



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**La degradación de los corre reguladores Ski y SnoN por los
antibióticos anisomicina y puromicina, modula las señales del
TGF- beta**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JACQUELINE HERNÁNDEZ DAMIÁN

**DRA. MARINA MACÍAS SILVA
TUTOR PRINCIPAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA ROBLES FLORES, FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)
DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
CELULAR (UNAM)**

MÉXICO, D. F. DICIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La degradación de los corre reguladores Ski y SnoN por los antibióticos anisomicina y puromicina, modula las señales del TGF- beta

R E C O N O C I M I E N T O S

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225 Norte del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dra. Marina Macías Silva Instituto de Fisiología Celular UNAM

Dra. Martha Robles Flores Facultad de Medicina UNAM

Dr. Ernesto Maldonado Instituto de Fisiología Celular UNAM

Olvera

Se reconoce la cooperación, asesoría y participación de la Biol. Marcela Sosa Garrocho del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la cooperación, asesoría y participación del M. en C. Blas Flores y M. en C. Margarita Romero Ávila de la Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce a los siguiente miembros del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del IFC, UNAM por su colaboración en el desarrollo experimental y discusión de este proyecto:

Dra. Angeles C. Tecalco Cruz

Biól. Diana Ríos López

LIBB. Genaro Vázquez Victorio

Biól. Cassandre Caligaris Benoit

Se reconoce por el apoyo técnico que otorgaron durante el progreso de esta investigación a:

M. en C. Valentín Mendoza Departamento de Biología Celular y del

Desarrollo del IFC, UNAM.

Dra. Ma. Teresa Romero Departamento de Biología Celular y del

Ávila Desarrollo del IFC, UNAM.

Dra. Laura Kawasaki Departamento de Genética Molecular del IFC, UNAM

Se reconoce por su contribución en reactivos y sugerencias y discusión de este trabajo a:

Dra. Guadalupe Reyes Cruz Departamento de Biología Celular
CINVESTAV

Dr. José Vázquez Prado Departamento de Biología Celular
CINVESTAV

Se reconoce a los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular UNAM, por su asesoría y apoyo técnico.

Dra. Laura Ongay Larios

Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta

M. en C. Minerva Mora Cabrera

Se reconoce a los miembros del taller del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel

Ortinez Benavides por su colaboración en el mantenimiento del equipo empleado en este trabajo.

La alumna fue apoyada por una beca otorgada por el CONACyT, en el programa de Ciencias Bioquímicas, UNAM.

El proyecto fue apoyado por los donativos de PAPIIT/DGAPA/UNAM No. IN206012 y CONACYT No. 101826.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en el mes de diciembre del 2013.

El jurado del Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente Dr. Jesús Adolfo García Sainz IFC, UNAM

Vocal Dra. Rosa Estela Navarro González IFC, UNAM

Vocal Dr. Fernando López Casillas IFC, UNAM

Vocal Dr. Salvador Uribe Carvajal IFC, UNAM

Secretario Dra. Guadalupe Reyes Cruz CINVESTAV

Índice de contenidos	
Abreviaturas	1
Abstract	2
Resumen	3
Introducción	4
La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β .	4
La familia de proteínas Ski y SnoN.	7
La relevancia biológica de los coreguladores Ski y SnoN.	10
La función de Ski y SnoN en tejidos adultos.	11
La importancia de Ski y SnoN en la progresión del cáncer.	13
Regulación de las proteínas Ski y SnoN por la degradación vía el proteosoma 26S.	13
Otros mecanismos de regulación en la señalización del TGF- β .	17
La anisomicina es un antibiótico con múltiples efectos en la señalización celular.	20
La inhibición de síntesis de proteínas por antibióticos y el estrés ribotóxico.	22
La activación de MAPK/SAPK por anisomicina.	23
Usos terapéuticos de la anisomicina.	26
Anisomicina induce la degradación de proteínas vía el proteosoma 26S.	27
La degradación de las oncoproteínas Ski y SnoN en respuesta a anisomicina.	28
Hipótesis	30
Objetivo General	30
Objetivos particulares	30
Materiales y métodos	31
Resultados	36
La degradación de SnoN por anisomicina depende del contexto celular.	36
La degradación de la proteína SnoN por anisomicina es llevada a cabo en células responsivas al TGF- β .	38
Participación funcional del receptor T β RI y Smad2 en el mecanismo de degradación de SnoN por ANS	41
El inhibidor del receptor T β RI bloquea la degradación de la proteína SnoN inducida por anisomicina.	41
La estabilidad de la proteína SnoN es regulada diferencialmente por TGF- β y ANS.	47
El inhibidor SB431542 bloquea la degradación de la proteína SnoN en el núcleo.	49
Los diferentes inhibidores del Receptor T β RI bloquean la degradación de la proteína SnoN por anisomicina.	51
La sobreexpresión de la proteína Smad7 previene el efecto de degradación de la proteína SnoN por ANS.	52
Anisomicina requiere de la expresión de T β RI y Smad2 para promover la degradación de SnoN.	54
El estrés ribotóxico y la inhibición de síntesis de proteínas no están involucrados en el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina.	55
Los inhibidores de la síntesis de proteínas higromicina y G418 no afectan los niveles de la proteína SnoN.	56
Puromicina y cicloheximida inducen la degradación de SnoN de manera análoga a anisomicina.	58
El estrés celular no participa en el mecanismo de degradación de la proteína SnoN por anisomicina.	61
La degradación de la proteína SnoN por N-acetil-PURO es independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas.	63
Las señales de TGF- β son favorecidas por la degradación de SnoN	

inducida por N-acetil-PURO.	65
Los compuestos análogos N-acetil-PURO y deacetil-ANS estimulan la degradación de la proteína SnoN.	68
Discusión	71
Conclusiones	81
Perspectivas	82
Bibliografía	83
APÉNDICE	93

ABREVIATURAS

ALK5	<i>Activin Like Kinase-5</i> (Receptor Tipo I del TGF- β)
ANS	Anisomicina
BMP	Proteína Morfogenética del hueso
RNA _m	Acido Ribonucleico mensajero
RNA _r	Acido Ribonucleico ribosomal
deacetil-ANS	deacetil-anisomicina
CHX	cicloheximida
DHD	<i>Dachshund homology domain</i>
Dominio GS	Dominio rico en Glicina/Serina
HIGRO	Higromicina
IP	Inmunoprecipitación
μ g	microgramos
μ M	micromolar
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno
N-Acetil-PURO	N-acetil-puromicina
pb	pares de bases
pS2	Smad2 fosforilada por T β RI
pS3	Smad3 fosforilada por T β RI
PURO	puromicina
R-Smad	Smad regulada por el Receptor tipo I
SAPK	Proteínas Cinasas Activadas por Estrés
SB43	SB431542 (inhibidor del T β RI)
S7	Smad7
Co-Smad	Smad común.
T β RI	Receptor Tipo I del TGF- β
TGF- β	Factor del Crecimiento Transformante β
TGF- β RII	Receptor Tipo II del TGF- β
pRS	Plásmido que confiere resistencia a puromicina
WB	Western Blot

Abstract

SnoN and Ski proteins function as Smad transcriptional corepressors and are implicated in the regulation of diverse cellular processes such as proliferation, differentiation and transformation. Transforming growth factor- β (TGF- β) signaling causes SnoN and Ski protein degradation via proteasome with the participation of phosphorylated R-Smad proteins. Intriguingly, the antibiotics anisomycin (ANS) and puromycin (PURO) are also able to downregulate Ski and SnoN proteins via proteasome.

This work explored the effects of ANS and PURO on SnoN protein downregulation when the activity of TGF- β signaling was inhibited by using different pharmacological and non-pharmacological approaches, either by using specific T β RI inhibitors, overexpressing the inhibitory Smad7 protein, or knocking-down T β RI receptor or Smad2 by specific shRNAs. The outcome of SnoN and Ski downregulation induced by ANS or PURO on TGF- β signaling was also studied.

SnoN protein downregulation induced by ANS and PURO did not involve the induction of R-Smad phosphorylation but it was abrogated after TGF- β signaling inhibition; this effect occurred in a cell type-specific manner and independently of protein synthesis inhibition or any other ribotoxic effect. Intriguingly, antibiotics seem to require components of the TGF- β /Smad pathway to downregulate SnoN. In addition, SnoN protein downregulation induced by antibiotics favored gene transcription induced by TGF- β signaling.

ANS and PURO require TGF- β /Smad pathway to induce SnoN and Ski protein downregulation independently of inducing R-Smad2 phosphorylation, which facilitates TGF- β signaling. Antibiotic analogs lacking ribotoxic effects are useful as pharmacological tools to study TGF- β signaling by controlling Ski and SnoN protein levels.

Resumen

Las proteínas supresoras de tumores Ski y SnoN funcionan como correpresores transcripcionales de las Smads y están implicadas en la regulación de diversos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la transformación celular. La señalización del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) causa la degradación de las proteínas Ski y SnoN, a través de las proteínas R-Smads fosforiladas vía el proteosoma. Los antibióticos anisomicina (ANS) y puromicina (PURO) inducen la degradación de las proteínas Ski y SnoN vía el proteosoma.

Este trabajo explora los efectos de ANS y PURO cuando la señal del TGF- β es inhibida mediante estrategias farmacológicas y no farmacológicas, como la utilización de inhibidores específicos del receptor I del TGF- β (T β RI), la sobreexpresión de la proteína Smad7, el depletamiento del receptor T β RI y Smad2 por shRNAs específicos. En este contexto se exploró la regulación de las proteínas Ski y SnoN por ANS y PURO.

También se demuestra que la degradación de las proteínas Ski y SnoN por ANS y PURO no involucra la inducción de las proteínas R-Smads fosforiladas, sin embargo el mecanismo es bloqueado al inhibir la señal del TGF- β . Este efecto ocurre de una manera específica del contexto celular e independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas o de cualquier efecto ribotóxico. Particularmente estos antibióticos requieren componentes de la señalización del TGF- β /Smads para promover la degradación de las proteínas Ski/SnoN. Asimismo esta degradación de las proteínas Ski y SnoN inducida por los antibióticos favorece la transcripción de genes inducida por la señalización del TGF- β .

El efecto de degradación de las proteínas Ski y SnoN por los compuestos análogos deacetil-ANS y acetil-PURO que carecen de efectos ribotóxicos, sugieren el uso de estas moléculas como una herramienta biológica para modular las respuestas del TGF- β de manera dependiente del contexto celular.

La degradación de los correguladores Ski y SnoN por anisomicina modula las señales del TGF- β .

Introducción

La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β .

Existen más de 30 miembros de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) codificados en el genoma humano. La superfamilia del TGF- β comprende los TGF- β s, las activinas, la señal de Nodal, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), los factores del crecimiento y diferenciación (GDFs) y la hormona anti-Mülleriana (AMH). Estas proteínas controlan un amplio repertorio de procesos celulares como la proliferación, diferenciación, apoptosis y el crecimiento celular, tanto en el desarrollo temprano embrionario como en el estadio adulto (Massagué 2012, Wakefield et al., 2013)

Diversos estudios de la superfamilia del TGF- β en distintos panoramas fisiopatológicos sugiere que una disfunción en los componentes de la vía del TGF- β , afecta la homeostasis celular generando graves padecimientos como el cáncer (Massagué 2012).

Actualmente se tienen registros de los componentes de la señal del TGF- β en una amplia variedad de genomas, existen estudios que sugieren una

coincidencia entre la aparición de la vía del TGF- β y el surgimiento de los primeros metazoarios en el reino animal (Huminiecki et al, 2009)

El mecanismo de señalización del TGF- β es similar para todos los miembros de la superfamilia. La célula requiere de dos componentes esenciales en la señalización del TGF- β : receptores transmembranales con actividad de cinasa y las proteínas Smads, sustrato principal de los receptores que funcionan como efectores principales de la vía (Massagué y Gomis, 2006). Cada ligando de la superfamilia requiere de un receptor tipo I y de un receptor tipo II (Tabla 1)

Tabla I. Ligandos y Receptores de la superfamilia del TGF- β .

Ligando	Receptor tipo I	Receptor tipo II
TGF- β 1	ALK1 y ALK5	TGF- β RII
TGF- β 2	ALK1 y ALK5	TGF- β RII
TGF- β 3	ALK1 y ALK5	TGF- β RII
NODAL	ALK4 y ALK7	ACTRII y ACTRIIB
Activin- β A	ALK4	ACTRII y ACTRIIB
Activin- β B	ALK4 y ALK7	ACTRII y ACTRIIB
GDF1	ALK4 y ALK7	ACTRII y ACTRIIB
GDF3	ALK4 y ALK7	ACTRII y ACTRIIB
AMH	ALK2 y ALK3	AMHR2
BMP5	ALK2, ALK3 y ALK6	ACTRII, ACTRIIB y BMPR2
BMP6	ALK2, ALK3 y ALK6	ACTRII, ACTRIIB y BMPR2
BMP7	ALK2, ALK3 y ALK6	ACTRII, ACTRIIB y BMPR2
BMP8	ALK2, ALK3 y ALK6	ACTRII, ACTRIIB y BMPR2
BMP15	ALK6	BMPR2
GDF6	ALK3 y ALK6	ACTRII, ACTRIIB y BMPR2
GDF7	ALK3 y ALK6	ACTRII, ACTRIIB y BMPR2

Tabla I. Ligandos/Receptores de la superfamilia del TGF- β . ACTR (Receptor de Activina) ALK (Receptor cinasa relacionado a activina); AMHR, Receptor AMH; BMP, proteína morfogenética del hueso; BMPR, Receptor de BMP; GDF, Factor de Diferenciación y crecimiento; TGF- β , factor de crecimiento transformante beta, TGF- β R, Receptor de TGF- β .

La señal del TGF- β comienza en la superficie celular, cuando el ligando interacciona con sus receptores en la superficie celular. El receptor T β RI (ALK5) y el receptor tipo II (T β RII) forman un complejo heterotetramérico que transduce la señal, mediante la fosforilación de las proteínas R-Smads. Ambos receptores poseen actividad de cinasa para residuos de serina y treonina (Figura 1). Los receptores tipo I, se caracterizan por el segmento regulatorio de 30 aminoácidos conocido como “dominio GS”, que se localiza entre la región transmembranal y el dominio de cinasa (Massagué y Gomis, 2006). En el genoma humano se han descrito siete receptores tipo I (ALKs 1-7) y cinco receptores tipo II (ActR-IIA, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-II y T β R-II), los diferentes miembros de la familia del TGF- β utilizan distintas combinaciones específicas entre los receptores tipo I y II para transducir la señal de esta citocina (Miyazono, 2000).

Una vez formado el complejo de receptores, el receptor tipo II fosforila varios residuos de serina y treonina del dominio GS del receptor T β RI, activando el dominio de cinasa. Esta fosforilación provee de un sitio de unión para las R-Smads, los mediadores intracelulares de la señal del TGF- β . (Figura 1)

La señal del TGF- β se propaga con la fosforilación de las proteínas R-Smads: Smad2 y Smad3 para el caso del TGF- β . Las R-Smads fosforiladas forman complejos heterotriméricos con Smad4, un mediador común de las Smads. Estos heterocomplejos activos son traslocados al núcleo, regulando la transcripción de genes blanco de esta citocina.

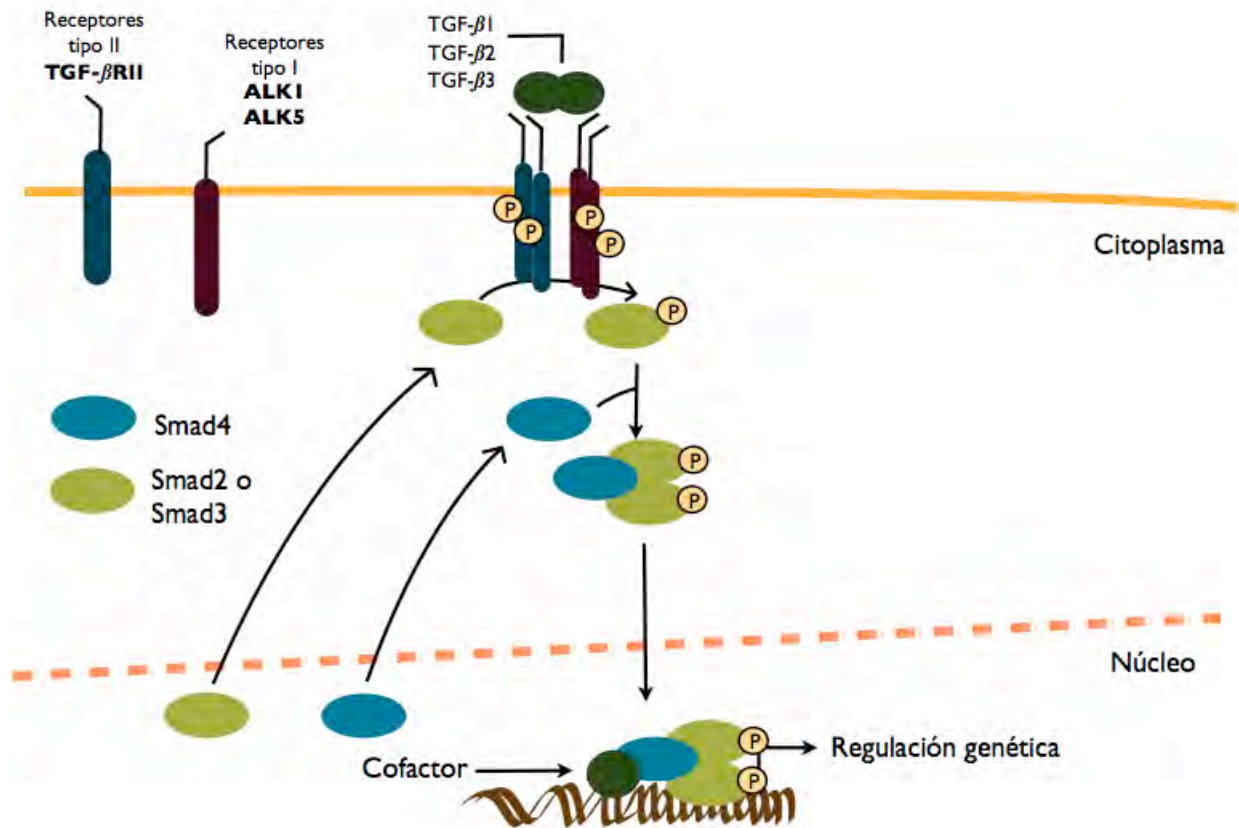


Figura 1. La vía de señalización del TGF-β. La vía canónica del TGF-β es a través de la señalización vía las proteínas Smads. Los distintos ligandos del TGF-β inducen la formación de un complejo heterotetramérico de dos tipos de receptores (Tipo I y Tipo II). El complejo activo de receptores inducen la fosforilación de las proteínas Smad2 y Smad3. Smad2 y Smad3 en su forma fosforilada, promueven la formación de complejos con Smad4 y la subsecuente acumulación en el núcleo. La complejos activos de las Smads interactúan con otros cofactores transcripcionales para la regulación genética de genes blanco.

La familia de proteínas Ski y SnoN.

Los genes *c-ski* y *c-sno* codifican para los miembros de la familia de oncoproteínas Ski, que fueron descritas a partir de su homología con la forma viral *v-ski*, un componente transformante del virus Sloan-Kettering. Las proteínas Ski y SnoN tienen una homología del 50% en su secuencia de aminoácidos (36% de identidad), además de tener dominios estructurales en común (Deheuninck y Luo 2009) (Figura 2).

En el caso de SnoN se han reportado tres isoformas a partir del procesamiento alternativo del mRNA, como SnoN2 (mSno-dE3), que muestra una delección de 46 aa (codificados por el exón 3), Sno1 que se compone de los primeros 399 residuos de SnoN y SnoA que difiere de SnoN porque tiene un extremo carboxilo más corto. En el caso de Ski aún no se han reportado isoformas existentes (Deheuninck y Luo 2009).

Ski y SnoN actúan como reguladores negativos del TGF- β al modular la vía de transducción de señales de esta citocina (Sun et al., 1999; Stroschein et al., 1999). Tanto Ski como SnoN interaccionan con los complejos activos de las Smads, a través de la unión directa con las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4, reprimiendo la habilidad de las Smads para inducir la transcripción de genes blanco del TGF- β (Luo, 2004).

Los coreguladores Ski y SnoN se unen con distintas proteínas a través de varios dominios estructurales. En la región amino terminal de la familia de proteínas Ski, se localiza el dominio DHD (*Dachshund homology domain*) un dominio importante en la unión con Smad4. El dominio DHD forma una estructura globular que consiste en alfa-hélices y láminas beta-plegadas, un dominio estructural característico en proteínas de unión a DNA, sin embargo no se ha demostrado la unión directa de Ski y SnoN al DNA. Este dominio DHD también ha sido descrito en la interacción con otras proteínas, como el co-regulador transcripcional N-CoR. Cerca del dominio DHD se encuentra a 80 aa de distancia, un dominio con homología a SAND, una estructura clave para la interacción con Smad4.

Otro mecanismo propuesto de la proteína SnoN como modulador negativo en la señalización del TGF- β , se basa en estudios de sublocalización celular de la proteína SnoN en células malignas y normales. La proteína SnoN muestra una localización citoplasmática en un modelo de células epiteliales de mama no transformadas, mientras que en células malignas esta localización es nuclear. Este trabajo sugiere que la señalización del TGF- β es inhibida a través del secuestro de las proteínas Smads por SnoN hacia el citoplasma, impidiendo la traslocación al núcleo de los complejos activos de las Smads (Krakowski et al., 2005).

La relevancia biológica de los coreguladores Ski y SnoN.

Los genes *ski* y *sno* son homólogos, sin embargo no poseen funciones redundantes durante el desarrollo embrionario. Diferentes modelos biológicos como *Xenopus*, pez cebra y ratón han lustrado la relevancia de Ski/SnoN durante el desarrollo embrionario en los linajes neuronal y muscular.

En ratón se ha descrito que la proteína Ski es expresada en todos los tejidos adultos y embrionarios. Sin embargo a lo largo del desarrollo embrionario se han descrito cambios en la expresión de la proteína Ski. Un primer incremento de Ski ocurre entre el día intrauterino 8.5-9.5 y un segundo incremento sucede entre los días 12.5 y 15.5. El primer incremento de Ski correlaciona con el cierre del tubo neural y con la migración de las células en la cresta neural, mientras que el segundo incremento correlaciona con el desarrollo del músculo esquelético. Estos estudios concuerdan con el fenotipo letal mostrado en los ratones knockout para *ski*, debido a una exencefalia y

una falla en el cierre del tubo neural con anomalías esqueléticas, así como un decremento marcado en la masa muscular (Berk et al., 1997).

Para el caso de la proteína SnoN se han descrito tres tipos de ratones *knockout*. De manera similar a Ski, el fenotipo es letal para los ratones *sno* $-/-$. Sin embargo el fenotipo es distinto pues estos ratones mueren en un estado más temprano del desarrollo, en el día intrauterino 3.5 antes de la formación del blastocisto (Shinagawa et al., 2000). Mientras que en el caso del ratón heterocigoto para *sno* $+/-$, muestra una hipersensibilidad a carcinógenos químicos, desarrollando linfomas espontáneos, en comparación con el fenotipo silvestre ($+/+$). Este último modelo sugiere que la proteína SnoN funciona como un supresor de tumores en ciertos tipos celulares (Shinagawa et al., 2000).

La función de Ski y SnoN en tejidos adultos.

Las proteínas Ski y SnoN se expresan en todos los tejidos adultos, usualmente en bajos niveles. La función de Ski y SnoN se ha descrito en procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la senescencia celular.

La sobreexpresión de las proteínas Ski y SnoN es relevante en los procesos de diferenciación muscular (Colmenares y Stavnezer 1990). Un modelo en ratones transgénicos muestra que la sobreexpresión de Ski induce una hipertrofia muscular, mientras que la proteína Ski modula la expresión de genes específicos de músculo como MyoD (Deheuninck y Luo 2009).

En un reporte de Ikeuchi y colaboradores se describe a SnoN como un regulador en el crecimiento axonal. Una disminución de la proteína SnoN en células de la granulosa, modula la expresión de genes, formando complejos

con el activador transcripcional p300. En este modelo SnoN puede funcionar como un coactivador transcripcional durante el crecimiento axonal (Ikeuchi et al., 2009).

La proteína Ski funciona como un regulador en la proliferación y mielinización de las células de Schwann. Durante la mielinización celular los niveles de Ski aumentan, mientras que una expresión baja de Ski resulta en una inhibición de la mielinización (Atanasoski et al., 2004).

La proteína SnoN participa en el proceso de senescencia celular. Se ha observado que la sobreexpresión de SnoN induce senescencia prematura a través de la interacción con p53 y la proteína PML (*promyelocytic leukaemia protein*). La forma mutante de SnoN que no interacciona con las proteínas Smads, muestra una disminución en la formación de tumores inducida por carcinógenos químicos en ratones inmunosuprimidos. SnoN regula el proceso de senescencia de una manera independiente de las Smads, pero dependiente de p53. (Pan et al., 2009).

La expresión de las proteínas Ski y SnoN puede ser alterada por otras condiciones biológicas como la cicatrización, la regeneración hepática y la nefropatía obstructiva (Deheuninck y Luo 2009). En el caso de la regeneración hepática, los hepatocitos muestran una resistencia al efecto antiproliferativo del TGF- β . Estos hepatocitos muestran que la señalización de las R-Smads es activada en respuesta al TGF- β , así como una elevación marcada de las proteínas Ski y SnoN. Probablemente la expresión aumentada de Ski y SnoN pueda explicar la resistencia de los hepatocitos al efecto antiproliferativo del TGF- β (Macías-Silva et al., 2002).

La importancia de Ski y SnoN en la progresión del cáncer.

Los primeros estudios de Ski y SnoN en la transformación oncogénica en fibroblastos de pollo, correlacionan con una expresión elevada de Ski y SnoN en distintos tipos de cáncer, entre los cuáles destacan el cáncer esofágico, melanoma, cáncer de mama, cáncer colorectal y linfoma. El gen *sno* se localiza en el cromosoma 3q26.2 un locus frecuentemente amplificado en tumores de cáncer de pulmón, esófago, cérvix, ovario y próstata.

Estudios *in vivo* han explorado el papel oncogénico y supresor de tumores de la proteína SnoN. Un modelo en ratones inmunosuprimidos que fueron inyectados con células transformadas que sobreexpresan SnoN, muestra la formación de tumores *in vivo*. Mientras que la inyección de estos ratones con células que no expresan SnoN, se observó la inducción de metástasis en hueso y pulmones del ratón desnudo. Los autores muestran que en el caso de Ski, no tiene efecto en la actividad transformante de las mismas células derivadas de cáncer de mama y pulmón. El papel pro-oncogénico de Ski se restringe a ciertos tipos celulares (Zhu et al., 2007).

Regulación de las proteínas Ski y SnoN por la degradación vía el proteosoma 26S.

Los componentes de la vía de señalización del TGF- β son controlados por el Sistema Ubiquitina-Proteosoma. El proteosoma 26S es un sistema celular involucrado en la destrucción proteolítica de una amplia gama de proteínas

como receptores, reguladores transcripcionales, cinasas, etc. (Izzi y Attisano, 2004; Shang et al., 2002; Glasgow y Mishra, 2008). La degradación proteolítica por la vía del proteosoma 26S comprende la reacción de ubiquitinación (la unión covalente de cadenas de ubiquitina) en la proteína blanco. La ubiquitinación es mediada por al menos 3 enzimas: 1) La enzima activadora de ubiquitina (E1); 2) La enzima conjugadora de la ubiquitina (E2); y 3) la ligasa de ubiquitina (E3). Las ligasas de ubiquitina E3 son enzimas cruciales en el reconocimiento específico de las proteínas blanco. Se ha reportado que la desregulación funcional de estas enzimas, esta asociada a padecimientos como el cáncer. (Briones-Orta et al., 2013)

La estabilidad de las proteínas Ski y SnoN es controlada principalmente por el TGF- β , la citocina induce una degradación rápida *vía* proteosoma 26S, mientras que tratamientos largos con TGF- β estimulan un incremento en los niveles de la proteína y el mRNA de SnoN. Esta regulación dual de la proteína SnoN promueve un mecanismo de retroalimentación negativa en la señalización del TGF- β (Stroschein et al., 1999) (Figura 3).

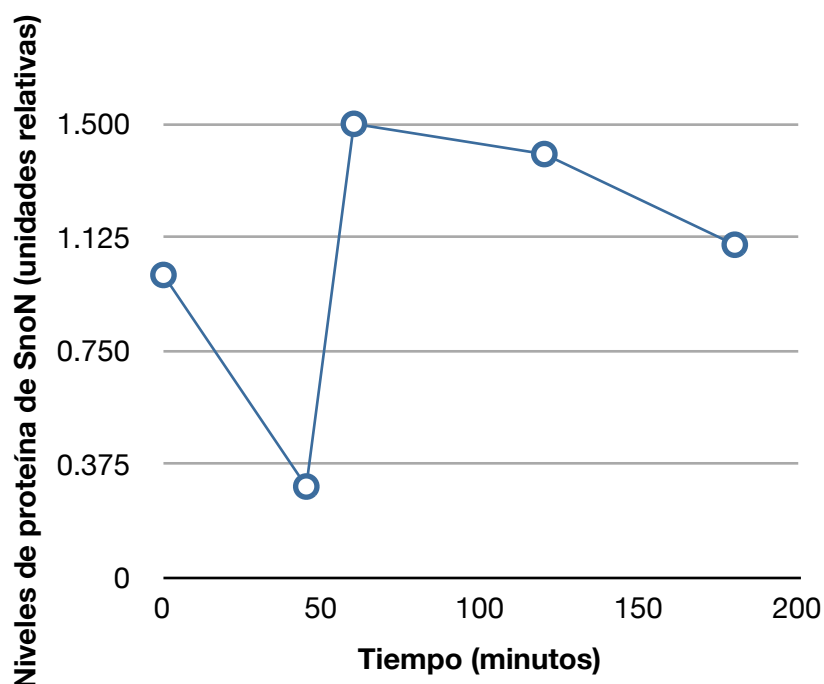


Figura 3. El TGF- β induce un comportamiento bifásico en la proteína SnoN. TGF- β induce la degradación de los niveles de proteína a tiempos cortos (30-45 minutos) e incrementando los niveles de la proteína en tiempos largos (60-120 minutos). La reducción en los niveles de proteína de SnoN es producto de una degradación vía el proteosoma 26S, mientras que el incremento es debido a un aumento en el mRNA y la traducción de la proteína SnoN. (Figura adaptada de Briones-Orta et al., 2006)

Actualmente se conoce con detalle el mecanismo de degradación de SnoN y Ski inducido por TGF- β . Este mecanismo depende de la activación de las proteínas Smads y de la actividad proteolítica vía el proteosoma 26S (Figura 4). En el caso de la proteína SnoN se han descrito tres ligasas de Ubiquitina E3; la proteína Smurf2, el complejo APC/Cdh1 y Arkadia (Figura 4).

Smurf2 es una ligasa de ubiquitina tipo E3 perteneciente a la familia HECT que se caracteriza por los dominios WW, estructuras clave para el reconocimiento del sustrato. Smurf2 interacciona con Smad2 uniéndose al motivo PY de la región linker de pSmad2. El mecanismo de degradación de la proteína SnoN es mediada por la interacción indirecta con Smurf2, a través de las proteínas R-Smads fosforiladas por TGF- β . (Bonni et al, 2001).

El complejo APC/Cdh1 es una ligasa de ubiquitina tipo E3 implicada en la regulación del ciclo celular. Cdh1 es una proteína asociada con APC, que funciona como un activador dependiente del sustrato y del ciclo celular (Stroschein et al., 2001). De manera similar Smad3 promueve la interacción entre APC/Cdh1 y SnoN, para la degradación del correpresor vía el proteosoma 26S.

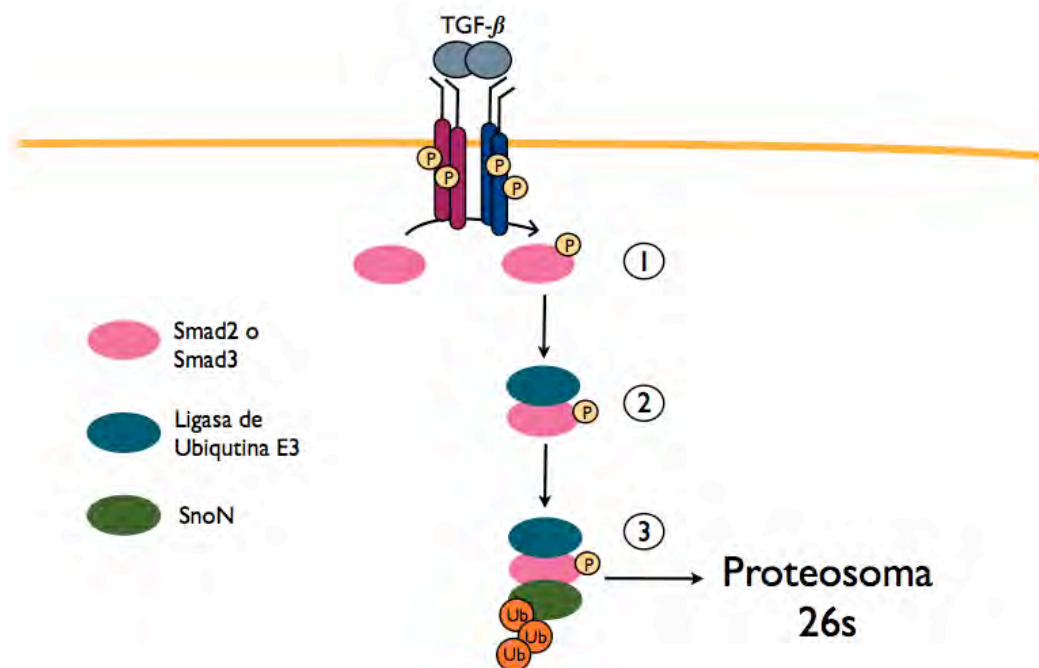


Figura 4. Mecanismo de degradación de la proteína SnoN mediada por TGF-β vía el proteosoma 26S. En la figura se señala diversas ligasas de ubiquitina para inducir la degradación de la proteína SnoN (Arkadia, APC/Cdh1 y Smurf2) a través de la interacción con las proteínas Smads. Una vez que la señal del TGF-β induce la formación del complejo de receptores, las proteínas Smads son fosforiladas (1). Tanto Smad2 como Smad3 en su forma fosforilada, tienen la capacidad de adaptar ligasas de ubiquitina al complejo con la proteína SnoN (2). Una vez que la proteína SnoN se incorpora al complejo pSmad/Ligasa de Ubiquitina, SnoN es poli-ubiquitinado y degradado por proteólisis vía el proteosoma 26s (3).

Arkadia fue identificada como otra ligasa de ubiquitina E3 involucrada en la degradación de las proteínas Ski/SnoN. Esta ligasa de ubiquitina fue

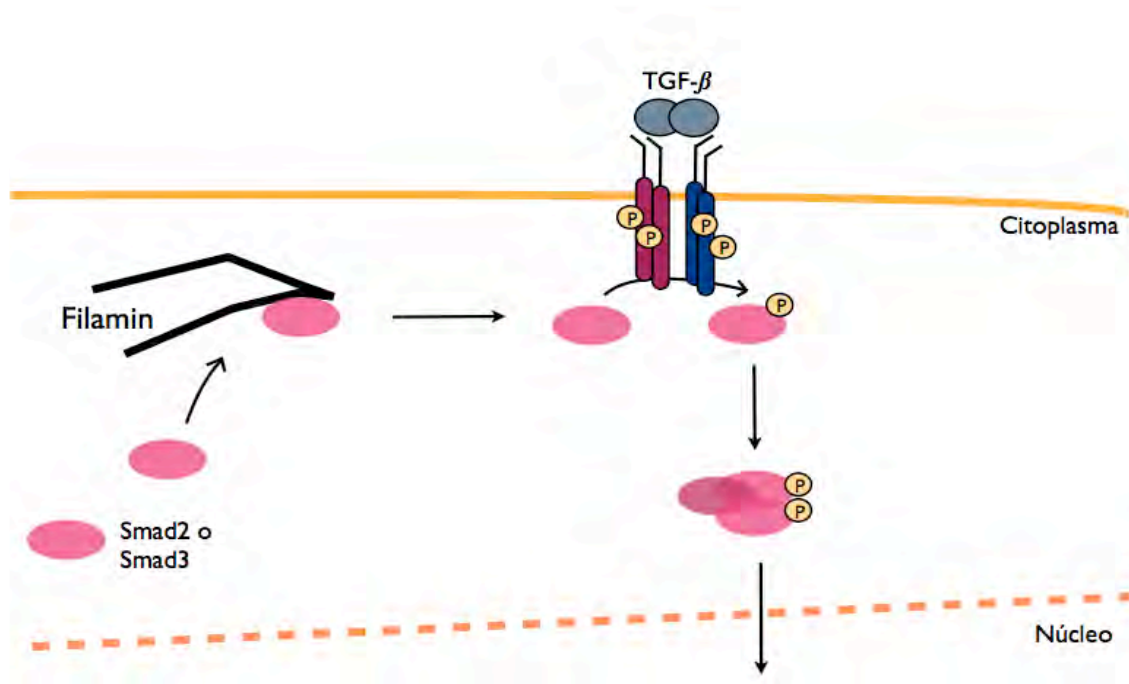
identificada mediante la utilización de una biblioteca de iRNA. Al igual que las proteínas Smurf2 y el complejo APC/Cdh1, Arkadia requiere de las proteínas Smad2/3 fosforiladas por TGF- β para inducir la degradación de las proteínas SnoN/Ski. Sin embargo se ha observado que Arkadia, puede interactuar con la proteína SnoN de manera basal de manera independiente del estímulo con TGF- β (Levy et al., 2007).

La fosforilación por la proteína TAK1 (*TGF-beta activated kinase 1*) regula la estabilidad de la proteína SnoN. TAK1 es una cinasa que fosforila a SnoN en respuesta a TGF- β , promoviendo la degradación vía el proteosoma. TAK1 es un miembro de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKKK), que funciona como un intermediario en distintas vías de señalización, incluyendo la vía del TGF- β . TAK1 es activada catalíticamente en respuesta a TGF- β , activando la MAPK p38. TAK1 también participa en distintos procesos biológicos mediados por TGF- β , como la apoptosis y el desarrollo vascular. Los sitios de fosforilación de SnoN por TAK1 son residuos de serinas y treoninas: Ser-115, Ser-117 y Thr-119. Sin embargo se ha sugerido que existen otros sitios posibles de fosforilación en SnoN (Kajino et al., 2007).

Otros mecanismos de regulación en la señalización del TGF- β .

Un mecanismo de regulación en la señalización del TGF- β fue descrito en un modelo de células de melanoma humano (células M2) que no expresan la filamina A (FLNa). La FLNa es un componente importante en la señalización del TGF- β /Smads. Esta proteína de citoesqueleto tiene dominios de interacción

con las proteínas Smads, funcionando como andamio y permitiendo que las Smads sean fosforiladas por el receptor T β RI (Sasaki et al., 2001).



a a

(FLNa). FLNa es una proteína de andamiaje que interactúa con el dominio MH1 de las R-Smads, esta interacción es necesaria para la fosforilación de las Smads por el complejo de receptores activos. La presencia de FLNa también es necesaria para la formación de los complejos activos de Smads así como su traslocación al núcleo. (Figura adaptada de Sasaki et al., 2001)

Las células M2 estimuladas con TGF- β (carentes de FLNa) no muestran la activación de las R-Smads por el receptor T β RI, así como la formación de los complejos activos de las Smads y su traslocación al núcleo. Sin embargo en el caso de las células A7 (expresión de FLNa reconstituida) la señal TGF- β /Smads es recuperada (Figura 5).

Las Smads inhibitorias (I-Smads) son otro punto de regulación en la señalización de la superfamilia del TGF- β , Smad7 es el miembro prototipo del

ligando TGF- β . Las I-Smads se caracterizan por tener un dominio MH1 más corto en comparación con las R-Smads/Co-Smads, este dominio MH1 de unión al DNA caracteriza a las R-Smads y Co-Smads. El dominio MH2 en la proteína Smad7 carece del motivo de fosforilación de serinas (SSXS) característico importante de las proteínas R-Smads.

El mecanismo de inhibición por la proteína Smad7 es a través de la unión de Smad7 con el dominio de cinasa del receptor T β RI, inhibiendo la fosforilación de las R-Smads y bloqueando la señal del TGF- β (Figura 6).

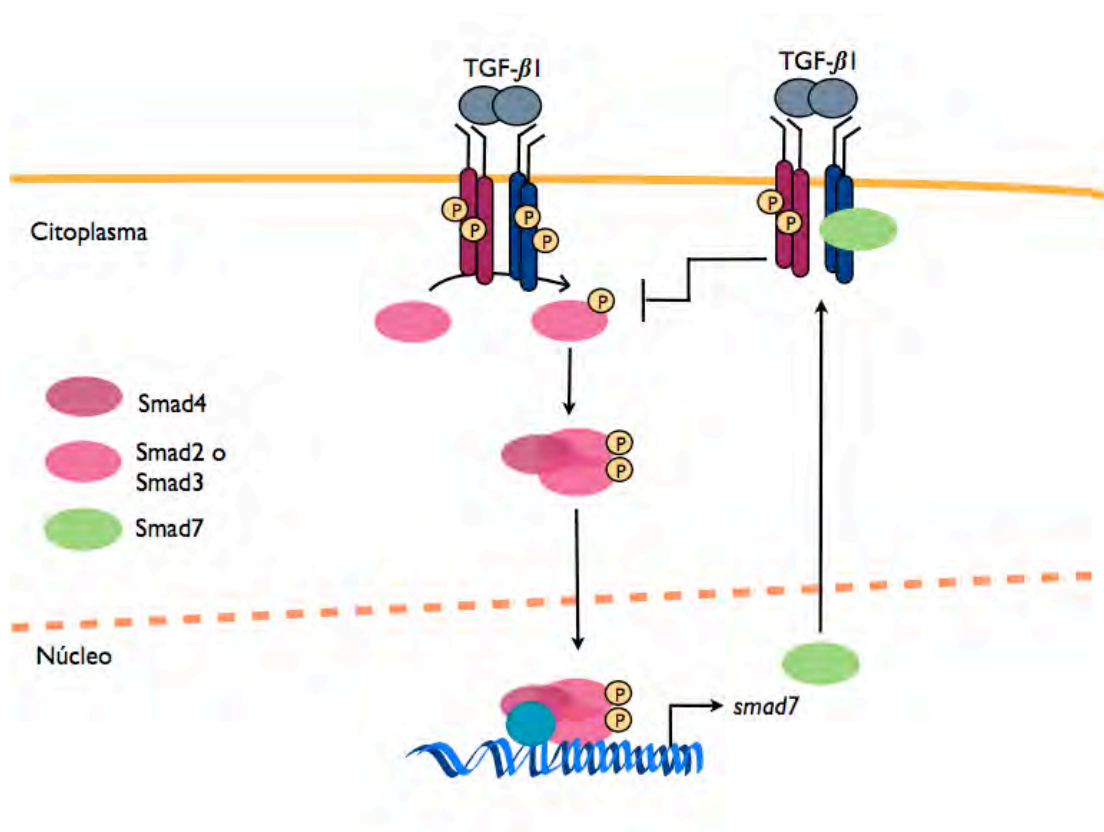


Figura 6. El mecanismo de retroalimentación negativa por Smad7 en la señalización del TGF- β . La señal del TGF- β /Smads induce la expresión del gen *smad7*. La expresión en los niveles de proteína de Smad7 aumenta y la proteína interacciona con el receptor T β RI impidiendo la fosforilación de las R-Smads, apagando la señal del TGF- β .

La proteína Smad7 también muestra un mecanismo de retroalimentación negativa para inhibir la señal del TGF- β , mediante la expresión del gen *smad7*

en respuesta al estímulo con TGF- β . En estado basal se observa la represión transcripcional del promotor de *smad7* por las proteínas Ski y SnoN, inhibiendo su expresión. En respuesta a TGF- β las proteínas Ski y SnoN son degradadas, permitiendo la transcripción del transcrito de *smad7* por las Smads (Briones-Orta et al., 2011).

La proteína Smad7 también puede reclutar ligasas de ubiquitina tipo E3 (Smurf1/2 o Nedd4-2) en el complejo de receptores, promoviendo la ubiquitinación de los receptores y su posterior degradación vía el proteosoma (Inoue et al., 2008).

La anisomicina es un antibiótico con múltiples efectos en la señalización celular.

La anisomicina es un compuesto que inhibe la síntesis de proteínas en organismos eucariotes (Barbacid y Vázquez 1973). Este antibiótico aislado de cultivos de *Streptomyces griseus* es tóxico en la mayoría de los eucariotes. La principal característica de anisomicina es la inhibición la síntesis de proteínas, bloqueando la actividad de peptidil-transferasa de la subunidad 60S del ribosoma eucariote, bloqueando la formación del enlace peptídico, previniendo la elongación y causando una estabilización del polirribosoma (Sobin et al., 1954). Se ha descrito que ciertas regiones de anisomicina mimetizan el extremo 3' del aminoacil-tRNA, durante el estado de transición en la formación del enlace peptídico. La anisomicina se une al ribosoma interfiriendo con la unión del aminoacil-tRNA y el movimiento del ribosoma. También es posible

que anisomicina se una a otros sitios del ribosoma, además del sitio de peptidil-transferasa (Iannou et al., 1998).

La anisomicina es un antibiótico pirrólico, su nombre químico es 2-*p*-metoxifenilmetil-3-acetoxi-4-hidroxipirrolidina. El anillo pirrólico de anisomicina es necesario para la inhibición de síntesis de proteínas. La acetilación o desacetilación del nitrógeno en la posición 3' del anillo pirrólico mantiene la molécula de anisomicina inactiva. El grupo acetilo en la posición 3' del anillo pirrólico también es importante en la señalización de MAPK/SAPK mediada por el estrés ribotóxico. Se ha descrito que la forma deacetil-anisomicina no promueve la inhibición de la síntesis de proteínas ni la activación de MAPK/SAPK por estrés ribotóxico (Radulovic y Tronson 2008).

La bacteria *Streptomyces* produce otros antibióticos como cicloheximida, puromicina e higromicina. Puromicina es un aminonucleósido que inhibe la síntesis de proteínas y bloquea la fase de elongación en el ribosoma eucariote. Tanto puromicina como cicloheximida inducen la activación de las MAPK/SAPK. La higromicina y G418 son aminoglucósidos que bloquean la síntesis de proteínas en eucariotes y procariotes, pero no activan las MAPK (Hansen et al., 2003) (Ver Tabla 2)

Tabla 2. Características y mecanismos de acción de algunos antibióticos.

	Anisomicina	Puromicina	Cicloheximida	G418	Higromicina
Compuesto	Pirrólico	Piperidona	Aminonucleósido	Aminoglicósido	Aminoglicósido
Mecanismo de acción	Se une a la Subunidad 60s del ribosoma, bloqueando la actividad de peptidil transferasa.	Mimetiza el extremo amino de un tRNA, bloqueando el sitio A del ribosoma	Bloquea el proceso de traslocación ribosomal	Interfiere con el reconocimiento del aminoacil-tRNA, bloqueando el sitio A del ribosoma	Bloquea la traslocación ribosomal
Sustrato	Ribosoma eucariote	Ribosoma eucariote y procarote	Ribosoma eucariote	Ribosoma eucariote y procarote	Ribosoma eucariote y procarote
Origen	Streptomyces griseus	Streptomyces griseus	Streptomyces griseus	Micronospora rhodorangea	Streptomyces

La inhibición de síntesis de proteínas por antibióticos y el estrés ribotóxico.

El estrés ribotóxico es una respuesta celular a las ribotoxinas que perturban el funcionamiento del extremo 3' del rRNA 28S y como consecuencia la función ribosomal. Durante la síntesis de proteínas esta región en el ribosoma tiene una función importante en la interacción con el aminoacil-tRNA, la actividad de peptidil-transferasa y la traslocación ribosomal. Dependiendo del tipo celular estas toxinas activan MAPK como JNK, p38 y ERK1/2. (Laskin *et al.*, 2002)

Los xenobióticos son un grupo de agentes químicos, que modulan repuestas en la señalización celular. Algunos xenobióticos actúan como inhibidores de la actividad del ribosoma. Estos compuestos son ribotoxinas ampliamente estudiadas y obtenidas en gran parte de organismos como plantas, hongos y bacterias. El detalle del mecanismo de acción de estos compuestos aún no ha sido resuelto por completo (Laskin *et al.*, 2002)

La fase inicial del estrés ribotóxico por los xenobióticos es a través de la unión con el extremo 3' del rRNA 28S. La inhibición de la síntesis de proteínas *per se* no activa MAPK como JNK y p38. Los antibióticos G418 o higromicina inhiben la síntesis de proteínas sin la activación de MAPK (Laskin et al., 2002).

La anisomicina fue caracterizada de manera inicial como un potente activador de la cinasa JNK. Anisomicina requiere de ribosomas activos para la activación de MAPK. Algunos inhibidores de la síntesis de proteínas bloquean la activación de MAPK por anisomicina. En estas condiciones cuando el ribosoma es bloqueado por otros inhibidores de la síntesis de proteínas, anisomicina no puede estimular la activación de MAPK (Iordanov et al., 1997).

La palitoxina es una toxina marina que funciona como un inductor del estrés ribotóxico de manera distinta, sin la unión directa del compuesto a los ribosomas. La palitoxina induce una respuesta ribotóxica al unirse a la ATPasa Na⁺/K⁺ en la membrana celular y aumentando el flujo de potasio de las células. El extremo 3' del rRNA 28S posee un sitio sensible a K⁺, niveles bajos de este catión inhiben la actividad funcional, mimetizando el efecto ribotóxico de compuestos como ANS (Iordanov *et al.*, 1998)

La activación de MAPK/SAPK por anisomicina.

Las MAPK son una familia de cinasas que fosforilan residuos de serinas y treoninas en respuesta a factores mitógenos (EGF, PDGF, VEGF) y a otros estímulos celulares mediado por diversos factores. Los miembros de esta familia incluyen ERK1/ERK2 (*extracelular signal-regulated kinase*), las SAPK

(*stress-activated protein kinases*) SAPK1 y JNK, así como la cinasa p38 (SAPK2/p38).

Entre los principales estímulos que inducen la activación de SAPK se encuentran la exposición a radiación UV, choque osmótico, estrés oxidativo, citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, agentes de daño a DNA, antibióticos, xenobióticos, toxinas y promotores de tumores, entre otros (Ouyang et al., 2005).

La activación de MAPK por factores de crecimiento como EGF es un mecanismo de señalización celular a través de receptores específicos y la activación de proteínas de unión a GTP, como Ras y una cascada de señalización por MAPK (Igishi et al., 1999).

Aún no es claro que moléculas están involucradas en el mecanismo de acción de anisomicina en la activación de MAPK. Estudios de Coso y colaboradores con mutantes dominantes negativas de Ras, RhoA, Rac1 y Cdc42 determinaron que las proteínas G pequeñas no están involucradas en la activación de MAPK por ANS (Coso et al., 1995).

La anisomicina estimula la activación de las proteínas MAPK de manera independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas. Evidencias experimentales muestran que la inhibición de síntesis de proteínas *per se* no parece activar MAPK. La anisomicina es un potente agonista de MAPK a concentraciones $<3 \mu\text{M}$, inhibiendo una tasa del 50% de la síntesis de proteínas total (Iordanov et al., 1997).

Un tratamiento de anisomicina con dosis subinhibitorias de la síntesis de proteínas, induce la desensibilización homóloga en la activación de MAPK y la expresión de genes tempranos (*c-fos*, *c-jun*, *fos-B*, *junB*, *junD*). La anisomicina se comporta como un agonista en la activación de MAPK (Hazzalin et al., 1998). La anisomicina activa otras vías de señalización como PI3K, AKT, IRS, NFκB, ROS, S6 p70/p85S6K, eE2F cinasa, PPARγ, HSF1, y HDAC1. Algunas de estas vías son moduladas por la activación de MAPK por anisomicina (Macías-Silva M. et al., 2010).

La regulación en la expresión de genes es otro de los efectos de anisomicina y otros antibióticos. La superinducción de genes es un fenómeno caracterizado por un aumento prolongado en la expresión de genes tempranos, que usualmente son inducidos transitoriamente. Existen distintos mecanismos que contribuyen a la superinducción de genes como el incremento en la estabilidad del mRNA, el aumento en la tasa de transcripción, el decremento en la síntesis de represores transcripcionales y la estimulación de respuestas nucleares. La anisomicina, ciclohexomida y puromicina superinducen genes tempranos como *c-fos* y *c-jun*. La anisomicina induce la expresión de genes tempranos a dosis muy bajas (0.1–1 μM), que son potencialmente más bajas que las requeridas para bloquear la traducción de proteínas (1-10 μM). En algunos casos la superinducción de genes depende de la activación de MAPK y/o del estrés ribotóxico causado por anisomicina.

Usos terapéuticos de la anisomicina.

La anisomicina es una molécula que sensibiliza células tumorales promoviendo procesos de apoptosis y anoikis. Se ha reportado que la anisomicina puede afectar mecanismos pro y antiapoptóticos dependiendo de la concentración utilizada. Por ejemplo en la línea celular PC12 proveniente de un feocromocitoma, dosis de anisomicina menores a $0.1 \mu\text{M}$ promueven la inducción de las proteínas anti-apoptóticas Akt y Bcl-2. Sin embargo las células tratadas con dosis de anisomicina mayores a $0.1 \mu\text{M}$ bloquea la activación de Akt por el factor de crecimiento nervioso. En algunos tipos celulares dosis de anisomicina mayores a $0.1 \mu\text{M}$ promueven la apoptosis al activar SAPK, previniendo la sobrevivencia y modulando la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bim y FLIP.

La anisomicina también activa la maquinaria apoptótica mitocondrial promoviendo la activación de las caspasas 3/8 y la liberación del citocromo C, así como la transcripción de grupos de genes asociados. Este grupo de genes modulados por anisomicina están relacionados con la muerte celular, cáncer y regulación de la expresión genética (Hori et al., 2008).

La anisomicina es un potente inductor de la anoikis, un tipo de muerte celular asociada con el desprendimiento de la célula al sustrato o matriz. En algunas células malignas resistentes a quimioterapia la anisomicina induce la anoikis. Este proceso está asociado a la activación de la caspasa 8 y con la inhibición de la proteína FLIP, de una manera dependiente de JNK y p38. La inducción de la anoikis por anisomicina fue capaz de reducir el potencial metastásico de estas células inyectadas en ratones (Curtin y Cotter 2002).

Rúller y colaboradores describen otro uso de anisomicina para inducir la muerte de células cancerosas, en un modelo de transplantes en ratones inmunosuprimidos. La anisomicina induce la sensibilización de células tumorales resistentes a quimioterapia y al factor de necrosis tumoral. El estudio demostró que en conjunto con otros compuestos anisomicina induce la muerte celular de células cancerosas, disminuyendo el tamaño de tumores con pocos efectos colaterales en otros tejidos y órganos.

Anisomicina induce la degradación de proteínas vía el proteosoma 26S.

Anisomicina es también un modulador en la degradación de distintas proteínas vía el sistema ubiquitina proteosoma (UPS), en algunos casos el mecanismo es dependiente de la señalización por las MAPK. Algunas de las proteínas que son reguladas por este antibiótico son la proteína fosfatasa M3/6, conexina43 (Cx43), el receptor AhR y el receptor de EGF. La degradación de estas proteínas por anisomicina puede depender de la activación de distintos subtipos de MAPK (JNK, p38 y ERK1/2). En el caso de la proteína M3/6 el mecanismo de degradación de la fosfatasa, depende de la señal de JNK y SEK-1 activadas por anisomicina. En el caso de la proteína Cx43 la activación de p38 por anisomicina promueve una reducción de las formas fosforiladas de Cx43 en células epiteliales de hígado. Estos ejemplos ilustran los diversos efectos que puede ejercer anisomicina en la célula, además de la inhibición de la síntesis de proteínas. (Ogawa et al., 2004; Theodiosiou et al., 2002; Joiakim et al., 2004).

Antecedentes directos

La degradación de las oncoproteínas Ski y SnoN en respuesta a anisomicina.

La anisomicina es un inductor de la degradación de proteínas vía el proteosoma 26S, Vázquez-Macías y colaboradores reportaron un mecanismo de degradación para las proteínas Ski y SnoN de manera independiente de la señalización por TGF- β /Smads, pero dependiente de la actividad del proteosoma (Vázquez-Macías et al., 2005). La degradación de Ski y SnoN por anisomicina en ciertos tipos celulares, sugiere un mecanismo dependiente de la expresión de factores asociados al contexto celular (Ver tabla 3).

Tabla 3. Resumen de las características del mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por anisomicina. (Vázquez-Macías et al., 2005)

Dependiente	Independiente
Contexto celular (células A549, HeLa)	Activación de MAPK
Sistema Proteosoma 26S	Inhibición de la síntesis proteínas
Dosis	

El tratamiento con anisomicina 10 μ M induce un decremento del 90% en los niveles de las proteínas Ski/SnoN, a partir de los 15 minutos de estímulo, observándose un máximo efecto a partir de los 30 minutos de tratamiento. El efecto de degradación de las proteínas Ski/SnoN por anisomicina es un proceso reversible.

Una de las características del mecanismo de degradación de Ski/SnoN por anisomicina, es el requerimiento de la actividad catalítica del proteosoma 26S. Experimentos en presencia del inhibidor del proteosoma MG132 bloquean el efecto de anisomicina sobre las proteínas Ski y SnoN. Al contrario

del efecto bifásico en la proteína SnoN por TGF- β , anisomicina provoca un efecto sostenido sobre las proteínas Ski/ SnoN (Vázquez-Macías., et al 2005).

El tratamiento con anisomicina no modula la fosforilación de las R-Smads. Sin embargo la degradación de la proteína SnoN es llevada a cabo en presencia del estímulo con TGF- β . La señal de anisomicina no interfiere con la fosforilación de Smad2 promovida al TGF- β , modulando la degradación de la proteína SnoN en presencia de la citocina. La reducción de las proteínas Ski y SnoN por anisomicina es más potente que el efecto inducido por TGF- β (Vázquez-Macías et al., 2005).

Experimentos realizados con inhibidores específicos de MAPK muestran que la activación de MAPK no está implicada en la degradación de las proteínas Ski y SnoN por anisomicina (Vázquez-Macías et al., 2005).

Hipótesis

El receptor T β RI y FLNa participan en la degradación de las proteínas Ski/SnoN inducido por anisomicina.

Objetivo General

Estudiar el mecanismo mediante el cual el T β RI y la FLNa participan en la degradación de las proteínas Ski/SnoN inducida por anisomicina.

Objetivos particulares

- 1.- Estudiar la implicación de los componentes de la vía del TGF- β , en el mecanismo de acción utilizado por la anisomicina para disminuir los niveles de la proteína SnoN.
- 2.- Estudiar el papel de la inhibición de la síntesis de proteínas, en el mecanismo de acción utilizado por anisomicina para disminuir los niveles de la proteína SnoN.
- 3.- Estudiar el efecto de la anisomicina sobre la estabilidad del corregulador transcripcional SnoN en la señalización por TGF- β .

Materiales y métodos

Líneas celulares

Las células AD293, HepG2 y HeLa se mantuvieron en medio DMEM complementados con 10% de suero fetal bovino (FBS) más antibióticos (penicilina y estreptomycin). La línea celular A549 fue mantenida en medio HAM'S F12 complementado con 10% de FBS más antibióticos (penicilina y estreptomycin). Las líneas Mv1Lu y L17 provenientes de epitelio de visón fueron mantenidas en medio MEM suplementado con 10% FBS más antibióticos (penicilina y estreptomycin).

La línea de melanoma humano M2 fue mantenida en medio MEM complementado con 8% de FBS y 2% NCS (suero de ternera), mientras que la clona A7 se mantuvo en las mismas condiciones de cultivo en presencia del antibiótico G418 (50 mg/ml).

Reactivos

El TGF- β recombinante humano fue obtenido en Pepro Tech (Rocky Hill, NJ). Los antibióticos ANS, CHX, PURO, G418 e higromicina fueron adquiridos en Sigma (St Louis, MO). El ácido okadaico y todos los inhibidores del receptor T β RI; SB431542, LY364947, D4476 y A8302, fueron obtenidos de Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Todos los inhibidores fueron disueltos en DMSO como vehículo. Todos los medios de cultivo fueron de la casa Comercial Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA).

Anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales de conejo: anti-SnoN (H-317), anti-Ski (H-329) anti-Smad2/3 (N-19), anti-lamina B1 (H-90), anti- β -actina fueron adquiridos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-p-p38, anti-p38, anti ERK 1/2 y anti-p-ERK 1/2 fueron de Cell Signaling (Boston, MA). Los anticuerpos anti-pSmad2 y anti-pSmad3 fueron de Chemicon/Millipore (Billerica, MA).

Plásmidos.

Los plásmidos pRS y shRNA utilizados para el depletamiento del receptor T β RI (Número de catálogo TR200003, ID T1379412 T1379413) fueron obtenidos de Origene Tech. Inc. El plásmido p-RetroSuper-GFP/Smad2 fue obtenido de Origene (Plásmido No. 15722). El gen reportero 3TP-lux y pCMV/ β -galactosidasa fueron utilizados para los ensayos de luciferasa.

Estimulación celular con TGF- β y otros compuestos.

Para la estimulación celular se retiró el medio de cultivo, se hicieron dos lavados con medio de ayuno (suplementado al 0.2% de FBS más antibióticos) Las células fueron ayunadas de 3-5 horas. Posteriormente se sustituyó con medio fresco de ayuno y se estimulo con el TGF- β o compuesto a la concentración adecuada y por el tiempo de tratamiento indicado.

Transfecciones y generación de líneas estables.

El método de transfección utilizado en este trabajo fue mediante transfecciones con el compuesto Lipofectamina 2000 de la casa comercial

Invitrogene (Carlsbad, CA), utilizando las especificaciones de la compañía. La generación de las líneas AD293/pRS, A549/pRS, resistentes a la PURO fueron seleccionadas con 10µg/ml del antibiótico y posteriormente llevadas en cultivo con 1 ug/ml de PURO.

Fraccionamiento celular

El protocolo para obtener la fracción nuclear y la fracción citoplasmática, fue modificada de un protocolo previamente descrito (Grewal et al., 2000). Las células fueron lavadas en un buffer de homogenización (3mM de Imidazol pH 7.4, 250 mM de sacarosa, más inhibidores de proteasas y fosfatasa) que fue pasado a través de una jeringa de 10-22 veces. El homogeneado se centrifugó a 1073 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante contiene la fracción citosólica y la pastilla la fracción nuclear. La pastilla fue lisada en un buffer de RIPA (50mM de 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% desoxicolato de sodio, 1% Nonidet y 0.1% SDS) por 15 min a 4°C, y después centrifugado a 18 188 g por 5 min. Los extractos nucleares de cada fracción fueron utilizados para los ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos como se detalla en cada experimento.

Purificación de proteínas por inmunoprecipitación.

Después de la estimulación, las células se lavaron con 5 ml de PBS 1X frío. Las células se lisan con 0.4 ml de buffer TNTE 0.5% frío conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras se mantuvieron en frío durante toda esta parte del experimento. Las células se rasparon y el extracto celular se transfirió a microtubos, y se incubaron por 15 min a 4°C en agitación continua. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 5

min. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos que contenían el anticuerpo específico para la inmunoprecipitación y se incubaron a 4°C toda la noche en agitación continua. Para la inmunoprecipitación se incubaron las muestras con 50 µl de proteína G acoplada a sefarosa (Upstate) en agitación continua a 4 °C por 2 h. Las muestras se centrifugaron y los pellets se lavaron tres veces con TNTE 0.1% en frío. Posteriormente se resuspendieron los pellets en 25 µl de solución Laemli 2x y se hirvieron por 3 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

SDS PAGE y Western Blot

Las muestras se sometieron a una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE, poliacrylamide gel electrophoresis), en geles al 7.5% en el caso de las inmunoprecipitaciones, y al 10% para los extractos totales. Los geles se corrieron a 100 Volts durante 3 h. Las muestras de proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. El procedimiento se realizó en frío, en una cámara húmeda de BioRad a 100 Volts por 1 h. Posteriormente las membranas son bloqueadas con una solución al 5% de leche libre de grasas en TBST-1X por una hora en agitación continua a temperatura ambiente. Las membranas son incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación continua a una temperatura de 4°C. Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano y se utiliza como sustrato el reactivo de quimioluminiscencia (Pierce) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Ensayo de Luciferasa.

Para los ensayos de luciferasa inducibles por TGF- β , se utilizaron células AD293 que expresan de manera estable el plásmido reportero 3TP-lux. Las células fueron sembradas a una confluencia del 60% en placas de 12 pozos. Las células fueron pretratadas con o sin puromicina (1 ug/ml) y luego tratadas por 12 h con TGF- β 100 pM. Después fueron lisadas (Promega) y la actividad de luciferasa fue medida en un luminómetro (Turner Biosystems). Una forma mutante de SnoN (HA-UbmSnoN) fue transfectada transitoriamente en las células AD293 por el método de fosfato de calcio.

Ensayos de RT-PCR.

Los niveles de mRNA de Smad7 y β -actina fueron detectados por RT-PCR utilizando los primers previamente descritos en el laboratorio (Briones-Orta et al., 2006). En breve el RNA total fue aislado mediante el método de TRIzol (INVITROGEN). Las células son lisadas en el volumen recomendado por la casa comercial a temperatura ambiente. El RNA total (2 ug) fue usado para la síntesis de cDNA utilizando hexámeros al azar y la enzima M-MLV RT (Invitrogen). La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando el kit Taq-PCR master mix (Quiagen) utilizando primers específicos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

Resultados

La degradación de SnoN por anisomicina depende del contexto celular.

Se conoce el efecto específico de anisomicina sobre las proteínas Ski y SnoN en líneas celulares específicas. Su efecto se ha reportado en distintos tipos celulares como en células HeLa y A549, mientras que el tratamiento con anisomicina en células HepG2 no tiene efecto sobre las proteínas Ski y SnoN.

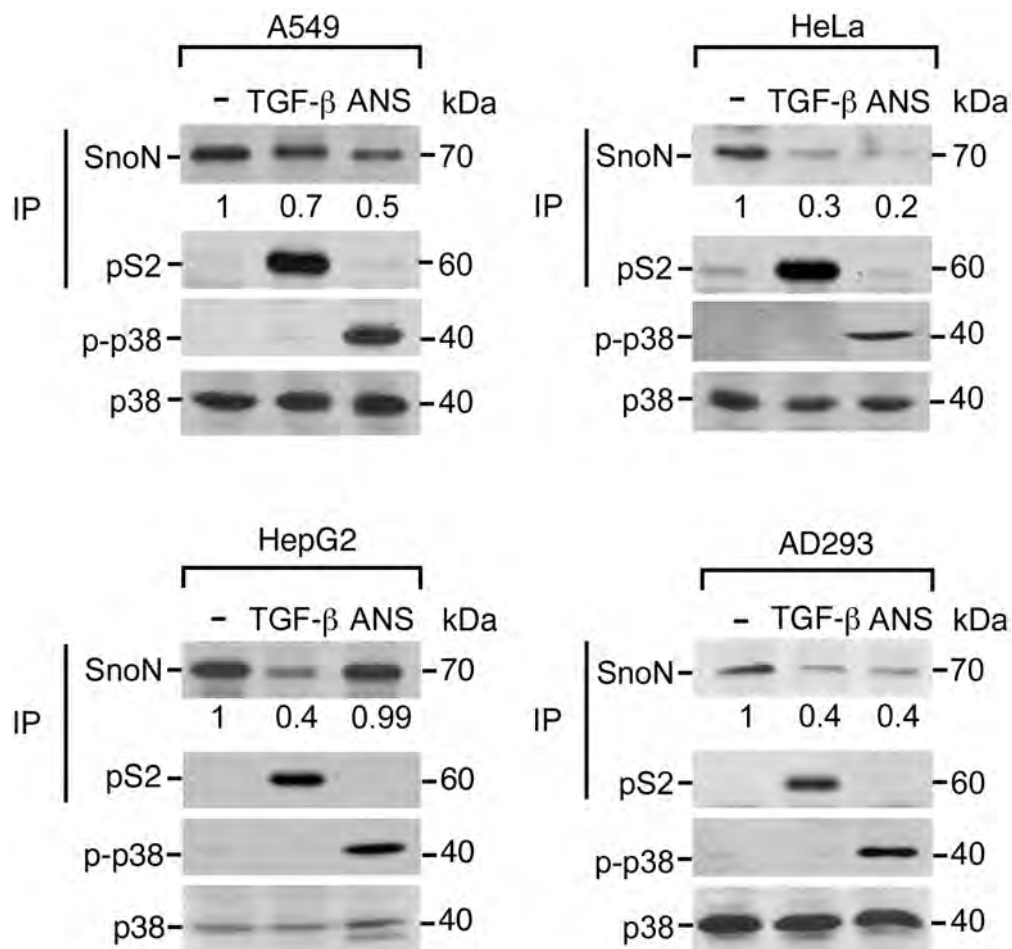


Figura 8. La degradación de SnoN inducida por anisomicina es dependiente del contexto celular. Distintas líneas celulares A549, AD293, HeLa y HepG2 fueron estimuladas con TGF-β 0.3 nM o anisomicina (ANS) 10 μM por 30 min. Los extractos celulares fueron sujetos a un IP para las proteínas SnoN, pS2. Los niveles de estas proteínas fueron analizados por WB. Las proteínas p-p38 y p38, fueron detectadas por WB directo a partir de una muestra de extractos celulares totales.

Estos experimentos se enfocaron en explorar el efecto de ANS sobre la regulación de los niveles de la proteína SnoN en otros tipos celulares hasta ahora no estudiados como se muestra en la Figura 8.

- 1) **A549.** Línea derivada de un carcinoma de pulmón humano. Se trata de una línea celular que se caracteriza por sobreexpresar la proteína SnoN.
- 2) **HeLa.** Células provenientes de un adenocarcinoma cérvico uterino humano.
- 3) **AD293.** Línea derivada de riñón embrionario humano, con morfología epitelial.
- 4) **HepG2.** Células transformadas derivadas de un hepatocarcinoma humano.

Existen distintos tipos celulares que responden a anisomicina con la degradación de las proteínas Ski y SnoN. Se exploró el efecto de anisomicina sobre los niveles de la proteína SnoN en otros contextos celulares. Las células fueron estimuladas por 30 min con anisomicina (ANS) 10 μ M o TGF- β 0.3 nM.

En todas las líneas celulares analizadas se observó la degradación de la proteína SnoN en presencia del estímulo con TGF- β , así como un aumento de la forma fosforilada de Smad2 (pS2). Esta última fue detectada como un control positivo de la señal del TGF- β .

Mientras que la degradación de la proteína SnoN por anisomicina fue detectada en células A549, AD293 y HeLa. Como control positivo del estímulo con anisomicina se evaluó la proteína p-p38, mientras que la forma p38 fue detectada como control de carga. La disminución en los niveles de la proteína SnoN es más severa en presencia de anisomicina. En el caso de las células HepG2, los niveles de la proteína SnoN no sufrieron cambios en presencia de ANS, aún en presencia de p-p38. Estos datos sugieren una especificidad del

efecto de ANS en ciertos contextos celulares, al parecer de una forma independiente de la señal del TGF- β y de la fosforilación específica en la región carboxilo terminal de Smad2.

La degradación de la proteína SnoN por anisomicina es llevada a cabo en células responsivas al TGF- β .

La degradación de la proteína SnoN por anisomicina es llevada a cabo en ciertos contextos celulares específicos, sin embargo todos los modelos celulares utilizados son responsivos al TGF- β . Se sabe que la fosforilación de las Smads no es inducida por anisomicina (Vázquez-Macías *et al.*, 2005). Se analizó la degradación de la proteína SnoN por anisomicina en modelos celulares insensibles al TGF- β . Se utilizaron otros modelos sensibles -o no- al estímulo de TGF- β (Figura 9).

- 1) M2. Estas células derivadas de un melanoma humano, tienen la particularidad de ser insensibles al TGF- β , no son capaces de inducir la fosforilación de las R-Smads. Este efecto es debido a la expresión nula de FLNa, una proteína de andamiaje y unión al citoesqueleto, importante en la activación de las R-Smads por TGF- β .
- 2) A7. Se trata de una clona celular proveniente de las células M2, pero que tiene reconstituida la expresión de la proteína FLNa y que responden al TGF- β con la fosforilación de las proteínas Smads.

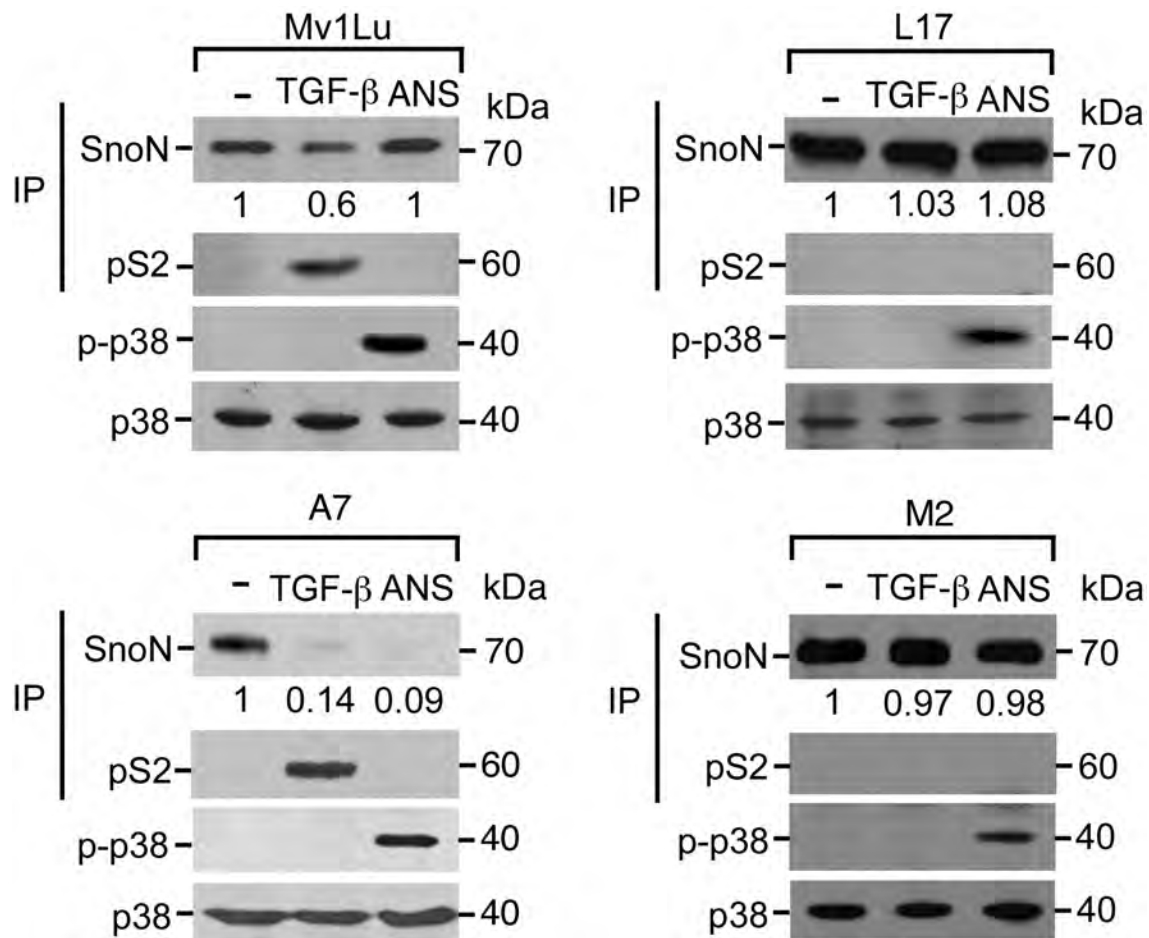


Figura 9. La degradación de la proteína SnoN por anisomicina requiere de un contexto responsivo al TGF-β. Células Mv1Lu, L17, A7 y M2 fueron ayunadas por 3 horas en medio sin suero. Las células fueron estimuladas con TGF-β 0.3 nM o anisomicina (ANS) 10 μM por 30 minutos. Las proteínas SnoN y pS2 fueron analizadas por IP/WB. Las proteínas p38 y p-p38 fueron analizadas directamente por WB a partir de una fracción de extractos celulares totales. Los valores expresan las unidades relativas de expresión de SnoN por análisis densitométricos.

- 3) Mv1Lu. Modelo celular proveniente de células epiteliales de pulmón de visón, ha sido ampliamente utilizado en el campo del TGF-β, por ser un modelo clásico para el estudio en la activación de las Smads por TGF-β.
- 4) L17. Clona derivada de las células Mv1Lu. Se caracteriza por sus bajos niveles de expresión del receptor TβRI y mostrar insensibilidad al estímulo con TGF-β, es decir no se induce la fosforilación de las R-Smads en el carboxilo terminal.

Estos cuatro tipos celulares fueron analizados en el contexto del mecanismo de degradación de la proteína SnoN por ANS. Las células fueron estimuladas con TGF- β 0.3 nM o ANS 10 μ M por 30 min.

El análisis de la proteína SnoN por IP/WB en la línea celular L17 insensible a TGF- β , mostró una resistencia en la degradación de la proteína SnoN por anisomicina y TGF- β . Mientras en las células Mv1Lu se observó la degradación de la proteína SnoN en presencia de TGF- β y la detección de la proteína pSmad2. Sin embargo el estímulo con anisomicina no mostró efecto en los niveles de la proteína SnoN.

En las células M2 la degradación de la proteína SnoN por TGF- β y anisomicina no fue detectada, mientras que en la clona A7 responsiva a TGF- β , se observó la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. Estos datos demuestran el requerimiento de la señal del TGF- β en el mecanismo de degradación de la proteína SnoN por anisomicina.

Un análisis más profundo del efecto de anisomicina en las células M2 y A7 (Figura 10) muestra que las células A7 responden de manera usual a los tratamientos cortos (30 minutos) o largos (2 horas) con TGF- β . Se observó la activación de pSmad2 en respuesta a TGF- β (0.5 y 2 h), así como la regulación bifásica de la proteína SnoN en respuesta al estímulo con TGF- β (0.5 y 2 h).

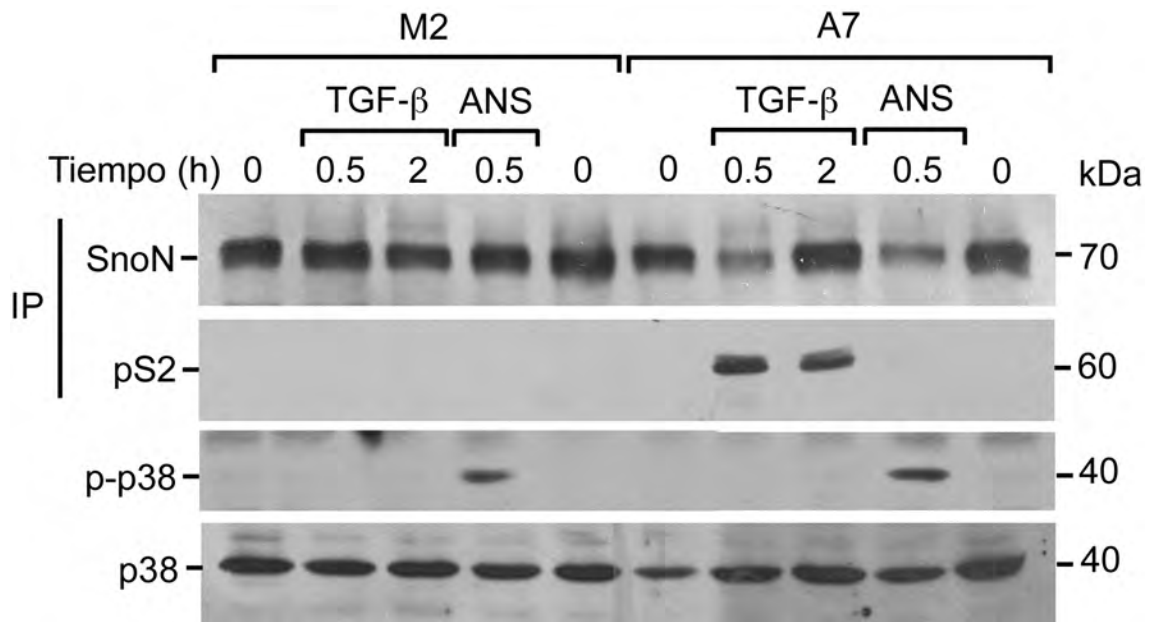


Figura 10. Anisomicina induce la degradación de la proteína SnoN en células A7, pero no en células M2. Células M2 y A7 fueron estimuladas con TGF- β 0.3 nM o anisomicina (ANS) 10 μ M por 30 min o 2 h como se indica en la figura. Los extractos celulares fueron sujetos a IP específicos anti-SnoN y anti-Smad2. Las proteínas SnoN y pSmad2 (pS2) fueron detectadas por WB. Para el caso de p-p38 y p38 fueron detectadas por un WB directo a partir de una fracción de proteínas totales.

Participación funcional del receptor T β RI y Smad2 en el mecanismo de degradación de SnoN por ANS

El inhibidor del receptor T β RI bloquea la degradación de la proteína SnoN inducida por anisomicina.

La degradación de las proteínas Ski y SnoN es promovida de forma dependiente de la señal del TGF- β /Smads. Para confirmar esta hipótesis se exploró el efecto del inhibidor específico del receptor T β RI (SB431542), sobre la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. El compuesto SB431542 inhibe de manera selectiva la actividad de cinasa del receptor T β RI. El SB431542 actúa como un inhibidor competitivo en el sitio de unión a ATP en el dominio de cinasa de los receptores tipo I, inhibiendo la fosforilación de Smad3 y Smad2 por TGF- β con una alta especificidad (IC₅₀ de 94 nM) (Callahan et al.,

2002). Las células A549 fueron pretratadas por 30 min con el inhibidor SB431542 10 μ M y posteriormente estimuladas por 30 min con TGF- β 0.3 nM o anisomicina 10 μ M (Figura 11).

Las células estimuladas con TGF- β se detectaron las proteínas pSmad2 y pSmad3 y la disminución del 70% en los niveles de la proteína SnoN. Como se tenía esperado el pretratamiento con SB431542, bloqueó la fosforilación de Smad2 y Smad3, inhibiendo la degradación de la proteína SnoN por TGF- β .

Entretanto las células tratadas con anisomicina se observó una caída más severa del 80% en los niveles de la proteína SnoN, sin la detección de las proteínas pSmad2 y pSmad3. Sin embargo el pretratamiento con el SB431542 previno la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. La activación de p38 por anisomicina no fue modificada en presencia del SB431542.

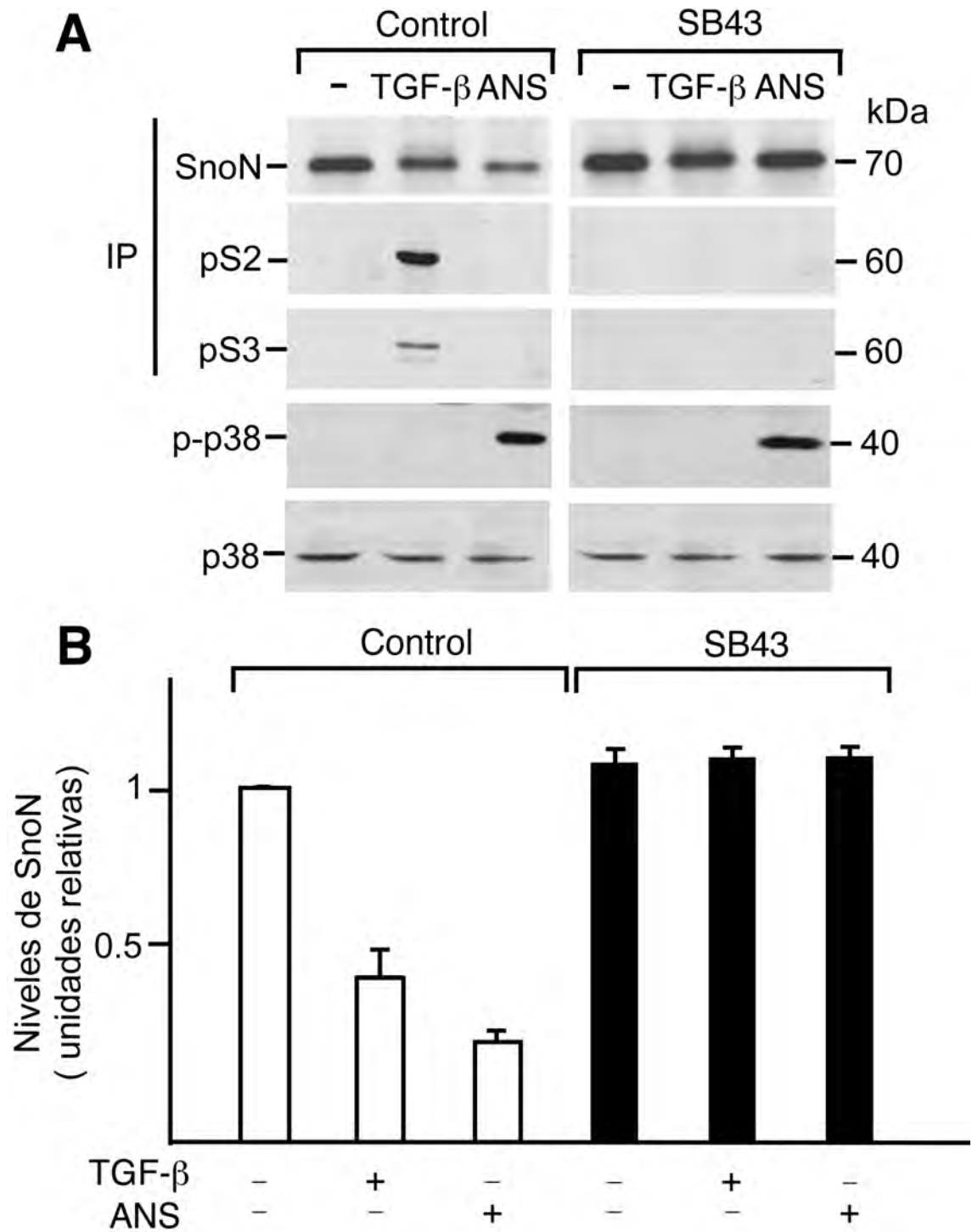


Figura 11. El inhibidor SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina. Las células A549 fueron ayunadas con medio Ham's F12 con 0.2% de suero fetal bovino por 3 horas. El tratamiento fue por 30 minutos con el inhibidor SB431542 (SB43) a una concentración de 10 μ M más TGF- β 0.3 nM o ANS 10 μ M por media hora, sin retirar el medio de preincubación. Los extractos celulares fueron sujetos a un IP anti-SnoN y Smad2/3 y analizados por WB para SnoN y pSmad2 (pS2) respectivamente. Para el caso de p-p38 y p38 se tomaron a partir de una muestra de extractos totales analizados por WB. La figura muestra un experimento representativo de 8. Las gráficas representan el promedio de análisis densitométricos de 8 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias \pm ES. Para los análisis por densitometría se utilizó el programa EDAS de Kodak.

Se hicieron ensayos Dosis-Respuesta y Curso-Temporales en células A549 para evaluar el efecto del SB431542 sobre el efecto de anisomicina (Figura 12 y 13).

En la figura 12 se muestra un análisis Dosis-Dependiente del SB431542 en la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. Las células A549 fueron pretratadas por 30 min con dosis crecientes (0.01-10 μM) del SB431542. El experimento mostró una inhibición dependiente de la dosis del SB431542 en la degradación de la proteína SnoN promovida por anisomicina. A partir del rango 0.01 μM se observó un efecto discreto en la inhibición de la degradación de SnoN por TGF- β . Una dosis de 10 μM fue efectiva para bloquear la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. Entretanto los niveles de las proteínas p-p38 y p38 no fueron alterados en presencia del tratamiento con SB431542 (Figura 12).

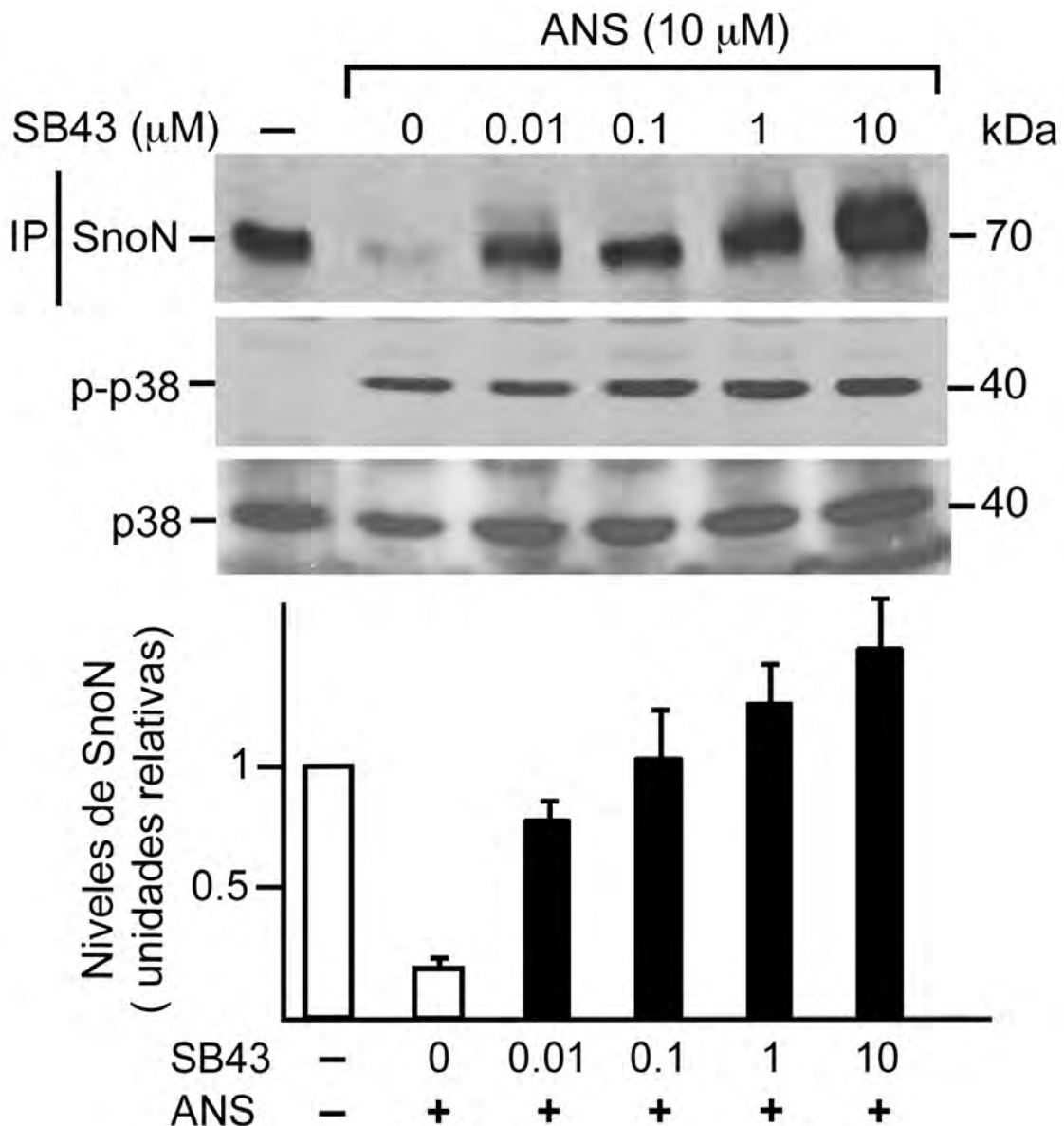


Figura 12. Análisis Dosis-Respuesta del inhibidor SB431542 en la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. Células A549 fueron ayunadas con medio Ham's F12 con 0.2% de suero fetal bovino durante 3 horas. Las células fueron pretratadas o no, con diferentes dosis del SB431542 (SB43) (rango 0.01-10 μ M) y después tratadas con anisomicina (ANS) 10 μ M por media hora, sin retirar el medio de preincubación. La proteína SnoN fue analizada por IP/WB. La forma p-p38 y p38 fueron detectadas a partir de una muestra de extractos totales y analizada por WB. La figura muestra un experimento representativo de 3 experimentos. La gráfica representa el promedio de análisis densitométricos de 3 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias \pm ES. Para los análisis por densitometría se utilizó el programa EDAS de Kodak.

Para el análisis curso-temporal del SB431542, las células A549 fueron pretratadas con el inhibidor SB431542 10 μ M por 30 min y posteriormente estimuladas con anisomicina 10 μ M por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). El experimento mostró una disminución en los niveles de la proteína SnoN en

presencia de anisomicina a partir de los 15 min de estímulo y con un máximo efecto a los 30 min de tratamiento. Se observaron las formas fosforiladas de p38 (p-p38) a partir de los 5 min de tratamiento con el estímulo de anisomicina (Figura 13).

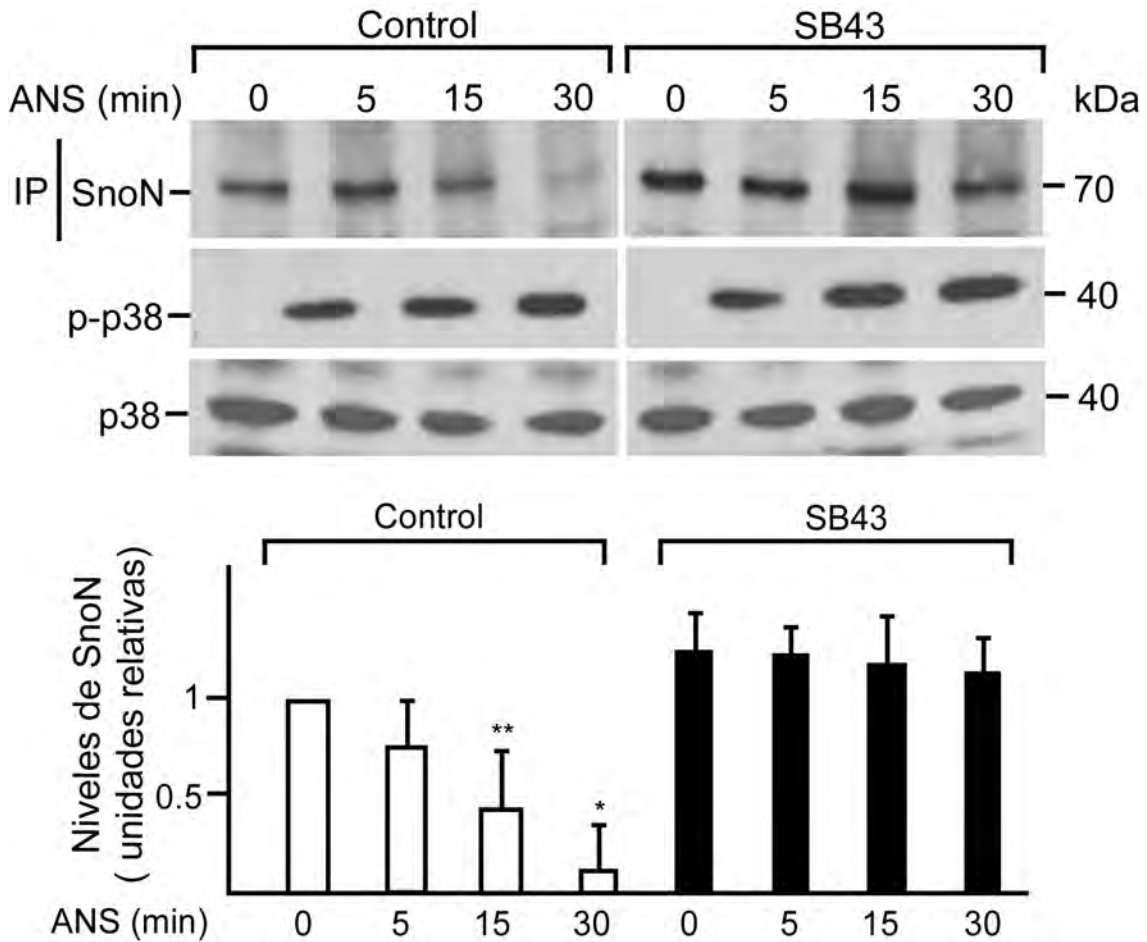


Figura 13. Análisis curso-temporal del inhibidor SB431542 sobre la degradación de la proteína SnoN por anisomicina. Células A549 fueron ayunadas con medio Ham's F12 con 0.2% de suero fetal bovino durante 3 h. Las células fueron pretratadas o no, con el inhibidor SB431542 (SB43) 10 μ M y después tratadas con anisomicina (ANS) 10 μ M por distintos tiempos (0-30 min), sin retirar el medio de preincubación. La proteína SnoN fue analizada por IP/WB. La forma p-p38 y p38 fueron detectadas a partir de una muestra de extractos totales y analizada por WB. La gráfica representa el promedio de análisis densitométricos de 3 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias \pm ES. Para los análisis por densitometría se utilizó el programa EDAS de Kodak.

El grupo de células pretratadas con SB431542 mostraron una resistencia al efecto de anisomicina, manteniendo los niveles de la proteína SnoN similares al estado basal, incluso a los 30 min de estímulo con anisomicina. Los niveles de p38 y p-p38 no se vieron afectados en presencia del SB431542, bloqueando de manera específica el mecanismo de degradación de la proteína SnoN por anisomicina (Figuras 11-13), sugiriendo la participación del receptor T β RI en la degradación de la proteína SnoN por anisomicina.

La estabilidad de la proteína SnoN es regulada diferencialmente por TGF- β y ANS.

El tratamiento con el inhibidor SB431542 inhibe la señalización del TGF- β /Smads, sin embargo los efectos del SB431542 sobre el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina se desconocen. Las células A549 fueron pretratadas o no con SB43 10 μ M por 30 min y estimuladas por 30 min con TGF- β 0.3 nM o anisomicina 10 μ M. Otro grupo experimental fue tratado con TGF- β 0.3 nM o anisomicina 10 μ M por 30 min y posteriormente incubadas con el SB431542 10 μ M por 1 h (Figura 14, Panel A).

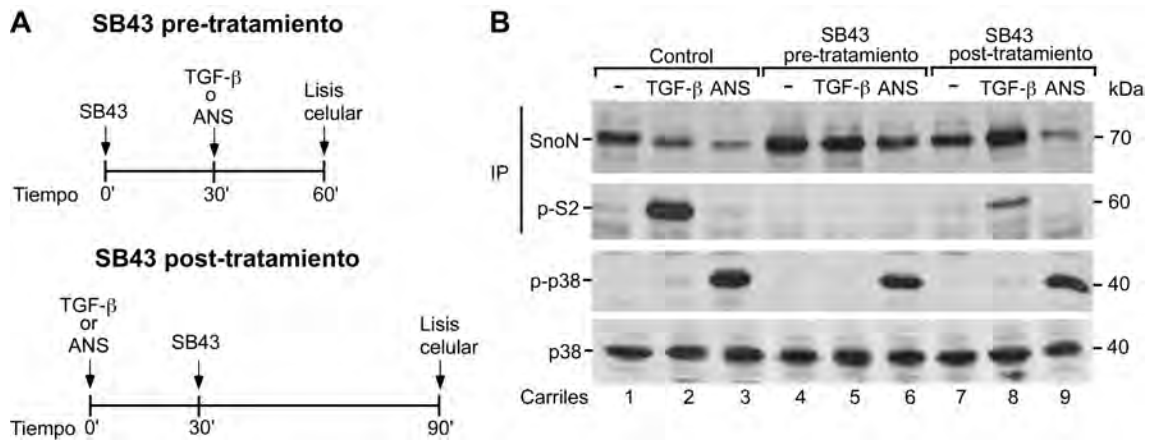


Figura 14. La estabilidad de la proteína SnoN es regulada diferencialmente por TGF- β y anisomicina. Las células A549 fueron ayunadas con medio Ham's F12 con 0.2% de suero fetal bovino por 3 horas. Las células control fueron preincubadas (pre-tratamiento) o no (Control) con SB43 10 μ M y posteriormente incubadas con TGF- β 0.3 nM o ANS 10 μ M por 30 min, sin retirar el medio de preincubación. El otro grupo de células fueron estimuladas con TGF- β 0.3 nM o ANS μ M por 30 min y posteriormente tratadas (post-tratamiento SB43; carriles 7-9) por 1h. Los extractos celulares fueron sujetos a un IP con anticuerpos específicos anti-SnoN y anti-Smad2/3. Los niveles de proteína SnoN y p-Smad2 fueron analizados por WB. Para el caso de p-p38 y p38 se detectaron por WB a partir de una muestra de extractos totales. La figura muestra un experimento representativo de n=2.

El pre-tratamiento y el postratamiento con el inhibidor SB431542 en células A549, bloquearon la degradación de SnoN por TGF- β y los niveles de fosforilación de pSmad2 (pS2) (Figura 14, Panel B, Carriles 5 y 8). Mientras que las células estimuladas con anisomicina se observó que la degradación de SnoN es bloqueada solamente con un pretratamiento con SB431542, pero no con el post-tratamiento (Figura 14, Panel B, Carriles 6 y 9). Los niveles de fosforilación de p-p38 inducidos por anisomicina no fueron afectados en presencia del inhibidor SB431542 antes o después del estímulo con anisomicina.

Estos datos sugieren que el SB431542 inhibe la degradación de la proteína SnoN por TGF- β y anisomicina, pero de manera distinta. (Figura 14, Panel B, Carril 9).

El inhibidor SB431542 bloquea la degradación de la proteína SnoN en el núcleo.

La proteína SnoN es una proteína nuclear en la mayoría de las células estudiadas. En algunas líneas altamente tumorigénicas se han detectado altos niveles de la proteína SnoN asociada a una resistencia en las acciones anti-proliferativas por TGF- β (Edmiston et al., 2005).

La sublocalización citoplasmática de las proteínas SnoN y Ski puede conferir una resistencia al efecto de degradación por TGF- β (Krakowski et al., 2005). Estos reportes han demostrado que SnoN puede localizarse en el citoplasma de líneas tumorales y es resistente a la degradación inducida por TGF- β vía el proteosoma. Un estudio adicional ha demostrado que la inhibición del proteosoma por MG132 promueve la traslocación de Ski hacia el citoplasma, protegiendo la proteína Ski de los efectos de degradación por TGF- β (Nagata et al., 2006). Con estos antecedentes surgió la hipótesis de un posible efecto del SB431542 como un inductor en la relocalización citoplasmáticas de la proteína SnoN nuclear. Los ensayos de fraccionamiento celular fueron montados en células para distinguir la fracción nuclear y citoplasmática de la proteína SnoN (Ver Sección Materiales y Métodos).

Las células fueron pretratadas por 45 min con el inhibidor SB431542 10 μ M y posteriormente estimuladas por 30 minutos con TGF- β 0.3 nM o anisomicina 10 μ M. Los extractos celulares fueron sujetos a un fraccionamiento celular de citoplasma y núcleo. El análisis de las proteínas SnoN y pSmad2 fue por IP/WB en cada fracción celular. Las proteínas p-p38, lamina B y β -tubulina fueron

detectadas por WB directo a partir de los extractos totales para distinguir cada fracción celular. La proteína Lamina B fue el marcador de la fracción nuclear, mientras que β -tubulina fue detectada en la fracción citoplasmática (Figura 15).

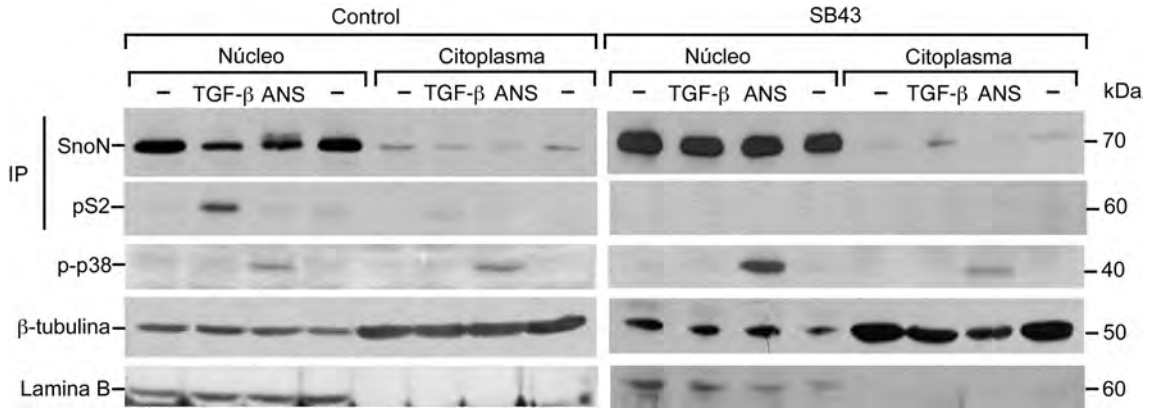


Figura 15. El inhibidor SB431542 bloquea la degradación de SnoN por anisomicina en el núcleo celular. Células AD293 fueron estimuladas en presencia (Panel B) o ausencia (Panel A) de SB431542 10 μ M por 30 minutos y posteriormente estimuladas con TGF- β 0.3 nM y anisomicina (ANS) 10 μ M. Los extractos celulares fueron sujetos a un fraccionamiento citoplásmico y nuclear. Las proteínas de cada fracción fueron inmunoprecipitadas (IP) con anticuerpos específicos y después analizadas por WB con anticuerpos específicos anti-SnoN o anti-pSmad2 (p-S2). p-p38, β -tubulina y lamina B fueron detectados por WB utilizando anticuerpos específicos. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

La proteína SnoN localizó en la fracción nuclear de todas las condiciones probadas y es susceptible a la degradación por TGF- β y anisomicina (Figura 15). Las proteínas Smads fosforiladas fueron localizadas en el núcleo. Al explorar el efecto del SB431542 no se observaron modificaciones en la sublocalización nuclear de la proteína SnoN. Estos experimentos muestran que el inhibidor SB431542 bloquea la degradación de la proteína SnoN por anisomicina sin perturbar la sublocalización celular.

Los diferentes inhibidores del Receptor T β RI bloquean la degradación de la proteína SnoN por anisomicina.

Los datos obtenidos con el inhibidor SB431542 muestran un efecto específico en la degradación de SnoN por anisomicina. Se consideró evaluar la función del receptor T β RI utilizando diferentes inhibidores del receptor T β RI disponibles comercialmente. Los inhibidores del receptor T β RI; LY364947, D4476 y A8301 poseen diferente fórmula química, pero funcionan de la misma manera que el SB431542 al competir por el sitio de unión a ATP en el dominio de cinasa del receptor. Las células A549 y AD293 fueron preincubadas por 30 min en ausencia o presencia de los inhibidores LY364947, D4476 y A8301 a una concentración final de 10 μ M y estimuladas por 30 min con 0.3 nM de TGF- β o anisomicina 10 μ M. Los niveles de la proteína SnoN y pSmad2 fueron analizados por IP/WB (Figura 16).

El efecto de los diferentes inhibidores del receptor T β RI, muestra que todos los compuestos bloquean la degradación de SnoN por TGF- β (Figura 16 Panel B) previniendo la fosforilación de Smad2. Todos los inhibidores mostraron prevenir la degradación de la proteína SnoN por anisomicina, manteniendo los niveles de proteína similares al estado basal (Figura 16 Panel A y B).

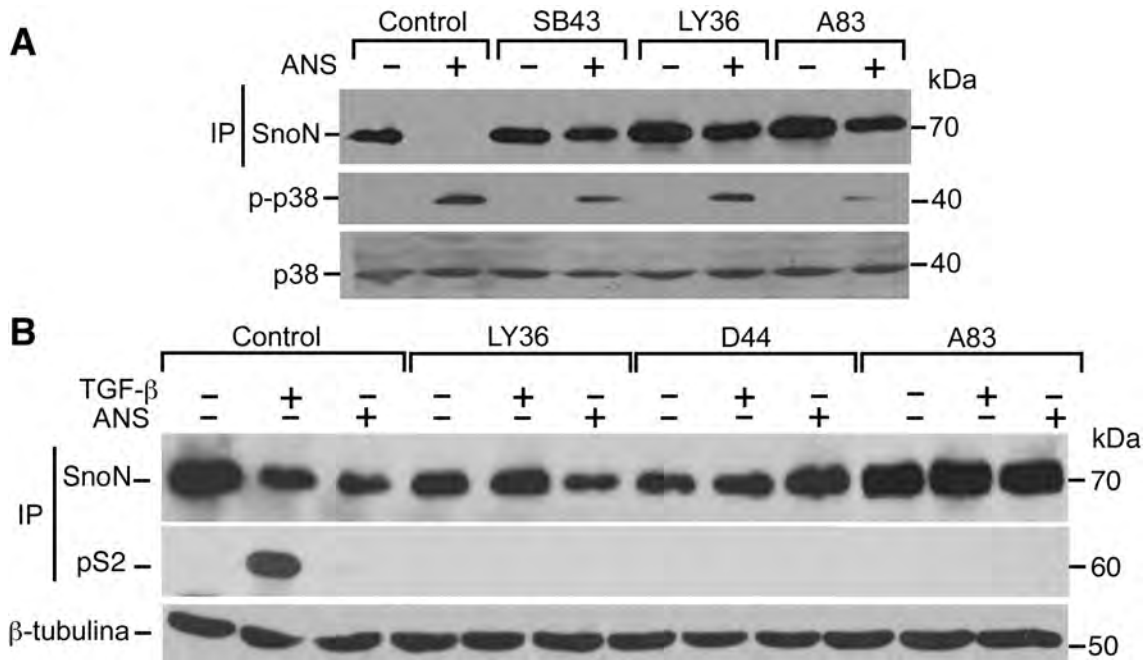


Figura 16. Inhibidores de la actividad de cinasa del TβRI bloquean la degradación de SnoN por anisomicina. Células AD293 y A549 fueron preincubadas por 30 min con los inhibidores LY364947, D4476 y A8301 a una concentración de 10 μM y estimuladas por 30 min con TGF-β y anisomicina (ANS) (0.3 nM y 10 μM). Los extractos celulares fueron sujetos a un IP/WB específico contra las proteínas SnoN y pSmad2. La proteína p-p38 y p38 fueron detectadas por un WB directo a partir de 50 ug de proteína total.

Los resultados mostraron un efecto específico de los inhibidores del receptor TβRI en la degradación de SnoN inducida por anisomicina, sugiriendo una relevancia funcional del receptor TβRI en el mecanismo de anisomicina sobre SnoN.

La sobreexpresión de la proteína Smad7 previene el efecto de degradación de la proteína SnoN por ANS.

Para confirmar el papel del receptor TβRI como un elemento necesario en la degradación de SnoN inducida por anisomicina, se montaron ensayos de sobreexpresión de la proteína Smad7, un inhibidor fisiológico de la señal del TGF-β. Smad7 es un miembro de la familia de las I-Smads (Smads inhibitorias), su mecanismo de acción reside en su capacidad de unión al

dominio de cinasa del receptor T β RI, bloqueando su actividad catalítica e impidiendo la fosforilación de las R-Smads (Hayashi et al., 1997).

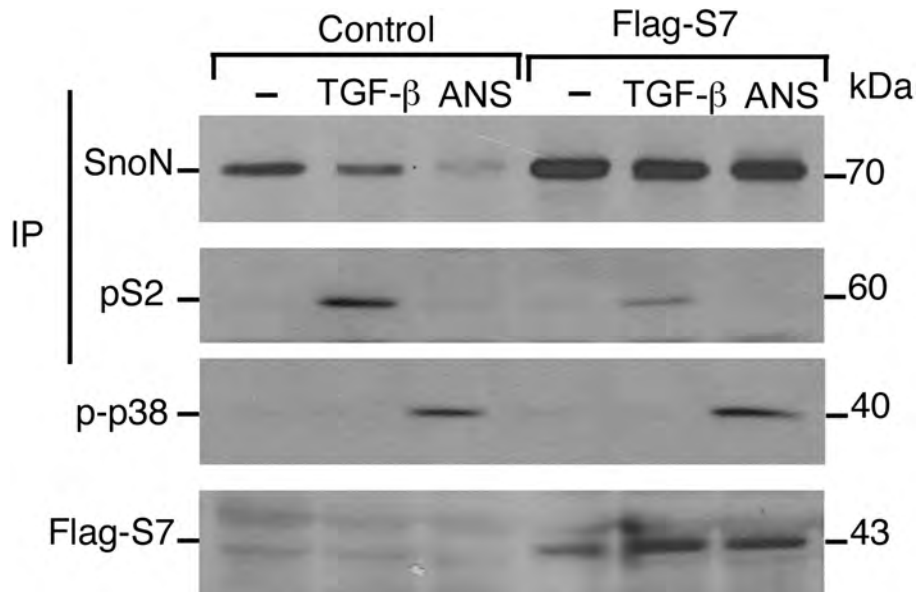


Figura 17. La inhibición de T β RI mediante la sobreexpresión de Smad7 bloquea la degradación de SnoN por anisomicina. Células AD293 fueron transfectadas transitoriamente con pCDNA3/Flag-Smad7. Las células fueron estimuladas 45 min con TGF- β 0.3 nM o ANS 10 μ M. SnoN y pSmad2 (pS2) fueron detectadas por IP/WB. Las proteínas p-p38 y Flag fueron detectadas por WB directo.

Las células AD293 fueron transfectadas transitoriamente con la construcción pCDNA3/Flag-Smad7. A las 48 h post-transfección, las células fueron estimuladas con por 40 min con TGF- β 0.3 nM y ANS 10 μ M. Los niveles de SnoN y pSmad2 fueron analizados por IP/WB. La sobreexpresión de Smad7 fue detectada con un WB directo del epítotope Flag. La sobreexpresión de Smad7 previno la degradación de SnoN mediada por TGF- β , así como en los niveles de fosforilación de Smad2 por esta citocina (Figura 17).

La sobreexpresión de Smad7 bloqueo la degradación de SnoN por anisomicina, reforzando el papel del T β RI como un componente involucrado en la degradación de SnoN inducida por anisomicina.

Anisomicina requiere de la expresión de T β RI y Smad2 para promover la degradación de SnoN.

Los datos obtenidos con los diferentes inhibidores del receptor T β RI y la sobreexpresión de Smad7 sugieren la participación del receptor T β RI en la degradación de la proteína SnoN inducida por anisomicina y probablemente la participación de las R-Smads.

Para confirmar la participación del receptor T β RI y las R-Smads, las células AD293 fueron transfectadas transitoriamente con shRNAs específico dirigidos contra el receptor T β RI (shT β RI) y la proteína Smad2 (shSmad2). Para analizar la disminución de los niveles de expresión del receptor T β RI, se detectaron los niveles del mRNA de T β RI, la activación de Smad2 (pS2) y los niveles de proteína total Smad2 (S2) (Sección Materiales y Métodos). Las células fueron estimuladas 48 h postransfección con TGF- β 0.3 nM o anisomicina 10 μ M por 45 min (Figura 18). Los ensayos con una alta eficiencia de los shT β RI y shSmad2 mostraron una disminución importante en los niveles del mRNA de T β RI y los niveles de proteína de Smad2 (S2) (Figura 18).

En el caso de las células estimuladas con anisomicina se observó una resistencia a la degradación de SnoN en las células transfectadas con el shT β RI y shSmad2. La expresión de los plásmidos shT β RI y shSmad2 no afectaron la activación de p-p38 por ANS.

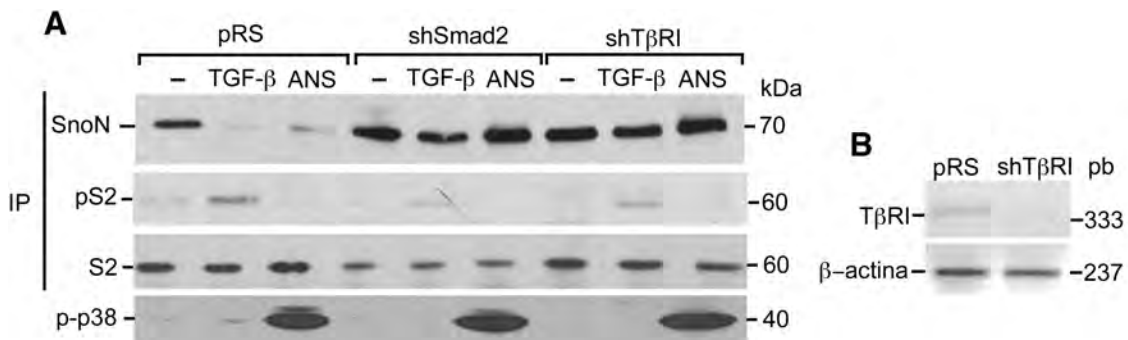


Figura 18. Anisomicina requiere de la expresión del receptor TβRI y Smad2. Células AD293 fueron transfectadas transitoriamente con los siguientes plásmidos: pRS (vector vacío), pRS/shTβRI shRNA específico para TβRI (shTβRI) y shSmad2 shRNA específico para Smad2 (shSmad2). 48 horas posttransfección las células fueron estimuladas con TGF-β 0.3 nM o ANS 10 μM por 45 minutos. En todos los casos los extractos celulares fueron sujetos a un IP con anticuerpos específicos anti-SnoN o anti-Smad2 (S2), los niveles de proteína fueron analizados por WB. El mRNA total fue aislado a partir de células transfectadas con pRS o con pRS/shRNA específico para TβRI (shTβRI). Los niveles de mRNA de TβRI (333 pb) y β-actina (237 pb) fueron evaluados por RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos en cada caso.

Estos experimentos ponen en evidencia la relevancia de la señalización del TGF-β en el mecanismo de anisomicina, así como la importancia funcional del receptor TβRI y Smad2 en el mecanismo de degradación de la proteína SnoN por anisomicina.

El estrés ribotóxico y la inhibición de síntesis de proteínas no están involucrados en el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina.

Uno de los efectos más característicos de anisomicina es su función como inhibidor de la síntesis de proteínas y la inducción del estrés ribotóxico en la célula. Por ello resulto importante explorar la inhibición de síntesis de proteínas y el estrés ribotóxico generado por anisomicina en el mecanismo de degradación de la proteína SnoN.

En estos ensayos se utilizaron dos clases de inhibidores de la síntesis de proteínas:

- 1) Inhibidores de la síntesis de proteínas que activan MAPK como p38 y JNK, como consecuencia del estrés ribotóxico (CHX, PURO y ANS).
- 2) Inhibidores de la síntesis de proteínas que no activan MAPK/SAPK (HIGRO y G418)

Los inhibidores de la síntesis de proteínas higromicina y G418 no afectan los niveles de la proteína SnoN.

La higromicina y el G418 (también conocido como geneticina) son inhibidores de la síntesis de proteínas que no inducen la activación de MAPK/SAPK. Las células A549 que fueron pretratadas por 30 min con el SB431542 10 μ M y estimuladas 30 min con los inhibidores anisomicina 10 μ M, higromicina 200 μ g/ml y G418 200 μ g/ml (Figura 19). De los tres compuestos solamente anisomicina promovió la degradación de la proteína SnoN (Figura 19).

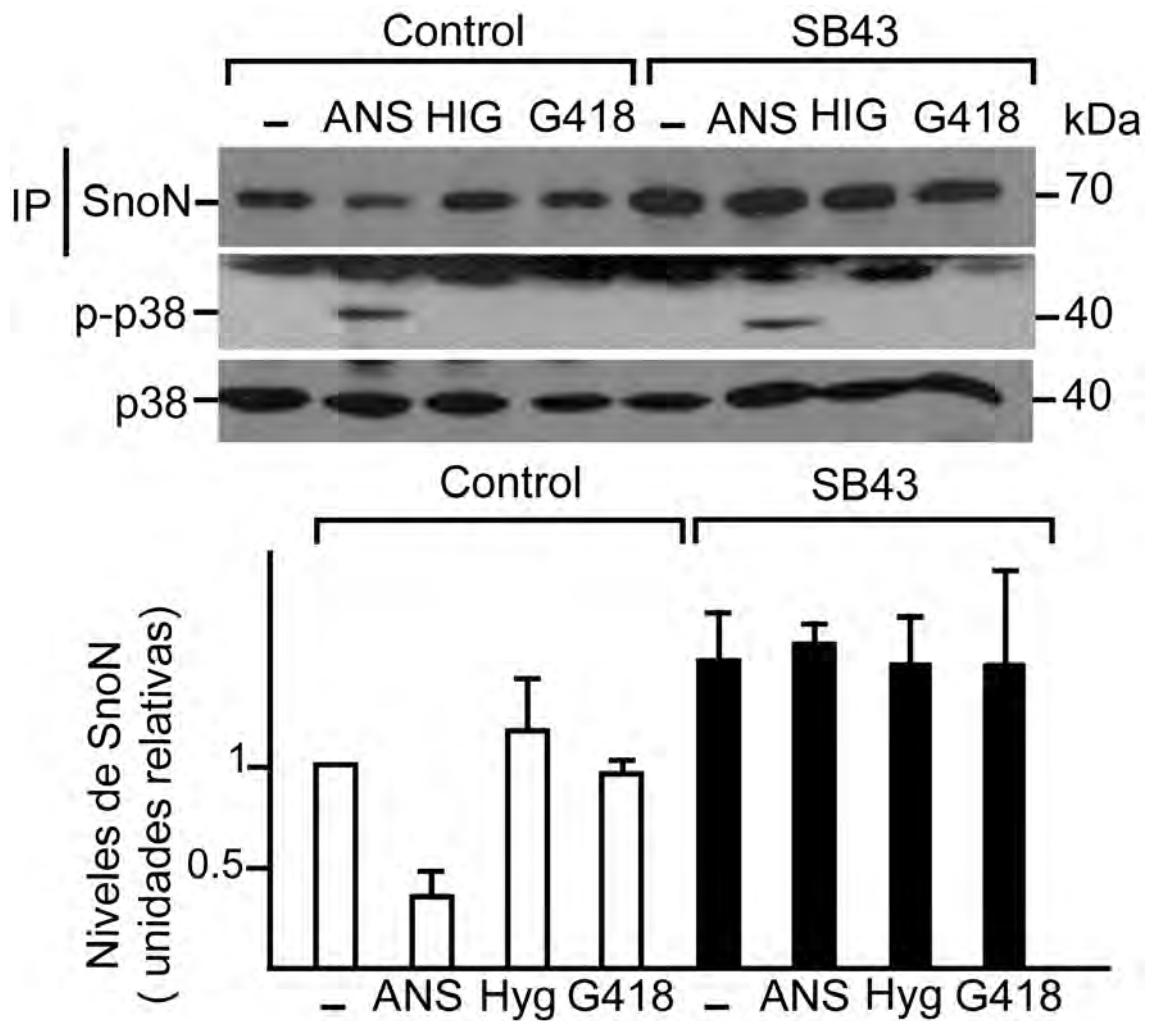


Figura 19. La inhibición de la síntesis de proteínas por Higromicina y G418 no induce cambios en los niveles de la proteína SnoN. Células A549 tratadas por 30 min con anisomicina (ANS) 10 μ M, higromicina (HIG) 200 μ g/ml o G418 200 μ g/ml en presencia o ausencia de un pretratamiento de 30 minutos con el inhibidor SB43 10 μ M. Los extractos celulares fueron sujetos a un IP para SnoN y analizada por WB. Para el análisis de p-p38 y p38 se detectaron por WB a partir de extractos totales celulares. Las gráficas representan el promedio de análisis densitométricos de 3 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias \pm ES.

Estos experimentos muestran que el efecto de anisomicina es específico y no es compartido por todos los inhibidores de la síntesis de proteínas, sugiriendo que la inhibición de la síntesis de proteínas no participa en el mecanismo de degradación de la proteína SnoN inducido por anisomicina.

Puromicina y cicloheximida inducen la degradación de SnoN de manera análoga a anisomicina.

Además de anisomicina existen inhibidores de la síntesis de proteínas que promueven la activación de MAPK. Los antibióticos puromicina y cicloheximida inducen la activación de MAPK/SAPK como JNK, p38 y ERKs (Edwards et al 1992). Ambos compuestos han demostrado inducir vías de señalización en células de mamíferos, independientemente de su habilidad para inhibir la síntesis de proteínas (Zinck et al, 1995). Las células A549 fueron pretratadas por 30 min con SB43 10 μ M y estimuladas por 30 min con TGF- β 0.3 nM, anisomicina 10 μ M, cicloheximida 100 μ g/ml o puromicina 10 μ g/ml (Figura 20). La activación de p38 por los tres antibióticos fue diferencial. En las células estimuladas con anisomicina p-p38 se elevó notablemente, mientras que las células estimuladas con cicloheximida y puromicina mostraron una activación más discreta.

Los tratamientos con TGF- β y anisomicina disminuyeron los niveles de la proteína SnoN entre un 70% y 90% respectivamente, con respecto al control.

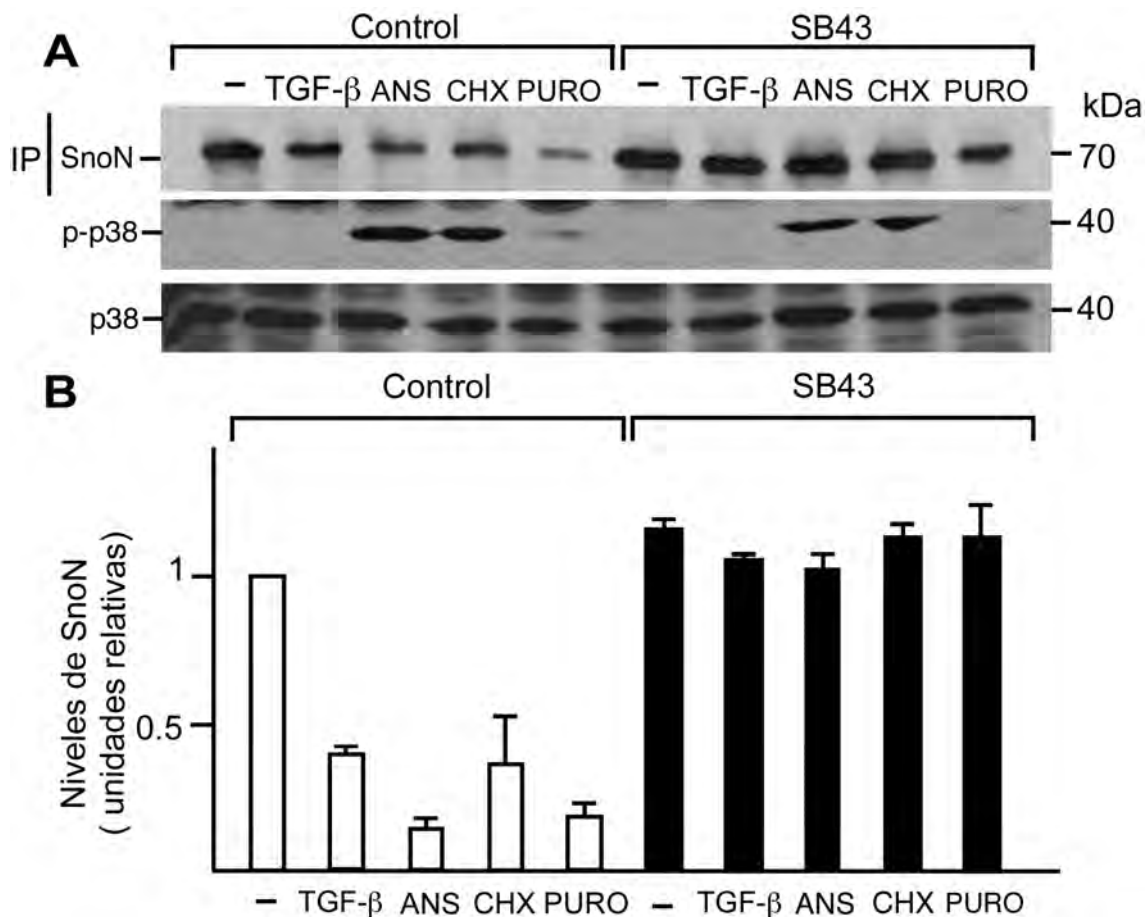


Figura 20. Los antibióticos cicloheximida y puromicina promueven la degradación de la proteína SnoN de manera análoga a anisomicina. Células A549 tratadas con TGF-β 0.3 nM anisomicina (ANS) 10μM cicloheximida (CHX) 100μg/ml o puromicina (PURO) 10μg/ml en presencia o ausencia de un pretratamiento con SB431542 (SB43) 10 μ M. Los extractos celulares fueron sujetos a un IP para SnoN y analizado por WB. Para el análisis de p-p38 y p38 se utilizaron extractos totales celulares para su detección por WB. Las gráficas representan el promedio de análisis densitométricos de 3 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias ± ES.

Las células tratadas con cicloheximida o puromicina los niveles de la proteína SnoN cayeron un 70% y 80% respectivamente con respecto al control. El inhibidor SB431542 previno la degradación de SnoN por los tres compuestos, sugiriendo un mecanismo compartido y el requerimiento de la señal TβRI/Smads. Para confirmar el efecto de degradación de las proteínas Ski/SnoN por cicloheximida y puromicina, se realizaron ensayos en células A7 (Figura 21). Las proteínas Ski/SnoN mostraron una disminución con el estímulo de 15-45 min con TGF-β. Posteriormente se observó una elevación en los

niveles de la proteína SnoN a las 2 h con el estímulo de TGF- β y una posterior recuperación de los niveles basales de SnoN a las 4 h tras el estímulo con TGF- β .

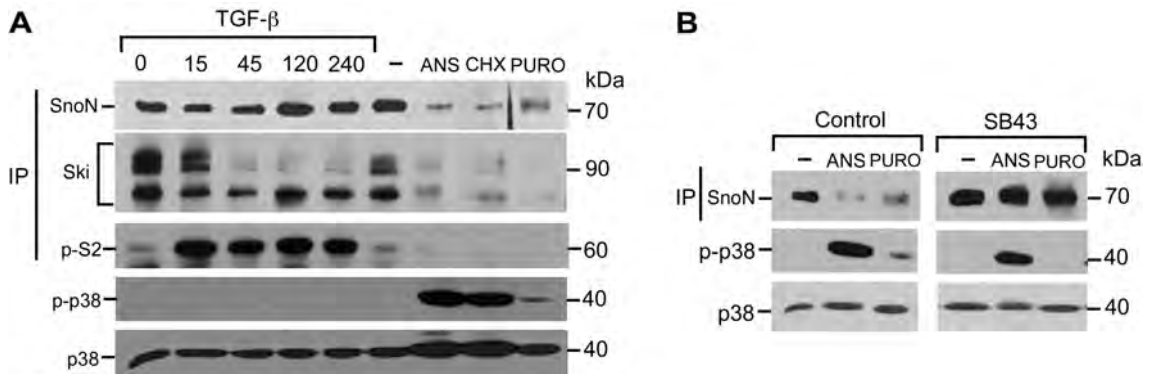


Figura 21. Los antibióticos cicloheximida y puromicina inducen la degradación de las proteínas Ski y SnoN de manera análoga a anisomicina en células A7. A) Células A7 fueron ayunadas por 3 h en medio de ayuno libre de suero. Las células fueron tratadas con TGF- β 0.3 nM por los tiempos indicados o por 45 min con anisomicina (ANS) 10 μ M, cicloheximida (CHX) 100 μ g/ml o puromicina (PURO) 10 μ g/ml (n=3). B) Las células A7 fueron pretratadas con el inhibidor SB431542 (SB43) 10 μ M por 30 min y posteriormente estimuladas con anisomicina (ANS) μ M o puromicina (PURO) μ g/ml. En ambos casos los extractos totales de la proteína fueron sujetos a un IP con anticuerpos específicos anti-SnoN, anti-Ski o anti-Smad2, los niveles de proteína fueron detectados por WB. Las proteínas p-p38 y p38 fueron detectadas por un WB directo a partir de una muestra de extractos totales.

De manera similar la cicloheximida y puromicina disminuyeron los niveles de las proteínas Ski y SnoN. Se observó la activación de p-p38 solamente en las células tratadas con los antibióticos, siendo anisomicina el activador más potente. Como control de carga de proteína se utilizó la detección de la proteína p38 (Figura 21, Panel A).

El pretratamiento con el inhibidor SB431542 previno la degradación de la proteína SnoN en respuesta a anisomicina y puromicina (Figura 21, Panel B).

El estrés celular no participa en el mecanismo de degradación de la proteína SnoN por anisomicina.

Una de las características de los antibióticos utilizados en este trabajo es la activación de MAPK en respuesta al estrés celular y ribotóxico. Considerando que existen otros estímulos que activan MAPK/SAPK en respuesta al estrés celular, se exploró la relevancia de estos estímulos en los niveles de la proteína SnoN.

El estrés hiperosmótico y la inhibición de fosfatasas son inductores clásicos de la activación de SAPK como p38 y JNK. Para estos experimentos se utilizaron células A549 que fueron pretratadas por 30 min con el SB431542 10 μ M y estimuladas por 30 min con NaCl 0.5 mM y ácido Okadaico 10 μ M (Figura 22).

La inducción del estrés celular por hiperosmolaridad o inhibición de fosfatasas no generó cambios en la proteína SnoN. La fosforilación de p38 fue detectada en las células tratadas con NaCl y Okad indicando que el estímulo fue efectivo. Estos resultados muestran que la activación del estrés celular no es un requisito para la modulación de la proteína SnoN.

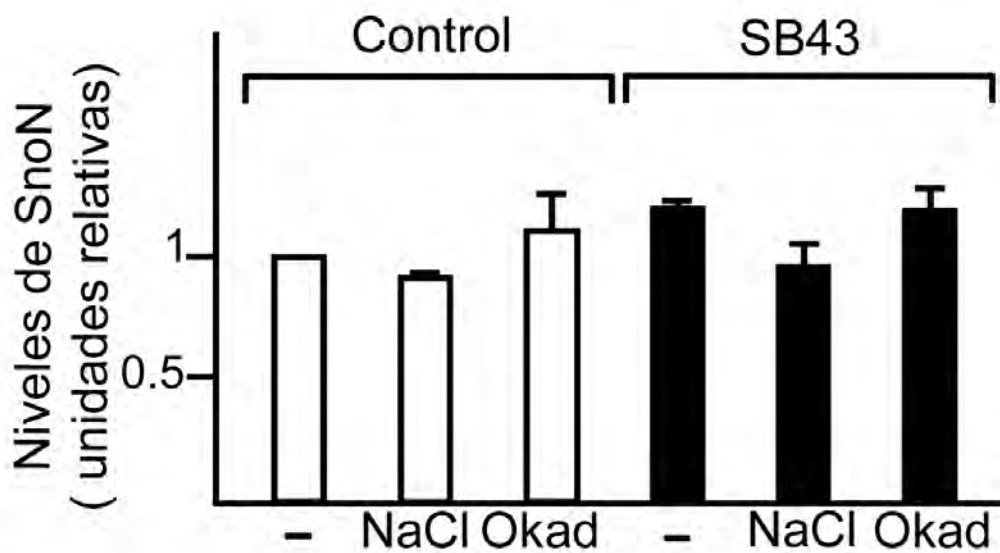
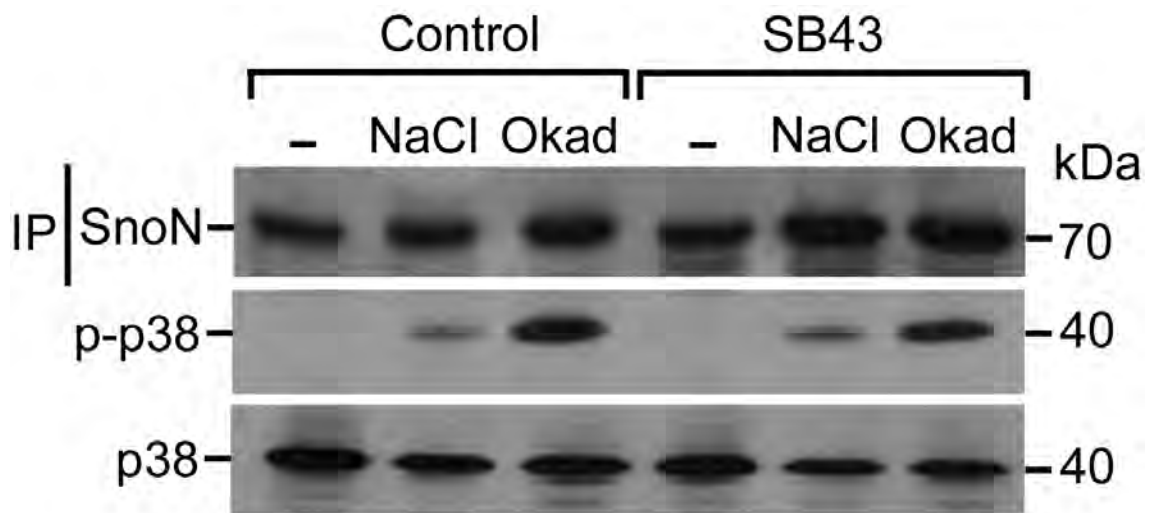


Figura 22. El estrés celular no modula los niveles de la proteína SnoN. Células A549 pretratadas con SB43 10 μ M por 30 minutos y posteriormente estimuladas con NaCl 0.5 mM y Ácido Okadaico (Okad) 10 μ M por 30 minutos. Los extractos celulares fueron sujetos a un IP anti-SnoN. Se detectó por WB las proteínas p-p38 y p38 en extractos celulares totales. Como control de carga se utilizó la detección de la proteína p38. Las gráficas representan el promedio de análisis densitométricos de 3 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias \pm ES.

La degradación de la proteína SnoN por N-acetil-PURO es independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas.

Los resultados anteriores muestran que los antibióticos anisomicina, cicloheximida y puromicina comparten el mecanismo de degradación de la proteína SnoN por el proteosoma. Para descartar la inhibición de la síntesis de proteínas se generó una línea celular resistente a la inhibición de la síntesis de proteínas por puromicina, nulificando el efecto ribotóxico en células AD293.

Las células fueron transfectadas con un plásmido (pRS) que contiene el gen *pac* que codifica una acetiltransferasa. Esta enzima modifica la molécula de puromicina uniéndole un grupo acetilo. La molécula modificada no es reconocida en el ribosoma y no genera efectos ribotóxicos en la célula (Figura 23). Estas células sobreviven en presencia de puromicina en el medio de cultivo (Pérez-González *et al.*, 1983).

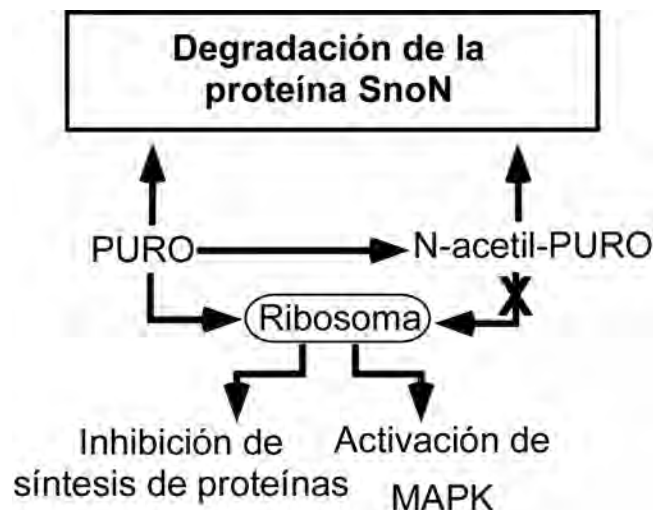


Figura 23. Estrategia experimental para la generación endógena del análogo N-acetil-puromicina para la degradación de la proteína SnoN. La figura muestra la estrategia experimental utilizada para la generación del análogo N-acetil-puromicina (N-acetil-PURO), un análogo del antibiótico puromicina (PURO). El antibiótico PURO inhibe la síntesis de proteínas por su interacción en el ribosoma, provocando estrés ribotóxico y la activación de MAPK, mientras que el análogo N-acetil-PURO carece de estos efectos ribotóxicos, sin afectar su efecto en la degradación de la proteína SnoN.

Las células AD293 Pr (*Puromycin resistant*) fueron estimuladas por 30 min (Figura 22, panel A) o 2 h (Figura 24, panel B) con TGF- β 0.3 nM, anisomicina 10 μ M o puromicina 10 μ g/ml o en presencia de un pretratamiento de 30 min con el inhibidor SB431542.

La fosforilación de p-38 fue detectada en las células tratadas con anisomicina, pero no en las células tratadas con puromicina. Las proteínas Ski y SnoN disminuyeron en presencia de TGF- β o anisomicina, en el caso de SnoN la proteína fue acumulada a las 2 h de estímulo con la citocina (Figura 24 Panel A y B) indicando que el mecanismo de anisomicina y TGF- β se mantuvo intacto en el modelo celular generado.

En las células tratadas con puromicina se observó la degradación de la proteína SnoN a los 30 min y a las 2 h de tratamiento, sin la activación de p38. Mientras que el pretratamiento con el inhibidor SB431542 previno la degradación de SnoN y Ski, indicando la participación del receptor T β RI en el mecanismo de degradación promovido por el análogo N-acetil-PURO (Figura 24).

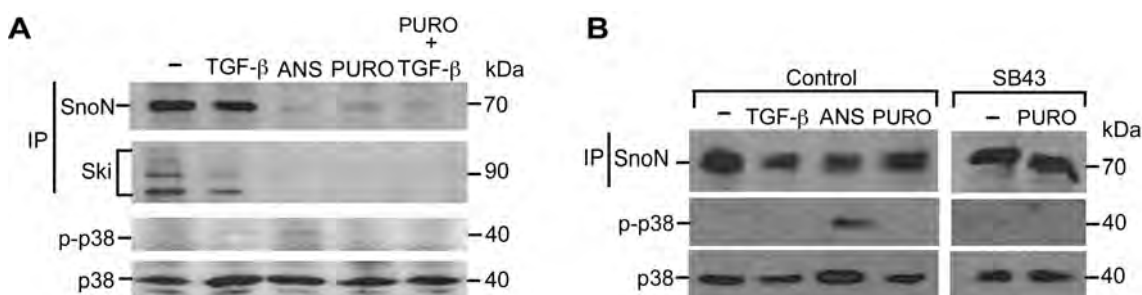


Figura 24. La degradación de SnoN por N-acetil-puromicina es independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas y el estrés ribotóxico. La línea celular AD293 Pr (línea celular generada que resiste los efectos ribotóxicos de puromicina) fueron estimuladas con TGF- β 0.3 nM, anisomicina (ANS) 10 μ M o puromicina (PURO) 10 μ g/ml por 30 minutos (Panel A) o 2 horas (Panel B) en presencia del inhibidor SB43 μ M por 30 minutos. (Panel B). Los extractos celulares fueron sujetos a un IP anti-SnoN y anti-Ski para su análisis por WB. La proteína p-p38 y p38 fueron detectadas por un WB directo a partir de 50 μ g de proteína total.

Los experimentos con el análogo N-acetil-PURO ponen en evidencia la capacidad de esta molécula análoga para promover la degradación de SnoN, de manera compartida con anisomicina y puromicina pero sin involucrar la inhibición de la síntesis de proteínas y el estrés ribotóxico.

Las señales de TGF- β son favorecidas por la degradación de SnoN inducida por N-acetil-PURO.

Las proteínas Ski y SnoN son clave en la modulación de la señales de TGF- β por su capacidad correpresora en los promotores de genes responsivos a TGF- β . Tanto Ski como SnoN reprimen la expresión del gen *smad7*. La señal del TGF- β estimula la expresión de la proteína Smad7, induciendo la degradación de Ski y SnoN y la activación de las proteínas Smads. Se exploró la posibilidad de un efecto en las respuestas transcripcionales del TGF- β por puromicina en ensayos realizados en células AD293 Pr. Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero 3TP-lux, un sistema para analizar la respuesta transcripcional mediada por TGF- β (Figura 25, Paneles A y B).

Las células fueron pretratadas con puromicina 10 $\mu\text{g/ml}$ por 2 h en un medio de ayuno y estimuladas por 12 h con TGF- β 50 pM. Como se observa la señal de TGF- β induce la actividad transcripcional del sistema 3TP-lux promoviendo la actividad de luciferasa. El estímulo con puromicina no induce la actividad del gen reportero, sin embargo las células que fueron pretratadas con puromicina y posteriormente estimuladas con TGF- β respondieron con un aumento significativo. Estos resultados muestran que la degradación de la

proteína SnoN por puromicina modula la intensidad de la respuesta transcripcional mediada por TGF- β .

Se hicieron experimentos en células AD293 Pr en presencia de una forma mutante de SnoN resistente a la degradación por TGF- β (mUbSnoN), una forma mutante de SnoN que posee sustituciones en los residuos de lisina que son poli-ubiquitinados en respuesta al estímulo con TGF- β (Tecalco-Cruz et al., 2012). La expresión de mUBSnoN no muestra los mismos efectos de la proteína SnoN endógena, respondiendo de manera discreta al estímulo con TGF- β en presencia de puromicina.

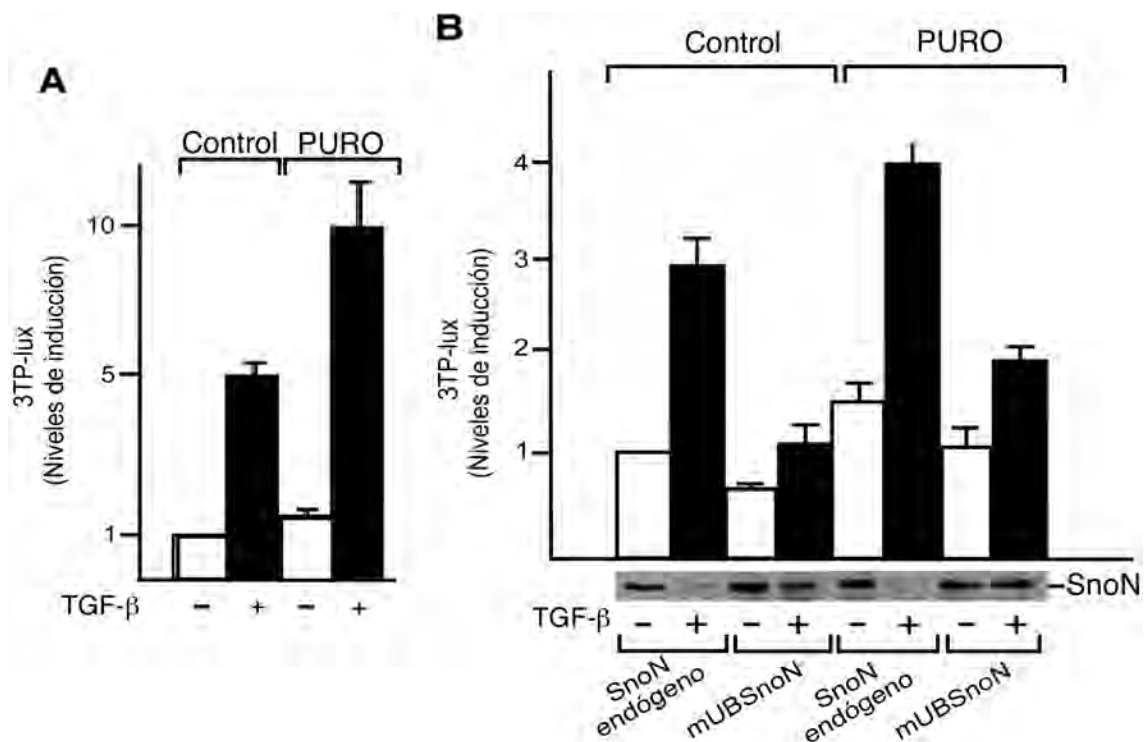


Figura 25. La actividad transcripcional por la señal del TGF- β es favorecida por la degradación de la proteína SnoN inducida por N-acetil-puromicina. A) Células AD293 (pR) fueron transfectadas con el plásmido reportero 3TP-lux. Las células fueron ayunadas por 3 h en un medio libre de suero, tratadas con PURO 1 μ g/ml por 2 h y posteriormente estimuladas con TGF- β 50 pM por 12 h. B) Células AD293 (pR) fueron transfectadas con el plásmido reportero 3TP-lux, en ausencia (SnoN endógeno) o presencia de la proteína mUBSnoN. Las células fueron ayunadas por 3 h en un medio libre de suero, tratadas con PURO 1 μ g/ml por 2 h y posteriormente estimuladas con TGF- β 50 pM por 12 h. Las células fueron lisadas y las muestras fueron analizadas para la actividad de luciferasa (niveles de inducción), que fue

normalizada utilizando como referencia la expresión de β -galactosidasa (n=3). Los valores son expresados como medias \pm ES de tres experimentos separados por triplicado. Los niveles de expresión de las proteínas SnoN (endógena) o la forma mUBSnoN fueron detectadas por WB (Panel B inferior).

Para estudiar la degradación de SnoN por anisomicina en la respuesta transcripcional mediada por TGF- β , se analizó la expresión del mRNA de *smad7* por RT-PCR (Ver Sección Materiales y Métodos) en células AD293 Pr.

Las células A549 Pr (resistentes a puromicina) fueron preincubadas por 2 h con puromicina 10 μ g/ml y tratadas por 30 min con el inhibidor SB43 10 μ M. Finalmente las células fueron estimuladas por 1 h con TGF- β 0.3 nM (Figura 26). El RNA total fue aislado para la amplificación de un fragmento de 317 pb, correspondiente a *smad7*. El fragmento fue amplificado por medio de oligonucleótidos específicos a través de un RT-PCR. (Ver Sección Materiales y Métodos). Como control experimental se amplificó un fragmento de 237 pb correspondiente al mensajero de β -actina.

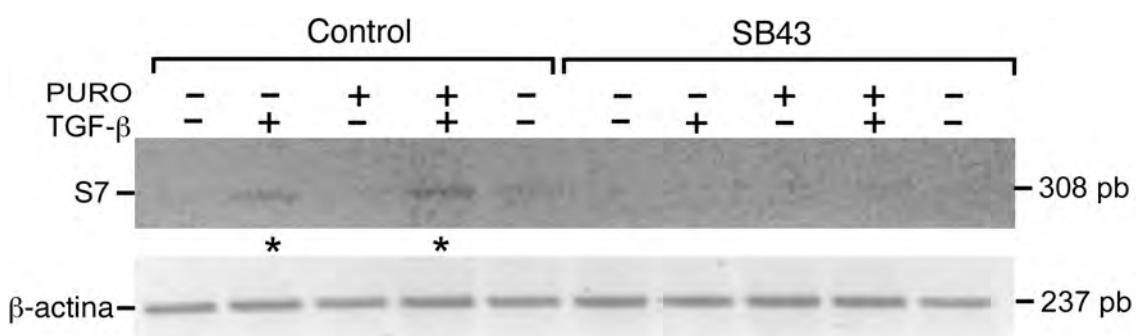


Figura 26. La degradación de SnoN por N-acetil-PURO favorece la expresión del RNA mensajero *smad7* por TGF- β . Expresión del mRNA de *smad7* en células A549 (Pr). Las células fueron ayunadas por 3 h en un medio libre de suero, pretratadas (+) o no (-) con PURO 10 μ g/ml por 2 h. Posteriormente fueron preincubadas o no con el inhibidor SB43 10 μ M. Finalmente las células fueron estimuladas (+) o no (-) con TGF- β 0.3 nM por 1 h. El RNA total fue aislado para amplificar Smad7 (317 pb) y β -actina (237 pb). Los mRNAs fueron amplificados por RT-PCR con oligonucleótidos específicos previamente descritos.

Se observó un incremento en la expresión del mRNA de *smad7* en respuesta al estímulo con TGF- β . En las células pretratadas con puromicina y estimuladas con TGF- β se elevaron los niveles de expresión del mRNA de *smad7*. El tratamiento con el inhibidor SB431542 previno la expresión del mRNA de *smad7* inducido por TGF- β y puromicina.

Estos resultados muestran una función del análogo N-acetil-puromicina en la regulación de las señales transcripcionales inducidas por TGF- β , a través de la modulación negativa de los correpresores Ski y SnoN. Los datos obtenidos en estos modelos celulares con la molécula análoga N-acetil-PURO, indican que el mecanismo de puromicina y anisomicina funcionan de manera independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas. Este compuesto análogo puede funcionar como una herramienta útil en el estudio de las señales de TGF- β .

Los compuestos análogos N-acetil-PURO y deacetil-ANS estimulan la degradación de la proteína SnoN.

El compuesto análogo N-acetil-PURO sintetizado endógenamente en células AD293 Pr y A549 Pr, sugieren efectos celulares independientes del estrés ribotóxico en la modulación de las señales por TGF- β . La síntesis de compuestos análogos que no generen efectos ribotóxicos en la célula resultó interesante para este trabajo. Se sintetizaron dos compuestos análogos: deacetil-anisomicina y N-acetil-puromicina en colaboración con el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química (Apéndice I).

Los compuestos sintetizados fueron N-acetil-puromicina y deacetil-anisomicina, ambos compuestos análogos fueron descritos como moléculas con una actividad nula como inhibidores de la síntesis de proteínas (Pérez-González et al, 1983, Rosser et al., 2004).

Los compuestos análogos fueron probados en células A7. Las células fueron ayunadas por un espacio de 3 h y estimuladas por 45 min con TGF- β 0.3 nM o diferentes dosis de ANS y deacetil-ANS (0.1 y 1 μ M) (Figura 27 Panel A) y diferentes concentraciones del análogo N-acetil-PURO (1, 10 o 100 μ g/ml) (Figura 27 Panel B).

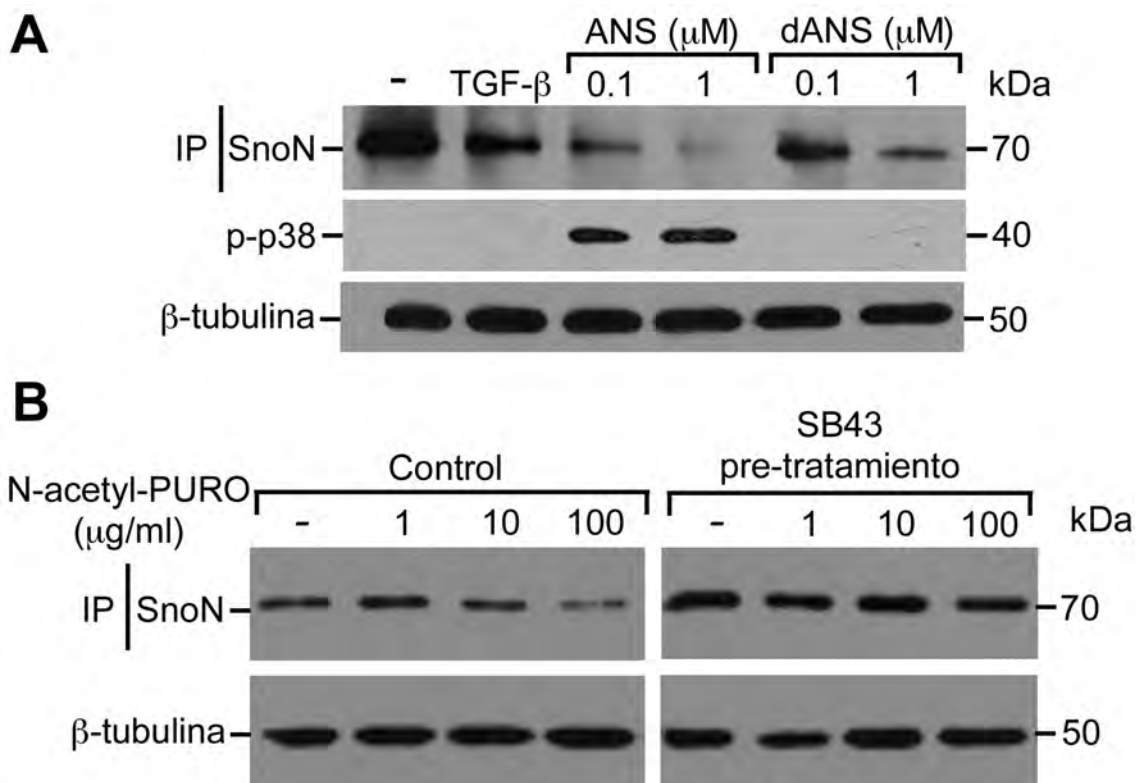


Figura 27. Los compuestos análogos deacetil-anisomicina y N-acetil-puromicina son capaces de inducir la degradación de SnoN. Células A7 fueron ayunadas en un medio de libre de suero y posteriormente estimuladas con TGF- β 0.3 nM o con 0.1 o 1 μ M de ANS o el compuesto análogo deacetil-ANS por 45 min. La figura es representativa de una n=3 (Panel A). Células A7 pretratadas con el inhibidor SB43 10 μ M por media hora y posteriormente estimuladas con diferentes dosis del análogo N-acetil-PURO (Panel B). La figura es representativa de una n=2. En todos los casos los extractos totales fueron sujetos a IP con anticuerpos específicos anti-SnoN y los niveles de proteína fueron detectados por WB.

Ambos compuestos análogos promovieron la degradación de la proteína SnoN sin la generación de efectos ribotóxicos. En las células tratadas con deacetil-anisomicina se observó la degradación de la proteína SnoN a partir de una dosis 1 μM sin la detección de p-p38 (Figura 27 panel A). El análogo N-acetil-puromicina (N-acetyl-PURO) provocó una caída en los niveles de SnoN a partir de una dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 27 panel A).

Estos datos muestran de forma contundente que el mecanismo de degradación de la proteína SnoN mediado por deacetil-anisomicina y acetil-puromicina es independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas y el estrés ribotóxico.

Discusión

Las proteínas Ski y SnoN son moduladas en diversos procesos fisiológicos como el ciclo celular, el desarrollo embrionario, la diferenciación y la regeneración celular. En estos procesos biológicos existen señales adicionales al TGF- β que pueden regular la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN y que aún no sido descritas por completo. Este trabajo describe un proceso de regulación de las proteínas Ski y SnoN inducido por estímulos distintos a la señal TGF- β vía el proteosoma 26S.

El Sistema Ubiquitina-Proteosoma modula la estabilidad de los componentes de la vía del TGF- β , tal es el caso de los receptores, las proteínas Smads y los reguladores de la vía Ski y SnoN. La modulación de las proteínas Ski y SnoN es un importante mecanismo de regulación en las señales del TGF- β . La degradación vía el proteosoma de las proteínas Ski y SnoN estimulada por TGF- β requiere de las proteínas Smads activadas por el receptor T β RI. Las proteínas R-Smads fosforiladas exponen su motivo PY, que es reconocido por los dominios WW de las ligasas de ubiquitina tipo E3, promoviendo la formación del complejo de degradación, la poli-ubiquitinación de las proteínas Ski/SnoN y finalmente la degradación proteolítica vía el proteosoma.

Este trabajo identifica los requerimientos moleculares en el mecanismo de degradación de las proteínas Ski y SnoN estimulado por los antibióticos anisomicina, puromicina y las moléculas análogas deacetil-anisomicina y N-acetil-puromicina. El efecto de estas moléculas es interrumpido por los inhibidores de la señalización T β RI/Smads, identificando la participación

funcional de estas proteínas en la degradación de Ski y SnoN por los antibióticos anisomicina y puromicina (Hernández-Damián *et al*; 2013).

El receptor T β RI es un elemento clave en la señalización del TGF- β , su dominio cinasa fosforila las proteínas R-Smads, activando las proteínas como efectores transcripcionales del TGF- β . Este trabajo demuestra la participación del receptor T β RI y Smad2 como componentes esenciales en la degradación de las proteínas Ski/SnoN inducida por antibióticos mediante el depletamiento en la expresión de las proteínas T β RI y Smad2.

Otra proteína involucrada en la modulación de la señal del TGF- β es la proteína FLNa, a través de su interacción con las proteínas R-Smads. En este trabajo se reporta que la degradación de Ski y SnoN por los antibióticos y moléculas análogas, requiere de la presencia de FLNa. Se ha descrito en una variedad de trabajos la participación de FLNa en diferentes vías de señalización mediadas por cinasas, receptores y factores de transcripción (Stossel *et al*; 2009). Sin embargo en este trabajo la función de FLNa en la degradación de Ski y SnoN por los antibióticos es a través de los componentes de la vía del TGF- β .

La sublocalización celular de ciertas proteínas es un mecanismo importante en la regulación de la estabilidad proteica, en el caso de las proteínas Ski y SnoN se demostró que su localización es preferentemente nuclear. Algunos reportes describen la localización citoplasmática de las proteínas SnoN y Ski, como un mecanismo de resistencia en la degradación inducida por TGF- β . En algunos casos la proteína Ski se acumula en la fracción

citoplasmática en respuesta al tratamiento con MG132 (Nagata et al., 2006), así como la interacción de Ski con el receptor T β RI (Ferrand et al., 2010).

Este trabajo demuestra que SnoN es una proteína nuclear, la anisomicina modula la degradación de SnoN nuclear, mientras que el inhibidor SB431542 induce la acumulación y la resistencia a los efectos de anisomicina en el núcleo, descartando un proceso de traslocación de la proteína SnoN hacia el citoplasma mediado por el inhibidor del receptor T β RI (Hernández-Damián et al., 2013)

¿Como es que el receptor T β RI y las proteínas R-Smads están involucrados en el mecanismo de estos antibióticos? Un modelo elaborado (Figura 28) de este trabajo propone que la proteína SnoN (y probablemente Ski) requiere de la señal vía T β RI/Smads endógena, para la generación de un complejo SnoN/pSmad2/3 (*Complejo listo para la degradación*). Este complejo es indispensable en la degradación de la proteína SnoN por TGF- β (Figura 28 Panel B), es indispensable en la modulación negativa de SnoN por los antibióticos anisomicina y puromicina (Figura 28 Panel B).

En un estado basal hipotético la proteína SnoN se sintetiza y se mantiene en un *estado protegido* de la degradación por TGF- β y los antibióticos (Figura 28 Panel A). En presencia de las señales endógenas del TGF- β , la proteína SnoN interacciona con los complejos de las proteínas p-

Smad2/pSmad3. Este complejo proteico es importante en el mantenimiento de los niveles basales de la proteína SnoN generada por la síntesis del mensajero/proteína y la estabilidad proteica mediada por TGF- β y los antibióticos.

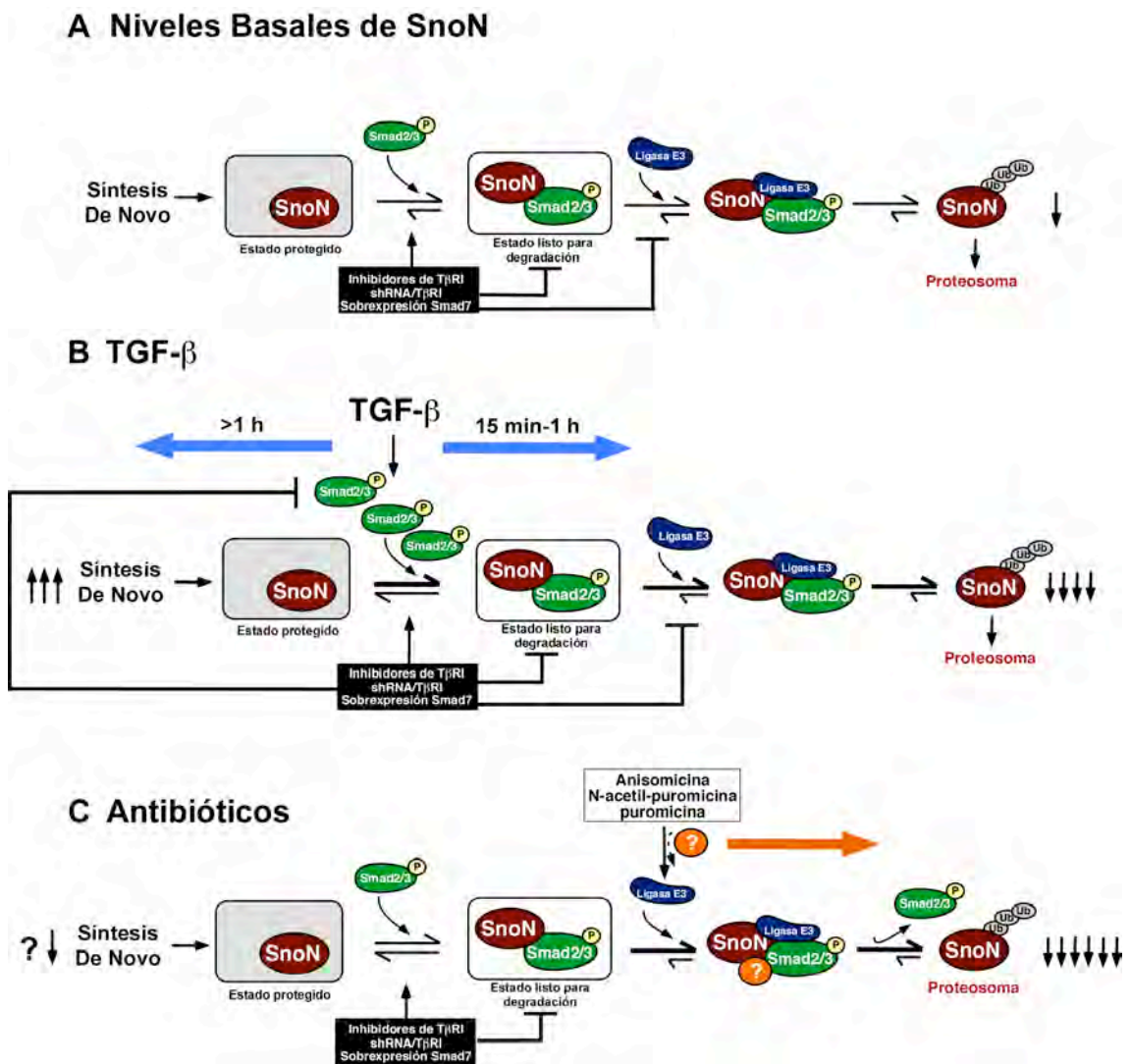


Figura 28. Resumen. A) Modulación del Estado Basal de la proteína SnoN. La proteína SnoN (probablemente Ski también) es sintetizada *de novo*, manteniéndose en un estado inaccesible a la degradación por TGF- β y los antibióticos vía el proteosoma. Sin embargo la señal endógena de TGF- β en la célula (inhibida por los inhibidores del receptor T β RI) induce la fosforilación de basal de Smad2/3, promoviendo la formación de un complejo pSmad2/3/SnoN. Este complejo es clave en la degradación de la proteína SnoN, pues permite la incorporación de las ligasas de ubiquitina, así como poli-ubiquitinación de la proteína SnoN y su posterior degradación vía el proteosoma. B) Regulación de la proteína SnoN en respuesta al estímulo con TGF- β . C) Efecto de los antibióticos ANS, PURO y los análogos N-acetil-PURO y deacetil-

ANS sobre los niveles de la proteína SnoN. Para más detalles, referirse al texto (Modelo basado en Hernández-Damián et al., 2013).

Cuando las células son estimuladas con TGF- β los niveles de la proteína SnoN son degradados (15 min-1 h) por poli-ubiquitinación y la posterior degradación vía el proteosoma. La señal del TGF- β incrementa la fosforilación de las proteínas Smad2/3, reclutando ligasas de ubiquitina a los complejos SnoN/pSmad2/3 recién formados por la señal del TGF- β . De manera paralela la proteína SnoN es sintetizada *de novo* a través de un asa de retroalimentación negativa promovida por TGF- β y las señales de las R-Smads a partir de 1 h del estímulo con la citocina (Figura 28 Panel B).

En el caso de los antibióticos anisomicina y puromicina las señales endógenas de TGF- β son requeridas para la formación del complejo SnoN/pSmad2/3, este *estado listo para degradación* promueve la degradación de la proteína SnoN mediada por TGF- β y antibióticos (Figura 28). La inhibición del receptor T β RI o el depletamiento de las proteínas Smads, promueve la estabilidad de la proteína SnoN, manteniéndola en un estado inaccesible para la degradación por los antibióticos (*Estado protegido*).

El mecanismo de degradación de SnoN (y Ski) induce una caída sostenida en los niveles de proteína. Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo existen contextos celulares específicos que son sensibles al efecto de los antibióticos, probablemente por la existencia de elementos adicionales involucrados en las acciones de anisomicina y puromicina. Estos elementos adicionales probablemente funcionen en los complejos SnoN/Smads/Ligasa de

Ubiquitina, elevando la tasa de degradación de la proteína SnoN (Figura 28 Panel C).

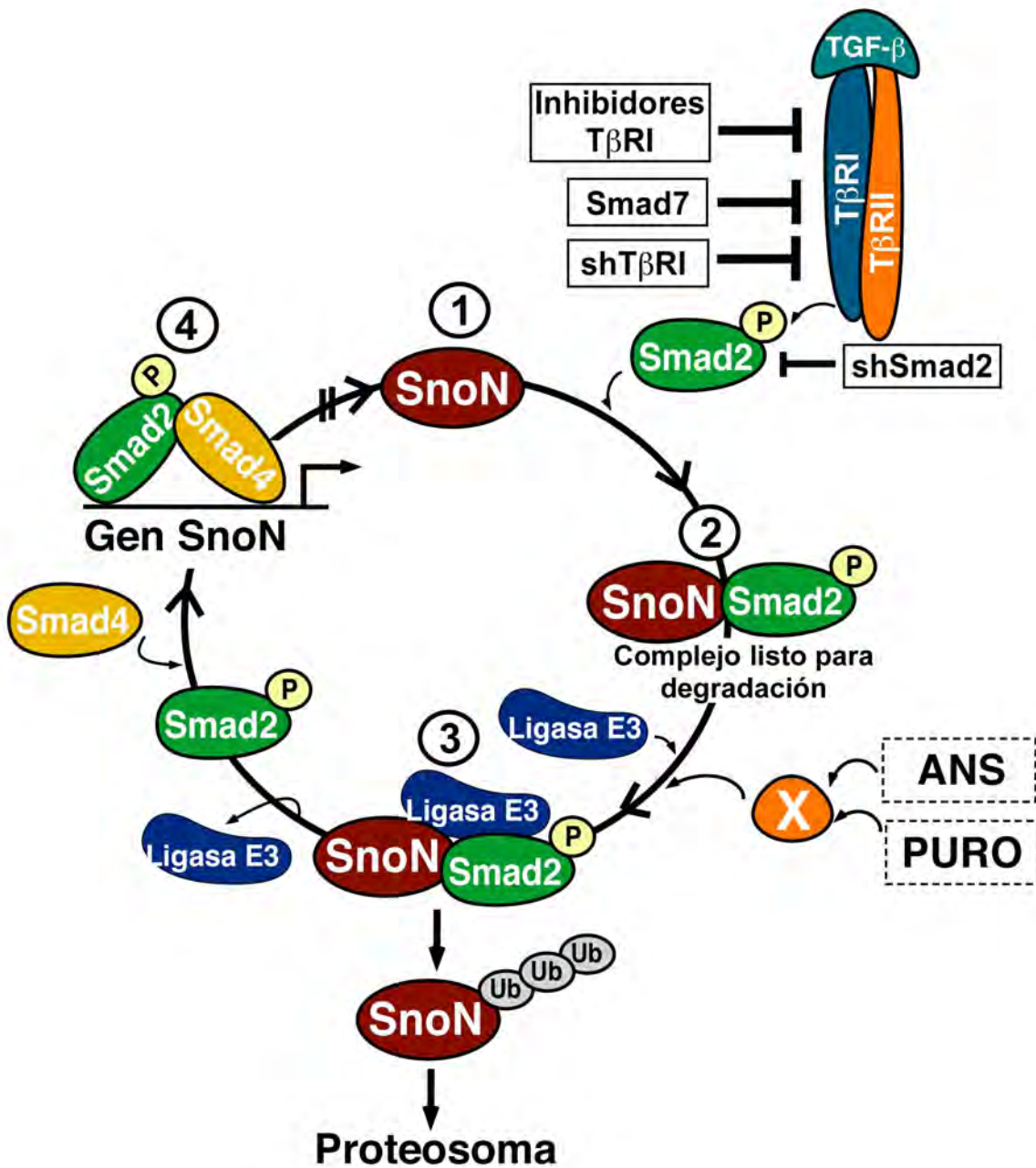


Figura 29. Los antibióticos anisomicina y puromicina modulan la estabilidad de la proteína SnoN a través de los componentes de la señal por TGF-β y elementos adicionales.

Una aproximación de la vida media de la proteína SnoN en la célula resulta del proceso en la síntesis del mensajero/proteína y la estabilidad proteica mediada por los procesos de degradación vía el proteosoma (Figura 29). En un estado basal la proteína SnoN (1), forma complejos proteicos al interaccionar con la proteína pSmad2 en respuesta al estímulo con TGF- β (2). Este complejo posee los elementos necesarios para la degradación de SnoN por los antibióticos (3). Los antibióticos promueven el reclutamiento ligasas de ubiquitina y otros elementos adicionales aún no identificados (3) para la degradación de la proteína SnoN.

La señal del TGF- β y las proteínas pSmad2/3 estimulan la expresión del gen *sno* de manera dependiente de Smad4 (4), restaurando los niveles basales de la proteína SnoN en la célula.

Este trabajo identifica tres antibióticos con estructura molecular diferente. Los tres compuestos sintetizados por el organismo *Streptomyces* comparten efectos en la modulación de vías de señalización de MAPK (Cano et al., 1994) y la degradación de la proteína SnoN vía el proteosoma.

La anisomicina es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariotes, sin embargo otros antibióticos como higromicina y G418 no mostraron modificar los niveles de proteína de Ski y SnoN, sugiriendo que la inhibición de la traducción no es un proceso involucrado en el efecto de anisomicina y puromicina. En este estudio se demostró mediante el uso de líneas celulares resistentes a los efectos ribotóxicos a puromicina que el efecto de la degradación de Ski y SnoN es totalmente independiente de la inhibición

de la síntesis de proteínas y el efecto ribotóxico de los antibióticos, sugiriendo un efecto específico de estas moléculas sobre la proteína SnoN.

En este trabajo se montaron experimentos con compuestos análogos de anisomicina y puromicina. Estas moléculas mostraron efectos en las proteínas Ski y SnoN sin la generación de los efectos ribotóxicos clásicos de los antibióticos. Estas moléculas mostraron potenciar las respuestas transcripcionales dependientes del TGF- β como la expresión del mRNA de *smad7* endógeno. La regulación de la respuesta transcripcional del TGF- β por estas moléculas análogas, perfila estos compuestos como herramientas biológicas en el estudio de las proteínas Ski/SnoN en la señalización del TGF- β .

El TGF- β posee funciones duales en la homeostasis celular como supresor y promotor de tumores. Algunas células tumorales evaden la respuesta pro-apoptótica inducida por TGF- β , a través de la adquisición de mutaciones en los receptores o en las proteínas Smads, sin embargo en algunos casos no se han observado mutaciones que modifiquen la señalización de las proteínas Smads, una alteración en los niveles de expresión de las proteínas Ski y SnoN podría explicar la insensibilidad al TGF- β en estas modelos celulares (Deheuninck y Luo 2009, Jahchan y Luo 2010, Reed et al., 2005)

La sobreexpresión de las oncoproteínas Ski y SnoN ha sido descrita en distintos modelos de cáncer, estudios tempranos reportan que la sobreexpresión de la forma viral *v-ski*, induce un fenotipo transformante en melanocitos de codorniz (Colmenares y Stavnezer 1990).

Modelos en cáncer como el melanoma humano muestran aspectos celulares interesantes para el estudio de la señalización del TGF- β . Se ha descrito que los Receptores y Smads muestran un fenotipo silvestre y son funcionales en respuesta a TGF- β . Los melanocitos humanos son sensibles a la inhibición del crecimiento en respuesta a TGF- β , sin embargo la mayoría de las células provenientes de melanoma pierden progresivamente la sensibilidad a esta citocina proliferando anormalmente. Un reporte describe que los niveles de la proteína Ski están aumentados en 44 muestras provenientes de tumores de melanoma humano, sin embargo aún se desconocen los mecanismos celulares involucrados en la sobreexpresión de Ski en melanoma (Medrano 2003, Reed et al., 2005, Reed et al., 2008). Un estudio del efecto de estos antibióticos y moléculas análogas en los niveles de proteína de Ski y SnoN, la respuesta anti-proliferativa y la expresión de genes por TGF- β en modelos de cáncer, sería de especial interés para la continuación de este trabajo.

Estudios complementarios describen que una reducción en los niveles de la proteína Ski por iRNA inhibe el crecimiento de tumores *in vivo*, así como la restauración del crecimiento dependiente del anclaje, promoviendo la señalización del TGF- β , probablemente por la reactivación de los efectos antiproliferativos de esta citocina (Chen et al., 2009). Se ha adjudicado un valor pronóstico y clínico a las proteínas Ski y SnoN, como marcadores clínicos en la progresión de melanoma, pues se ha asociado su expresión con la presencia de ulceración y nodos positivos centinela en tumores de melanoma (Boone

and Brochez 2009, Reed et al., 2001). La reducción en los niveles de las proteínas Ski y SnoN por los antibióticos y moléculas análogas, provee de una herramienta biológica para la modulación de estas proteínas y una posible relevancia terapéutica.

Estos trabajos muestran la importancia fisiológica en la regulación de las proteínas Ski y SnoN en la homeostasis celular, sería de especial interés para la continuación de este estudio abordar el estudio de la degradación de las proteínas Ski/SnoN por compuestos análogos como deacetil-anisomicina y N-acetil-puromicina en modelos celulares que muestren la sobreexpresión de las oncoproteínas Ski/SnoN y recobrar la respuesta pro-apoptótica por TGF- β .

Conclusiones

- Anisomicina, puromicina y cicloheximida promueven la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma en ciertos contextos celulares.
- El receptor T β RI y la proteína Smad2 son requeridas para la degradación de Ski y SnoN en respuesta a los antibióticos anisomicina y puromicina.
- La degradación de Ski y SnoN por los antibióticos modula las señales transcripcionales dependientes del TGF- β .
- Los compuestos análogos acetil-puromicina y deacetil-anisomicina promueven la degradación de Ski y SnoN en ausencia de efectos ribotóxicos.

Perspectivas

- ❖ Sería de especial interés para la continuación de este trabajo abordar el estudio de la degradación de las proteínas Ski/SnoN por compuestos análogos como deacetil-ANS y N-acetil-PURO en modelos celulares que muestren la sobreexpresión de las oncoproteínas Ski/SnoN y recobrar la respuesta pro-apoptótica por TGF- β .
- ❖ Estudiar el efecto de deacetil-ANS y N-acetil-PURO en el crecimiento de tumores *in vivo* que sean insensibles al efecto pro-apoptótico por TGF- β .
- ❖ Explorar una posible interacción de los antibióticos ANS y PURO con elementos de la vía de señalización de TGF- β (Receptores, Smads, Ski, SnoN, Ligasas de Ubiquitina), que pudiera explicar el mecanismo de degradación de las oncoproteínas Ski/SnoN.
- ❖ Identificar proteínas efectoras involucradas en la degradación de Ski/SnoN por ANS/PURO, además de los elementos en la vía de señalización del TGF- β .

Bibliografía

- Barbacid M, Vázquez D (1974). (3H) anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. *J Mol Biol* **84**: 603-623.
- Boone B, Brochez L. (2009) Clinical markers and driving mechanisms in melanoma progression: VEGF-C, RhoC, c-Ski/SnoN and EGFR. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 71:251-94.
- Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K (2001). TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* **3**: 587- 595.
- Briones-Orta MA, Levy L, Madsen CD, Das D, Erker Y, Sahai E, Hill CS. (2013) Arkadia regulates tumor metastasis by modulation of the TGF- β pathway. *Cancer Res.* **73**:1800-10.
- Briones-Orta MA, Sosa-Garrocho M, Moreno-Alvarez P, Fonseca-Sánchez MA and M Macías-Silva (2006). SnoN co-repressor binds and represses *smad7* promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 889-894.
- Briones-Orta MA, Tecalco-Cruz AC, Sosa-Garrocho M, Caligaris C, Macías-Silva M (2011). Inhibitory Smad7: Emerging roles in health and disease. *Current Mol Pharm* **4** (In Press).
- Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC (1994). Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* **14**: 7352-7362.

- Chen D, Lin Q, Box N, Roop D, Ishii S, Matsuzaki K, Fan T, Hornyak TJ, Reed JA, Stavnezer E, Timchenko NA, Medrano EE. (2009) SKI knockdown inhibits human melanoma tumor growth in vivo. *Pigment Cell Melanoma Res* **6**:761-72.
- Colmenares C, Stavnezer E. (1990) Structure and activities of the ski oncogene. *Semin Cancer Biol.* 1:383-7.
- Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* **15**: 98-102.
- Croons V, Martinet W, Herman AG, De Meyer GR (2008). Differential effect of the protein synthesis inhibitors PUROomycin and cycloheximide on vascular smooth muscle cell viability. *J Pharmacol Exp Ther* **325**: 824-832.
- Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janmey PA, Byers HR, Stossel TP. (1992) Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science.* 255:325-7.
- Deheuninck J, Luo K (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**: 47-57.
- Edmiston JS, Yeudall WA, Chung TD, Lebman DA (2005). Inability of transforming growth factor-beta to cause SnoN degradation leads to resistance to transforming growth factor-beta-induced growth arrest in esophageal cancer cells. *Cancer Res.* **65**:4782-8.
- Estruch F (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469-486.
- Feng XH, Derynck R (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 659-693.

- Feng Y, Walsh CA. (2004) The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol.* 6(11):1034-8.
- Ferrand N, Atfi A, Prunier C. (2010). The oncoprotein c-ski functions as a direct antagonist of the transforming growth factor-beta type I receptor. *Cancer Res* **70**:8457–8466.
- Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G *et al.* (2000). Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J Biol Chem* **275**: 33806–33813.
- Grollman AP (1967). Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J Biol Chem* **242**: 3226-3233.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu Y-Y, Grinnell BW *et al.* (1997). The MAD-Related Protein Smad7 Associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**: 1165-1173.
- Heldin CH, Landström M, Moustakas A (2009). Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* **21**:166-176.
- Hernández-Damián J, Tecalco-Cruz AC, Ríos-López DG, Vázquez-Victorio G, Vázquez-Macías A, Caligaris C, Sosa-Garrocho M, Flores-Pérez B, Romero-Avila M, Macías-Silva M. (2013) Downregulation of SnoN oncoprotein induced by antibiotics anisomycin and puromycin positively regulates transforming growth factor-β signals. *Biochim Biophys Acta.* 1830:5049-5058.

- Huminiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin CH. (2009) Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol.* 9:28
- Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD *et al.* (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**: 65-74.
- Inoue Y, Imamura T (2008). Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* **99**: 2107-2112.
- Izzi L, Attisano L (2004). Regulation of the TGF-beta signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 2071-2078.
- Jahchan NS, Luo K (2010). SnoN in mammalian development, function and disease. *Current Opinion in Pharm* **10**: 670-675.
- Kajino T, Omori E, Ishii S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J (2007). TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor- β signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *J Biol Chem* **282**: 9475-9481.
- Kang JS, Liu C, Derynck R (2009). New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol* **19**:385-394.
- Krakowski AR, Laboureau J, Mauviel A, Bissell MJ, Luo K (2005). Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF-beta signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:12437-42.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J (1996). Partnership between DPC4 and Smad proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* **383**:832-6.

- Lamouille S, Derynck R (2009). Oncogene and tumour suppressor: the two faces of SnoN. *EMBO J* **28**: 3459-3460.
- Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C *et al.* (2002). Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* **62**: 58-64.
- Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V, Hill CS (2007). Arkadia Activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol Cell Biol* **27**: 6068–6083.
- Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF (2001). Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine and Growth Factor Rev* **12**: 1-8.
- Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S *et al.* (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF-beta signaling. *Genes Dev* **13**: 2196-2206.
- Luo K (2004). Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 65-70.
- Lutz M, Knaus P (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* **14**: 977-988.
- Macías-Silva M, Abdollah S, Pirone R, Hoodless PA, Attisano L, Wrana JL (1996). MADR2 is a substrate of the TGF-b receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**: 1215-1224.
- Macías-Silva M, Briones-Orta MA (2009). Ski-like protein-[Isoform SNON]. *Targeted Proteins Database* 1, [22539], 10.2970/tpdb.2009.215. *Current Biodata Ltd*: 1-12.

- Macias-Silva M, Li W, Leu JI, Crissey MA, Taub R. (2002) Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem.* **277**:28483-28490
- Macías-Silva M, Vázquez-Victorio G, Hernández-Damián J (2010). Anisomycin is a multifunctional drug: More than just a tool to inhibit protein synthesis. *Curr Chem Biol* **4**: 124-132.
- Massagué J. (2012) TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**:616-30.
- Massague J, Gomis RR. (2006) *The logic of TGF-beta signaling.* *FEBS Lett.***22**, 2811-20.
- Medrano EE. (2003) Repression of TGF-beta signaling by the oncogenic protein SKI in human melanomas: consequences for proliferation, survival, and metastasis. *Oncogene.* 19;22(20):3123-9.
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 727-737.
- Mishra L, Marshall B (2006). Adaptor proteins and ubiquitinators in TGF-b signaling. *Cytokine and Growth Factor Rev* **17**: 75-87.
- Nagano Y, Mavrakis KJ, Lee KL, Fujii T, Koinuma D, Sase H *et al.* (2007). Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* **282**: 20492-20501.
- Nagata M, Goto K, Ehata S, Kobayashi N, Saitoh M, Miyoshi H, et al. (2006) Nuclear and cytoplasmic c-Ski differently modulate cellular functions. *Genes Cells* **11**:1267-80.

- Nagaraj NS, Datta PK (2010). Targeting the transforming growth factor- β signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 77–91.
- Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP. (2007) Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol.* 5:1011-25
- Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, *et al.* (1997). Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* **389**: 631-635.
- Ogawa T, Hayashi T, Kyoizumi S, Kusunoki Y, Nakachi K, MacPhee DG, *et al.* (2004). Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via p38 MAP-kinase pathway. *J Cell Sci* **117**: 2087-2096.
- Reed JA, Bales E, Xu W, Okan NA, Bandyopadhyay D, Medrano EE. (2001) Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 61(22):8074-8.
- Reed JA, Lin Q, Chen D, Mian IS, Medrano EE. (2005) SKI pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24(2):265-72.
- Reed JA, Chen D, Lin Q, Medrano EE. (2008) SKI is critical for repressing the growth inhibitory function of TGF- β in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* (4):494-5.
- Rosser EM, Morton S, Ashton KS, Cohen P, Hulme AN. (2004) Synthetic anisomycin analogues activating the JNK/SAPK1 and p38/SAPK2 pathways. *Org Biomol Chem.* 2:142-9.
- Ross S, Hill CS (2008). How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 383-408.

- Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. (2001) Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 276(21):17871-7.
- Shi Y, Massagué J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685-700.
- Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS.(2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:138-45.
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**: 771-774.
- Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, Luo K (2001). Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* **15**: 2822-2836.
- Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA (1999). SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12442-12447.
- Tabata T, Kokura K, ten Dijke P, Ishii S (2009). Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-beta target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes Cells* **14**: 17-28.
- Tan R, Zhang X, Yang J, Li Y, Liu Y. (2007) Molecular basis for the cell type specific induction of SnoN expression by hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol.* **18**:2340-2349.
- Torocsik B, Szeberényi J (2000). Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen activated protein kinases and gene expression and to

inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Neurosci* **12**: 527-532.

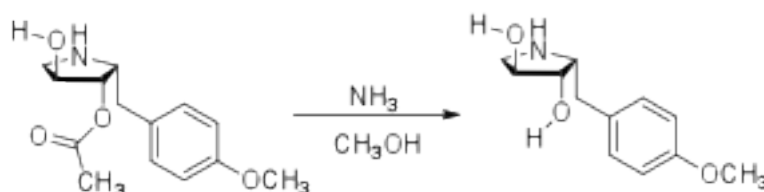
- Vázquez-Macías A, Ruíz-Mendoza AB, Fonseca-Sánchez MA, Briones-Orta MA, Macías-Silva M (2005). Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS Let* **579**: 3701-3706.
- Wakefield LM, Hill CS. (2013) Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 13:328-41
- Wan Y, Liu X, Kirschner MW (2001). The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* **8**: 1027-1039.
- Won JS, Lee JK, Song DK, Huh SO, Jung JS, Kim YH *et al.* (2000). Cycloheximide increases proenkephalin and tyrosine hydroxylase gene expression in rat adrenal medulla. *Mol Pharmacol* **57**: 1173-1181.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994). Mechanism of activation of the TGF-b receptor. *Nature* **370**:341-7.
- Wrana JL, Ozdamar B, Le Roy C, Benchabane H (2008). Signaling receptors of the TGF-b family. In: Derynck R, Miyazono K (ed). *The TGF-b family*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, pp 151-177.
- Zhang F, Laiho M (2003). On and off: proteasome and TGF-beta signaling. *Exp Cell Res* **291**: 275-281.
- Zhu Q, Pearson-White S, Luo K (2005). Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor beta-induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol* **25**: 10731-10744.
- Zhu TN, He HJ, Kole S, D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ, Bernier M. (2007) Filamin A-mediated down-regulation of the exchange factor Ras-GRF1

correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells. *J Biol Chem.* 282(20):14816-26.

APÉNDICE

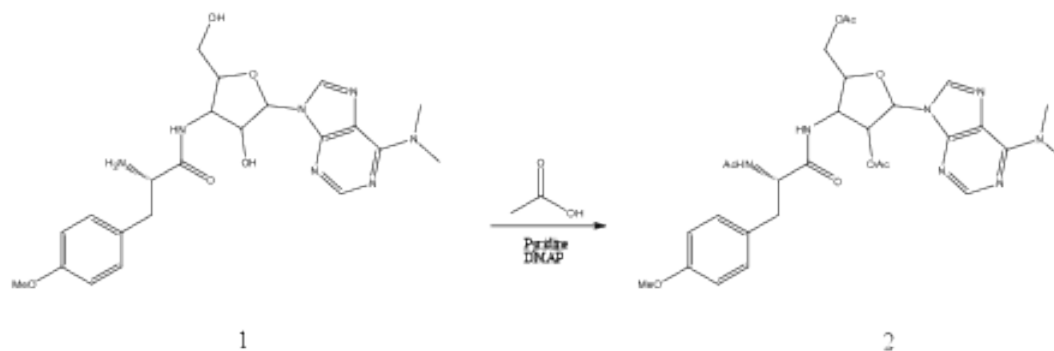
Síntesis de los compuestos análogos de ANS y PURO.

Síntesis de (2R,3S,4S)-Deacetil-anisomicina: 3 mg de ANS fueron disueltos en 2 ml de metanol, fueron colocados en un matraz en un condensador de hielo seco. El sistema fue inyectado con nitrógeno y enfriado a -78°C y el condensador fue llenado con una mezcla de acetona/hielo: Fue condensado 1 ml de amoniaco. El sistema de baño en frío fue removido y se dejó que el sistema llegará a temperatura ambiente. El amoniaco se evaporo bajo una corriente de aire por 12 horas y se concentro en condiciones de baja presión para obtener un producto sólido blanco (2.5 mg) (Rosser et al., 2004).

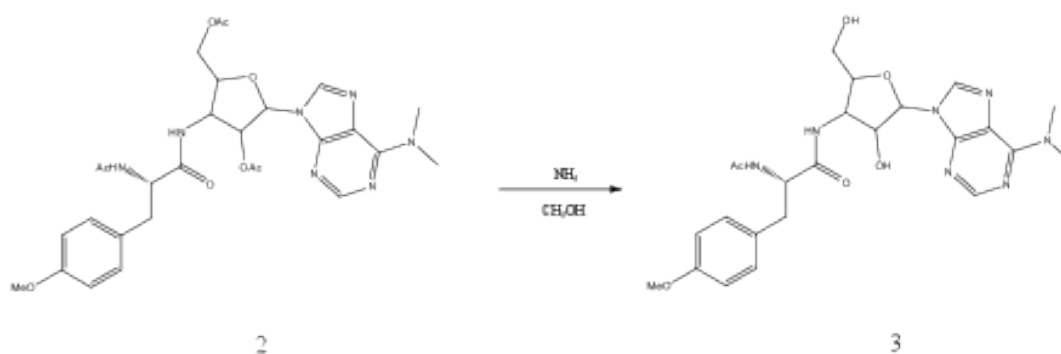


Síntesis de deacetil-puromicina: Una solución de puromicina dihidroclorido 1 (7.6 mg, .0161 mM) fue disuelto en 2 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético fueron adicionados en presencia de DMAP como catalizador. La solución fue mezclada por 36 h bajo una atmósfera de Argón a temperatura ambiente. Los solventes fueron concentrados y las trazas resultates de piridina fueron eliminadas por co-evaporación con tolueno. El residuo fue purificado por cromatografía con (CH₂Cl₂ con proporciones crecientes de 5% de metanol)

como solvente, para la obtención de un producto de rendimiento **2** (4.2 mg , 43.6%) en forma de un sólido blanco.



(3-((S)-2-acetamida-3-(4-metoxifenil)propanamida)-4-acetoxi-5-(6-(dimetilamina)- 9H-purina-9-yl)tetrahidrofurano-2-yl)metil acetato **2**



(2S)-2-acetamida-N-(5-(6-(dimetilamino)-9H-purina-9-il)-4-hidroxi-2(hidroxiometil) tetrahidrofurano-3-il)-3-(4-metoxifenil) propanamida **3**

Una solución de (3-((S)-2-acetamida-3-(4-metoxifenil)propanamida)-4-acetoxi-5-(6-(dimetilamina)- 9H-purina-9-yl)tetrahidrofurano-2-yl)metil acetato **2** (4.2

mg, 7.03×10^{-3} mmol) en metanol (2 ml) fue saturada a -78°C amoníaco anhídrido. La solución fue mezclada a temperatura ambiente por 24 horas y después fue concentrada. El residuo fue purificado por cromatografía flash (cromatografía de presión media) con (CH_2Cl_2 con proporciones crecientes de 5% de metanol) como solvente , para obtener un producto de rendimiento **3** (2.6 mg, 72%) en forma de sólido blanco (Green et al., 1991)

Referencias

E.M. Rosser, S. Morton, K.S. Ashton, P. Cohen, A.N. Hulme. Synthetic anisomycin analogs activating the JNK/SAPK1 and p38/SAPK2 pathways, *Org Biomol Chem.* 2 (2004) 142-149.

T. W. Green, P. G. M. Wuts. Conversion of silyl ethers to other functional groups, in: *Protective Groups in Organic Synthesis*. J. Wiley & Sons Inc., New York, 1991, pp. 88-90.