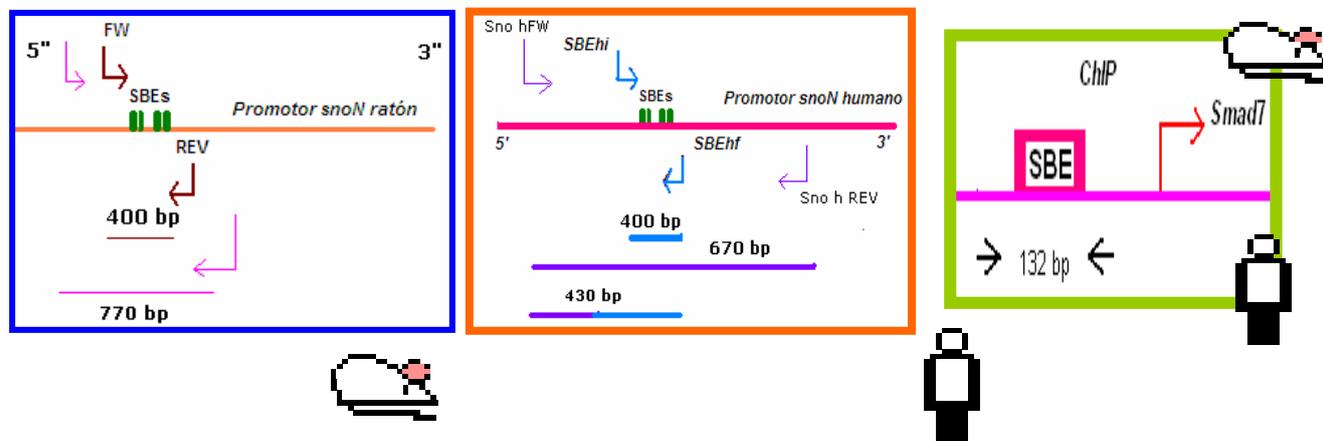


Figura 15. Esquema de los diferentes pares de oligonucleótidos empleados para amplificar la región de interés del promotor *snoN* que contiene a los SBEs. En la parte superior se indica el par de oligonucleótidos y en la parte inferior el producto de PCR esperado correspondiente a cada par.

	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm	Producto esperado
R	FW	ATAGGTACCTGGGGCCGAGGGAACAT	26	57	400 bp
	REV	ATAGAGCTCACGTCACTGGCGGAGACA	27	55	
H	SBEhi	CGCGGTACCGCGGTGAGGGTGGGGTG	26	59	400 bp
	SBEhf	CGCGAGCTCACGTCACTGCGGAGACA	26	55	
	Hfw	CGGCGGGGTACCTGGGGACTAGAGGAAGGAA	31	62	670 bp
	Hrev	GGGGAGCTCTCGACGAGCTTTGTGAATTCC	30	63	
H/	S7 sense	CCTCTGCTCGGCTGGTTCCAC	21	62	132 bp
R	S7 antisense	TAGAAACCCGATCTGTTGTTTGCG	24	64	

Tabla 5. Oligonucleótidos sintéticos. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para amplificar la región de SBEs del promotor del gen *snoN* de ratón y de humano. Algunos pares de oligonucleótidos se diseñaron con el sitio de restricción para las enzimas *KpnI* y *SacI* integrado, en los cuales se muestra en naranja la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *KpnI* y en azul para *SacI*. En verde se muestran las bases adicionales para facilitar el ensamble de la *Taq* polimerasa durante la amplificación del DNA. En gris claro se muestran las condiciones de *Tm* de la secuencia del oligonucleótido. Consideraciones: Sitios de reconocimiento para ER (enzima de restricción): *KpnI*= GGTACC. *SacI*= GAGCTC. Se muestran además los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor del gen *Smad7*, utilizado como un control positivo, los cuales sirven para la amplificación para el promotor tanto de humano como de ratón.

7.1.4 Análisis de factores transcripcionales

El análisis de factores transcripcionales (FT), se realizó mediante el programa ALGGEN-PROMO, el cual predice qué factores pueden unirse al DNA, de acuerdo con la similitud que presenta la secuencia problema con la secuencia consenso para un FT determinado. Para validar el empleo del programa ALGGEN-PROMO, inicialmente se buscaron los 4 SBEs reportados (1). El programa identificó los SBEs reportados para ratón con una similitud del 95-80% con el sitio consenso, y se pronosticó la unión de Smad3 y Smad4 en dichos SBEs (Fig 16).

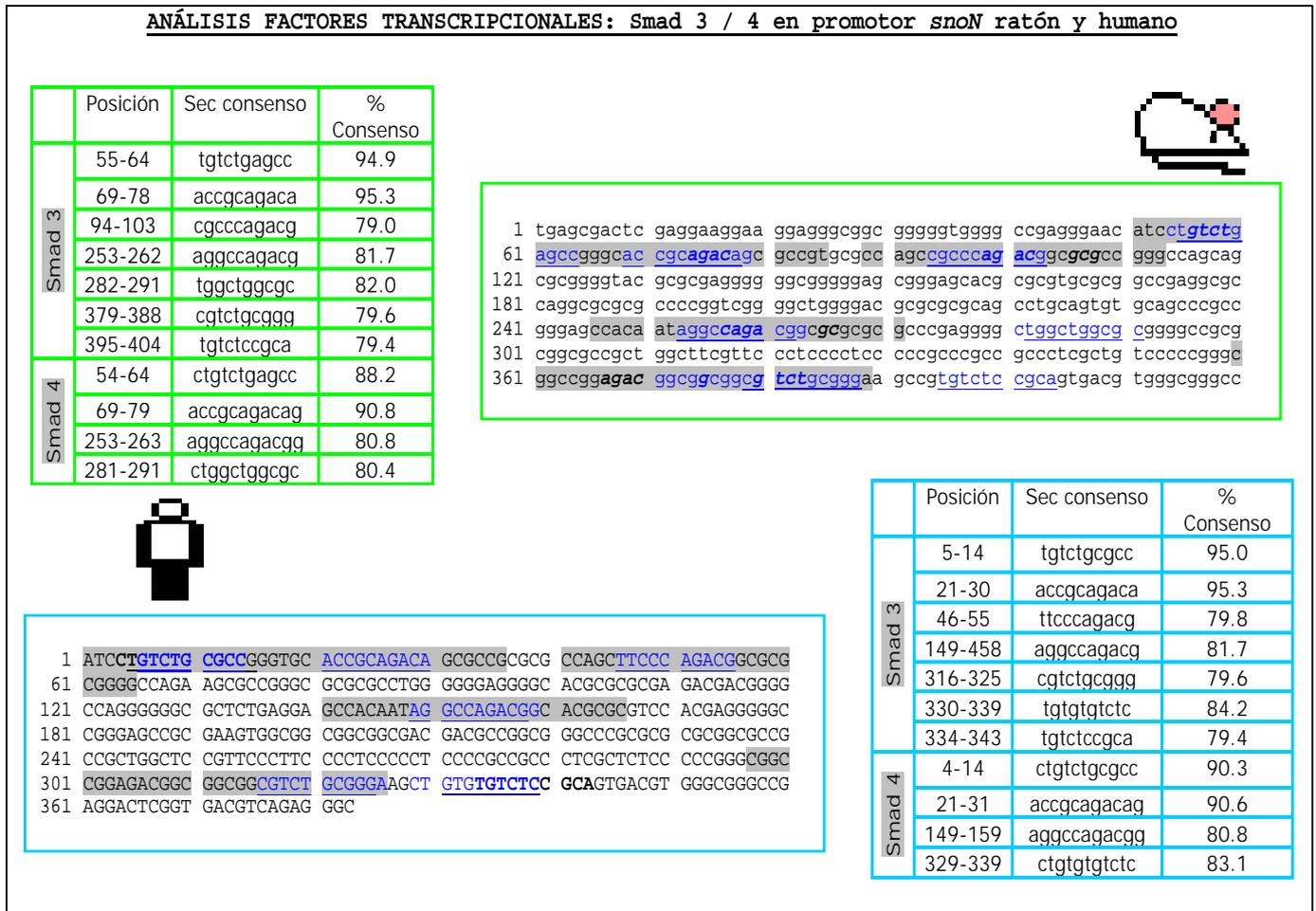


Figura 16. Comparación entre el análisis bioinformático de los SBEs en el promotor de *snoN* de ratón y de humano, usando el programa ALGGEN-PROMO, y la evidencia experimental. En verde se indica el análisis del ratón y en azul el de humano. En el caso del ratón se muestran en gris las secuencias SBEs reportadas por Luo y cols y en azul los SBEs indicados por el programa. En la tabla correspondiente se indica la posición, secuencia y % de similitud de esa secuencia con el sitio consenso establecido para Smad3 y Smad4. Para el humano, se comparan en gris los SBEs identificados mediante blast con los SBEs de ratón y en azul las secuencias consenso identificadas por el programa para la unión de Smad3 y Smad4, como se indica en la tabla correspondiente.

Cabe reiterar que las Smads regulan la expresión de un gen positiva o negativamente, a través de su unión con el DNA y de su interacción con otros reguladores de la transcripción como FT, coactivadores o corepresores. La combinación de interacciones entre las Smads y ciertos FTs da un mecanismo básico para la regulación coordinada de genes específicos. En el caso de *snoN*, que es un gen blanco del TGF- β , no se sabe que FTs están involucrados en el control de su expresión, es por ello la importancia de la predicción de los FTs implicados generada con este programa.

Algunos de los FTs determinados por ALGGEN-PROMO se muestran en la tabla 6. Estos resultados se basan en la similitud mayor o igual al 90% de la secuencia problema con el sitio consenso para los factores transcripcionales mostrados.

La mayoría de los factores transcripcionales mostrados (Tabla 6) han sido involucrados en el control de la expresión de otros genes blanco del TGF- β mediante su asociación con las proteínas Smads o bien por participar en la regulación de procesos de proliferación y diferenciación celular, por lo que entonces podrían también participar en la regulación del gen *snoN* tanto de humano como de ratón, aunque esto debe ocurrir de una forma dependiente del tipo y contexto celular.

Unión de factores transcripcionales al promotor de <i>SnoN</i> de ratón y humano				
Pax-1,2,5,6	Sp1,3	WT1	C/EBP α,β,δ	YY1
NF-kB	Miogenina	MyoD	p53	AhR
RXR- β	VDR	STAT4	AP-2	ATF
Nkx2-1	GR α,β	MF3	NF-1	E2F-1

Tabla 6. FT que potencialmente podrían unirse al promotor de *snoN* de ratón y de humano

Comparación de la unión de factores transcripcionales al promotor de *snoN* de ratón y de humano

Dado que la región promotora del gen *snoN* de ratón y de humano son secuencias con alta similitud en las zonas donde radican los SBEs (Fig 11 y 13), en general, el programa ALGGEN-PROMO pronostica sitios consenso para los mismos FTs (Fig 16), y sólo en algunos casos, se presentan diferencias entre el patrón de FTs potenciales de unión al promotor de *snoN* de ambas especies, principalmente en las secuencias entre los SBEs,

con lo que se comprueba que los SBEs son secuencias conservadas. Considerando lo anterior, la figura 17 muestra los FTs que podrían unirse al promotor de *snoN* y que se encuentran aledaños y/o sobrelapados con los SBEs. Se ha demostrado experimentalmente para algunos de estos FT que interaccionan con las Smads y que controlan la expresión de genes blanco del TGF- β , sin embargo otros de los FT encontrados aun no han sido estudiados (Tabla 7).

FT con evidencia experimental de interacción con Smads	FT sin evidencia experimental de interacción con Smads
YY1	Pax 1,2,5,6
VDR	E2F1
p53	STAT-4
Miogenina	
Sp1	
C/EBP	
MyoD	
NF-kappaB	

Tabla 7. Predicción de FT que se unen al promotor de *snoN* de ratón y/o humano, cuyo sitio de unión es cercano o está sobrelapado con los SBEs.

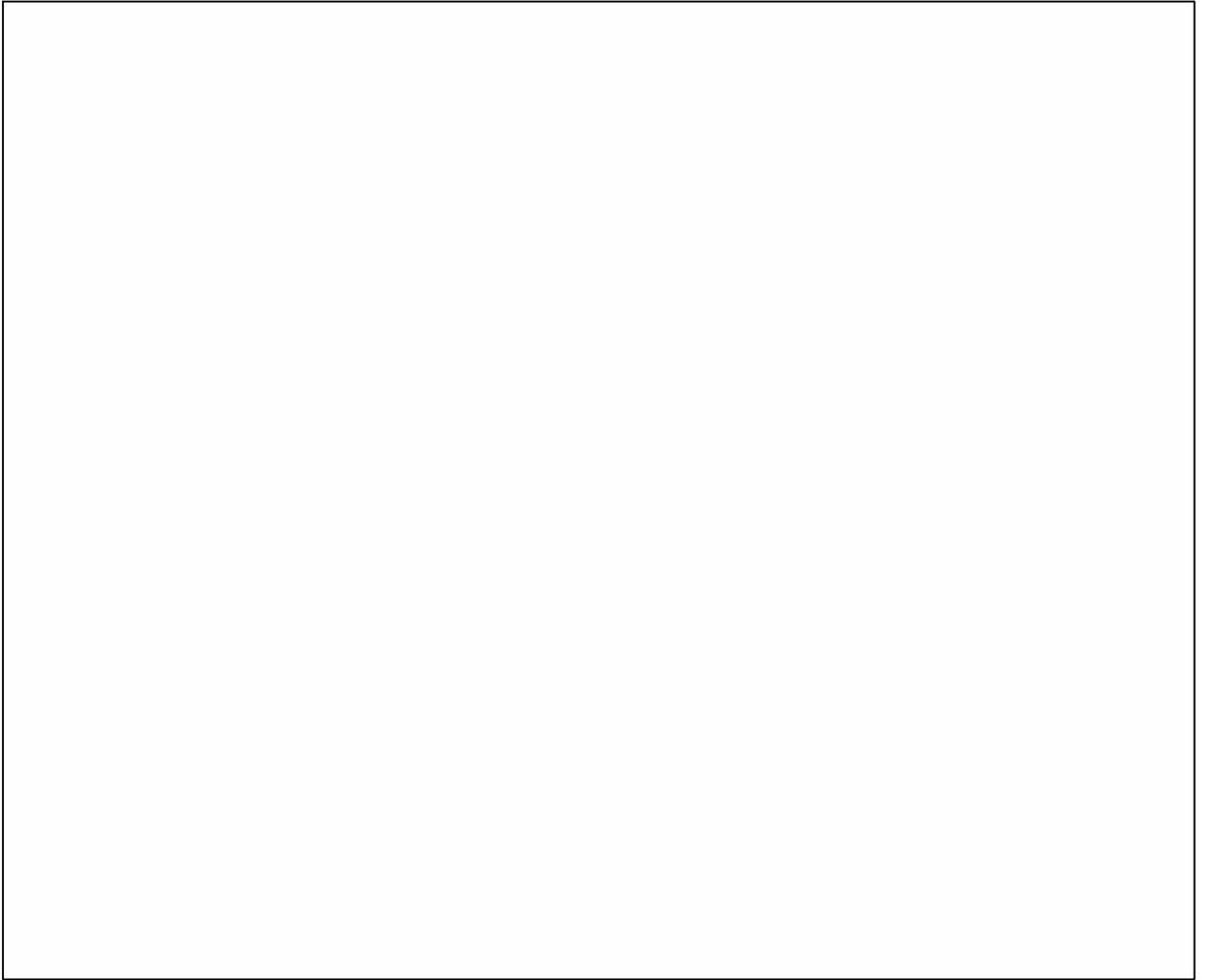


Figura 17. Predicción de FT que pueden potencialmente regular la expresión del gen snoN de ratón y de humano. Cada línea de color corresponde a un FT y se encuentra posicionada debajo de la secuencia que reconoce. Dada la similitud entre el promotor de snoN de ambas especies, la mayoría de los FT que se predicen son iguales en ambos casos.

FTs que se predice se unen al promotor del gen *snoN*, y que además existe una evidencia experimental de su interacción con las Smads.

Dentro de los FTs que se ha probado que interactúan con las Smads, y que se muestran en la tabla 6, se tiene como ejemplo a YY1, que es capaz de reprimir la actividad transcripcional de las Smads de una manera gen específica, y que regula la diferenciación celular inducida por el TGF- β (31).

Por otro lado, la vía de señalización de la vitamina D y el TGF- β se relacionan, ya que sus mediadores transcripcionales: VDR (receptor de la vitamina D) y las Smads respectivamente, requieren unirse a su sitio consenso en el DNA, los cuales se encuentran cercanos en el promotor de *snoN*.

Algunos de estos FTs son clave en procesos cancerígenos como es p53, el cual se ha propuesto que puede cooperar con algunos efectores del TGF- β como las Smads e incluso con SnoN para mediar una modificación de la cromatina y la represión transcripcional de algunos genes (33). También se ha sugerido que la señal del TGF- β vía las Smads podría mediar la apoptosis dependiente de p53 en líneas celulares de hepatoma (43).

Un ejemplo es el caso de C/EBPbeta, que es esencial para la coordinación de la expresión de genes blanco del TGF- β y que su sobreexpresión podría desencadenar una evasión de estas respuestas en cáncer de mama (41). Algunos otros de estos FTs son importantes en la diferenciación celular como es el caso de miogenina y MyoD, que interaccionan con Smad3 y que juegan un papel crítico en la diferenciación miogénica, regulando la expresión de genes específicos de músculo (37, 38, 40).

Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo de comunicación cruzada entre la vía de señalización del TGF- β y la vía de NF- κ B, en donde la activación del receptor tipo I es requerida para la activación del NF κ B y éste coopera con Smad4 para mediar la expresión de genes como *I κ B α* y *smad7*, actuando este último como un regulador que inhibe la actividad transcripcional mediada por la señal del TGF- β y de NF- κ B a través de bloquear la fosforilación de *I κ B α* y la translocación de Smad4 al núcleo (39).

FTs que se predice se unen al promotor del gen *snoN*, pero que no existe una evidencia experimental de su interacción con las Smads.

No se ha demostrado que los FTs como Pax 1, 2, 5 y 6, que se predice se unen al promotor de *snoN*, interactúen con las Smads. La familia de genes *Pax* (paired box) se sabe que son reguladores del desarrollo embrionario y que codifican para FT nucleares que se expresan tempranamente durante la embriogénesis y que están involucrados en organogénesis (principalmente en el SNC). Además, estos FTs normalmente presentan disminuidos sus niveles en el estado adulto. Mutaciones de *pax* se relacionan con enfermedades humanas como el síndrome de Waardenburg y Aniridia, y además están asociados con el desarrollo de cáncer, por lo que se consideran proto-oncogenes (44).

Existen subgrupos de los genes *Pax II* (*Pax2*, *Pax5* y *Pax8*) y *Pax III* (*Pax3* y *Pax7*) que son expresados en una amplia gama de tipos de cáncer, al conferir motilidad celular, sobrevivencia y autosuficiencia en señales de crecimiento. Por otra parte (*Pax1* y *Pax9*) y el subgrupo IV (*Pax4* y *Pax6*) están menos relacionados al cáncer o su expresión resulta ser un indicio de un pronóstico favorable, como se observa para *Pax6* y *Pax9* (40).

Todos los blancos de *Pax* son genes involucrados en procesos de desarrollo, en proliferación, diferenciación, regulación hormonal, organogénesis, adhesión celular y migración. Muchos de ellos, interactúan con otros FT, como p53 (40).

En cuanto a E2F1, se sabe que regula la expresión de genes que participan en procesos de angiogénesis, invasión y metástasis, por lo que se ha considerado que tiene un papel central en muchos aspectos del desarrollo de cáncer. Se ha demostrado que su sobreexpresión conduce a apoptosis solo o en cooperación con p53, para proteger a los organismos del desarrollo de tumores (36).

Los STATs son una clase de factores transcripcionales involucrados en el control del crecimiento celular, diferenciación y respuesta inmune. STAT-4, es un miembro de esta familia, del cual hasta ahora se sabe que es un activador transcripcional que juega un papel importante en la respuesta inmune, al ser activado en respuesta a IL-12 (35).

La importancia de clonar el promotor del gen de *snoN*, para posteriormente estudiar con más detalle su regulación, se justifica una vez más en el hecho de que no existe

evidencia experimental de la participación de otros factores transcripcionales, diferentes a las Smads, en la regulación transcripcional del gen de *snoN* de ratón y de humano.

Por otra parte, la secuencia SIE, también se analizó sin embargo, en este caso pocos son los FTs que se predice que tienen una unión de un 85-100%. Algunos de ellos, se muestran en la figura 18. Cabe señalar que a diferencias de los SBEs, en el SIE de humano y ratón varían los FT, que se predicen como es el caso de Pax-6 para el ratón pero no para el humano y E2F-1 que se predice para el humano pero no para el ratón (Fig. 18).

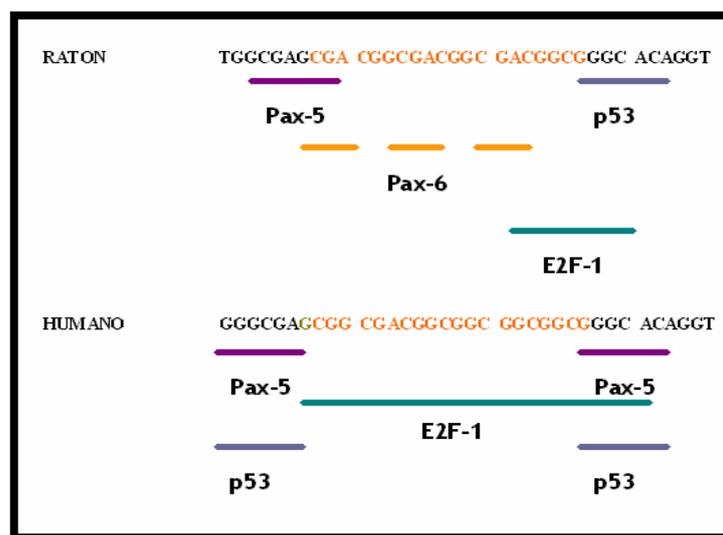


Figura 18. Predicción de FT que pueden potencialmente unirse en la región SIE. Cada línea de color corresponde a un FT y se encuentra posicionada debajo de la secuencia que reconoce. Dada la similitud entre el promotor de *snoN* de ambas especies, la mayoría de los FT que se predicen son iguales en ambos casos.

7.1.5 Análisis del sitio de inicio de la transcripción del gen *snoN*

Para determinar el posible sitio de inicio de la transcripción del gen *snoN*, se efectuó el alineamiento de la secuencia que contiene al promotor del gen de *snoN* (secuencia del cromosoma 3 AC117590 y NC_005412 para el ratón y humano respectivamente) con la secuencia del RNAm maduro correspondiente (U14655 y U70730 para ratón y humano respectivamente). En la fig. 19 se muestran los RNAm reportados en el Genbank para la isoforma *snoN2* de ratón y de humano que se utilizaron para realizar el blast.

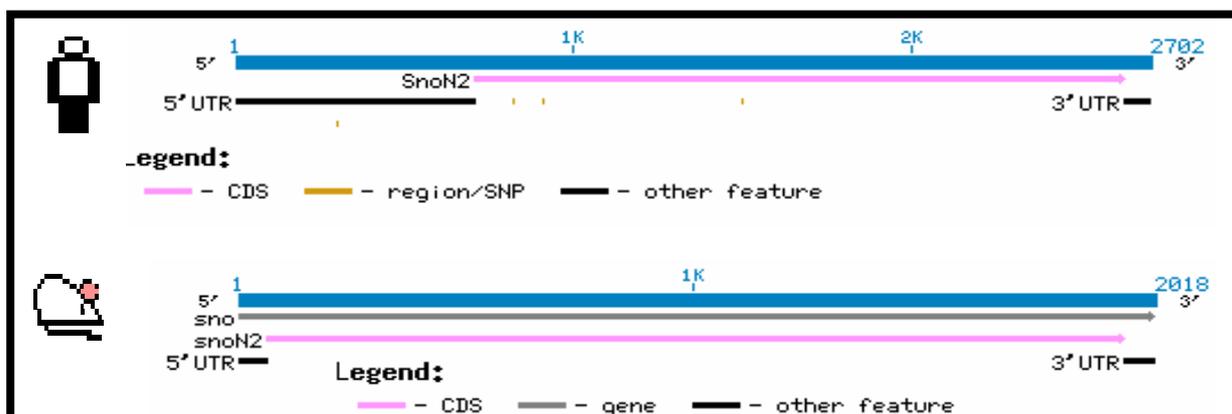


Figura 19. El esquema representa las secuencias de los RNAm del gen *snoN* para humano y para ratón, obtenidas del Genbank, y utilizadas para la determinación del sitio de inicio de la transcripción de este gen. Secuencia Genbank: Humano mRNA U70730. Ratón mRNA U14655.

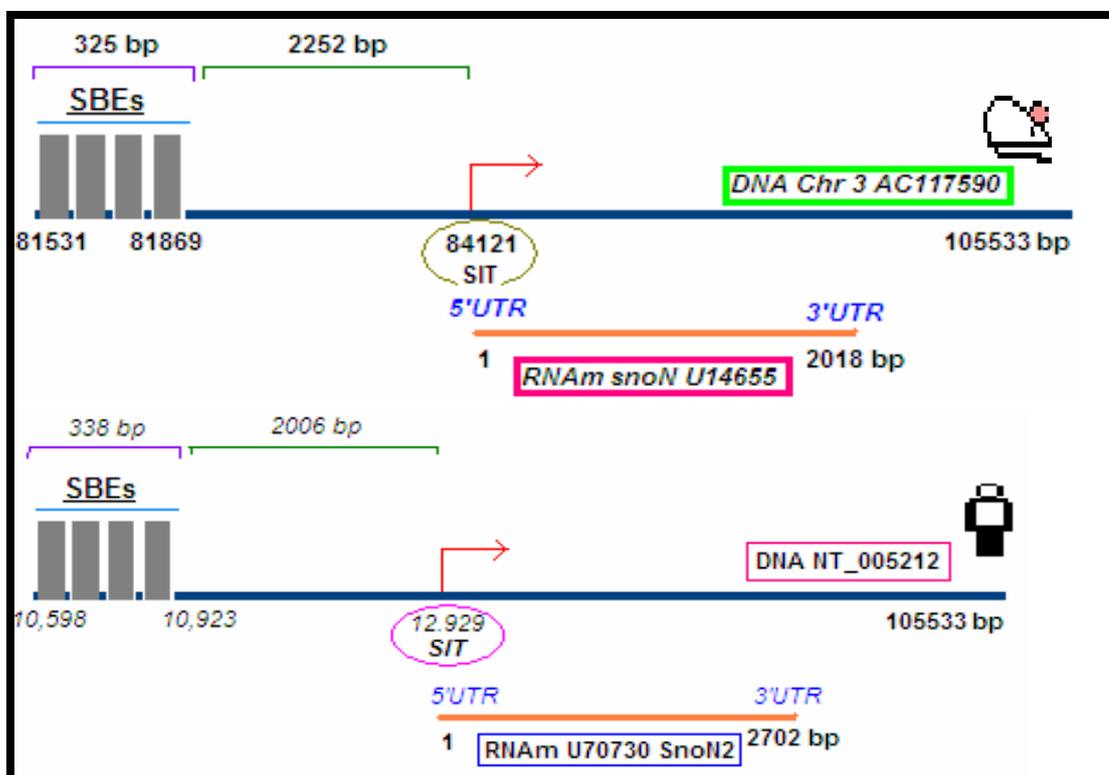


Figura 20. Representación del sitio potencial de inicio de la transcripción.

Se muestra la secuencia del mRNA empleado y la distancia desde donde se alinea con la secuencia AC117590 y NT_005212, que corresponden a la secuencia que contiene al cromosoma 3 donde se localiza el gen *snoN*

Los resultados obtenidos se esquematizan en la figura 20. En el caso del ratón, de acuerdo con lo reportado por Luo y cols, las SBEs se ubicaron a 2800 bp del sitio de inicio de la transducción. Mediante este análisis las SBEs se localizaron a 2577 bp y a 2344 bp del SIT para el ratón y para el humano respectivamente.

7.2 Resultados experimentales

7.2.1 DNA genómico de ratón y de humano.

Se llevó a cabo la extracción de DNA genómico del hígado de ratón y de leucocitos de sangre periférica humana. La concentración del DNA extraído determinada por absorbancia, se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 8. DNA extraído de ratón y humano

Muestra	Concentración	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$
DNA ratón	6.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1.9
DNA humano	0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1.8

Para comprobar la integridad del DNA genómico obtenido, se utilizó una muestra sin digerir y otra digerida con la enzima de restricción *SacI* y se corrió en un gel de agarosa al 0.8 %. En el DNA sin digerir se observó solo una banda sin la presencia de productos de degradación, mientras que en el caso de las digestiones, las enzimas cortaron eficientemente (datos no mostrados).

7.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del fragmento del promotor que contiene las SBEs y/o SIE para ratón y humano

El fragmento del promotor del gen *snoN* que contiene los SBEs y/o SIE para el ratón y el humano se obtuvieron a través de la técnica de PCR utilizando como molde el DNA genómico obtenido.

Para tener un control positivo de los experimentos a realizar, se llevó a cabo la amplificación por PCR de una región de 132 bp que contiene a un SBE del promotor de *smad7*, el cual se sabe por nuestro laboratorio y por otros grupos de investigación que es capaz de responder al TGF- β . La secuencia promotora de 132 bp de ratón, rata y humano de *smad7* presenta una alta similitud, por lo que la amplificación por PCR de este fragmento para las tres especies puede efectuarse con los mismos oligonucleótidos.

Dado que el promotor del gen *snoN* se caracteriza por ser una secuencia rica en GC, y por el hecho de partir de DNA genómico como molde para la realización de la PCR, fue necesario realizar un proceso de estandarización. Para lograr amplificar la región promotora *snoN*, previamente se utilizaron diferentes gradientes de temperatura y diferentes concentraciones de $MgSO_4$, así como DNA genómico digerido y sin digerir como molde, diferentes pares de oligonucleótidos y combinaciones de éstos y distintas enzimas Taq polimerasas, con el objetivo de optimizar las condiciones para la obtención del producto de interés.

En la mayoría de los casos, las amplificaciones por PCR generaban un gran número de productos inespecíficos y en ocasiones bandas que a pesar de corresponder aparentemente al tamaño esperado no eran el producto de PCR de interés. Es por ello que para comprobar que se trataba del producto de interés se efectuó una reamplificación, una PCR anidada, ensayos de digestión y finalmente la secuenciación (Fig 21).

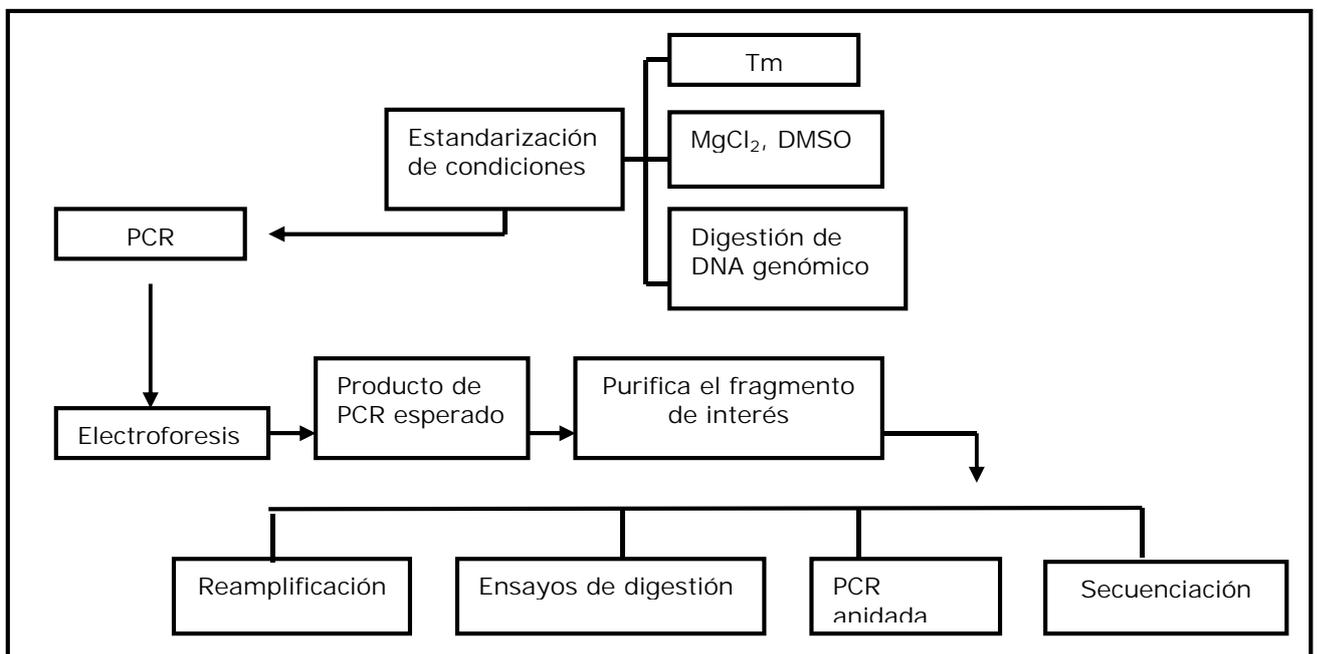


Figura 21. Obtención y comprobación del fragmento promotor de interés.

Los fragmentos del promotor del gen *snoN* de respuesta al TGF- β que se lograron amplificar, mediante la técnica de PCR, para el humano y el ratón se resumen en la tabla 9 y se muestra el producto obtenido por PCR en la figura 23 y 24.

Especie	Tamaño	Región promotora	Gen
Ratón	400 bp	SBE	<i>snoN</i>
	770 bp	SBE+SIE	
Humano	430 bp	SBE	
	670 bp	SBE+SIE	
Ratón/Humano	133/132 bp	<i>SBE</i>	<i>smad7</i>

Tabla 9. Insertos obtenidos por PCR, correspondientes al promotor de *snoN* o *smad7*. Estos insertos fueron clonados en el vector *pGL3-Basic*. SBE= elemento de unión a Smad. SIE= Elemento inhibitorio de las Smads.

Una vez estandarizadas las condiciones, se lograron amplificar a partir de DNA genómico, los fragmentos promotores de *snoN* de ratón y de humano.

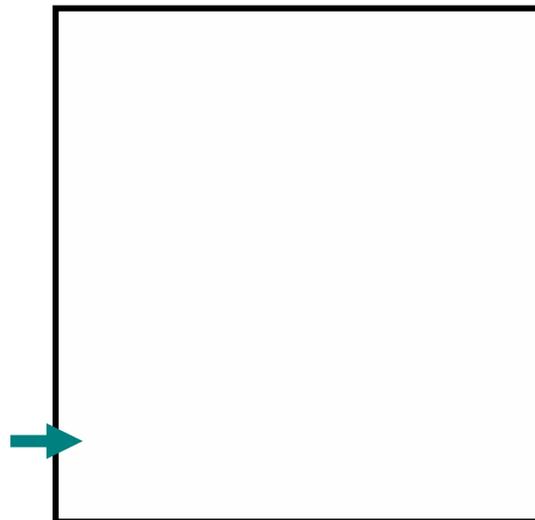


Figura 22. Obtención de la región del promotor de 132 bp *smad7* que comprende a su único SBE de humano y ratón.

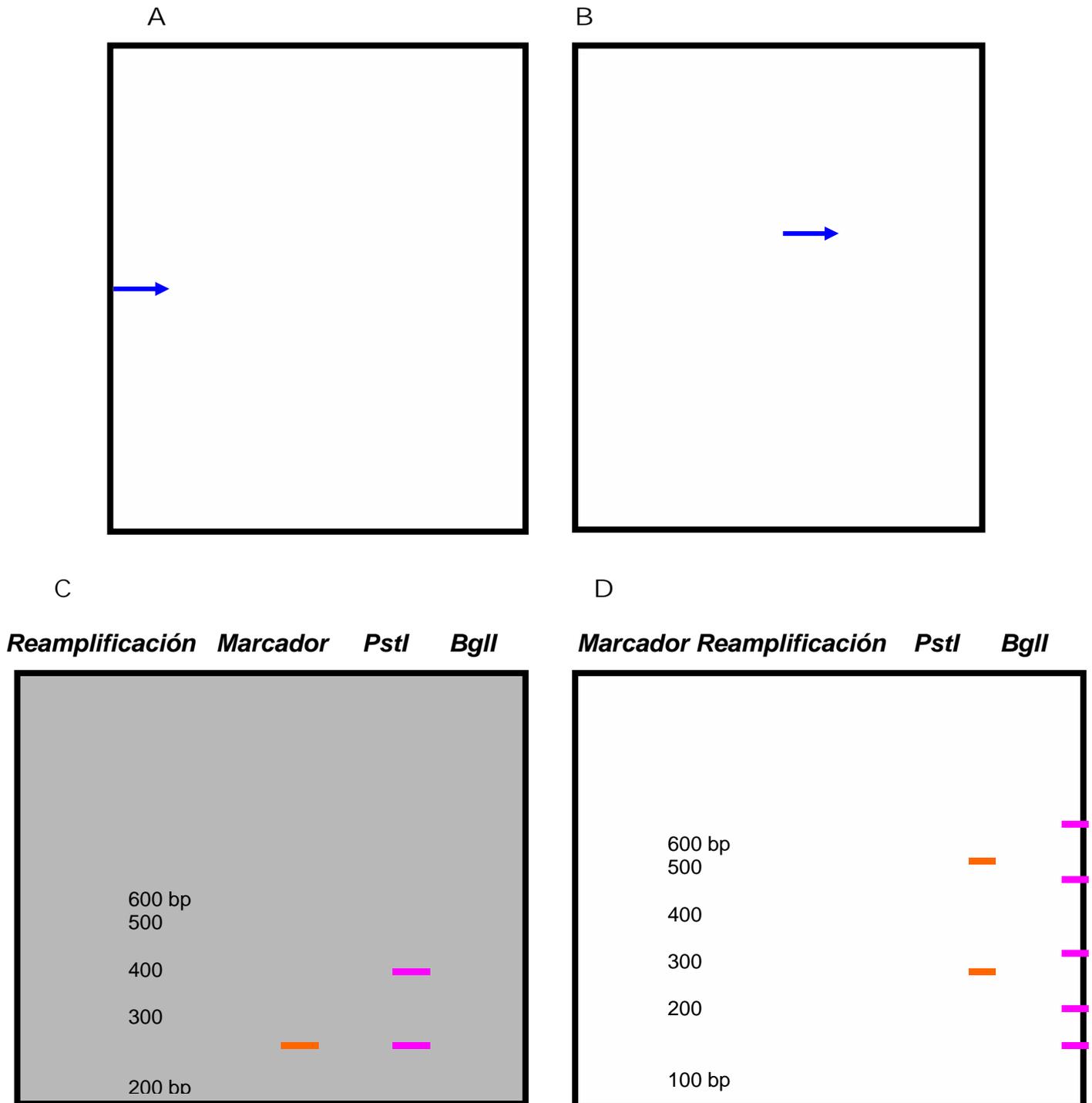


Figura 23. Obtención de la región promotora de *snoN* de ratón a partir de DNA genómico de ratón A y B: Se observó el producto de PCR esperado de 400 bp (A) y 770 bp (B), el cual fue purificado. C y D. Reamplificación del probable producto de interés que fue purificado y ensayos de digestión con ER (*BglI* y *PstI*). Estas ER cortan las secuencias SBEs, por lo que se obtuvieron los productos de digestión esperados, que corresponden al fragmento de interés.

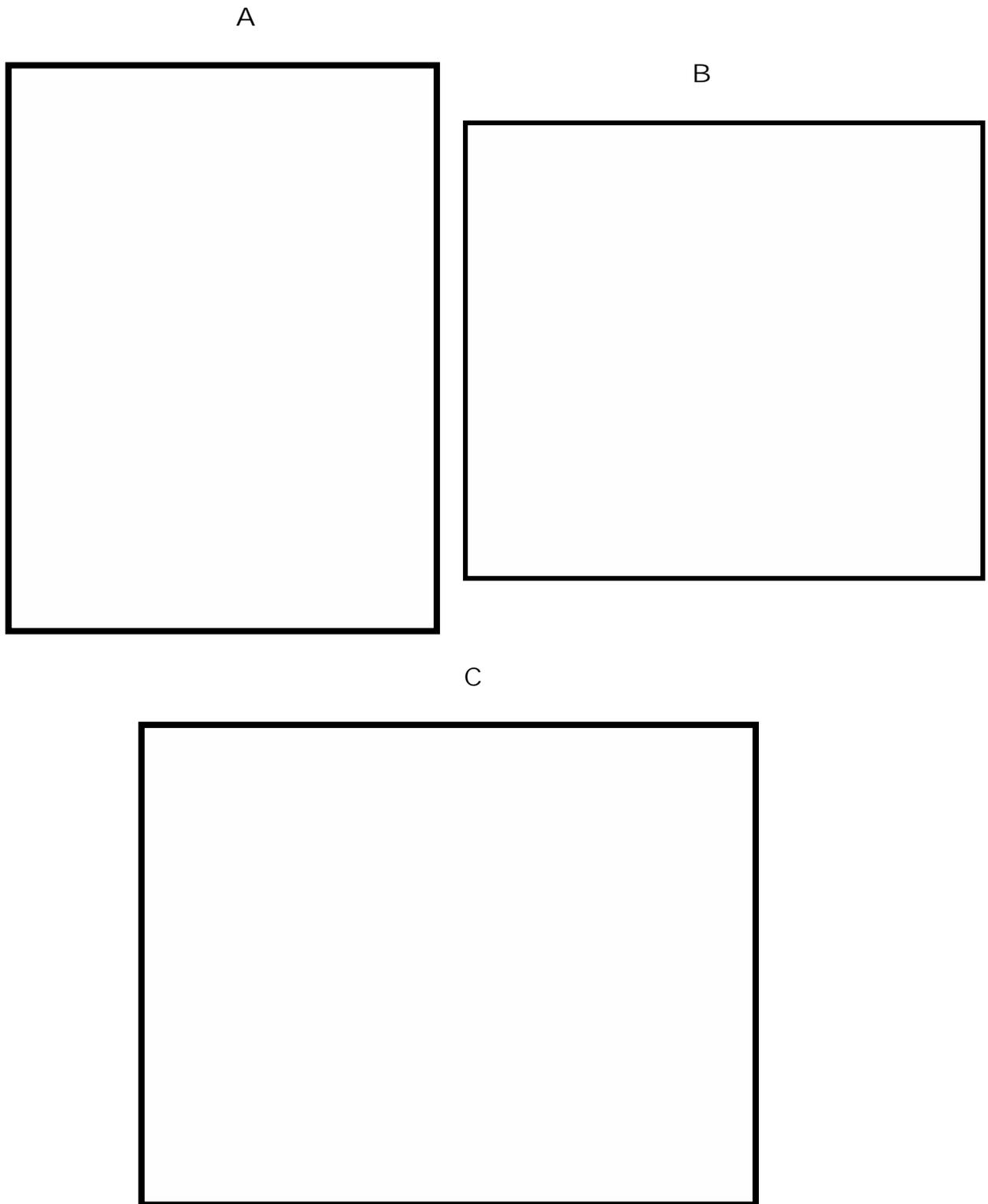


Figura 24. Obtención de la región promotora de snoN de humano a partir de DNA genómico de humano. A: Se observaron los productos de PCR esperados de 430 y 670 bp, los cuales fueron purificados. C. Producto obtenido de la PCR anidada del probable producto de interés purificado. D: Ensayos de digestión con ER (BglI). Estas ER cortan las secuencias SBEs, por lo que se obtuvieron los productos de digestión esperados, que corresponden al fragmento de interés.

7.2.3 Clonación de fragmentos de los promotores *smad7* y *snoN*

Un fragmento del promotor de *snoN* humano y de ratón se clonaron directamente en el vector pGL3-Basic. Dado que los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *snoN* tenían integrado el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI*, se llevó a cabo la ligación de los productos de PCR digeridos con *KpnI* y *SacI* al vector pGL3-Basic con estas enzimas, tanto para el promotor *snoN* humano como el de ratón.

La presencia del inserto en las clonas obtenidas se comprobó por el análisis de PCR sobre clona (Fig. 25). El plásmido purificado de las clonas seleccionadas se sometió a ensayos de digestión con las enzimas de restricción utilizadas para la clonación (*KpnI* y *SacI*) y algunas otras que de acuerdo al análisis bioinformático, eran capaces de cortar la secuencia promotora (*RasI*, *BglI* y/o *PstI*). De esta forma se confirmó la obtención del gen reportero para el promotor del gen *snoN* de ratón y de humano (Fig. 26 y 27).

La región promotora de *smad7* de 132 bp que contiene al SBE obtenida por PCR, se clonó en el vector pCR4 Topo-cloning TA y posteriormente se llevaron a cabo dos subclonaciones, la primera en el vector pcDNA3 y finalmente en pGL3-Basic. En la figura 28 se muestran los resultados de la estrategia de clonación para el promotor de *smad7*.

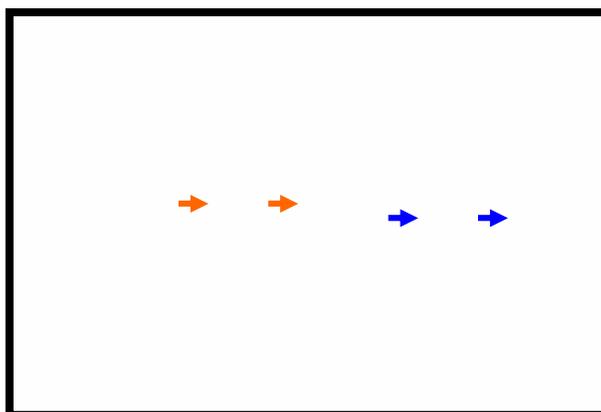


Fig. 25 PCR sobre clona, para la verificación clonas recombinantes con el inserto de interés. En la figura se muestra como ejemplo, la verificación de la presencia del inserto de *snoN* de ratón y humano de 770 y 670 bp respectivamente, utilizando como molde la clona obtenida de la transformación de pGL3-*snoN* correspondiente.

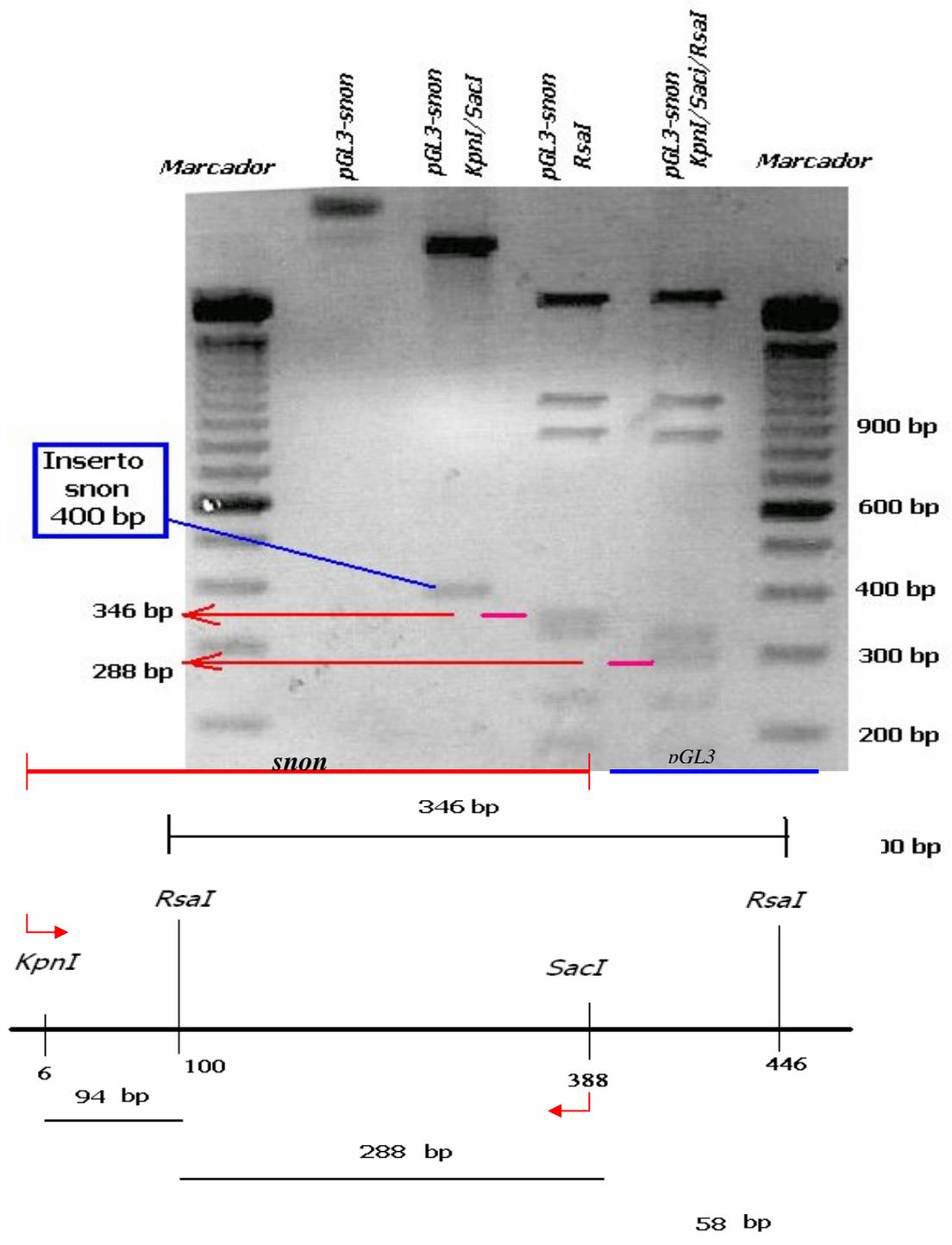


Fig. 26 Comprobación de la clonación del promotor snoN 400bp de ratón en pGL3-Basic mediante ensayos de restricción. Los ensayos con la enzima RsaI, o SacI y KpnI o sin digerir como se observa en la parte superior. El esquema representa al producto de la digestión de pGL3-snon con RsaI. RsaI corta el plásmido y el inserto snoN generando varios fragmentos, entre ellos, uno de 346 bp. Cuando se digiere con RsaI, KpnI y SacI se libera el inserto (por KpnI y SacI, que fueron las enzimas utilizadas para la clonación) y el inserto es cortado por RsaI, generando un fragmento de 288 bp y eliminando la presencia del fragmento de 346 bp.

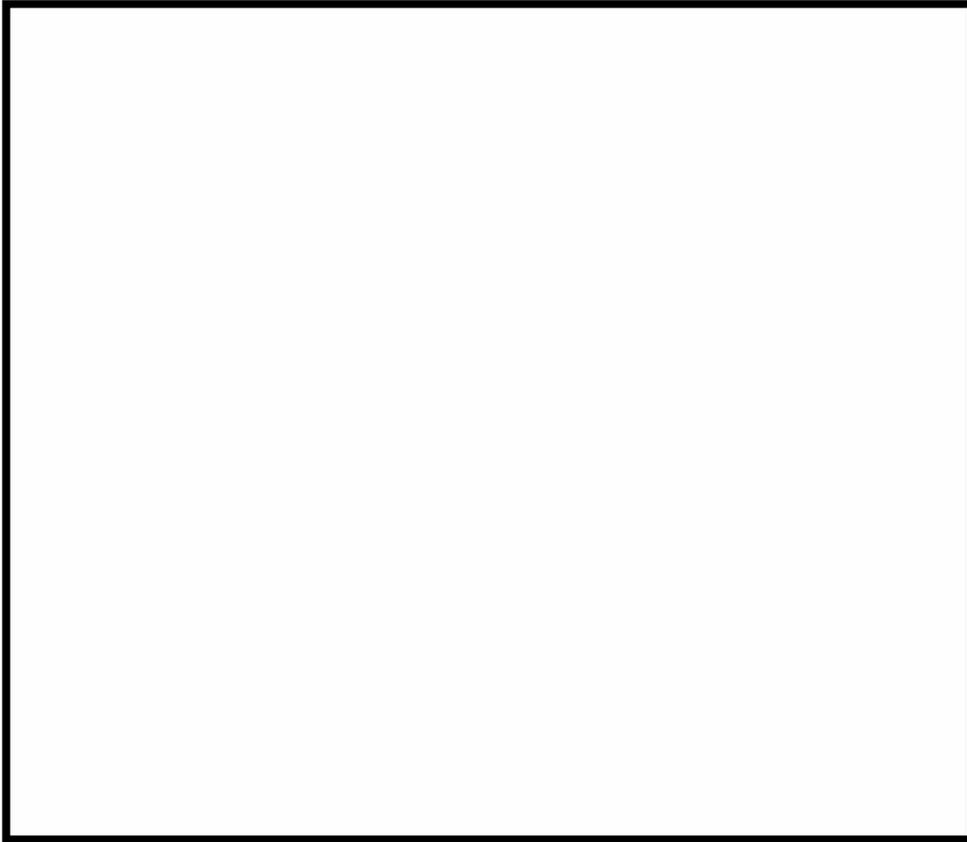


Fig. 27 Comprobación de la clonación del promotor de snoN 430 bp humano. Se efectuaron ensayos de digestión, utilizando a las ER *SacI* y *KpnI*, para identificar al inserto y con el empleo de *SacI*, *KpnI* y *BglI* se verificó que se trataba del inserto de interés, que corresponde al promotor de snoN humano de 430 bp.

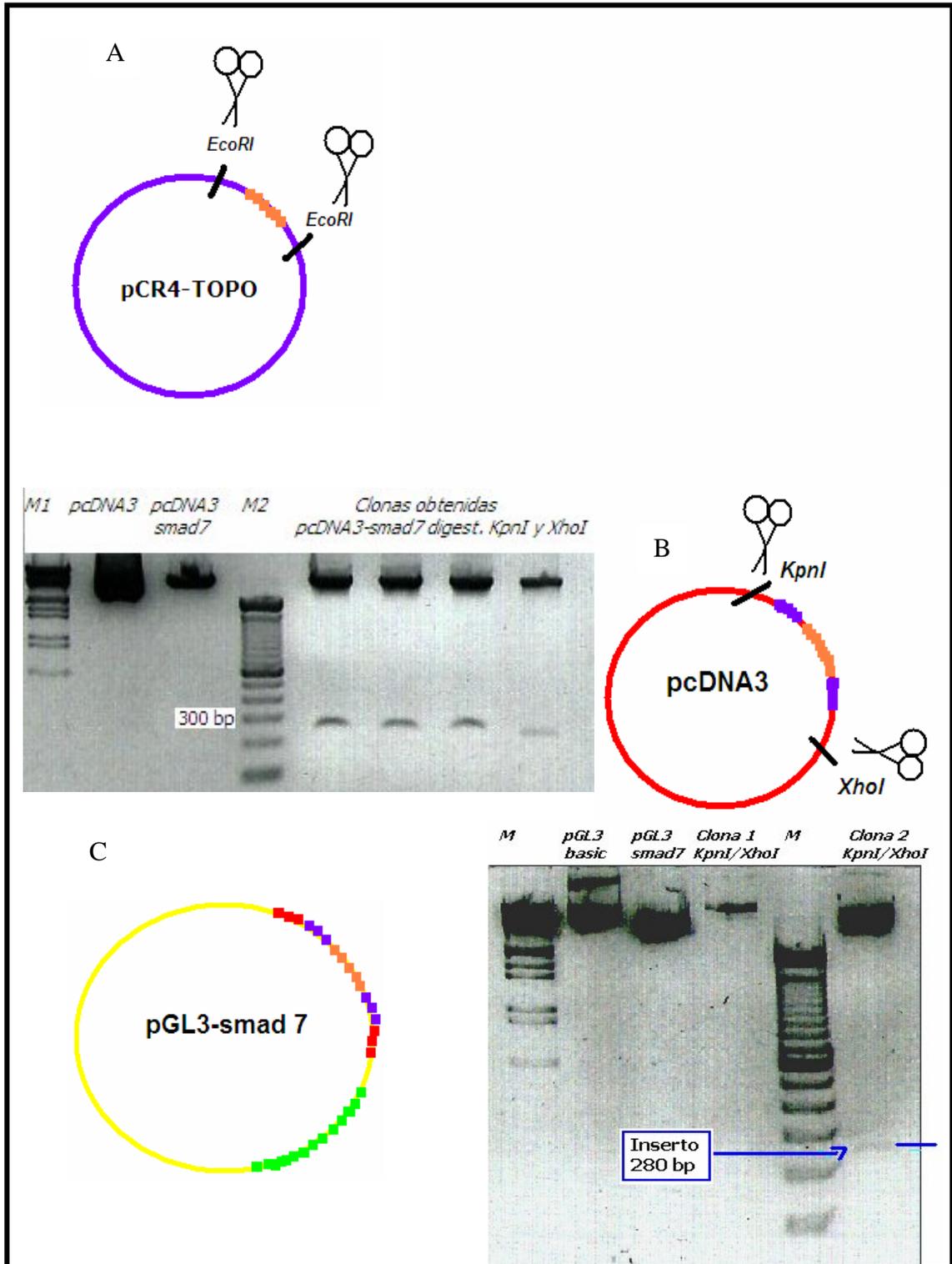


Fig. 28 Comprobación de la clonación del promotor de smad7. Se realizó la clonación del producto de PCR de 132 bp de smad7 en pCR4 Topo-cloning TA. A) Se muestra mediante la digestión con EcoRI la presencia del inserto. B) Subclonación en pcDNA3, confirmada por la liberación del inserto mediante la digestión con las enzimas KpnI y XhoI. Mediante estos sitios de restricción fue clonada finalmente en pGL3-Basic como se muestra en C).

Los vectores reporteros obtenidos (Tabla 10 y Fig. 29) pGL3-smad7, pGL3-snoN400R, pGL3-snoN770R, pGL3-snoN430H y pGL3-snoN670H, una vez analizados mediante los ensayos de digestión con enzimas de restricción, se llevó a cabo su secuenciación.

pGL3-smad7
pGL3-snoN400R
pGL3-snoN770R
pGL3-snoN430H
pGL3-snoN670H

Tabla 10. Vectores reporteros obtenidos con el gen reportero de la luciferasa controlado por el promotor de snoN humano y ratón y smad7.

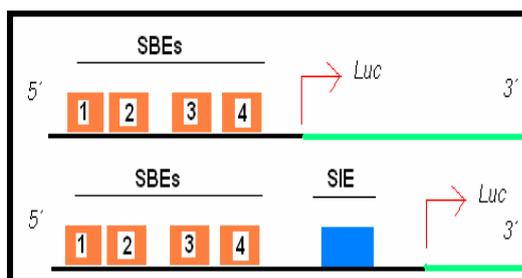


Figura 29. El esquema representa las regiones responsivas a TGF- β que están presentes en el promotor de snoN y que fueron clonadas. Los vectores reporteros pGL3-snoN 400R y 430H presentan únicamente la región de SBEs, mientras que los vectores pGL3-snoN770R y 670H contienen los SBEs y el SIE. (H=HUMANO)

La secuenciación confirmó que se clonaron los fragmentos promotores de interés. No obstante, únicamente en el caso de pGL3-snoN400R, se observó la delección de 3 pares de bases (GGC) en la región denominada SBE4, la cual no afecta los sitios de unión de Smad.

7.2.4 Regulación transcripcional del promotor de *snoN* humano y ratón por TGF- β

Con el objetivo de demostrar que el fragmento del promotor de *snoN* clonado es inducido por TGF- β , se llevó a cabo la transfección de los plásmidos reporteros descritos previamente en diferentes tipos de células, tales como HepG2, A549 y HEK293T, todas ellas responsivas al TGF- β . Por otra parte, las células A549 y HepG2 presentan altos niveles de SnoN, mientras que sólo las células HepG2 presentan altos niveles de Ski detectables por inmunoprecipitación y Western blot a diferencia de las células A549. Se transfectó como control positivo a pGL3-smad7, que fue clonado en este trabajo y 3TP-lux, los cuales son dos genes responsivos a TGF- β .

El plásmido 3TP-Lux es un reportero quimérico que contiene elementos del promotor de colagenasa humana y PAI-1 (inhibidor activador de plasminógeno) fusionado al gen reportero de la luciferasa, por contener tres repeticiones de un elemento responsivo a 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato (elementos responsivos a PMA) más un fragmento del promotor PAI-1. Este reportero es activado por el estímulo de TGF- β en una variedad de células.

Los resultados mostraron que los reporteros, empleados como controles positivos: pGL3-smad7 y 3TP-Lux, respondieron como se esperaba al TGF- β . Se observa que el tratamiento con TGF- β indujo un aumento de la actividad de luciferasa de 2 a 3.5 veces con respecto al control, en todos los tipos celulares utilizados (Fig. 30 A y B).

El estímulo de TGF- β fue capaz de activar al promotor de *snoN*, tanto para el ratón como para el humano en las células HepG2, Hek293T y A549. No obstante, se observó que los niveles basales de la actividad de luciferasa estaban elevados en las líneas celulares HepG2 y Hek293T, pero no en las células A549, empleando las mismas condiciones de transfección. Los niveles basales eran tan altos que el sistema HepG2 y Hek293T, que no respondía

satisfactoriamente al estímulo de TGF- β (Datos no mostrados). Bajo estas circunstancias se utilizó para las células HepG2 y HEK293T, una dilución 1:100 de pGL3-snoN430H respecto a la concentración utilizada para transfectar a las células A549. Con lo anterior, se disminuyó de forma importante la actividad basal de luciferasa, y se obtuvo una mayor inducción de *snoN* (2 a 2.5 veces con respecto al control) en las células HepG2, HEK293T y A549 (Fig 30C y 31, 32).

De acuerdo con los resultados observados en las figuras 30C, 31 y 32, la zona promotora del gen *snoN* que contiene los SBEs, tanto de humano como de ratón responde al TGF- β .

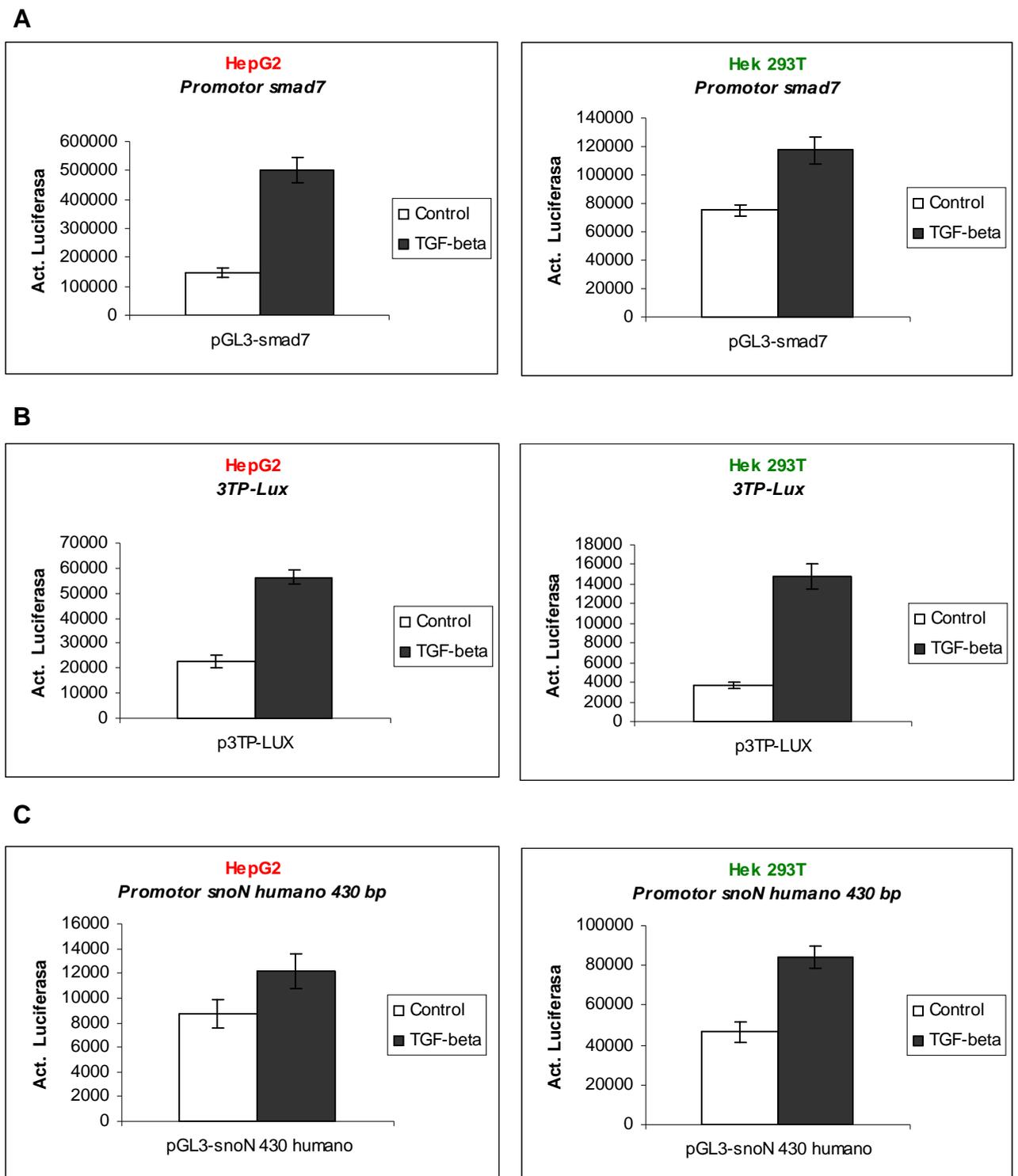


Figura 30. El promotor de snoN es regulado positivamente por TGF- β . A) Se observa la inducción del control positivos pGL3-smad7 por TGF- β en las células HepG2 y Hek. B) Inducción del control positivo 3TP-Lux por TGF- β en las mismas células. C) Análisis de la inducción de snoN 430 humano en las células HepG2 y Hek por TGF- β .

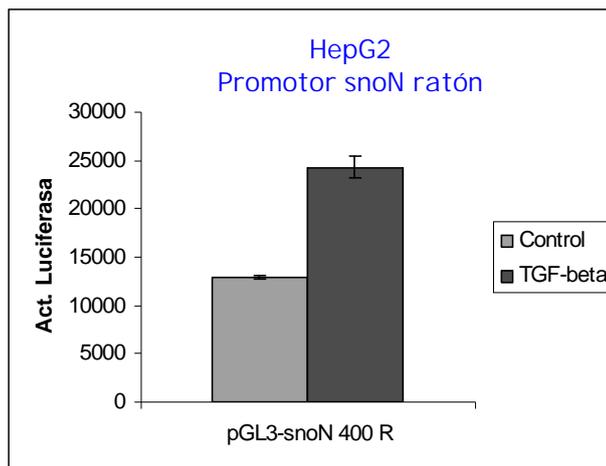


Figura 31. El promotor de *snoN* de ratón es regulado positivamente por TGF- β . Se observa en, la inducción del promotor de *snoN* de ratón de 400 bp que contiene los SBEs, en las células A549 por TGF- β .

Para reafirmar lo anterior, se utilizó el inhibidor de la cinasa del RI del TGF- β , 30 minutos antes del tratamiento con TGF- β . Como se observa en la figura 32, en las células A549 con las condiciones de transfección utilizadas se observó una inducción de 2 veces y el inhibidor “SB431542” disminuyó los niveles basales de la actividad de luciferasa e inhibió la inducción por TGF- β . Esto comprueba que la activación del promotor de *snoN* es debida a la señal del TGF- β .

Para determinar si la presencia del elemento SIE, descrito por Luo en el promotor de *snoN* de ratón y definido en los estudios bioinformáticos de este trabajo en el promotor *snoN* humano con una similitud del 93% con el SIE de ratón, tenía algún efecto sobre la activación de los SBEs por TGF- β , se efectuó la transfección de los plásmidos reporteros pGL3-snoN770R y 670H en las células A549.

La presencia del SIE al parecer no afecta la respuesta de la zona promotora de *snoN* que contiene los SBEs al TGF- β , como se muestra en la gráfica de la figura 33 con el reportero pGL3-snoN 670 H en las células A549. En este caso, se comprueba también que la activación del promotor de *snoN* que contiene los SBEs y SIE es debida al estímulo de TGF- β , por el uso del inhibidor

SB431542, que fue capaz de disminuir la actividad basal y prevenir la inducción por TGF- β .

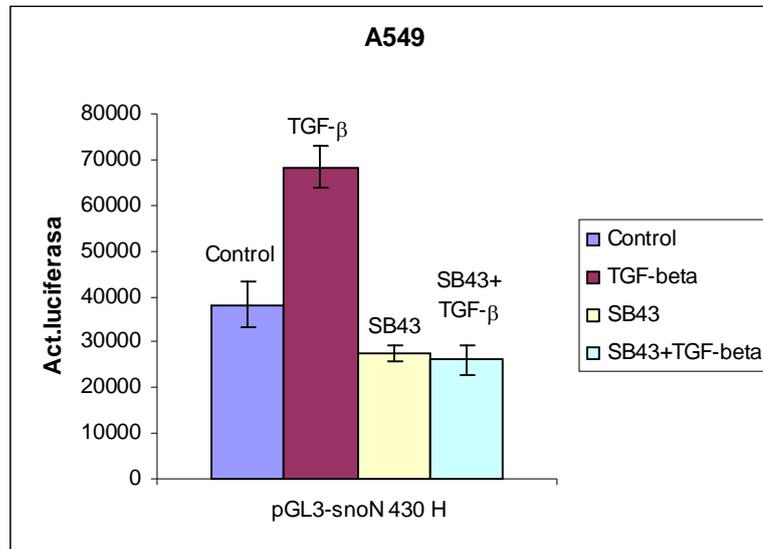


Figura 32. El promotor de snoN humano que contiene los SBEs es regulado positivamente por TGF- β en las células A549. Las células fueron tratadas con el inhibidor de la cinasa de RI "SB431542", el cual disminuyó la actividad de luciferasa basal y fue capaz de prevenir la inducción por TGF- β .

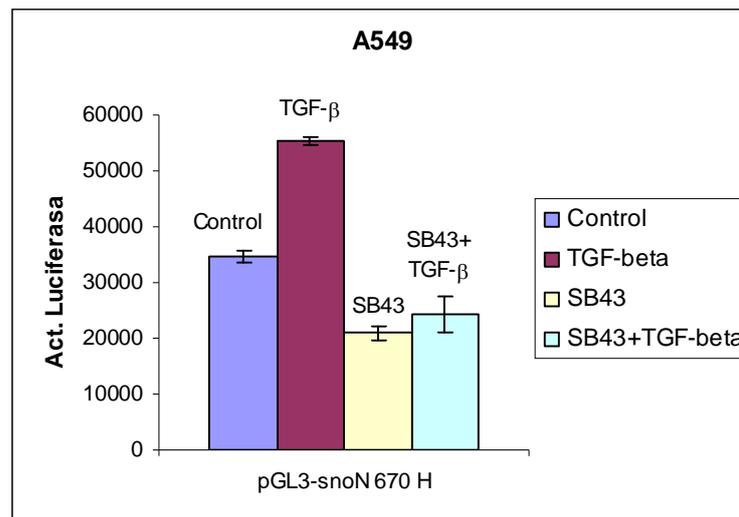


Figura 33. El promotor de snoN que contiene los SBEs y el SIE es regulado positivamente por TGF- β las células A549. El tratamiento con el inhibidor de la cinasa de RI del TGF- β (SB431542) disminuye la actividad basal de luciferasa y previene la inducción por esta citocina.

7.2.5 Inmunoprecipitación de cromatina

Para entender cómo se regula la expresión del promotor del gen *snoN* humano se efectuó la técnica de ChIP, utilizando a las células A549, estimuladas con 0.5nM TGF- β por diferentes tiempos e inmunoprecipitando a Smad2/3 y Smad4. Se identificó el reclutamiento de Smad2/3 y Smad4 en la región que flaquea a los SBEs y SIE, localizados en el promotor de *snoN*, que comprende 670 bp.

En las células A549, se observa que Smad2/3 se encuentran unidas al promotor del gen *snoN* después del estímulo con TGF- β (45 minutos), pero no significativamente en estado basal ni luego de 2 horas de la estimulación, y lo mismo se observa para el gen *smad7*, lo cual indica que ambos promotores se regulan positivamente por TGF- β .

Smad4, está unido al promotor de *snoN* en estado basal y al parecer su reclutamiento se incrementa luego del estímulo, mientras que su unión al promotor de *smad7* es discretamente mayor en estado basal y luego de dos horas del estímulo y menor a los 45 minutos de dicho estímulo con TGF- β (Fig. 35).

De esta forma los resultados del ChIP realizado para el promotor de *smad7*, utilizado como control positivo por conocerse su regulación en las células A549, concuerdan con lo reportado. El distinto patrón de unión a los promotores de *snoN* y *smad7* sugieren que la regulación de *smad7* y *snoN* podría ser diferente.

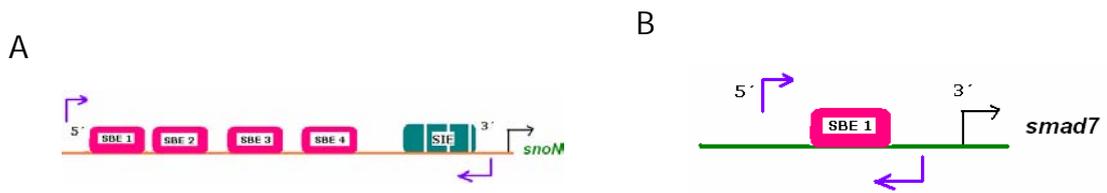


Figura 35. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) A) ChIP promotor *snoN* humano. B) ChIP promotor *smad7* empleando las células A549. Luego de 45 min con el estímulo de TGF- β , se observa en ambos casos el reclutamiento de Smad2/3. Smad4 es reclutado al promotor de *smad7* principalmente en estado basal y luego de 2 horas del estímulo y disminuye discretamente a los 45 minutos de tratamiento, mientras que en el promotor de *snoN* se encuentra basalmente y su reclutamiento se incrementa luego de la estimulación.

8. DISCUSIÓN

SnoN es una proteína reguladora de la señal del TGF- β . Interesantemente, la expresión de SnoN es regulada por el propio TGF- β . Diversos grupos de investigación incluyendo a nuestro laboratorio, han demostrado que 1 a 2 horas de estímulo con TGF- β causan un incremento en los niveles del RNAm de SnoN, dejando claro que *snoN* es un gen blanco del TGF- β , pero quedando pendiente describir cómo se regula su expresión a nivel transcripcional.

Luo y cols (2005) clonaron el promotor del gen *snoN* de ratón y demostraron que el complejo de proteínas Smads puede regular diferencialmente la expresión de este gen. Complejos de Smad2/4 activan la transcripción de *snoN* por su unión directa a los cuatro SBEs presentes en su promotor, mientras que el complejo Smad3/4 inhibe este proceso, a través de su unión a un nuevo sitio consenso descrito denominado SIE (elemento de inhibición de las Smads). No obstante, la secuencia del promotor de *snoN* de ratón no fue reportada en dicho estudio.

El promotor de *snoN* humano no había sido clonado, por lo que el analizar su regulación podría ser importante para entender su patrón de expresión en diversos procesos en los que se ha visto implicado a SnoN, como por ejemplo el papel dual que se ha sugerido tiene durante la tumorigénesis que se ha sugerido que tiene (45).

En relación a lo anterior, en experimentos con ratones atímicos, la inyección de células A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) que presentan niveles elevados de SnoN, favorece la formación de un tumor, mientras que esto no ocurre con la inyección de las mismas células con los niveles de SnoN abatidos por RNAi. Sin embargo, a pesar de que la ausencia de SnoN evita el desarrollo del tumor, favorece la metástasis de estas células hacia hueso y pulmón (45).

Esto indica la importancia que tiene un adecuado balance de los niveles de SnoN y la trascendencia de los mecanismos implicados en su regulación, puesto que niveles elevados pueden contribuir a desordenes como en este caso a la formación de tumores localizados, pero también el descenso de sus niveles puede influir en procesos que contribuyen a la metástasis del tumor.

El conocer cómo está siendo regulada la expresión de *snoN*, podría contribuir a comprender su comportamiento dual hasta ahora descrito en la tumorigénesis, considerando además que en diversos tipos de cáncer se observa la sobreexpresión de *snoN*. Aunado a lo anterior, en otros escenarios como la regeneración hepática o la fibrosis renal, en donde existe un desequilibrio en los niveles de SnoN, no se sabe como SnoN pudiese estar regulado.

Con el objetivo de evaluar y caracterizar la regulación de la expresión del gen *snoN* se clonó y analizó bioinformáticamente al promotor correspondiente al gen *snoN* humano que presenta la zona responsiva al TGF- β , estableciendo su regulación por TGF- β y la posible participación de las Smads en el control de su expresión.

Análisis bioinformático del promotor snoN

Mediante estudios bioinformáticos, se obtuvo la secuencia promotora de *snoN* para ratón, rata y humano, delimitando el análisis a las secuencias promotoras con elementos de interés que presumiblemente son regulados por el complejo de las Smads y con los cuales se efectuaron alineamientos de 2 secuencias así como alineamientos múltiples. Los resultados obtenidos muestran que el promotor de *snoN* de ratón, rata y humano presenta cuatro zonas de respuesta a TGF- β , que coinciden con las secuencias establecidas como SBE, todas ellas conservadas. La secuencia denominada como SIE por Luo, que se sugiere como el sitio de unión para el complejo de Smad3/4 para reprimir la expresión de *snoN*, también fue identificada en el humano con un 93% de similitud, siendo completamente igual para la rata. Por lo tanto, los SBEs y SIE en el promotor de *snoN* son elementos altamente conservados.

Los resultados del análisis bioinformático del promotor *snoN* resultaron relevantes por varios aspectos. Por una parte, la mayoría de los promotores blanco de las Smads descritos presentan uno o dos SBEs, pero pocos promotores se han caracterizado con cuatro o más SBEs. Al respecto, algunos proponen que la presencia de múltiples SBEs favorece las interacciones cooperativas entre los SBEs y los complejos de las Smads (48). En lo reportado por Luo, la mutación de cualquier SBE individualmente no afecta la respuesta al TGF- β , pero mutaciones en los cuatro SBEs simultáneamente abate completamente la activación del promotor de *snoN*, por lo que pudiese existir una cooperación entre ellos, de hecho un aspecto interesante sería saber el efecto de la combinación de mutaciones de dos y tres SBEs, lo cual no fue reportado. Esto podría indicar la importancia que tienen distintas regiones de respuesta a Smads en la respuesta a TGF- β y a mecanismos de regulación transcripcional.

A pesar de ello, en algunos casos como en el del promotor *p21*, que presenta cuatro SBEs, esta cooperación entre múltiples SBEs-Smads no es suficiente y de igual forma que en promotores que presentan un SBE, se requieren la asociación con otros factores transcripcionales que hagan efectiva la unión de Smads al DNA (48). Es por ello, la relevancia de determinar los posibles FTs que pudieran modular la expresión de *snoN*.

Los posibles FTs potenciales para regular la expresión de *snoN* se definieron a través del programa ALGGEN-PROMO. Dada la similitud de las secuencias promotoras de interés, la mayoría de los factores transcripcionales que se predicen coinciden para las tres especies. En general estos factores se han relacionado con el control de procesos como proliferación y diferenciación celular y algunos de ellos se sabe pueden interaccionar con las Smads, además de que sus sitios consenso se encuentran aledaños o sobrelapados con los SBEs, por lo que FTs específicos pudieran participar en conjunto con las Smads para regular la expresión de *snoN* dependiendo del tipo celular. Tan sólo dos ejemplos sobresalen como FTs potenciales para regular la expresión de *snoN*: Pax y p53 (33, 44).

Los FTs Pax 1, 2, 5 y 6 se predice que se unen al promotor de *snoN*. No existen muchas evidencias de que estos FT interactúen con las Smads. No obstante, recientemente un estudio señala que Smad3 puede asociarse con Pax-3 de manera dependiente de TGF- β , en donde Smad3 secuestra a Pax-3 evitando su unión al promotor *pax-3*, inhibiendo de esta forma su expresión (44).

Además estos FTs resultan interesantes, porque se sabe que son reguladores del desarrollo embrionario, por lo que sus niveles están normalmente disminuidos en el estado adulto y su sobreexpresión relacionada con padecimientos como el cáncer. Mientras Pax 2 y 5 son expresados en diferentes tipos de cáncer, involucrados en la motilidad celular y sobrevivencia, la expresión de Pax 1,6 resulta ser un indicio de un pronóstico favorable, desconociendo los mecanismos implicados en esto (44). Principalmente Pax 5 y 6 se predice se unen a la mayoría de los SBEs, por lo que pudieran regular la expresión de *snoN*.

Otro factor que resultó interesante es p53, el cual se ha propuesto que puede cooperar con las Smads e incluso con SnoN para mediar la represión transcripcional de algunos genes tales como la alfafetoproteína (AFP), cuyo incremento en sus niveles se considera un marcador de cáncer de hígado (33). El sitio consenso de p53 se encuentra en la mayoría de los SBEs y zonas inter-SBEs del promotor *snoN*, por lo que podría contribuir a su regulación transcripcional.

El promotor de snoN es inducido por TGF- β

Para demostrar la regulación del promotor *snoN* humano por TGF- β , se clonó el fragmento promotor *snoN* humano que contiene a los SBEs y el que posee tanto a los SBEs como al SIE. Las mismas regiones promotoras de *snoN* de ratón fueron clonadas en el vector reportero pGL3-Basic.

Dos de los genes responsivos a TGF- β son *smad7* y *PAI-1*. El promotor de *smad7* contiene un SBE, mientras que 3TP-lux presenta tres repeticiones de

unión a Smads, correspondientes al promotor *PAI-1*. Tanto *smad7* como *3TP-lux* fueron utilizados como controles positivos.

El análisis de genes reporteros se efectuó en las células Hek293T, HepG2 y A549 que responden a TGF- β . En el caso de las A549 presentan altos niveles de SnoN pero no de Ski, contrario a las HepG2 que presenta altos niveles de ambas proteínas. Los resultados muestran que el promotor de *smad7* clonado en este trabajo y el *3TP-lux* se inducen tras el estímulo de TGF- β como se esperaba por ser responsivos a esta citocina.

En cambio en las células A549 se obtuvieron niveles basales menores y se observó una inducción con el estímulo con TGF- β . El uso del inhibidor de la cinasa de RI "SB431542" disminuyó la actividad de luciferasa basal y el estímulo de TGF- β tras la preincubación con el inhibidor, confirmando que la vía de señalización del TGF- β induce la expresión de *snoN* en estas células.

Los ensayos con genes reporteros muestran por tanto que la zona que contiene los SBEs del promotor de *snoN* responde al TGF- β . A pesar de ello, los altos niveles basales y la inducción máxima obtenida (2-2.5 veces) en los contextos estudiados, sugieren un mecanismo más complejo en su regulación, en donde dependiendo del complejo formado de Smads, la presencia de correpresores SnoN y Ski y de FTs tejido específicos, pudieran estar implicados en su regulación.

En las células Hek293T y HepG2, los altos niveles de actividad basal y la discreta inducción por TGF- β obtenida en los ensayos con genes reporteros del promotor de *snoN*, sugieren la importancia que tendría clonar todo el promotor de *snoN* y evaluar su regulación por TGF- β , ya que es posible que otros elementos pudieran estar implicados. Además FTs específicos del contexto celular pueden estar implicados en la regulación de *snoN*.

Otra secuencia conservada en el promotor de *snoN* es el SIE. El SIE es un elemento recientemente propuesto como una secuencia consenso para el complejo Smad3/4, que media la represión de *snoN*.

Para mostrar el efecto total que TGF- β tiene sobre el promotor de *snoN* humano que contiene tanto a los SBEs como al SIE, se realizaron ensayos con el gen reportero que está controlado por el promotor de 670 bp de humano. Los resultados obtenidos, no muestran diferencias importantes con respecto a la inducción observada con los reporteros de los fragmentos promotores que contiene sólo los SBEs en las células A549. Al parecer en estos estudios, la presencia de SIE no altera la actividad promotora en respuesta a TGF- β en las células A549. Esto podría indicar que la presencia de SBEs es suficiente para la inducción del promotor por TGF- β .

El análisis de FT en el SIE, muestra algunas diferencias en el humano y ratón que podrían influir en su regulación, ya que SIE humano parece tener sitios potenciales para E2F-1, mientras que el SIE de ratón para Pax-5.

Por lo tanto, el promotor de *snoN* humano se induce por la señal del TGF- β , pero considerando la regulación diferencial de *snoN* propuesta, establecida por el complejo de Smads, es posible que la proporción de las proteínas Smads, pudiera influir en que complejos de Smads se formen (Smad2/4 o Smad 3/4) en cada tipo de célula tras el estímulo de TGF- β , y dependiendo de este complejo se obtenga una mayor o menor inducción de *snoN*.

Lo anterior puede ser evidenciado en varios tipos celulares donde Smad2 y Smad3 regulan diferencialmente la transcripción de genes blanco del TGF- β . Por ejemplo en HepG2, la sobreexpresión de Smad3/4 causa la activación del promotor *p21*, pero no Smad2/4. Otro ejemplo interesante es que Smad2/4 se asocia con FAST-2 para inducir al promotor del gen *gooscoide*, mientras que éste es reprimido por Smad3/4 (49).

Aunado a lo anterior, los niveles de Ski y SnoN propios de cada contexto celular, pueden influir en la respuesta al TGF- β , del promotor de *snoN*. No obstante, cabe la posibilidad de que se requieran FT específicos para inducir la expresión de *snoN* y alguno de los FTs potenciales establecidos en este trabajo pudiesen tener una participación importante en ello.

Smad 2/3 y Smad4 son reclutados al promotor de snoN en respuesta a la señal del TGF- β

Para evaluar el reclutamiento de las proteínas endógenas Smad2/3 y Smad 4 al promotor de *snoN* en las células A549 se efectuó la técnica de ChIP y se utilizó en todos los casos al promotor de *smad7* como un control positivo.

Al parecer el reclutamiento de Smad2/3 al promotor de *snoN* y *smad7* es similar, en donde después de 45 min del estímulo con TGF- β se observa su posicionamiento en el promotor y no está presente significativamente en el promotor ni antes ni después de 2 horas del estímulo con esta citocina (33). El reclutamiento de Smad4 parece incrementar con el estímulo de TGF- β en el caso del promotor de *snoN*, siendo mayor su reclutamiento en estado basal y luego de las dos horas del estímulo en el caso del promotor de *smad7*.

Este hecho pudiera ser significativo, para conocer cómo el promotor de *snoN* pudiera ser regulado por otros FTs y por los correpresores Ski y SnoN. Al respecto, Ski y SnoN se han propuesto como reguladores de la expresión de genes blanco de las Smads (15). Sin embargo, no se cuenta con evidencia experimental de todos los genes que se proponen blanco de estas proteínas, por lo que *snoN* podría ser un gen blanco de estas proteínas.

En estado basal se sabe que el promotor de *smad7* es reprimido por Ski y SnoN, en donde se ha demostrado que Ski se une al SBE a través de su interacción con Smad4 y se ha sugerido lo mismo para SnoN (16). Esto justifica los resultados obtenidos para el reclutamiento de Smad4 al promotor de *smad7*, en estado basal y luego de 2 horas de la estimulación. Si SnoN y

Ski pueden unirse a través de Smad4 al promotor de *snoN* y la relevancia de este hecho, son cuestiones que deben ser evaluadas.

Considerando lo anterior, es posible que SnoN y Ski tengan un papel importante en el control de la expresión de *snoN* a nivel basal y luego del estímulo del TGF- β . Los niveles de SnoN y Ski pueden estar influyendo en la activación del promotor de *snoN* por TGF- β . Además estos correpresores podrían regular la expresión de *snoN* de forma diferente a como lo hacen con smad7, sin embargo se requieren más estudios al respecto.

Con relación a lo descrito, podría especularse que la participación del complejo activo de las Smads puede repercutir en la función de SnoN y Ski. Además, SnoN y Ski pueden necesitar la participación de otros factores para integrarse a determinado complejo de Smads y mediar la expresión o represión de *snoN*.

9. CONCLUSIONES

Se definió, caracterizó y clonó la secuencia promotora del gen *snoN* de humano y ratón que contiene los elementos responsivos al TGF- β : SBEs (Elementos de unión a Smads) y SIE (Elemento Inhibitorio de las Smads).

La secuencia responsiva del promotor de *snoN* (SBEs + SIE) al TGF- β es altamente conservada entre las especies ratón, rata y humano. Factores potenciales como Pax, p53, YY1, Sp1, c-myc, entre otros fueron identificados por análisis bioinformático y podrían regular la expresión de *snoN* dependiendo del contexto celular.

Se clonó la región que responde al TGF- β por poseer un SBE del promotor del gen *smad7*, para ser utilizado como un control positivo.

El promotor del gen *snoN* que contiene sólo los SBEs, así como el que posee los SBEs y SIE, son regulados positivamente por TGF- β , en humano y ratón.

El reclutamiento de Smad2/3 al promotor de *snoN* a los 45 minutos del estímulo del TGF- β es similar al mecanismo descrito para el promotor de *smad7*.

Smad4 está unido al promotor de *snoN* humano en estado basal, y parece incrementar su reclutamiento hasta dos horas después del estímulo de TGF- β , estando principalmente unido en estado basal y luego de 2 horas de dicho estímulo al promotor de *smad7*. Por lo que la regulación de la expresión de *snoN* humano por correpresores como SnoN y Ski podría no ser similar a lo descrito para *smad7*.

10. PERSPECTIVAS

- Clonación de una zona promotora de *snoN* mayor y evaluar su regulación por TGF- β .
- Analizar si SnoN ejerce un efecto represor en la expresión de *snoN*.
En nuestro laboratorio se ha mostrado que la anisomicina induce la degradación de SnoN. Mostrar si en las células A549 incubadas con anisomicina, ésta es capaz de desreprimir a *snoN* y contribuir a una mayor inducción en los niveles de mensajero para las células tratadas con anisomicina y estimuladas con TGF- β .
- Comprobar si SnoN y Ski ejercen un efecto distinto o similar en la expresión de *snoN*. Como herramienta podría utilizarse RNAi para SnoN y Ski y confirmar el efecto que el abatimiento de cada una y ambas proteínas tiene sobre la expresión transcripcional de *snoN*.
- Analizar la regulación diferencial de la expresión de la zona de respuesta del promotor *snoN* (SBEs y/o SIE) por los complejos de las Smads. Con la sobreexpresión de complejos Smads: Smad2/4 o 3/4, analizar el efecto sobre la actividad del promotor, lo cual podría contribuir a entender por qué su inducción por TGF- β es diferente en los diferentes contextos celulares estudiados.
- Para probar también el punto anterior, el ChIP, inmunoprecipitando Smad2, 3 y 4 podría sugerir a través de cuales complejos de Smads están siendo reclutados al promotor *snoN* y cómo podría estar siendo regulados, positiva o negativamente.
- Determinar si existe un complejo formado por las Smads, Ski y SnoN posicionado en el promotor de *snoN* que medie su regulación, a través de la técnica de Re-ChiP.
- Analizar si algunos FTs, que parecen clave en procesos regulados por TGF- β , pudieran regular la expresión de *snoN* en determinados contextos celulares.

11. APÉNDICE

Inmunoprecipitación de cromatina

Solución de Formaldehído 11%

	<i>Para preparar 5 ml</i>	Concentración Final
1.5 ml	37 % Formaldehído	11%
100 μ l	5 M NaCl	0.1 M
10 μ l	0.5 M EDTA (pH 8)	1 mM
10 μ l	0.25 M EGTA (pH 8)	0.5 mM
250 μ l	1 M Hepes (pH 8)	50 mM
3.1 ml	H ₂ O	

Extracción de núcleos

Amortiguador de Lisis (Amortiguador 1)

	<i>para preparar 100 ml</i>	Concentración Final
5 ml	1 M Hepes-KOH pH 7.5 (o 7.4)	50 mM
2.8 ml	5 M NaCl	140 mM
0.2 ml	0.5 M EDTA	1 mM
10 ml	glicerol	10 %
5 ml	10 % NP-40	0.5 %
0.25 ml	Triton X-100	0.25 %

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Amortiguador 2

	<i>para preparar 100 ml</i>	Concentración Final
4 ml	5 M NaCl	200 mM
0.2 ml	0.5 M EDTA (pH 8)	1 mM
0.1 ml	0.5 M EGTA (pH 8)	0.5 mM
0.5 ml	2 M Tris-HCl (pH 8)	10 mM

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Amortiguador 3

	<i>para preparar 100 ml</i>	Concentración Final
0.2 ml	0.5 M EDTA (pH 8)	1 mM
0.1 ml	0.5 M EGTA (pH 8)	0.5 mM
0.5 ml	2 M Tris-HCl (pH 8)	10 mM

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Mezcla de inhibidores de proteasa

Añadir a las concentraciones finales que se señalan.

Aprotinina 0.1 µg/ml (preparar solución stock a 5 mg/ml en H₂O, guardar a -20 °C)
leupeptina 0.1 µg/ml (preparar solución stock a 5 mg/ml en H₂O, guardar a -20 °C)

Glicina 2.5 M

Para preparar 2 ml
375 mg en H₂O

Bloque de la proteína G

Se bloquean 500 µl de proteína G con 30 µl de DNA de esperma de salmón a 10 mg/ml (Promega) y 15 µl de albumina sérica bovina a 20 mg/ml, mezclando durante toda la noche. Al siguiente día la proteína G se lava centrifugando a 3000 r.p.m. por 2 min, desechando el sobrenadante y repitiendo este proceso 2 veces más. Al final la proteína G bloqueada se resuspendió en TE 1:1 (vol/vol), se guardó a 4 °C hasta el momento de utilizarse.

Amortiguador de inmunoprecipitación

<i>Para cada inmunoprecipitación</i>	Concentración Final
195 µl TE	
50 µl tritón X-100	1%
5 µl deoxicolato de sodio (prepararlo fresco)	0.1 %

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Amortiguador de lavado (RIPA)

Concentración Final
50 mM Hepes pH 7.6
1 mM de EDTA
0.7% deoxicolato de sodio
0.5 M cloruro de litio
1% NP-40

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu Q, Pearson White S, Luo K: Requirements for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor B-induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol* 25:10731-10744, 2005.
2. Bonni S, Wilson SM, Sarker KP: SnoN is a type-specific mediator of transforming growth factor- β responses. *JBC* 280:13037-13046, 2005.
3. Miyazono K, Suzuki H, Imamura T: Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors, *Cancer Sci* 94:203-234, 2003.
4. He J, Tegen SB, Krawitz AR, Martin GS, Luo K: The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *JBC* 33:30540-30547, 2003.
5. Luo K: Ski and SnoN negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 14:65-70, 2004.
6. Briones-Orta MA, Sosa-Garrocho M, Moreno-Alvarez, Fonseca-Sánchez MA, Macías-Silva M: SnoN co-repressor binds and represses smad 7 gene promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 341:889-894, 2006.
7. Sun Y, Liu X, Ng-Eaten E, Lodish HF, Weinberg RA: SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor b signaling. *PNAS* 96:12442-12447, 1999.
8. Miyazono K: Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *Journal of cell science* 113:1101-1109, 2000.
9. Shi Y, Massagué J: Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700, 2003.
10. Pearson-White S, McDuffie M: Defective T-Cell Activation is associated with augmented transforming growth factor β sensitivity in mice with mutations in the sno gene. *MCB* 23:5446-5459, 2003.
11. Stroschein SL, Bonnis, Wrana JL, Luo K: Smad 3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes & Dev* 15:2822-2836, 2001.
12. Vázquez-Macias A, Ruiz-Mendoza A, Fonseca-Sánchez MA, Briones-Orta MA, Macías-Silva M: Down-regulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS* 579:3701-3706, 2005.
13. Bonnis S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroscheint SL, Luo K, Wrana JL: TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature Cell Biology* 3:587-594, 2001.
14. Krakowski AR, Laboureau J, Mauviel A, Bisselo MJ, Luo K: Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- β signaling by sequestration of the Smad proteins. *PNAS* 102:12437-12442, 2005.
15. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF: Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine growth factor rev*, 12:1-8, 2001.
16. Liu F, Denissova NG: Repression of endogenous Smad 7 by Ski. *JBC* 279:28143-28148, 2004.
17. Macías-Silva M, Li W, Leu JL, Crissey MA, Taub R: Up-regulated transcriptional repressors SnoN y Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem* 277:28483-28490, 2002.
18. Wotton D, Massagué J: Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *The EMBO Journal* 19:1745-1754, 2000.
19. Lee-Hoeflich ST, Attisano L: The Smads. *Genoma biology* 2:3010.0-3010.8, 2001.
20. Massagué J: How cells read TGF- β signals. *Molecular cell biology* 1:169-178, 2000.
21. Knaus P, Lutz M: Integration of the TGF- β pathway into the cellular signaling network. *Cellular Signaling* 14:977-988, 2002.
22. Liu Y, Dai C, Yang J: A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 16:68-78, 2005.
23. Yue D, Yates K, Poholek A, Read AJ, Lin S, Yatsula B: Identification of binding sites of EV11 in mammalian cells. *JBC* 280:30712-30722, 2005.
24. Baldwin RL, Tran H, Karlan BY: Loss of *c-myc* Repression Coincides with Ovarian Cancer Resistance to Transforming Growth Factor β Growth Arrest Independent of

- Transforming Growth Factor β /Smad Signaling. *CANCER RESEARCH* 63:1413–1419, 2003.
25. Yang J, Zhang X, Li Y, Liu Y : Down-regulation of Smad Transcriptional Corepressors SnoN and Ski in the Fibrotic Kidney: An Amplification Mechanism for TGF- β 1 Signaling. *J Am Soc Nephrol* 14: 3167–3177, 2003.
 26. Edmiston JS, Yeudall WA, Chung TD, Lebman DA: Inability of Transforming Growth Factor- β to Cause SnoN Degradation Leads to Resistance to Transforming Growth Factor- β -Induced Growth Arrest in Esophageal Cancer Cells. *Cancer Res* 65: 4782-4788, 2005.
 27. Kaivo-oja N, Jeffery LA, Rives O, Mottershead DG: Smad signalling in the ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006.
 28. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Flavell AR, Robertson L: Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol* 24:99-146, 2006.
 29. Feng XH, Derynck R: Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21:659-693, 2005.
 30. Kaufman PB, Wu W, Kim D, Cseke LJ: *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. CRC Press. USA 1995.
 31. Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 3 ed. Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA 2001.
 32. Kurisaki K, Kurisaki A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, Dijke P, Heldin CH, Ericsson J, Moustakas A: Nuclear Factor YY1 Inhibits Transforming Growth Factor β - and Bone Morphogenetic Protein-Induced Cell Differentiation. *MCB* 23:4494-4510, 2003.
 33. Wilkinson DS, Ogden SK, Stratton SA, Piechan JL, Nguyen TT, Smulian GA, Barton MC: A direct intersection between p53 and Transforming growth factor β repression of the β -fetoprotein gene. *MCB* 25:1200-1212, 2005.
 34. Subramaniam N, Leong GM, Cock TA, Flanagan JL, Fong C, Eisman JA, Kouzmenko AP: Cross-talk between 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Transforming growth factor- β signaling requires binding of VDR and Smad3 proteins to their cognate DNA recognition elements. *JBC* 276:15741-15746, 2001.
 35. Hoey T, Zhang S, Schmidt N, Yu O, Ramchandani S, Xu X, Naeger LK, Sun YL, Kaplan MK: Distinct requirements for the naturally occurring splice forms Stat4 α and Stat4 β in IL-12 responses *The EMBO Journal* 22:4237–4248, 2003.
 36. [Stanelle J](#), [Stiewe T](#), [Theseling CC](#), [Peter M](#), [Putzer BM](#): Gene expression changes in response to E2F1 activation. [Nucleic Acids Res.](#) 30(8):1859-67, 2002.
 37. Langley B, Thomas M, Bishop B, Sharma M, Gilmour S, and Kambadur: Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression. *R. J Biol Chem* 277(51):49831-49840, 2002.
 38. Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C: Transforming Growth Factor- β -Induced Inhibition of Myogenesis Is Mediated Through Smad Pathway and Is Modulated by Microtubule Dynamic Stability. *Circulation Research* 94:617-619, 2004.
 39. Grau AM, Datta PK, Zi J, Halder SK and Beauchamp RD: Role of Smad proteins in the regulation of NF- κ B by TGF- β in colon cancer cells. *Cellular Signalling* 18(1041-1050), 2006.
 40. Kollias HD, Perry RLS, Miyake T, Aziz A, McDermott JC: Smad7 Promotes and Enhances Skeletal Muscle Differentiation. *MCB* 6248-6260, 2006.
 41. Gomis RR, Alarcon C, Nadal C, Van Poznak C, Massague J: C/EBP β at the core of the TGF β cytosstatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. [Cancer Cell.](#) 10(3):203-14, 2006.
 42. Jungert K, Buck A, Buchholz M, Wagner M, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V: Smad-Sp1 complexes mediate TGF β -induced early transcription of oncogenic Smad7 in pancreatic cancer cells. [Carcinogenesis.](#) 27(12):2392-401, 2006.
 43. Wang CL, Wan YL, Liu YC, Huang ZQ TGF- β 1/SMAD signaling pathway mediates p53-dependent apoptosis in hepatoma cell lines. [Chin Med Sci J.](#) 21(1):33-5, 2006.
 44. Robson JD, He S and Eccles MR: A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature Publishing Group* 6:(52-62), 2006.
 45. Zhu Q, Krakowski. Dunham EE, Wang L, Bandyopadhyay A, Berdeaux R, Martin SG, Sun L, and Luo K: Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis. *MCB* doi:10.1128/MCB.01394-06, 2006.

46. Kajino T, Omori E, Ishii S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. [J Biol Chem.](#) 282(13):9475-81, 2007.
47. Kano K, Tajo H, Yamanashi K, Sueta C, Tanaka S, Ishii S, Tachi C: Skeletal Muscles of transgenic Mice Expressing Human *snoN* a Homologue of *c-ski*.
48. Massagué J, Seoane J, Wotton D: Smad transcription factors. *Genes & Dev.* 19:2783-2810, 2005.
49. Brown KA, Pietsenpol JA, Moses HL: A tale of two proteins: Differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF- β signaling. *Journal of Cellular Biochemistry,* 101(1):9-33, 2007.

