



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A SMAC/DIABLO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.F.B. GUSTAVO ULISES MARTÍNEZ RUÍZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DRA. MARINA MACIAS SILVA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mi madre, Micaela Ruiz Ramirez

Eres luz resplandeciente que ilumina mi andar. Gracias

A mis hermanos Miguel Angel y Guadalupe

Los llevo en mi pensamiento y corazón. Gracias

Agradecimientos

A Georgina Victoria Acosta por el apoyo durante muchos años. Gracias

A Vilma Maldonado y Jorge Melendez por el apoyo y la enseñanza. Los aprecio

A Karla Vazquez, Franz Pruefer, Luis Hernandez, Laura Muñoz, Luz Maria Mejia y Sergio Garay que son mis amigos y fueron compañeros del laboratorio. Gracias

A los sinodales por sus valiosos puntos de vista en relación a esta tesis.

Al CONACYT por el apoyo otorgado durante mis estudios doctorales (numero de becario 207097).

Al Instituto Carlos Slim de la Salud por el apoyo otorgado durante mis estudios de doctorado (numero de folio S0811162).

Índice General

A. Índice de figuras y tablas.....	6
B. Resumen.....	8
1. Antecedentes.....	9
1.1. Cáncer.....	9
1.2 Carcinogénesis.....	9
1.3 Apoptosis.....	11
1.3.1 La regulación de la apoptosis.....	13
1.3.1.1 La proteína FLIP y la vía extrínseca de la apoptosis.....	14
1.3.1.2 La familia de proteínas BCL-2 y la mitocondria.....	14
1.3.1.3. La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis y las caspasas.....	16
1.4 Las proteínas antagonistas de las PIAs.....	17
1.5 Smac/DIABLO regula negativamente a las PIAs.....	17
1.5.1 La regulación negativa de Smac/DIABLO.....	20
1.5.2 Las isoformas generadas por procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen Smac/DIABLO.....	20
1.6 Efectos biológicos independientes del AVPI de Smac/DIABLO.....	22
1.6.1 Smac- β es una isoforma del gen Smac/DIABLO con actividad pro-apoptótica independiente del AVPI.....	22
1.6.2 La proteína Smac/DIABLO con mutaciones en el AVPI posee efectos biológicos.....	23
1.6.3 La proteína Smac/DIABLO carente del segmento amino-terminal AVPI posee efectos apoptóticos.....	24
2. Planteamiento del problema.....	26
3. Hipótesis.....	27
4. Objetivo General.....	28
4.1 Objetivos específicos.....	28
5. Materiales y métodos.....	29
5.1 Cultivo celular.....	29
5.2 El ensayo de formación de esferoides multicelulares.....	29
5.3 La transfección con liposomas.....	29
5.4 El ensayo de actividad NF- κ B por gen reportero.....	30
5.5 El ensayo de clonogenicidad en agar suave.....	30
5.6 La técnica de western-blot.....	30
5.7 La transcripción reversa del ARN mensajero acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	31

5.8 El ensayo de inmunoprecipitación.....	32
5.9 Los microarreglos de expresión.....	32
5.10 El análisis de datos de los microarreglos.....	33
5.11 El análisis de interacción de genes en vías de señalización.	33
5.12 El fraccionamiento de proteínas citoplasmáticas y nucleares.	34
5.13 El fraccionamiento mitocondrial y citoplasmático.....	34
5.14 Los vectores de expresión.....	35
5.15 El análisis estadístico.	36
5.16 Los reactivos biológicos.....	37
6. Resultados.....	38
6.1 La identificación de una nueva isoforma del gen de Smac/DIABLO.	38
6.2 El análisis de los niveles de expresión de Smac- ϵ en diferentes tejidos sanos y líneas celulares tumorales.....	39
6.3 La proteína Smac- ϵ tiene una localización citoplasmática.	41
6.4 La proteína de Smac- ϵ sufre degradación en ambos extremos, carboxilo- y amino-terminal.....	42
6.5 La proteína Smac- ϵ es degradada vía proteasomal.....	44
6.6 La proteína endógena de Smac- ϵ es degradada constitutivamente por el proteasoma. ..	45
6.7 Los estímulos pro-apoptóticos modulan los niveles de proteína de Smac- ϵ ectópico.	47
6.8 La proteína Smac- α regula la vía canónica de NF-kB.....	49
6.9 La proteína Smac- ϵ no interacciona con XIAP.....	51
6.10 Smac- ϵ no regula los niveles de expresión de las PIAs.....	53
6.11 La expresión ectópica de Smac- ϵ induce aumento en el potencia clonogénico.....	54
6.12 La sobre-expresión de Smac- ϵ incrementa la formación de esferoides.....	55
6.13 El perfil de expresión génica en los esferoides multicelulares expresando Smac- ϵ	57
7. Discusión.....	64
8. Conclusiones.....	71
9. Perspectivas.....	72
10. ANEXOS.....	73
10.1 Abreviaturas.....	73
10.2 Iniciadores específicos para la técnica de PCR que se utilizaron en este trabajo.....	74
Bibliografía.....	75
Artículos publicados.....	84

A. Índice de figuras y tablas

1. La proteína Smac/DIABLO es inhibidor de las proteínas inhibidoras de las apoptosis (PIAs).....	18
2. La interacción entre el dominio BIR3 de XIAP y el segmento amino-terminal de Smac/DIABLO.....	19
3. La representación esquemática de las isoformas generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen Smac/DIABLO.....	21
4. Identificación de Smac-ε.....	39
5. El análisis de la expresión de la abundancia relativa del ARN mensajero de Smac-ε en diferentes tejidos sanos.....	40
6. El análisis de la expresión de la abundancia relativa del ARN mensajero de Smac-ε en diferentes líneas celulares tumorales.....	40
7. La proteína Smac-ε tiene una localización citoplasmática.....	42
8. La proteína Smac-ε es procesada proteolíticamente en los extremos amino- y carboxilo-terminal.....	44
9. La proteína Smac-ε es degradada por el proteasoma.....	45
10. La proteína endógena de Smac-ε fue detectada posterior al tratamiento con MG132 en las células T47D.....	46
11. El tratamiento con TNF-α induce la acumulación de Smac-ε ectópico.....	48
12. El tratamiento con TNF-α induce un ligero aumento en la cantidad de las proteínas Smac-ε y HA-Smac-ε.....	48
13. HA-Smac-ε incrementa la actividad de la vía canónica NF-κB.....	50
14. Smac-ε modula la vía NF-κB. La interacción entre el dominio BIR3 de XIAP y el segmento amino-terminal de Smac/DIABLO.....	51
15. La proteína Smac-ε no interacciona con XIAP.....	52
16. Smac-ε no modula los niveles de expresión de las proteínas XIAP, cIAP1 ni Survivina.....	54
17. La expresión ectópica de Smac-ε aumenta el potencial clonogénico de las células.....	55

18. Smac-ε incrementa el tamaño de los esferoides multicelulares	56
19. El mapa de calor de los genes diferencialmente expresados en los esferoides con expresión ectópica de Smac-ε.	59
20. Se detectó la activación de varias vías de señalización en los esferoides generados a partir de células con expresión ectópica de Smac-ε ..	60
21. El análisis de las funciones biológicas que son afectadas por los genes diferencialmente expresados en los esferoides multicelulares con sobre-expresión de Smac-ε.....	61
Cuadro 1. Algunos genes diferencialmente expresados en los esferoides con expresión de Smac-ε fueron analizados en estudios previos en pacientes con cáncer..	62

B. Resumen

Smac- α es una proteína mitocondrial por la presencia de una señal de localización mitocondrial (SLM) en su secuencia codificante. En condiciones apoptóticas, Smac- α es translocada al citoplasma donde regula negativamente a los miembros de la familia de Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (PIAs). Tal inhibición, es mediada por la secuencia de aminoácidos NH₂-terminales Alanina-Valina-Prolina-Isoleucina (AVPI) de Smac- α . Sin embargo, la descripción funcional de proteínas carentes del AVPI sugieren la presencia de funciones biológicas residentes en el extremo carboxilo-terminal o próximo al AVPI de Smac- α . En esta tesis, se describe una nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo del ARNm del gen Smac/DIABLO la cual se ha denominado Smac- ϵ . Esta nueva isoforma carece del AVPI y de la SLM como consecuencia de la exclusión de los exones que codifican para estos segmentos. Smac- ϵ muestra niveles de expresión tejido-específicos a nivel de ARNm en distintas líneas celulares tumorales y tejidos sanos. Interesantemente, los niveles de expresión de la proteína endógena de Smac- ϵ son degradados constitutivamente, al menos, por el proteasoma. Adicionalmente, Smac- ϵ es procesado proteolíticamente en ambos extremos, -amino y -carboxilo-terminal. De los diferentes estímulos apoptóticos que se analizaron, solo TNF- α induce su estabilización. En concordancia con la ausencia de los elementos SLM y AVPI, Smac- ϵ tiene una localización citoplasmática y es incapaz de interaccionar o regular la expresión de PIAs. Inesperadamente, Smac- ϵ ectópico es capaz de aumentar el potencial clonogénico de las células. Así mismo, Smac- ϵ incrementa la capacidad de formar esferoides multicelulares. Finalmente, usando microarreglos de genoma completo para el análisis de expresión génica se determinó que Smac- ϵ activa la vía de señalización receptor de estrógeno entre otras en los esferoides formados. En conclusión, estos resultados soportan la funcionalidad de esta nueva isoforma y arroja evidencia sobre el mecanismo independiente al AVPI propuesto por estudios previos.

1. Antecedentes

1.1. Cáncer.

El cáncer abarca un grupo superior a 100 distintas enfermedades que pueden generarse en diferentes órganos [1]. La patogenia de estas enfermedades esta ligada a modificaciones genéticas y/o epigenéticas que a muy grandes rasgos le confieren a las células una capacidad proliferativa sin restricciones.

El cáncer presenta las siguientes características: 1) insensibilidad a señales inhibitorias para el crecimiento, 2) capacidad de auto-proveerse de señales que promueven su crecimiento, 3) potencial replicativo ilimitado, 4) evasión de la muerte celular programada, 5) angiogénesis e 6) invasión y metástasis a tejidos [2]. Sin embargo, recientemente se ha adicionado dos características, la reprogramación del metabolismo energético y la capacidad de evadir la respuesta inmune [3]. La distinción de un tumor benigno a uno maligno es la capacidad del segundo para realizar invasión y metástasis, además de presentar las características antes mencionadas [4].

1.2 Carcinogénesis

Se distinguen cuatro modelos carcinogénicos, que no son mutuamente excluyentes: *i)* el multipasos/multigenes, *ii)* el relacionado con la inestabilidad genómica, *iii)* el darwiniano y *iv)* el relacionado al microambiente tumoral [5]. En el modelo multipasos/multigenes indica la presencia de alteraciones heredables tanto genéticas como epigenéticas en múltiples genes independientes que ocurren a lo largo de un periodo [6, 7]. Estas alteraciones heredables pueden ser de diferentes clases, como mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas, inserciones, deleciones, rearrreglos cromosómicos, amplificaciones génicas y modificaciones epigenéticas. Estos daños afectan a dos clases de genes, oncogenes y genes supresores de tumor, los cuales regulan positivamente y negativamente la proliferación celular, respectivamente. Esta teoría ha sido apoyada por modelos matemáticos basados en la incidencia de tumores dependientes de la edad que

indican el requerimiento de 3 a 7 alteraciones heredables [7]. Interesantemente, analizando bases de datos se ha podido diferenciar que existen tumores que requieren mas mutaciones que otros [8]. Es importante mencionar, que las alteraciones genómicas en el cáncer se pueden dividir en dos grupos en cuanto a sus consecuencias en el proceso carcinogénico: 1) las mutaciones que dirigen la carcinogénesis debido a que adicionan fenotipos malignos a las células que las contengan y 2) mutaciones pasajera que no tienen alguna incidencia en el fenotipo mostrado por la célula tumoral en un momento dado [1]. La estabilidad genómica durante la división celular es mantenida por los siguientes cuatro mecanismos: 1) replicación del ADN con alta fidelidad; 2) correcta distribución de los cromosomas entre las células hijas durante la mitosis; 3) reparación libre de errores del ADN dañado esporádicamente y 4) coordinación durante el ciclo celular [9]. De tal forma, que la alteración de cualquiera de los mecanismos antes mencionados podría inducir a un estado de inestabilidad genómica. La inestabilidad genómica se puede definir como un proceso que incrementa la proporción alteraciones genómicas. El modelo relacionado con la inestabilidad genómica explica el hecho de que el numero de mutaciones en células normales es muy bajo comparado con la gran cantidad de mutaciones detectadas en células cancerígenas [10]. Este modelo postula la presencia de un fenotipo “mutador” encargado de generar la alta incidencia de mutaciones debido a la mutación de genes que regulan eventos de estabilidad cromosómica o de reparación del ADN [10]. Se han adicionado otros genes involucrados en el fenotipo mutador como aquellos implicados en la segregación cromosómica, regulación del ciclo celular y mantenimiento del genoma [11]. Sin embargo, se han descrito tumores independientes de la presencia del fenotipo mutador [12]. En el modelo Darwiniano dos hechos estrechamente relacionados suceden en la carcinogénesis: 1) la continua presencia de variabilidad genética y/o epigenética en la células individuales y 2) la presencia de un agente seleccionador actuando sobre la diversidad fenotípica de las células (microambiente, sistema inmune, terapia, etc.) [1]. Por lo tanto, aquellas modificaciones genéticas y /o epigenéticas que le confiere una ventaja selectiva a una clona sobre las demás inducen su expansión selectiva debido que están mejor adaptadas a las condiciones del microambiente [13]. Como se había mencionado previamente, estos modelos no son excluyentes por ejemplo: la selección natural de clones en el proceso carcinogénico esta

ligada a una alta variación heredable la cual puede ser debida a la inestabilidad genómica. En el modelo Darwiniano, o también llamado ecológico, el tratamiento con quimio y/o radio-terapia a un paciente es interpretado como una selección artificial en la cual se expanden las clonas que tengan las modificaciones heredables suficientes para evadir esta presión selectiva [14]. Por lo tanto, la evolución neoplásica como respuesta a las distintas presiones selectivas tiende a seleccionar clonas con propiedades malignas. En el modelo relacionado al microambiente tumoral nos indica que el microambiente es la fuerza que dirige la malignidad en el proceso carcinogénico. El microambiente pro-tumoral se define como el conjunto de células, proteínas y señales presentes en la masa tumoral que son necesarias para la iniciación, el crecimiento y la progresión del cáncer [15]. Básicamente, la formación de un pre-nicho canceroso dependerá de que los distintos tipos celulares tales como las estromales, epiteliales y aquellas derivadas de la médula ósea provean de señales adecuadas para que las células iniciadas puedan evolucionar neoplásicamente. Sin embargo, su malignidad tumoral dependerá de la expansión del nicho tumoral y su posterior maduración [15].

El proceso carcinogénico puede ser separado en tres fases: iniciación, promoción y progresión. La primera etapa comprende la inducción de una célula a un estado irreversiblemente alterado. La etapa de promoción sucede cuando la célula iniciada es expandida clonalmente hasta formar un tumor visible. Esta etapa culmina con la presencia de una lesión benigna. En la siguiente etapa, progresión, la lesión benigna adquiere características malignas definiéndose como cáncer [6].

1.3 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es una de las barreras naturales para eliminar aquellas células que comprometen la homeostasis de los tejidos y finalmente del organismo. El sistema inmune puede eliminar a las células tumorales por medio de la activación de la apoptosis. La evasión de la apoptosis es una de las características que definen al cáncer. En el ambiente clínico, los pacientes diagnosticados con cáncer son tratados con quimio- y/o radio-terapia. Es frecuente la presencia de efectos secundarios como la alopecia, náuseas, supresión del sistema inmune e inclusive el desarrollo de

tejido fibroso o displásico. Sin embargo, el peor efecto es la aparición de cánceres resistentes a la terapia, los cuales son altamente mortales. Estos cánceres secundarios son originados como consecuencia de la selección de células malignas resistentes a la inducción de la apoptosis por la quimio- y/o radio-terapia [16]. De tal forma, la resistencia a la apoptosis constituye una ventaja selectiva para las clonas cancerosas a factores endógenos (sistema inmune) o artificiales (terapia). Esta ventaja repercute en la evolución del cáncer hacia fenotipos más agresivos [14].

La apoptosis puede ser activada principalmente por dos vías: la extrínseca (mediada por receptores de muerte) y la intrínseca (mediada por la mitocondria). La vía extrínseca está involucrada en reconocimiento y el procesamiento de señales extracelulares mientras que la intrínseca reconoce señales intracelulares. Existe dos tipos de células en cuanto a la sensibilidad apoptótica: Las células de tipo 1 y 2. Las primeras son sensibles a la apoptosis mediada por la vía extrínseca mientras que las de tipo 2 necesitan amplificar esta señal por medio de la activación de la vía intrínseca. Ambas vías culminan con la activación de caspasas que en ausencia de algún estímulo inductor apoptótico se encuentran inactivas como zimógenos. Las caspasas pueden diferenciarse en dos tipos, las iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) y las efectoras (caspasa-3, -6 y -7), como sus nombres lo indican están involucradas en la activación y en la culminación de la apoptosis, respectivamente. Una vez que son activadas las caspasas presentan actividad enzimática cisteín-proteasas. De esta forma, las caspasas degradan a sus sustratos específicos generándose así la morfología apoptótica.

Básicamente, la activación de la vía extrínseca ocurre cuando un receptor de muerte es activado por su ligando específico. Estos receptores de muerte son una super-familia de receptores caracterizados por un dominio intracelular de muerte y un dominio extracelular encargado del reconocimiento del ligando específicos. La asociación del ligando con su receptor específico, como sucede con TNF- α y TNF-R1, induce el reclutamiento dependiente de los dominios de muerte de proteínas adaptadoras como FADD, TRADD o RAIDD formándose el complejo de señalización inductor de muerte (CSIM). Este complejo recluta a la caspasa iniciadora pro-caspasa-8 la cual se auto-activa por procesamiento proteolítico. La vía intrínseca puede ser activada por distintos

estímulos tales como: hipoxia, irradiación, ausencia de factores de crecimiento, choque térmico y antineoplásicos. Estos estímulos inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial induciendo la salida de proteínas mitocondriales retenidas en el espacio intermembranal. A este evento, se le ha denominado como “el punto del no retorno” debido a que se afecta irreversiblemente la función generadora de energía de la mitocondria por la translocación del Citocromo-c al citoplasma y se favorece el comienzo de la apoptosis [17]. El citocromo-c citoplasmático se asocia al factor inductor de apoptosis-1, la pro-caspasa-9 y ATP para formar el apoptosoma el cual induce auto-activación de la caspasa-9. La caspasa-9 activa induce la activación de las caspasas efectoras por medio de su actividad cisteína-proteasa amplificando la señal apoptótica. Finalmente, las caspasas efectoras activas degradan a sus sustratos blancos generandose la aparición de las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis.

Se han descrito proteínas mitocondriales adicionales al citocromo-c involucradas en la apoptosis intrínseca. Las proteínas mitocondriales que son liberadas al citoplasma en condiciones apoptóticas son Factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G, Omi/HTRA2 y Smac/DIABLO. La proteína AIF esta involucrada en la fragmentación del ADN en gran escala, aproximadamente 50 kb, pero no a nivel de nucleosoma [18]. En el caso de la endonucleasa G, también ha sido asociada con fragmentación del ADN. Sin embargo, su actividad catalítica es 100 veces menor que CAD/DFP40 [19, 20]. La DNAsa CAD/DFP40 es activada por caspasa-3 liberándose CAD la cual fragmenta el ADN a nivel de nucleosoma.

La activación de la apoptosis en las células tipo 2 es determinado cuando la caspasa-8 procesa proteolíticamente a BID, miembro de la familia BCL2, el cual se transloca a la mitocondria permitiendo la salida de proteínas mitocondriales, activándose así la vía intrínseca.

1.3.1 La regulación de la apoptosis

La regulación del evento apoptótico es llevado a cabo por tres mecanismo de acción: 1) la inhibición de la vía extrínseca mediado por la proteína FLIP, 2) La regulación de la vía

intrínseca por la familia BCL2, y 3) la inhibición de la caspasas activas por la familia de Proteínas inhibidoras de la apoptosis (PIAs).

1.3.1.1 La proteína FLIP y la vía extrínseca de la apoptosis

La activación de la vía extrínseca induce la formación del DISC reclutándose pro-caspasa-8. La proteína FLIP es estructuralmente homologa a pro-caspasa-8 pero no tiene actividad catalítica. FLIP interacciona con el CSIM por medio de los dominios DED del FADD inhibiendo el reclutamiento y activación de la caspasa-8. Dado que la proteína FLIP es un punto de control de la vía extrínseca, la inhibición de la expresión de FLIP junto con la activación de la vía extrínseca es una estrategia para inducir apoptosis en células tumorales [21, 22]. Adicionalmente, la activación transcripcional de FLIP por medio de la vía NF- κ B como consecuencia del tratamiento con TNF- α prolonga la vida en las células debido a que evaden la apoptosis [23, 24]. Estos ensayos funcionales demuestran a FLIP como punto de decisión en la activación de la apoptosis activada por la vía extrínseca.

1.3.1.2 La familia de proteínas BCL-2 y la mitocondria.

Otro mecanismo de regulación es mediado por los miembros de la familia BCL2. Esta familia regula la salida de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas cuando se activa la vía intrínseca de la apoptosis. La familia BCL2 caracterizada estructuralmente por tener de uno a cuatro dominios de homología a BCL2 (BH) y algunos miembros tienen una región transmembranal. Esta familia puede ser dividida en dos grupos: miembros anti-apoptóticos (BCL2, BCL-w, BCL-X_L, MCL1, BOO/DIVA) y miembros pro-apoptóticos (BAX, BID, BAD, BIK, BAK, BOK, BCL-X_S, PUMA, NOXA, NIX, BIM). Sin embargo, los miembros mas estudiados pueden dividirse en dos categorías en base a la presencia de los dominios BH. Los miembros de la familia BCL2 con los dominios BH-1, -2 y -4 están ligados a actividades anti-apoptóticas. Mientras que los miembros que contienen el dominio BH3 presentan efectos pro-apoptóticos. Se distinguen dos sub-

familias con actividad pro-apoptótica: Subfamilia BAX (conformada por las proteínas BAX, BAK y BOK) y la subfamilia de proteínas con solo el dominio BH3, como su nombre lo indica esta formada por proteínas que solo contienen tal dominio (BID, BAD y BIM) [25]. Se han descrito dos mecanismos de acción por parte de esta familia para la modulación de la salida de proteínas mitocondriales. Uno de ellos estipula que la familia BCL2 tiene efectos regulatorios sobre el complejo poro de transición de permeabilidad (CPTP) el cual tiene puntos de contacto en la ambas membranas mitocondriales, la externa y la interna. El CPTP está formado por varias proteínas entre las cuales se encuentran el translocador de nucleótido adenina, el canal de voltaje dependiente de anión y el receptor de benzodiazepina periférico [26, 27]. Las proteínas BCL2 y Bax regula la permeabilidad de las membranas interna y externa de la mitocondria por medio de interacciones específicas con el CPTP [28]. El otro mecanismo descrito indica que las proteínas anti-apoptóticas BCL2 están asociadas a la membrana de la mitocondria mientras que las proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bid, Bad y Bim se encuentran en el citosol pero son translocadas a la membrana externa de la mitocondria ante estímulos inductores de la apoptosis. Se han descrito que modificaciones postraduccionales en respuesta a estímulos específicos (insultos pro-apoptóticos) activan los dominios BH3 de las proteínas pro-apoptóticas induciendo su translocación a la mitocondria en donde ejercen sus funciones pro-apoptóticas. Por ejemplo, Bad defosforilado es liberado de la represión ejercida por proteínas 14-3-3. De esta forma, Bad es capaz de interactuar con BCL-X_L bloqueando la función anti-apoptótica de esta proteína. En el caso de la activación de la vía apoptótica en células tipo 2, Bid es cortado por caspasa-8 formándose la versión trunca de Bid (tBid), tBid interactúa con Bax o Bak induciendo la exposición del segmento amino-terminal de estas proteínas. Esta modificación estructural en Bax o Bak promueve la formación de homo-oligómeros generándose la formación de canales en la membrana externa mitocondrial y, consecuentemente, permitiendo la salida de proteínas mitocondriales.

1.3.1.3. La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis y las caspasas.

El tercer mecanismo de regulación de la apoptosis es llevado a cabo por la familia de Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (PIAs). Estas proteínas tienen como blanco de regulación a las caspasas activas. Se han descrito dos mecanismos por medio de los cuales las PIAs ejercen sus efectos anti-apoptóticos: 1) la regulación de la actividad enzimática de las formas activas de las caspasas por medio de interacción física y 2) la adición postraduccional de residuos de ubiquitina a las caspasas activas para que sean degradadas por el proteasoma. La familia de las PIAs está formada por 8 miembros los cuales son XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP/Livina, ILP2, NAIP, Bruce/Apollon y Survivina. Las PIAs estructuralmente se caracterizan por tener de 1 a 3 dominios Baculovirales denominado (BIR) involucrados en el reconocimiento de las formas activas de las caspasas. Las proteínas XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen tres dominios BIRs. Algunas PIAs como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen un dominio RING situado en la posición carboxilo-terminal. El dominio RING posee actividad E3 ubiquitin-ligasa. La poli-ubiquitinación de las proteínas funciona en la mayoría de las veces como una señal para su degradación por parte de la subunidad 26S del proteasoma. El proceso de poli-ubiquitinación es llevado a cabo por tres enzimas: la enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la enzima ligasa de ubiquitina (E3). De las tres enzimas antes mencionadas, la E3 es la que determina la especificidad hacia el sustrato a modificarse postraduccionalmente. De tal forma, el dominio RING de las PIAs es decisivo para que una proteína sea poli-ubiquitinada. Se ha observado que las PIAs con el dominio RING inducen la degradación de las caspasas retenidas por ellas por medio del mecanismo dependiente de ubiquitinación [29]. La PIA más estudiada es la XIAP, la cual interacciona por medio del dominio BIR3 con la caspasa-9 activa y por medio de la región que une a los dominios BIR1 con BIR2 con las caspasas-3 y caspasa-7 activas [30, 31]. La asociación de XIAP con las caspasas antes mencionadas reprime la actividad catalítica de estas favoreciendo la evasión de la apoptosis. Se ha determinado que XIAP es la PIA con mayor efecto inhibitorio de la actividad de las caspasas. Se ha establecido que la resistencia tumoral a la terapia convencional se debe, en parte, a la sobre-expresión de XIAP y la disminución de los niveles de esta proteína restablece la

sensibilidad a la terapia [32]. En cuanto a los otros miembros de la familia PIA, se ha reportado que la proteína ML-IAP/Livina inhibe a las caspasa 3 y 9 mientras que c-IAP1 y c-IAP2 inhiben a las caspasa 3 y 7 [33].

1.4 Las proteínas antagonistas de las PIAs.

La familia de las PIAs son los reguladores negativos de las formas activas de las caspasas. De las proteínas mitocondriales que son liberadas al citoplasma, existe un grupo de proteínas que funcionan como inhibidores de las PIAs. Estas proteínas son ARTS, Omi/HTRA2 y Smac/DIABLO. La proteína ARTS es liberada al citoplasma en condiciones apoptóticas donde interactúa específicamente con el dominio BIR-3 de XIAP induciendo la liberación de caspasas retenidas por XIAP [34, 35]. Omi/HTRA2 es una proteína con actividad proteasa de serina la cual es necesaria para ejercer sus efectos pro-apoptóticos [36]. En su extremo NH₂-terminal expone un tetra-péptido conocido como motivo de interacción para PIAs. Este motivo es determinante para asociarse al dominio BIR-2 y BIR-3 de XIAP induciendo la liberación de caspasa-3 que la caspasa-9 [36, 37].

1.5 Smac/DIABLO regula negativamente a las PIAs.

La proteína Smac/DIABLO canónica, Smac- α , esta compartimentada en la mitocondria debido a que contiene en el extremo amino-terminal una señal de localización mitocondrial (SLM) la cual es procesada cuando se importa a este organelo generándose la proteína madura que consta de 184 aa [38]. Este procesamiento proteolítico induce la exposición de un motivo de unión para las PIAs. Ante diferentes estímulos inductores de la apoptosis Smac- α es expulsado al citoplasma como consecuencia de la pérdida de permeabilidad de la membrana externa mitocondrial. La proteína Smac- α en el citoplasma antagoniza las actividades supresoras de apoptosis de las PIAs liberando a las formas activas de las caspasas retenidas por estas [39] (Figura 1).

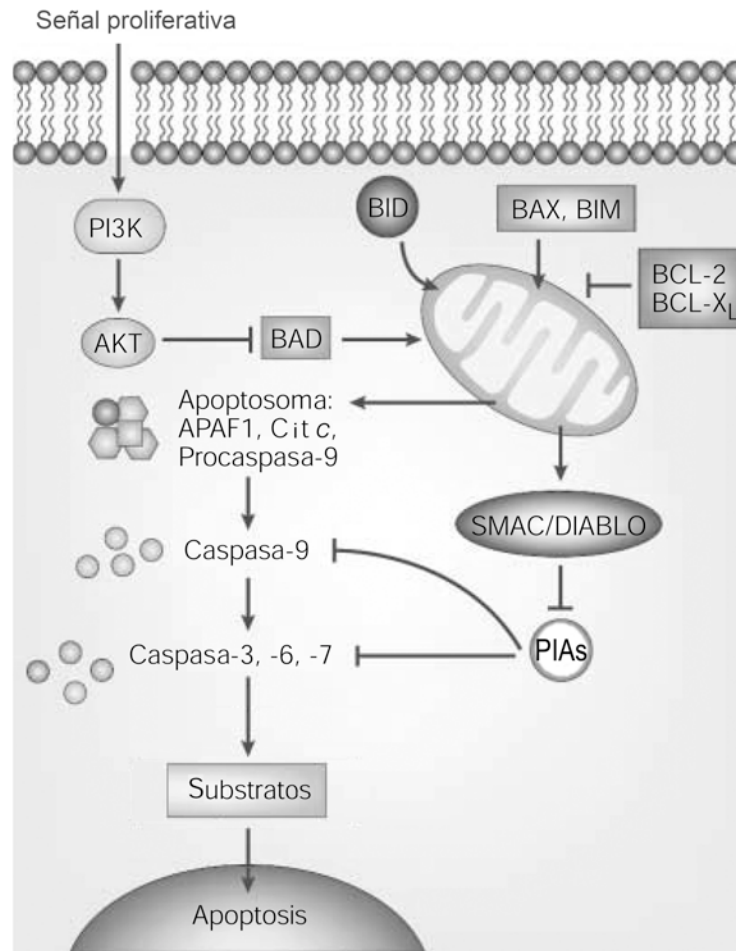


Figura 1. La proteína Smac/DIABLO es inhibidor de las proteínas inhibidoras de las apoptosis (PIAs). La proteína Smac/DIABLO es translocada al citoplasma debido a la pérdida de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial como consecuencia de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Smac/DIABLO interacciona y antagoniza las funciones antiapoptóticas de las PIAs favoreciendo la culminación de la apoptosis (Modificado de Igney F.H, et al [40]) .

El mecanismo de acción para interactuar específicamente con las PIAs radica en el extremo amino-terminal de Smac- α donde presenta la secuencia de aminoácidos Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) los cuales son indispensables para interactuar específicamente con las PIAs (Figura 2) [41]. La proteína Smac- α interacciona por medio del AVPI con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP induciendo la liberación de las caspasas activas -3, -7 y

-9 [42, 43]. Interesantemente, por medio del análisis de datos estructurales entre las formas silvestre y mutantes de Smac/DIABLO, se concluyo que la proteína Smac- α forma homodímeros [42]. La pérdida de esta capacidad, ya sea por mutaciones puntuales o por modificaciones postraduccionales compromete sus funciones pro-apoptóticas [42, 44]. Se ha descrito que Smac/DIABLO es capaz de interactuar por medio del AVPI con cIAP-1 [45-47], cIAP-2 [47], survivina [48, 49], livina [50] y BRUCE [51].

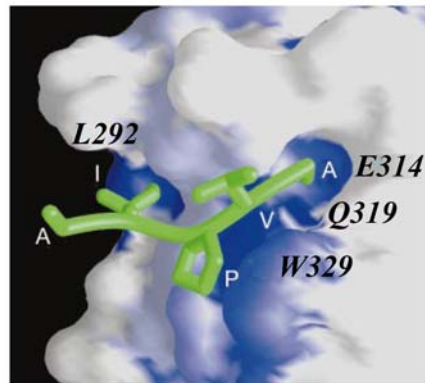


Figura 2. La interacción entre el dominio BIR3 de XIAP y el segmento amino-terminal de Smac/DIABLO. En color verde se muestran la estructura de los aminoácidos NH₂-terminales de Smac/DIABLO (AVPI, Alanina-Valina-Prolina-Isoleucina). Las letras en color negro muestra los aminoácidos de XIAP que interactúan con Smac/DIABLO (Modificado de Wu G., et al [41]).

Adicionalmente a las actividades antagónicas de Smac/DIABLO sobre las PIAs, se ha descrito que Smac/DIABLO es capaz de modular los niveles de PIAs por medio de promover la auto-ubiquitinación de las PIAs. Las PIAs poli-ubiquitinadas pueden ser blanco de degradación por el proteasoma. Específicamente, Smac/DIABLO induce degradación de c-IAP1 y c-IAP2 debido a que favorece su auto-ubiquitinación. Sin embargo, Smac/DIABLO no es capaz de inducir la degradación de XIAP [47, 52] pero se ha detectado que favorece su auto-ubiquitinación [47]. La relevancia biológica de la auto-ubiquitinación de XIAP mediada por Smac/DIABLO no ha sido estudiada.

1.5.1 La regulación negativa de Smac/DIABLO.

Se ha descrito que los niveles de expresión de Smac- α son regulados por algunas PIAs. Específicamente, las proteínas XIAP [53], c-IAP1 y cIAP2 [54], y Livina [50] poli-ubiquitinan a Smac- α por medio sus dominios RINGs haciéndola susceptible a la degradación por parte del proteasoma. Por otra parte, Smac/DIABLO es susceptible de sufrir otras modificaciones postrasduccionales distintas a la ubiquitinación. La proteína JNK3 fosforila a Smac/DIABLO reduciendo su afinidad de unión a XIAP y por ende no incide sobre la actividad antagónica de XIAP hacia las caspasas [55]. Por otro lado, los efectos pro-apoptóticos de Smac/DIABLO se presentan cuando se transloca al citoplasma. El tratamiento con un inhibidor específico para JNK1 o la sobre-expresión de la mutante dominante negativa de la misma proteína retiene a Smac/DIABLO en la mitocondria en condiciones apoptóticas de tal forma que se evade la apoptosis [56].

1.5.2 Las isoformas generadas por procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen Smac/DIABLO

El gen de Smac/diablo está compuesto por 7 exones. Los exones 1 y 3 codifican para la señal de localización mitocondrial (SLM). El segmento AVPI esta contenido en el exón 3 pero se expone cuando se elimina el SLM al importarse la proteína a la mitocondria. Actualmente, se han descrito tres isoformas de Smac/DIABLO generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero: La isoforma Smac- α de la cual se ya se ha mencionado sus características, Smac- β [38, 57] y Smac- δ [44, 58] (Figura 3). La secuencia codificante para Smac- β pierde los exones 1 y 3, eliminándose la SLM. El inicio de la transcripción para esta isoforma se genera en un codón alternativo (exón 2). Experimentalmente se demostró que la sobre-expresión de esta isoforma tiene una localización citoplasmática comprobándose indirectamente la funcionalidad del SLM [57]. Smac- β no es capaz de interaccionar con PIAs debido a que carece del AVPI. Sin embargo, es capaz de sensibilizar a las células a morir por apoptosis inducida por distintos agentes pro-apoptóticos [57]. Este antecedente pudiera indicar funciones pro-

apoptóticas adicionales al AVPI presentes en Smac- α . La isoforma Smac- δ pierde los exones 2 y 3 conservándose el SLM y el AVPI. Al igual que Smac- α , Smac- δ reside en la mitocondria y es translocada al citoplasma en condiciones apoptóticas donde interacciona específicamente con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP [58]. Sin embargo, Smac- δ es capaz de inducir la degradación de XIAP cuando interacciona con esta pero no así la isoforma canónica de Smac/DIABLO [58]. Adicionalmente, esta isoforma forma homodímeros con ella misma y no se asocia con Smac- α pero si con XIAP [44]. La sobre-expresión de esta isoforma incrementa modestamente la apoptosis inducida por la inhibición del proteasoma [44].

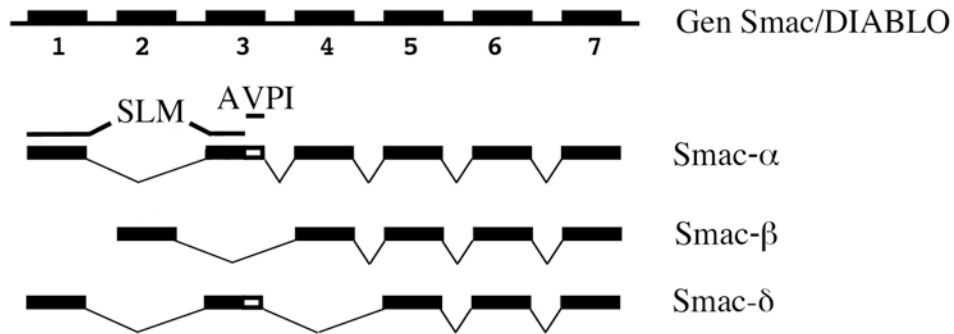


Figura 3. La representación esquemática de las isoformas generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen Smac/DIABLO. Los exones son representados como rectángulos negros. La isoforma canónica, Smac- α , tiene en su extremo amino terminal una Señal de Localización Mitocondrial (SLM) la cual es procesada cuando ingresa a tal organelo. Esto ocasiona la exposición del motivo de interacción para las PIAs formado por 4 aminoácidos, Alanina-Valina-Prolina-Isoleucina (AVPI). La isoforma Smac- β no tiene el SLM ni el AVPI. La isoforma Smac- δ y Smac- α son similares debido a que contienen el SLM y el AVPI pero Smac- δ carece del exón 4.

1.6 Efectos biológicos independientes del AVPI de Smac/DIABLO.

Los efectos pro-apoptóticos de la isoforma canónica de Smac/DIABLO están mediados por el AVPI en el extremo amino-terminal. Esta característica ha sido explotada por diferentes grupos de trabajo en el sentido de sintetizar pequeñas moléculas que mimeticen el AVPI con el fin de inducir apoptosis al inhibir las funciones antagónicas de las PIAs hacia las caspasas [59-61]. Sin embargo, en las siguientes secciones se describirá la evidencia experimental que muestra acciones biológicas de Smac- α independiente de la presencia del AVPI.

1.6.1 Smac- β es una isoforma del gen Smac/DIABLO con actividad pro-apoptótica independiente del AVPI.

La única isoforma estudiada de Smac/DIABLO generada por el procesamiento alternativo que carece del AVPI es Smac- β . La proteína Smac- β no es capaz de interactuar con las PIAs cuando es sobre-expresada en líneas celulares tumorales. Adicionalmente, el extremo amino-terminal de Smac- β sufre un procesamiento proteolítico explicando su inhabilidad de interactuar con las PIAs *in vivo*, aunado al hecho de que esta isoforma carece del AVPI [57]. Sorprendentemente, la sobre-expresión de esta isoforma sensibilizó a la apoptosis en la misma magnitud que la forma canónica de Smac/DIABLO ante el tratamiento con diferentes agentes antineoplásico en líneas celulares tumorales [57]. Otro grupo de investigación describió que Smac- β no es capaz antagonizar las funciones represoras de XIAP hacia las caspasas -9, -7 y -3 debido a su incapacidad de interacción con los dominios BIR3 y BIR1-BIR2 [38]. El análisis de estos trabajos, nos hacen postular que las acciones de pro-apoptóticas Smac- β son independientes de su asociación con PIAs y que el mecanismo pudiera no estar mediado por la regulación de las formas activas de las caspasas.

1.6.2 La proteína Smac/DIABLO con mutaciones en el AVPI posee efectos biológicos.

Se ha demostrado que mutaciones puntuales en cualquiera de los 4 primeros aminoácidos en el extremo amino-terminal de la proteína madura de Smac/DIABLO, el llamado segmento AVPI, inhabilita a la proteína de interactuar con las PIAs [41-43] y por ende, en muchos casos se pierden las funciones pro-apoptóticas de Smac/DIABLO. Estructuralmente se ha determinado que los cuatro residuos amino-terminales de Smac/DIABLO reconocen una estructura conformacional específica en el dominio BIR3 de XIAP, mapeado entre los residuos 241-356 de XIAP [43], donde el primer residuo de Smac/DIABLO, alanina, interactúa con este segmento hidrofóbico de XIAP por medio de 5 enlaces de hidrógeno [41]. La sustitución de esta alanina por otro aminoácido o la adición de grupos acilos o metilos hacen que pierda afinidad hacia XIAP [43]. Adicionalmente, se determinó que la mutación en los aminoácidos valina, prolina e isoleucina del AVPI, también comprometen la habilidad de Smac/DIABLO para interactuar con XIAP si se toma como referencia de comparación las constantes de disociación entre estos motivos estructurales [43]. Sin embargo, existe evidencia experimental que muestra efectos biológicos independientes de la mutación del AVPI. La sobre-expresión de la mutante de Smac/DIABLO con delección de alanina en el AVPI (Smac- Δ A) en células HeLa indujo auto-ubiquitización de XIAP y Livina en forma similar como la hace la forma canónica de Smac/DIABLO [47]. Sin embargo, a diferencia de la isoforma silvestre de Smac/DIABLO (Smac- α), Smac- Δ A no fue capaz de interactuar con XIAP y Livina [47]. Por lo tanto, las acciones de Smac- Δ A parecen requerir factores no conocidos para ejercer estas modificaciones sobre XIAP y Livina por un mecanismo distinto al de Smac- α . La relevancia biológica acerca de la auto-ubiquitinación de PIAs por Smac- α con el AVPI mutado no ha sido profundizada. Sería interesante analizar el efecto de tal modificación dado que las PIAs están relacionadas con la modulación de la vía NF- κ B por su actividad ubiquitin-ligasa [59, 62, 63] y de otros eventos celulares (invasión, motilidad celular y migración) [64]. Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales en las PIAs pudiera presentar un efecto biológico

distinto a la regulación de la apoptosis. Adicionalmente, se ha descrito que Smac regula la supresión tumoral independientemente de sus funciones conocidas en la apoptosis [65]. En otro estudio se analizó el efecto apoptótico de Smac- α que fue mutado por la adición de una metionina en el extremo amino-terminal bloqueando el primer aminoácido del AVPI (Smac-M-AVPI), esta modificación fue suficiente para bloquear su habilidad para interactuar con las PIAs como Survivina [48]. Sin embargo, en tal trabajo Smac-M-AVPI sensibilizó a las células a la apoptosis inducida por Taxol pero en menor grado que la forma canónica [48]. Los autores postularon la existencia de un mecanismo aun no caracterizado implicado en la actividad pro-apoptótica desplegada por Smac-M-AVPI. Por otro lado, se analizó el efecto de la sustitución de la alanina del AVPI por metionina de la proteína Smac- δ modificándose el extremo-amino-terminal por MVPI (Smac- δ -M-VPI). La proteína Smac- δ -M-VPI es capaz de interactuar con el dominio BIR2 de XIAP in vitro [58]. Estos estudios nos indican que aunque el AVPI sea mutado, la proteína Smac presenta funciones biológicas tales como la sensibilización a agentes antineoplásicos e inducción de modificaciones postraduccionales independientes de su interacción con la proteína blanco.

1.6.3 La proteína Smac/DIABLO carente del segmento amino-terminal AVPI posee efectos apoptóticos.

La delección del AVPI de la proteína Smac- α , que se encuentra en el extremo amino-terminal, induce la pérdida de su función pro-apoptótica mediada por la regulación de la PIAs [38, 41]. Smac- Δ -60 y Smac- Δ -75 son proteínas trunca donde se eliminan los últimos 4 y 20 nucleótidos en el extremo amino-terminal, respectivamente. Estas proteínas carentes del AVPI sensibilizaron a diferentes líneas celulares a sufrir apoptosis ante diferentes agentes antineoplásicos [57]. En otro estudio, se observó que en condiciones apoptóticas Smac- α , mediante su AVPI, se asocia al complejo de señalización del receptor a linfoxina- β activado. Sin embargo, mediante un mecanismo desconocido, la sobre-expresión de Smac- Δ -76, otra proteína trunca artificial donde se eliminan 21 nucleótidos amino-terminales, fue incapaz de interactuar con el complejo

derivado de la activación del receptor linfotoxina- β pero sensibilizó a la apoptosis de la misma forma que la sobre-expresión de Smac- α [66]. Otra proteína trunca del segmento AVPI es Smac- Δ -73, en donde se eliminan 18 aa en el extremo amino-terminal. Smac- Δ -73 demostró tener propiedades apoptóticas independientemente de su inhabilidad de interactuar con las PIAs [48]. Por otro parte, experimentalmente se comprobó que Smac- Δ -60 es capaz de interactuar con XIAP indicando que la presencia del AVPI podría ser dispensable en ciertas condiciones [44]. Estos estudios demuestran acciones biológicas de Smac- α que no dependen de la presencia del AVPI señalando la existencia de un mecanismo aun no caracterizado. Interesantemente, se ha descrito que Smac- α interactúa con otra proteína mediante un sitio distinto al AVPI. La proteína Smac- Δ -60 o Smac- α interactúa con la proteína NADE en un sitio proximal al AVPI. Esta interacción tiene significado biológico, NADE al interactuar con Smac- α inhibe la poli-ubiquitinación de Smac- α ejercida por XIAP [67]. Tal trabajo es el único descrito que involucra una interacción específica independientemente del AVPI. El análisis en conjunto de los efectos biológicos de las mutantes en el AVPI de Smac- α sugieren que existe un mecanismo alternativo al atribuido en su extremo amino-terminal, AVPI.

2. Planteamiento del problema

Smac- α es una proteína mitocondrial por la presencia de una Señal de Localización Mitocondrial (SLM) en su secuencia codificante. En condiciones apoptóticas, Smac- α se transloca al citoplasma donde se asocia y antagoniza las funciones anti-apoptóticas de las Proteínas Inhibidoras de las Apoptosis (PIAs). Las PIAs regulan negativamente a las caspasas activas por interacción física con ellas de tal forma que la actividad antagónica de Smac- α hacia las PIAs favorece la apoptosis. En el extremo amino-terminal de la proteína Smac- α se encuentra el sitio de unión para las PIAs formado por los aminoácidos Alanina-Valina-Prolina-Isoleucina (AVPI). Sin embargo, la descripción de formas artificiales de Smac- α con mutaciones en el AVPI o la delección del mismo sugieren la posible existencia de funciones biológicas independientes del AVPI. En este trabajo, hemos descubierto una nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen Smac/DIABLO que aun no ha sido descrita. Esta isoforma carece de los elementos SLM y AVPI. Dadas estas características intrínsecas, la descripción funcional de esta nueva isoforma podría arrojar datos relevantes sobre las funciones biológicas independientes al AVPI de Smac- α .

3. Hipótesis

Smac- ϵ , una nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo de los exones del gen Smac/DIABLO, incrementará el potencial clonogénico de las células y la capacidad de formar de esferoides multicelulares independientemente de su asociación con las PIAs.

4. Objetivo General

Caracterizar la nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo del ARN mensajero de Smac/DIABLO

4.1 Objetivos específicos

4.1.1.- Determinar los niveles de expresión de ARN mensajero y de proteína de la nueva isoforma, Smac- ϵ , en diferentes tejidos sanos y líneas celulares tumorales

4.1.2.- Determinar la localización celular de esta nueva isoforma.

4.1.3.- Determinar su capacidad de interacción con la PIA más estudiada, XIAP.

4.1.4.- Determinar si Smac- ϵ regula los niveles de expresión de algunas PIAs

4.1.5.- Determinar la funciones biológicas de Smac- ϵ .

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivo celular

Se trabajó con las líneas celulares tumorales de HeLa y MCF-7 ,la cuales fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC). Estas líneas se crecieron en el medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) el cual estaba suplementado con 5 y 10% de suero fetal bovino, respectivamente. Las células fueron crecidas en una incubadora a 37°C con humedad controlada y con 5 %de CO₂.

5.2 El ensayo de formación de esferoides multicelulares.

La línea celular MCF-7 se utilizo para este ensayo. Se sembraron 1×10^6 de células en cajas de cultivo especiales para el crecimiento no en condiciones no adherentes. El medio de cultivo utilizado fue el de Leibovitz L-15 previamente suplementado al 10 % de suero fetal bovino. El crecimiento del cultivo se llevo a cabo en una incubadora con movimiento rotatorio. El medio fue remplazado cada dos días para evitar citotoxicidad dependiente del crecimiento celular. Después de 8 días de crecimiento en las condiciones antes mencionas, fueron tomas fotografías con una amplificación de 10X. Se asumió que los esferoides formados tenias una forma elipsoidal de tal forma que se midieron los dos diámetros perpendiculares y se calculo el área de cada esferoide.

5.3 La transfección con liposomas.

Un día antes de la transfección se sembraron 5×10^5 células en cajas de 35 mm de diámetro. Al día siguiente, se uso el reactivo lipofectamina 2000 de la casa comercial invitrogen. Se siguió las indicaciones del fabricante. Brevemente, 2.5 µg de plásmido fueron resuspendidos en 400µL de medio DMEM sin suero fetal bovino. En otro recipiente se mezclaron 6 µL del lipofectamina 2000 en 400 µL de medio DMEM sin suero. Después, de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se mezclaron ambas soluciones (mezcla lipofectamina-plásmido). Se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se lavaron las células cultivadas el día anterior con

medio DMEM sin suero tres veces. Se retiro el medio del ultimo lavado y se adicono la mezcla de lipofectamina-plásmido al cultivo celular antes mencionado. Se incubaron las células durante una noche y posteriormente se les cambio la mezcla de transfección por medio DMEM suplementado con suero fetal bovino. La generación de líneas celulares con expresión estable de las construcciones de interés se realizo seleccionándose las células con el antibiótico de resistencia puromicina a la concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ durante 15 días.

5.4 El ensayo de actividad NF- κ B por gen reportero.

Las células fueron transfectadas por liposomas siguiéndose el procedimiento ya descrito. Datos relevantes, se co-transfectaron 2.5 μg del plásmido pHTS-NF- κ B y 0.5 μg del plásmido pCMV-Sport- β -Gal (Life Technologies). A las 48 horas post-transfección, las actividades enzimáticas de los genes reporteros fueron determinadas. La actividad luciferasa se determino con el kit Dual-luciferase reporte assay kit (Promega) y la actividad beta-galactosidasa con el Luminescent Beta-galactosidase Detection Kit (Clontech). Se siguieron indicaciones del fabricante para cada caso. Se graficó la actividad luciferasa normalizados con los datos de la actividad beta-galactosidasa.

5.5 El ensayo de clonogenicidad en agar suave.

Se prepararon placas de 35 mm con una solución de DMEM al 1% de suero fetal bovino y 0.5% peso/volumen de agarosa de bajo punto de fusión (solución A). Se contabilizaron 1×10^5 células de cada población las cuales fueron resuspendidas en medio DMEM el cual contenía 10% de suero fetal bovino y 0.3% peso/volumen de agarosa de bajo punto de fusión. Se sembraron estas células en las cajas previamente se les adicono la solución A. Las cajas fueron incubadas a 37°C con humedad controlada y 0.5 % de CO₂. Después de 5 semanas. las colonias viables fueron visualizadas por cristal violeta al 0.005% peso/volumen.

5.6 La técnica de western-blot

El extracto proteína total fue obtenido usando la solución de RIPA adicionado con los inhibidores de proteasas y de fosfatasa. Se cuantificó la cantidad de proteína de cada muestra por el método de Bradford usando el producto comercial DC proteína assay de la marca Bio-rad. 20 µg de proteína total de cada muestra fueron sujetos a electroforesis en geles de 12%, 15% o 18% de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. La electroforesis fue realizada a corriente constante (20mA) durante 1.5 horas. Después las proteínas en el gel fueron transferidas a membranas de PVDF de la marca Millipore. La transferencia fue realizada en condiciones semi-húmedas en el equipo de Trans-blot SD de la marca Bio-rad a la corriente constante de 15mA durante 20 minutos. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora con la solución bloqueadora TBS-T (20mM de Tris-HCl, 500 mM NaCl, Tween-20 0.1% peso/volumen, pH 7.4) con 5% peso/volumen de leche. Posteriormente, se incubaron las membranas en solución bloqueadora adicionada con leche con los anticuerpos indicados durante una noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron cuatro veces con solución TBS-T. Se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario, el cual estaba acoplado a la enzima peroxidasa. Nuevamente, se realizando los cuatro lavados con el buffer TBS-T y se revelaron la membranas siguiendo las instrucciones del estuche comercial de Immobilon Western de la marca Millipore.

5.7 La transcripción reversa del ARN mensajero acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

El ARN fue extraído de células crecidas en condiciones de monocapa o de esferoides usando el reactivo de TRIzol de la marca invitrogen. Siguiendo instrucciones del fabricante. 1×10^6 células fueron resuspendidas en 1mL de TRIzol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se le adición 200 µL de cloroformo, se mezcló y se incubó durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 14×10^3 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recolectó la fase acuosa y se le adición 500 µL de isopropanol. Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se centrifugó la muestra a 14×10^3 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con etanol al 70%. Después, se procedió a centrifugar la muestra a 14×10^3 rpm durante

5 minutos. Por último, el sobrenadante fue desechado y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el precipitado en agua tratada con dietilpírocarbonato. Este ARN fue cuantificado y 2 µg del mismo fueron convertidos a ADN complementario (ADNc) usando el estuche comercial SuperScriptIII de la marca invitrogen. El ADNc fue amplificado con iniciadores específicos para los genes de interés (Anexo1, Tabla A1) usando y siguiendo instrucciones de AmpliTaq Gold de la marca Applied Biosystems.

5.8 El ensayo de inmunoprecipitación.

Las células que se utilizaron en este ensayo fueron lavadas dos veces con PBS y centrifugadas a 2×10^3 rpm durante 3 minutos. Las células se lisaron utilizando el buffer TNTE (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasas) y fueron incubadas durante 15 minutos en hielo. Después, las muestras se centrifugaron a 14×10^3 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante fue incubado durante una hora con 10 µL de proteína G recombinante de la marca Life Technologies. Después, las muestras fueron centrifugadas a 14×10^3 rpm durante 10 segundos. Se recolectaron los sobrenadantes de las muestras y fueron incubados durante una noche con 3 µL del anticuerpo primario con agitación constante a la temperatura de 4°C. Al día siguiente, 10 µL de proteína G recombinante fue adicionado a cada muestra. Se incubaron las muestras en agitación constante durante una hora a la temperatura de 4°C. Entonces, las muestras fueron centrifugadas 14×10^3 rpm durante 10 segundos. Los precipitados resultantes fueron lavados dos veces con la solución TNTE-1 (50 mM Tris at pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasas). Finalmente a las muestras se le adiciono solución de carga Laemmli (100 mM Tris pH 6.8, 20% Glicerol, 2% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 100 mM DTT) y se hirvieron durante 7 min. Estas muestras fueron utilizadas en los western-blots mostrados.

5.9 Los microarreglos de expresión.

Se utilizo el arreglo de genes Affymetrix Human Gene 1.0 ST array de la marca Affymetrix. El ARN fue aislado usando el reactivo de TRIzol de la marca Life

Technologies de esferoides multicelulares generados con las líneas tumorales de MCF-7 con expresión estable de Smac- ϵ o con el vector vacío. Se siguieron indicaciones del fabricante para hibridar el ARN con los arreglos de genes. Describiendo brevemente el procedimiento, 200 ng de ARN con un número de integridad del ARN por encima de 8.8 fue utilizado como material de inicio para la preparación de ADNc usando el producto comercial WT Expression Kit de la marca Ambion. Aproximadamente 5.5 mg de ADNc fue fragmentado enzimáticamente para su posterior asociación con biotina con el estuche comercial GeneChip Terminal Labeling and Controls Kit de la marca Affymetrix. La hibridación con los arreglos génicos de expresión fue llevado a cabo en el GeneChip Hybridization Over 640 de la marca Affymetrix a la temperatura de 45 °C durante 16 horas. Después del tiempo de hibridación, se realizaron los procedimientos de lavado y tinción utilizando el equipo Affymetrix Fluidics Station 640 usando el producto comercial GeneChip Hybridization, Wash, and Stain kit de la marca Affymetrix. Finalmente, los arreglos procesados escaneados por el equipo GeneChip Scanner 7G de la marca affymetrix. Los datos de las imágenes resultantes fueron manejados con el programa Affymetrix Expression Console Version 1.1 usando el algoritmo RMA para el control de datos.

5.10 El análisis de datos de los microarreglos.

El análisis de datos se realizó con el lenguaje de programación R usándose la paquetería de Bioconductor. Se utilizó la paquetería “Oligo” para realizar la eliminación de ruido de fondo, normalización y sumarización. La paquetería de “Limma” fue usado para detectar la expresión diferencial de sondas usando la corrección Benjamini–Hochberg para comparaciones múltiples. En el análisis se tomo en cuenta las replicas técnicas y las replicas biológicas [68].

5.11 El análisis de interacción de genes en vías de señalización.

Se utilizo la paquetería de Ingenuity[®] Pathway Analysis de la marca Ingenuity Systems para determinar los procesos funcionales diferencialmente afectados en las lista de genes

obtenidas del análisis de datos de los microarreglos. La base de datos de Ingenuity Pathways fue usada para construir vías de interacción génica. La significancia estadística de las vías de interacción fue determinada por la prueba exacta de Fisher.

5.12 El fraccionamiento de proteínas citoplasmáticas y nucleares.

Las células adherentes fueron despegadas de la superficie de cultivo por medio de una espátula de silicón. Se lavaron dos veces con solución salina isotónica, solución PBS, (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4). Entre cada lavado se centrifugaron las células a 2×10^3 rpm durante 3 minutos a 4°C. Los pellets celulares se resuspendieron en 300 mL de Solución A (10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA e inhibidores de proteasas y fosfatasa). Las células fueron incubadas durante 20 minutos en hielo con agitación esporádica. Después, 15 µL de NP-40, previamente diluido al 10% volumen/volumen, fue adicionado y se mezcló suavemente por inversión del tubo. A los 2 minutos de incubación en hielo, las muestras fueron centrifugadas 5×10^3 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron guardados y etiquetados como fracciones citosólicas mientras que los precipitados fueron resuspendidos con 200 mL de Solución C (25 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA y glicerol al 20% volumen/volumen). Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos en hielo con agitación esporádica. En seguida, las muestras fueron centrifugadas a 8×10^3 rpm durante 5 minutos a la temperatura de 4°C. Los sobrenadantes recolectados después de la centrifugación y fueron etiquetados como fracciones nucleares.

5.13 El fraccionamiento mitocondrial y citoplasmático.

El procedimiento utilizado para este fraccionamiento fue de uno previamente descrito [69]. Básicamente, las células fueron desprendidas de la superficie de cultivo por medio de un gendarme. Se lavaron las células dos veces con solución salina isotónica (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4). Posteriormente, las células fueron resuspendido en Solución de aislamiento (0.25 M de glucosa, 10mM de HEPES, pH 7.5). Estas células fueron sonicadas usando el equipo Ultrasonic processor de

la marca Cole Palmer. Las condiciones de sonicación fueron 10 segundos a 20 % de amplitud seguido de una incubación de 1 minuto en hielo. Este procedimiento se realizó 10 veces. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 8×10^3 rpm durante 10 minutos a la temperatura de 4°C . Los sobrenadantes resultantes fueron recolectados y se centrifugaron por segunda vez a 12×10^3 rpm durante 25 minutos. Después, se recolectaron los sobrenadantes que corresponden a la fracción citoplasmática. Los precipitados fueron lavados una vez con solución de aislamiento y se centrifugaron 12×10^3 rpm durante 25 minutos. Posteriormente, los precipitados fueron resuspendidos en solución mitocondrial (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 120 mM ditiotreitól, y 40 mM Tris-HCl) e incubados a 4°C por 30 minutos con agitación esporádica. Después fueron centrifugados a 12×10^3 rpm durante 5 minutos en la temperatura de 4°C . Los sobrenadantes fueron recolectados y corresponden a la fracción mitocondriales.

5.14 Los vectores de expresión.

Smac- ϵ fue amplificado de ADNc por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando la enzima polimerasa Pfu de la marca Stratagene. Posteriormente, el fragmento amplificado fue clonado en el vector pTZ57RT de la marca de fermentas. El fragmento fue subclonado en el vector pQCXIP de la marca Clontech para generar la construcción llamada pQCXIP-Smac- ϵ . La generación de una construcción de Smac- ϵ que tuviera en el extremo amino-terminal el epítipo inmunogénico hemaglutinina (HA) se llevó a cabo amplificando de la siguiente manera. El templado utilizado fue pQCXIP-Smac- ϵ y se usaron el primer sentido 5-CATACGACGTCCCAGACTACGCTATGAAATCTGACT-3' y el antisentido 5'-CGGATCCGTCAATCCTCACGCAGGTAG-3'. El producto de PCR fue purificado por gel agarosa al 1.5% y se usó el producto comercial QIAQuick PCR purification kit de la marca QIAGEN. Posteriormente fue clonado en el vector pTZ57RT. Se volvió a amplificar el otro producto de PCR tomando como templado la construcción antes mencionada con el iniciador antisentido previamente descrito y iniciador sentido: 5'-CGCGGCCGCATGTACCCATACGACGT-3', el cual contiene un sitio Not1 (subrayado). El producto fue purificado por gel de agarosa como se menciona

previamente y fue clonado en el vector pQCXIP generando la construcción pQCXIP-HA-Smac-ε. La construcción HA-Smac-ε-Myc fue generada por la adición en extremo carboxilo-terminal el epítipo inmunogénico Myc a HA-Smac-ε. Se amplificó por PCR a HA-Smac-ε usando como templado pQCXIP-HA-Smac-ε con los siguientes iniciadores: sentido 5'-CGCGGCCGCATGTACCCATACGACGT-3' y antisentido 5'-TGCTCGAGGTCATCCTCACGCAGG-3, los cuales tienen un sitio de reconocimiento para la enzima XhoI (subrayado). El producto fue clonado en el vector pCVM-tag5C (pCVM-Tag5C-HA-Smac-ε-Myc). Después, fue subclonado HA-Smac-ε-Myc al vector pQCXIP. La secuencia codificante de Smac-75 fue amplificada y clonada en el vector pQCXIP con los siguientes pares de iniciadores: sentido 5'-CGCGGCCGCATGAGAAGAGC-3' el cual contiene un sitio de reconocimiento para la endonucleasa NotI (subrayado), y antisentido 5'-CGGATCCGTCAATCCTCACGCAGGTAG-3' el cual contiene un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de digestión BamHI (subrayado). Smac-α fue amplificado de ADNc por PCR usando la enzima polimerasa Pfu con los siguientes iniciadores: sentido 5'-GCGCGGATCCATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCT-3, antisentido, 5'-AGCTCTCTAGACTCAGGCCCTCAATCCTCACGC-3' y el producto fue clonado en el vector PCR2.1-TOPO (Invitrogen). Después, fue subclonado en el vector pLXSN de la marca comercial Clontech para la generación de la construcción pLXSN-Smac-α. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación capilar.

5.15 El análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda de la paquetería GraphPad Prism versión 5.0 de la marca La Jolla, Ca. Se realizaron análisis de una sola vía y se utilizó la prueba estadística post-test de Bonferroni a un intervalo de confianza del 95% o del 99% según se haya indicado para determinar las diferencias significativas.

5.16 Los reactivos biológicos.

Los anticuerpos se adquirieron de diferentes fabricantes y se siguieron instrucciones del mismo. Los anticuerpos Anti-Smac- α (1:1000), anti-XIAP (1:2000), anti-Myc (1:1500), y anti-Cox-IV (1:4000) fueron adquiridos de la compañía Cell Signaling Technology. Anti-c-IAP1 (1:500), y anti-tubulina (1:3000) fueron adquiridos de la compañía Santa Cruz Biotechnology. Entre paréntesis se indica la concentración a la cual fueron utilizados. El inhibidor de proteasas fue adquirido de invitrogen. El MG132 y TNF- α fue adquirido de Calbiochem y R&D, respectivamente.

6. Resultados.

6.1 La identificación de una nueva isoforma del gen de Smac/DIABLO.

Se extrajo ARN de células HeLa y se convirtió a ADNc. Se realizó el PCR para amplificar la isoforma Smac- β del gen de Smac/DIABLO. Los iniciadores que se utilizaron reconocen específicamente el inicio y el final de la secuencia codificante para Smac- β . El producto del PCR se visualizó después de la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %. Se observaron dos productos adicionales a la banda esperada, 558 pb, uno por encima y otro por debajo (Figura 4). Se purificaron y secuenciaron las dos bandas detectadas de bajo peso molecular. El gen de Smac/DIABLO contiene 7 exones. La isoforma Smac- β es generada por el procesamiento alternativo del ARN mensajero, los exones que se unen son 2, 4, 5, 6 y 7 (Figura 3). Se confirmó que el producto esperado era la isoforma Smac- β . El análisis de la identidad de los nucleótidos para la banda pequeña corresponde con la unión exacta de los exones 2, 5, 6 y 7. Esta nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo de los exones indicados del gen Smac/DIABLO se le asignó el nombre de Smac- ϵ . Los exones que se encuentran en los extremos de las secuencias codificantes de las isoformas Smac- β y Smac- ϵ son los mismos, exones 2 y 7. Esto explica claramente la amplificación de ambas isoformas por medio de PCR usando los iniciadores dirigidos a los extremos de la secuencia codificante de Smac- β .

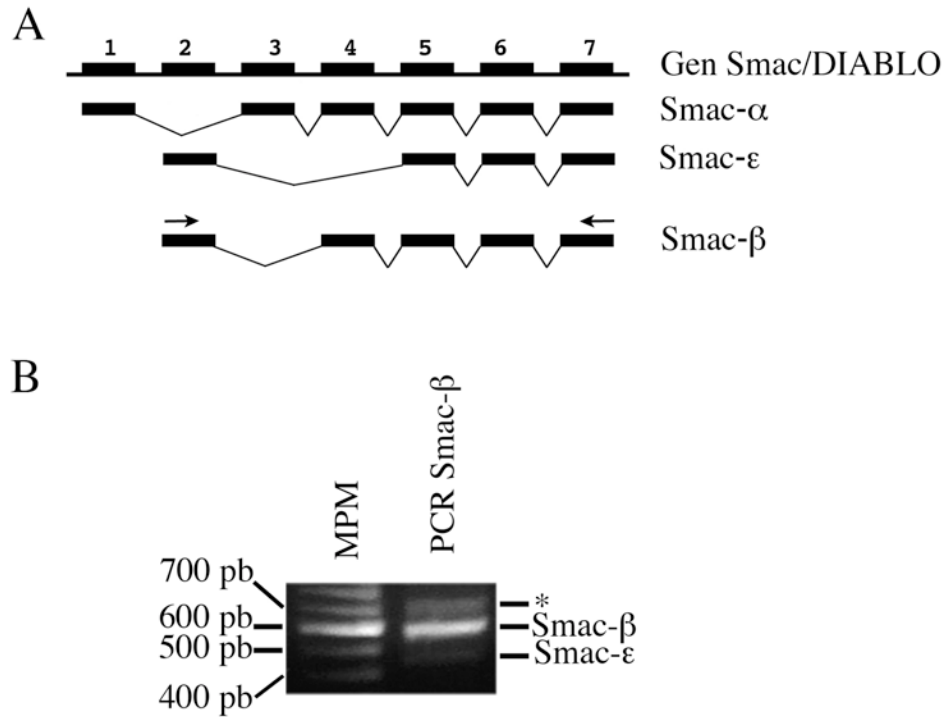


Figura 4. Identificación de Smac- ϵ . (A) Representación esquemática de las isoformas generadas por el procesamiento alternativo del gen Smac/DIABLO. Los cuadros negros simulan los exones. (B) El resultado del PCR de la isoforma Smac- β usando iniciadores específicos que reconocen los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5% de concentración. Los iniciadores están simbolizados por flechas en la figura A. La banda pequeña corresponde a Smac- ϵ . MPM, Marcador de pesos moleculares. *, banda no caracterizada.

6.2 El análisis de los niveles de expresión de Smac- ϵ en diferentes tejidos sanos y líneas celulares tumorales

Debido a que esta isoforma no ha sido descrita previamente, se analizaron los niveles de expresión en distintos tejidos sanos. Se extrajo ARN de riñón, hígado, pulmón, colon y colon bajo de pacientes sanos. Posteriormente se analizaron los niveles de expresión por medio de la técnica RT-PCR usando iniciadores específicos para Smac- ϵ . Se analizaron los niveles de expresión del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

fungiendo como gen de expresión constitutiva para tener un parámetro de comparación. El RNAm de Smac- ϵ mostro niveles de expresión tejido especifica en las muestras analizadas (Figura 5).

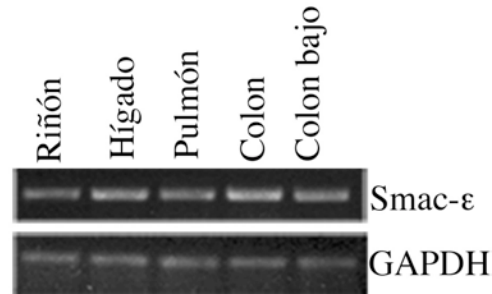


Figura 5. El análisis de expresión de la abundancia relativa del ARN mensajero de Smac- ϵ en diferentes tejidos sanos. Por medio de la técnica RT-PCR, se usaron iniciadores específicos para Smac- ϵ y GAPDH.

Debido a que Smac/DIABLO está involucrada en el proceso apoptótico, se analizaron los niveles de expresión del ARN mensajero de Smac- ϵ y GAPDH en diferentes líneas celulares cancerosas. Se realizó RT-PCR para los genes antes mencionados de las siguientes líneas celulares: HeLa, AGS, HTRE, Calu-1, MCF-7, T47D y A549. Se observó un patrón de expresión tejido-especifico entre las diferentes líneas celulares analizadas (Figura 6).

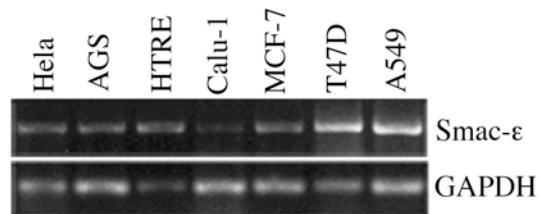


Figura 6. El análisis de expresión de la abundancia relativa del ARN mensajero de Smac- ϵ en diferentes líneas celulares tumorales. Se realizó RT-PCR usando iniciadores específicos contra GAPDH y Smac- ϵ .

6.3 La proteína Smac- ϵ tiene una localización citoplasmática.

Los exones 1 y 3 de Smac/DIABLO codifican para una señal de localización mitocondrial (Figura 3 y 4). La forma canónica de Smac/DIABLO, Smac- α , tiene una localización mitocondrial debido a que solo sufre la exclusión del exón 2. Dado que en Smac- ϵ no tiene los exones 1 y 3 en su secuencia codificante, es de esperarse una localización citoplasmática. Se transfectaron células HeLa transitoriamente con los vectores de expresión pQCXIP- Smac- ϵ y el vector vacío. Después de 48 horas postransfección, se realizaron dos fraccionamientos: 1) citoplasmático y nuclear, y 2) citoplasmático y mitocondrial. Posteriormente, se realizó Western blot usando anticuerpos específicos contra las proteínas Smac, Tubulina, Nucleolina y Cox-IV. La presencia de las proteínas Tubulina, Nucleolina y Cox-IV fungieron como indicadores de la pureza de las fracciones citoplasmática, nuclear, y mitocondrial, respectivamente. Se comprobó que Smac- ϵ tiene una localización citoplasmática mientras que la isoforma canónica una mitocondrial (Figura 7).

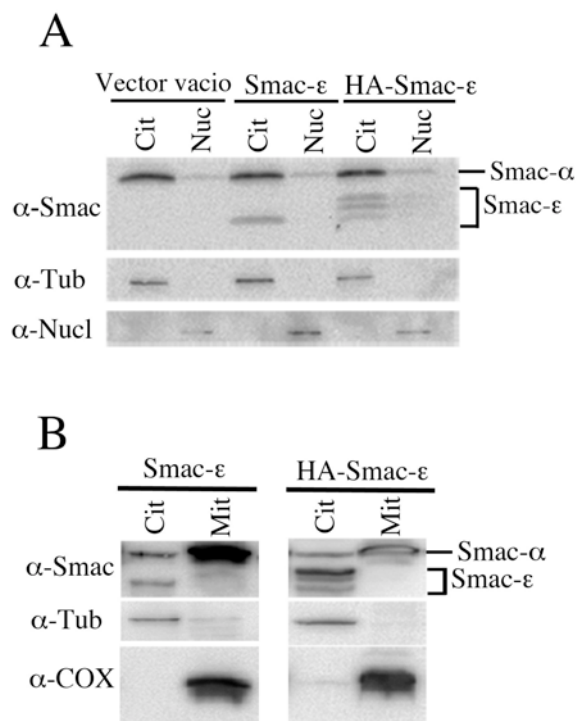


Figura 7. La proteína Smac- ϵ tiene una localización citoplasmática. Las células Hela fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones indicadas. Las proteínas resultantes del fraccionamiento citoplasmático y nuclear (A) o del fraccionamiento citoplasmático y mitocondrial (B) fueron utilizadas para generar Western-blot contra las proteínas indicadas. Tub, Tubulina; Nucl, Nucleolina; COX, Cox-IV; Cit, Citoplasma; Nuc, Nucleo; Mit, mitocondria.

6.4 La proteína de Smac- ϵ sufre degradación en ambos extremos, carboxilo- y amino-terminal.

La secuencia codificante de Smac- ϵ está compuesta por 146 aminoácidos. Usando diferentes algoritmos, se calculó que la proteína de Smac- ϵ tendría un peso aproximado de 16.3 kDa. Se ha descrito que Smac- β sufre de procesamiento proteolítico en el extremo amino-terminal [57]. Debido a que las secuencias codificantes de Smac- β y Smac- ϵ son idénticas en el extremo amino-terminal, podría esperarse un procesamiento proteolítico en Smac- ϵ similar al observado en Smac- β . Se ha descrito que la adición de

epítopes en los extremos de proteínas susceptibles a ser degradadas extiende su vida media [70, 71]. Al extremo amino-terminal de la proteína Smac- ϵ se le adicionó el epítipo inmunogénico hemaglutinina (HA) generándose la proteína HA-Smac- ϵ . Adicionalmente, el extremo carboxilo-terminal de HA-Smac- ϵ fue protegido por la adición del epítipo inmunogénico Myc generándose HA-Smac- ϵ -Myc. Por lo tanto, Si existiese un procesamiento en los extremos de la proteína Smac- ϵ podría ser parcialmente inhibido por la adición de las epítopes indicados. Se transfectaron células Hela con los vectores pQCXIP- Smac- ϵ (Smac- ϵ), pQCXIP-HA-Smac- ϵ (HA-Smac- ϵ) y pQCXIP-HA-Smac- ϵ -Myc (HA-Smac- ϵ -Myc). A las 48 horas postransfección, se extrajo proteína total de las células transfectadas. Se cuantificó y la misma cantidad de proteína total fue usada para generar Western-blot contra Smac- ϵ . El peso experimental para Smac- ϵ fue alrededor 10 Kda, menor al esperado. La adición del péptido HA en el extremo amino-terminal de Smac- ϵ indujo un incremento en el peso molecular experimental de Smac- ϵ (Figura 8). Este incremento es mayor al peso calculado por la adición del epítipo HA. Por ultimo, la adición de la secuencia codificante para el epítipo Myc en el extremo carboxilo-terminal de HA-Smac- ϵ produjo la proteína en el peso esperado de 18.9 kDa, tomando en cuenta la adición de ambos epítopes inmunogénicos (Figura 8). Dos conclusiones fueron concebidas con los datos experimentales: 1) Smac- ϵ sufre de un procesamiento proteolítico que origina una proteína con un peso molecular menor al esperado; 2) La presencia de bandas de menor peso molecular en los extractos proteicos de las células que sobre-expresaban HA-Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ -Myc indican que el procesamiento proteolítico fue parcialmente inhibido cuando se agregaron los epítopes inmunogénicos en los extremos de la proteína Smac- ϵ .

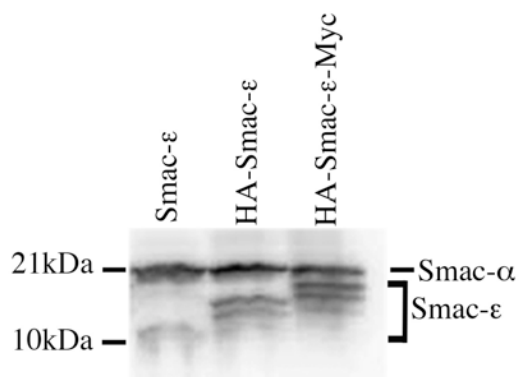


Figura 8. La proteína Smac- ϵ es procesada proteolíticamente en los extremos amino- y carboxilo-terminal. Se realizó Western-blot a partir de los extractos de proteína total correspondientes de las transfecciones transitorias en células MCF7 con construcciones indicadas. Se usó un anticuerpo específico contra Smac. Este anticuerpo reconoce a las isoformas canónica y Smac- ϵ .

6.5 La proteína Smac- ϵ es degradada vía proteasomal.

Las células MCF-7 que fueron transfectadas transitoriamente con Smac- ϵ mostraron bajos niveles de expresión cuando se compararon con las transfecciones de HA-Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ -Myc (Figura 8). Se ha descrito que las proteínas con corta vida media tienden a ser reguladas por el proteasoma [72]. Debido a estos dos antecedentes, se ideó que los bajos niveles de expresión de Smac- ϵ pudieran ser explicados si Smac- ϵ fuera blanco de regulación por parte del proteasoma. Para comprobar esta hipótesis, en células transfectadas con Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ se inhibió el proteasoma con el agente MG132, el cual inhibe específicamente al proteasoma [73], y a diferentes tiempos de exposición del MG132 se obtuvo extractos de proteína total. Por medio de Western-blot se comprobó que hay una acumulación de Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ desde el menor tiempo de exposición con el MG132, 6 horas (Figura 9). Por lo tanto, los niveles de expresión de la proteína Smac- ϵ son regulados por dos mecanismos: 1) procesamiento proteolítico (Figura 8) y 2) vía proteasomal (Figura 9).

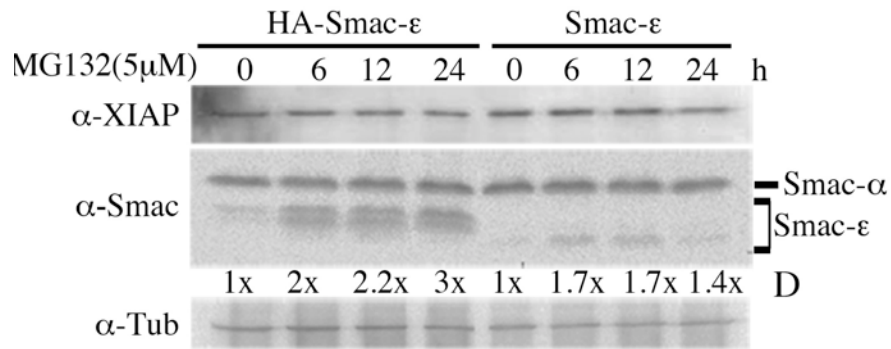


Figura 9. La proteína Smac-ε es degradado por el proteasoma. Las células HeLa con expresión estable de Smac-ε o HA-Smac-ε fueron tratadas con el MG132 a la concentración indicada. A distintos tiempos de exposición se extrajo proteína total. Se realizó Western-blot con la misma cantidad de proteína total de la diferentes muestras usándose anticuerpos específicos contra las proteínas indicadas. Desde el menor tiempo de exposición con el MG132, 6 horas, se detectó acumulación de la proteína Smac-ε o HA-Smac-ε. Tub, Tubulina; D, Densitometría.

6.6 La proteína endógena de Smac-ε es degradada constitutivamente por el proteasoma.

Sabiendo que la expresión del ARN mensajero de Smac-ε tiene un patrón de expresión tejido específica en las muestras analizadas, decidimos caracterizar su expresión a nivel de proteína. Sin embargo, no pudimos detectar a la proteína Smac-ε endógena en distintos extractos proteicos. Por lo tanto, escogimos la línea celular T47D que mostró altos niveles de expresión del RNAm de Smac-ε de nuestro panel de líneas celulares (Figura 6). Nuevamente, no pudimos identificar esta nueva isoforma en células T47D cuando lo analizamos por Western-blot. Es importante resaltar que por medio de líneas celulares con sobre-expresión de Smac-ε identificamos algunos mecanismos que regulan su expresión tales como posible cortes proteolíticos en ambos extremos de la proteína (Figura 8) y la degradación mediada por el proteasoma (Figura 9). Ante estos resultados, pensamos que la proteína endógena de Smac-ε es constitutivamente degradada por tales

mecanismos regulatorios por lo que decidimos inhibir el proteasoma para verificar la existencia de Smac- ϵ endógeno. Las células T47D fueron tratadas con el inhibidor de proteasoma, MG132, durante 24 horas. Se decidió incorporar el tratamiento con TNF- α para favorecer la presencia de la proteína endógena de Smac- ϵ a niveles detectables debido a que induce el acumulación de las proteínas ectópicas Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ (Figura 11 y 12). Conforme a lo esperado, la inhibición del proteasoma indujo acumulación de proteína endógena de Smac- ϵ a niveles detectables (Figura 10). El tratamiento de TNF- α , ya sea como único estímulo o con la combinación con MG132, no produjo algún efecto (Figura 10).

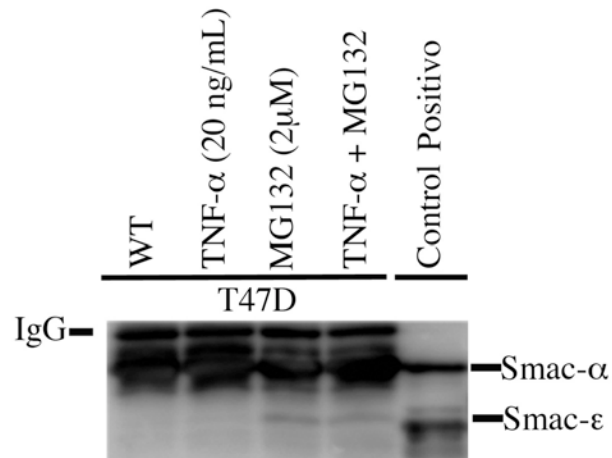


Figura 10. La proteína endógena de Smac- ϵ fue detectada posterior al tratamiento con MG132 en células T47D. Las células T47D fueron estimuladas con los TNF- α y/o MG132 a la concentración indicada durante 24 horas. Posteriormente se extrajo proteína total de cada condición y la misma cantidad de proteína total de cada tratamiento fue sujeta a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Smac. El resultado de la inmunoprecipitación fue resuelto por western-blot usando el anticuerpo específico contra Smac. Las células MCF7 con expresión estable de Smac- ϵ fueron incluidas como control positivo. La proteína Smac- ϵ es detectable ante el estímulo con MG132.

6.7 Los estímulos pro-apoptóticos modulan los niveles de proteína de Smac- ϵ ectópico.

Las proteínas escapan de los mecanismos antagónicos o represores en circunstancias específicas donde ejercen sus efectos biológicos. Se observó que en condiciones basales, al menos en los tipos celulares analizados, la presencia de la proteína de Smac- ϵ pudiera ser prescindible explicándose la degradación constitutiva observada (Figura 10). Dado que la isoforma canónica de Smac/DIABLO está involucrada en la apoptosis, decidimos analizar si algún estímulo pro-apoptótico podría inducir su acumulación como indicio de necesidad celular hacia las funciones de la proteína de Smac- ϵ . Las células con expresión ectópica de Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ fueron tratadas con diferentes agentes pro-apoptóticos. Por medio de Western-blot se determinó que el tratamiento con TNF- α induce acumulación de HA-Smac- ϵ (Figura 11). Interesantemente, se observó que estímulos como cisplatino o doxorubicina favorecen la degradación de la proteína ectópica de Smac- ϵ (Figura 11). Adicionalmente, las células con expresión ectópica de Smac- ϵ fueron tratadas con TNF- α a distintos tiempos de exposición. Se extrajo proteína total de cada condición. Usando estos extractos para western-blot, se detectó un ligero incremento de la expresión ectópica de Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ a las 10 horas de tratamiento con TNF- α (Figura 12).

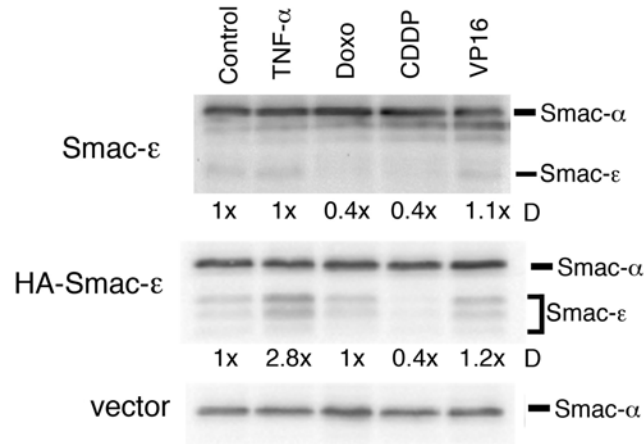


Figura 11. El tratamiento con TNF- α induce la acumulación de Smac- ϵ ectópico. Las células HeLa transfectadas con Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ o el vector vacío fueron tratadas con los agentes pro-apoptóticos: TNF- α (20ng/mL; 4 horas), Doxorubicina (1.3 μ M; 12 horas), Cisplatino (12.5 μ M, 12 horas) y Etopósido (100 μ M, 12 horas). Los extractos proteicos fueron obtenidos después del tratamiento indicado. Se realizó western-blots usando un anticuerpo específico contra Smac. Doxo, Doxorubicina; CDDP, Cisplatino; VP16, Etoposido; D, Densitometría.

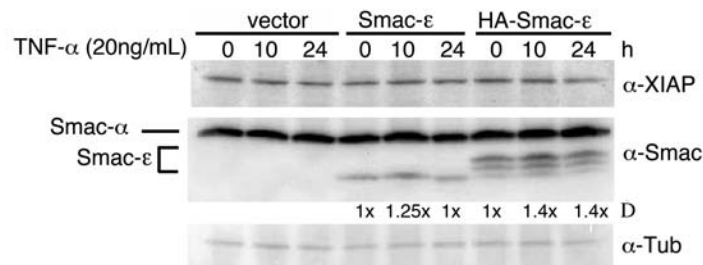


Figura 12. El tratamiento con TNF- α induce un ligero aumento en la cantidad de las proteínas Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ . Las células HeLa que sobre-expresaban Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ fueron tratadas con TNF- α . A distintos tiempos de exposición, se realizó la extracción de proteína total y utilizando la misma cantidad de proteína total se generaron los western-blots con los anticuerpos indicados en la figura. Tub, Tubulina; D, Densitometría.

6.8 La proteína Smac- α regula la vía canónica de NF- κ B.

El ligando TNF- α activa la vía canónica de NF- κ B al inducir la activación del complejo IKK el cual fosforila al inhibidor de la vía, I-kappaB (I κ B). En condiciones basales, I κ B se asocia al factor de transcripción p65 impidiendo su translocación nuclear donde ejerce sus efectos transcripcionales. Sin embargo, cuando I κ B es fosforilado, es susceptible de degradarse por la vía proteasomal. De esta manera, p65 es liberado de la represión e induce la activación de los genes responsivos de NF- κ B. Debido a que la forma canónica de Smac/DIABLO puede inducir activación de la vía NF- κ B al regular los miembros de la familia de PIAs [65] y que la ausencia del AVPI en Smac/DIABLO no compromete su habilidad de interactuar con las PIAs, al menos en ciertas condiciones [44], se pensó que el ligero acumulamiento de Smac- ϵ ante el tratamiento con TNF- α pudiera estar ligado a la modulación de la vía NF- κ B. Para comprobar esta hipótesis, las células HeLa que expresan constitutivamente Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ fueron co-transfectadas con un plásmido que contenía elementos de respuesta a NF- κ B que proporcionalmente modulan la expresión del gen reportero, luciferasa. Después de 48 horas post-transfección estas células fueron estimuladas con TNF- α durante 4 horas. Interesantemente HA-Smac- ϵ induce una ligera activación de la vía NF- κ B mientras que Smac- ϵ no se detectó alguna diferencia significativa cuando se comparó con el control (Figura 13).

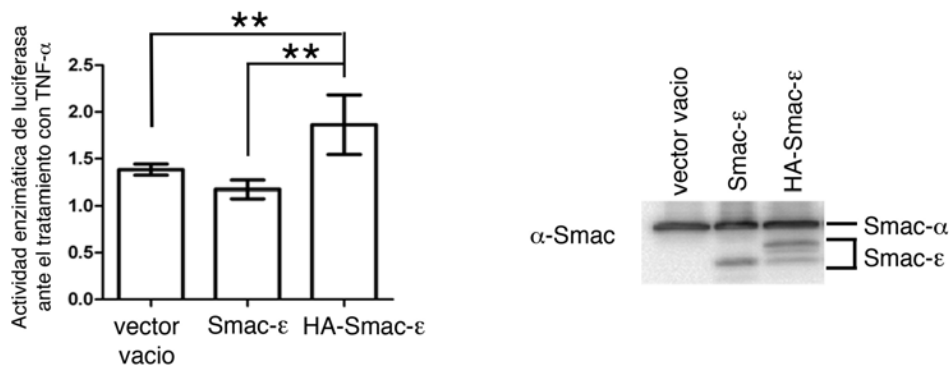


Figura 13. HA-Smac-ε incrementa la actividad de la vía canónica de NF-κB. Las células HeLa transfectadas establemente con Smac-ε o HA-Smac-ε fueron co-transfectadas transitoriamente con los plásmidos pHTS-NF-κB y pCMV-β- galactosidasa. Después de 48 horas pos-transfección, las células fueron tratadas con TNF-α (20ng/mL, 4 horas). Después del tratamiento, las actividades enzimáticas de los genes reporteros fueron determinadas. En la parte izquierda de la figura, la gráfica representa el nivel de cambio de la actividad enzimática, normalizada con respecto a la eficiencia de transfección, de tres experimentos independientes. En la parte derecha de la figura, se muestra un Western-blot representativo de los extractos proteicos revelado con el anticuerpo específico contra Smac. ****P < 0.05.**

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con TNF-α en células transfectadas con el control y aquellas que sobre-expresan a Smac-ε en el sistema de gen-reportero de NF-κB (Figura 13), se decidió analizar si Smac-ε modula la vía de NF-κB en ausencia del estímulo con TNF-α. Se realizaron transfecciones transitorias con Smac-ε, HA-Smac-ε o con el vector vacío. Después de 48 horas, se realizó fraccionamiento citoplasmático y nuclear. Se verificó la pureza de las fracciones obtenidas por medio de anticuerpos específicos contra anti-Tubulina (proteína citoplasmática) y anti-Nucleolina (proteína nuclear). En células que sobre-expresan a HA-Smac-ε hay un aumento de p65 en el núcleo. Sin embargo, parece ser que no existe algún decremento en IκB citoplasmático (Figura 14A). Finalmente, se exploró el efecto de Smac-ε en la vía canónica de NF-κB por medio del análisis de expresión de

Interleucina-6 (IL-6) el cual es un gen responsivo de la vía canónica de NF- κ B. Interesantemente, Smac- ϵ disminuye la expresión del IL-6 en condiciones basales (Figura 14B). Estos datos sugieren que HA-Smac- ϵ incrementa la activación de la vía NF- κ B en condiciones basales o ante el estímulo de TNF- α .

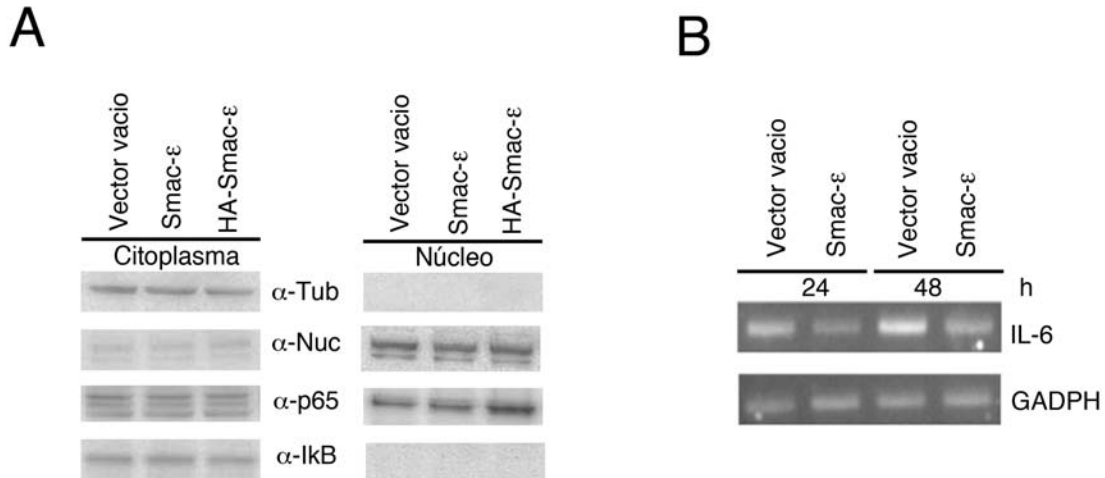


Figura 14. Smac- ϵ modula la vía NF- κ B. (A) Las células MCF-7 fueron transfectadas transitoriamente con Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ o el vector vacío. Después de 48 horas post-transfección, las células fueron sujetas a fraccionamiento celular donde se generaron las fracciones citoplasmáticas y nucleares. Estas fracciones fueron analizadas con los anticuerpos indicados por medio de Western-blot. Se muestra el experimento representativo de tres replicas independientes. (B) Las células MCF-7 fueron transitoriamente transfectadas con Smac- ϵ o con el vector vacío. A las 24 o 48 horas después de la transfección, se realizó RT-PCR con iniciadores específicos contra los genes GAPDH e Interleucina-6 (IL-6). Tub, Tubulina; Nuc, Nucleolina.

6.9 La proteína Smac- ϵ no interacciona con XIAP.

La forma canónica de Smac/DIABLO a través de su segmento amino-terminal, AVPI, interacciona específicamente con los miembros de la familia PIAs [38, 41, 43]. Sin embargo, también se ha observado asociación de Smac/DIABLO con PIAs en ausencia

del AVPI [44, 57]. Se ha descrito que Smac- β , isoforma carente del segmento AVPI, es capaz de interactuar con algunas PIAs en ensayos *in vitro* [57]. Por lo tanto, se decidió analizar si Smac- ϵ podría interactuar con el miembro mejor descrito de las PIAs, XIAP. Para realizar esto, se realizó inmunoprecipitación con la proteína de Smac- ϵ que contenía epítopes inmunogénicos en ambos extremos de la proteína (HA-Smac- ϵ -Myc). Se incluyó un control positivo para verificar la interacción específica entre la forma canónica de Smac/DIABLO con XIAP. Se transfectaron células transitoriamente con la construcción HA-Smac- ϵ -Myc o la forma canónica de Smac/DIABLO. Después de 48 horas, se realizaron las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos específicos anti-Myc y anti-Smac para inmunoprecipitar HA-Smac- ϵ -Myc y Smac- α , respectivamente. Se comprobó que la isoforma canónica de Smac/DIABLO interactúa con XIAP (Figura 15). La proteína HA-Smac- ϵ -Myc no interactúa con XIAP comprobándose la relevancia del segmento amino-terminal en condiciones *in vivo* (Figura 15). Interesantemente, Smac- ϵ se asocia específicamente entre ella misma y no interactúa con Smac- α (Figura 15).

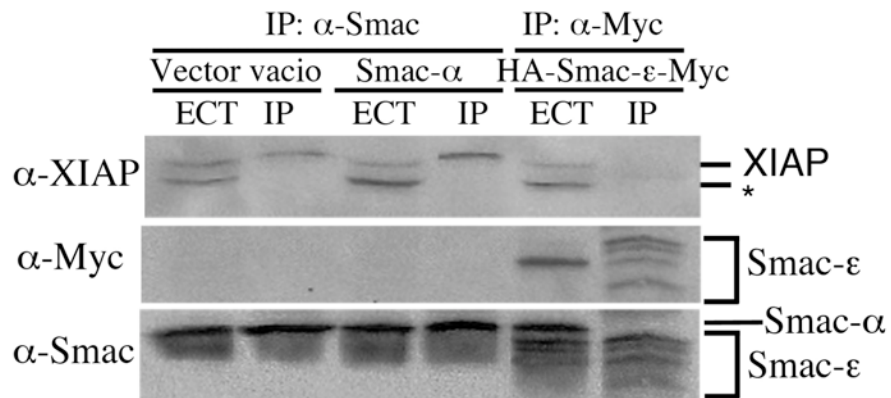


Figura 15. La proteína Smac- ϵ no interactúa con XIAP. Las células MCF-7 fueron transfectadas transitoriamente con HA-Smac- ϵ -Myc o con la isoforma canónica de Smac/DIABLO, Smac- α . Después de 48 horas, el lisado de las células transfectadas con HA-Smac- ϵ -Myc fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-Myc. El resultado de la inmunoprecipitación fue utilizado para hacer Western-blots con los anticuerpos indicados. El

lisado de células transfectadas con Smac- α que fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-Smac corresponde al control positivo de la interacción entre Smac y XIAP. ECT, Extracto celular total; IP, Inmunoprecipitación.

6.10 Smac- ϵ no regula los niveles de expresión de las PIAs.

Debido a que se ha descrito que Smac/DIABLO con el extremo amino-terminal mutado es capaz de inducir modificaciones postraduccionales en PIAs independientes de su interacción con estas [47], se analizó si Smac- ϵ independientemente de su habilidad a interactuar con las PIAs pudiera ejercer algún efector modulador en la expresión de estas proteínas. Se transfectaron células MCF-7 con Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ -Myc o con el vector vacío. Después de 2 días de la transfección, se determinó por Western-blot que Smac- ϵ o sus formas modificadas con epítopes inmunogénicos en los extremos no modificaba los niveles de expresión de las proteínas XIAP, Survivina y cIAP1 (Figura 16A). Dado que se ha descrito una relación entre HA-Smac- ϵ y la activación de la vía NF- κ B (Figuras 13 y 14A) y que Smac/DIABLO regula la activación de la vía NF- κ B a través de la modulación de los niveles de las cIAP1/2 [65], se decidió analizar si la sobre-expresión de HA-Smac- ϵ induce algún cambio en cIAP1. En ninguna de las condiciones analizadas, basales (Figura 16A) o ante el tratamiento con TNF- α (Figura 16B) hay una modificación en los niveles de cIAP1 en células transfectadas con HA-Smac- ϵ o con cualquiera de las formas de Smac- ϵ .

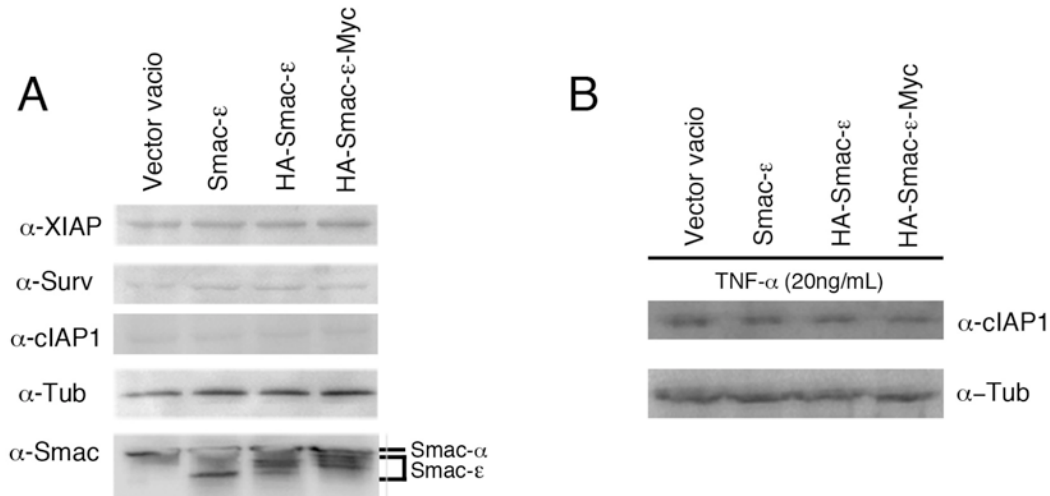


Figura 16. Smac- ϵ no modula los niveles de expresión de las proteínas XIAP, cIAP1 ni Survivina. (A) Se transfectaron células MCF-7 con Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ -Myc o con el vector vacío. A las 48 horas después de la transfección, se extrajo proteína total y se analizaron las proteínas indicadas por medio de Western-blot usando anticuerpos específicos. (B) Se trataron las células de la misma forma que en (A) pero después de las 48 horas post-transfección se estimularon con TNF- α durante 4 horas. Después de este tiempo se extrajo proteína total de las células y se realizó western-blots contra los anticuerpos señalados utilizando la misma cantidad de proteína total. Tub, Tubulina; Surv, Survivina.

6.11 La expresión ectópica de Smac- ϵ induce aumento en el potencia clonogénico.

Las isoformas de Smac/DIABLO se han relacionado con algún efecto celular [44, 57, 58]. Indudablemente, Smac- α esta asociada con la regulación positiva de la apoptosis al antagonizar la acciones de las PIAs hacia las caspasas [39]. Recientemente, se ha descrito que Smac- α tiene un papel en la supresión tumoral independiente de su capacidad pro-apoptótica [65]. En relación al interés de este estudio, Smac- β siendo la única isoforma no cuenta con el segmento AVPI demostró funciones celulares pro-apoptóticas ante el

estimulo con distintos agentes antineoplásicos [57]. De tal forma, es imperativo demostrar el valor biológico de Smac- ϵ . Las células MCF7 que expresaban en forma estable de Smac- ϵ o sus variantes generadas por la adición de péptidos inmunogenicos en los extremos de la proteína fueron sometidas a ensayos de clonogenicidad en agar suave. Independientemente de los péptidos inmunogenicos adicionados a la proteína de Smac- ϵ , se detectó un aumento en el potencial clonogénico en las condiciones analizadas (Figura 17).

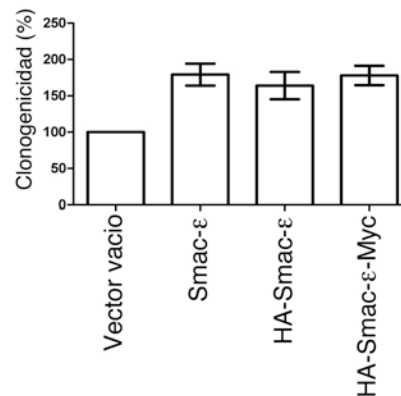


Figura 17. La expresión ectópica de Smac- ϵ aumenta el potencial clonogénico de las células. Las células MCF7 con expresión estable de Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ -Myc fueron sembradas en agar suave para determinar su potencial clonogénico. La grafica corresponde al promedio de tres experimentos independientes. Se ha grafico error estándar de la media.

6.12 La sobre-expresión de Smac- ϵ incrementa la formación de esferoides.

Los ensayo de esferoides multicelulares tiene la capacidad de replicar el patrón de diferenciación así como funciones bioquímicas que se presentan en los tumores [74, 75] y en órganos sanos [76]. Conociendo estas características, se decidió analizar el efecto de Smac- ϵ en esferoides multicelulares. Las células MCF7 transfectadas establemente con Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ , HA-Smac- ϵ -Myc o aquellas con el vector vacío fueron cultivadas

en condiciones especiales para generar esferoides tridimensionales. De forma similar al ensayo de clonogenicidad, se observó un incremento en la capacidad de formación de esferoides con mayor tamaño con respecto al control independientemente de la adición de epítopes inmunogenicos en los extremos de la proteína Smac- ϵ (Figura 18).

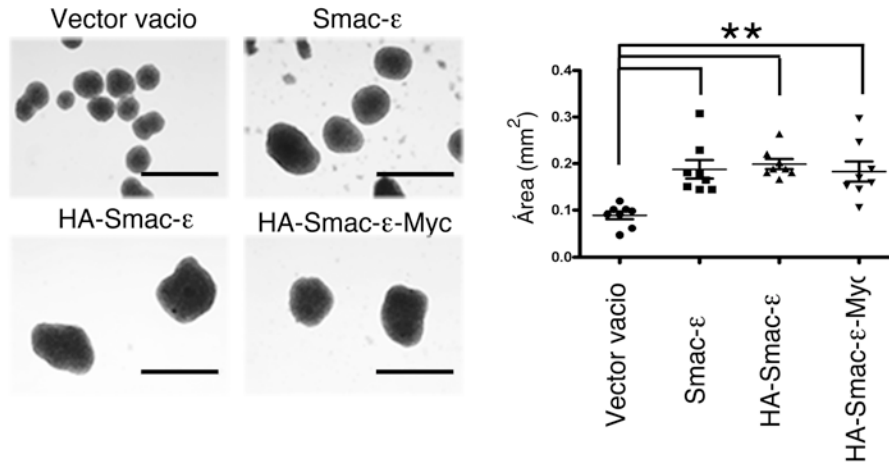


Figura 18. Smac- ϵ incrementa el tamaño de los esferoides multicelulares. Las células MCF-7 transfectadas en forma estable con Smac- ϵ o sus variantes con epítopes inmunogenicos fueron cultivadas como esferoides multicelulares. En la parte izquierda de la figura, se muestran fotos representativas de dos experimentos independientes las cuales fueron capturadas con un objetivo de 10X de magnificación. La barra negra que se muestra en la esquina inferior derecha en cada foto representa la longitud de 1mm. En la parte derecha de la figura, se realizó una grafica con los datos de las dimensiones de los esferoides. ** $P < 0.01$

6.13 El perfil de expresión génica en los esferoides multicelulares expresando Smac-ε.

La proteína Smac-ε es altamente regulada por diversos mecanismos, entre ellos la degradación mediada por el proteasoma (Figuras 8-10). Adicionalmente, es incapaz de interactuar o regular los niveles de expresión de las PIAs (Figura 15 y 16). Sin embargo, Smac-ε aumenta el potencial clonogénico de las células e incrementa el tamaño de esferoides multicelulares (Figuras 17 y 18). Por lo tanto, se decidió profundizar acerca de cuales son los efectos moleculares que Smac-ε altera para la formación de esferoides de mayor tamaño. Para llevar a cabo lo antes mencionado, se utilizaron los microarreglos de expresión para el análisis de la expresión diferencial de los genes expresados entre esferoides generados con células transfectadas establemente con Smac-ε y aquellas con el vector vacío. El análisis de los datos obtenidos arrojó que existen 43 genes diferencialmente expresados entre los esferoides generados con células transfectadas establemente con Smac-ε o con el vector vacío (Figura 19 y Cuadro 1). De estos genes, se seleccionaron 9 de forma aleatoria para validar por medio de RT-PCR la técnica de microarreglos de expresión. Los ARNs de los esferoides generados con células que expresaban ectópicamente a HA-Smac-ε y HA-Smac-ε-Myc fueron incluidos en la validación. Conforme a lo esperado, se observa que los esferoides generados con células expresando Smac-ε incrementan los niveles de ARNm de los 9 genes seleccionados cuando se comparan con los esferoides control (Figura 20A). Interesantemente, este patrón de expresión es compartido para los esferoides que expresan ectópicamente a HA-Smac-ε y HA-Smac-ε-Myc (Figura 20A). De los genes diferencialmente expresados, encontramos un enriquecimiento en los genes responsivos al receptor de estrógeno (Figura 20B). Adicionalmente, se determinó que existen 9 vías de señalización enriquecidas por los 43 genes diferencialmente expresados en los esferoides de Smac-ε. Las tres vías de señalización con mayor importancia fueron: 1) sobre-vida células (GRAF1, STC1, PGR), crecimiento y proliferación (NPY5R, NPYIR, GREB), cáncer y desarrollo celular (BCL2, JAK2, CCNA1, HMOX1). Adicionalmente, se realizó el análisis de los genes diferencialmente expresados en términos de su función biológica

usando la base de datos del IPA. En la Figura 21 se muestra cuales son las enfermedades y funciones moleculares que son significativamente enriquecidas por estos 43 genes diferencialmente expresados (Figura 21). Adicionalmente, a partir de los genes diferencialmente expresados en los esferoides con expresión ectópica de Smac- ϵ , se analizó si tales se encontraban alterados entre muestras de pacientes y grupos control. 18 de estos genes se encontraron sobre-expresados en muestras de pacientes con cáncer (Cuadro 1).

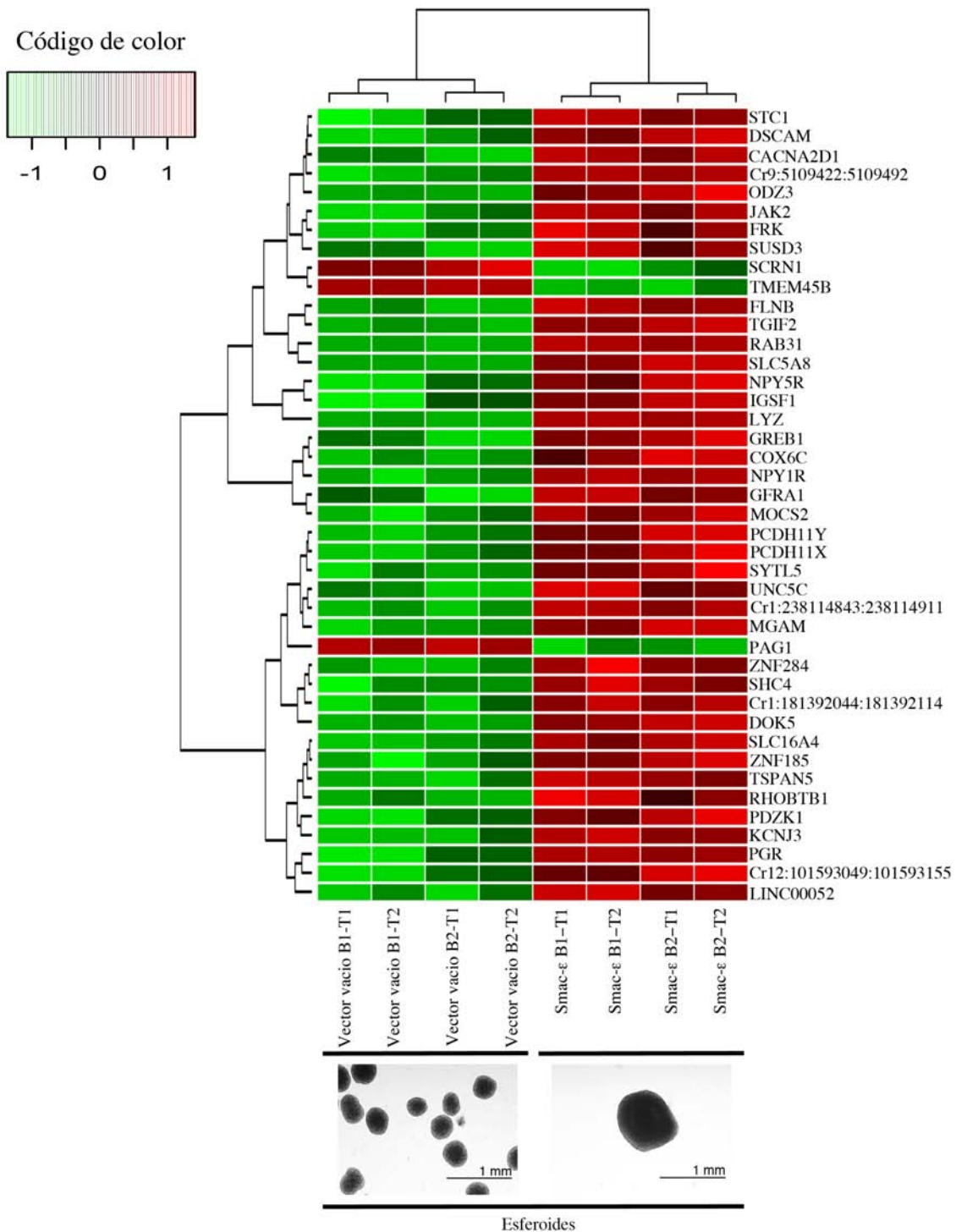


Figura 19.- El mapa de calor de los genes diferencialmente expresados en los esferoides de **Smac-ε**. Se muestran los genes que se expresan diferencialmente entre los esferoides generados con células MCF-7 transfectadas establemente con Smac-ε o con el vector vacío. Los genes

mostrados tienen una diferencia mayor al nivel de cambio de 0.5 de expresión y una p calculada de 0.05 con la prueba estadística FDR (false discovery rate).

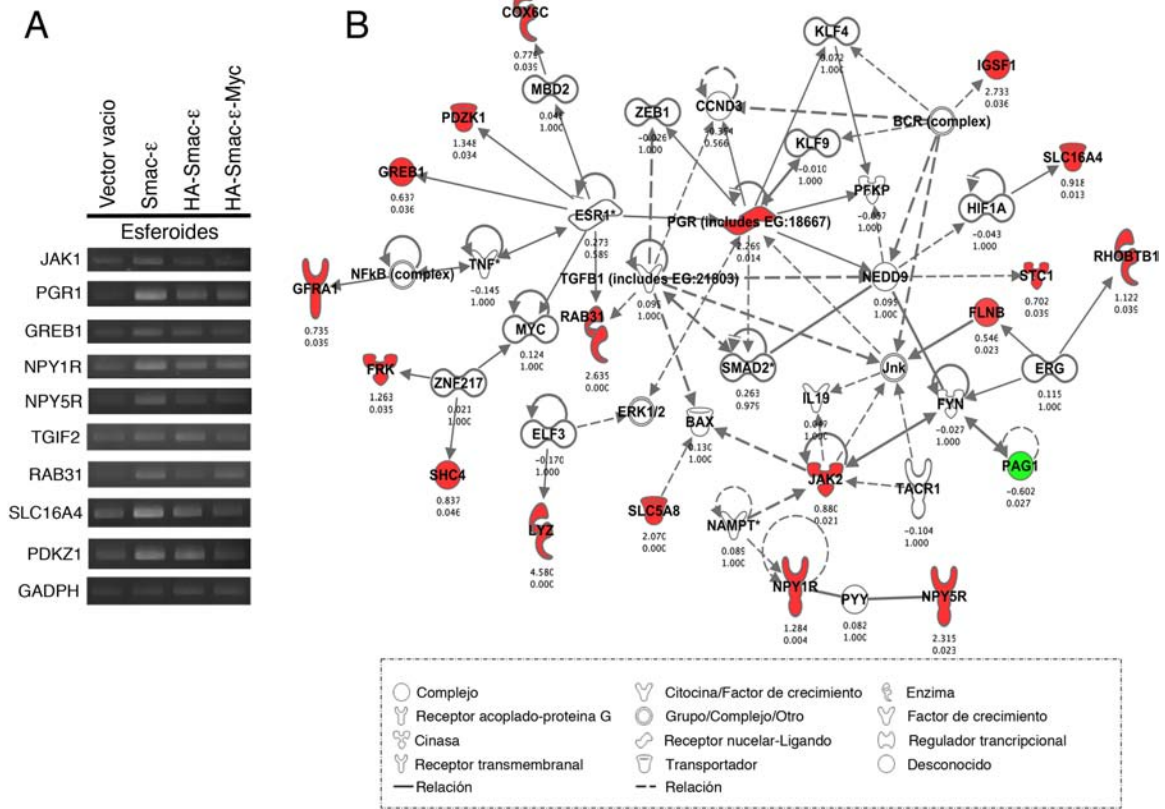


Figura 20. Se detectó la activación de varias vías de señalización en los esferoides generados a partir de células con expresión ectópica de Smac-ε. (A) La validación de los datos de microarreglos de expresión usando la técnica de RT-PCR. Se seleccionaron 9 genes diferencialmente expresados entre esferoides con expresión ectópica de Smac-ε y esferoides transfectados con el vector vacío. Se incluyeron las muestras de esferoides con expresión ectópica de HA-Smac-ε y HA-Smac-ε-Myc. (B) El análisis de las vías de señalización generada por la paquetería de programación del IPA muestra los genes diferencialmente expresados entre los esferoides con expresión ectópica de Smac-ε y los esferoides control. Las moléculas en rojo y en verde indican sobre-expresión e inhibición, respectivamente.

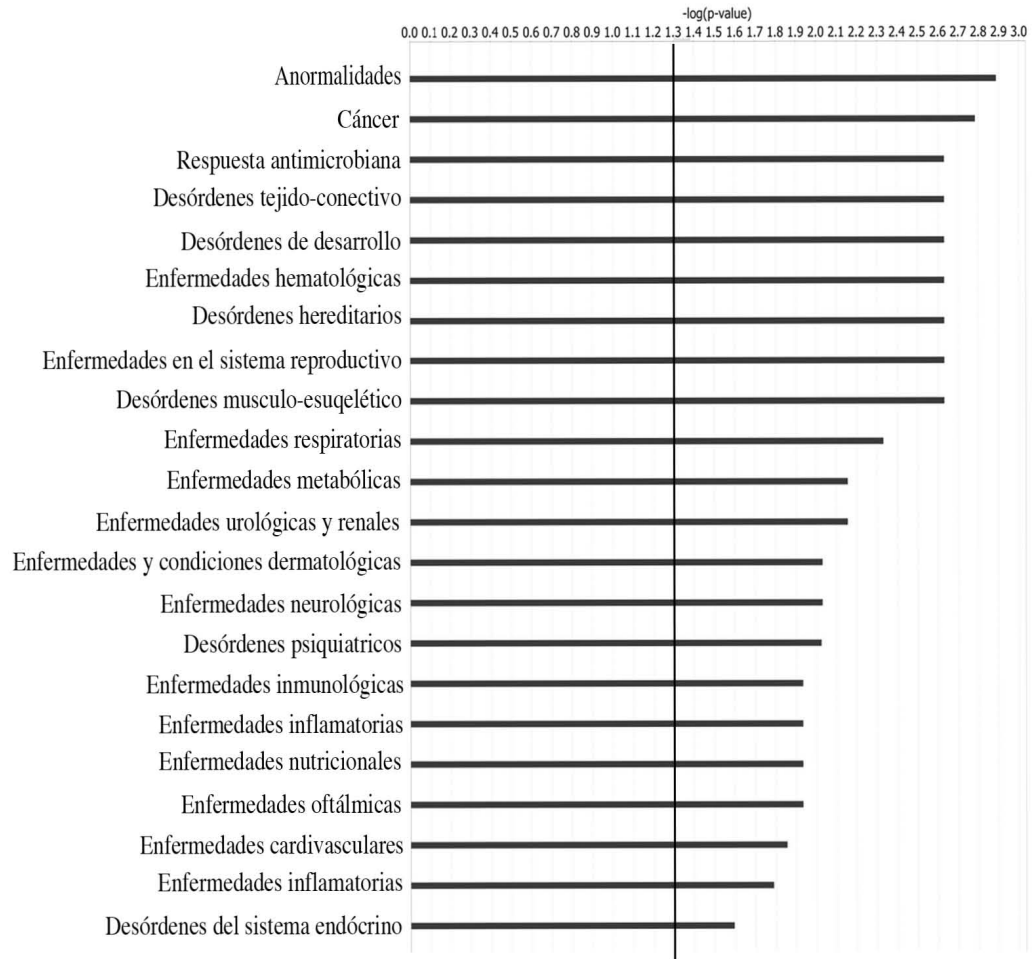
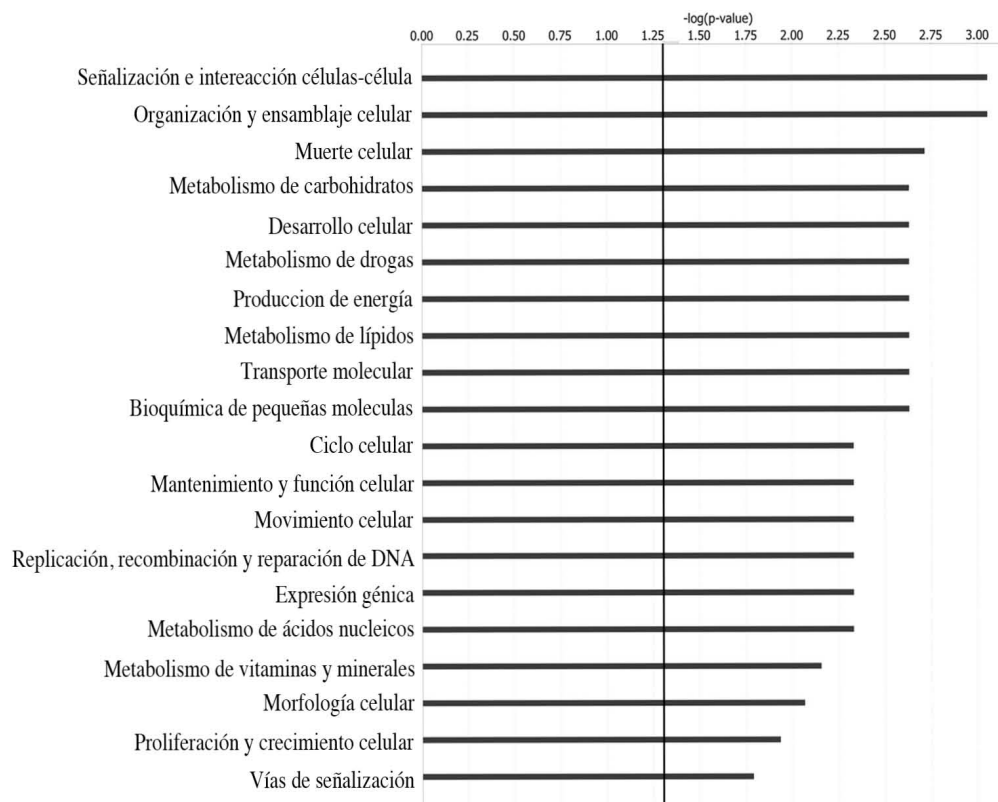
A**B**

Figura 21. El análisis de las funciones biológicas que son afectadas por los genes diferencialmente expresados en los esferoides multicelulares con sobre-expresión de Smac- ϵ . El análisis se realizó con la paquetería de Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Usando la base de datos del IPA, se generaron los siguientes histogramas afectados por la sobre-expresión de Smac- ϵ en esferoides multicelulares: (A) Enfermedades y desórdenes de desarrollo, y (B) funciones celulares y moleculares. El valor de $-\log(p\text{-Value})$ fue determinado usando la prueba estadística de Fisher's exact test.

Símbolo	Nombre	Función	Nivel de cambio	Tendencia de cambio/tipo de cáncer
LYZ	Lisozima	E	4.580	Sobre-expresión/Gástrico [77]
IGSF1	Miembro 1 de la super-familia de inmunoglobulina	O	2.733	Sobre-expresión/Papilar tiroideo [78]
RAB31	RAB31, miembro del oncogén RAS	O	2.635	Sobre-expresión/Mama [79]
PGR	Receptor de progesterona	RN-L	2.269	Sobre-expresión/Mama [80-82]
SLC5A8	Miembro 8 de la familia acarreadora de soluto (transportador de yoduro).	T	2.070	Sobre-expresión/Próstata [83]
DOK5	Proteína docking 5	O	1.758	Sobre-expresión/Medula adrenal [84]
PDZK1	PDZ domain containing 1	T	1.348	Sobre-expresión/Mama [80] Ovario [85]
NPY1R	Receptor Y1 del neuropeptido Y	R-p-G	1.218	Sobre-expresión/Mama [86, 87]
UNC5C	Unc-5 homólogo a C (<i>C. Elegans</i>)	R-T	1.218	Sobre-expresión/Tiroideas [88]. Baja-expresión/Renal [89]

BCL2	CLL células B/linfoma 2	T	0.974	Sobre-expresión/Pulmón [90, 91] Baja-expresión/Colon y recto [92]
SLC16A4	Miembro 4 de la familia 16 del acarreador de soluto.	T	0.918	Sobre-expresión/Mama [93] y próstata[94]
ZNF185	Proteína dedos de zinc 185 (dominio LIM)	O	0.915	Baja-expresión/Próstata [95]
SHC4	Miembro 4 de la familia SHC	O	0.837	Sobre-expresión/Melanoma [96]
GFRA1	Receptor 1- α de la familia GDNF	Tr-R	0.735	Sobre-expresión/Mama [97] y testicular [98]
STC1	Estannioalcalina 1	C	0.702	Sobre-expresión/Mama [99], colon y recto [100, 101] y ovario [102].
MGAM	Maltosa-glucoamilasa 8 α -glucosidasa	O	0.696	Sobre-expresión/Gástrico [103]
GREB1	Regulación del crecimiento por estrógeno en cáncer de mama 1	O	0.637	Sobre-expresión/Mama [104] y próstata [105, 106]
TGIF2	Factor homeótico 2 inducido por TGF- β	Reg-T	0.585	Sobre-expresión/Ovario [107]y rectal [108]
KCNJ3	Miembro 3 del canal Potassium unwardly rectifying channel	C-I	0.577	Sobre-expresión/Pulmón [109]

Cuadro 1. Algunos genes diferencialmente expresados en los esferoides con expresión de Smac- ϵ fueron analizados en estudios previos en pacientes con cáncer. En el cuadro se muestran los genes analizados en muestras de pacientes. La sobre-expresión o la baja-expresión indica su abundancia relativa del gen en cuestión cuando se comparo con el grupo control (pacientes sanos o tejido no canceroso). E, enzima; O, otro; R-p-G; Receptor acoplado a proteína G; RN-L, Receptor nuclear dependiente de ligando; T, transportador; Tr-R, Receptor transmembranal; T, transportador; C-I, Canal iónico; Reg-T, Regulador transcripcional.

7. Discusión.

La proteína Smac- α ejerce sus efectos pro-apoptóticos cuando se encuentra en el citosol, lugar en donde interacciona con los miembros de la PIAs. Tal interacción induce la liberación de caspasas activas retenidas por las PIAs, favoreciendo la culminación de la apoptosis [39]. Se ha descrito que los cuatro aminoácidos amino-terminales, Alanina-Valina-Prolina-Isoleucina (AVPI), son indispensables para interaccionar con las PIAs [41, 43]. La mutación o la delección del AVPI compromete las funciones antagónicas de Smac/DIABLO hacia las PIAs [43]. Diferentes grupos de trabajo han desarrollado pequeñas moléculas que mimetizan al segmento AVPI incrementando la afinidad a interaccionar con las PIAs [59, 110]. Actualmente existen moléculas miméticas del segmento AVPI que tienen una mayor afinidad a ciertas PIAs sobre otras [60]. Sin embargo, uno de los estudios mas importantes donde se demuestran funciones celulares independientes del AVPI de Smac- α fue la descripción de una isoforma generada por el procesamiento alternativo del RNAm de Smac/DIABLO, Smac- β [57]. Esta isoforma *per se* carece del SLM y del AVPI los cuales son elementos que caracterizan el funcionamiento de isoforma canónica, Smac- α . Es decir, en condiciones basales Smac- α esta compartimentalizada en la mitocondria hasta que se transloca al citoplasma como respuesta de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Contrariamente, Smac- β nunca es importada a la mitocondria por la ausencia de la SLM. Así, la proteína Smac- β tiene distribución celular citoplasmática en condiciones no estimuladas. Al carecer del AVPI, Smac- β no tendría funciones pro-apoptóticas debido a su incapacidad a interaccionar con las PIAs. Sin embargo, los autores demostraron que Smac- β sensibilizó a las células a morir por apoptosis ante distintos agentes antineoplásicos [57]. Por lo tanto, se infirió que Smac- β ejerce sus funciones pro-apoptóticas mediante la parte carboxilo-terminal o en la proximidad del AVPI. Posteriormente, el diseño y estudio de proteínas truncas artificiales que carecen del AVPI demostraron funciones biológicas adicionales a las desplegadas por Smac- α sugiriendo la idea de la presencia de un mecanismo no caracterizado en Smac responsable de los efectos biológicos independientes del AVPI [48, 57, 66]. Dado que Smac- β , las formas truncas artificiales con mutaciones o delección del AVPI y Smac- α son idénticas en sus segmentos

carboxilos-terminales, se infiere que los efectos biológicos independientes del AVPI pudieran estar presentes en Smac- α . Actualmente, no se ha abordado el mecanismo de acción de las proteínas truncas artificiales o de Smac- β . Sin embargo, ya se ha descrito una interacción específica independiente del AVPI de Smac- α con una proteína como NADE [67]. Esta interacción es mediada por el elemento proximal al AVPI. La proteína XIAP por medio del dominio su RING es capaz de inducir la degradación de Smac- α mediada por el proteasoma [53, 67]. NADE protege a Smac- α de la degradación medida por el proteasoma al inhibir la poli-ubiquitinación ejercida por XIAP. Tal estudio demuestra la existencia de funciones adicionales que residen segmento proximal al AVPI.

La descripción de las funciones que presentan las proteínas truncas artificiales carentes del AVPI, como la sobre-expresión de Smac- Δ -75 y Smac- Δ -60 es interesante en el sentido de indagar posibles funciones biológicas independientes del AVPI. Sin embargo, la relevancia biológica de estas proteínas truncas radica en el hecho de averiguar en que condiciones celulares Smac- α puede ser procesado para que de origen a las formas artificiales diseñadas o si las acciones funcionales presentadas por las proteínas truncas están presentes también en Smac- α . El trabajo presentado aquí, describe una nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo del ARN mensajero de Smac/DIABLO. Esta isoforma la nombramos Smac- ϵ la cual no tiene los elementos SLM ni el AVPI por que sufre la exclusión de los exones 1 y 3 (Figura 3 y 4). Por lo tanto, la caracterización de esta nueva isoforma natural tienen relevancia biológica. Adicionalmente, dada las características intrínsecas de Smac- ϵ , las funciones descritas pueden ser utilizadas para inferir posibles mecanismos independientes del AVPI que pudieran estar presentes en Smac- α .

La abundancia del ARNm de Smac- ϵ fue evaluada en distintos tejidos sanos y líneas celulares tumorales. Se demostró que tiene una expresión tejido específica (Figuras 5 y 6). La presencia de la proteína endógena de Smac- ϵ no fue posible detectarla en condiciones basales. Se detectó la proteína endógena como consecuencia del tratamiento con MG132, inhibidor del proteasoma, en una línea celular que manifestó altos niveles de expresión del ARNm de Smac- ϵ (Figura 10). A diferencia de los reportes de Smac- β , la

presencia de la proteína endógena de Smac- ϵ fue demostrada. La ausencia de la proteína endógena en condiciones basales es indicativo de una alta regulación, al menos por parte del proteasoma (Figura 10). Este dato nos hace formular cuestiones en relación a la(s) proteína(s) que determinan esta degradación. Sin duda, la determinación de las proteínas asociadas a Smac- ϵ ectópico en condiciones basales arrojará indicios sobre esta regulación.

La isoforma Smac- β sufre procesamiento proteolítico en el extremo amino-terminal. Interesantemente, encontramos que Smac- ϵ también sufre el mismo procesamiento. Esto es explicable debido a que ambas isoformas comparten el exón-2 en la extremo 5' en sus secuencias codificantes (Figura 3 y 4). Adicionalmente, se detectó que Smac- ϵ también es procesado en el extremo carboxilo-terminal (Figura 8) revelándose un mecanismo no compartido para las otras isoformas descritas. Por lo tanto, la proteína Smac- ϵ está sujeta a dos mecanismos que regulan su expresión: el procesamiento proteolítico en sus extremos amino- y carboxilo-terminal, y su degradación mediada por el proteasoma.

La proteína de Smac- ϵ es susceptible de ser degradado en condiciones basales. Dado que las isoformas del gen Smac/DIABLO han sido asociadas a eventos apoptóticos, se ideó que las acciones de Smac- ϵ pudieran ser necesarias en algún estímulo inductor de la apoptosis bloqueándose el mecanismo encargado de su degradación constitutiva y consecuentemente se observaría un fenómeno de “acumulación o estabilización” de la proteína Smac- ϵ . De los estímulos analizados, el tratamiento con TNF- α en células HeLa que expresaban ectópicamente a Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ indujo la “acumulación” de HA-Smac- ϵ y en menor proporción de Smac- ϵ (Figuras 9 y 10). Sin embargo, en células T47D estimuladas con TNF- α no produjo algún efecto de “acumulación” en los niveles de la proteína endógena de Smac- ϵ (Figura 10). Este dato sugiere que la estabilización de Smac- ϵ ectópica observado en células HeLa pudiera ser un artefacto. El tratamiento con TNF- α , a través de la activación de la vía NF- κ B, podría activar transcripcionalmente al promotor citomegalovirus en el plásmido donde se clona Smac- ϵ y por lo tanto se observaría la “acumulación” de Smac- ϵ ectópico. Sin embargo, no se descarta que el

fenómeno de “estabilización ” de Smac- ϵ ectópico inducido por TNF- α en las células HeLa sea un efecto real dependiente del tipo celular.

La sobre-expresión de la variante artificial de Smac- ϵ que en el extremo el amino-terminal se le adiciono el epítoto inmunogénico Hematoglutina (HA-Smac- ϵ), indujo activación de la vía canónica de NF- κ B evaluado por ensayos con gen reportero y mayor translocación de p65 al núcleo (Figura 13 y 14). Smac- ϵ es susceptible de un procesamiento en el amino-terminal el cual es parcialmente inhibido por la adición del epítoto HA (Figura 8). Dado que se desconoce en que condiciones fisiológicas es inhibido el procesamiento en el amino-terminal de Smac- ϵ , la activación de la vía NF- κ B por parte de HA-Smac- ϵ carece de impacto biológico. Siguiendo esta línea de razonamiento, las acciones biológicas de HA-Smac- ϵ que no sean compartidas por Smac- ϵ indicaría un efecto no real debido a que, al menos en las condiciones analizadas, Smac- ϵ es constitutivamente procesado por proteólisis en la parte NH₂-terminal. De forma similar, se describió que Smac- β fue capaz de interactuar con las PIAs en ensayos *in vitro*. Sin embargo, estudios *in vivo* demostraron que esta habilidad fue perdida por el procesamiento proteolítico que sufre en la parte amino-terminal. De ahí la importancia de Smac- β , sensibilizador a la apoptosis inducida por agentes antineoplásicos independientemente de la asociación con las PIAs. Por otro lado, la activación de la vía canónica NF- κ B sería explicable si HA-Smac- ϵ regulara la expresión de c-IAP1 ya que esta proteína regula la activación de la vía NF- κ B inducida por TNF- α a través de la poliubiquitinación de RIP1 [111-113]. Al analizar el efecto de Smac- ϵ y sus variantes con epítotos inmunogénicos sobre los niveles de expresión de XIAP, cIAP1 y Survivina no se encontró alguna relación (Figura 16). Se concluye que la determinación de las proteínas que se asocien a HA-Smac- ϵ ayudara a comprender su relación con la vía NF- κ B.

Se ha descrito que Smac- α forma homodímeros con una estabilidad calculada de 20 000 años [114]. La diferencia entre Smac- α y Smac- δ es que la última carece del exón 4 perdiéndose el segmento comprendido entre el aminoácido 62 al 105 con respecto a Smac- α (Figura 3 y 4) . Este exón ausente en Smac- δ compromete la capacidad de formar heterodímeros con Smac- α . Por lo tanto, la presencia del exón 4 es necesaria para

interaccionar con la forma canónica. A diferencia de Smac- α , Smac- δ es capaz de interaccionar e inducir auto-ubiquitinación de XIAP y consecuentemente su degradación mediada por el proteasoma [58]. Posiblemente, la incapacidad de Smac- δ a interaccionar con Smac- α sea fundamental para ejercer las acciones descritas. Por otro lado, Smac- ϵ y Smac- δ son similares en la parte carboxilo-terminal debido a que comparten la inclusión de los exones 5, 6 y 7 así como la exclusión del exón en sus secuencias codificantes (Figura 3 y 4). Experimentalmente, se demostró que Smac- ϵ es incapaz de interaccionar con la Smac- α (figura 15) posiblemente por la ausencia del exón 4 en Smac- ϵ . Si Smac- α pierde la capacidad de formar homodímeros, ya sea por mutaciones puntuales como la descrita en el aminoácido 33 involucrado en la asociación del homodímero [42] o posibles modificaciones postraduccionales [44], reduce su poder antagónico con las PIAs y consecuentemente su potencial pro-apoptótico. Interessantemente, la nueva isoforma descrita en este trabajo, no es capaz de interaccionar con el miembro mas estudiado de las PIAs, XIAP (Figura 15). Por lo tanto, Smac- ϵ constituye modelo atractivo para estudiar posibles acciones biológicas contenidas en la parte carboxilo-terminal de Smac- α debido a que carece del SLM y del AVPI así como la habilidad a interactuar con Smac- α y la capacidad de regular o interaccionar con las PIAs. Estos datos dieron la pauta para analizar los efectos biológicos de Smac- ϵ en un contexto independiente de la apoptosis.

El ensayo de formación de esferoides multicelulares tiene la ventaja de recapitular la biología de los tumores avasculados, secciones intervascuales y micrometástasis. Este modelo es capaz de simular varias características que están presentes en los tumores tales como interacciones célula-célula, las condiciones patofisiológicas del microambiente así como la disposición diferencial de nutrientes [115, 116]. Adicionalmente, se ha reportado que los esferoides pueden mimetizar el patrón de diferenciación y funciones bioquímicas de los tumores y tejidos sanos. Interessantemente, la comparación del transcriptoma entre tumores y esferoides multicelulares del mismo tipo de cáncer revelo similares perfiles de expresión [117, 118]. Las células transfectadas establemente con Smac- ϵ mostraron la formación de esferoides mas grandes que las células transfectadas con el vector vacío (Figura 18). Se decidió analizar este efecto con mayor profundidad por lo que se utilizó la técnica de microarreglos de expresión. Al realizar el análisis de los datos entre los

esferoides que expresaban Smac- ϵ y las células control, se detectó que existen 43 genes diferencialmente expresados en los esferoides con expresión ectópica de Smac- ϵ (Figura 19). Al validar la técnica de microarreglos de expresión por medio de RT-PCR se decidió incluir muestras de esferoides con expresión ectópica de HA-Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ -Myc. Aunque estas muestras no se incluyeron en los microarreglos de expresión, observamos que en los esferoides de HA-Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ -Myc también muestran la sobre-expresión de los genes utilizados en la validación (Figura 20A). Dado que las células transfectadas con Smac- ϵ o sus variantes (HA-Smac- ϵ y HA-Smac- ϵ -Myc) incrementan la capacidad de formar esferoides multicelulares de mayor tamaño que las células control (Figura 20A), la detección de los genes diferencialmente expresados en los esferoides con expresión ectópica de Smac- ϵ pudieran ser los mismos para los esferoides expresando HA-Smac- ϵ o HA-Smac- ϵ -Myc. Es importante mencionar que de los 43 genes diferencialmente expresados en esferoides de Smac- ϵ ninguno es blanco directo de regulación por parte de la vía NF- κ B. Es probable que la activación de la vía NF- κ B ejercida por la sobre-expresión de HA-Smac- ϵ sea perdida en este tipo de ensayo o que los efectos biológicos a raíz de la activación de la vía NF- κ B sean apreciados en otro tipo de ensayos. Adicionalmente, se identificaron que varios de los genes diferencialmente expresados en nuestro ensayo de formación de esferoides fueron previamente detectados en muestras de pacientes con diferentes tipos de cáncer pero no en los grupos control (Cuadro 1). Buena parte de estos genes tuvieron una sobre-expresión en muestras de pacientes con cáncer de mama (Cuadro 1). Esto concuerda con las células utilizadas para la formación de esferoides multicelulares, MCF7. Por otro lado, se determinó que 17 genes diferencialmente expresados están asociados con el cáncer. Estos datos contribuyen al posible papel de Smac- ϵ en el proceso de carcinogénesis.

Se observó que la sobre-expresión de Smac- ϵ induce en los esferoides activación del programa transcripcional mediado por el receptor de estrógeno. Esta vía de señalización está asociada con la proliferación, metástasis e invasión. Este resultado concuerda con el mayor potencial clonogénico que demostraron las células que expresaban ectópicamente a Smac- ϵ con respecto a las células control (Figura 17). Por otro lado, se determinó que el

grupo de genes diferencialmente expresados están asociados en forma significativa con enfermedades como anormalidades del organismo, desordenes de desarrollo y cáncer (Figura 21). Esto explicaría la formación de esferoides de mayor tamaño en células con expresión ectópica de Smac- ϵ . Estos datos en conjunto sostienen la relevancia biológica de Smac- ϵ .

8. Conclusiones

- * Se descubrió una nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo del ARN mensajero de Smac/DIABLO, Smac- ϵ .
- * El ARNm de Smac- ϵ mostro expresión tejido especifica en distintos tejidos sanos y líneas tumorales celulares.
- * La proteína Smac- ϵ en condiciones basales es susceptible de ser degradada por medio del proteasoma.
- * La proteína Smac- ϵ sufre procesamiento proteolítico en ambos extremos, amino- y carboxilo-terminal.
- * La proteína Smac- ϵ es incapaz de interaccionar con el miembro mas estudiado de la familia de las PIAs, XIAP.
- * La proteína de Smac- ϵ no ejerce ningún efecto regulador sobre las PIAs a nivel de proteína.
- * La sobre-expresión de Smac- ϵ incremento la capacidad de la células a formar esferoides de mayor tamaño que las células control.
- * Las células con expresión ectópica de Smac- ϵ mostraron mayor potencial clonogénico.
- * Se detectó activación transcripcional de diferentes genes involucrados en la proliferación, crecimiento y sobre-vida en los esferoides con expresión ectópica de Smac- ϵ .

9. Perspectivas

En este trabajo se describió una nueva isoforma generada por el procesamiento alternativo del RNAm de gen Smac/DIABLO, Smac- ϵ . Se describió que la expresión ectópica de Smac- ϵ confiere a las células un aumento en el potencial clonogénico así como la capacidad de formar esferoides de mayor tamaño. Por medio del análisis del transcriptoma de los esferoides formados, se determinó que Smac- ϵ influye en la tasa de transcripción de diferentes genes. A raíz de estas investigaciones, se generaron nuevas interrogantes. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que Smac- ϵ afecta para modular los genes determinados? Debido a que en este trabajo se fusionó la secuencia codificante de Smac- ϵ a epítopes inmunogénicos, por medio de ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos dirigidos a los epítopes inmunogénicos y la posterior identificación de las proteínas asociadas arrojará indicios de los mecanismos moleculares que son afectados por Smac- ϵ .

Se describió que Smac- ϵ es degradado constitutivamente por distintos mecanismos. Los experimentos realizados con células expresando ectópicamente a Smac- ϵ fueron valiosos para asignarle alguna relevancia biológica. Sin embargo, se partió de un escenario donde la proteína Smac- ϵ es acumulada en el citosol para ejercer alguna función. Es necesario determinar en que condiciones fisiológicas y/o patologías es necesaria la presencia de Smac- ϵ endógeno. Dado que Smac- ϵ modula fenotipos no directamente relacionado con la apoptosis. El tratamiento con agentes inductores de las vías de señalización moduladas por Smac- ϵ pudieran estabilizar a la proteína endógena.

10. ANEXOS

10.1 Abreviaturas

ARNm = ARNmensajero

PIAs= Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

ADNc= ADN complementario

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

SLM= Señal de Localización Mitocondrial

CSIM= Complejo de señalización inductor de muerte

PIAs= Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

Smac= Segundo activador de las caspasas derivado de la mitocondria

DIABLO= Proteína de unión a las PIAs con bajo potencial iónico.

XIAP= Proteína inhibidora de la apoptosis relacionada al cromosoma X

ARN= Acido ribonucleico

ADN= Acido desoxirribonucleico

TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa.

AVPI= Abreviación de la secuencia de aminoácidos Alanina-Valina-Prolina-Isoleucina.

NF- κ B= Factor de transcripción κ B

RT-PCR= Técnica de biología molecular en la cual se amplifica un segmento específico de ADN por medio de iniciadores específicos usando la reacción en cadena de la polimerasa para interrogar la abundancia de un transcrito a nivel de ARN mensajero.

10.2 Iniciadores específicos para la técnica de PCR que se utilizaron en este trabajo.

Nombre del Gen	Iniciador sentido	Iniciador anti-sentido	Tamaño del product esperado (pares de bases)
PDZK1	CGGCGAGTCTGTGGAA CCC	GAGCCTGGCAGACCCCGAAT	327
RAB31	GCCATCGCTGGAAACAA GTGCG	GCGGCTGGCTTGCATGGTTG	234
PGR1	TTGAGGAGGAGGATGGC TCTGAGT	ATAAGGCGTGATTGAGAGGCA GGATA	285
NPY1R	CAGTCTGCTGGCTCCCT CTTAC	ATGCGACTGGGCTTGCTTG	297
NPY5R	GGTCCCCACTTGCTTTG AGA	ACAGGACATCATGCCCAACAA	259
SLC5A8	AGGATTTGATCTGTGGG GCG	CCAAATACGCTGAGTGCTGC	779
SLC16A4	ATTACCACAAGTCTTACC TCATCCTC	AGAAAGGACAGCCATCCCAG C	221
JAK2	GGGAATGGCCTGCCTTA CGA	ATCATGCCGCCACTGAGCAA	478
GREB1	ATCCCTGCGGTCCAACA ACCT	GCACACCAGGAGATGGTCCG G	331
TGIF2	AACGCCTACCCCTCAGA GCAGG	CGGCATGGAGCACACAGACA G	273
GAPDH	CCCCTTCATTGACCTCA ACT	TTGTCATGGATGACCTTGGC	396
SMAC-ε	CTTCTACTTCCAGGCT GTTTA	CCTTCCTCCTGTGTTTTCTGA C	369

Bibliografía

1. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: **The cancer genome.** *Nature* 2009, **458**(7239):719-724.
2. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
3. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
4. Lazebnik Y: **What are the hallmarks of cancer?** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(4):232-233.
5. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD: **Models of carcinogenesis: an overview.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(10):1703-1709.
6. Barrett JC: **Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment.** *Environmental health perspectives* 1993, **100**:9-20.
7. Barrett JC, Wiseman RW: **Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment.** *Environmental health perspectives* 1987, **76**:65-70.
8. Renan MJ: **How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data.** *Molecular carcinogenesis* 1993, **7**(3):139-146.
9. Shen Z: **Genomic instability and cancer: an introduction.** *Journal of molecular cell biology* 2011, **3**(1):1-3.
10. Loeb LA: **A mutator phenotype in cancer.** *Cancer research* 2001, **61**(8):3230-3239.
11. Abdel-Rahman WM: **Genomic instability and carcinogenesis: an update.** *Current genomics* 2008, **9**(8):535-541.
12. Bodmer W, Bielas JH, Beckman RA: **Genetic instability is not a requirement for tumor development.** *Cancer research* 2008, **68**(10):3558-3560; discussion 3560-3551.
13. Nowell PC: **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science* 1976, **194**(4260):23-28.
14. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC: **Cancer as an evolutionary and ecological process.** *Nature reviews Cancer* 2006, **6**(12):924-935.
15. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC: **The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis.** *Nature reviews Cancer* 2013, **13**(7):511-518.
16. Allan JM, Travis LB: **Mechanisms of therapy-related carcinogenesis.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(12):943-955.
17. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B: **The biochemistry of programmed cell death.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995, **9**(13):1277-1287.

18. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M *et al*: **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor**. *Nature* 1999, **397**(6718):441-446.
19. Li LY, Luo X, Wang X: **Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria**. *Nature* 2001, **412**(6842):95-99.
20. Sakahira H, Enari M, Nagata S: **Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis**. *Nature* 1998, **391**(6662):96-99.
21. Sanchez-Perez T, Medema RH, Lopez-Rivas A: **Delaying mitotic exit downregulates FLIP expression and strongly sensitizes tumor cells to TRAIL**. *Oncogene* 2014.
22. Woo SM, Min KJ, Kwon TK: **Calyculin A causes sensitization to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by ROS-mediated down-regulation of cellular FLICE-inhibiting protein (c-FLIP) and by enhancing death receptor 4 mRNA stabilization**. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2012, **17**(11):1223-1234.
23. Micheau O, Tschopp J: **Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes**. *Cell* 2003, **114**(2):181-190.
24. Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M: **The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover**. *Cell* 2006, **124**(3):601-613.
25. Huang DC, Strasser A: **BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death**. *Cell* 2000, **103**(6):839-842.
26. Hausenloy DJ, Yellon DM: **The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion**. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003, **35**(4):339-341.
27. Crompton M: **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death**. *The Biochemical journal* 1999, **341** (Pt 2):233-249.
28. Zamzami N, Kroemer G: **The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens**. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, **2**(1):67-71.
29. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(15):8662-8667.
30. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL: **Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family**. *EMBO reports* 2006, **7**(10):988-994.
31. Martin SJ: **Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction**. *Cell* 2002, **109**(7):793-796.
32. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG: **IAP-targeted therapies for cancer**. *Oncogene* 2008, **27**(48):6252-6275.
33. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: **The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases**. *The EMBO journal* 1997, **16**(23):6914-6925.

34. Gottfried Y, Rotem A, Lotan R, Steller H, Larisch S: **The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP.** *The EMBO journal* 2004, **23**(7):1627-1635.
35. Bornstein B, Gottfried Y, Edison N, Shekhtman A, Lev T, Glaser F, Larisch S: **ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists.** *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2011, **16**(9):869-881.
36. Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R: **Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways.** *Cell death and differentiation* 2004, **11**(2):208-216.
37. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandennebeele P: **The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity.** *Cell death and differentiation* 2002, **9**(1):20-26.
38. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES: **Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway.** *J Biol Chem* 2000, **275**(46):36152-36157.
39. Verhagen AM, Vaux DL: **Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac.** *Apoptosis* 2002, **7**(2):163-166.
40. Igney FH, Krammer PH: **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(4):277-288.
41. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y: **Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **408**(6815):1008-1012.
42. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y: **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **406**(6798):855-862.
43. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW: **Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.** *Nature* 2000, **408**(6815):1004-1008.
44. Burke SP, Smith JB: **Monomerization of cytosolic mature smac attenuates interaction with IAPs and potentiation of caspase activation.** *PLoS One* 2010, **5**(10).
45. Cossu F, Mastrangelo E, Milani M, Sorrentino G, Lecis D, Delia D, Manzoni L, Seneci P, Scolastico C, Bolognesi M: **Designing Smac-mimetics as antagonists of XIAP, cIAP1, and cIAP2.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008.
46. Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH: **Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ.** *J Biol Chem* 2002, **277**(46):44236-44243.
47. Yang QH, Du C: **Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**(17):16963-16970.
48. Song Z, Yao X, Wu M: **Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 2003, **278**(25):23130-23140.

49. Kim JY, Chung JY, Lee SG, Kim YJ, Park JE, Yoo KS, Yoo YH, Park YC, Kim BG, Kim JM: **Nuclear interaction of Smac/DIABLO with Survivin at G2/M arrest prompts docetaxel-induced apoptosis in DU145 prostate cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **350**(4):949-954.
50. Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, Qiu X, Heese K, Wu M: **Survivin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(12):2079-2088.
51. Qiu XB, Goldberg AL: **The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9.** *J Biol Chem* 2005, **280**(1):174-182.
52. Silke J, Kratina T, Ekert PG, Pakusch M, Vaux DL: **Unlike Diablo/smac, Grim promotes global ubiquitination and specific degradation of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and neither cause apoptosis.** *J Biol Chem* 2004, **279**(6):4313-4321.
53. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM: **Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro.** *J Biol Chem* 2002, **277**(39):36611-36616.
54. Hu S, Yang X: **Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO.** *J Biol Chem* 2003, **278**(12):10055-10060.
55. Park BD, Ham YM, Jeong HJ, Cho SJ, Je YT, Yoo KD, Lee SK: **Phosphorylation of Smac by JNK3 attenuates its interaction with XIAP.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **361**(4):994-999.
56. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S, Anderson KC: **JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**(20):17593-17596.
57. Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM: **The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity.** *J Cell Biol* 2001, **153**(1):221-228.
58. Fu J, Jin Y, Arend LJ: **Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein.** *J Biol Chem* 2003, **278**(52):52660-52672.
59. Bai L, Smith DC, Wang S: **Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics.** *Pharmacology & therapeutics* 2014, **144**(1):82-95.
60. Sun H, Lu J, Liu L, Yang CY, Wang S: **Potent and selective small-molecule inhibitors of cIAP1/2 proteins reveal that the binding of Smac mimetics to XIAP BIR3 is not required for their effective induction of cell death in tumor cells.** *ACS chemical biology* 2014, **9**(4):994-1002.
61. Peng Y, Sun H, Lu J, Liu L, Cai Q, Shen R, Yang CY, Yi H, Wang S: **Bivalent Smac mimetics with a diazabicyclic core as highly potent antagonists of XIAP and cIAP1/2 and novel anticancer agents.** *J Med Chem* 2012, **55**(1):106-114.
62. Silke J, Meier P: **Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(2).

63. Blankenship JW, Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Kirkpatrick DS, Izrael-Tomasevic A, Phu L, Arnott D, Aghajan M, Zobel K *et al*: **Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1).** *The Biochemical journal* 2009, **417**(1):149-160.
64. Oberoi-Khanuja TK, Murali A, Rajalingam K: **IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration.** *Cell death & disease* 2013, **4**:e784.
65. Qiu W, Liu H, Sebastini A, Sun Q, Wang H, Zhang L, Yu J: **An apoptosis-independent role of SMAC in tumor suppression.** *Oncogene* 2013, **32**(19):2380-2389.
66. Kuai J, Nickbarg E, Wooters J, Qiu Y, Wang J, Lin LL: **Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis.** *J Biol Chem* 2003, **278**(16):14363-14369.
67. Yoon K, Jang HD, Lee SY: **Direct interaction of Smac with NADE promotes TRAIL-induced apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **319**(2):649-654.
68. Smyth GK, Michaud J, Scott HS: **Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments.** *Bioinformatics* 2005, **21**(9):2067-2075.
69. Chaiyarit S, Thongboonkerd V: **Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study.** *Anal Biochem* 2009, **394**(2):249-258.
70. Mikalsen T, Johannessen M, Moens U: **Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005, **37**(12):2513-2520.
71. O'Quin JB, Mullen RT, Dyer JM: **Addition of an N-terminal epitope tag significantly increases the activity of plant fatty acid desaturases expressed in yeast cells.** *Applied microbiology and biotechnology* 2009, **83**(1):117-125.
72. Chondrogianni N, Gonos ES: **Proteasome function determines cellular homeostasis and the rate of aging.** *Adv Exp Med Biol* 2010, **694**:38-46.
73. Zhang S, Shi Y, Jin H, Liu Z, Zhang L, Zhang L: **Covalent complexes of proteasome model with peptide aldehyde inhibitors MG132 and MG101: docking and molecular dynamics study.** *Journal of molecular modeling* 2009, **15**(12):1481-1490.
74. Takagi A, Watanabe M, Ishii Y, Morita J, Hirokawa Y, Matsuzaki T, Shiraishi T: **Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features.** *Anticancer Res* 2007, **27**(1A):45-53.
75. Valcarcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, Lopategi A, Martinez I, Mendoza L, Muruzabal FJ, Salado C, Vidal-Vanaclocha F: **Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis.** *J Transl Med* 2008, **6**:57.
76. Lu H, Searle K, Liu Y, Parker T: **The effect of dimensionality on growth and differentiation of neural progenitors from different regions of fetal rat brain**

- in vitro: 3-dimensional spheroid versus 2-dimensional monolayer culture.** *Cells Tissues Organs* 2012, **196**(1):48-55.
77. Lee HJ, Nam KT, Park HS, Kim MA, Lafleur BJ, Aburatani H, Yang HK, Kim WH, Goldenring JR: **Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early stage gastric cancer.** *Gastroenterology* 2010, **139**(1):213-225 e213.
78. Jarzab B, Wiench M, Fujarewicz K, Simek K, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, Wloch J, Czarniecka A, Chmielik E, Lange D *et al*: **Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications.** *Cancer Res* 2005, **65**(4):1587-1597.
79. Kotsch M, Sieuwerts AM, Grosser M, Meye A, Fuessel S, Meijer-van Gelder ME, Smid M, Schmitt M, Baretton G, Luther T *et al*: **Urokinase receptor splice variant uPAR-del4/5-associated gene expression in breast cancer: identification of rab31 as an independent prognostic factor.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **111**(2):229-240.
80. Dunbier AK, Anderson H, Ghazoui Z, Folkerd EJ, A'Hern R, Crowder RJ, Hoog J, Smith IE, Osin P, Nerurkar A *et al*: **Relationship between plasma estradiol levels and estrogen-responsive gene expression in estrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(7):1161-1167.
81. Wojnar A, Drozd K, Podhorska-Okolow M, Pudelko M, Szuba A, Zabel M, Dziegiel P: **Differentiated expression of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PgR) in ductal breast cancers.** *Folia Histochem Cytobiol* 2009, **47**(1):55-60.
82. Arnedos M, Nerurkar A, Osin P, A'Hern R, Smith IE, Dowsett M: **Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC).** *Ann Oncol* 2009, **20**(12):1948-1952.
83. Lin HY, Park HY, Radlein S, Mahajan NP, Sellers TA, Zachariah B, Pow-Sang J, Coppola D, Ganapathy V, Park JY: **Protein expressions and genetic variations of SLC5A8 in prostate cancer risk and aggressiveness.** *Urology* 2011, **78**(4):971 e971-979.
84. Sandgren J, Andersson R, Rada-Iglesias A, Enroth S, Akerstrom G, Dumanski JP, Komorowski J, Westin G, Wadelius C: **Integrative epigenomic and genomic analysis of malignant pheochromocytoma.** *Exp Mol Med* 2010, **42**(7):484-502.
85. Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF, Langdon SP: **Estrogen-regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer.** *Gynecol Oncol* 2007, **106**(3):461-468.
86. Reubi C, Gugger M, Waser B: **Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002, **29**(7):855-862.
87. Reubi JC, Gugger M, Waser B, Schaer JC: **Y(1)-mediated effect of neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets.** *Cancer Res* 2001, **61**(11):4636-4641.
88. Heiliger KJ, Hess J, Vitagliano D, Salerno P, Braselmann H, Salvatore G, Ugolini C, Summerer I, Bogdanova T, Unger K *et al*: **Novel candidate genes of thyroid**

- tumourigenesis identified in Trk-T1 transgenic mice.** *Endocr Relat Cancer* 2012, **19**(3):409-421.
89. Lv D, Zhao W, Dong D, Qian XP, Zhang Y, Tian XJ, Zhang J: **Genetic and epigenetic control of UNC5C expression in human renal cell carcinoma.** *Eur J Cancer* 2011, **47**(13):2068-2076.
 90. Laudanski J, Chyczewski L, Niklinska WE, Kretowska M, Furman M, Sawicki B, Niklinski J: **Expression of bcl-2 protein in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathology and patient survival.** *Neoplasma* 1999, **46**(1):25-30.
 91. Groeger AM, Caputi M, Esposito V, De Luca A, Salat A, Murabito M, Giordano GG, Baldi F, Giordano A, Wolner E: **Bcl-2 protein expression correlates with nodal status in non small cell lung cancer.** *Anticancer Res* 1999, **19**(1B):821-824.
 92. Ilyas M, Hao XP, Wilkinson K, Tomlinson IP, Abbasi AM, Forbes A, Bodmer WF, Talbot IC: **Loss of Bcl-2 expression correlates with tumour recurrence in colorectal cancer.** *Gut* 1998, **43**(3):383-387.
 93. Witkiewicz AK, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A, Philp NJ, Lin Z, Gandara R, Sneddon S, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP: **Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers.** *Cell Cycle* 2012, **11**(6):1108-1117.
 94. Pertega-Gomes N, Vizcaino JR, Miranda-Goncalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, Monteiro P, Henrique RM, Reis RM, Lopes C *et al*: **Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer.** *BMC Cancer* 2011, **11**:312.
 95. Vanaja DK, Chevillat JC, Iturria SJ, Young CY: **Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression.** *Cancer Res* 2003, **63**(14):3877-3882.
 96. Fagiani E, Giardina G, Luzi L, Cesaroni M, Quarto M, Capra M, Germano G, Bono M, Capillo M, Pelicci P *et al*: **RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas.** *Cancer Res* 2007, **67**(7):3064-3073.
 97. Essegir S, Todd SK, Hunt T, Poulsom R, Plaza-Menacho I, Reis-Filho JS, Isacke CM: **A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer.** *Cancer Res* 2007, **67**(24):11732-11741.
 98. Ferranti F, Muciaccia B, Ricci G, Dovere L, Canipari R, Magliocca F, Stefanini M, Catizone A, Vicini E: **Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes invasive behaviour in testicular seminoma cells.** *Int J Androl* 2012.
 99. McCudden CR, Majewski A, Chakrabarti S, Wagner GF: **Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas.** *Mol Cell Endocrinol* 2004, **213**(2):167-172.
 100. Tamura S, Oshima T, Yoshihara K, Kanazawa A, Yamada T, Inagaki D, Sato T, Yamamoto N, Shiozawa M, Morinaga S *et al*: **Clinical significance of STC1 gene expression in patients with colorectal cancer.** *Anticancer Res* 2011, **31**(1):325-329.

101. Macartney-Coxson DP, Hood KA, Shi HJ, Ward T, Wiles A, O'Connor R, Hall DA, Lea RA, Royds JA, Stubbs RS *et al*: **Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level.** *BMC Cancer* 2008, **8**:187.
102. Liu G, Yang G, Chang B, Mercado-Uribe I, Huang M, Zheng J, Bast RC, Lin SH, Liu J: **Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2010, **102**(11):812-827.
103. Yang S: **Gene amplifications at chromosome 7 of the human gastric cancer genome.** *Int J Mol Med* 2007, **20**(2):225-231.
104. Hnatyszyn HJ, Liu M, Hilger A, Herbert L, Gomez-Fernandez CR, Jorda M, Thomas D, Rae JM, El-Ashry D, Lippman ME: **Correlation of GREB1 mRNA with protein expression in breast cancer: validation of a novel GREB1 monoclonal antibody.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **122**(2):371-380.
105. Rae JM, Johnson MD, Cordero KE, Scheys JO, Larios JM, Gottardis MM, Pienta KJ, Lippman ME: **GREB1 is a novel androgen-regulated gene required for prostate cancer growth.** *Prostate* 2006, **66**(8):886-894.
106. Antunes AA, Leite KR, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Camara-Lopes LH, Dall'oglio MF, Srougi M: **GREB1 tissue expression is associated with organ-confined prostate cancer.** *Urol Oncol* 2012, **30**(1):16-20.
107. Watanabe T, Imoto I, Katahira T, Hirasawa A, Ishiwata I, Emi M, Takayama M, Sato A, Inazawa J: **Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers.** *Jpn J Cancer Res* 2002, **93**(10):1114-1122.
108. Lips EH, van Eijk R, de Graaf EJ, Oosting J, de Miranda NF, Karsten T, van de Velde CJ, Eilers PH, Tollenaar RA, van Wezel T *et al*: **Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis.** *BMC Cancer* 2008, **8**:314.
109. Takanami I, Inoue Y, Gika M: **G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK 1) gene expression correlates with tumor progression in non-small cell lung cancer.** *BMC Cancer* 2004, **4**:79.
110. Fulda S: **Molecular pathways: targeting death receptors and smac mimetics.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014, **20**(15):3915-3920.
111. Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA: **cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination.** *Molecular cell* 2008, **30**(6):689-700.
112. McComb S, Cheung HH, Korneluk RG, Wang S, Krishnan L, Sad S: **cIAP1 and cIAP2 limit macrophage necroptosis by inhibiting Rip1 and Rip3 activation.** *Cell death and differentiation* 2012, **19**(11):1791-1801.
113. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J *et al*: **Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(33):11778-11783.

114. Goncalves RB, Sanches D, Souza TL, Silva JL, Oliveira AC: **The proapoptotic protein Smac/DIABLO dimer has the highest stability as measured by pressure and urea denaturation.** *Biochemistry* 2008, **47**(12):3832-3841.
115. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA: **Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again.** *J Biotechnol* 2010, **148**(1):3-15.
116. Lin RZ, Chang HY: **Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research.** *Biotechnol J* 2008, **3**(9-10):1172-1184.
117. De Witt Hamer PC, Van Tilborg AA, Eijk PP, Sminia P, Troost D, Van Noorden CJ, Ylstra B, Leenstra S: **The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids.** *Oncogene* 2008, **27**(14):2091-2096.
118. Ernst A, Hofmann S, Ahmadi R, Becker N, Korshunov A, Engel F, Hartmann C, Felsberg J, Sabel M, Peterziel H *et al*: **Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(21):6541-6550.

Artículos publicados

Original Article

Ectopic expression of new alternative splice variant of Smac/DIABLO increases mammospheres formation

Gustavo U Martínez-Ruiz, Georgina Victoria-Acosta, Karla I Vazquez-Santillan, Luis Jimenez-Hernandez, Laura Muñoz-Galindo, Gisela Ceballos-Cancino, Vilma Maldonado, Jorge Melendez-Zajgla

Functional Cancer Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur 4809, Col. Arenal Tepepan, Tlalpan 14610, Mexico

Received July 14, 2014; Accepted August 21, 2014; Epub August 15, 2014; Published September 1, 2014

Abstract: Smac- α is a mitochondrial protein that, during apoptosis, is translocated to the cytoplasm, where it negatively regulates members of the inhibitor of apoptosis (IAP) family via the IAP-binding motif (IBM) contained within its amino-terminus. Here, we describe a new alternative splice variant from Smac gene, which we have named Smac- ϵ . Smac- ϵ lacks both an IBM and a mitochondrial-targeting signal (MTS) element. Smac- ϵ mRNA exhibits a tissue-specific expression pattern in healthy human tissues as well as in several cancer cell lines. The steady-state levels of endogenous Smac- ϵ protein is regulated by the proteasomal pathway. When ectopically expressed, this isoform presents a cytosolic localization and is unable to associate with or to regulate the expression of X-linked Inhibitor of apoptosis protein, the best-studied member of IAP family. Nevertheless, over-expression of Smac- ϵ increases mammosphere formation. Whole genome expression analyses from these mammospheres show activation of several pro-survival and growth pathways, including Estrogen-Receptor signalling. In conclusion, our results support the functionality of this new Smac isoform.

Keywords: Smac- ϵ , tumorigenicity, cancer, breast

Introduction

Apoptosis is a type of cell death that occurs during both physiological and pathological conditions. In healthy cells, apoptosis is activated by the ligand-stimulated engagement of death receptors or by the cytoplasmic presence of certain mitochondrial proteins (Cytochrome-C and Smac- α). These events trigger the activation of effector caspases that degrade their target molecules. The inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) block the activity of caspases via physical interactions. This family of proteins is characterized by the presence of one to three baculovirus IAP repeat (BIR) domains. XIAP, the most extensively studied IAP family member, interacts with and inhibits caspase-3, caspase-7, and caspase-9 by direct interaction via its BIR domains. Smac- α , the main IAP inhibitor, is located within the mitochondrial intermembrane space, from which it is released during apoptosis [1]. Upon release, Smac- α interacts with IAPs, de-repressing caspases. The

first four amino acids (AVPI, also called the IAP-binding motif or IBM) in the NH₂-terminal segment of mature Smac- α are responsible for the interaction with IAPs [2-4]. Although it has been established that mutating the AVPI sequence of Smac- α is sufficient to abrogate its interaction with IAPs, a Smac- α protein with a mutated AVPI still elicits biological effects. This mutant is unable to bind to XIAP and Livin, but it nonetheless induces their ubiquitination [5] and decreases cell survival [6]. Smac-75 is a truncated mutant protein that lacks the first 20 amino acids from the NH₂-terminus of mature Smac- α . This mutant is unable to associate with IAPs, but it nevertheless sensitizes cells to apoptosis by different stimuli [7, 8]. New Smac- α variants generated by alternative splicing have also been described. Among them is Smac- β , which, despite harboring neither an IBM nor a mitochondrial targeting sequence (MTS), can sensitize cells to apoptosis by different stimuli when this isoform is over-expressed [7]. Interestingly, TRAIL-induced apoptosis has

Smac-ε increases mammosphere formation

been shown to be increased by the ectopic co-expression of both nerve growth factor receptor associated protein-1 (NGFRAP1) and mature Smac-α. Mature Smac-α is able to associate with NGFRAP1 in an IBM-independent way, inhibiting its ubiquitination by XIAP [9]. These results highlight the IBM-independent cellular functions of Smac-α, although information about its cellular impact remains limited.

After an initial PCR screening, we discovered a new Smac isoform that is generated by alternative splicing, which we have named Smac-ε. Smac-ε was detected at both RNA and, to a lesser extent, protein levels. In basal conditions, the protein derived from this new isoform is tightly regulated by the proteasomal pathway. In contrast to canonical Smac-α, this new isoform lacks both IBM and MTS elements. The absence of these structural motifs allowed us to seek IBM-independent functions without using an artificial Smac mutant. In breast cancer cells, ectopic Smac-ε expression promoted the generation of larger mammospheres, pointing toward a pro-tumorigenic role in cancer. Microarray assays of these mammospheres indicated that the expression of this new Smac isoform results in the activation of several oncogenic pathways not attributable to any direct or indirect regulation of IAPs.

Materials and methods

Cell culture and reagents

HeLa (CCL2) and MCF-7 (HTB22) cells were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC), and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% and 10% fetal bovine serum (FBS), respectively. The cells were grown in a humidified incubator that was maintained at 37 °C with 5% CO₂. Mammospheres were obtained from MCF-7 cells that were seeded in non-adherent culture flasks in Leibovitz L:15 medium with 10% FBS and then transferred into a rotatory incubator. The medium was changed every two days to avoid cytotoxicity. After 8 days of culture in those conditions, pictures were taken at 10× magnification. Mammospheres were assumed to have an ellipsoidal shape, we measured two perpendicular diameters and the area was determined. Transfection of constructs was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), and stable cell lines

were selected using puromycin (1 μg/ml for 15 days). Anti-Smac-α, anti-XIAP, anti-Myc and anti-Cox-IV were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-c-IAP1 and anti-tubulin were purchased from Santa Cruz Biotechnology. MG132 was purchased from Calbiochem. TNF-α was purchased from R&D. For soft agar clonogenic assays, 10000 cells of each population were resuspended in DMEM containing 10% SFB and 0.3% agarose. Cells were then seeded into six-well plates over a bottom layer containing a solution of 0.5% agarose and DMEM 1%. Plates were incubated at 37 °C for 5 weeks. Viable colonies were visualized by 0.005% crystal violet staining and counted.

Immunoblotting

Protein fractions were subjected to either 15% or 18% SDS-PAGE and were transferred to Immobilon P membranes (Millipore). Next, the membranes were incubated with the indicated antibodies overnight and the blots were visualized using the Immobilon Western kit (Millipore) with a peroxidase-labeled secondary antibody, according to the manufacturer's protocols.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from monolayer cultures and from mammospheres using TRIzol reagent (Invitrogen) and then subjected to reverse transcription using the Superscript III kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocols. Using Amplitaq Gold (Applied Biosystems), cDNA was amplified with the primers described in Table S1 in Supporting Information.

Immunoprecipitation assay

Briefly, the cells were washed with PBS, scraped and centrifuged at 2,000 rpm for 3 min. Cells were lysed using 1 mL of TNTE-5 buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton, 1 mM EDTA and 1X protease inhibitor cocktail) and incubated for 15 minutes on ice. The lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The supernatants were incubated with 10 μL of recombinant protein G (Life Technologies) for 1 hour. After incubation, the lysates were centrifuged at 14000 rpm for 10 sec. The supernatants were incubated overnight at 4 °C with 3 μL of primary antibody with constant agitation.

Smac-ε increases mammosphere formation

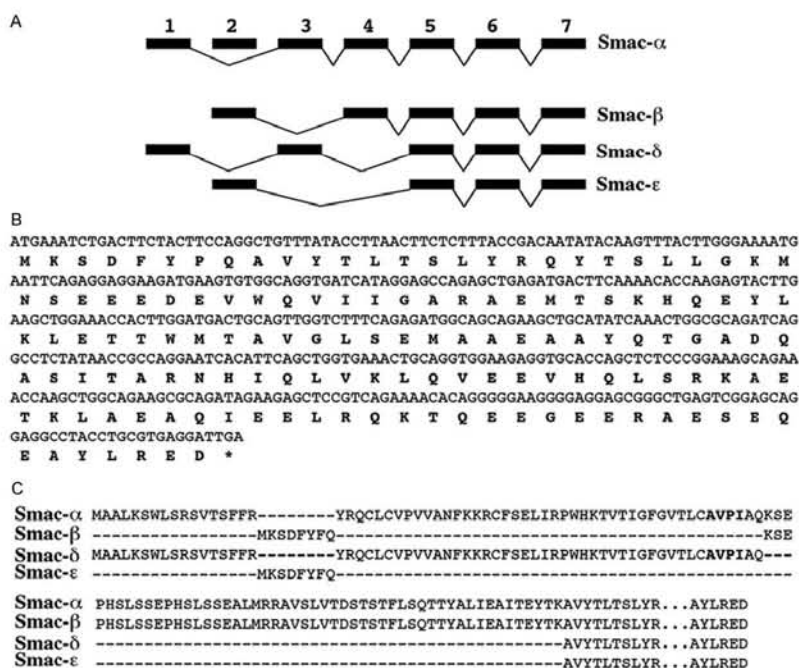


Figure 1. Smac-ε, a new alternative splice variant from Smac/DIABLO gene. **A.** Schematic representation of Smac/DIABLO isoforms generated by alternative splicing. Exons are shown as black boxes. **B.** Nucleotides and amino acids sequences of Smac-ε. **C.** The alignment shows the differences between Smac-α, Smac-β, Smac-δ and Smac-ε. The COOH-terminus is the same for all these isoforms. Boldface type shows the IAP-Binding-Motif (IBM).

Next, 10 μL of recombinant protein G was added to each lysate, and the lysates were then incubated with constant agitation for 1 hour on ice. The lysates were next centrifuged at 14,000 rpm for 10 sec. The resulting pellets were washed twice with TNTE-1 buffer (50 mM Tris at pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton, 1 mM EDTA and 1X protease inhibitor cocktail), followed by boiling in Laemmli sample solution (100 mM Tris pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 0.05% Bromophenol blue and 100 mM DTT) for further analysis.

Oligo nucleotide microarray analysis

Affymetrix Human Gene 1.0 ST array GeneChips were used for all of the experiments. Total RNA from mammospheres was isolated using the

TRIzol reagent (Life Technologies) following the manufacturers' protocols. 200 ng of total RNA with a RNA Integrity Number (RIN) of up to 8.8 was used as starting material. Processed arrays were scanned using the GeneChip Scanner 7 G, and the resulting image data were managed with the Affymetrix Expression Console Version 1.1 using the RMA algorithm for the quality control data.

Data analysis

Analysis of the microarray data was performed using Bioconductor packages. The Oligo package was used for background subtraction, quantile normalization and summarization via median polish. The Limma package was used to detect differentially expressed probes, taking into account technical replication data sets

Smac-ε increases mammosphere formation

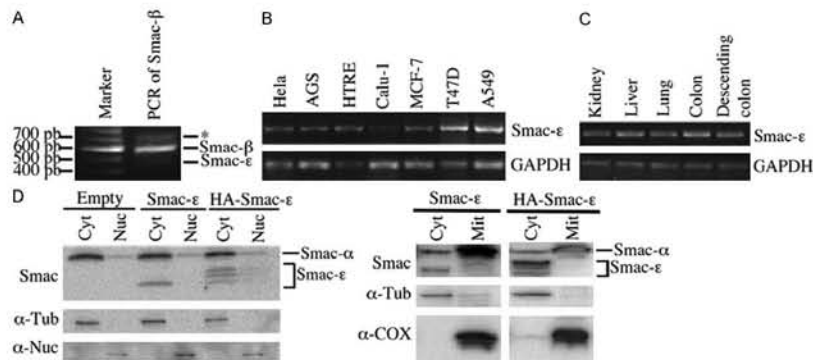


Figure 2. Characterization of Smac-ε. (A) RT-PCR from HeLa cells was done with specific primers anchored in the 5' and 3'-ends of the complete Smac-β isoform. From the three bands detected, the two lowest mRNAs signals were identified by capillary sequencing as Smac-β and Smac-ε. *, uncharacterized band. RT-PCR analysis of Smac-ε and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in healthy tissues and in (C) cancer cell lines (B). (D) HeLa cells were stably transfected with Smac-ε, HA-Smac-ε or an empty vector. Cellular fractionation was performed, and equal amounts of protein from each fraction were subjected to western blot analyses with the indicated antibodies. Smac-ε and HA-Smac-ε present cytosolic localization. Cyt, cytoplasm; Nuc, nucleus; Mit, mitochondria; Tub, tubulin; Nuc, nucleolin; COX, COX-IV.

using Benjamini-Hochberg correction for multiple testing [10].

Gene interaction network analysis

Ingenuity® Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems) software was used to determine which functional processes were differentially represented in the gene lists obtained from data analysis. The Ingenuity Pathways Knowledgebase was used to build gene interaction networks derived from the provider's data. The statistical significance of interaction networks was determined by the Fisher's exact test.

Cytoplasmic and nuclear protein fractionation

Cells were scraped into PBS (phosphate-buffered saline) and centrifuged at 2,000 rpm for 3 min. The pellets were resuspended in 300 µL of Buffer A (10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA and 1X protease inhibitor cocktail (Sigma)). The cells were then incubated in lysis buffer for 20 minutes on ice. Fifty microliters of NP-40 (10%) was added and incubated for 2 min. The lysates were centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The supernatants were recovered (cytosolic frac-

tion) for further analysis. The residual pellets were resuspended vigorously in 200 µL of Buffer C (25 mM HEPES at pH 7.5, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA and 20% glycerol) and incubated for 30 min on ice with sporadic agitation. Next, the lysates were centrifuged at 8000 rpm for 5 min. The supernatants (nuclear extract) were recovered for further analysis.

Mitochondrial and cytoplasmic fractionation

Mitochondrial and cytoplasmic fractions were obtained as previously described [11]. Briefly, 1×10⁶ HeLa cells were sonicated in isolation buffer (0.25 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.5) using a probe sonicator (ultrasonic processor, Cole Palmer) for 10 sec/10 cycles on ice. The samples were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min, and the resulting supernatants were collected and then centrifuged at 12,000 rpm for 25 min (cytoplasmic fraction). The pellets were retained, washed once with fresh isolation buffer, and then centrifuged at 12,000 rpm for 25 min. The pellets were resuspended in mitochondrial buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 120 mM dithiothreitol, and 40 mM Tris-HCl), incubated at 4°C for 30 min, and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min. The superna-

Smac-ε increases mammosphere formation

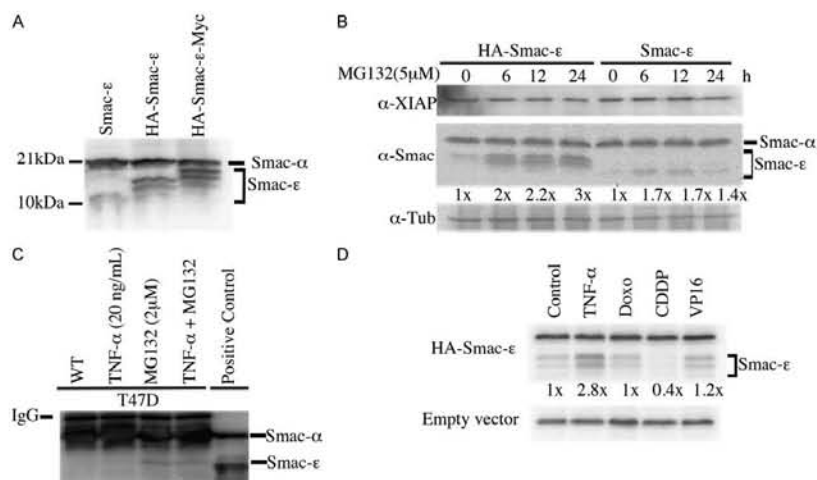


Figure 3. Smac-ε has a short life. **A.** MCF-7 cells were transfected with Smac-ε, HA-Smac-ε or HA-Smac-ε-Myc. Forty-eight hours posttransfection, lysates were generated and immunoblotted with an anti-Smac-α antibody. **B.** HeLa cells stably transfected with Smac-ε and HA-Smac-ε were treated with 5 μM MG132 for the indicated times and analyzed by western blot using the indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control; **C.** T47D cells were stimulated with TNF-α or MG132 or both at the indicated concentrations for 24 h. Equal amounts of total proteins were subject to immunoprecipitation with an anti-Smac antibody, this antibody recognizes both Smac-α and Smac-ε proteins, followed by immunoblotting using the same antibody. Immunoprecipitation from cells ectopically expressing Smac-ε was included as a control. **D.** HeLa cells transfected with HA-Smac-ε or an empty vector were treated with TNF-α at 20 ng/mL for 4 h, doxorubicin at 1.3 μM for 12 h, cisplatin at 12.5 μM for 12 h or etoposide at 100 μM for 12 h. Equal amounts of total proteins from each lysate were subject to western blot analysis with an anti-Smac-α antibody. Doxo, doxorubicin; CDDP, cisplatin; VP16, etoposide; Tub, tubulin.

tants (mitochondrial extracts) were retained for further analysis.

Plasmid constructions

Smac-ε was amplified from cDNA using Pfu polymerase (Stratagene) and cloned into pTZ-57RT (Fermentas). It was then subcloned into the pQCXIP (Clontech) expression vector, producing the pQCXIP-Smac-ε construct. To generate a Smac-ε with a NH₂-terminal hemagglutinin (HA) tag (HA-Smac-ε), PCR amplification was performed using pQCXIP-Smac-ε as a template with the following primers: Forward, 5'-CATACGACGTCCGACTACGCTATGAAATCTGACT-3'; Reverse, 5'-CGGATCCGTCATCCTCACGCA-GGTAG-3'. The PCR product was cloned into pTZ57RT (Fermentas). Re-amplification was performed using the same reverse primer and the following primer: 5'-CGCGGCCGCATGTACC-CATACGACGT-3', which contains a NotI site

(underlined). The PCR product was cloned into pQCXIP, generating pQCXIP-HA-Smac-ε. HA-Smac-ε with a COOH-terminal Myc tag (HA-Smac-ε-Myc) was created by PCR-amplifying HA-Smac-ε using pQCXIP-HA-Smac-ε as a template with the following primers: Forward, 5'-CGCGGCCGCATGTACCCATACGACGT-3' and Reverse, 5'-TGCTCGAGGTCATCCTCACGCAGG-3', each of which contains a XhoI site (underlined). The product was cloned into the pCVM-tag5C vector (pCVM-Tag5C-HA-Smac-ε-Myc). Subcloning of HA-Smac-ε-Myc was performed from pCVM-Tag5C to pQCXIP, generating pQCXIP-HA-Smac-ε-Myc. cDNA encoding Smac-75 was amplified by PCR and cloned into pQCXIP to generate pQCXIP-Smac-75 with the following primers: Forward 5'-CGCGGCCGCATGAGAAAGAGC-3', which contains a NotI site (underlined), and Reverse 5'-CGGATCCGTCA-ATCCTCACGCAAGGTAG-3', which contains a BamHI site (underlined). Smac-α was amplified

Smac-ε increases mammosphere formation

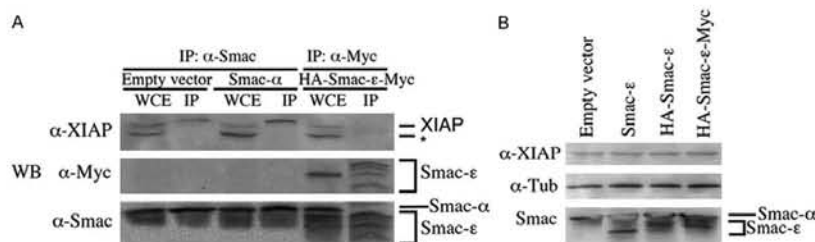


Figure 4. Smac-ε neither associates with nor regulates the protein levels of XIAP. **A.** MCF-7 cells were transiently transfected with empty vector, Smac-α or HA-Smac-ε-Myc. Forty-eight hours after transfection, lysates from cells transfected with HA-Smac-ε-Myc was subjected to immunoprecipitation with an anti-Myc antibody, followed by immunoblotting using the indicated antibodies. We included a positive control of (Smac-α)-XIAP interaction, immunoprecipitation with an anti-Smac-α antibody were performed in lysates from cells transfected with empty vector or Smac-α. **B.** MCF-7 cells transfected with Smac-ε, HA-Smac-ε, HA-Smac-ε-Myc or empty vectors were subjected to immunoblotting analyses with the indicated antibodies. WCE, whole cell extract; IP, immunoprecipitation; Tub, Tubulin; *, non-specific band.

from cDNA using Pfu polymerase (Stratagene) with the following primers: Forward, 5'-GCGC GGATCCATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCT-3'; Reverse, 5'-AGCTCTTAGACTCAGGCCCTCAATCCTCACGC-3' and cloned into PCR2.1-TOPO (Invitrogen). It was then subcloned into the pLXSN (Clontech) expression vector, producing the pLXSN-Smac-α construct. All of the constructs were verified by capillary sequencing.

Statistical analysis

GraphPad Prism version 5.0 for Windows (La Jolla, CA) was used to perform statistical analyses. One-way analysis of variance was performed, and the Bonferroni post-test was used at 95% or 99% confidence intervals to determine significant differences.

Results

Identification of Smac-ε as a novel splice variant with cytosolic distribution

The Smac gene is composed of 7 exons. Exons 1 and 3 encode the mitochondrial targeting signal (MTS) and the IBM elements. Using HeLa cells, we performed a screen using primers anchored in the 5' and 3'-ends of the putative complete Smac-β mRNA. We found two new variants and further analyzed the shortest isoform (Figure 2A). The novel variant described here is generated by alternative splicing that results in the exclusion of exons 1, 3 and 4 (Figure 1) To assess the mRNA expression and

distribution of this isoform, specific primers were designed and used to analyze the ratio between Smac-ε and GAPDH in several human tissues and cell lines. Tissue-specific expression was detected in five different normal human tissue samples and in seven different cancer cell lines (Figure 2B and 2C). Smac-ε was anticipated to exhibit cytosolic localization as it lacks a MTS. Cellular fractionating was performed to verify this prediction using HeLa cells stably expressing Smac-ε. As expected, Smac-ε exhibited exclusively cytosolic localization (Figure 2D).

Smac-ε undergoes constitutively proteasome-dependent degradation and proteolytic cleavage

The expected translated sequence of Smac-ε comprises 146 amino acids, with an expected molecular weight of 16.3 kDa. Under denaturing conditions, Smac-ε exhibited an approximate molecular weight of 10 kDa, which is lower than expected. Taking into consideration that an over-expressed Smac-β isoform undergoes NH₂-terminal cleavage producing truncated protein [7] and that Smac-ε and Smac-β are largely homologous within their NH₂-termini, we explored the possibility of NH₂-terminal cleavage in the new isoform. It has been shown that adding peptide tags to short-lived proteins stabilizes them and increases effectively their half-life [12, 13]. For this purpose, we protected the NH₂-terminus of Smac-ε by adding a hemagglu-

Smac-ε increases mammosphere formation

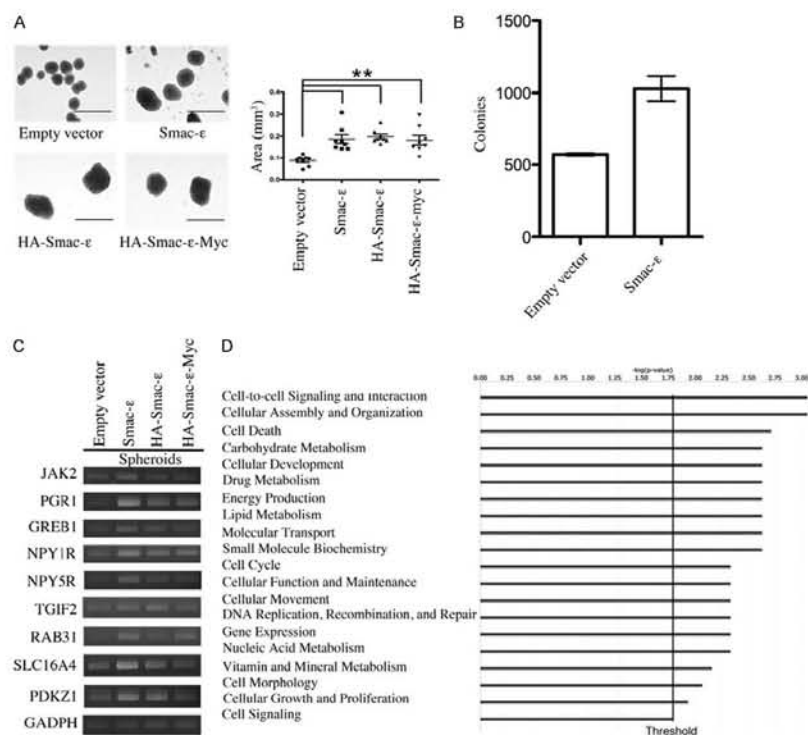


Figure 5. Smac-ε enhances mammosphere formation. **A.** MCF-7 cells stably transfected with Smac-ε, HA-Smac-ε, HA-Smac-ε-Myc or an empty vector were subjected to 3D culture conditions (described in the Methods section). Left, representative images from two independent experiments were selected, scale bar=1 mm. Right, the graph indicates the dimension of spheres generated from each transfection. ****P < 0.01**. **B.** Soft agar clonogenic assays of MCF-7 cells overexpressing Smac-ε. Graph shows number of colonies after six weeks in triplicate independent assays. **C.** Semi-quantitative RT-PCR validation analysis of nine differentially expressed genes of mammospheres expressing Smac-ε, HA-Smac-ε or HA-Smac-ε-Myc. **D.** Bio-function analysis of differentially expressed genes in Smac-ε mammospheres. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software was used to generate the molecular and cellular functions histogram. The significance referred in the histograms as $-\log(P\text{-value})$ was determined using the Fisher's exact test. The threshold was set at $P=0.05$.

tinin (HA) epitope coding sequence (HA-Smac-ε) and the COOH-termini of the isoform with a Myc tag (HA-Smac-ε-Myc). Transient expression of HA-Smac-ε produced a protein with increased molecular weight compared to over-expressed Smac-ε (Figure 3A). Carboxyl tagging further increased the molecular weight of the isoform (Figure 3A). Protecting both NH₂- and CO₂H-terminal ends of Smac-ε was enough to detect

this new isoform in its expected weight. The presence of additional shorter bands after tag addition could indicate us that Smac-ε was only partially protected from proteolytic cleavage. Furthermore, the incorporation of the HA-epitope sequence did not change the cellular localization of Smac-ε (Figure 2D). The above findings support the idea that Smac-ε undergoes proteolytic cleavage at both termini.

Smac-ε increases mammosphere formation

Table 1. Differentially-expressed genes in Smac-ε-expressing cells

Symbol	Name	Fold change
LYZ	Lysozyme	4.580
IGSF1	Immunoglobulin-superfamily, member 1	2.733
RAB31	RAB31, member RAS oncogene family	2.635
NPY5R	Neuropeptide Y receptor Y5	2.315
PGR	Progesterone receptor	2.269
SLC5A8	Solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8	2.070
DOK5	Docking protein 5	1.758
PDZK1	PDZ domain containing 1	1.348
NPY1R	Neuropeptide Y receptor Y1	1.218
FRK	Fyn-related kinase	1.263
UNC5C	Unc-5 homolog C (C elegans)	1.218
RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	1.122
BCL2	B cell CLL/lymphoma 2	0.974
SLC16A4	Solute carrier family 16, member 4	0.918
ZNF185	Zinc finger protein 185 (LIM domain)	0.915
TSPAN5	Tetraspanin 5	0.893
DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule	0.889
JAK2	Janus kinase 2	0.880
CACNA2D1	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	0.878
SHC4	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4	0.837
COX6C	Cytochrome c oxidase subunit VI C	0.779
GFRA1	GDNF family receptor alpha 1	0.735
MOCS2	Molybdenum cofactor synthesis 2	0.703
STC1	Stanniocalcin 1	0.702
MGAM	Maltose-glucoamylase (alpha-glucoamidase)	0.696
GREB1	Growth regulation by estrogen in breast cancer 1	0.637
TGIF2	TGFB-induced factor homeobox 2	0.585
KCNJ3	Potassium unwardly rectifying channel subfamily J, member 3	0.577
FLNB	Filamin B, beta	0.546

Symbol and name are HUGO Gene Nomenclature Committee approved. We selected an up-regulation cut-off ratio of 0.5 or more and a down-regulation cut-off of 0.5 or less and a false discovery rate of 0.5%.

We observed low protein expression levels of Smac-ε, regardless of the type of transfection (transitory or permanent). Since it has been demonstrated that proteasomal activity is the main mechanism for the regulation of short-lived proteins [14, 15], we sought to determine whether the proteasome might be implicated in the degradation of Smac-ε. For this purpose, cells stably transfected with plasmids encoding either Smac-ε or HA-Smac-ε were treated with a proteasome inhibitor (MG132). Proteasomal inhibition by MG132 caused an accumulation of both Smac-ε and HA-Smac-ε proteins (Figure 3B). In addition, endogenous Smac-ε protein was also stabilized by MG132 (Figure 3C).

These results strongly suggest that proteasomal activity is implicated in the degradation of Smac-ε in basal conditions.

Since ectopically-expressed Smac-ε protein is expressed at low levels due to mentioned mechanisms, we explored the possibility that specific stimuli might stabilize the protein to promote a specific function. For this purpose, Smac-ε expressing cells were exposed to different stimuli, and its levels were analyzed by western blotting. As shown in Figure 3D, exposure to TNF-α increased the expression of HA-Smac-ε, in the absence of mRNA regulation (results not shown).

Smac-ε neither interacts with nor modulates the protein expression of XIAP

Since mature Smac-α mediates its biological actions by interacting with IAP family members, we sought to determine whether Smac-ε was able to interact with them. For this, we tested a well-characterized Smac-α partner, XIAP [3, 5, 16]. Whereas Smac-α clearly interacted with XIAP (Figure 4A), HA-Smac-ε-Myc was unable to interact with it (Figure 4A). Interestingly, HA-Smac-ε-Myc associated with its cleaved variants but not with Smac-α (Figure 4A). The same pattern of interaction was showed by HA-Smac-ε (data not shown). The inability of Smac-ε to interact with Smac-α has also been described for another Smac isoform, Smac Smac δ [17]. Since it has been previously shown that Smac isoforms are able to increase the auto-ubiquitination and degradation of XIAP and c-IAP-1 [5,

18], we next analyzed whether Smac-ε could be altering the expression levels of these IAP family members. As shown in **Figure 4B**, the expression of Smac-ε or its tagged variants did not change XIAP expression. In accordance with this result, XIAP protein levels were not affected during the stabilization of HA-Smac-ε induced by the treatment with MG132 (**Figure 3B**). Additionally, we evaluated if Smac-ε or its tagged variants could induce changes in c-IAP1 protein levels. We could not detect any significant c-IAP1 protein regulation (data not shown). The above findings indicate that Smac-ε is unable to regulate the IAP family members as canonical Smac-α does.

Smac-ε increase mammosphere size

To assess a possible role of this new isoform in tumorigenicity, we used mammosphere assays. These assays provide a model for tumor development, cancer stem cell enrichment and, more interestingly, an accurate predictor of breast cancer cells tumorigenicity [19]. The inner layers of cells growing in three-dimensional spheres are exposed to hypoxic and nutrient-deprived conditions [20]. As the spheres continue to grow, hostile conditions at the center worsen and eventually lead to a limit to the sphere size. When we analyzed mammospheres derived from MCF-7 cells transfected with Smac-ε, we found a significant increase in their size (**Figure 5A**), pointing toward a more aggressive phenotype. In addition, we found that overexpression of the new Smac isoform induced an important increase in the clonogenic ability of MCF-7 cells (**Figure 5B**). Altogether, these results point toward a possible pro-tumorigenic effect of Smac-ε.

Smac-ε regulates distinct transcriptional networks

To further explore the mechanism by which the overexpression of Smac-ε regulates the growth of mammospheres, we performed whole-genome expression analyses of MCF-7 spheres derived from cells overexpressing the new isoform. In these assays, we identified 45 differentially expressed genes (**Table 1**). To validate these microarray results, semiquantitative RT-PCR was performed from randomly selected genes. We found a 100% concordant rate (**Figure 5C**). Additionally, we also confirmed the mRNA up-regulation of these genes in spheres

generated from HA-Smac-ε and HA-Smac-ε-Myc-transfected cells (**Figure 5C**). We found 9 enriched signaling networks, with the top two including cell survival, growth and proliferation (**Figure S1** in supplemental data). In addition, we found 20 overrepresented GO cellular processes, including cell-to-cell signaling, cell death and growth and proliferation, among others (**Figure 5D**). These results provide support to our previous mammosphere results. In the first of the two signaling networks, eleven molecules showed an increased expression: Janus kinase (JAK2), Filamin B (FLNB), neuropeptide Y Y1 receptor (NPY1R), NPY5R (neuropeptide Y Y5 receptor), SCL548 (sodium-coupled transporter 548), PGR (progesterone receptor), PAG1 (Associated RAS oncogene phosphoprotein family), and RHOBTB1 (Rho - related BTB domain containing 1) (**Figure S1** in supplemental data). The latter two are members of the RAS family, a crucial transduction pathway regulating cellular growth and carcinogenesis. The second network is also associated with cell growth and proliferation and contains four molecular loci deregulated in the microarray analysis: Fyn-related kinase (FRK), Growth Regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB 1), Growth Regulation by estrogen in breast cancer 1 (SHC4) and SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4 (**Figure S1** in supplemental data). Both networks are related to important transduction pathways such as NFκappaB, TGFβ 1, EGFR and ERKs, which together may favor cell growth. Interestingly, Smac-ε induced the transcriptional activation of estrogen-responsive genes (PGR, GREB1, PDZK1 and RAB31) (**Figure 5C**). The activation of the estrogen receptor (ER)-mediated transcriptional program has been associated with proliferation, metastasis and invasion [21, 22].

Discussion

In this study, we describe Smac-ε, a new alternatively spliced isoform of Smac, which lacks both IBM and MTS elements. As expected by this, we have experimentally determined that Smac-ε is a cytosolic protein. The mRNA of this new isoform is ubiquitously expressed in normal human tissues and cancer cell lines (**Figure 2B** and **2C**). Intriguingly, endogenous Smac-ε protein has a very short half-life, due to the activity of the proteasomal degradation pathway.

Smac-ε increases mammosphere formation

Cytosolic Smac-α relieves the negative regulation of caspases via its IBM [1-3, 5]. Previous studies assumed that the IBM was the only element in Smac-α that exerts biological effects. Molecules mimicking this IBM have been designed and are now being tested for clinical activity. Smac-α mimetics exert their functions by interacting with XIAP and other IAPs [23, 24]. Consistent with the findings described above, Smac-β and Smac-α mutant proteins lacking an IBM are unable to interact with IAPs. However, functional experiments demonstrated that IBM is dispensable for the induction of apoptosis [7, 8, 17, 25], pointing toward the presence of an unknown mechanism residing on Smac-α's COOH-terminus and/or IBM-proximal aminoacids. As expected, we demonstrated that Smac-ε is unable to associate with a classical member of the IAP family (Figure 4A). Our results are in concordance with previous reports indicating that mutation of IBM is enough to loss that ability [2, 3]. Interestingly, Smac-α with a mutated IBM is able to induce ubiquitination of IAPs independently of any physical interaction [5]. In that study, an artificial Smac mutant did not modify the half-life of ubiquitinated IAPs, although the biological relevance of this finding was not studied. These results are in accordance with our findings (Figure 4B).

Mammosphere culture has been widely used as an assay for propagating and analyzing cancer stem cells. Besides the utility for determining stem phenotype, it has been shown that the size of the spheres correlates with the ability of freshly-derived patient cancer cells to induce tumors in immunodeficient mice [19]. To study the biological effects of this novel Smac isoform, Smac-ε-transfected cells were grown as mammospheres. Unexpectedly, independently of any proteolytic cleavage, Smac-ε and its tagged variants were able to enhance the mammosphere formation ability of breast cancer cells, probably due to an increase in proliferation at higher cell density. To explain this phenomenon, we performed whole-genome microarray experiments from mammospheres expressing Smac-ε. Several pathways related to growth and proliferation were induced by the new Smac isoform. Interestingly, Smac-ε induced the transcriptional activation of estrogen-responsive genes. The activation of the estrogen receptor (ER)-mediated transcriptional program has been associated with prolifera-

tion, metastasis and invasion [21, 22]. It is notable that estrogen increases breast cancer cell survival via an IAP-dependent mechanism that can be inhibited by Smac-α [26], supporting the importance of the contribution of this gene. Analyzing all of the interacting proteins of Smac-ε might provide an insight into the molecular mechanisms responsible for these effects.

In the current study, we describe a new alternative splice variant from the Smac gene. Ectopic expression of this isoform was able to increase the growth of mammospheres by activating several transduction pathways in an IAP-independent process. Since it has been previously shown that mammosphere size was a better indicator of tumorigenicity than the content of cancer stem cells [19], the effect of Smac-ε is particularly interesting. Notwithstanding the results presented, the undetectable expression of the Smac-ε protein in non-stimulated cell lines raises the question of the exact relevance of this new isoform protein product during basal or physiological conditions. We also cannot exclude a possible additional non-coding function of the Smac-ε messenger RNA, as recent evidence has pointed toward a plethora of new biological functions for the recently discovered RNA universe [27]. Additional studies are required to resolve this issue. Nonetheless, our results could be used to infer a possible IBM-independent mechanism present in Smac-α and, in addition, it raises the question of a possible activity of Smac-ε well-expressed messenger RNA, even in the absence of a protein product.

Acknowledgements

Gustavo U Martinez-Ruiz was a recipient of a PhD fellowship provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant number 207097], and this study is part of his doctoral thesis from the Biomedical Sciences Doctorate Program, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank Jose Luis Cruz-Colin for his help in cell culture techniques.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Jorge Melendez-Zajgla, Functional Cancer Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur 4809, Col. Arenal Tepepan, Tlalpan 14610.

Smac-e increases mammosphere formation

Mexico, Tel: +52 55 53501900; E-mail: jmelendez@inmegen.gob.mx

References

- [1] Adrain C, Creagh EM and Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* 2001; 20: 6627-6636.
- [2] Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X and Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406: 855-862.
- [3] Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC and Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 2000; 408: 1004-1008.
- [4] Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X and Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 408: 1008-1012.
- [5] Yang QH and Du C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 16963-16970.
- [6] McNeish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M, Wheatley SP and Lemoine NR. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 2005; 302: 69-82.
- [7] Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M and Cohen GM. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol* 2001; 153: 221-228.
- [8] Kuai J, Nickbarg E, Wooters J, Qiu Y, Wang J and Lin LL. Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 14363-14369.
- [9] Yoon K, Jang HD and Lee SY. Direct interaction of Smac with NADE promotes TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 649-654.
- [10] Smyth GK, Michaud J and Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; 21: 2067-2075.
- [11] Chaloyrit S and Thongboonkerd V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Anal Biochem* 2009; 394: 249-258.
- [12] Mikalsen T, Johannessen M and Moens U. Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2513-2520.
- [13] O'Quin JB, Mullen RT and Dyer JM. Addition of an N-terminal epitope tag significantly increases the activity of plant fatty acid desaturases expressed in yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 83: 117-125.
- [14] Chondrogianni N and Gonos ES. Proteasome function determines cellular homeostasis and the rate of aging. *Adv Exp Med Biol* 2010; 694: 38-46.
- [15] Low P. The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172: 39-43.
- [16] Wist AD, Gu L, Riedl SJ, Shi Y and McLendon GL. Structure-activity based study of the Smac-binding pocket within the BIR3 domain of XIAP. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 2935-2943.
- [17] Burke SP and Smith JB. Monomerization of cytosolic mature smac attenuates interaction with IAPs and potentiation of caspase activation. *PLoS One* 2010; 5.
- [18] Fu J, Jin Y and Arend LJ. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 52660-52672.
- [19] Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L, Taylor-Papadimitriou J and Burchell JM. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R52.
- [20] Achilli TM, Meyer J and Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multicellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 1347-1360.
- [21] Saha Roy S and Vadlamudi RK. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. *Int J Breast Cancer* 2012; 2012: 654698.
- [22] Cortez V, Mann M, Brann DW and Vadlamudi RK. Extracellular signaling by estrogen: role in breast cancer progression and metastasis. *Minerva Ginecol* 2010; 62: 573-583.
- [23] Cossu F, Mastrangelo E, Milani M, Sorrentino G, Lecis D, Delia D, Manzoni L, Seneci P, Scolastico C and Bolognesi M. Designing Smac-mimetics as antagonists of XIAP, cIAP1, and cIAP2. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 162-167.
- [24] Sun H, Stuckey JA, Nikolovska-Coleska Z, Qin D, Meagher JL, Qiu S, Lu J, Yang CY, Saito NG and Wang S. Structure-based design, synthesis, evaluation, and crystallographic studies of conformationally constrained Smac mimetics as inhibitors of the X-linked inhibitor of apoptosis

Smac-ε increases mammosphere formation

- sis protein (XIAP). *J Med Chem* 2008; 51: 7169-7180.
- [25] Song Z, Yao X and Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 23130-23140.
- [26] Stanculescu A, Bembinster LA, Borgen K, Bergamaschi A, Wiley E and Frasor J. Estrogen promotes breast cancer cell survival in an inhibitor of apoptosis (IAP)-dependent manner. *Horm Cancer* 2010; 1: 127-135.
- [27] Consortium EP, Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, Gunter C and Snyder M. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; 489: 57-74.

Smac-ε increases mammosphere formation

Table S1. Primers used in this work

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Product lenght
PDZK1	CGGCGAGTCTGTGAAACCC	GAGCCTGGCAGACCCCGAAT	327
RAB31	GCCATCGCTGAAACAAGTGCG	GCGGCTGGCTTGCATGGTTG	234
PGR1	TTGAGGAGGAGGATGGCTCTGAGT	ATAAGGCGTGATTGAGAGGCAGGATA	285
NPY1R	CAGTCTGCTGGCTCCCTTAC	ATGCGACTGGGCTTGCTTG	297
NPY5R	GGTCCCCTACTGCTTTGAGA	ACAGGACATCATGCCCAACAA	259
SLC5A8	AGGATTTGATCTGTGGGGCG	CCAAATACGCTGAGTGCTGC	779
SLC16A4	ATTACCACAAGTCTACCTCATCCTC	AGAAAGGACAGCCATCCCAGC	221
JAK2	GGGAATGGCCTGCCTTACGA	ATCATGCCGCTACTGAGCAA	478
GREB1	ATCCTGCGGTCCAACAACCT	GCACACCAGGAGATGGTCCGG	331
TGIF2	AACGCCTACCCCTCAGAGCAGG	CGGCATGGAGCACACAGACAG	273
GAPDH	CCCCTTATTGACCTCAACT	TTGTCATGGATGACCTTGGC	396
SMAC-ε	CTTCTACTCCAGGCTGTTTA	CCTTCTCTGTGTTTCTGAC	369

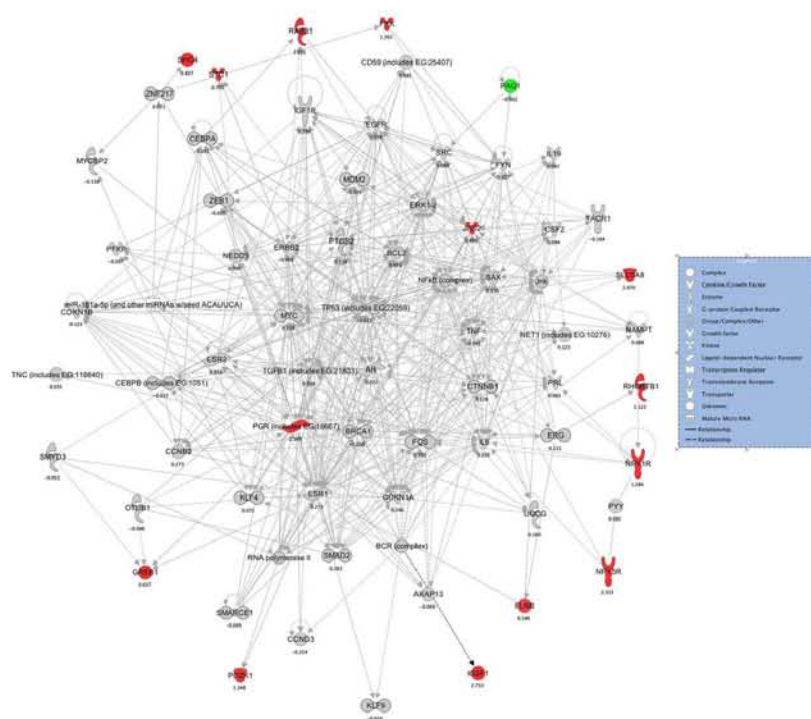


Figure S1. Gene network analysis by Ingenuity Pathway Analysis of a comparison between Smac-ε and control spheres. The two top pathways were merged. Direct or indirect interactions are shown by complete or dashed lines, respectively. Fold changes in log scales are shown below each symbol. The color scales goes from green (under-regulated) to red (up-regulated).

Review

Open Access

Role of Smac/DIABLO in cancer progression

Gustavo Martinez-Ruiz¹, Vilma Maldonado², Gisela Ceballos-Cancino¹,
Juan P Reyes Grajeda³ and Jorge Melendez-Zajgla*¹

Address: ¹Functional Cancer Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Periferico Sur 4124, Torre Zafiro II 5to piso, Col. Ex-Rancho de Anzaldo, Alvaro Obregon 01900, Mexico City, México, ²Molecular Biology Laboratory, Subdireccion de Investigacion Basica, Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico City, 14000, México and ³Medical Proteomics unit, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, 01900, México

Email: Gustavo Martinez-Ruiz - gustavobambam@gmail.com; Vilma Maldonado - vilmaml@gmail.com; Gisela Ceballos-Cancino - gceballos@inmegen.gob.mx; Juan P Reyes Grajeda - jreyes@inmegen.gob.mx; Jorge Melendez-Zajgla* - jorgezajgla@gmail.com

* Corresponding author

Published: 26 September 2008

Received: 14 August 2008

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2008, **27**:48 doi:10.1186/1756-9966-27-48

Accepted: 26 September 2008

This article is available from: <http://www.jeccr.com/content/27/1/48>

© 2008 Martinez-Ruiz et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI (Smac/DIABLO) is a proapoptogenic mitochondrial protein that is released to the cytosol in response to diverse apoptotic stimuli, including commonly used chemotherapeutic drugs. In the cytosol, Smac/DIABLO interacts and antagonizes inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), thus allowing the activation of caspases and apoptosis. This activity has prompted the synthesis of peptidomimetics that could potentially be used in cancer therapy. For these reasons, several authors have analyzed the expression levels of Smac/DIABLO in samples of patients from different tumors. Although dissimilar results have been found, a tissue-specific role of this protein emerges from the data. The objective of this review is to present the current knowledge of the Smac/DIABLO role in cancer and its possible use as a marker or therapeutic target for drug design.

Background

Cancer cells share six features that distinguish them from normal cells: Autocrine production of growth signals, inability to respond to anti-growth signals, sustained angiogenesis, limitless replicative potential, tissue invasion and metastasis, and apoptosis avoidance [1]. This type of cell death is fundamental for the maintenance of tissue homeostasis and immune system development [2]. Tumor cells are subjected to stressful internal and external environments, but nevertheless are resistant to apoptosis.

Apoptosis can be activated through two pathways: The extrinsic pathway (mediated by death receptors) or the intrinsic pathway (mediated by mitochondria). The former is activated in response to the engagement of lig-

ands such as CD95 or TNF- α with their receptors. This in turn induces the recruitment of adapter proteins (FADD, TRADD or RAIDD) to form the so-called death-inducing signal complex (DISC), which activates caspase-8. In turn, caspase 8 activates effector caspases by catalytic cleavage. The intrinsic pathway is induced by several different stimuli like antineoplastic drugs, hypoxia, irradiation, growth factor withdrawal and heat shock. These stimuli provoke the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and the release of proteins from the intermembrane space, such as cytochrome-c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 and AIF to the cytosol [3]. This release allows the assemble of a multiprotein complex, the apoptosome, that includes cytochrome-c, procaspase-9, dATP and cytosolic apoptosis inductor factor-1 (Apaf-1) [4]. The

apoptosome activates caspase-9, which in turn induces the activation of effector caspases-3, -6 and -7 [5]. The effector caspases cleave their cellular specific substrates and generate the typical morphology of apoptosis.

The activity of mature caspases is negatively regulated by their interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) [6,7]. This protein family is comprised by X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), cellular IAP-1 (c-IAP1), cellular IAP-2 (c-IAP2), Testis specific IAP (Ts-IAP), survivin, livin and BRUCE/Apollon [8]. The more studied member is XIAP, formed by three BIR (Baculoviral IAP Repeat) domains located in the NH₂-terminus and one RING (Really Interesting New Gene) domain in the CO₂H-terminus. The linker region between the BIR1 and BIR2 is implicated in the inhibition of caspase-3 and -7 whereas the BIR2 domain inhibits caspase-7 in a non-competitive manner [9]. Caspase-9 activity is inhibited by its association with the BIR3 domain of XIAP [10]. In addition, it has been determined that the RING domain of XIAP has E3 ubiquitin ligase activity toward caspases, provoking their degradation by the proteasome after their interaction [11,12].

Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) protein, also known as DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOW pI), is codified by a nuclear gene. Its protein presents an NH₂-terminus that serves as mitochondrial targeting signal (MTS). The mature form of Smac/DIABLO is originated by the cleavage of this signal. In the presence of apoptotic stimuli, mature Smac/DIABLO is released to the cytosol [13]. There, Smac/DIABLO has a pro-apoptotic effect that is mediated by its interaction with IAPs and the release of caspases from them. Structural data had established that Smac/DIABLO requires to form homodimers to interact with IAPs [14]. A particular NH₂-terminal motif, consisting of four amino acids, Ala-Val-Pro-Ile, is responsible for the interaction with IAPs [14,15]. It has been demonstrated that Smac/DIABLO interacts with the BIR2 and BIR3 domains of XIAP, allowing the release of caspase-3 [14] and caspase 9 [16], respectively. Caspase-9 has a similar tetrapeptide motif in its NH₂-terminus, so both compete for the BIR3 domain of XIAP [15]. Caspase-3 is released by the interaction between NH₂-terminus of Smac/DIABLO and BIR2 domain of XIAP [17].

Smac/DIABLO sensitizes tumor cells to die by apoptosis

Several studies have shown that overexpression of Smac/DIABLO sensitizes neoplastic cells to apoptotic death [18,19]. These findings prompted the development of peptides derived from NH₂-terminal of smac/DIABLO and small molecules that mimic Smac/DIABLO functions as therapeutic agents in order to induce death or to increase the apoptotic effect of chemotherapeutic agents.

Permeable NH₂-terminal peptides of Smac/DIABLO sensitize Hodgkin lymphoma cells to apoptosis mediated by B granzyme [18] and induce caspase-3 activation mediated by cytochrome-c [19]. Moreover, NH₂-terminal peptides of Smac/DIABLO fused to *Drosophila* antennapedia penetratin sequences enhance apoptosis mediated by different antineoplastic agents in breast cancer [20] and glioblastoma cell lines [21]. Similarly, a small Smac-mimic compound is able to increase the apoptotic effects of death factors such as TRAIL and TNF- α [22]. It is interesting to note that this small molecule induces apoptosis by itself in MDA-MB-231 breast cancer cells, which have high expression levels of XIAP and c-IAP1. In contrast, it only sensitizes MDA-MB-452 and T47D cells, which have low IAPs expression, to TRAIL or etoposide. [23]. Recently, it has been described that compounds that mimic Smac/DIABLO induce the activation of the NF- κ B pathway eliciting TNF- α -dependent apoptosis via caspase-8 activation [24]. This activation depends on c-IAP1 and -2 degradation [25]. This was replicated *in vivo* using a malignant glioma xenograft mice model, in which co-administration of Smac/DIABLO peptides and TRAIL sensitized glioma cells to apoptotic death and induced tumor regression [26]. In the same line, tumor regression was observed when nude mice with xenografted hepatocarcinoma tumors were locally treated with an adenovirus expressing Smac/DIABLO and 5-Fluorouracyl [27]. Taken together, these results show that the NH₂-terminal Smac/DIABLO derivatives and small molecules that mimic its function could be useful as adjuvant therapy in tumors with low levels of IAPs and as stand-alone therapy in tumors with high expression of IAPs. Further work is needed to address the potential use of these drugs in humans. Nevertheless, these studies show that particular expression levels of IAPs are key to the cellular response to these peptides or small molecules and underline the possible contribution of Smac/DIABLO levels to the intrinsic resistance to antineoplastic drugs.

Smac/DIABLO and cancer progression

Due to the importance of Smac/DIABLO in determining the sensitivity of cancer cells to apoptotic death induced by diverse stimuli, it is important to investigate if its expression levels could be negatively regulated during the initiation or progression of cancer. This information could be useful as a prognostic or therapeutic marker or to provide new targets for drug design. As mentioned before, it could be expected that cells with lower Smac/DIABLO and therefore, higher apoptosis resistance, should be selected during cancer progression. This selection would contribute to the higher intrinsic resistance in more advanced cancer stages. All the studies have been summarized in Table 1.

Table 1: Expression of Smac/DIABLO in different tumors.

Tumor	Smac/DIABLO expression	Molecule analyzed	Disease relationship.	Ref.
RCC	↓	mRNA.	Expression was low in patients with metastasis progress.	[29]
	↓	Protein.	The levels of expression inversely correlate with grade disease.	[30]
	-	mRNA and protein.	XIAP-Smac/DIABLO ratio increased from early to advance stages.	[28]
Lung cancer	↓	mRNA.	Patients with low expression had worse prognosis.	[31]
	↓	mRNA.	Smac/DIABLO expression diminished from normal testicular tissue to non-seminomatous germ cell tumours and stage III tumors.	[34]
TGCT	↓	mRNA.		
HCC	↓	mRNA and protein.	Tissues with HCC primary had low expression of Smac/DIABLO compared with normal organ.	[35]
CC	↑	mRNA.	Smac/DIABLO expression is independent of stage. In a subset of tumors Smac/DIABLO is expressed <i>de novo</i>.	[36]
	↑	Protein.	Higher expression in adenocarcinoma than squamous tumors and correlates with a marker of angiogenesis. There was not any correlation with grade disease or survival rates.	[37]
GA	↑	mRNA.	Smac/DIABLO expression was higher in gastric adenocarcinomas than in non-neoplastic gastric mucosa.	[38]
Lymphomas (NHL and HL)	-	Protein.	There was not difference in Smac/DIABLO expression between clinically indolent and aggressive NHLs.	Ren, Y. et al.*
Carcinomas and sarcomas	-	Protein.	Different tumors had distinct immunoreactivity against Smac/DIABLO.	Yoo, N.J. et al**

*Y. Ren, N. Akyurek, E. Schlette, G.Z. Rassidakis, and L.J. Medeiros, Expression of Smac/DIABLO in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Hum Pathol* 37 (2006) 1407-13., ** N.J. Yoo, H.S. Kim, S.Y. Kim, W.S. Park, C.H. Park, H.M. Jeon, E.S. Jung, J.Y. Lee, and S.H. Lee, Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *Apms* 111 (2003) 382-8. Abbreviations: RCC, Renal Cell Carcinoma; NHL, non-Hodgkin lymphoma; HL, Hodgkin lymphoma; HCC, Hepatocellular carcinoma; CC, Cervical cancer; GA, Gastric adenocarcinoma; TGCT, Testicular germ cell tumors; XIAP, X-linked IAP.

Inverse correlation between Smac/DIABLO expression and cancer progression

Two recent studies of Renal Cell Carcinoma (RCC) patients showed that Smac/DIABLO expression at both mRNA and protein level were not associated with stage or grade of tumor [28,29]. However, another study demonstrated a significant inverse correlation between Smac/DIABLO protein expression level and both stage and histologic grade of RCC [30]. Regardless of this discrepancy, a clear correlation with progression was made in the three studies: patients with metastatic disease had lower Smac/DIABLO levels than those with localized disease [28-30]. In addition, it was shown that patients that undergo radical nephrectomy for RCC with positive Smac/DIABLO expression had a longer disease-specific survival when compared with those with negative expression [30]. Moreover, RCC patients with low Smac/DIABLO expression had a four times higher risk to die than those with high expression [29].

Similarly, Sekimura et al have shown that Smac/DIABLO mRNA levels decreased significantly during lung cancer progression [31]. Since it has been shown that IAPs levels

are upregulated in non small cell lung cancer [32], this reduction should increase further the apoptotic threshold of these cells. As expected from these results, decreasing XIAP expression *in vitro* sensitized lung cancer cells to apoptosis induced by diverse stimuli [33].

It has also been shown that testicular germ tumors with more advanced malignant phenotype presented lower Smac/DIABLO expression levels [34]. Moreover, the XIAP-Smac/DIABLO ratio increased significantly in clinical stage III tumors when compared with stages I or II. In this study an inverse correlation between Smac/DIABLO expression levels and cancer progression was also demonstrated [34].

Finally, it has also been shown that Smac/DIABLO mRNA and protein expression is reduced in hepatocellular carcinoma (HCC) when compared with normal hepatic tissue [35]. This reduction directly correlated with progression. Moreover, in this study, the authors showed that the IAP survivin, increased in parallel with cancer progression [35]. All these studies showed that Smac/DIABLO expression inversely correlated with cancer progression, aggres-

Table 1: Expression of Smac/DIABLO in different tumors.

Tumor	Smac/DIABLO expression	Molecule analyzed	Disease relationship.	Ref.
RCC	↓	mRNA.	Expression was low in patients with metastasis progress.	[29]
	↓	Protein.	The levels of expression inversely correlate with grade disease.	[30]
	-	mRNA and protein.	XIAP-Smac/DIABLO ratio increased from early to advance stages.	[28]
Lung cancer	↓	mRNA.	Patients with low expression had worse prognosis.	[31]
	↓	mRNA.	Smac/DIABLO expression diminished from normal testicular tissue to non-seminomatous germ cell tumours and stage III tumors.	[34]
TGCT	↓	mRNA.		
HCC	↓	mRNA and protein.	Tissues with HCC primary had low expression of Smac/DIABLO compared with normal organ.	[35]
CC	↑	mRNA.	Smac/DIABLO expression is independent of stage. In a subset of tumors Smac/DIABLO is expressed <i>de novo</i>.	[36]
	↑	Protein.	Higher expression in adenocarcinoma than squamous tumors and correlates with a marker of angiogenesis. There was not any correlation with grade disease or survival rates.	[37]
GA	↑	mRNA.	Smac/DIABLO expression was higher in gastric adenocarcinomas than in non-neoplastic gastric mucosa.	[38]
Lymphomas (NHL and HL)	-	Protein.	There was not difference in Smac/DIABLO expression between clinically indolent and aggressive NHLs.	Ren, Y. et al.*
Carcinomas and sarcomas	-	Protein.	Different tumors had distinct immunoreactivity against Smac/DIABLO.	Yoo, N.J. et al**

*Y. Ren, N. Akyurek, E. Schlette, G.Z. Rassidakis, and L.J. Medeiros, Expression of Smac/DIABLO in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Hum Pathol* 37 (2006) 1407-13., ** N.J. Yoo, H.S. Kim, S.Y. Kim, W.S. Park, C.H. Park, H.M. Jeon, E.S. Jung, J.Y. Lee, and S.H. Lee, Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *Apms* 111 (2003) 382-8. Abbreviations: RCC, Renal Cell Carcinoma; NHL, non-Hodgkin lymphoma; HL, Hodgkin lymphoma; HCC, Hepatocellular carcinoma; CC, Cervical cancer; GA, Gastric adenocarcinoma; TGCT, Testicular germ cell tumors; XIAP, X-linked IAP.

Inverse correlation between Smac/DIABLO expression and cancer progression

Two recent studies of Renal Cell Carcinoma (RCC) patients showed that Smac/DIABLO expression at both mRNA and protein level were not associated with stage or grade of tumor [28,29]. However, another study demonstrated a significant inverse correlation between Smac/DIABLO protein expression level and both stage and histologic grade of RCC [30]. Regardless of this discrepancy, a clear correlation with progression was made in the three studies: patients with metastatic disease had lower Smac/DIABLO levels than those with localized disease [28-30]. In addition, it was shown that patients that undergo radical nephrectomy for RCC with positive Smac/DIABLO expression had a longer disease-specific survival when compared with those with negative expression [30]. Moreover, RCC patients with low Smac/DIABLO expression had a four times higher risk to die than those with high expression [29].

Similarly, Sekimura et al have shown that Smac/DIABLO mRNA levels decreased significantly during lung cancer progression [31]. Since it has been shown that IAPs levels

are upregulated in non small cell lung cancer [32], this reduction should increase further the apoptotic threshold of these cells. As expected from these results, decreasing XIAP expression *in vitro* sensitized lung cancer cells to apoptosis induced by diverse stimuli [33].

It has also been shown that testicular germ tumors with more advanced malignant phenotype presented lower Smac/DIABLO expression levels [34]. Moreover, the XIAP-Smac/DIABLO ratio increased significantly in clinical stage III tumors when compared with stages I or II. In this study an inverse correlation between Smac/DIABLO expression levels and cancer progression was also demonstrated [34].

Finally, it has also been shown that Smac/DIABLO mRNA and protein expression is reduced in hepatocellular carcinoma (HCC) when compared with normal hepatic tissue [35]. This reduction directly correlated with progression. Moreover, in this study, the authors showed that the IAP survivin, increased in parallel with cancer progression [35]. All these studies showed that Smac/DIABLO expression inversely correlated with cancer progression, aggres-

sive behavior, as shown by metastatic disease, and bad prognosis. These correlations could be due to an increased apoptotic threshold, which should allow cancer cells to withstand not only invasion and metastasis, but to provide a relative increased intrinsic resistance to chemo- or radiotherapy. Further *in vivo* experiments specific for each tumor should help to solve this question.

Direct correlation between Smac/DIABLO expression and cancer progression

Recently, our group analyzed the participation of Smac/DIABLO in cervical cancer patients. Surprisingly, we found that Smac/DIABLO expression did not correlate inversely with progression. As a matter of fact, normal cervix barely expressed the Smac/DIABLO RNA messenger. During cancer progression, a subset of cervical cancer samples expressed *de novo* this protein [36]. We could not find any correlation between Smac/DIABLO expression and stage or grade for both squamous cell carcinoma and adenocarcinoma [37]. However, higher immunostaining was directly associated with local recurrence in squamous cell carcinoma. We also established a positive correlation between Smac/DIABLO immunoreactivity and high microvascular density [37], which could be accounting for the recurrence results. More investigation is needed to clarify the relation between Smac/DIABLO and angiogenesis in cervical cancer.

A similar finding in gastric cancer patients supports these results [38]. Gastric adenocarcinomas showed a significant higher expression of Smac/DIABLO than non-neoplastic gastric mucosa [38]. However, no difference in the ratio XIAP-Smac/DIABLO between non-neoplastic gastric mucosa and gastric adenocarcinoma was found [38]. This discrepancy could be due to decrease in the expression of XAF1 (XIAP-associated factor-1) found in these samples [38]. XAF1 is a direct inhibitor of XIAP, so this decrease could be also be increasing the apoptotic threshold of these tumors [39]. Supporting these results, a recent report showed that a decrease of XIAP in gastric cancer cells increase the apoptotic response induced by cisplatin and mitomycin-c [40].

Analyzing a single protein such as Smac/DIABLO or a particular IAP in cancer samples, will only give a partial vision of the mitochondrial apoptotic threshold, since it is known that these proteins are regulated by themselves and, in a tissue-specific pattern, specific IAPs functions overlap. In the case of IAPs (Figure 1), although Smac/DIABLO is not able to degradate XIAP, it induces the ubiquitination and degradation of other members of the family, such as c-IAP1 and c-IAP2 [41]. In addition, a recently cloned Smac/DIABLO isoform, Smac3, induces the auto-ubiquitination and degradation of XIAP [42]. As mentioned before, another negative regulator of XIAP is XAF1.

This protein antagonizes the inhibitory activity of XIAP toward caspase-3 [39]. Similarly to IAPs, Smac/DIABLO is also regulated by IAPs family members (Figure 2). Livin is able to ubiquitinate and degrade Smac/DIABLO [43]. Also, in a reciprocal manner, XIAP, c-IAP1, c-IAP2 and Apollon induce the ubiquitination and degradation of Smac/DIABLO [11,44,45]. Although *in vivo* relevance has not yet been demonstrated for these mechanisms, a complicated scenario emerges from these studies, underlying the need for more research focusing not only in Smac/DIABLO protein and isoforms, but also in their interaction partners in a tissue-specific manner.

Conclusion

The balance of IAPs and Smac/DIABLO dictates the apoptotic response to microenvironment clues (e.g. invasion and metastasis) and therapy. Due to this, it is important to perform protein expression studies, which are more informative than mRNA expression analyses, to survey not only Smac/DIABLO but also IAP family members to establish the relevance of these molecules in cancer progression and as possible prognostic markers. Although there is much to learn, we believe that directed therapy aimed to inhibit IAPs functions could be more efficient in those cancers with IAP overexpression or low expression of Smac/DIABLO. Nevertheless, caution is needed in those tumors in which the Smac/DIABLO and IAPs association with progression and/or prognosis is not clear, such as cervical and gastric cancer.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GMR wrote the first draft, VM, GCC and JPRC contributed with specific sections, JM-Z reviewed the manuscript and wrote the final version. All authors read and approved the final manuscript.

List of abbreviations

Smac/DIABLO: Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI; IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; FADD: Fas Associated Death Domain; TRADD: TNF receptor associated-protein with death domain; DISC: Death Inducing Signal Complex; MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization; RING: Really Interesting New Gene; BIR: Baculovirus Inhibitor Repeat; MTS: Mitochondrial Targeting Signal; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis; AIF: Apoptosis inductor factor; cIAP1: cellular IAP-1; cIAP2: cellular IAP-2; Ts-IAP: Testis specific IAP; XAF1: XIAP-associated factor-1; RCC: Renal Cell Carcinoma; Omi: OmiHtrA2.

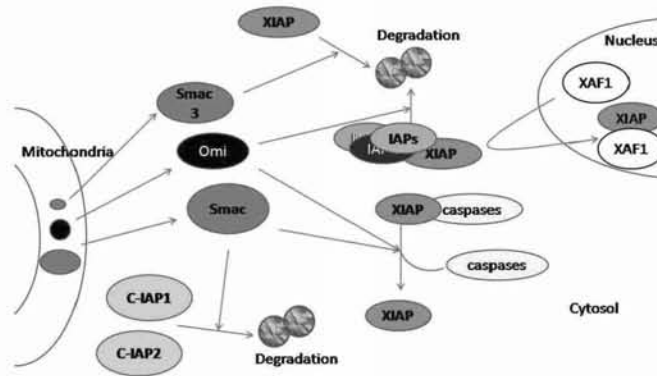


Figure 1
Smac/DIABLO and other proteins are able to regulate the expression levels of inhibitors of apoptosis (IAPs). Smac/DIABLO-induced downregulation of c-IAP1 and c-IAP2 is mediated by ubiquitination and proteasomal degradation. Smac3, a Smac/DIABLO isoform generated by alternative splicing, induces the auto-ubiquitination and degradation of XIAP by the proteasome. Omi/HtrA2 degrades XIAP, c-IAP1 and c-IAP2. Another negative regulator of XIAP is XAF1.

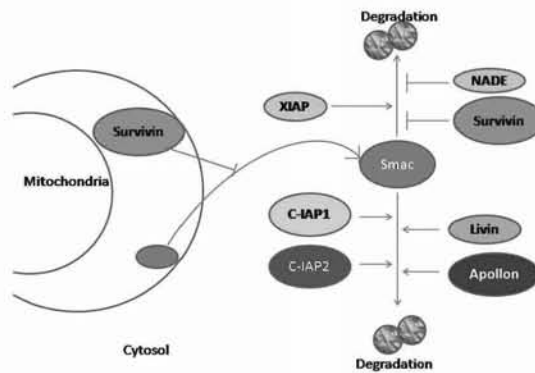


Figure 2
The inhibitors of apoptosis (IAPs) regulate expression levels of Smac/DIABLO. Smac: Smac/DIABLO. IAPs downregulate Smac/DIABLO by ubiquitination and proteasomal degradation. XIAP, c-IAP1 and c-IAP2 action is mediated by their RING domain. Smac/DIABLO degradation by XIAP is inhibited when the protein NADE is associated with them. Survivin inhibits the release of Smac/DIABLO from mitochondria after apoptotic stimuli. In addition, Survivin prevents Smac/DIABLO degradation in the cytosol.

Acknowledgements

GMR is supported by a CONACYT doctoral fellowship. JM-Z work is supported by grant 45728 by CONACYT.

References

- Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ: **Cell death in development.** *Cell* 1999, **96**(2):245-254.
- van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenberghe P: **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** *Cell Death Differ* 2002, **9**(10):1031-1042.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X: **An APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.** *J Biol Chem* 1999, **274**(17):11549-11556.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA: **Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.** *Cell* 1998, **94**(3):325-337.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** *Nature* 1997, **388**(6639):300-304.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* 1998, **17**(25):3247-3259.
- Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets.** *Apoptosis* 2007, **12**(9):1543-1568.
- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R: **X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes.** *J Biol Chem* 2001, **276**(29):27058-27063.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedel SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y: **Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9.** *Mol Cell* 2003, **11**(2):519-527.
- Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H: **X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO.** *J Biochem* 2005, **137**(2):125-132.
- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**(15):8662-8667.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X: **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.** *Cell* 2000, **102**(1):33-42.
- Chai J, Du C, Wu JW, Klyn S, Wang X, Shi Y: **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **406**(6798):855-862.
- Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y: **Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **408**(6815):1008-1012.
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, et al.: **A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis.** *Nature* 2001, **410**(6824):112-116.
- Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X: **A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo.** *J Biol Chem* 2007, **282**(42):30718-30727.
- Kashkar H, Seeger JM, Hombach A, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermohlen O, Heimlich G, Abken H, Kronke M: **XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack.** *Blood* 2006, **108**(10):3434-3440.
- Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, Jurgensmeier JM: **XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells.** *J Exp Med* 2003, **198**(2):341-347.
- Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH: **Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ.** *J Biol Chem* 2002, **277**(46):44236-44243.
- Mizukawa K, Kawamura A, Sasayama T, Tanaka K, Kamei M, Sasaki M, Kohmura E: **Synthetic Smac peptide enhances the effect of etoposide-induced apoptosis in human glioblastoma cell lines.** *J Neurooncol* 2006, **77**(3):247-255.
- Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG: **A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death.** *Science* 2004, **305**(5689):1471-1474.
- Bockbrader KM, Tan M, Sun Y: **A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells.** *Oncogene* 2005, **24**(49):7381-7388.
- Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, et al.: **IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis.** *Cell* 2007, **131**(4):682-693.
- Wang L, Du F, Wang X: **TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways.** *Cell* 2008, **133**(4):693-703.
- Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM: **Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo.** *Nat Med* 2002, **8**(8):808-815.
- Zhao J, Jin J, Zhang X, Shi M, Dai J, Wu M, Wang R, Guo Y: **Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo.** *Cancer Gene Ther* 2006, **13**(4):420-427.
- Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Wethkamp N, Liebmann J, Suschek CV, Guo Y, Gabbert HE, Gerharz CD, et al.: **Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas.** *Br J Cancer* 2004, **91**(7):1349-1357.
- Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Maghelli A, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S: **Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2008, **134**(5):543-550.
- Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubara H, Mikami K, Okihara K, Kawachi A, Bonavida B, Miki T: **Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(3):448-454.
- Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, Kobayashi Y, Sasaki H, Yano M, Fukui I, Fujii Y: **Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer.** *Oncol Rep* 2004, **11**(4):797-802.
- Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B: **Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2002, **128**(10):554-560.
- Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, Baird S, Korneluk RG, Durkin JP, Mayer LD, LaCasse EC: **Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(7):2826-2836.
- Kempkensteffen C, Jager T, Bub J, Weikert S, Hinz S, Christoph F, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M: **The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours.** *Int J Androl* 2007, **30**(5):476-483.
- Bao ST, Gui SQ, Lin MS: **Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006, **5**(4):580-583.
- Espinosa M, Cantu D, Lopez CM, De la Garza JG, Maldonado VA, Melendez-Zajgla J: **SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors.** *BMC Cancer* 2004, **4**:84.
- Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J: **High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer.** *BMC Cancer* 2006, **6**:256.
- Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, Heikaus S, Gabbert HE, Ramp U: **Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas.** *Diagn Mol Pathol* 2007, **16**(1):1-8.
- Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG: **Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(2):128-133.
- Tong QS, Zheng LD, Wang L, Zeng FQ, Chen FM, Dong JH, Lu GC: **Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells.** *Cancer Gene Ther* 2005, **12**(5):509-514.

41. Yang QH, Du C: **Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**(17):16963-16970.
42. Fu J, Jin Y, Arend LJ: **Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein.** *J Biol Chem* 2003, **278**(52):52660-52672.
43. Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, Qiu X, Heese K, Wu M: **Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(12):2079-2088.
44. Hu S, Yang X: **Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO.** *J Biol Chem* 2003, **278**(12):10055-10060.
45. Hao Y, Sekine K, Kawabata A, Nakamura H, Ishioka T, Ohata H, Katayama R, Hashimoto C, Zhang X, Noda T, et al: **Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**(9):849-860.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp





Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Cervical Cancer: From Public Health to Molecular Pathogenesis, 2015: 000-000
ISBN: 978-81-308-0000-0 Editors: Luis del Pozo-Yauner and Jorge Meléndez Zajjla

4. Cervical cancer and apoptosis

Gustavo Ulises Martínez-Ruiz, Karla Itzel Vázquez-Santillan
and Georgina Victoria-Acosta

*Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina
Genómica, D.F. México*

Abstract. Cervical cancer is a global health problem that affects women of all ages. Cancer is defined as a disease that shows the following seven features: insensitivity to growth-inhibitory signals, high proliferative capacity, production of autocrine factors that promote its proliferation, invasion, metastasis, evasion of apoptosis and, recently, chronic inflammatory processes. Data from epidemiological, clinical and experimental studies sustain the conclusion that the human papillomavirus (HPV) is the main causative agent of this cancer. This section of the book will discuss the effect of HPV on the evasion of the apoptotic event as predominant mechanism for the initiation and transformation towards a malignant phenotype.

Apoptosis

Apoptosis is a type of programmed cell death responsible for eliminating cells that have been damaged and the viability of which has thus been compromised. This cellular destruction process is essential in the normal development and homeostasis of multicellular organisms. Under normal conditions, apoptosis can be activated via two pathways: the intrinsic one (also known as the mitochondrial pathway) and the extrinsic one (known as

Correspondence/Reprint request: Dr. Gustavo Ulises Martínez-Ruiz, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, D.F. C.P. 14610, Mexico. E-mail: gustavobambam@gmail.com

the death receptor pathway). The intrinsic pathway may be activated by different agents such as ultraviolet radiation, antineoplastic agents, etc. These factors induce the loss of integrity of the outer mitochondrial membrane, allowing the translocation of mitochondrial proteins such as cytochrome-c, Smac/DIABLO, Omi/Htra2 and AIF-1 to the cytoplasm. Two groups of proteins orchestrate the apoptotic process: Bcl-2 family members and caspases.

The Bcl-2 family is involved in regulating mitochondrial permeabilization; the family is divided into two groups: pro-apoptotic proteins (Bax, Bak, Bid and Bok/Mtd) and anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl- α , Bcl-w, Mcl-1 and A1/Bfl-1). In basal conditions, caspases exist as inactive zymogens that are activated when cut by some cysteine protease (which can be themselves). Caspases can be grouped into two groups, the initiators (caspase-8 and -9) and the effectors (caspase-3, -7); as implied by their name, the first initiate the apoptotic process, while the latter are responsible for the degradation of specific substrates that induce the apoptotic phenotype. The cytochrome-c in the cytoplasm induces the formation of the apoptosome through the recruitment of Apaf-1 and pro-caspase-9, inducing the self-activation of caspase-9. This initiator caspase induces the activation of effector caspases by its cysteine protease activity, which leads to the apoptotic phenotype.

The coupling of a death receptor with its specific ligand activates the extrinsic pathway. For example, the union of CD95 by its ligand FasL induces the recruitment of the adapter protein fas-associated protein with death domain (FADD), by interactions between the death domains of both proteins. Caspase-8 is then recruited to the receptor through FADD. This complex is called the death inducing signaling complex (DISC) and it induces the self-activation of caspase-8. This caspase, in turn, induces the activation of effector caspases by its cysteine protease activity. It has been described that the extrinsic pathway may also induce activation of the intrinsic pathway, as Bid, a pro-apoptotic member of the Bcl2 family, is proteolytically cut by caspase-8, and is translocated to the mitochondria, inducing the activation of the mitochondrial pathway.

Apoptosis regulation

Apoptosis is regulated by different mechanisms; one of the most important is carried out by the family of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). Structurally, the members of this family have one to three BIR domains, which interact with and inhibit the active forms of caspases. Some IAPs have RING domains that present ubiquitin -E3 ligase activity,

contributing to the degradation of protein targets. The most important and studied protein of this family is XIAP, which has three BIR domains and one RING. XIAP is able to inhibit caspases -3, -7 and -9. The overexpression of IAPs has been observed in different cancers as a mechanism for evasion of apoptosis. It has been demonstrated in samples of cervical cancer patients that XIAP protein expression correlates with the recurrence of the disease [1]. The same study found that Survivin, another member of the IAP family, increases its expression in cells with a malignant phenotype [1]. These results are consistent with those described for different types of cancer, supporting the idea that the over-expression of IAPs is a mechanism to evade apoptosis [2]. Smac/DIABLO an interesting mitochondrial protein, is a negative regulator of IAPs that induces the release of caspases retained by IAPs and favors the apoptotic event. Different studies have demonstrated that this protein has a low expression in the samples from patients with different types of cancer [3-6]. Espinosa, M et al. determined that Smac/DIABLO is expressed *de novo* in a subset of samples of cervical cancer patients [7]. When the number of patient samples was increased, the presence of Smac/DIABLO was associated with a high percentage of recurrence in samples from squamous cervical carcinoma [8]. This result could be considered contradictory because Smac/DIABLO is a negative regulator of the activity of IAPs. A plausible explanation is that the increased expression of Smac/DIABLO may be due to a compensatory response to the possible increase of IAPs. However, this study did not evaluate the presence of some IAPs [8]. This motivated us to propose that both pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins must be analyzed in the same patient samples to obtain a comprehensive view of the samples in question [9]. Furthermore, it has been reported that Smac/DIABLO regulates other cellular processes independently of its ability to regulate apoptosis [10].

Etiological factors in cervical cancer

Worldwide, cervical cancer is the second most commonly diagnosed cancer in women. It has been estimated that 80% of the annual deaths attributed to this cancer occur in developing countries [11]. Many studies have been carried out to understand the etiology of cervical cancer since it was considered as a public health problem. Data from epidemiological studies have indicated that the infection by human papillomavirus (HPV) is associated with cervical carcinogenesis. However, HPV infections are benign and are resolved within a time span of 1-2 years without the application of any treatment. Because of these facts, HPV is conceptualized as a necessary but not sufficient agent to induce cervical cancer. The

presence of co-factors is critical to the establishment of the disease. These co-factors have an impact on the natural history of the lesion, inducing increased viral persistence and, consequently, its progression. These co-factors can be split into three groups: (A) related to the host, (B) related to behavior and (C) related to the environment. (Table 1).

Among the co-factors related to the host, the suppression of the immune system plays an important role. This has been clearly observed in individuals in which, due to different circumstances, the immune system is altered, such as HIV infected individuals [12], individuals undergoing an immunosuppressive treatment prior to organ transplantation [13], or pregnant women [14]. In this regard, it is reported that patients diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia that had a regression to a normal phenotype showed higher levels of CD4+ T cells, a reactivation of the immune system [15]. On the other hand, several studies have postulated another risk co-factor for cervical cancer associated with the host but with heritable characteristics. However, these studies conclude that cervical tumors are best explained based on a multifactorial mechanism, which involves a heritable component [16, 17].

As HPV infection is a sexually transmitted disease, the sexual behavior is intrinsically related to the natural history of the infection. Undoubtedly, having sexual intercourse with different sexual partners increases the risk of recurrent infections with different variants of HPV and of a benign lesion progressing to a malignant one [11]. In addition, it has been reported that there may be an increased risk of being infected with HPV the younger a person starts its sex life, although this claim is related to the greater likelihood of having more sexual partners during a lifetime [18]. It is worth noting that the risk increases when there are sexual contacts with persons at

Table 1. Co-factors involved in cervical cancer.

Factors related to the host	<ul style="list-style-type: none"> • Suppressed immune system. • Genetic predisposition.
Factors related to the conduct	<ul style="list-style-type: none"> • Multiple sexual partners. • Age at first intercourse • Parity • Risk behaviors (sexual encounter with persons at risk) • Oral Contraceptives • Steroidal hormones.
Environmental Factors	<ul style="list-style-type: none"> • Smoking.

risk, such as prostitutes. Moreover, because there are response elements to steroid hormones in the virus genomes, it is probable that the rate of viral gene transcription is influenced when hormones are present. In the case of HPV infections, the presence of steroid hormones influences the development of a malignant phenotype [19, 20]. It has been observed that samples from patients with high levels of steroid hormones are correlated with greater prevalence of HPV [21]. On the other hand, a positive relationship between parity and HPV has been observed in cervical cancers. It has been determined that women who deliver more than four children have a risk twice as high as those that conceive only one or none at all [22]. Hormonal, traumatic and immunological mechanisms have been proposed to explain this association [23].

Of the environmental factors, smoking is well understood as a risk factor for various cancers [24, 25]. Cigarette smoking has been taken by some studies as an independent risk factor for cervical cancer [26, 27]. The biochemical mechanism involved in smoking is thought to be related to DNA damage and mutation induction.

Infection with HPV and cervical cancer

Several epidemiological and experimental studies have confirmed that of the possible etiologic agents that have been associated with cervical cancer, HPV is the main cause of this cancer. The genome of the human papillomavirus is circular and double stranded, containing between 6800 and 8000 base pairs. This genome contains eight open reading frames divided into three groups, the encoding genes of early proteins (E1-E7), the encoding genes of late structural proteins (L1 and L2) and the non-coding region which contains structural elements that function in cis for the replication and transcription of the viral genome. The human papilloma virus has variants which are classified into two main groups, the high-risk ones (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82) and the low-risk (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81). The infection with high-risk HPV induces lesions that progress to high-grade epithelial neoplasms and finally develop carcinomas, while the infection with low-risk variants produces only genital lesions and rarely progress to a malignant phenotype. However, the lesions induced by the two groups can progress to cancer if they are recurrent and the co-factors described above are present.

In the early stages of infection, when the viral genome is episomal, the presence of the E5 protein of the HPV virus stimulates cell growth by interacting with the receptors of the epidermal growth factor B, derived from platelets, and of the colony stimulating factor 1 [28]. In an *in vitro* model of

cervical cancer, apoptosis was inhibited by E5 by means of an ubiquitination-dependent proteosomal degradation of the pro-apoptotic protein Bax, preventing the activation of the mitochondrial pathway [29]. Furthermore, by inhibiting the DISC assembly, E5 was able to decrease, via the extrinsic pathway, the activation of caspases -8 and -3 [30]. It has been observed that in the events in which the viral genome integrates into the host genome, the coding sequence of the E5 gene is deleted, which allows to infer that this gene is not required in late stages of the carcinogenic process by HPV infection.

Another protein that is deleted when the viral genome is integrated is E2. This protein has remarkable qualities; it inhibits the transcription of the viral genes E6 and E7, which are indispensable in the late stages of HPV infection. This action is mediated by the transcriptional activation domain located in the amino-terminal, and by the DNA binding domain located at the carboxyl-terminus [31]. It has been observed that the presence of this protein activates apoptosis through mechanisms that are dependent [32, 33] and independent of p53 [34, 35]. There is a difference between the E2 proteins of the high and low risk HPVs. The low risk proteins are constrained to a nuclear distribution, while the high-risk ones are also cytoplasmic due to CRM1, a carrier protein that shuttles proteins from the nucleus to the cytoplasm. In the cytoplasm, E2 is capable of inducing the activation of caspase-8, activating apoptosis [34]. However, it has been described that E2 is a substrate for the active form of caspases, so there is a negative feedback [36]. The deletion of E2 during the integration event is essential to the carcinogenic process induced by HPV.

The viral protein E6 has been linked to the carcinogenic process. E6 interacts with the p53 protein, inducing its degradation [37], which in turn creates chromosome instability since p53 checkpoint activity is lost when the DNA is damaged. E6 protein stimulates the activity of telomerase, which is a ribonucleoprotein with polymerase activity that synthesizes telomeric sequence repeats and prevents telomere attrition. The protein is important but not sufficient for the immortalization of cells [38]. In addition, E6 increases cyclin-dependent kinase activity (CDK) [39], which could paradoxically be a permissive factor for apoptosis induction. Nevertheless, during apoptosis, E6 degrades Bak, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family [40, 41], thus inhibiting cell death. Additionally, E6 induces the degradation of FADD and of pro-caspase-8, inducing resistance to the activation of the extrinsic pathway by inhibiting the formation of DISC and, consequently, the activation of effector caspases [42]. However, malignancy does not depend on the expression of E6 alone, since the presence of E7 is also necessary.

E2F is a transcription factor required for the activation of genes involved in the S-phase of the cell cycle. This factor is negatively regulated by the retinoblastoma protein (RB), which is inhibited by phosphorylation. The oncoprotein E7 interacts and degrades the retinoblastoma protein (RB) [43, 44], releasing E2F from the repression exerted by RB, inducing cell proliferation [45]. The E7 protein is associated with the stimulation of cyclin A [46, 47] and cyclin E genes [39], key regulators of cell growth. However, it has been reported that E7 can also induce p53 [48] and p21 [49]-dependent apoptosis, although it has been reported that the presence of E6 and E7 of high-risk HPV induces the transcriptional activation of cIAP-2 (a member of the IAPs family). cIAP-2 up-regulation is needed to protect cells from TNF- α -induced cell death [50]. E7 is able to induce the activation of the NF- κ B pathway through p52 and, in turn, this cascade up-regulates cIAP-2 protecting these cells from apoptosis by TNF- α [51]. Paradoxically, the apoptotic effect of E7 seems to be associated with the activation of the extrinsic pathway. Yamato, et. al. determined that the presence of E7 promotes apoptosis by TNF- α or TRAIL [52]. Further studies are needed to resolve this discrepancy. Additionally, the actions of E6 and E7 have been described as complementary in the sense that the inhibitory cellular mechanisms induced by the presence of a viral oncoprotein are supported by the actions of the other oncoprotein and vice versa. For example, the presence of INK4a inhibits the activity of E6, but E7, due to its stimulatory activity on cyclins, eliminates this regulatory mechanism. On the other hand, E7 can induce p53-dependent apoptosis, which is inhibited by the effect of E6 on p53 and the members of the apoptotic pathway mentioned above. Finally, the contribution of the rest of the viral proteins of HPV to the apoptotic event has not been clearly elucidated.

IAPs and cervical cancer

The evasion of apoptosis by over-expression of the members of the IAPs family is a mechanism that has been described for various types of cancer. The same situation has been observed in cervical cancer (Table 2). The survivin protein is a member of the IAPs family. This protein is expressed during the G2/M phase of the cell cycle. The antiapoptotic effects of survivin are mediated through the inhibition of caspases -3 and -7 [53, 54]. Additionally, this protein interacts with the microtubules of the mitotic spindle, being required for the mitotic checkpoint as part of the chromosomal passenger complex. Interestingly, survivin has been detected in human fetal tissues [55, 56] and in different types of neoplasia, but it is

Table 2. Expression of various IAPs and cervical cancer. IH, Immunohistochemistry, CI, immunocytochemistry, CIN, cervical intraepithelial neoplasia.

IAP	Detection method	IAP expression/malignant phenotype	Ref.
Survivin	IH	Co-localization of HPV and survivin in patient samples.	[58]
	IH	Expression of survivin correlates lesions larger than 4 cm, lymph vascular space invasion and lack of response to initial therapy in patients.	[59]
	IH	Direct correlation between the increase in the degree of injury and was associated with the presence of high risk HPV.	[60]
	IH	Increased expression of survivin in cervical cancer with inverse relationship between the expression of caspase-3.	[61]
	IH	Survivin was detected in all cases with cancer. Patients with higher expression of survivin had an increase of 3.3 times die from cancer than those who had low levels. Study in samples from patients who received radiotherapy	[62]
	IH	The expression of survivin was detected in all samples from patients treated with radiotherapy. Expression cytoplasm and nucleus was detected.	[63]
	IH	The expression of survivin was overexpressed in cervical cancer samples. Correlated with levels of BCL2.	[64]
	IH	Increased survivin expression in advanced stages of the disease. The expression of survivin and telomerase were associated with the severity of the lesion	[65]
	IH	Overexpression of survivin in CIN and cervical cancer squamous type.	[66]
	IH	Increased expression of survivin was detected in cervical cancer than in cervicitis and CIN groups. Inverse relationship between the expression of survivin and caspase-3	[67]
IH	Overexpression of survivin was detected in more samples with increasing degree of malignancy. Survivin expression was directly and inversely proportional to the expression of Fas and FasL.	[68]	

Table 2. Continued

IAP	Detection method	IAP expression/malignant phenotype	Ref.
	IH	Overexpression of survivin was detected in more samples with increasing degree of malignancy. Survivin expression was directly and inversely proportional to the expression of Fas and FasL.	[69]
	IH, IC	Expression of survivin increases the likelihood of developing severe grades of CIN.	[70]
	RT-PCR	The presence of Survivin and Survivin and Survivin-Dex3 was higher in carcinomas.	[71]
XIAP	IH	None	[72]
	RT-PCR	Low expression of XIAP protein was associated with disease relapse	[1]
	IH	XIAP was associated with more aggressive phenotype and poorly differentiated samples. XIAP protein was detected in 20.6% of samples from normal epithelium with squamous type.	[73]
Survivin	IH	Survivin expression was associated with advanced clinical state of the disease and metastases. In cervical squamous carcinoma type, survivin expression was negatively associated with caspase-3	[74]
c-IAP1 y IAP2	RT-PCR	None	[1]
c-IAP2	IH	None	[72]
c-IAP2	IH	High expression of c-IAP2 in severe grades of CIN, in poorly differentiated tumors. Direct correlation was detected between the expression of c-IAP2 and NFkB p65, and reverse the presence of caspase-3 in cervical cancer	[75]

barely expressed in the differentiated tissues. Two isoforms generated by alternative splicing of the messenger RNA of the survivin gene have been described, survivin-2B and Survivin-Dex3. The first retains 69 base pairs (bp) of intron 2, functioning as a cryptic exon, while the second loses exon 3, which has 118 bp. The expression of survivin-DEX3 has anti-apoptotic

potential, while Survivin-2B shows a reduction of the anti-apoptotic potential [57]. The expression of survivin is present in pre-cancerous and cancerous lesions, and is absent in normal tissue. This protein has been associated with a poor prognosis for patients with cervical cancer. XIAP is another interesting protein, the most important member of the IAPs. However, it has not been extensively studied in cervical cancer. Like other IAP family members, it has been found that XIAP confers resistance to various apoptosis-inducing agents such as antineoplastics, radiotherapy, and immunotherapy. The expression in cervical cancer of other IAP family members such as Livin, c-IAP1 and c-IAP2 has been analyzed (Table 2). Of the studies cited in this section, it is important to point out the one by the group of Indarti, J. et al., which analyzes the contribution of the expression of survivin as an additive risk factor for cervical cancer. With this integrative vision, they define a profile of those individuals who may be at risk of progressing to a more severe lesion. It is clear that this profile depends on the intrinsic characteristics of each population but is an example of the integration of various elements that have been presented in this chapter.

Caspases and cervical cancer

One of the main cancer hallmarks is the disruption of the critical balance of apoptosis and proliferation during carcinogenesis. As a consequence, damaged cells are not eliminated, predisposing the survival of these mutated cells and allowing them to participate in different selection processes that are necessary for the full tumorigenic phenotype. Initiator caspases are involved in triggering the intrinsic and extrinsic pathways of the apoptotic pathway. The importance of effector caspases is evident, since they degrade specific substrates which are proteins involved in basic cellular processes. Therefore, alterations in the expression of these caspases have an important role in the carcinogenic process. There are some studies that focus on the expression of caspases in cervical cancer. (Table 3). Interestingly, down-regulation of caspase-3 and caspase-9 seems to be clearly associated with worse clinical status. Contradictory, some studies had demonstrated a direct relationship between caspase detection and cervical cancer (including pre-cancerous lesions). It would be interesting to determinate if there were any change in IAPs protein levels that could counteract this increment.

Table 3. The relationship between caspases and cervical cancer. CIN, cervical intraepithelial neoplasia.

Caspase-	Direct relationship between status disease and caspase (expression or activity).	Inverse relationship between status disease and caspase (expression or activity).
3	<ul style="list-style-type: none"> Increases the severity of CIN [76]. Increased expression in cervical cancer than in the group of samples with cervicitis or CIN [67]. 	<ul style="list-style-type: none"> Undetectable in samples of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma type [77]. Low expression with increasing pathological grade and clinical status [78]. Decreased expression of high-grade CIN lesion to cervical carcinoma [76]. Decreases active caspase-3 expression in dysplasia and invasive cervical carcinoma [79]. Low expression in high-grade disease in advanced clinical status and lymph node metastasis [74].
9	<ul style="list-style-type: none"> Higher activity enzyme in low-grade CIN lesions than in controls [80]. 	<ul style="list-style-type: none"> Undetectable in samples of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma type [77]. Decreased enzyme activity in CIN and high-grade lesions greater decrease in cervical cancer [80].
6		<ul style="list-style-type: none"> Low expression with increasing pathological grade yestado clinical [78]. Decreased expression of high-grade CIN lesion to cervical carcinoma [76].
2 and 5	<ul style="list-style-type: none"> Enzyme activity increased in low-grade CIN [81]. 	
8	<ul style="list-style-type: none"> Increased enzyme activity in low-grade CIN lesions than in controls [80]. 	<ul style="list-style-type: none"> Inverse relationship between the expression of caspases and cervical cancer [80].

Reactivation of apoptosis as cancer therapy

Modulating the apoptotic event in cervical tumor cells is an option for controlling this disease. The development of small interfering RNAs (siRNAs) targeted to oncoviral proteins of HPV is a viable tool for preventing their evasion of apoptosis. This assertion has been successfully observed in *in vitro* models for E6 [82-85] and E7 [86, 87] activity. In addition, restoring the p53 pathway by nonsteroidal anti-inflammatory molecules [88] or by proteasome inhibitors [89, 90] has been proposed. Interestingly, immunotherapy gives us the opportunity to have prophylactic and therapeutic effects simultaneously. The development of vaccines of viral chimeric particles between the antigenic epitopes of E7 and L1 has met with success in cervical cancer mouse models by generation of both humoral

response and cell-mediated immunity [91]. Another approach is to fuse the DNA binding domain of the oncoprotein E2 to the catalytic domain of the endonuclease FokI. Endonuclease enzyme activity was detected in HeLa cells in the E2 binding sites in the integrated viral DNA of HVP18 [92]. Since effective treatment options are limited in advanced cervical cancer, the discovery of new targets and the development of new small molecules are needed for clinical testing and, finally, cancer cervical treatment.

Conclusion

It is well known the association between HPV and cervical carcinogenesis. In principle, HPV infections and premalignant lesions could be resolved without any treatment, but the presence of risk factors, as described above, allows the transition from pre-cancerous lesions to malignant tumor. HPV oncoproteins alter cellular homeostasis by diverse molecular mechanism that modify the apoptotic response. HPV directly or indirectly modulates protein levels of IAPs and/or caspases, prompting a cellular resistance to apoptosis in cervical carcinogenesis. HPV vaccines with prophylactic purposes are available to reduce disease incidence, however, when the disease is established, current therapeutic treatments are still ineffective. Understanding how HPV modulates apoptosis during disease progression will open the door to improve the designing of small molecules to target the disease.

References

1. Espinosa M, Cantu D, Herrera N, Lopez CM, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J: **Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer.** *BMC Cancer* 2006, **6**:45.
2. Gyrd-Hansen M, Meier P: **IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(8):561-574.
3. Mizutani Y, Katsuoka Y, Bonavida B: **Low circulating serum levels of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) in patients with bladder cancer.** *Int J Oncol* 2012, **40**(4):1246-1250.
4. Pluta A, Wrzesien-Kus A, Cebula-Obrzut B, Wolska A, Szmigielska-Kaplon A, Czernicka M, Pluta P, Robak T, Smolewski P, Wierzbowska A: **Influence of high expression of Smac/DIABLO protein on the clinical outcome in acute myeloid leukemia patients.** *Leuk Res* 2010, **34**(10):1308-1313.
5. Pluta P, Cebula-Obrzut B, Ehemann V, Pluta A, Wierzbowska A, Piekarski J, Bilski A, Nejc D, Kordek R, Robak T *et al*: **Correlation of Smac/DIABLO protein expression with the clinico-pathological features of breast cancer patients.** *Neoplasma* 2011, **58**(5):430-435.
6. Yan H, Yu J, Wang R, Jiang S, Zhu K, Mu D, Xu Z: **Prognostic value of Smac expression in rectal cancer patients treated with neoadjuvant therapy.** *Med Oncol* 2012, **29**(1):168-173.

7. Espinosa M, Cantu D, Lopez CM, De la Garza JG, Maldonado VA, Melendez-Zajgla J: **SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors.** *BMC Cancer* 2004, **4**:84.
8. Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J: **High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer.** *BMC Cancer* 2006, **6**:256.
9. Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JP, Melendez-Zajgla J: **Role of Smac/DIABLO in cancer progression.** *J Exp Clin Cancer Res* 2008, **27**:48.
10. Qiu W, Liu H, Sebastini A, Sun Q, Wang H, Zhang L, Yu J: **An apoptosis-independent role of SMAC in tumor suppression.** *Oncogene* 2013, **32**(19):2380-2389.
11. Castellsague X: **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.** *Gynecol Oncol* 2008, **110**(3 Suppl 2):S4-7.
12. Wang C, Wright TC, Denny L, Kuhn L: **Rapid rise in detection of human papillomavirus (HPV) infection soon after incident HIV infection among South African women.** *J Infect Dis* 2011, **203**(4):479-486.
13. Roka S, Rasoul-Roekenschaub S, Roka J, Kimbauer R, Muhlbacher F, Salat A: **Prevalence of anal HPV infection in solid-organ transplant patients prior to immunosuppression.** *Transpl Int* 2004, **17**(7):366-369.
14. Bandyopadhyay S, Chatterjee R: **HPV viral load determination during pregnancy as a possible cervical cancer risk.** *J Exp Clin Cancer Res* 2006, **25**(1):29-38.
15. Roccio M, Dal Bello B, Gardella B, Carrara M, Gulminetti R, Mariani B, Spinillo A: **HPV infection and intraepithelial lesions: comparison between HIV positive and negative women.** *Curr HIV Res* 2012, **10**(7):614-619.
16. Couto E, Hemminki K: **Heritable and environmental components in cervical tumors.** *Int J Cancer* 2006, **119**(11):2699-2701.
17. Vink JM, van Kemenade FJ, Meijer CJ, Casparie MK, Meijer GA, Boomsma DI: **Cervix smear abnormalities: linking pathology data in female twins, their mothers and sisters.** *Eur J Hum Genet* 2011, **19**(1):108-111.
18. Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM: **Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer.** *J Infect* 2013, **66**(3):207-217.
19. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM: **Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology.** *Int J Cancer* 2005, **117**(6):1007-1012.
20. de Villiers EM: **Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma.** *Int J Cancer* 2003, **103**(6):705-708.
21. Kedzia W, Gozdziacka-Jozefiak A, Kwasniewska A, Schmidt M, Miturski R, Spaczynski M: **Relationship between HPV infection of the cervix and blood serum levels of steroid hormones among pre- and postmenopausal women.** *Eur J Gynaecol Oncol* 2000, **21**(2):177-179.

22. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX: **Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.** *Lancet* 2002, **359**(9312):1093-1101.
23. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N: **Environmental co-factors in HPV carcinogenesis.** *Virus Res* 2002, **89**(2):191-199.
24. Brinton LA, Schairer C, Haenszel W, Stolley P, Lehman HF, Levine R, Savitz DA: **Cigarette smoking and invasive cervical cancer.** *JAMA* 1986, **255**(23):3265-3269.
25. La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Fasoli M, Gentile A, Tognoni G: **Cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia.** *Am J Epidemiol* 1986, **123**(1):22-29.
26. Moralejo D: **Smoking increased risk of cervical cancer, independent of infection with high-risk HPV types.** *Evid Based Nurs* 2009, **12**(4):122.
27. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, Lenner P, Love A, Mahlamaki E, Thoresen S *et al*: **Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks.** *Am J Epidemiol* 2009, **169**(4):480-488.
28. zur Hausen H: **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(5):342-350.
29. Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhnn YS: **Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(3):402-410.
30. Kabsch K, Alonso A: **The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms.** *J Virol* 2002, **76**(23):12162-12172.
31. Giri I, Yaniv M: **Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains.** *The EMBO journal* 1988, **7**(9):2823-2829.
32. Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K: **The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2000, **275**(1):87-94.
33. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F: **Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis.** *The EMBO journal* 1997, **16**(3):504-514.
34. Blachon S, Bellanger S, Demeret C, Thierry F: **Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis.** *J Biol Chem* 2005, **280**(43):36088-36098.
35. Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, Thierry F: **Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells.** *Oncogene* 1999, **18**(32):4538-4545.

36. Demeret C, Garcia-Carranca A, Thierry F: **Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein.** *Oncogene* 2003, **22**(2):168-175.
37. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT: **Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes.** *J Virol* 1992, **66**(10):6237-6241.
38. McMurray HR, McCance DJ: **Degradation of p53, not telomerase activation, by E6 is required for bypass of crisis and immortalization by human papillomavirus type 16 E6/E7.** *J Virol* 2004, **78**(11):5698-5706.
39. Martin LG, Demers GW, Galloway DA: **Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E.** *J Virol* 1998, **72**(2):975-985.
40. Simmonds M, Storey A: **Identification of the regions of the HPV 5 E6 protein involved in Bak degradation and inhibition of apoptosis.** *Int J Cancer* 2008, **123**(10):2260-2266.
41. Thomas M, Banks L: **Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6.** *Oncogene* 1998, **17**(23):2943-2954.
42. Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ: **Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(11):1915-1926.
43. Boyer SN, Wazer DE, Band V: **E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway.** *Cancer Res* 1996, **56**(20):4620-4624.
44. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E: **The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.** *Science* 1989, **243**(4893):934-937.
45. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR: **Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(10):4549-4553.
46. Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P: **Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**(10):6537-6546.
47. Nguyen CL, Munger K: **Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes.** *Virology* 2008, **380**(1):21-25.
48. Jones DL, Thompson DA, Munger K: **Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis.** *Virology* 1997, **239**(1):97-107.
49. Stoppler H, Stoppler MC, Johnson E, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME, Iyer S, Rosenthal DS, Schlegel R: **The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis.** *Oncogene* 1998, **17**(10):1207-1214.

50. Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, Chen IS, Liu X: **Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis.** *Oncogene* 2005, **24**(32):5069-5078.
51. James MA, Lee JH, Klingelhutz AJ: **Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner.** *J Virol* 2006, **80**(11):5301-5307.
52. Basile JR, Zacny V, Munger K: **The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein.** *J Biol Chem* 2001, **276**(25):22522-22528.
53. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH: **An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7.** *Biochemistry* 2001, **40**(4):1117-1123.
54. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC: **IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.** *Cancer Res* 1998, **58**(23):5315-5320.
55. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC: **Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation.** *Am J Pathol* 1998, **152**(1):43-49.
56. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: **A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** *Nat Med* 1997, **3**(8):917-921.
57. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD: **Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties.** *Cancer Res* 1999, **59**(24):6097-6102.
58. Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, Shroyer KR: **Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma.** *Am J Clin Pathol* 2002, **117**(5):738-744.
59. Lee JP, Chang KH, Han JH, Ryu HS: **Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2005, **15**(1):113-119.
60. Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Costa S, Benedetto A, Casolati EA, Favalli C, Paba P *et al*: **Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer.** *Am J Clin Pathol* 2005, **124**(1):113-121.
61. Lu S, Zhang B, Wang Z: **Expression of survivin, cyclinD1, p21(WAF1), caspase-3 in cervical cancer and its relation with prognosis.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005, **25**(1):78-81.

62. Bache M, Holzapfel D, Kappler M, Holzhausen HJ, Taubert H, Dunst J, Hansgen G: **Survivin protein expression and hypoxia in advanced cervical carcinoma of patients treated by radiotherapy.** *Gynecol Oncol* 2007, **104**(1):139-144.
63. Suzuki Y, Oka K, Yoshida D, Shirai K, Ohno T, Kato S, Tsujii H, Nakano T: **Correlation between survivin expression and locoregional control in cervical squamous cell carcinomas treated with radiation therapy.** *Gynecol Oncol* 2007, **104**(3):642-646.
64. Yaqin M, Ruhnua L, Fuxi Z: **Analyses of Bcl-2, Survivin, and CD44v6 expressions and human papillomavirus infection in cervical carcinomas.** *Scand J Infect Dis* 2007, **39**(5):441-448.
65. Barbosa LC, da Silva ID, Correa JC, Ribalta JC: **Survivin and telomerase expression in the uterine cervix of women with human papillomavirus-induced lesions.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2011, **21**(1):15-21.
66. Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, Paul-Ng HO: **Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm.** *Indian J Pathol Microbiol* 2010, **53**(1):1-6.
67. Lu H, Gan M, Zhang G, Zhou T, Yan M, Wang S: **Expression of survivin, caspase-3 and p53 in cervical cancer assessed by tissue microarray: correlation with clinicopathology and prognosis.** *Eur J Gynaecol Oncol* 2010, **31**(6):662-666.
68. Wu SF, Zhang JW, Qian WY, Yang YB, Liu Y, Dong Y, Zhang ZB, Zhu YP, Feng YJ: **Altered expression of survivin, Fas and FasL contributed to cervical cancer development and metastasis.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012, **16**(15):2044-2050.
69. Lu D, Qian J, Yin X, Xiao Q, Wang C, Zeng Y: **Expression of PTEN and survivin in cervical cancer: promising biological markers for early diagnosis and prognostic evaluation.** *Br J Biomed Sci* 2012, **69**(4):143-146.
70. Indarti J, Aziz MF, Suryawati B, Fernando D: **Scoring system and management algorithm assessing the role of survivin expression in predicting progressivity of HPV infections in precancerous cervical lesions.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2013, **14**(3):1643-1647.
71. Futakuchi H, Ueda M, Kanda K, Fujino K, Yamaguchi H, Noda S: **Transcriptional expression of survivin and its splice variants in cervical carcinomas.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2007, **17**(5):1092-1098.
72. Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY, Wong LC, Ngan HY: **Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma.** *Eur J Cancer* 2001, **37**(9):1104-1110.
73. Burstein DE, Idrees MT, Li G, Wu M, Kalir T: **Immunohistochemical detection of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in cervical squamous intraepithelial neoplasia and squamous carcinoma.** *Ann Diagn Pathol* 2008, **12**(2):85-89.

74. Xu M, Xia LP, Fan LJ, Xue JL, Shao WW, Xu D: **Livin and caspase-3 expression are negatively correlated in cervical squamous cell cancer.** *Eur J Gynaecol Oncol* 2013, **34**(2):152-155.
75. Xia L, Xue XZ: **Immunohistochemical study of NF-kappaB p65, c-IAP2 and caspase-3 expression in cervical cancer.** *Oncol Lett* 2012, **3**(4):839-844.
76. Cheung TH, Chung TK, Lo KW, Yu MY, Krajewski S, Reed JC, Wong YF: **Apoptosis-related proteins in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix.** *Gynecol Oncol* 2002, **86**(1):14-18.
77. Arechaga-Ocampo E, Pereira-Suarez AL, del Moral-Hernandez O, Cedillo-Barron L, Rodriguez-Sastre MA, Castillo-Alvarez A, Lopez-Bayghen E, Villegas-Sepulveda N: **HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases.** *Gynecol Oncol* 2008, **108**(1):10-18.
78. Chung TK, Cheung TH, Lo WK, Yim SF, Yu MY, Krajewski S, Reed JC, Wong YF: **Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer.** *Cancer Lett* 2002, **180**(1):63-68.
79. Zanotti S, Fisseler-Eckhoff A, Mannherz HG: **Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2003, **89**(3):376-384.
80. Ekonomopoulou MT, Babas E, Mioglou-Kalouptsi E, Malandri M, Iakovidou-Kritsi Z: **Changes in activities of caspase-8 and caspase-9 in human cervical malignancy.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2011, **21**(3):435-438.
81. Babas E, Ekonomopoulou MT, Karapidaki I, Doxakis A, Betsas G, Iakovidou-Kritsi Z: **Indication of participation of caspase-2 and caspase-5 in mechanisms of human cervical malignancy.** *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2010, **20**(8):1381-1385.
82. Koivusalo R, Krausz E, Helenius H, Hietanen S: **Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs.** *Mol Pharmacol* 2005, **68**(2):372-382.
83. Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T, Nishihara T, Ikeda Y, Kizaki M, Yoshinouchi M: **Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA.** *Cancer Gene Ther* 2006, **13**(3):234-241.
84. Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, Nishihara T, Yamato K: **In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA.** *Mol Ther* 2003, **8**(5):762-768.
85. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F: **siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells.** *Oncogene* 2003, **22**(38):5938-5945.
86. Cun B, Song X, Jia R, Wang H, Zhao X, Liu B, Ge S, Fan X: **Cell growth inhibition in HPV 18 positive uveal melanoma cells by E6/E7 siRNA.** *Tumour Biol* 2013, **34**(3):1801-1806.

87. Jiang M, Milner J: **Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference.** *Oncogene* 2002, **21**(39):6041-6048.
88. Saha B, Adhikary A, Ray P, Saha S, Chakraborty S, Mohanty S, Das K, Mukherjee S, Mazumdar M, Lahiri L *et al*: **Restoration of tumor suppressor p53 by differentially regulating pro- and anti-p53 networks in HPV-18-infected cervical cancer cells.** *Oncogene* 2012, **31**(2):173-186.
89. Hougardy BM, Maduro JH, van der Zee AG, de Groot DJ, van den Heuvel FA, de Vries EG, de Jong S: **Proteasome inhibitor MG132 sensitizes HPV-positive human cervical cancer cells to rhTRAIL-induced apoptosis.** *Int J Cancer* 2006, **118**(8):1892-1900.
90. Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S: **Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells.** *Oncogene* 2001, **20**(34):4740-4749.
91. Sharma C, Dey B, Wahiduzzaman M, Singh N: **Human papillomavirus 16 L1-E7 chimeric virus like particles show prophylactic and therapeutic efficacy in murine model of cervical cancer.** *Vaccine* 2012, **30**(36):5417-
92. Horner SM, DiMaio D: **The DNA binding domain of a papillomavirus E2 protein programs a chimeric nuclease to cleave integrated human papillomavirus DNA in HeLa cervical carcinoma cells.** *J Virol* 2007, **81**(12):6254-6264.