



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- $\beta$  Y LA DINÁMICA DEL  
CITOESQUELETO DE ACTINA CONTROLAN LA ESTABILIDAD DE LA  
ONCOPROTEÍNA SKI.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

LIBB. Genaro Vázquez Victorio

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Marina Macías Silva  
(Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dr. José Vázquez Prado  
(Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas )

Dr. Jesús Chimal Monroy  
(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **RECONOCIMIENTOS**

### **DIRECCIÓN DE TESIS DOCTORAL**

Dra. Marina Macías Silva. IFC, UNAM.

### **COLABORADORES**

Dra. Guadalupe Reyes Cruz. CINVESTAV, IPN.

Dr. Marco Antonio Briones Orta. IFC, UNAM.

Biol. Marcela Sosa Garrocho (Técnico Académico). IFC, UNAM.

Mtra. Cassandre Caligaris Benoit. IFC, UNAM.

Mtro. Eugenio del Valle Espinosa. IFC, UNAM.

Mtra. Nelly Raquel González Arenas. IFC, UNAM.

### **COMENTARIOS Y SUGERENCIAS**

#### **Miembros del Comité Tutorial:**

Dr. José Vázquez Prado. CINVESTAV, IPN.

Dr. Jesús Chimal Monroy. IIB, UNAM.

#### **Jurado de Examen Doctoral:**

Presidente     Dr. Félix Recillas Targa. IFC, UNAM.

Secretario     Dr. Jesús Chimal Monroy. IIB, UNAM.

Vocal             Dr. Jesús Aguirre Linares. IFC, UNAM.

Vocal             Dr. Fernando López Casillas. IFC, UNAM.

Vocal             Dr. Ignacio Camacho Arroyo. Facultad de Química, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

### **ASESORIAS TÉCNICAS**

Dr. Fernando García Hernández. IFC, UNAM.

Dra. Ruth Rincón Heredia. IFC, UNAM.

Dr. Jean Alberto Castillo Badillo. IFC, UNAM.

Dra. Aída Gabriela Guzmán López. IFC, UNAM.

Med. Cir. Valentin Mendoza Rodríguez (Técnico Académico). IFC, UNAM.

Dr. Aurelio Hernández Méndez. IFC, UNAM.

### **UNIDADES DE SERVICIO**

Unidad de Imagenología. IFC, UNAM.

Unidad de Cómputo. IFC, UNAM.

Unidad de Biología Molecular. IFC, UNAM.

Taller de Mantenimiento. IFC, UNAM.

Bioterio. IFC, UNAM.

### **APOYOS**

Doctorado en Ciencias Biomédicas/Posgrado UNAM.

CONACYT

DGAPA/UNAM

### **COORDINACIÓN DE ENSEÑANZA**

Sara Elena Méndez Ibañez. Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi **Familia** que aún me enseña y aún me quiere; que me da libertad y me espera. A ellos que los amo y los llevo siempre.

A mi **Madre** por ser un ejemplo de virtud. Enseñandome que los seres humanos no necesitan ni de dioses ni de ciencias para hacer esas bellas acciones que conocemos con el nombre de virtud.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por dejarme soñar. Espacio donde se conoce las artes y las ciencias, lugar donde nace el aforismo “*Ars longa, vita brevis*”. Espacio donde se encuentra personas hermosas del presente y, del pasado, cuya existencia nos conmueve, nos motiva.

A todos mis **Profesores** que se han preocupado por mi formación académica y personal.

A mi tutora, la **Dra. Marina Macías Silva**, por aceptar y no cesar en la tarea de hacer de mi persona, un académico.

A mis **Amigos** que me embelezan la vida haciendome olvidar la soledad de la existencia; que me recuerdan lo que al final anhelo ser, un simple ser humano.

A mis amigos del **Laboratorio 225 Norte** (o del IFC), de todos estos años, que me alegraron el sinuoso camino de la investigación científica.

A todas las **Personas** que me han hecho sentir amor, alejando tantos miedos; que han creado en mí la necesidad de hacer bien a otros seres humanos, a la sociedad.

# ÍNDICE GENERAL

Página

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>8/9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 <i>Principios de la comunicación celular.</i>	<b>10</b>
1.2 <i>Membranas celulares (transporte vesicular y lipid rafts).</i>	<b>14</b>
1.3 <i>La vía de señalización del TGF-<math>\beta</math>.</i>	<b>17</b>
1.4 <i>Las protooncoproteínas Ski y SnoN.</i>	<b>21</b>
1.5 <i>Papel de las proteínas Ski y SnoN en la vía de señalización del TGF-<math>\beta</math>.</i>	<b>26</b>
1.6 <i>Regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.</i>	<b>32</b>
1.7 <i>La vía de señalización del TGF-<math>\beta</math> en hígado.</i>	<b>34</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>37</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1 <i>Objetivo general</i>	<b>40</b>
4.2 <i>Objetivos particulares</i>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 <i>La proteína Ski se localiza en la fracción insoluble al detergente Tritón X-100 en los hepatocitos.</i>	<b>41</b>
5.2 <i>La proteína Ski une a actina en el citoplasma.</i>	<b>51</b>
5.3 <i>Ski se localiza en membranas resistentes a detergente (DRMs) o lipid rafts.</i>	<b>54</b>
5.4 <i>Ski se localiza endosomas multivesiculares (MVE), y la señal de TGF-<math>\beta</math> promueve la localiza en estas estructuras.</i>	<b>57</b>
5.5 <i>La proteína Ski responde a los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina.</i>	<b>64</b>
5.6 <i>Los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR) regulan los niveles de la proteína Ski a través de los cambios en el estado del citoesqueleto de actina.</i>	<b>71</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
<b>7. MÉTODOS</b>	<b>83</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>90</b>
<b>9. APÉNDICES</b>	
9.1 <i>Materiales</i>	<b>100</b>

## INDICE DE FIGURAS

## Página

### INTRODUCCIÓN

Figura 1. La vía de señalización del factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ).	21
Figura 2. La familia de oncoproteínas Ski.	26
Figura 3. Regulación de la vía de señalización del TGF- $\beta$ por las proteínas Ski y SnoN.	29
Figura 4. Control de la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN.	32

### RESULTADOS

Figura 5. Los niveles de las proteínas Ski y SnoN aumentan durante el proceso de regeneración hepática.	43
Figura 6. La proteína Ski es degradada por la señal del TGF- $\beta$ y se localiza en la fracción insoluble a Tritón X-100 en los hepatocitos aislados y cultivados.	46
Figura 7. La proteína Ski se localiza en la fracción insoluble a Tritón X-100.	48
Figura 8. La señal del TGF- $\beta$ regulada negativamente a la proteína Ski en la línea celular C9.	50
Figura 9. La proteína Ski une a Actina en el citoplasma en la línea celular C9.	52
Figura 10. Localización subcelular de la proteínas Ski, Smad2 y Smad4 en la línea celular C9.	54
Figura 11. La proteína Ski se localiza en las membranas resistentes a detergente (DRM) o <i>lipid rafts</i> .	57
Figura 12. La proteína Ski colocaliza Flotilina-2 y GM130 en endosomas.	59
Figura 13. El transporte vesicular regula la estabilidad de la proteína Ski	61
Figura 14. La señal del TGF- $\beta$ acumula a la proteína Ski en los endosomas multivesiculares (MVE).	63
Figura 15. Los cambios en el citoesqueleto de actina regula la estabilidad de la proteína Ski en la línea celular C9.	66
Figura 16. La confluencia celular regula la estabilidad de la proteína Ski.	69
Figura 17. Las uniones intercelulares regulan los niveles de la proteína Ski en la línea celular C9.	71
Figura 18. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) controlan la Estabilidad de la proteína Ski.	74
Figura 19. El desmantelamiento de los lipid rafts no tiene efectos en la localización de Ski.	75

## ABREVIATURAS

<b>cAMP</b>	AMP cíclico
<b>Co-Smad</b>	Smad común
<b>DRM</b>	Membranas resistentes a detergente
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetraacético
<b>F-actina</b>	Filamentos de actina
<b>F/IBMX</b>	Forskolina/Isobutil-metil-xantina
<b>G-actina</b>	Actina Globular
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>Jasp</b>	Jasplakinolida
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LatB</b>	Latrunculina B
<b>LPA</b>	Ácido lisofosfatídico
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
<b>MVE</b>	Endosomas multivesiculares
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NDRM</b>	Membranas no resistentes a detergente
<b>p-S2</b>	Smad2 fosforilada
<b>PH</b>	Hepatectomía Parcial
<b>RIPA</b>	Solución de lisis para ensayos de radioinmunoprecipitación
<b>PPA</b>	Ensayo de protección de la proteínasa K
<b>ProtK</b>	Proteínasa K
<b>R-Smads</b>	Smads reguladas por el receptor
<b>ROCK</b>	Cinasa asociada a la proteína Rho
<b>S1P</b>	Esfingosina-1-fosfato
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>S2</b>	Smad2
<b>S4</b>	Smad4
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TNTE</b>	Tris-NaCl-Tritón-EDTA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>UPS</b>	Sistema ubiquitina proteosoma



## RESUMEN

La vía de señalización del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) controla múltiples procesos celulares como el crecimiento, la migración y la diferenciación, que se llevan a cabo desde el desarrollo temprano hasta en el mantenimiento de la homeostasis en los organismos adultos. Existe una regulación estricta de la señal del TGF- $\beta$  a diferentes niveles debido a la importancia de los procesos que regula; fallas en el funcionamiento de esta vía de señalización se han asociado a patologías tales como el cáncer o la fibrosis. Los miembros de la familia de oncoproteínas Ski, como las proteínas Ski y SnoN, regulan negativamente la señal del TGF- $\beta$  a través de la inhibición de los complejos transcripcionales de las proteínas Smad, los principales efectores de la señal del TGF- $\beta$ . Para contrarrestar la acción inhibitoria de estos correguladores, la misma señal del TGF- $\beta$  induce la degradación de estas proteínas a través de la participación de las proteínas Smad activas y del uso del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). En estudios de regeneración hepática en ratones, ha sido muy interesante observar que los niveles de las proteínas Ski y SnoN aumentan, aún cuando las proteínas Smad están activas durante todo el proceso de regeneración. En este trabajo nos interesamos principalmente en las señales que podrían estar modulando los niveles de expresión de la proteína Ski en los hepatocitos de rata. En un inicio, se observó que Ski se localizaba en la fracción insoluble al detergente Tritón X-100 en los hepatocitos aislados de hígados de rata en estado de quiescencia o en regeneración, así como en los cultivos primarios de hepatocitos y en la línea celular de hepatocito de rata, C9. También se determinó que la proteína Ski interactuaba con la proteína actina en el citoplasma. Posteriormente, se encontró que una fracción de la proteína Ski total se localiza en las membranas resistentes a detergente (DRM), o *lipid rafts*; probablemente donde Ski colocaliza con las proteínas CD63 y ALIX, que son proteínas específicas de endosomas multivesiculares (MVE). La señal del TGF- $\beta$  enriquece la presencia de Ski en este tipo de endosomas. Finalmente, se observó que la estabilidad de la proteína Ski es regulada por cambios en la dinámica del ensamblaje del citoesqueleto de actina, que comprenden tanto la estabilización de la actina monomérica (G-actina) como la formación de filamentos de actina (F-actina). La confluencia celular o la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son también señales que controlan los niveles de Ski. Se observó que las señales de algunos GPCRs conducen a la degradación de la proteína Ski, a través de la activación de la cinasa de ROCK o bien estabilizan los niveles de Ski a través del aumento de los niveles de AMP cíclico (cAMP). Este tipo de señales son antagónicas y parecen ser independientes de la señal del TGF- $\beta$ . En este trabajo se demostró claramente que una fracción de la proteína Ski se localiza en dominios del tipo balsas lipídicas (*lipid rafts*) uniéndose a actina en el citoplasma de los hepatocitos. Es muy probable que las señales que controlan la dinámica del citoesqueleto de actina pueden tener efectos importantes en la señal del TGF- $\beta$  en procesos tales como la regeneración hepática, a través de sus efectos en la regulación de la estabilidad de la proteína Ski.

## ABSTRACT

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway controls multiple cellular processes as growth, migration and differentiation occurring from early development to homeostasis maintenance in adult organisms. There is a tight regulation on TGF- $\beta$  signaling at different levels due to it has important effects on the cellular processes that may control. Failure on TGF- $\beta$  signaling is related to certain diseases such as cancer and fibrosis. Members of the Ski oncoprotein family, in particular Ski and SnoN proteins, regulate negatively the TGF- $\beta$  signaling pathway by inhibiting the Smad protein transcriptional complexes: the main effectors of the TGF- $\beta$  pathway. To avoid negative regulation, TGF- $\beta$  signaling induces the downregulation of these proteins through using activated Smad proteins and ubiquitin-proteasome system (UPS). In the liver regeneration process in mice, Ski and SnoN protein levels increase even though Smad protein activation occurs during all hepatic regeneration process. In this study, we aimed to find out the signals that could regulate Ski protein expression in rat hepatocytes. At first, we found that Ski protein localizes in a Triton X-100 insoluble fraction in isolated hepatocytes from quiescent or regenerating livers, as well as in primary cultured hepatocytes and in the C9 cell line that comes from rat hepatocytes. We also found that Ski interacts with actin protein in the cytoplasm. Subsequently, we identified that a fraction of total Ski protein localizes in detergent resistant membranes (DRM), also named lipid rafts, where Ski protein probably colocalizes with CD63 and ALIX proteins, which are specific proteins of multivesicular endosomes (MVE). TGF- $\beta$  signaling increases Ski protein localization in these endosomes. Finally, we identified that changes in the actin-cytoskeleton dynamics, defined as actin monomers (G-actin) stabilization or actin filaments (F-actin) formation, regulates Ski protein stability. Cell density and activation of the G protein-coupled receptors (GPCR) are signals that control Ski protein levels through actin-cytoskeleton dynamics. GPCR signals that direct Ski protein to degradation activate ROCK kinase whereas signals that increase the amount of cyclic AMP (cAMP) stabilize Ski protein. Both GPCR signals counteract each other and seem to be independent of TGF- $\beta$  signaling. All these data demonstrated clearly that a fraction of total Ski protein localizes in lipid rafts where it binds to actin protein in the hepatocytes. So that signals that control actin-cytoskeleton dynamics could have effects on the TGF- $\beta$  signaling pathway by regulating Ski protein stability in important processes such as liver regeneration.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### ***1.1 Principios de la comunicación celular.***

El estudio de la comunicación celular y la transducción de señales, es una de las áreas con mayor auge en la actualidad dentro de las áreas químico-biológicas. Entender procesos celulares como el desarrollo temprano de los organismos y el mantenimiento de su homeostasis nos permite desarrollar mejores estrategias para solucionar muchas de sus patologías (Hynes *et al.*, 2013). Este amplio campo de estudio se enfoca en dilucidar y entender de que manera las células se comunican entre sí y cómo reaccionan ante un medio extracelular definido. En la actualidad, existen un sin número de señales descritas que varían enormemente en sus características fisicoquímicas y en los mecanismos moleculares que utilizan estas para desarrollar una respuesta específica a una señal particular. Dentro de las características fisicoquímicas encontramos una amplia variedad que va desde señales de bajo o alto peso molecular, hidrofílicas o hidrofóbicas, solubles o adheridas a una membrana celular, etcétera. Por tanto, no es difícil imaginar que la célula requiere de un buen número de rutas o vías de señalización para reconocer e interpretar las señales que recibe.

A pesar de la complejidad en las maneras en que las células se comunican entre ellas, estas pueden ser agrupadas en 4 tipos generales de comunicación: autocrina, paracrina, endocrina y yuxtacrina. La comunicación autocrina se puede definir como la interpretación de una señal por un tipo celular particular que ha sido generada por las mismas células en un área no muy amplia dentro del mismo tejido. La señalización tipo paracrina requiere de un elemento adicional a la autocrina, este es la comunicación entre tipos celulares distintos en donde uno genera la señal que será asimilada e interpretada (sensada) por el otro tipo celular dentro de un espacio definido del tejido que comparten. Un ejemplo de comunicación paracrina se da en la sinapsis (neurológica), en la que esta involucrada la proximidad de dos neuronas (o células de la glia) y la secreción de moléculas (neurotransmisores) dentro de un espacio muy pequeño entre las dos terminales nerviosas provenientes de cada una de las neuronas. La comunicación endocrina, al igual que los dos anteriores tipos de comunicación, requiere de la síntesis y secreción de moléculas con características particulares (hormonas), pero a diferencia de las anteriores, una señal es sensada por un tipo celular que se encuentra en un tejido u órgano distante al sitio donde fue generada inicialmente la señal. Esta comunicación,

en particular, hace uso del sistema circulatorio de los organismos para poder viajar a través de todos los tejidos del mismo.

Las señales del tipo yuxtacrina requieren de un cierto grado de proximidad entre dos células en donde existe la unión entre sus componentes de la membrana plásmica. En las señales yuxtacrina, la interacción entre sus componentes de membrana tiene repercusiones para ambos tipos celulares; este tipo de señales las encontramos comúnmente en las células del sistema inmune (sinapsis inmunológica) y en células precursoras de las primeras etapas del desarrollo embrionario en donde la posición en que un tipo celular se encuentra, es crucial para su estado de diferenciación. También podemos definir como señalización yuxtacrina a la interacción directa entre los componentes de membrana de una célula y la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) circundante, generalmente generada por las células adyacentes o células estromales.

La forma en que una señal, o ligando, es reconocida por una célula requiere básicamente de una proteína que recibe el nombre de proteína receptora, o receptor. Debido a la variedad en la naturaleza química de los ligandos, la célula cuenta con proteínas receptoras presentes en la membrana plasmática y con proteínas receptoras intracelulares, o receptores nucleares, presentes en el citoplasma o en el núcleo (de donde reciben este nombre). Las moléculas de naturaleza hidrofílica como lo son los péptidos, proteínas y moléculas sintetizadas a partir de un aminoácido requieren de receptores embebidos en la membrana plasmática (transmembranales), ya que no pueden acceder, por sí mismas, a las proteínas intracelulares y, así transducir su señal específica. Los receptores nucleares son capaces de reconocer señales de naturaleza hidrofóbica. Estos ligandos, gracias a sus características químicas, son capaces de cruzar por sí solas la membrana plasmática y, de esta manera, tienen acceso a su receptor intracelular. Los receptores nucleares no sólo tienen la capacidad de reconocer a su ligando específico sino también realizan la función de factores transcripcionales en los promotores de genes específicos (genes blanco). Estos receptores son un puente directo entre la señal y sus efectos en la regulación transcripcional de genes blanco, regulación que tiene como finalidad una respuesta celular específica.

En el caso de los ligandos de naturaleza química hidrofílica, requieren de más elementos en sus mecanismos moleculares de señalización en comparación con los receptores nucleares. El ligando, al ser reconocido por su receptor de manera específica, provoca un cambio conformacional en la estructura del receptor o un cambio en las uniones con las proteínas que interacciona, formando así nuevos complejos. Esto permite que el receptor transduzca la señal al interior de la célula a través de una cadena de activación de varios elementos que llevan el nombre de proteínas efectoras. Esta activación, mediada por el ligando, desde el receptor hasta las proteínas efectoras (transducción de la señal) ocurre a través de cambios conformacionales o por modificaciones postraduccionales en las proteínas involucradas. Generalmente, las proteínas efectoras transducen esta activación a enzimas encargadas de amplificar la señal inicial utilizando la creación de los llamados segundos mensajeros químicos. No necesariamente la transducción de la señal lleva a cabo la creación de segundos mensajeros, en cambio, realiza una serie de fosforilaciones secuenciales que tiene el mismo fin de los mensajeros químicos, la amplificación de la señal. Es importante destacar que existen otras modificaciones postraduccionales adicionales a la fosforilación de las proteínas, como es el caso de la adición de la proteína ubiquitina (ubiquitinación) a las lisinas de una proteína en particular, que también participan en la activación secuencial de los efectores. Por último, la transducción de la señal concluye en la activación o represión de factores transcripcionales que regulan a los promotores de genes específicos y cuya regulación provoca un cambio particular en un proceso celular definido; aunque es importante destacar que muchas de las señales pueden regular un proceso celular específico sin el empleo de la regulación transcripcional.

En la actualidad, se conocen un sin número de ligandos específicos y sus receptores correspondientes. No obstante, se pueden agrupar muchas de las señales en alguna de las vías de señalización que están lo bastante bien descritas actualmente: 1) los receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, o GPCR), 2) los receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (RTKs, por sus siglas en inglés), y 3) los receptores con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina (ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$ ). Aunque existen otras vías de señalización estas son casos particulares, y debido a que por su complejidad salen de estos 3 grandes grupos.

Los GPCRs son los receptores más abundantes en la naturaleza y reconocen a un gran número de ligandos, por ejemplo, muchas de las hormonas descritas para el sistema endocrino en mamíferos usan GPCRs. Sus mecanismos moleculares de transducción varían entre sí pero, como su nombre lo indica, todos dependen de la activación de las proteínas G heterotriméricas (subunidad  $\alpha$  y las subunidades  $\beta\gamma$ ). Esta activación requiere la separación de las subunidades  $\beta\gamma$  de la subunidad  $\alpha$  la cual coordina un gran número de procesos dentro de los cuales podemos mencionar el crecimiento y la migración celular a través de la generación de segundos mensajeros químicos. No obstante, tanto algunos tipos de subunidades  $\alpha$  como de subunidades  $\beta\gamma$  pueden señalar independientemente de la formación de segundos mensajeros.

En el caso de la señalización por RTKs también existe un gran número de ligandos, todos son de naturaleza polipeptídica, y basan la transducción de su señal en una secuencia de fosforilaciones comenzando por una fosforilación cruzada entre sus receptores en los residuos de tirosina. Muchos de los factores de crecimiento descritos que promueven supervivencia, crecimiento y división celular (mitógenos) utilizan este tipo de señalización. Esto se debe a que activan cierto número de señales que son indispensables para los efectos arriba mencionados, y entre ellas encontramos las siguientes: las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cinasa de fosfoinositidos PI3K, junto con la cinasa AKT, y la proteína mTOR. Todas estas proteínas efectoras coordinan la activación de otros efectores y la posterior regulación transcripcional de muchos genes blanco. No obstante, es importante mencionar que estas cinasas no son particulares de los RTKs y pueden ser activadas por otras vías de señalización.

El grupo de ligandos que utilizan a los receptores con actividad de cinasa de serinas y treoninas, son señales que están presentes desde la formación y durante el mantenimiento (homeostasis) de un gran número de organismos. Puede decirse que junto con las vía de señalización del ligando Wnt y los ligandos FGF (factores de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés) son las principales señales que regulan los patrones principales en el desarrollo temprano y la manutención de los tejidos en un organismo adulto a través del control de la diferenciación y división de las células troncales, o *stem cells*. Sin embargo, estos ligandos participan en otros procesos fisiológicos tales como la regulación del sistema inmune. Más adelante hablaremos con detalle sobre los mecanismos de activación de estas vías de señalización.

## ***1.2 Membranas celulares (transporte vesicular y lipid rafts).***

El recambio de membranas es un proceso constante, dinámico e indispensable para todos los tipos celulares; es un campo de estudio amplio del cual sólo se tiene las bases y es necesario conocer más afondo. Dentro de las membranas celulares podemos estudiar su composición, localización y transporte. Las células utilizan sus membranas para movilizar muchas de sus moléculas estructurales como las proteínas y los lípidos a través de estructuras membranosas denominadas vesículas o endosomas. Este transporte se lleva a cabo dentro de la composición de la membrana misma o en su lumen (espacio dentro de la vesícula) donde puede aislar y almacenar distinta clase de componentes. Estas vesículas se forman y se movilizan a través del uso de un gran número de lípidos, como lo son los fosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol; y de proteínas como las clatrininas, caveolinas y proteínas del citoesqueleto de las que destacan la tubulina (microtubulos) y la actina (filamentos de actina). Los endosomas son el producto directo del recambio e intercambio entre las mismas membranas intracelulares provenientes de los distintos organelos o estructuras subcelulares, como lo son el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, y el intercambio de estos con la membrana plasmática.

Los endosomas se pueden clasificar en endosomas tempranos, tardíos, de reciclamiento y multivesiculares. Los endosomas tempranos son estructuras membranosas que surgen del proceso de endocitosis y permanecen cerca de la membrana plasmática hasta que alguna señal los relocalice nuevamente a la membrana plasmática o a los lisosomas; también pueden proceder del aparato de Golgi. La proteína EEA1 es un excelente marcador de endosomas tempranos debido a que une a estos endosomas exclusivamente a través de su dominio FYVE, dominio que reconoce al fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P); este lípido está enriquecido en los endosomas tempranos. Los endosomas tardíos son los endosomas que provienen de la región Trans del aparato de Golgi (GM130 es una proteína transmembranal exclusiva de esta región), aunque sus componentes son formados desde el RE, y puede fusionarse con endosomas tempranos, lisosomas o endosomas multivesiculares (MVE, por sus siglas en inglés). Los endosomas de reciclamiento son las vesículas que provienen de endosomas adyacentes a la membrana plasmática y vuelen a insertarse a la misma escapando así de su posible transporte al lisosoma. Los MVE son estructuras membranosas que tienen como función introducir (invaginar) una vesícula (membrana y lumen) dentro de otra vesícula que

tiene como destino final: la degradación de sus componentes a través del lisosoma o la salida al espacio extracelular dentro de estructuras llamadas exosomas donde las proteínas tetraspaninas, como la proteína transmembranal CD63, parecen jugar un papel importante en este transporte (Pols y Klumperman, 2009). El transporte de membranas ocurre también entre estructuras dentro del mismo organelo independiente de los mecanismos ya mencionados.

Existe un gran número de proteínas que coordinan el transporte y fusión de distintos tipos de endosomas. Las proteínas Rab, las proteínas de los complejos ESCRT y las proteínas SNARE son básicamente las proteínas encargadas de llevar a cabo estos procesos. Las proteínas Rab pertenecen a la superfamilia que lleva el mismo nombre y coordinan el direccionamiento de los endosomas. Dentro de esta familia destacan las proteínas Rab5, Rab7 y Rab11, por la relevancia de los procesos que regulan. La proteína Rab5 se localiza específicamente en los endosomas tempranos y es la encargada del transporte de este tipo de endosomas. La proteína Rab7 se localiza en los endosomas tardíos y endosomas multivesiculares donde desarrolla un papel importante en la correcta función de estas estructuras. La proteína Rab11 se localiza específicamente en los endosomas que regresan a la membrana plasmática. La correcta localización de las proteínas Rab depende mucho de la composición lipídica de los endosomas debido a que estas proteínas pueden distinguir entre diferentes tipos de fosfoinosítidos (Jean y Coger, 2012).

Los miembros de los complejos ESCRT son las proteínas encargadas de formar los endosomas multivesiculares. El correcto funcionamiento de estas proteínas depende de sus motivos de reconocimiento a ubiquitina (UBM), de reconocimiento a fosfolípidos de membrana, tales como el PI3P, o de sus dominios de interacción a proteínas Rab. Se han descrito cuatro complejos: el complejo ESCRT0 regula el destino de los endosomas dirigiéndolos hacia los MVE, las proteínas HRS y STAM son las proteínas principales involucradas en este complejo; el complejo ESCRTI recluta a los endosomas destinados a los MVE y está compuesto de varias proteínas, destacando la proteína TSG101; el complejo ESCRTII sólo es el puente entre el complejo I y III; el complejo ESCRTIII coordina el complicado proceso de insertar los endosomas a los MVE donde las proteínas accesorias VPS4 y ALIX tienen un papel destacado (Hanson y Cashikar, 2012).



Finalmente las proteínas de la superfamilia SNARE son las encargadas de llevar a cabo el importante papel de fusionar las membranas celulares en los procesos de recambio e intercambio de endosomas y en el proceso de exocitosis, que es la fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática. Se pueden clasificar sus más de 60 miembros en R-SNARE y Q-SNARE, dependiendo del aminoácido que conservan en su dominio de unión entre ellas, o en v-SNARE y t-SNARE por su localización en vesículas o en las membranas blanco (organelo o plasmática), respectivamente. El mecanismo de fusión entre membranas, básicamente, se requiere de la fuerte interacción de 4 proteínas SNARE (dos por cada membrana) y de la presencia del ión calcio (Chen y Scheller, 2001).

Las membranas celulares no solo sirven como medios de transporte a lo largo del citoplasma sino también como soporte en la formación de plataformas de interacción entre receptores y proteínas transmembranales en la membrana plasmática o componentes de señalización en las vesículas intracelulares. Estas plataformas se presentan en estructuras denominadas balsas lipídicas, o *lipid rafts*, cuyas membranas son ricas en fosfolípidos con cadenas laterales planas saturadas, en colesterol, en esfingolípidos y en lípidos glicosilados. Todos estos componentes forman estructuras compactas, debido a sus características de estructura química plana, capaces de formar grandes extensiones de membranas rígidas (plataformas). Un ejemplo de estas membranas rígidas son las caveolas. Las caveolas son estructuras de la membrana plasmática (invaginaciones) que dependen de los *lipid rafts* y cuya función es la de tener la mayor cantidad de membrana posible en un espacio reducido en donde estén presentes estructuras proteicas elaboradas como los complejos de señalización. Las caveolinas, que contienen un motivo de unión al colesterol, son las proteínas más abundantes en estas estructuras y las responsables de formar las caveolas. Muchas vías de señalización requieren de la función de la caveolina o de la correcta formación de los *lipid rafts* para lograr una señalización correcta o específica (Mayoral *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010). No obstante, las caveolas no son las únicas membranas ricas en *lipid rafts* sino también los endosomas encargados de dirigir a muchos de los receptores o de las proteínas efectoras hacia los lisosomas o al exterior de la célula a través de la formación de exosomas. En este tipo de endosomas encontramos proteínas como las

flotilinas, la chaperona HSP70 y la proteína actina (Rajendran y Simons, 2005; Théry *et al.*, 2002).

Existe una estrecha relación entre las vías de señalización y las membranas celulares. Los receptores transmembranales generalmente se agrupan dentro de la célula en endosomas tempranos poco después de la unión a su ligando a través del proceso de endocitosis. Estos receptores endocitados siguen tres destinos por lo general: 1) la continuación de la señal iniciada por la unión al ligando a través de la activación o reclutamiento de sus efectores; 2) el reciclamiento de los receptores después de señalar y separarse del ligando y 3) la degradación de los receptores o de los endosomas que los contienen a través de los MVE y lisosomas (Drobowski y De Robertis, 2012). Los receptores no son los únicos componentes de las vías de señalización que son regulados por el transporte vesicular, también ciertos efectores o cinasas son transportados en endosomas para su correcta función, su compartimentalización o su degradación (Chairoungdua *et al.*, 2010). Uno de los trabajos más sobresalientes relacionado con la regulación de las señales por transporte vesicular es el relacionado con el mecanismo de activación de la vía de señalización de WNT. El factor transcripcional  $\beta$ -catenina es constantemente degradado vía proteosoma mediante su fosforilación por la cinasa GSK3 $\beta$  y la interacción con la ligasa E3 de ubiquitina,  $\beta$ -TrCP; esta degradación es constante hasta que el ligando WNT une a su receptor e impide la formación de los complejos de GSK3 $\beta$  con  $\beta$ -catenina. Se han descrito muchas de las proteínas involucradas en los mecanismos básicos de activación de esta vía, sin embargo, quedaba aun la incógnita sobre como  $\beta$ -catenina lograba escabullirse de la actividad de GSK3 $\beta$ . Fue hasta que el grupo de investigación de De Robertis descubrió que para abolir completamente la fosforilación del factor transcripcional  $\beta$ -catenina era necesaria la subcompartimentalización de la cinasa GSK3 $\beta$  en los endosomas multivesiculares, así evitando por completo la interacción de esta cinasa con el factor  $\beta$ -catenina. Este reclutamiento de GSK3 $\beta$  en los MVE trae como consecuencia la acumulación de  $\beta$ -catenina. Además el arresto de la cinasa GSK3 $\beta$ , sorprendentemente, no sólo regula la estabilidad de  $\beta$ -catenina sino de muchas otras proteínas blanco de fosforilación de esta cinasa (Taelman *et al.*, 2010).

### ***1.3 La vía de señalización del TGF- $\beta$ .***

La vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) tiene un importante papel en una amplia variedad de procesos celulares tales como el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis, la migración, etcétera; procesos que se llevan a cabo desde el desarrollo embrionario hasta el mantenimiento de la homeostasis del organismo adulto. Debido a la importancia de la señal del TGF- $\beta$ , el funcionamiento incorrecto de esta vía se ha asociado a patologías como el cáncer, fibrosis y enfermedades autoinmunes (Siegel y Massagué, 2003). Esta citocina pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento relacionados al TGF- $\beta$ , donde los más de 50 miembros de esta superfamilia se dividen en dos grandes grupos: la subfamilia de las proteínas morfogénicas de hueso (Bone and morphogenic proteins, BMPs) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs, por sus siglas en inglés); y la subfamilia de Nodal, Activinas/Inhibinas y los TGF- $\beta$  (1, 2 y 3). Al igual que el TGF- $\beta$ , todos los miembros de esta superfamilia coordinan procesos muy diversos dentro del desarrollo embrionario y la homeostasis, así como la alteración de sus señales se asocia a un gran número de enfermedades (Wakefield y Hill, 2013).

El factor de crecimiento TGF- $\beta$  y los miembros de esta superfamilia utilizan el mismo mecanismo de señalización con diferencias particulares. En términos generales, el ligando TGF- $\beta$  en su forma dimérica requiere un complejo de cuatro receptores, con un solo pase transmembranal, para transducir su señal: dos receptores tipo I (T $\beta$ RI o Alk5) y dos receptores tipo II (T $\beta$ RII). En algunos tipos celulares, el TGF- $\beta$  puede utilizar el receptor tipo I que utilizan los mismos factores BMPs para su señalización, el receptor Alk1. El receptor tipo II para el TGF- $\beta$  es la proteína responsable de reconocer específicamente a los dímeros de los TGF- $\beta$ s. El TGF- $\beta$  (dímero) activo es reconocido directamente por dos moléculas de T $\beta$ RII y esta unión provoca un cambio conformacional en la estructura del ligando mismo; este cambio permite a dos moléculas del T $\beta$ RI reconocer al TGF- $\beta$  en complejo con los dos receptores T $\beta$ RII y así formar un complejo TGF- $\beta$ (2)-Alk5(2)-T $\beta$ RII(2) en la membrana plasmática. En algunos casos, el TGF- $\beta$  requiere de la participación de coreceptores tal como la proteína betaglicano. Se ha reportado que este complejo de ligando/receptores es internalizado en endosomas tempranos donde se ha sugerido que este paso es esencial para una correcta señalización de la vía. El receptor T $\beta$ RII tiene en su región

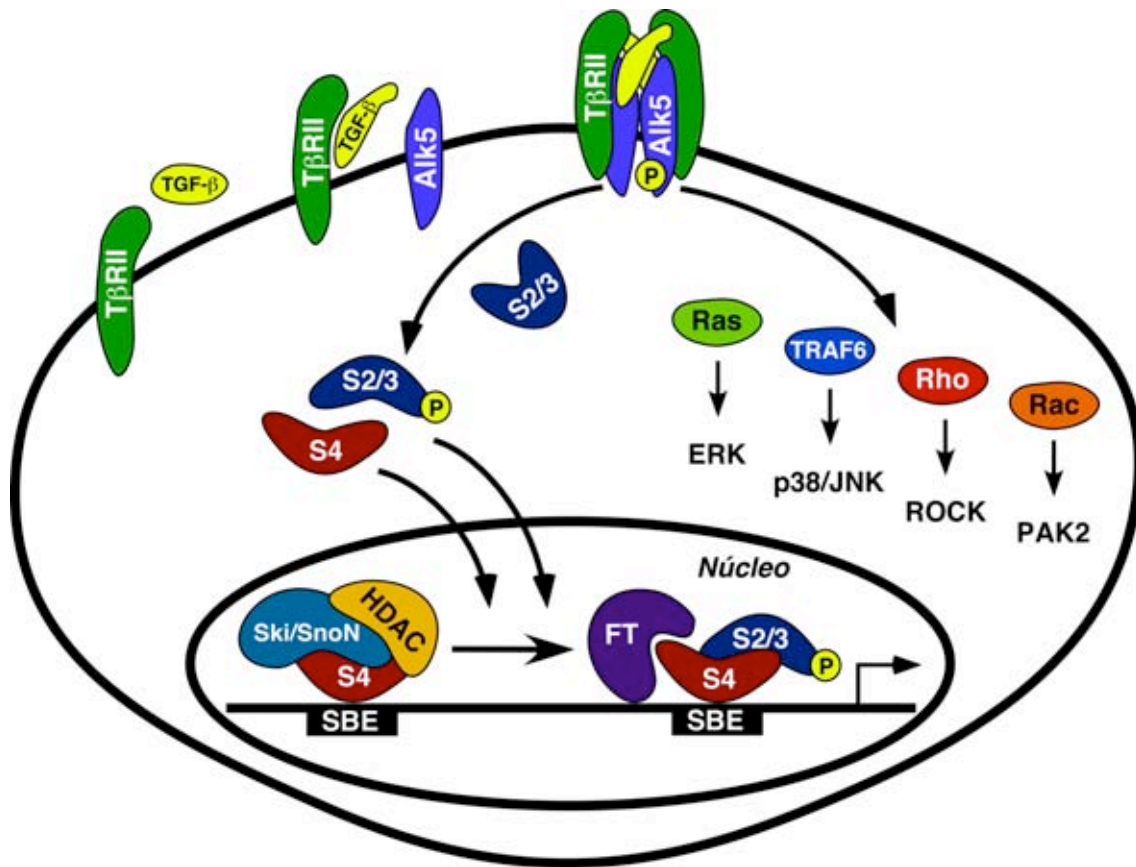
intracelular un dominio con actividad constitutiva de cinasa de residuos de treonina y serina. La formación del complejo T $\beta$ RII-Alk5 permite la fosforilación del receptor Alk5 en su secuencia GS rica en glicinas y serinas. Este cambio postraduccional es suficiente para la completa activación del dominio de cinasa del receptor T $\beta$ RI localizado en su región intracelular. Los sustratos de esta cinasa son las proteínas Smad reguladas por receptor, o R-Smads. En la vía del TGF- $\beta$  encontramos a las proteínas Smad2 y Smad3 y, en el caso particular de los factores BMPs/GDFs, a las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8. La fosforilación de las R-Smads en su dominio MH2 (C-terminal), por el receptor Alk5, les permite a estas proteínas translocar al núcleo y, simultáneamente acoplarse a un gran número de proteínas de donde destaca la interacción con la proteína Smad4, o Smad común (Co-Smad). La proteína Smad4, como su nombre lo indica, es compartida por todos los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Wakefield y Hill, 2013).

Las complejos formados de las posibles combinaciones entre las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4 unen directamente a los promotores de los genes destinados a ser blanco de la señal del TGF- $\beta$ . Las proteínas Smad3 y Smad4 poseen un motivo de unión débil al DNA (*DNA-binding hairpin*). La proteína Smad2 carece de esta motivo de unión a DNA a causa de splicing alternativo; este procesamiento del RNA que codifica para Smad2 no ocurre en las primeras etapas del desarrollo embrionario permitiendo a la proteína Smad2 unir directamente al DNA. A causa de que las proteínas Smad unen débilmente al DNA, estas proteínas requieren de unir a otros factores transcripcionales (así como de cofactores) para lograr una completa regulación, positiva o negativa, en los promotores de sus genes blanco (Massagué *et al.*, 2005). Esta característica de requerir cofactores específicos para la correcta regulación de sus genes blanco en parte explica la gran capacidad que tiene el TGF- $\beta$  para regular procesos muy diversos y, en algunos casos, antagónicos. Esto es evidente en el desarrollo embrionario donde la vía de señalización del TGF- $\beta$  coordina dos procesos distintos, la pluripotencia y la diferenciación, dependiendo de los diferentes complejos reguladores en los que participen las R-Smads (Massagué, 2012).

Adicional a la unión a cofactores, las proteínas R-Smad y Co-Smad también interaccionan con un gran número de correguladores transcripcionales (coactivadores o

correpresores) (Massagué *et al.*, 2005). Esto es debido a que las proteínas Smad no son capaces de afectar la transcripción *per se* (no reclutan a ningún componente del complejo mediador) sino que cambian el contexto de la cromatina permitiendo que sus genes blanco sean transcritos en el caso de una regulación positiva, o de tener una cromatina cerrada (reprimida) a la transcripción, en el caso de una regulación negativa. Dentro de los coactivadores que tienen una unión directa con las Smads encontramos a las proteínas p300/CBP y P/CAF. En el caso de los correpresores encontramos a las proteínas p107, un corregulador presente en la represión del gen *c-Myc*, así como a el correpresor TGIF y a las proteínas Ski y SnoN. Dentro de las proteínas que interaccionan con las Smads, destacan los miembros de la familia de la proteína Ski, correguladores transcripcionales que regulan negativamente la vía de señalización del TGF- $\beta$ .

En general, el mecanismo arriba descrito es conocido como la vía canónica del TGF- $\beta$ , sin embargo, se ha reportado que este ligando puede activar otros efectores independientemente de la activación de la proteínas Smad, a través de la actividad de cinasa del receptor Alk5, y estas tipo de señalización es conocido como vías alternas. Dentro de estas vías alternas destacan la activación de las proteínas G pequeñas de la familia de Rho, las proteínas Ras, Rho y Rac, y las MAPK activadas por estrés (p38/JNK) a través del reclutamiento de la ligasa E3 de ubiquitina TRAF6. Aun no están totalmente descritos los mecanismos de activación de estas vías alternas por el TGF- $\beta$  aunque se sabe que no se requiere de la actividad de cinasa del T $\beta$ RI.



**Figura 1. La vía de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).** En la activación de la vía canónica, el ligando TGF- $\beta$  es reconocido por el receptor tipo II de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII) y esta unión permite la interacción del receptor tipo I del TGF- $\beta$  (Alk5) con el TGF- $\beta$ . La formación del complejo de dos receptores T $\beta$ RII, dos Alk5 y dos TGF- $\beta$  (dímero) permite la activación (fosforilación) del receptor Alk5 por el T $\beta$ RII, y la fosforilación (P) de las proteínas Smad2/3. La activación de las proteínas Smad2/3 les permite translocar al núcleo e interactuar con la proteína Smad4 para regular la transcripción de múltiples genes blanco del TGF- $\beta$  a través de la unión a sus elementos de respuesta (SBE) dentro de los promotores. Estos promotores están reprimidos basalmente por correguladores transcripcionales como las proteínas Ski y SnoN y la función de las proteínas Smad activadas es reemplazar estos complejos represores. Las Smads generalmente necesitan la cooperación de factores transcripcionales (FT) adicionales para la completa activación de los genes. El ligando TGF- $\beta$  regula vías alternas (no canónicas) de supervivencia a través de la activación de Ras y TRAF6. El TGF- $\beta$  también regula procesos como la migración a través de la activación de las proteínas G pequeñas Rho y Rac.

#### ***1.4 Las protooncoproteínas Ski y SnoN.***

Los coreguladores transcripcionales Ski y SnoN son miembros de la familia de protooncoproteínas Ski. El primer miembro descrito para esta familia fue la oncoproteína v-Ski, esta proteína fue aislada de retrovirus de aves elaborados por el

Sloan Kettering Institute (de donde la proteína Ski toma su nombre) y cuya expresión causa la transformación, el crecimiento independiente de anclaje y la diferenciación celular a células de músculo esquelético, en células embrionarias de pollo y codorniz (Stavnezer *et al.*, 1986). La proteína v-Ski contiene una secuencia mínima de transformación celular que es la secuencia base para clasificar a los miembros de esta familia (Stavnezer *et al.*, 1989). Posterior a la identificación de v-Ski, y de su homólogo en pollo c-Ski, se identificó a la proteína homóloga en humano y la proteína relacionada Sno (Ski-related novel gene), o también llamada SnoN (Nomura *et al.*, 1989). Ambas fueron descritas como proteínas nucleares con capacidad transformante (Sutrave *et al.*, 1990; Colmenares *et al.*, 1991). Estas dos proteínas tienen dominios estructurales similares y una homología de secuencia de un 50% (Deheuninck y Luo, 2009).

Los miembros de esta familia poseen en su región transformante (N-Terminal) dos dominios conservados: el dominio Dachshund (DHD) y el dominio SAND (Sp100, AIRE1, NucP41/75, DEAF1). Ambos dominios poseen características de dominios de unión a DNA aunque no se conoce que algún miembro de esta familia tenga la capacidad de unir directamente al DNA (Nagase T *et al.*, 1990). Sin embargo, ambos dominios son sitios de unión a un gran número de proteínas con las que las proteínas Ski y SnoN interaccionan (Deheuninck y Luo, 2009). La región C-Terminal es la menos conservada entre los miembros de esta familia pero destaca el motivo *coil-coiled* presentes en las proteínas Ski y SnoN que les permite formar homodímeros y heterodímeros (Nagase T *et al.*, 1993; Heyman *et al.*, 1994). Al parecer esto es relevante debido a que la formación de homodímeros tiene una acción mucho más transformante que los heterodímeros en las células donde se coexpresan (Cohen *et al.*, 1999). En el caso particular de la proteína SnoN, se conocen tres isoformas alternativas (por *splicing*): SnoN2, SnoI y SnoA (Pearson-White, 1993; Pearson-White and Crittenden, 1997). La isoforma SnoN2 muestra una alta expresión en sistema nervioso central e hígado en roedores (Pelzer *et al.*, 1996; Macías-Silva *et al.*, 2002). Hasta el momento no se conoce ninguna isoforma alternativa de la proteína Ski. No obstante, existen posibles isoformas generadas probablemente a partir de modificaciones post-transcripcionales. También se han reportado otros miembros de esta familia, las proteínas Fussel-15 y Fussel-18 (SKOR1 y SKOR2, respectivamente) (Deheuninck y Luo, 2009).

Se han reportado 3 ratones *knockout* para la proteína SnoN; sin embargo entre ellos muestran fenotipos diferentes. En un de estos ratones *knockout* el embrión muere antes de la implantación demostrando su papel esencial en el desarrollo temprano (Shinagawa *et al.*, 2000). No obstante, la delección de un exón o la mutación en su promotor no causaron problemas aparentes en el ratón (Pearson-White *et al.*, 2003). Aunque sólo un ratón *knockout* mostró problemas en la formación del blastocisto, posteriormente se confirmaría el papel de SnoN en el mantenimiento de la pluripotencia al regular negativamente a los genes de diferenciación temprana (Tsuneyoshi N *et al.*, 2012). El ratón heterocigo para la proteína SnoN (*sno*<sup>-/-</sup>) mostró una tendencia a desarrollar linfomas de manera espontánea y también mostró sensibilidad a agentes carcinogénicas (Shinagawa *et al.*, 2000). En este ratón se reportó un mayor crecimiento en los fibroblastos embrionarios (MEFs, por sus siglas en inglés), y este efecto nuevamente se confirmaría por el grupo de K. Luo cuando demuestra que la proteína SnoN tiene un papel relevante en el proceso de senescencia de las MEFs junto a las proteínas PML para la estabilización de la proteína p53 (Pan *et al.*, 2009).

En el caso particular de la proteína Ski se han reportado 3 ratones *knockout* por tres grupos de trabajo independientes, y es muy interesante que los tres muestran un fenotipo altamente parecido. Un fenotipo general abarca defectos en la neurulación, craneofaciales, en el desarrollo del ojo y en el desarrollo del músculo esquelético (Berk M *et al.*, 1997; Shinagawa y Ishii, 2003). El trabajo desarrollado por el grupo de Stavnezer, correlaciona el fenotipo del ratón *knockout* de Ski con el síndrome asociado a la delección del cromosoma 1p36. Se demostró que estos pacientes tienen delecciones en las regiones cromosómicas donde el gen de Ski está ubicado, además de tener fenotipos similares a los ratones *knockout* (Colmenares *et al.*, 2001). Posteriormente, se reportó en dos estudios genéticos exhaustivos que las mutaciones en el primer exón del gen de *ski* son las causantes del síndrome de Shprintzen-Golberg (Doyle *et al.*, 2012; Carmignac *et al.*, 2012). El ratón heterocigo para la proteína Ski (*ski*<sup>-/-</sup>) muestra características muy similares al de la proteína SnoN, una susceptibilidad a agentes carcinogénicos y un mayor crecimiento en las MEFs (Shinagawa *et al.*, 2001). Aunque no se ha reportado alguna función en senescencia para la proteína Ski, se ha observado su presencia en estructuras nucleares (*nuclear speckles*) asociadas al procesamiento de RNA y senescencia. Ski parece también tener una función relevante en el metabolismo celular (Sutrave *et al.*, 1990); fibroblastos embrionarios que sobreexpresan a la proteína

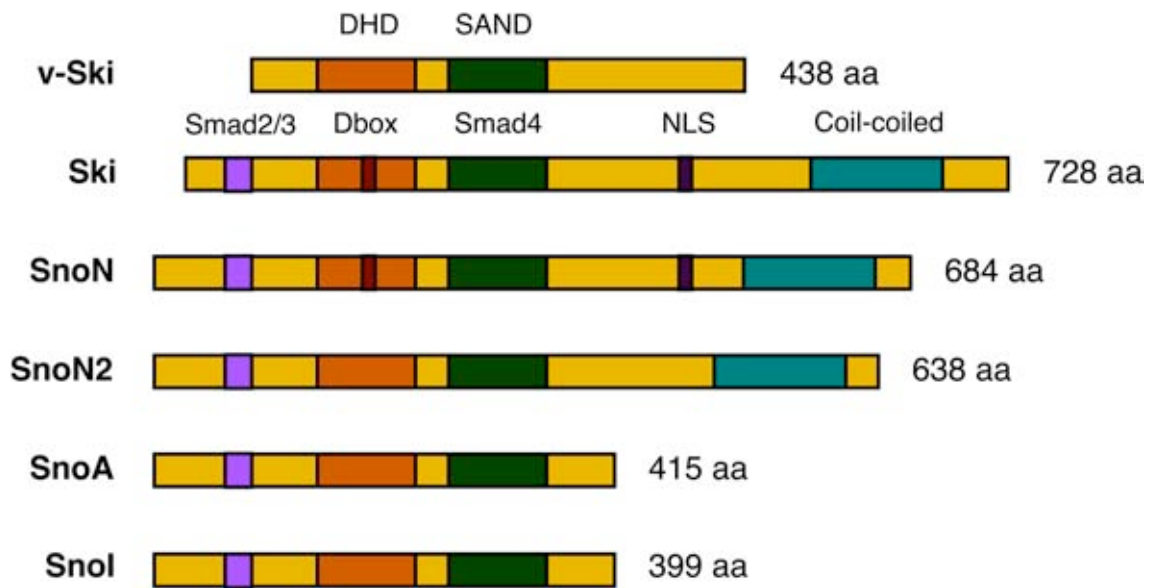


c-Ski pasan de un metabolismo dependiente de glucólisis a uno dependiente de la oxidación de ácidos grasos, además de aumentar la actividad, tamaño y número de las mitocondrias (Ye *et al.*, 2011). En estudios posteriores se muestra *in vivo* que la sobreexpresión de Ski genera un fenotipo de baja lipogénesis, un aumento de la oxidación de ácidos grasos y un aumento en la miogénesis (Leong *et al.*, 2010).

Existen ratones transgénicos para la proteína Ski, en los que la sobreexpresión de esta proteína conlleva a un aumento en la masa muscular del ratón específicamente en el tejido muscular esquelético; aunque los ratones presentan afectaciones en la estructura ósea (Sutrave *et al.*, 1990; Lana *et al.*, 1996). También los niveles de la proteína SnoN aumentan durante la diferenciación a células musculares en fibroblastos embrionarios (Mimura N *et al.*, 1996). Es también interesante que los niveles de las proteínas Ski y SnoN están elevados en células hematopoiéticas maduras (Pearson-White *et al.*, 1995). A pesar de la relación de los altos niveles de Ski y SnoN con la diferenciación hacia un tipo celular determinado sin la formación de tumores, se han reportado altos niveles de las proteínas Ski y SnoN en múltiples células y tejidos cancerosos. De estos destacan el melanoma, carcinoma esofágico escamoso, carcinoma colorectal, cáncer de mama y leucemia (Deheuninck y Luo, 2009); aunque no siempre correlacionan los altos niveles de Ski y SnoN con el grado de severidad del cáncer. Los estudios más destacados en este ámbito, son los realizados por dos grupos distintos: el grupo de K. Luo para la proteína SnoN en cáncer de mama (Zhu *et al.*, 2007) y el grupo de E. Medrano para la proteína Ski en melanoma (Chen *et al.*, 2009). En ambos estudios se eliminó a la proteína Ski o SnoN, respectivamente, observándose una reducción en el crecimiento del tumor *in vivo*. Sin embargo, para el caso particular de SnoN, a pesar de que el *knockdown* para esta proteína redujo el tamaño del tumor causó una mayor invasión (metástasis) en pulmón. Por lo tanto, parece que los niveles específicos de las proteínas Ski y SnoN juegan un papel importante en el crecimiento y el desarrollo del tumor, ya que comparten características de proteínas supresoras de tumores y oncoproteínas.

Las proteínas Ski y SnoN no tienen la capacidad de unirse al DNA ni poseen ningún dominio catalítico, no obstante, se conoce que estas proteínas interactúan con un gran número de factores o coreguladores transcripcionales, con los cuales forman parte de complejos reguladores de la transcripción. La función más conocida de las proteínas Ski y SnoN es la de correpresores transcripcionales; se ha reportado que Ski y SnoN pueden

formar complejos con represores transcripcionales tales como N-CoR, mSin3A, MeCP2, SMRT y HDACs (Nomura et al., 1999). Esto les permite ser reguladores negativos de algunas vías de señalización y de distintos factores transcripcionales. Dentro de los factores transcripcionales que unen encontramos a las proteínas Smad (R-Smad/Co-Smad), receptores nucleares, la proteína PML, entre otros. En el caso particular de SnoN se conoce que además de ser un fuerte regulador negativo de las proteínas Smad interacciona con la proteínas p53 para reprimir al gen que codifica para la  $\alpha$ -fetoproteína (Wilkinson DS *et al.*, 2005). Para la proteína Ski se conocen varias interacciones entre las que destacan: el receptor para ácido retinoico (RAR $\alpha$ ) y el receptor para vitamina D (Ueki y Hayman *et al.*, 2003), regulando negativamente su actividad transcripcional; el factor GATA1 y la proteína PU.1, regulando negativamente la diferenciación en eritrocitos y macrófagos, respectivamente (Ueki *et al.*, 2004); la proteína pRb, inhibiendo la actividad represora de pRb; y a las proteínas Smad1/5/8 inhibiendo la actividad transcripcional de estos factores, siendo una función exclusiva de la proteína Ski. Finalmente, se ha reportado que las proteínas Ski y SnoN pueden funcionar como coactivadores transcripcionales. SnoN aumenta la actividad transcripcional del receptor para estrógeno (ER $\alpha$ ) reclutando a la proteínas p300. La proteína Ski promueve la actividad transcripcional de MyoD, para una correcta diferenciación muscular, y también activa la vía de WNT a través de su interacción con la proteínas FHL2 y la posterior activación del factor  $\beta$ -catenina en células de melanoma (Kobayashi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003).



**Figura 2. La familia de oncoproteínas Ski.** La proteína Ski contiene tres dominios principales: el dominio Dachshund (DHD) es un sitio de interacción para ciertas proteínas y contiene el motivo *Dead box* (Dbox) que es secuencia presente en muchas proteínas cuyos niveles oscilan durante el ciclo celular; el dominio SAND es una secuencia de unión al DNA no funcional que en Ski funciona como sitio de interacción con proteínas y contiene la secuencia de unión a Smad4; y el dominio Coil-coiled de  $\alpha$ -hélices consecutivas le permite la formación de dímeros con las proteínas SnoN y SnoN2 y la unión a ciertas proteínas. Todos los miembros hasta ahora reportados contienen los dominios DHD y SAND, esta región es conocida como la secuencia transformante, y la secuencia de unión a las proteínas Smad2/3, exceptuando la proteína viral v-Ski. Para las proteínas Ski y SnoN se ha reportado una secuencia de localización nuclear (NLS) indispensable para su correcto funcionamiento. aa: número de aminoácidos.

### ***1.5 Papel de las proteínas Ski y SnoN en la vía de señalización del TGF- $\beta$ .***

La función más importante descrita para las proteínas Ski y SnoN es la de reguladores negativos de la vía del TGF- $\beta$ . Esta regulación negativa ocurre a varios niveles de la vía, de ahí la gran influencia que tiene sobre la señal del TGF- $\beta$ . La interacción de las proteínas R-Smad con Ski y SnoN ocurre en la región N-terminal de ambas proteínas (Mizuide M *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003). En el caso de la proteína Smad4 esta interacción se lleva a cabo en su dominio SAND. La interacción de Ski y SnoN con las R-Smad aumenta con la activación de la señal del TGF- $\beta$ , a diferencia de su unión con Smad4 que es independiente de la activación de la señal. A nivel transcripcional la unión de Ski y SnoN con las proteínas Smad bloquea la activación transcripcional de los genes blanco del TGF- $\beta$ , en primera instancia, a través de romper los complejos activos

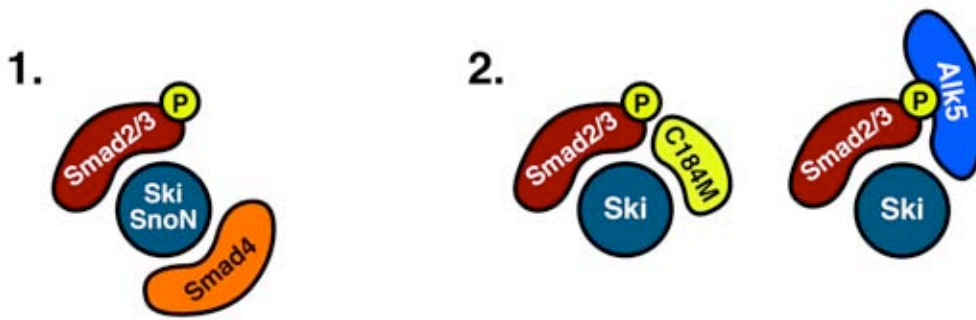
de las proteínas R-Smad (fosforiladas) y Smad4 donde al parecer la proteína Ski compete con las R-Smad por la proteína Smad4. Esta unión provoca que los complejos de las proteínas Smad no puedan unir a DNA o estabiliza el pegado de complejos transcripcionales no activos de las Smads, a través del reclutamiento de correpresores, teniendo como resultado general la inhibición de la activación transcripcional dependiente de TGF- $\beta$  (Deheuninck y Luo, 2009). Sin embargo, parece que la función general de las proteínas Ski y SnoN en el contexto de la señal del TGF- $\beta$  es mantener una represión basal de sus genes blanco. El caso mejor estudiado para entender la represión transcripcional a nivel basal de los genes blanco del TGF- $\beta$  por las proteínas Ski y SnoN es del gen que codifica para la proteína Smad7. La ausencia de la proteína Ski o SnoN incrementa los niveles del transcrito de *smad7*. Se conoce que en estado basal las proteínas Ski y SnoN están unidas al promotor de este gen y, que por lo menos, Ski está uniendo a los correpresores N-CoR/SMRT, a la desacetilasa de histonas HDAC3 y a la metiltransferasa de argininas PRMT5 (Tabata *et al.*, 2009).

Adicional a esta regulación negativa de la transcripción por los correpresores Ski y SnoN, la presencia de ambas proteínas en el citoplasma impide la translocación de las proteínas R-Smad al núcleo; al parecer este secuestro en el citoplasma es independiente de la fosforilación de las R-Smad por el TGF- $\beta$ . Para la proteína SnoN se reportó que en tejidos sanos de mama, su localización es predominantemente citoplasmática en comparación de tejidos malignos o células cancerosas donde su localización es fuertemente nuclear. También se comprobó que al mutar los sitios de importación nuclear de SnoN, esta proteína impedía la translocación de las R-Smads y la activación de los genes dependientes de TGF- $\beta$  (Krakowski *et al.*, 2005). En el caso de la proteína Ski, dos estudios independientes demostraron que la acumulación de Ski en el citoplasma inhibía la señal del TGF- $\beta$  en células de melanoma (Reed JA *et al.*, 2001). Esto ocurre debido a que la proteína Ski citoplasmática impide la translocación de las R-Smad al núcleo; al parecer el arresto de las R-Smad depende de la formación del complejo de Ski-R-Smads con el receptor tipo I del TGF- $\beta$  (Ferrand *et al.*, 2010).

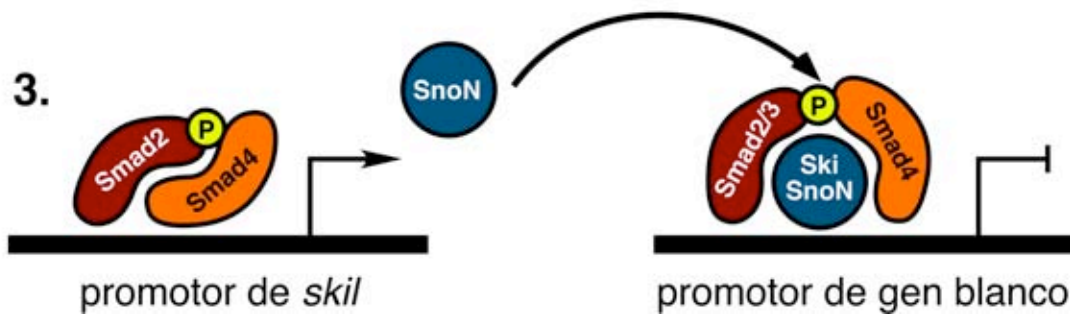
En el caso de la proteína Ski existen más evidencias de la importancia de la localización subcelular de esta proteína. Se ha reportado que la proteína Ski, al igual que SnoN, posee una secuencia de importación nuclear que al ser mutada impide su translocación a

núcleo y le confiere mayor estabilidad a la proteína. En este mismo trabajo se observó que Ski se acumula en el núcleo y en el citoplasma al inhibir la actividad del proteosoma 26; también se identificaron las secuencias necesarias para esta acumulación en el citoplasma. Esta proteína acumulada en el citoplasma interacciona con las proteínas Smad1/5/8 fosforiladas bloqueando su translocación al núcleo e inhibiendo los genes dependientes de BMP (Nagata M *et al.*, 2006). En otros estudios también se ha reportado la acumulación de la proteína Ski en el citoplasma inhibiéndose su degradación vía el proteosoma. En las células de Schwann, se reportó que la proteína Ski transloca del núcleo al citoplasma por la misma acción del TGF- $\beta$ . Ski interacciona con la proteína pRb tanto en núcleo como en citoplasma pero al translocar al citoplasma acarrea a la proteína pRb inhibiendo completamente su acción en núcleo, promoviendo así positivamente la proliferación celular (Jacob *et al.*, 2008). Por último, esta reportado que la proteína de bajo peso molecular, C184M, es capaz de mantener a Ski en el citoplasma impidiendo su localización en el núcleo de hepatocitos. Esto nuevamente, promueve la formación de complejos de Ski con las proteínas R-Smad y Co-Smad en el citoplasma bloqueando así la translocación de las Smads mediada por TGF- $\beta$ . La señal del TGF- $\beta$  regula positivamente la transcripción del gen que codifica para la proteína C184M; esto es muy interesante ya que podría funcionar como un asa de regulación negativa en la señal del TGF- $\beta$  (Kokura K *et al.*, 2003).

## Citoplasma



## Núcleo



**Figura 3. Regulación de la vía de señalización del TGF- $\beta$  por las proteínas Ski y SnoN.** 1. En el citoplasma, la acumulación de las proteínas Ski o SnoN permite su pronta interacción con las proteínas Smad2/3 fosforiladas (P) y Smad4; esta interacción impide la correcta translocación de las Smads al núcleo. 2. La proteína Ski captura a las proteínas Smad2/3 fosforiladas en el citoplasma a través de la formación de complejos estables con las proteínas citoplasmáticas C184M y el receptor tipo I de TGF- $\beta$ , Alk5. 3. Las proteínas Ski o SnoN regulan la transcripción basal de los genes blancos de TGF- $\beta$  que contienen secuencias de unión a las Smads en sus promotores (SBE), sin embargo, al llegar la señal del TGF- $\beta$  estos genes comienzan a transcribirse. Muchos de estos genes vuelven a su estado basal mucho antes que la señal del TGF- $\beta$  termine y esto se debe a que el gen *skil*, que codifica para la proteína SnoN, es un blanco del TGF- $\beta$  formando así, una asa de retroalimentación negativa: la proteína SnoN sintetizada por la misma señal del TGF- $\beta$ , posiblemente junto a la proteína Ski, desestabiliza los complejos activos de las proteínas Smad en los promotores y, posiblemente, permite la formación de complejos represores para que la transcripción de los genes blanco del TGF- $\beta$  regrese a sus estados basales.

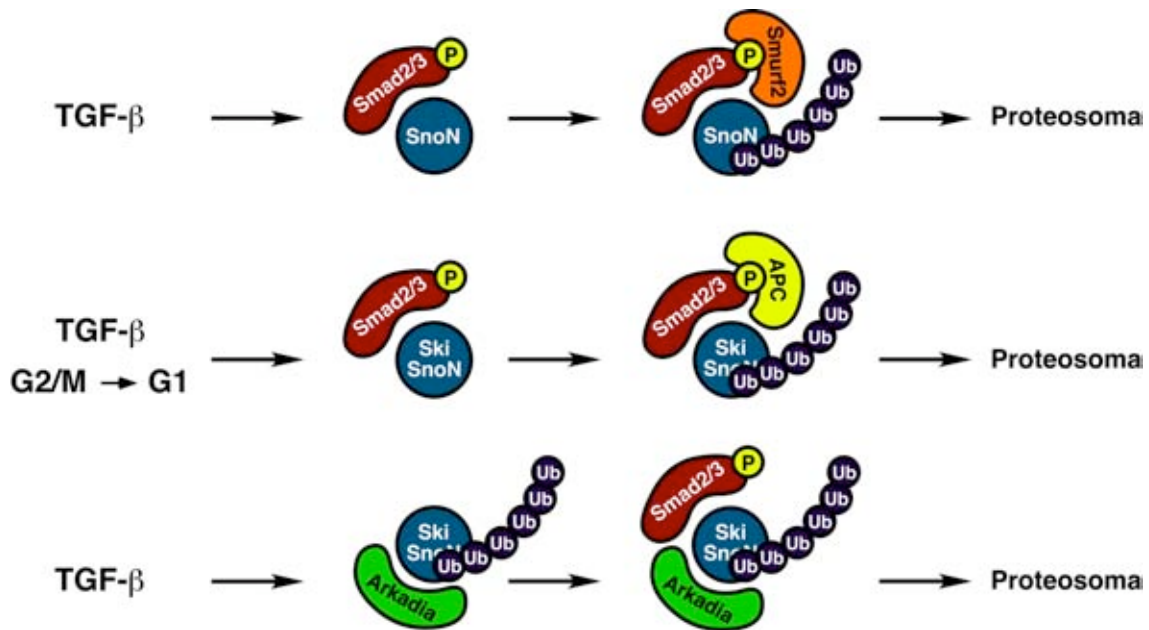
Aun cuando las proteínas Ski y SnoN son fuertes reguladores negativos de la señal del TGF- $\beta$ , la misma señal del TGF- $\beta$  regula los niveles de ambas proteínas en múltiples células y tejidos (Sun Y *et al.*, 1999). Hasta el momento no se conoce otra señal que controle de manera tan directa los niveles de estas dos proteínas. La señal del TGF- $\beta$

regula los niveles de las proteínas Ski y SnoN, a través del reclutamiento de ligasas E3 de ubiquitina, para promover su poliubiquitinación y degradación vía el proteosoma 26S; sin embargo, todos los mecanismos descritos para esta regulación coinciden en la fosforilación de las proteínas R-Smad. Las proteínas R-Smad tienen la función de proteínas adaptadoras entre Ski o SnoN y las ligasas E3 de ubiquitina; las ligasas Smurf2 (Bonni *et al.*, 2001) y el complejo promotor de la anafase (APC, por sus siglas en inglés) en el caso de la proteína SnoN (Stroschein SL *et al.*, 2001; Wan Y *et al.*, 2001). La ligasa Arkadia, la única ligasa conocida capaz de regular los niveles de ambas proteínas Ski y SnoN, une directamente a ambas proteínas y la ubiquitina, sin necesidad de las proteínas Smad; sin embargo, la fosforilación de las R-Smads es una señal indispensable para mandar a degradación a las proteínas Ski y SnoN previamente ubiquitinadas (Levy *et al.*, 2007; Nagano Y *et al.*, 2007). Al parecer, existe una regulación muy similar entre los niveles de Ski y SnoN por la señal de TGF- $\beta$  aunque existen algunas diferencias. La diferencia más importante es que el gen que codifica para la proteína SnoN (*skil*) es un gen blanco de respuesta temprana para el TGF- $\beta$  (Tecalco-Cruz *et al.*, 2012). Hasta el momento, no existe una fuerte evidencia de que el gen de *ski* sea también un gen responsivo al TGF- $\beta$ . La activación transcripcional del gen de *skil* es un mecanismo de asa de regulación negativa debido a que, aun cuando existe una señal de degradación para las proteínas Ski y SnoN, los niveles de SnoN suben (algunas veces hasta niveles mayores a los basales) para reprimir muchos de los genes dependientes de la señal de TGF- $\beta$ . En el caso particular de Ski, lo que se conoce es que los niveles de esta proteína no se estabilizan hasta que la señal del TGF- $\beta$  se ha apagado. Otra diferencia se encuentra en la secuencia de ambas proteínas, ya que SnoN es ubiquitinado en ciertas lisinas que no se comparten en la secuencia aminoacídica de Ski; para esta proteína no se han identificado aún las lisinas responsables para su degradación.

Aunque la señal de degradación más fuerte para Ski y SnoN es la desencadenada por el TGF- $\beta$ , se conocen algunas otras señales que influyen en sus niveles de proteína. Ambas proteínas Ski y SnoN llevan en sus secuencias el motivo *Dead-box* (D-box) que es una secuencia que se encuentra en muchas de las proteínas que participan en el ciclo celular y cuyos niveles fluctúan en las diferentes fases del ciclo (Macdonald M *et al.*, 2004; Wan Y *et al.*, 2001). Este motivo es reconocido por la proteína adaptadora CDH1,

que al igual que CDC20, reclutan a la ligasa E3 APC a sus proteínas blanco. En el caso de Ski se conocen dos aspectos relacionados con esta regulación. En el primer caso, la proteína CDC34, proteína de conjugación E2, es indispensable en la degradación de Ski durante el ciclo celular. En el segundo caso, se ha reportado que la proteína Ski se localiza en centrosomas y en el huso acromático en células en división. Los niveles de Ski se acumulan durante toda la interfase hasta llegar a su punto máximo en la fase G2/M del ciclo celular y disminuyen inmediatamente en la fase G1 (Marcelain *et al.*, 2005). También se ha reportado que la ausencia de la proteína Ski en MEFs (en ratones *ski*<sup>-/-</sup>) provoca defectos en la segregación de cromosomas y en el proceso de división celular, justificando así su presencia en los centrosomas y en el huso acromático (Marcelain *et al.*, 2012). Finalmente, se han identificado dos sitios de sumoilación para la proteína SnoN aunque esta modificación parece no afectar la estabilidad ni la función represora de esta proteína; son necesarios más estudios para conocer concretamente los efectos de la sumoilación. Hasta el momento, no se han identificado sitios de sumoilación para Ski ni otra modificación post-traducciona, diferente de la fosforilación, que regula la estabilidad de esta proteína.





**Figura 4. Control de la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN.** La fosforilación de las proteínas Smad2/3 (P) es un requisito indispensable para la degradación de las proteínas Ski y SnoN por la señal del TGF- $\beta$ . Sin embargo, las ligasas E3 de ubiquitina responsables de esta degradación tienen mecanismos distintos. La ligasa de ubiquitina Smurf2 usa a las proteínas Smad2/3 como proteínas adaptadoras para interactuar con la proteína SnoN, no obstante, SnoN interactúa únicamente con las proteínas Smad2/3 en su forma fosforilada. La ligasa APC tiene un mecanismo similar al de Smurf2 aunque podría degradar a las proteínas Ski y SnoN en un mecanismo independiente del TGF- $\beta$  durante el ciclo celular. La proteína Arkadia es la única ligasa reportada capaz de interactuar directamente a las proteínas Ski y SnoN, independiente de su interacción con las proteínas Smad2/3; no obstante, la degradación vía proteosoma de las proteínas Ski y SnoN ubiquitinadas por esta ligasa se lleva a cabo sólo si las proteínas Smad2/3 son fosforiladas por la señal del TGF- $\beta$ .

### ***1.6 Regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.***

La actina es una de las proteínas más conservadas en los eucariontes. Es una proteína de estructura terciaria globular. Su estructura le permite polimerizar sus monómeros (G-actina), a través de la unión de ATP, en orden y dirección aunque la designación de los polos es de forma arbitraria. Bioquímicamente, la polimerización de monómeros de actina en filamentos (F-actina) sólo requiere del ión calcio y de una concentración mínima de monómeros. Sin embargo, dentro de las células la polimerización de G-actina en F-actina requiere de la presencia, activación y desactivación de muchas proteínas y sus respectivos complejos. Básicamente la función de estas proteínas es adaptar las múltiples señales celulares hacia un equilibrio o desequilibrio entre la

cantidad de G-actina y F-actina presentes en la célula (concentración crítica). Se conoce que la actina se encuentra tanto en citoplasma como en el núcleo, aunque existe la discusión sobre si la G-actina es capaz de polimerizar en el núcleo. Al parecer la actina puede entrar libremente al núcleo de donde es rápidamente exportada al citoplasma por la proteína transportadora nuclear CRM1. Existen varias proteínas que unen a actina y evitan la translocación de los monómeros al citoplasma (Mouilleron S *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha dado un especial énfasis en entender como las señales extracelulares, tales como las proporcionadas por las células adyacentes o la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) circundante, tienen un fuerte impacto sobre el fenotipo total en un tipo celular o sobre una vía señalización específica. Las uniones intercelulares (célula-célula) son de gran importancia para mantener el estado diferenciado en casi todas las células. Dentro de este tipo de uniones encontramos las uniones adherentes, mediadas por las proteínas cadherinas; estas uniones son dependientes del ión calcio. Las cadherinas son puntos de unión de los filamentos de actina dentro de la célula, además de que sirven como un reservorio del factor  $\beta$ -catenina. Las uniones directas con la ECM están coordinadas principalmente por las proteínas integrinas. Las integrinas activan un grupo de cinasas (destacando la cinasa src) que regulan la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Estas señales regulan de manera importante el estado del citoesqueleto de actina; el número de interacciones que tiene una célula o las características fisicoquímicas de la ECM perturban fuertemente el equilibrio entre G-actina y F-actina dentro de la célula. Esta dinámica tiene un papel crucial en la función de muchas proteínas de donde destacan los factores transcripcionales YAP/TAZ (Hadler *et al.*, 2012). Las proteínas de *scaffold*, adaptadoras y cinasas encargadas de controlar la actividad de las proteínas YAP/TAZ reconocen y responden al estado de polimerización de la actina (muchas de ellas pertenecen a la vía de señalización HIPPO). Nuevamente, la formación de F-actina mantiene a los factores YAP/TAZ en el núcleo mientras que la estabilización de G-actina transloca a estos factores al citoplasma para su posterior degradación vía proteosoma 26S. Existen muchas otras señales, independientes de la adherencia y de los cambios en la morfología celular, que regulan la localización subcelular de YAP/TAZ, sin embargo, se ha reportado que la polimerización de actina esta por arriba de las demás señales que afectan a YPA/TAZ.

La dinámica del citoesqueleto de actina (cambios entre la G-actina y F-actina) es de gran importancia para la regulación de muchas de las vías de señalización, incluida entre ellas la señal del TGF- $\beta$ . El factor transcripcional de respuesta a suero (SRF, por sus siglas en inglés) es un claro ejemplo de cómo la dinámica del citoesqueleto de actina regula la activación de un factor transcripcional. Las señales presentes en el suero inducen la formación de F-actina y esto trae como consecuencia la disminución de la cantidad de actina libre (G-actina) en la célula. Las señales del suero polimerizan los monómeros de actina a través de la activación de la GTPasa RhoA y sus efectores río abajo. El SRF une directamente a los monómeros de actina y la formación del complejo SRF-G-actina transloca al factor SRF al citoplasma mediante la proteína CRM1. Cuando los niveles de G-actina disminuyen, por la acción del suero, el SRF libre de actina permanece en el núcleo donde une a otros factores transcripcionales para regular correctamente a los promotores de sus genes blanco (Mouilleron S *et al.*, 2011). Cualquier perturbación en la activación de RhoA, en sus efectores o en la formación de F-actina bloquea la activación del SRF. Muchas hormonas regulan la dinámica del citoesqueleto de actina: la esfingosina-1-fosfato (S1P) y el ácido lisofosfatídico (LPA) provocan la formación de F-actina; mientras el glucagon y, el derivado del aminoácido tirosina, epinefrina, incrementan los niveles de G-actina (despolimerización) a través de la síntesis del segundo mensajero AMP cíclico o cAMP. Es importante destacar que todas estas hormonas señalizan a través de los GPCRs y que estas mismas señales regulan la localización de los factores YAP/TAZ, a través de los cambios en el citoesqueleto de actina (Yu *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Por último, la vía de señalización del TGF- $\beta$  también induce la formación de F-actina en células de tipo epitelial y fibroblastos. No se ha dilucidado cómo los receptores del TGF- $\beta$  activan la polimerización de actina; sin embargo, se conoce que la proteína RhoA, y su cinasa efectora, la proteína ROCK, son esenciales para la formación de fibras de stress (F-actina) en células epiteliales por este ligando. Se ha reportado que la dinámica del citoesqueleto de actina y los *lipid rafts* ayudan a la señal del TGF- $\beta$  en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) (Fan *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009).

### ***1.7 La vía de señalización del TGF- $\beta$ en hígado.***

Entre muchas de sus funciones en el metabolismo de un organismo adulto, el hígado es el

órgano encargado de la detoxificación de agentes externos en el organismo y de producir proteínas presentes en el plasma sanguíneo. Además participa en la síntesis (o activación) de algunas hormonas y en la producción de ciertos compuestos tales como las sales biliares, principales moléculas emulcificadoras del organismo. Debido a su importancia en el organismo el hígado es un órgano que posee una gran capacidad de regeneración. Este proceso se ha estudiado ampliamente en roedores debido a la impresionante rapidez con la que se regenera el hígado aunque también se ha observado en diferentes especies incluyendo en los humanos (Taub, 2004). En roedores, existe el modelo de hepatectomía parcial (PH) en donde se retiran 2/3 del volumen total del hígado (lóbulos mayores); después de dos semanas el hígado recupera su volumen casi por completo. Sin embargo, la regeneración hepática no es un proceso de regeneración *per se* sino más bien un proceso de hiperplasia donde los hepatocitos restantes son capaces de dividirse entre 1 a 2 veces para restituir el volumen inicial previo al daño. También las células no parenquimatosas tienen 1 o 2 ciclos de división. Estas observaciones sugieren que la repoblación de muchas de las células hepáticas no es a través del uso de células troncales (*stem cells*) (Michalopoulos, 2007). No obstante, la manera en que el hígado se regenera depende directamente del tipo de daño que sufre el hígado siendo muy distinto el proceso de regeneración a partir de daño por agentes químicos en comparación con la PH. En los modelos de daño hepático por la administración de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) o por la ligadura del ducto biliar, el proceso de regeneración sólo existe en el tejido dañado y es esencial el recambio de las células necróticas; además este recambio no ocurre en toda la estructura del lóbulo hepático al mismo tiempo sino de manera secuencial y con dirección, iniciando en el parénquima cercano a la vena portal y terminando en los hepatocitos próximos a la vena central. En este modelo se sugiere una mayor participación del recambio celular mediado por las *stem cells* (Gilgenkrantz y de L'Hortet, 2011).

Existen un gran número de estudios que demuestran el papel crucial que tiene la vía de señalización del TGF- $\beta$  en los procesos celulares del hígado que van desde su desarrollo en etapas tempranas hasta el mantenimiento de su homeostasis; también esta señal participa en los procesos patológicos del hígado tales como la fibrosis y el cáncer

hepático. Se ha reportado que las proteínas R-Smad son esenciales para el desarrollo normal del hígado. El ratón knockout doble para las R-Smads (*smad2<sup>-/-</sup>/smad3<sup>-/-</sup>*) muestra un desarrollo anormal del hígado, con mucho menor tamaño y una menor sobrevivencia de los hepatocitos. Después de su papel esencial en el desarrollo temprano del hígado, la señal del TGF- $\beta$  es necesaria para mantener a los hepatocitos en su estado de quiescencia. Diferentes investigaciones han demostrado que el bloqueo de la vía del TGF- $\beta$  provoca la salida de los hepatocitos de la quiescencia (fase G0 del ciclo celular) hacia un estado de proliferación celular. Adicionalmente, la señal del TGF- $\beta$  induce la producción de matriz extracelular (fibrogénesis) a través de la activación de las células estrelladas hepáticas (HSCs, por sus siglas en inglés) en la región del tejido dañado; el TGF- $\beta$  también induce el proceso de EMT en los hepatocitos lo cual también favorece el proceso de reparación.

El papel de la vía de señalización del TGF- $\beta$  en la homeostasis del hígado está prácticamente enfocado en dos aspectos: 1) el mantenimiento de la quiescencia de los hepatocitos al mantenerlos en arresto celular o dirigirlos a apoptosis y 2) en la reparación del tejido dañado a través de la producción de ECM y la regulación del proceso inflamatorio. Todo esto, en parte, explica la relación íntima de la señal del TGF- $\beta$  con los procesos patológicos del hígado como la fibrosis y el cáncer hepático (Dooley y ten Dijke, 2012). En la fibrosis hepática, independientemente de la naturaleza del daño, la vía de señalización del TGF- $\beta$  está activada en los hepatocitos y en las células no parenquimatosas; de estas últimas destacan las células de Kupffer (macrófagos) como productoras de TGF- $\beta$  y las HSCs como productoras de la ECM. Aunque participan un gran número de señales en la producción exacerbada de la ECM casi todas ellas llevan a la activación de la señal del TGF- $\beta$ , ya sea a través de la síntesis del ligando o del aumento de la señal. El desarrollo de la fibrosis es un caso de exceso de la señal del TGF- $\beta$ , por otra parte, la pérdida en la inhibición del crecimiento mediado por el TGF- $\beta$  en los hepatocitos lleva a un crecimiento anormal del parénquima que al final desemboca en el desarrollo de cáncer hepatocelular. Por tanto, entender los mecanismos de señalización en los procesos hepáticos es un paso importante en el desarrollo de nuevas metodologías para el tratamiento de sus patologías.

## 2. ANTECEDENTES

La señal del TGF- $\beta$  necesita de los *lipid rafts* para su correcta señalación en distintos tipos celulares. Se ha reportado que tanto los dos tipos de receptores para el TGF- $\beta$  como las proteínas R-Smads están asociadas a este tipo de membranas y que esta asociación es de características dinámicas (Chen *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009). En los hepatocitos, la correcta activación de las R-Smads es dependiente de la proteína asociada a *lipid rafts*, caveolina-1 (Cav-1). La ausencia de Cav-1 no permite la fosforilación de las R-Smads; además aumenta los niveles de la proteína SnoN, posiblemente por la ausencia de la activación de las R-Smads que es la principal señal de degradación de SnoN (Mayoral *et al.*, 2010). Contrario a esto, se ha reportado que en los hepatocitos la señal canónica del TGF- $\beta$  no es dependiente de los *lipid rafts*, sin embargo, las vías alternas del TGF- $\beta$  sí dependen de las membranas ricas en colesterol (Meyer C *et al.*, 2010). Existe otro reporte en donde se demuestra que la ausencia de Cav-1 estimula la apoptosis mediada por TGF- $\beta$  debido a que la ausencia de esta proteína evita que el TGF- $\beta$  active correctamente a la proteína Akt en los hepatocitos (Meyer C *et al.*, 2013). En conclusión, los *lipid rafts* tienen un papel relevante en la correcta señalización del TGF- $\beta$  en los hepatocitos, posiblemente, a través del reclutamiento de sus componentes en estas estructuras.

La señal del TGF- $\beta$  es responsable de mantener el estado de quiescencia de los hepatocitos en el hígado. También se ha reportado que el TGF- $\beta$  tiene un efecto apoptótico en los cultivos primarios de hepatocitos. Posteriormente, se describió tanto *in vitro* como *in vivo* que el TGF- $\beta$  es capaz de iniciar el proceso de EMT en los hepatocitos. Recientemente se describió que esta doble acción de la señal del TGF- $\beta$  puede ser controlada por las características fisicoquímicas de la ECM que rodeaba a los hepatocitos. Cuando los hepatocitos son cultivados en una ECM con características de gel (suave), la señal del TGF- $\beta$  provoca la apoptosis en estas células, mientras que la señal del TGF- $\beta$  promueve la EMT en los hepatocitos cultivados en una ECM seca (rígida). La activación de las vías alternas del TGF- $\beta$  se ven favorecidas en las condiciones de cultivo de una ECM rígida, no obstante, la vía canónica no se ve afectada. Interesantemente, esta doble característica en los hepatocitos es plástica debido a que pueden cambiar de un estado al otro solamente cambiando las condiciones de cultivo (Godoy *et al.*, 2009). Es importante entender los mecanismos involucrados en

la regulación de la señal del TGF- $\beta$  por los cambios en las características de la ECM, estos cambios activan muchas señales siendo la dinámica del citoesqueleto de actina una de las principales.

En el proceso de la regeneración hepática en ratones, la activación de las proteínas R-Smad ocurre durante todo el proceso; además estas proteínas forman complejos activos con la proteína Smad4. Al mismo tiempo, los niveles de los correpresores de Ski y SnoN aumentan, a diferentes tiempos, durante los tiempos que la señal del TGF- $\beta$  está activa. Ski y SnoN forman complejos con las R-Smads fosforiladas en el núcleo de las células hepáticas. Estos dos efectos se observan no importando el origen del proceso regenerativo (PH o como por daño con CCl<sub>4</sub>) (Macías-Silva *et al.*, 2002). El aumento en los niveles de Ski y SnoN se adjudicó a la posible acción represora sobre los complejos activos de las proteínas Smad; así se explica en parte, el bloqueo de la señal del TGF- $\beta$  que corresponde a los efectos de inhibición del crecimiento, en un momento donde las células hepáticas requieren dividirse para restablecer el volumen inicial del hígado antes del daño. Sin embargo, no es posible explicar el aumento de Ski y SnoN, aun cuando los RNAs mensajeros que codifican para ambas proteínas aumentan, en la presencia de la activación de la vía canónica del TGF- $\beta$  (fosforilación de las R-Smad) que es la señal de degradación más fuerte para ambas proteínas. Tampoco podemos explicar este aumento secuencial en los niveles de Ski y SnoN y no conocemos con certeza si existe alguna señal que contrarreste la degradación mediada por TGF- $\beta$  de ambas proteínas. Con estos antecedentes nos decidimos a estudiar más a fondo los mecanismos involucrados en la regulación de la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos y en el proceso de regeneración hepática. Esta búsqueda no es una tarea fácil debido a que en el proceso de regeneración hepática coexisten un gran número de señales que van desde el recambio en la ECM hasta la acción de hormonas que provienen del intestino, riñón o páncreas. Además hasta el momento no se ha reportado una vía de señalización, adicional a la señal del TGF- $\beta$ , que coordine un cambio en los niveles de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos.

### **3. HIPÓTESIS**

Los estabilidad de la oncoproteína Ski es regulada negativamente por la señal del TGF- $\beta$  a través de la fosforilación de las proteínas R-Smad. En el proceso de regeneración hepática, los niveles de la proteína Ski aumentan a pesar de la presencia de la señal del TGF- $\beta$ . Por lo tanto, existen señales que participan en el proceso de regeneración hepática que regulan la estabilidad de la proteína Ski vía mecanismos independientes de la vía de señalización del TGF- $\beta$ .



## **4. OBJETIVOS**

### ***4.1 Objetivo general***

Estudiar la regulación de la estabilidad de la proteína Ski a través de mecanismos dependientes o independientes de la vía de señalización del TGF- $\beta$  en los hepatocitos.

### ***4.2 Objetivos particulares***

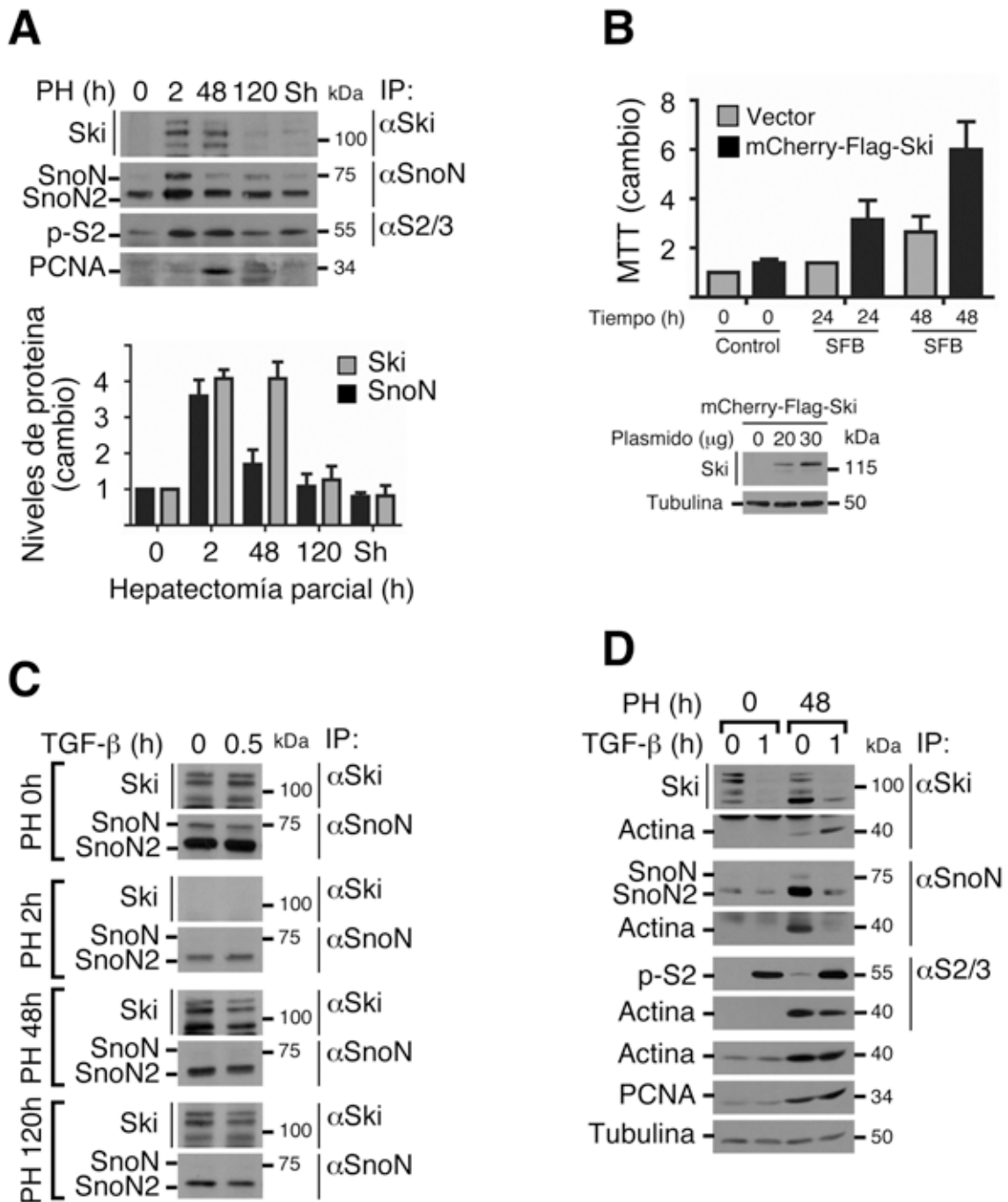
1. Estudiar sí la estabilidad de la proteína Ski es regulada negativamente por la señal del TGF- $\beta$  en los hepatocitos aislados de hígados en regeneración.
2. Identificar a las señales que regulen la estabilidad de la proteína Ski en los hepatocitos en estado de regeneración, en cultivos primarios y en líneas celulares hepáticas.

## 5. RESULTADOS

**5.1 La proteína Ski se localiza en la fracción insoluble al detergente Tritón X-100 en los hepatocitos.** En el trabajo de Macías-Silva *et al.* en el 2002, se sugiere que el aumento en los niveles de las proteínas Ski y SnoN, en el proceso de regeneración hepática en ratón, ocurre principalmente en los hepatocitos. Este aumento no correlaciona con lo reportado hasta ahora en donde la fosforilación de las R-Smads y la interacción de estas con las proteínas Ski y SnoN es una señal suficiente para la degradación de estas últimas. Estos datos sugerían un cambio importante en la regulación de la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos durante el proceso de regeneración, por lo que decidimos indagar más en la regulación de ambas proteínas por la señal del TGF- $\beta$  durante este proceso. Inicialmente, decidimos cambiar de modelo experimental debido a que la cantidad de hepatocitos obtenidos de un hígado de rata es mucho mayor a los obtenidos del hígado de ratón, y esto nos permitía tener una mayor cantidad de material biológico para trabajar. Usando el modelo de PH se confirmó el aumento en los niveles de Ski y SnoN en hígados de rata, mostrando pocas diferencias con el modelo de ratón. La proteína Ski aumenta a partir de las 2h posteriores a la PH. La proteína Smad2 fosforilada (p-S2) se utilizó como marcador de activación de la señal del TGF- $\beta$  (Figura 5A). Antes de continuar con el análisis en la señalización del TGF- $\beta$  en los hepatocitos, decidimos estudiar si la proteína Ski tenía un papel relevante en la proliferación de los hepatocitos que justificara el aumento en sus niveles durante la regeneración del hígado y un análisis más profundo. Para este fin se utilizó la línea celular inmortalizada de hepatocito de rata C9 (Clona 9). Las células C9 se transfectaron transitoriamente con una construcción que expresa a la proteína Ski exógena, pcDNA3-mCherry-Flag-Ski, y se estimularon con suero fetal bovino (SFB) para estudiar su proliferación mediante el ensayo de viabilidad de MTT. Como se esperaba, la expresión de Ski exógeno permitió una mayor proliferación en las células C9 (Figura 5B). Al ver que la proteína Ski tenía un efecto positivo en la proliferación de los hepatocitos, decidimos indagar más sobre la regulación de los niveles de Ski por TGF- $\beta$  y por otras señales que podrían controlar esta regulación. Nuestra primera aproximación fue aislar hepatocitos de hígados de rata en regeneración, obtenidos a diferentes tiempos después de la PH, para analizar su respuesta al TGF- $\beta$ , y esperando una resistencia de las proteínas Ski y SnoN a ser degradados como ocurre en los hígados en regeneración. Los hepatocitos aislados fueron incubados en condiciones de cultivo

celular (a 37 °C en condiciones de gaseo con O<sub>2</sub>) e incubados con TGF-β. Para nuestra sorpresa, las proteínas Ski y SnoN mostraron una regulación contraria a la observada previamente. Tanto los niveles de la proteína Ski como de SnoN disminuyen en los tiempos de regeneración. Además, parecía que existía una resistencia de ambas proteínas a la degradación mediada por TGF-β (Figura 5C).

Existían varias posibilidades que podrían explicar la disminución en los niveles de Ski y SnoN en los hepatocitos en regeneración. Por ejemplo, el aumento de ambas proteínas observado en hígado completo podría provenir de las células no parenquimatosas. Sin embargo, por datos obtenidos en el laboratorio, existía una gran probabilidad que estuviéramos analizando parcialmente la cantidades totales de las proteínas Ski y SnoN presentes en los hepatocitos. Nuestros métodos de aislamiento de proteína estaban diseñados para la extracción de proteínas solubles en soluciones de lisis con detergentes no iónicos como el TNTE (Tritón X-100 al 0.5%), como es el caso para el estudio de muchos factores transcripcionales localizados en núcleo. Ningún antecedente en la literatura nos sugería que las proteínas Ski y SnoN se localizaran en el citoplasma de los hepatocitos ni que estuvieran asociadas a estructuras insolubles a detergentes no iónicos. Aunque existe una gran variedad de detergentes, iónicos y no iónicos, capaces de extraer proteínas asociadas a material insolubles en Tritón X-100, nos decidimos por utilizar una solución de lisis que contenía diferentes detergentes. La solución de RIPA contiene un detergente no iónico (NP-40) y dos detergentes iónicos (desoxicolato de sodio y SDS). La lisis con RIPA puede afectar algunas interacciones entre proteínas pero nos asegura una fuerte extracción del material insoluble en Tritón X-100. Para probar nuestra teoría se aislaron hepatocitos frescos en condiciones de regeneración (48 h después de la PH) y normales (quiescencia). Como se predijo, con este nuevo método de extracción se recuperaron las observaciones previas, es decir el aumento de los niveles de Ski y SnoN en los hepatocitos en regeneración, y además se recuperó la sensibilidad a la degradación inducida por el TGF-β. La fosforilación de Smad2 y el aumento en la proteína PCNA, son controles del proceso regenerativo en el hígado. De forma muy interesante, observamos que no sólo se recuperó el efecto en el aumento de Ski y SnoN sino que también observamos una fuerte interacción de ambas proteínas con la proteína actina. Esta interacción principalmente fue observada en los hepatocitos en regeneración (Figura 5D). Esto podría explicar la presencia parcial de ambas proteínas en la fracción insoluble a Tritón X-100.

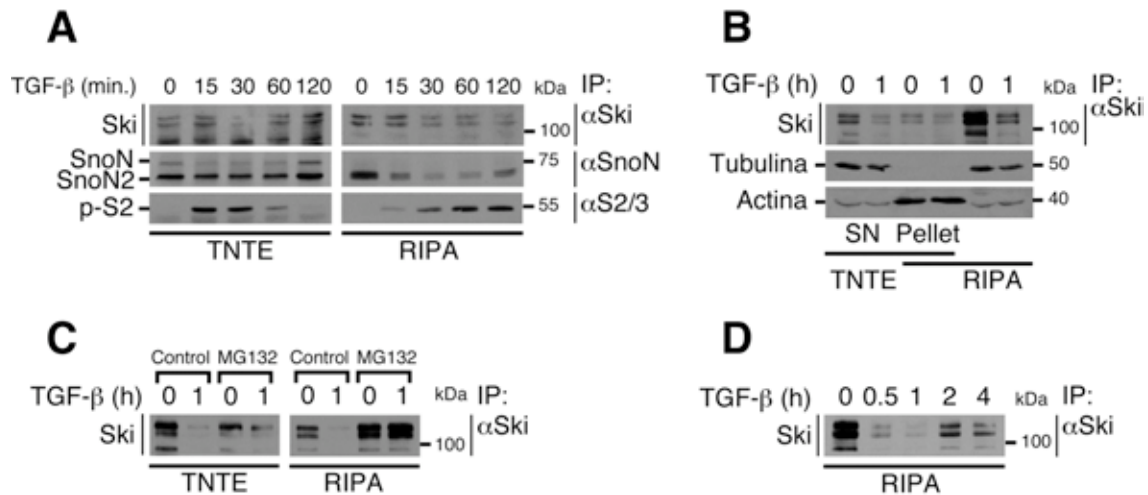


**Figura 5. Los niveles de las proteínas Ski y SnoN aumentan durante el proceso de regeneración hepática.** (A) Cambios en los niveles de las proteínas Ski y SnoN en extractos nucleares de hígados en estado de quiescencia y en regeneración: 0, 2, 48 y 120 horas post-hepatectomía parcial (PH). Sh, extractos nucleares de hígados de ratas *Sham*; la proteína p-S2 es un control de activación de la señal de TGF- $\beta$ ; la proteína PCNA es un como marcador de regeneración hepática. (B) Ensayo de viabilidad celular de MTT en la línea celular C9 con expresión transitoria de la proteína mCherry-Flag-Ski exógena a 0, 24 y 48 horas de estimulación con suero fetal bovino al 10% (SFB). (C) Cambios en los niveles de las proteínas Ski y SnoN en hepatocitos aislados de hígados normales (PH 0h) y en proceso de

regeneración: 2h, 48h y 120h PH. Los hepatocitos se incubaron en condiciones control y estimulados 0.5 horas con 0.3 nM de TGF- $\beta$ ; los hepatocitos fueron lisados con Tritón 0.5% por 30 min. **(D)** Cambios en los niveles de las proteínas Ski, SnoN y p-S2 en hepatocitos aislados en quiescencia (PH0) y en proceso de regeneración (PH48). Los hepatocitos, incubados en condiciones control y estimulados 0.5 horas con 0.2 nM de TGF- $\beta$ , fueron lisados en RIPA por 1h. Las proteínas PCNA y Tubulina son utilizadas como marcadores de regeneración y control de carga, respectivamente. La proteína Actina fue también utilizada como control de carga aunque sus niveles cambian durante la regeneración hepática. Los cambios en los niveles de proteína fueron analizados por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot. SnoN: SnoN/SnoN2; Smad2 fosforilada: p-S2.

Con estos resultados nos decidimos inmediatamente a estudiar esta nueva e interesante característica de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos. Primeramente, nos decidimos a corroborar que Ski y SnoN eran realmente degradados por la señal del TGF- $\beta$  en los hepatocitos aislados. Se realizó un curso temporal de TGF- $\beta$  en hepatocitos que fueron lisados posteriormente con el TNTE (Tritón X-100 al 0.5%) o con RIPA (Figura 6A). Nuevamente, al extraer la proteína con la solución de RIPA se recupera la dinámica de degradación de Ski y SnoN por TGF- $\beta$ . También decidimos analizar la regulación de la proteína Ski en los cultivos primarios de hepatocitos. Evaluamos si la proteína Ski se localiza en la región insoluble a Tritón X-100. Los hepatocitos se incubaron en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$  y se lisaron posteriormente con TNTE (Tritón X-100 al 0.5%). Las muestras fueron centrifugadas para obtener dos fracciones: la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (*pellet*). Las proteínas presentes en el *pellet* se extrajeron posteriormente utilizando la solución de lisis RIPA. Se utilizaron muestras lisadas inicialmente con RIPA para comparar la eficiencia de extracción entre ambas condiciones. Interesantemente, una fracción de la proteína Ski total se localiza en el *pellet*. Además la lisis con la solución de RIPA extrajo una mayor cantidad de Ski de los hepatocitos (Figura 6B). Se utilizaron a las proteínas tubulina y actina como controles de proteínas presentes en la fracciones solubles e insolubles, respectivamente. Después de confirmar que la proteína Ski se localiza en la fracción insoluble al detergente Triton X-100 en los hepatocitos en cultivo, quisimos evaluar el efecto del inhibidor del proteosoma, MG132, sobre la proteína Ski en la fracción soluble como en la fracción insoluble en Tritón X-100 debido a que existe el reporte de que este compuesto es capaz de regular la localización de la proteína Ski (Nagata M *et al.*, 2006). Los hepatocitos se preincubaron con el inhibidor MG132 en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$ . Las células se

lisaron con TNTE (Tritón X-100 al 0.5%) o con RIPA. En la lisis con RIPA se observó un efecto similar a lo ya reportado donde la inhibición del proteosoma bloquea la acción de degradación del TGF- $\beta$  sobre la proteína Ski, además de que aumentó los niveles de Ski. Sin embargo, para nuestra sorpresa observamos que en la lisis con TNTE (Tritón X-100 al 0.5%), no hay un bloqueo eficiente del efecto del TGF- $\beta$  por el MG132, mientras que los niveles de la proteína Ski disminuyeron considerablemente (Figura 6C). Esto nos sugirió que la localización de la proteína Ski en el material insoluble a detergentes no iónicos es un proceso regulable por señales como la inhibición del proteosoma. Posteriormente realizamos un curso temporal de la señal del TGF- $\beta$  en los hepatocitos cultivados, con las nuevas condiciones de extracción de proteína (utilizando RIPA). La degradación de la proteína Ski inducida por el TGF- $\beta$  se observó entre los 30 min y 1 h de incubación, con una posterior recuperación a partir de las 2 h de estímulo (Figura 2D). Esta es la primera vez que se reporta una recuperación de la proteína Ski aun en la presencia de la señal del TGF- $\beta$ . Además, datos previos en el laboratorio demostraron que el gen de *ski* no es un gen blanco de la señal del TGF- $\beta$ .

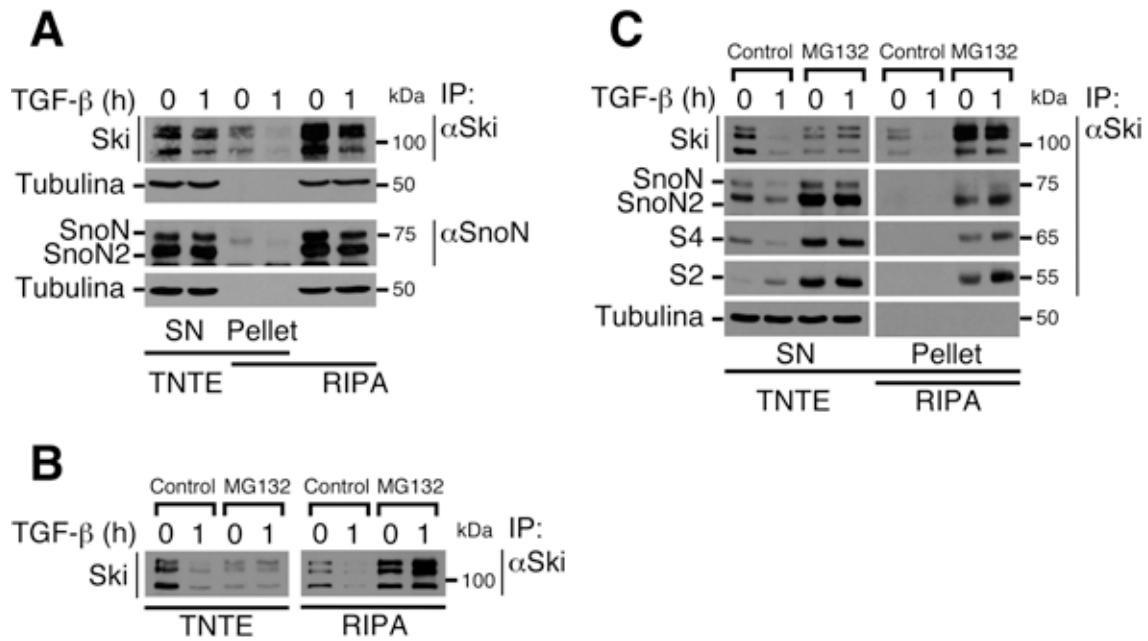


**Figura 6. La proteína Ski es degradada por la señal del TGF-β y se localiza en la fracción insoluble a Tritón X-100 en los hepatocitos aislados y cultivados.** (A) Curso temporal de estimulación con 0.3 nM de TGF-β en los hepatocitos aislados; los hepatocitos fueron lisados en Tritón al 0.5% (TNTE) o en solución de RIPA. La fosforilación de la proteína Smad2 (p-S2) se utilizó como control de activación (B) Localización de la proteína Ski en las fracciones solubles (SN) e insolubles (*pellet*) en los hepatocitos cultivados. Los hepatocitos cultivados se incubaron en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF-β. La fracciones solubles e insolubles se compararon con extractos lisados inicialmente en RIPA. La proteína Tubulina y Actina son utilizadas como control de extracción de proteínas solubles e insolubles, respectivamente. (C) Inhibición de la degradación de la proteína Ski por TGF-β en hepatocitos cultivados preincubados por 4h con 25 μM de MG132; los hepatocitos fueron lisados con TNTE y RIPA. (D) Curso temporal de estimulación con 0.2 nM de TGF-β en los hepatocitos en cultivo; los hepatocitos se lisaron en solución de RIPA. Los cambios en los niveles de proteína fueron analizados por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot.

Lo siguiente fue estudiar las características bioquímicas y celulares de Ski en esta fracción insoluble a Tritón X-100; sin embargo, decidimos buscar antes si este mismo efecto ocurría en la línea celular C9, debido a que el uso de este modelo nos facilita el análisis experimental. Estas células inmortalizadas provienen de hepatocitos de hígado de rata, lo que nos permitiría hacer las comparaciones con los cultivos primarios de hepatocitos. La primera aproximación fue evaluar si las proteínas Ski y SnoN se localizaban en la fracción insoluble a Tritón X-100 en estas células. Las células C9 confluentes en condiciones controles o estimuladas con TGF-β fueron lisadas con TNTE (Tritón X-100 al 0.5%). Las muestras fueron centrifugadas para obtener la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (*pellet*). Las proteínas presentes en el *pellet* se extrajeron posteriormente utilizando la solución de lisis RIPA, y se

utilizaron muestras lisadas inicialmente con esta mezcla de detergentes. Como se esperaba, por lo encontrado en los hepatocitos, la proteína Ski se localizó en la fracción insoluble (*pellet*) a detergentes no iónicos; además se observó una mayor extracción de Ski con RIPA. En el caso de la proteína SnoN no se demostró una fuerte presencia en la fracción insoluble a Tritón X-100 ni una mayor extracción con RIPA (Figura 7A). Al confirmar que la proteína Ski se localiza en la fracción insoluble al detergente Triton X-100 en las células C9, también evaluamos el efecto del inhibidor MG132, sobre la proteína Ski en la fracción soluble como en la fracción insoluble al detergente Tritón X-100. Las células C9 confluentes se preincubaron con el inhibidor MG132 en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$ . Las células se lisaron con TNTE (Tritón X-100 al 0.5%) o con RIPA. Al igual que en los hepatocitos, en la lisis con RIPA se observó el bloqueo total por MG132 de la degradación de Ski inducida por la señal del TGF- $\beta$ , además de acumular los niveles de esta proteína sobre el basal. En la lisis con TNTE (Tritón al 0.5%), los niveles de Ski disminuyeron sin observarse un claro bloqueo del efecto del TGF- $\beta$  (Figura 7B). En la línea celular C9, la proteína Ski tiene un comportamiento muy similar a lo encontrado en los hepatocitos en cultivo. Después, decidimos evaluar si la inhibición del proteosoma acumulaba a Ski en la fracción insoluble a Tritón X-100. Para confirmar esto decidimos hacer uso de la metodología anterior donde analizamos ambas fracciones, y de nuevo se utilizaron las células C9, las que se preincubaron con el inhibidor MG132 y se estimularon en ausencia (control) o con TGF- $\beta$ . Primeramente, se lisaron las células con TNTE y las proteínas en el material precipitado (*pellet*) se solubilizaron con RIPA. Como se esperaba, el inhibidor MG132 acumuló a la proteína Ski en la fracción insoluble al detergente Tritón X-100, tanto en la condición control como en la estimulada con TGF- $\beta$  (Figura 7C). También se demostró que la proteína Ski es capaz de formar complejos con las proteínas SnoN/SnoN2, Smad4 (S4) y Smad2 (S2) en la fracción insoluble a detergentes no iónicos.



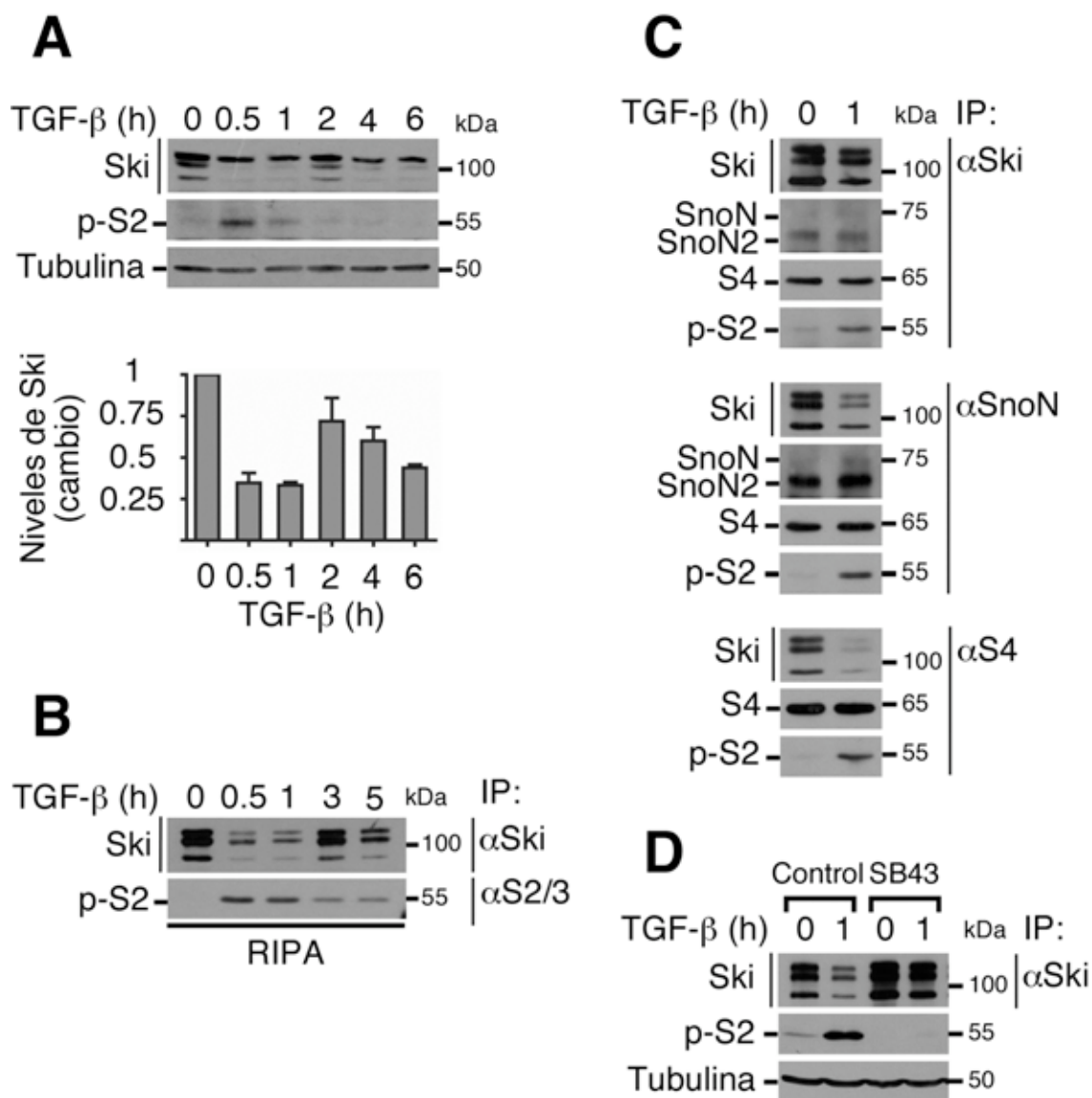


**Figura 7. La proteína Ski se localiza en la fracción insoluble a Tritón X-100.** (A) Localización de las proteínas Ski y SnoN en las fracciones solubles (SN) e insolubles (*pellet*) en la línea celular C9. Las células fueron incubadas en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF-β. Las fracciones solubles e insoluble se compararon con extractos lisados inicialmente con RIPA. La proteína Tubulina es utilizada como control de extracción de proteínas solubles. (B) Inhibición de la degradación de la proteína Ski mediada por TGF-β en las células C9. Las células se preincubaron por 4h con 25 μM de MG132 y fueron lisadas con solución de Tritón 0.5% (TNT) y RIPA. (C) Localización de la proteína Ski en las fracciones solubles e insolubles en la línea celular C9. Las células fueron preincubadas por 4 h con 25 μM de MG132 en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF-β. Las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot, con anticuerpos específicos anti-SnoN (SnoN/SnoN2), anti-Smad4 (S4), y anti-Smad2 (S2).

En este punto decidimos trabajar con las células C9, ya que tienen un comportamiento muy similar a los hepatocitos. También se decidió enfocarse en el estudio de Ski, ya que a diferencia de SnoN, Ski mostró una mayor localización en la fracción insoluble a Tritón X-100 y, probablemente, podría ser la proteína responsable de localizar a SnoN en la fracción insoluble. Para asegurarnos completamente que analizábamos un cambio más cuantitativo de los niveles de la proteína Ski, implementamos una nueva estrategia usando a las células C9. Se utilizó una solución de lisis con SDS al 1%, esta solución no deja ningún material insoluble. En células C9 confluentes se realizó un curso temporal con TGF-β, las células se lisaron con SDS al 1% y se analizaron los cambios en la cantidad total de la proteína Ski. Como está reportado, Ski es degradado por la señal de

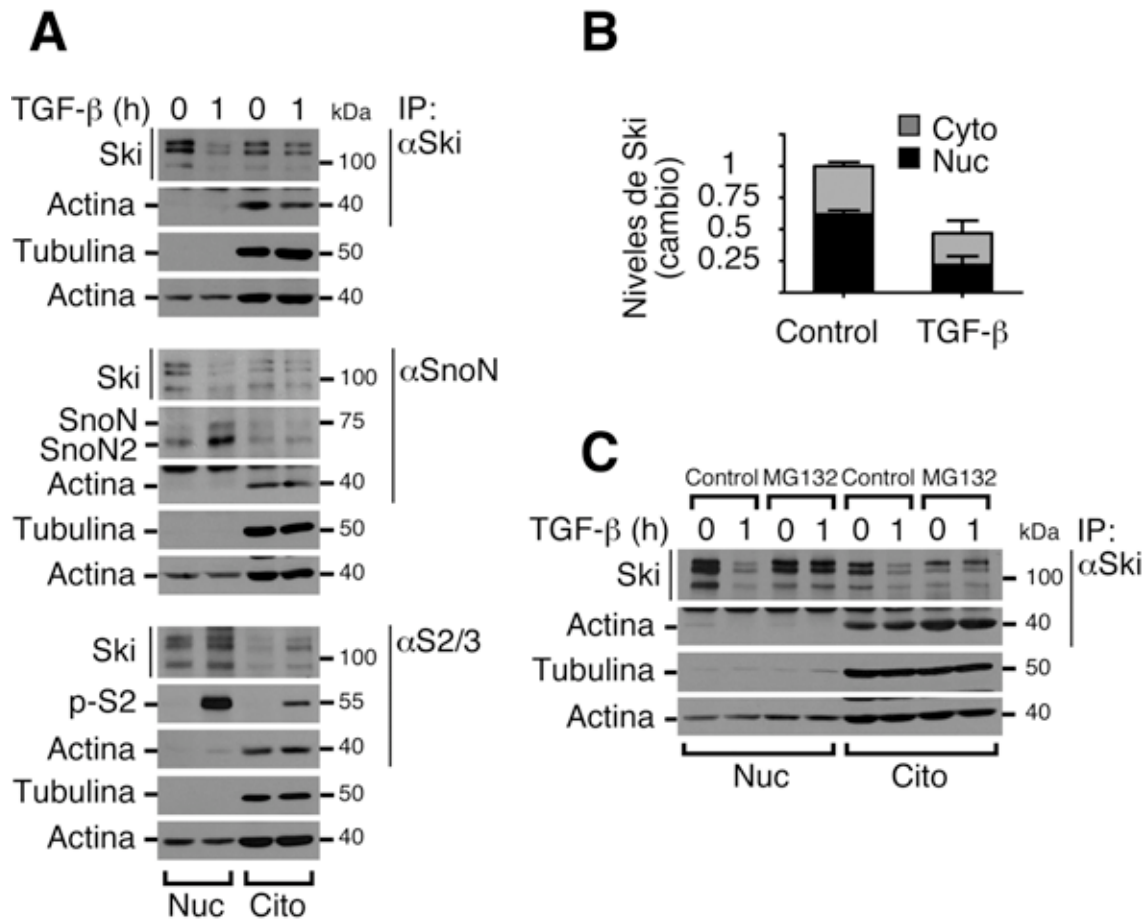
TGF- $\beta$  a partir de los 30 min de estímulo. Fue muy interesante observar un aumento en los niveles de Ski a partir de las 2 h del tratamiento con TGF- $\beta$  y una disminución de sus niveles a las 4 h (Figura 8A) de estímulo. Este incremento en los niveles de la proteína Ski ocurre aun cuando todavía se observa la fosforilación de Smad2 (p-S2), lo que sugiere que este aumento no está relacionado con la terminación de la señal del TGF- $\beta$ ; este efecto es muy similar a lo observado en los cultivos primarios de hepatocitos. Esta recuperación en los niveles de la proteína Ski que se observó, es un efecto similar a lo observado en el caso de SnoN, pero el mecanismo debe ser diferente, ya que en el caso de SnoN, su aumento se explica porque su gen es inducido por el TGF- $\beta$ , mientras que el gen de Ski no es blanco del TGF- $\beta$ .

En los ensayos posteriores, se obtuvieron datos muy similares extrayendo a las proteínas con SDS al 1% o con RIPA, aun cuando en el último caso se deja poco material insoluble; por lo tanto, se decidió utilizar la solución de lisis RIPA en la mayoría de los experimentos (Figura 8B). Estos datos nos confirman que la proteína Ski es degradada por TGF- $\beta$  en los hepatocitos, sin embargo, es necesario extraer toda la proteína presente en estas células (la proteína Ski soluble e insoluble a detergentes no iónicos) para hacer un análisis correcto en los cambios de los niveles de Ski. Con estas nuevas condiciones estudiamos la regulación de la proteína Ski por la señal del TGF- $\beta$ . Se analizaron los complejos de las proteínas Ski, SnoN, S4 y p-S2. Las células C9 confluentes se incubaron en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$ . Ski interacciona con las proteínas SnoN y S4 de manera basal mientras que esta proteína interacciona con p-S2 bajo el estímulo con TGF- $\beta$ . Este mismo efecto sucedió con la proteínas SnoN y S4 (Figura 8C). También se evaluó si la degradación de Ski por TGF- $\beta$  era dependiente de la activación de las R-Smads. Las células C9 confluentes se preincubaron con el inhibidor SB431542, inhibidor de la actividad del receptor T $\beta$ RI, en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$ . El inhibidor SB431542 bloqueó la fosforilación de la proteína Smad2 y la degradación de Ski por TGF- $\beta$  (Figura 8D). Con todos estos resultados podemos concluir que la señal del TGF- $\beta$  es capaz de degradar a la proteína Ski en los hepatocitos; la proteína Ski se localiza en una fracción insoluble a Tritón X-100 y esta localización podría enmascarar los efectos reales de la señal de TGF- $\beta$  u otras señales que regularan a esta proteína; y, por último, que esta nueva localización de Ski podría ser objeto de regulación.



**Figura 8. La señal del TGF- $\beta$  regulada negativamente a la proteína Ski en la línea celular C9.** (A) Superior: curso temporal con 0.2 nM de TGF- $\beta$  en las células C9. Las células fueron lisadas con solución de SDS al 1%. Las proteínas p-S2 y Tubulina son utilizadas como control de activación de la señal del TGF- $\beta$  y de carga, respectivamente. Inferior: densitometría de los cambios en los niveles en la proteína Ski. (B) Curso temporal con 0.2 nM de TGF- $\beta$  en las células C9. Las células fueron lisadas con solución de RIPA las proteínas Ski y p-S2 fueron analizadas por IP e inmunoblot (C) Interacciones entre las proteínas Ski, SnoN, S4 y p-S2 en las células C9 en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF- $\beta$ . Las células fueron lisadas en solución de RIPA. (D) Inhibición de la vía de señalización del TGF- $\beta$ . Las células C9 fueron preincubadas por 1h con 10  $\mu$ M de SB431542 (SB43). Las proteínas p-S2 y Tubulina son utilizadas como control de activación de la señal del TGF- $\beta$  y control de carga, respectivamente. Las proteínas y los complejos proteicos fueron analizados por IP e inmunoblot. SnoN: SnoN/SnoN2; Smad4: S4; Smad2 fosforilada: p-S2.

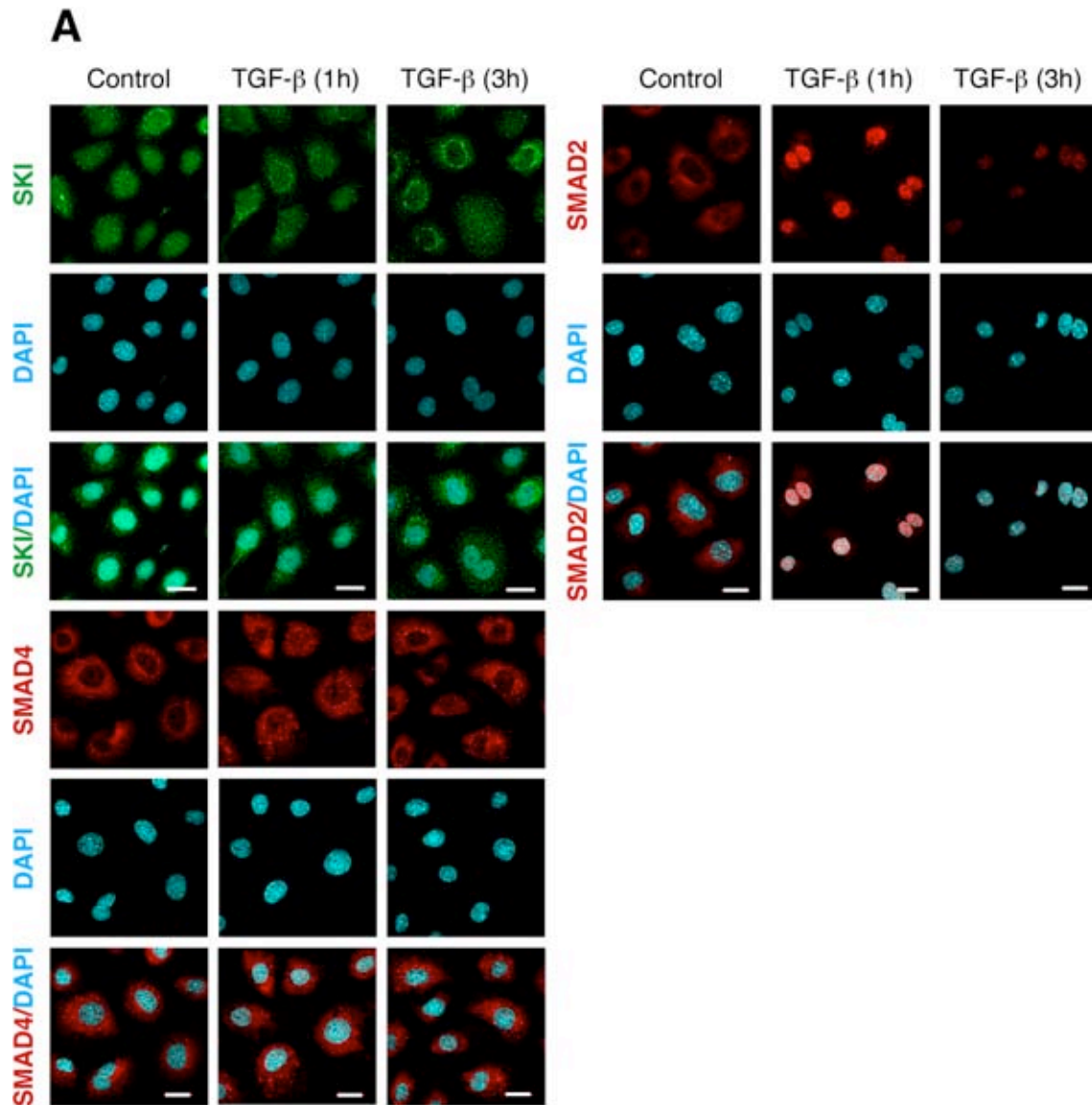
**5.2 La proteína Ski une a actina en el citoplasma.** Decidimos estudiar las características de la proteína Ski en la fracción insoluble a detergentes no iónicos, antes de buscar las señales celulares que podrían localizar a Ski en esta fracción. Hasta ese momento sabíamos que la localización de Ski en el material insoluble en Tritón X-100 podía ser influida por la inhibición del proteosoma 20S. Nuestra primera opción fue analizar la localización subcelular de Ski. Para este propósito, se realizó un ensayo de fraccionamiento de núcleo y citoplasma en las células C9 confluentes en condiciones control y con TGF- $\beta$ . Sorpresivamente, se encontró que la proteína Ski se localizaba en ambas fracciones; algo nunca reportado en células hepáticas. Aún más interesante fue el encontrar que Ski interactuaba con la proteína actina únicamente en la región citoplasmática (Figura 9A). Tanto en núcleo como en citoplasma la señal del TGF- $\beta$  es capaz de inducir la degradación de la proteína Ski (Figura 9B). Posteriormente, para comprobar que la porción de la proteína Ski presente en la fracción insoluble en Tritón X-100 era parte de la proteína localizada en citoplasma, decidimos evaluar los efectos del inhibidor MG132, compuesto capaz de movilizar a Ski al material insoluble. Se preincubaron células C9 confluentes con el inhibidor MG132 en condiciones control y estimuladas con TGF- $\beta$  y, posteriormente, se separaron las fracciones nuclear y citoplasmática. Se observó que el MG132 bloqueó la degradación de Ski por la señal del TGF- $\beta$  y, además, aumentó su interacción con la proteína actina (Figura 9C). También se observó la localización de las proteínas SnoN y p-S2 en el citoplasma, en donde interactúan con las proteínas Ski y actina (Figura 9A). Estos resultados confirman que una fracción de la proteína Ski está presente en el material insoluble a detergente, fracción que se localiza en el citoplasma y es capaz de interactuar con la proteína actina, una interacción que se enriquece por la inhibición del proteosoma.



**Figura 9. La proteína Ski une a Actina en el citoplasma en la línea celular C9.** (A) Fraccionamiento de núcleo (Nuc) y citoplasma (Cito) en las células C9. Las células se incubaron en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF- $\beta$ . Todas las fracciones fueron lisadas con solución de RIPA. La proteína Tubulina se utilizó como control de fraccionamiento (citoplasma) mientras la proteína Actina se utilizó como control de carga. (B) Densitometría de la distribución de la proteína Ski en núcleo y citoplasma en condiciones control y de estimulación con TGF- $\beta$ . (C) Fraccionamiento de núcleo y citoplasma en células C9 preincubadas por 4h con 25  $\mu$ M de MG132 en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF- $\beta$ . La proteína Tubulina se utilizó como control de fraccionamiento (citoplasma). Las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot. SnoN: SnoN/SnoN2; Smad2/Smad3: S2/3; Smad2 fosforilada: p-S2.

No obstante que sabíamos que Ski estaba presente en el citoplasma interaccionando con la proteína actina, en una fracción insoluble al Tritón X-100, era importante evaluar si la proteína Ski mostraba una localización en estructuras relacionadas a filamentos de actina dentro del citoplasma. Muchas proteínas de unión a actina se localizan en este tipo de fracciones. Para investigar este punto hicimos uso de la técnica de inmunofluorescencia (IF). Ya se había reportado que Ski podía observarse por esta

técnica en células de Schwann utilizando los mismos anticuerpos que empleamos en el laboratorio (Jacob *et al.*, 2008). Se utilizaron células C9 subconfluentes en condiciones controles o estimuladas con TGF- $\beta$  en los tiempos en donde se observa la disminución y la recuperación de los niveles de la proteína Ski (0h, 1h y 3h con TGF- $\beta$ ). Primeramente se observó que Ski mostraba un patrón puntado, tipo vesicular, en lugar de una localización tipo filamentosa en el citoplasma. El tratamiento con TGF- $\beta$  disminuyó los niveles de Ski en ambas fracciones (núcleo y citoplasma) a 1 h de estímulo, y Ski se localizó en la región perinuclear a las 3 h de incubación (Figura 10A). También se analizó la localización de las proteínas S2 y S4 para evaluar la activación de la vía. La proteína S2 mostró una clara translocación hacia núcleo después de 1 h de estímulo con TGF- $\beta$ , mientras la proteína S4 no mostró una clara relocalización.



**Figura 10. Localización subcelular de las proteínas Ski, Smad2 y Smad4 en la línea celular C9.** (A) Coinmunolocalización de las proteínas Ski (verde), Smad2 (rojo) y Smad4 (rojo) en las células C9 por microscopía confocal. Células subconfluentes fueron incubadas en condiciones control y de estimulación con 0.2 nM de TGF- $\beta$  a diferentes tiempos. El compuesto DAPI fue utilizado como marcador de núcleo.

### 5.3 Ski se localiza en membranas resistentes a detergente (DRMs) o lipid rafts.

Existen vesículas cuya composición o transporte están influenciadas por los cambios en el citoesqueleto de actina. Estas vesículas, o endosomas, poseen características particulares en los lípidos que las componen así como en las proteínas presentes en sus membranas. Un componente esencial de estos endosomas son las balsas Lipídicas o *lipid rafts* que, con proteínas como la actina, le dan una gran estabilidad a este tipo de membranas. Estas membranas suelen ser insolubles a detergentes no iónicos y esto

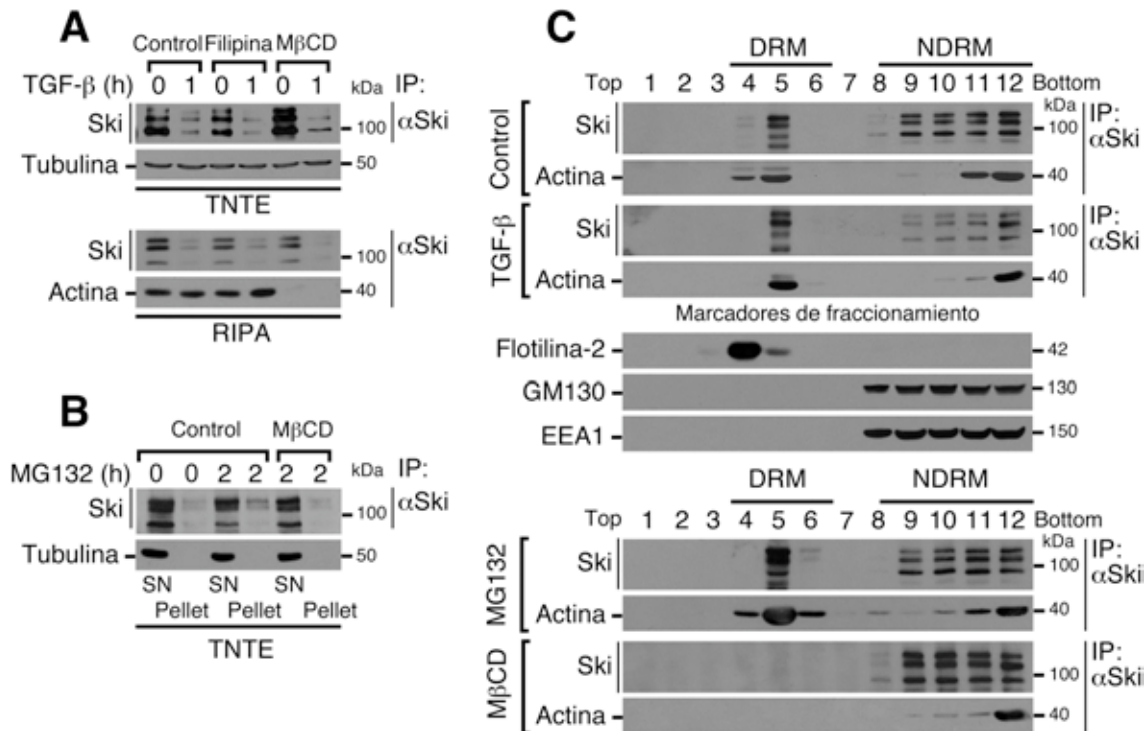
puede explicar la presencia de la proteína Ski tanto en la fracción insoluble al detergente Tritón X-100 como su interacción con la proteína actina. Para comprobar si Ski se localizaba en este tipo de endosomas realizamos experimentos bioquímicos quitando el colesterol, lípido esencial para mantener la estructura de los *lipid rafts*, de las membranas de los hepatocitos. Existen en la literatura dos moléculas capaces de atrapar el colesterol de las membranas celulares: filipina y metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD). Las moléculas de filipina atrapan con mayor eficiencia al colesterol asociado a la membrana plasmática, mientras que la M $\beta$ CD quita el colesterol eficientemente en todas las membranas.

Nuestra primera aproximación fue evaluar los cambios en la solubilidad de Ski, preincubando a las células C9 confluentes con filipina o M $\beta$ CD en condiciones controles o estimuladas con TGF- $\beta$ . Estas células se lisaron con TNTE (Tritón X-100 al 0.5%) lo que nos permitió evaluar solamente la fracción soluble a detergente. Como se esperaba, el detergente M $\beta$ CD solubilizó a la proteína Ski, esto se reflejó como un aumento en los niveles de Ski en la fracción extraída por el detergente no iónico (Figura 11A, panel superior). La siguiente aproximación fue realizar el mismo diseño experimental, pero esta vez, lisando a las células con RIPA. En esta ocasión no se observó un cambio evidente en los niveles de la proteína Ski, sin embargo, la M $\beta$ CD rompió la unión de Ski con la proteína actina (Figura 11A, panel inferior). Para confirmar que la presencia de la proteína Ski en membranas ricas en colesterol está asociada con su localización al material insoluble en Tritón X-100, realizamos el siguiente experimento: células C9 confluentes fueron preincubadas con la M $\beta$ CD y, posteriormente, se incubaron con el inhibidor MG132. Como hemos demostrado previamente, el MG132 localiza a Ski en la fracción insoluble a detergente, por lo tanto, la M $\beta$ CD debería impedir esta localización. Como se esperaba, la preincubación con M $\beta$ CD impidió la acumulación de Ski en el material insoluble a Tritón X-100 (Figura 11B). Estos datos demuestran que la proteína Ski se localiza en membranas ricas en colesterol y que estas son las responsables de que Ski se encuentre en la fracción insoluble a detergente.

Hasta ese momento sabíamos que Ski se localizaba en membranas ricas en colesterol, no obstante, faltaba ver si la proteína Ski se localizaba en *lipid rafts*. Para determinar sí



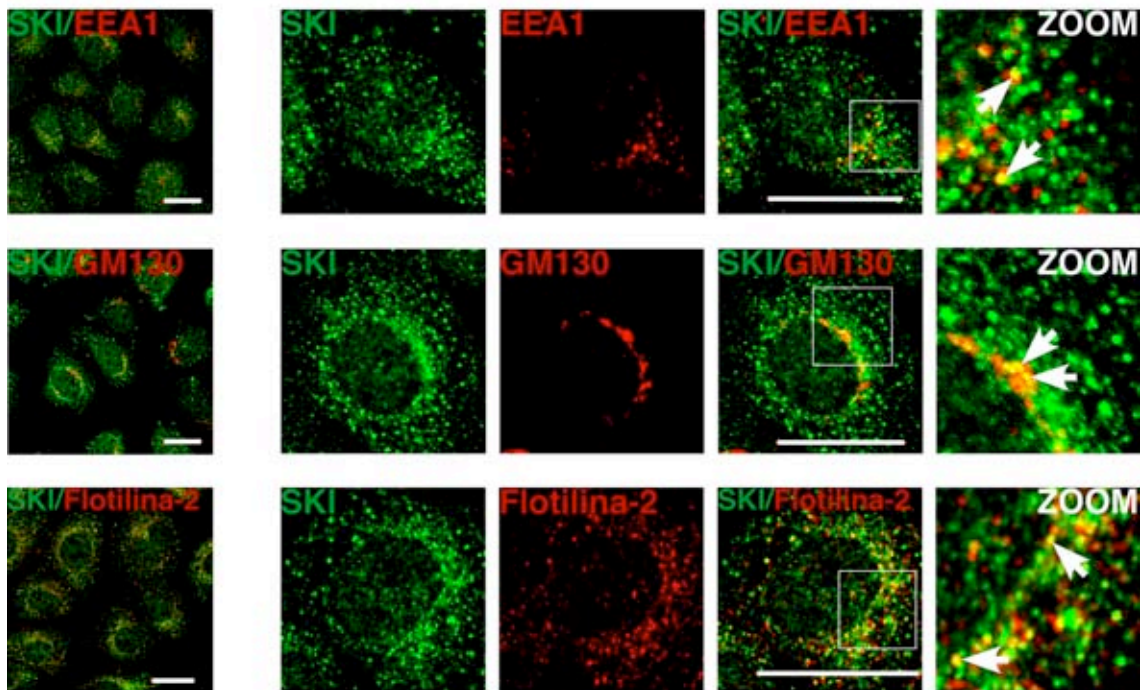
Ski estaba presente, o no, en *lipid rafts* utilizamos la técnica de asilamiento de las membranas resistentes a detergente (DRM, por sus siglas en inglés). Es la prueba bioquímica más utilizada para determinar si una proteína se encuentra dentro de este tipo de membranas. Se utilizaron células C9 confluentes en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$ . Las células se lisaron con Tritón al 1% y las DRM se aislaron mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. Como se había predicho, la proteína Ski se localizó en las fracciones correspondientes para las DRM, las cuales no son tan sensibles a la señal del TGF- $\beta$ , en comparación con las fracciones no resistentes a detergentes o NDRM (Figura 11C, panel superior). La proteína Flotilina-2, es una proteína transmembranal exclusiva de *lipid rafts*; mientras que EEA1 (endosomas tempranos) y GM130 (aparato de Golgi) son proteínas transmembranales de membranas presentes en endosomas tempranos y Golgi, respectivamente. Para confirmar que Ski se localizaba en las fracciones de las DRM, se hizo uso nuevamente del detergente M $\beta$ CD. Las células C9 confluentes se preincubaron con la M $\beta$ CD y, posteriormente, se aislaron las DRM. La M $\beta$ CD removió a la proteína Ski de las DRM y esto confirmó la presencia de una fracción del total de la proteína Ski en los *lipid rafts* (Figura 11C, panel inferior). Para reconfirmar la presencia de Ski en las DRM, se preincubaron células C9 confluentes con el inhibidor MG132. La inhibición del proteosoma enriqueció la localización de Ski en las DRM. Este es la primera vez que se reporta la presencia en *lipid rafts* de algún miembro de la familia de la proteína Ski. Con estos datos concluimos que una fracción de la proteína Ski se localiza específicamente en *lipid rafts*, probablemente en endosomas, y esta localización le permite interactuar con la proteína actina.



**Figura 11. La proteína Ski se localiza en las membranas resistentes a detergente (DRM) o lipid rafts.** (A) Efectos de la salida del colesterol de la membranas celulares en la proteína Ski. Las células C9 fueron preincubadas por 4h con 2.5  $\mu$ M de Filipina y 2.5 mM de M $\beta$ CD en condiciones controles y estimuladas con 0.2 nM de TGF- $\beta$ . Las células fueron lisadas con Tritón al 0.5% (TNTE) o RIPA. La proteína Tubulina se utilizó como control de carga. (B) Inhibición de la localización de Ski en la fracción insoluble a detergente. Las células C9 se preincubaron por 4h con 2.5 mM de M $\beta$ CD y, posteriormente, se adicionó 25  $\mu$ M de MG132 por 2h. Las células se lisaron en TNTE y la fracción insoluble (*pellet*) se resuspendió en RIPA. La Tubulina se utilizó como marcador de extracción de proteínas solubles. (C) Aislamiento de las DRM en la células C9. Las células se incubaron en condiciones de control y de estimulación con 0.2 nM de TGF- $\beta$ , 25  $\mu$ M de MG132, 2.5 mM M $\beta$ CD. Las células fueron lisadas en Tritón al 1%; se hicieron fraccionamientos discontinuos de sacarosa (fracciones del 1-12) con cada uno de los extractos. Las fracciones 4, 5 y 6 corresponden a las DRM y las fracciones 9, 10, 11 y 12 corresponde a las membranas no resistentes a detergente (NDRM). La proteína Flotilina-2 se utilizó como marcador específico de DRM (*lipid rafts*) mientras que las proteínas EEA1 y GM130 se utilizaron como marcadores de proteínas membranales localizadas en NDRM. Las distribución de las proteínas fue analizadas por IP e inmunoblot. *Top*: parte superior; *Bottom*: fondo.

**5.4 Ski se localiza en endosomas multivesiculares (MVE), y la señal de TGF- $\beta$  promueve su localización en estas estructuras.** Para confirmar que la proteína Ski se localizaba en endosomas enriquecidos en *lipid rafts* hicimos nuevamente uso de la técnica de IF. Se había reportado que la proteína Ski se localizaba en vesículas positivas

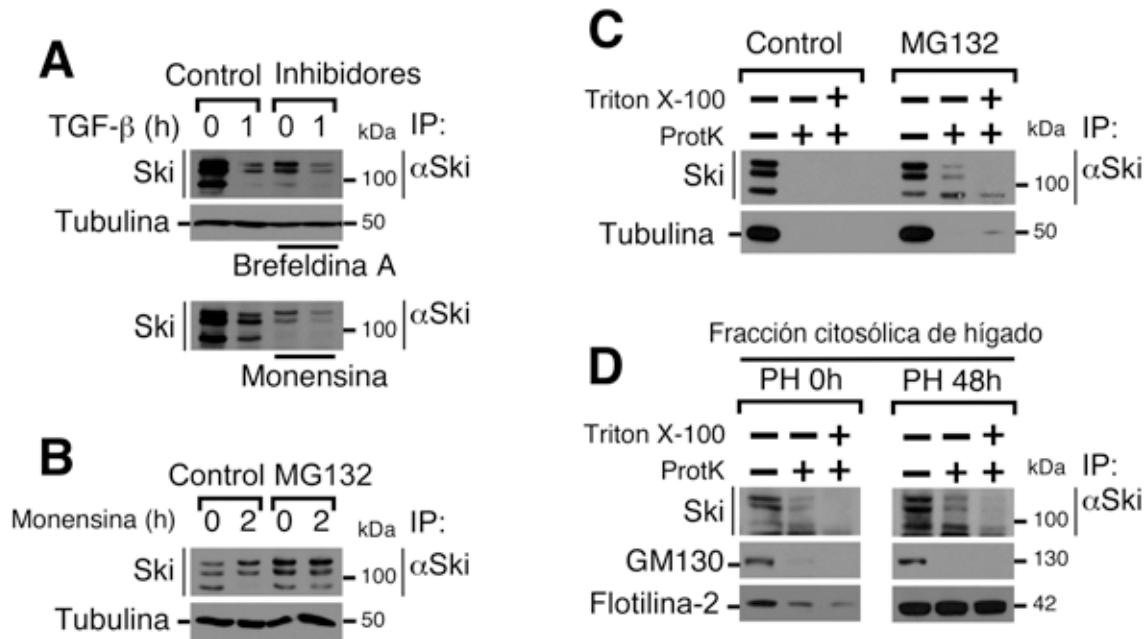
a marcadores de endosomas tempranos (EEA1) en células de Schwann (Jacob *et al.*, 2008). Así que empezamos analizando si se conservaba esta característica. Se utilizó el mismo marcador de endosomas tempranos. Para nuestra sorpresa, se observó muy poca colocalización de Ski con la proteína EEA1 en células C9 subconfluentes (Figura 12A); aunque siguiendo la línea de nuestros datos no se esperaba una fuerte localización con este tipo de endosomas, que son vesículas poco enriquecidas con *lipid rafts*. Debido a que Ski no se comportaba como se sugería, decidimos evaluar otro tipo de endosomas. Dentro del transporte vesicular existen una gran variedad de endosomas que contienen *lipid rafts*. Haciendo una evaluación general, se analizaron endosomas provenientes del aparato de Golgi y endosomas marcados con proteínas asociadas a *lipid rafts*. Se analizaron dos proteínas: la proteína GM130, marcador de la región Trans del aparato de Golgi, y la proteína flotilina-2, asociada a membranas ricas en colesterol. Se observó que la proteína Ski colocalizaba con ambas proteínas en células C9 subconfluentes (Figura 12A). Aunque esta colocalización no es abundante nos indicaba que la proteína Ski podría localizarse con endosomas que contienen *lipid rafts*.

**A**

**Figura 12. La proteína Ski colocaliza Flotilina-2 y GM130 en endosomas.** (A) Coinmunolocalización de la proteína Ski (verde) y de las proteínas EEA1, GM130, Flotilina-2 (rojo) en células C9 subconfluentes por microscopía confocal. La proteína EEA1 es marcador de endosomas tempranos; la proteína GM130 es marcador de la región Trans del aparato de Golgi y Flotilina-2 es marcador de endosomas con DRM o *lipid rafts*. Las flechas indican los puntos de colocalización de ambos fluorocromos. La escala es una representación de 20  $\mu\text{m}$ .

Existe un tipo de transporte que se ajustaba a los datos bioquímicos encontrados en el laboratorio. Este transporte es el reportado por Tealman *et al.* en 2010, donde describe la regulación de la proteína GSK3 $\beta$  por los endosomas multivesiculares (MVE). Por lo tanto, decidimos analizar el efecto de los inhibidores del transporte vesicular tales como brefeldina A y monensina. Muchas proteínas presentes en los MVE responden a los cambios en el transporte vesicular. Ambos inhibidores regularon negativamente los niveles de la proteína Ski e hicieron más evidente el efecto de TGF- $\beta$  en las células C9 (Figure 13A). Esta disminución de los niveles de Ski es dependiente de la degradación vía el proteosoma (Figure 13B). Sin embargo, para comprobar que Ski se localizaba realmente en los MVE realizamos el ensayo de protección a la proteínasa K (PPA, por sus siglas en inglés). Este ensayo permite dilucidar si una proteína se encuentra envuelta en alguna membrana como es el caso de las proteínas presentes en los MVE; por tanto, sí

la proteína Ski se encontraba en los MVE sería protegida de la acción de la proteínasa K (ProtK). Se utilizaron células C9 confluentes en condiciones controles y incubadas con MG132, este último se utilizó en el caso de que la presencia de Ski en los MVE fuera un proceso transitorio y se necesitara de la acumulación de Ski en este tipo de endosomas a través de la inhibición del proteosoma. No se observó ninguna protección de Ski a la actividad de la ProtK en las células controles, sin embargo, se encontró una clara protección de Ski en las células C9 incubadas con el inhibidor MG132 (Figura 13C). Para confirmar la localización de Ski en los MVEs regresamos al modelo inicial, la regeneración hepática, donde una fracción de la proteína Ski total se localizaba en el material insoluble al detergente Tritón X-100. Para nuestra sorpresa, se observó la protección de la proteína Ski a la acción de la ProtK en extractos citoplasmáticos de hígados en regeneración (Figura 13D); aunque también se observó una protección en los extractos de hígados controles, la protección a la ProtK en los hígados en proceso de regeneración fue mucho mayor. En conclusión, estos hallazgos nos permitieron estudiar más afondo la localización de Ski en los MVE.

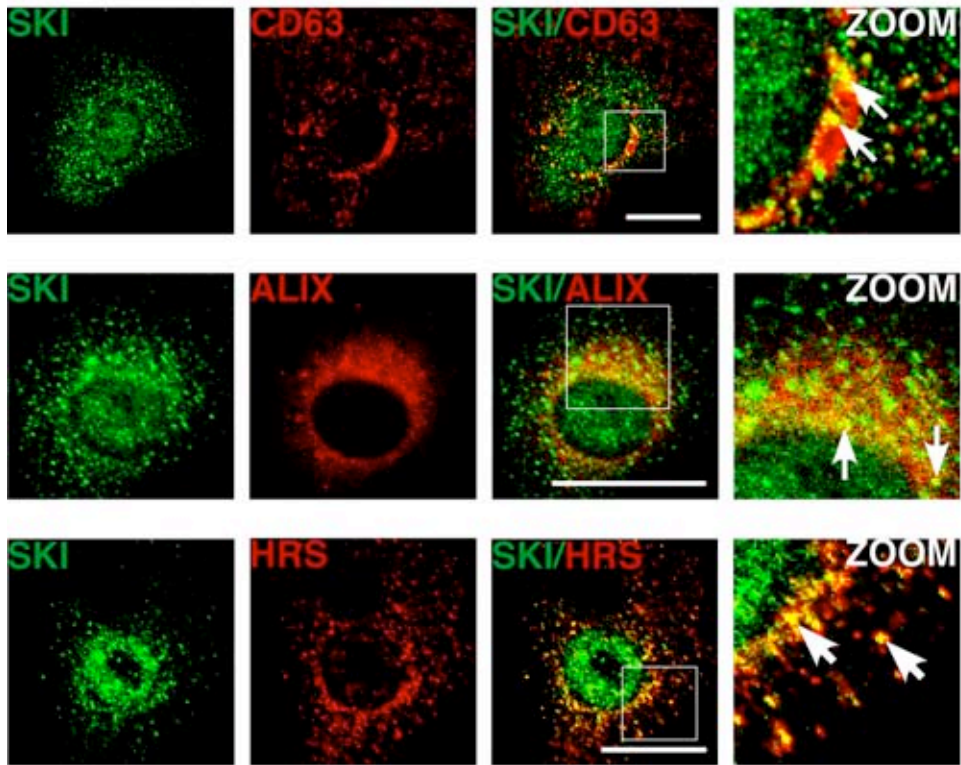


**Figura 13. El transporte vesicular regula la estabilidad de la proteína Ski** (A) Efecto de los inhibidores del transporte vesicular. Las células C9 se incubaron por 2 horas en condiciones controles y con 20 nM de Brefeldina A o 20  $\mu$ M de Monensina. La Brefeldina A es un inhibidor del transporte en el aparato de Golgi y el compuesto Monensina inhibe el transporte de endosomas. (B) Inhibición de la degradación de Ski por Monensina. Las células C9 se preincubaron por 2h con 25  $\mu$ M de MG132 y, posteriormente, se incubaron con 20  $\mu$ M de Monensina. (C) Ensayo de protección a la proteinasa K (PPA). Se rompieron las membranas plasmáticas de las células C9 en condiciones controles e incubadas por 4h con 25  $\mu$ M de MG132. Los extractos se dividieron en 3 condiciones: control, incubadas con proteinasa K e incubadas con proteinasa K más Tritón al 0.1%. La proteína Tubulina se utilizó como control de proteína no protegida. (D) Ensayo de PPA en extractos citoplasmáticos de hígados normales y en proceso de regeneración. Los extractos citoplasmáticos se incubaron en las condiciones control, incubados con proteinasa K e incubados con proteinasa K más Tritón al 0.5%. Las proteínas GM130 y Flotilina-2 se utilizaron como marcadores de proteínas no protegidas y protegidas, respectivamente. Los cambios en los niveles de las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot.

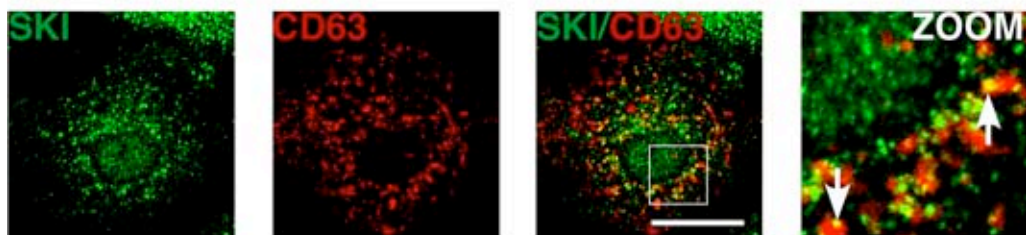
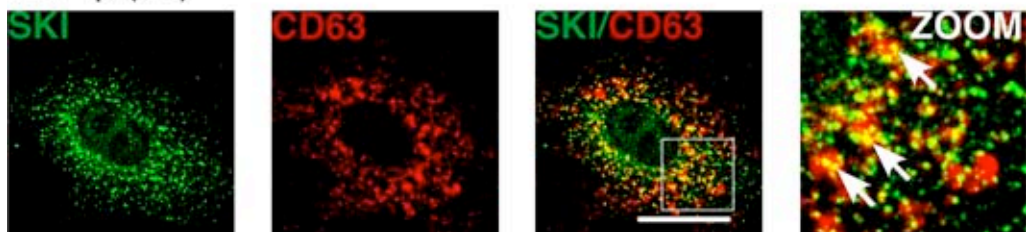
Existen varios marcadores de MVE de los cuales se seleccionaron 4 proteínas: la proteína HRS, perteneciente al complejo ESCRT 0; la proteína TSG101, que forma parte del complejo ESCRT I; la proteína ALIX, miembro del complejo ESCRT III y la proteína CD63, tetraspanina localizada en los MVE y exosomas. Lamentablemente, la proteína TSG101 no pudo ser identificada en las células C9 por ninguna de las metodologías que empleamos. Todas estas proteínas están relacionadas con el transporte o la formación de los MVE. Se utilizaron células C9 subconfluentes y se buscó la

colocalización de Ski con estos 3 marcadores. En el caso particular de la proteína HRS fue localizada con la técnica de IF. Ski mostró una fuerte colocalización con HRS en la región perinuclear de las células (Figura 14A). En el caso de las proteínas ALIX y CD63, se tuvo que utilizar la expresión de ambas proteínas exógenas marcadas con la proteína fluorescente mCherry debido a que no poseíamos anticuerpos específicos para estos marcadores. La localización de la proteína Ski se analizó por la técnica de IF en células C9 que expresaban transitoriamente a las proteínas ALIX o CD63. Interesantemente, se observó claramente la colocalización de Ski con ambas proteínas y, al igual que con HRS, en la región perinuclear de las células (Figura14A). Por último, se evaluó el efecto de la señal del TGF- $\beta$  en la colocalización de la proteína Ski en los MVE. Se utilizaron células C9 expresando transitoriamente a la proteína CD63 en condiciones controles y estimuladas con TGF- $\beta$  por 3 h; en este tiempo la proteína Ski se localiza en la región perinuclear durante la estimulación con TGF- $\beta$ . Claramente, la señal del TGF- $\beta$  enriqueció la colocalización de Ski con la proteína CD63 (Figura 14B). Todos estos datos demuestran que la proteína Ski se localiza en endosomas multivesiculares y, como señal fisiológica diferente al uso del inhibidor MG132, el TGF- $\beta$  enriquece esta localización. Aunque falta por entender a detalle el transporte de Ski en estas estructuras y la función de esta localización, es importante señalar que es la primera vez que se estudia más a fondo el transporte y las características de la proteína Ski en el citoplasma.



**A****B**

Control

TGF- $\beta$  (3h)

*Figura 14. La señal del TGF- $\beta$  acumula a la proteína Ski en los endosomas multivesiculares (MVE).*

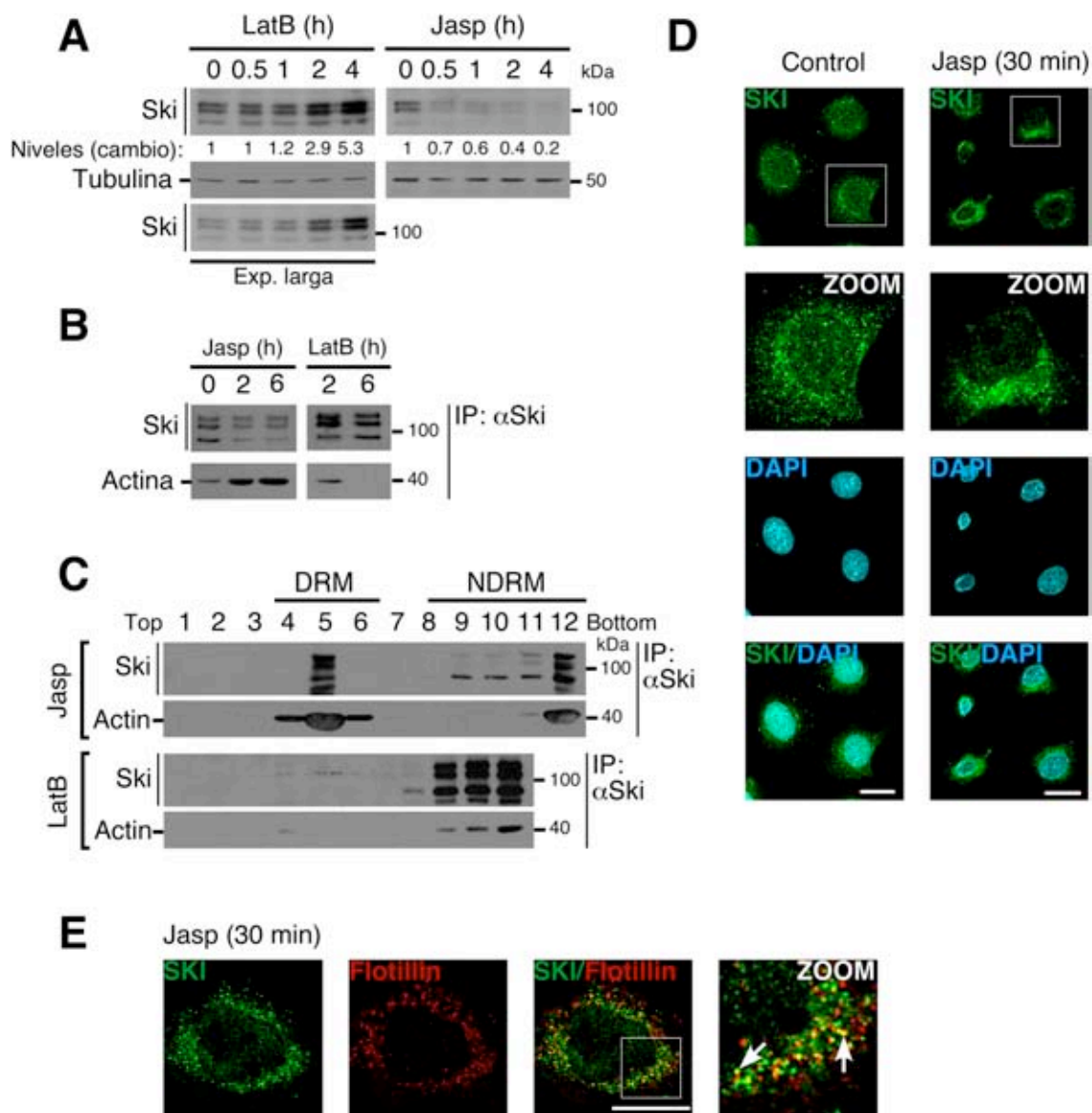
(A) Coinmunolocalización de la proteína Ski (verde) y de las proteínas CD63, ALIX, HRS (rojo) en células C9 subconfluentes por microscopía confocal. Las proteínas CD63-mCherry y mCherry-ALIX



fueron expresadas transitoriamente. La proteína HRS es marcador de endosomas previos a los MVE; las proteínas CD63 y ALIX son marcadores específicos de MVE (B) Coinmunolocalización de la proteína Ski (verde) y la proteínas CD63 (rojo) por microscopia confocal, en células C9 en condiciones control y estimuladas con 0.2 nM de TGF- $\beta$ . La proteína CD63-mCherry fue expresada transitoriamente. Las flechas indican los puntos de colocalización de ambos fluorocromos. La escala es una representación de 20  $\mu$ m.

**5.5 La estabilidad de la proteína Ski es regulada por cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina.** Después de estudiar la localización de Ski en el citoplasma nos enfocamos en otro aspecto, la regulación de la proteína Ski debido a esta nueva característica de su unión con la proteína actina. Aunque Ski no mostró ningún patrón filamentoso en los ensayos de IF no se descartaba la influencia de la dinámica del citoesqueleto de actina sobre la proteína Ski. Primero evaluamos los efectos en los niveles de la proteína Ski por agentes moduladores de la polimerización de actina en los hepatocitos. Latrunculina B (LatB) es una molécula que estabiliza los monómeros de actina (G-actin), mientras que jasplakinolida (Jasp) es un compuesto que impide la despolimerización de los filamentos de actina (F-actina), dándoles estabilidad. Se realizó un curso temporal con ambos moduladores en células C9 confluentes. Las células se lisaron con la solución de lisis de SDS al 1% para analizar los cambios en los niveles de la proteína Ski, asegurando una extracción completa de toda la proteína. Para nuestra gran sorpresa, el compuesto LatB aumentó considerablemente los niveles de la proteína Ski después de las 2 h de incubación mientras el modulador Jasp disminuyó los niveles de Ski a partir de los 30 min (Figura 15A). Esta disminución en los niveles de la proteína Ski es mediada por la degradación vía el proteosoma 20S, debido a que la preincubación con el inhibidor MG132 bloqueó la disminución de los niveles de Ski mediada por Jasp en las células C9. También se observó en células C9 confluentes que los moduladores Jasp y LatB modulan la interacción de Ski con la proteína actina, observándose claramente que LatB rompe con esta interacción (Figura 15B). Al descubrir esta nueva regulación en la estabilidad de la proteína Ski por la formación de G-actina o F-actina, decidimos evaluar los efectos de estos dos moduladores en su interacción con la proteína actina y su localización en las DRM. Interesantemente, en el caso de la incubación con LatB, se observó la salida de la proteína Ski de las fracciones correspondientes a las DRM junto con un enriquecimiento de Ski en las fracciones NDRM. En el caso del modulador Jasp, la incubación con este compuesto localizó a Ski en las DRM (*lipid rafts*) y disminuyó los niveles de la proteína Ski en las NDRM

(Figura 15C). Estos datos demostraron que cambios en el estado del citoesqueleto de actina por moduladores químicos ejercen cambios en la estabilidad, interacción con actina y localización de la proteína Ski. Finalmente, evaluamos los efectos del modulador Jasp mediante la técnica de IF. Las células C9 subconfluentes fueron incubadas con Jasp a tiempos cortos (30 min). La incubación con Jasp provocó la localización Ski en la región perinuclear de las células (Figura 15D). Esto correlaciona con nuestros datos bioquímicos donde la interacción de Ski con actina ocurre únicamente en el citoplasma y es fomentada por la formación de F-actina. También se busco la colocalización de Ski con la proteína flotilina-2 en células incubadas con Jasp, esto para confirmar que la proteína Ski acumulada en el perinúcleo corresponde también a la fracción de Ski presente en los *lipid rafts*. Interesantemente, la proteína Ski localizada en la región perinuclear colocalizó con la señal correspondiente a la proteína flotilina-2 (Figura 15E). Lamentablemente, no se pudo obtener la colocalización de Ski con F-actina, como en el experimento con MG132, debido a que el compuesto *phalloidin* compite con Jasp por la unión a los filamentos. Estos resultados nos indicaron que probablemente señales fisiológicas que regularan la dinámica del citoesqueleto de actina tendrían un impacto en la estabilidad de la proteína Ski en los hepatocitos.

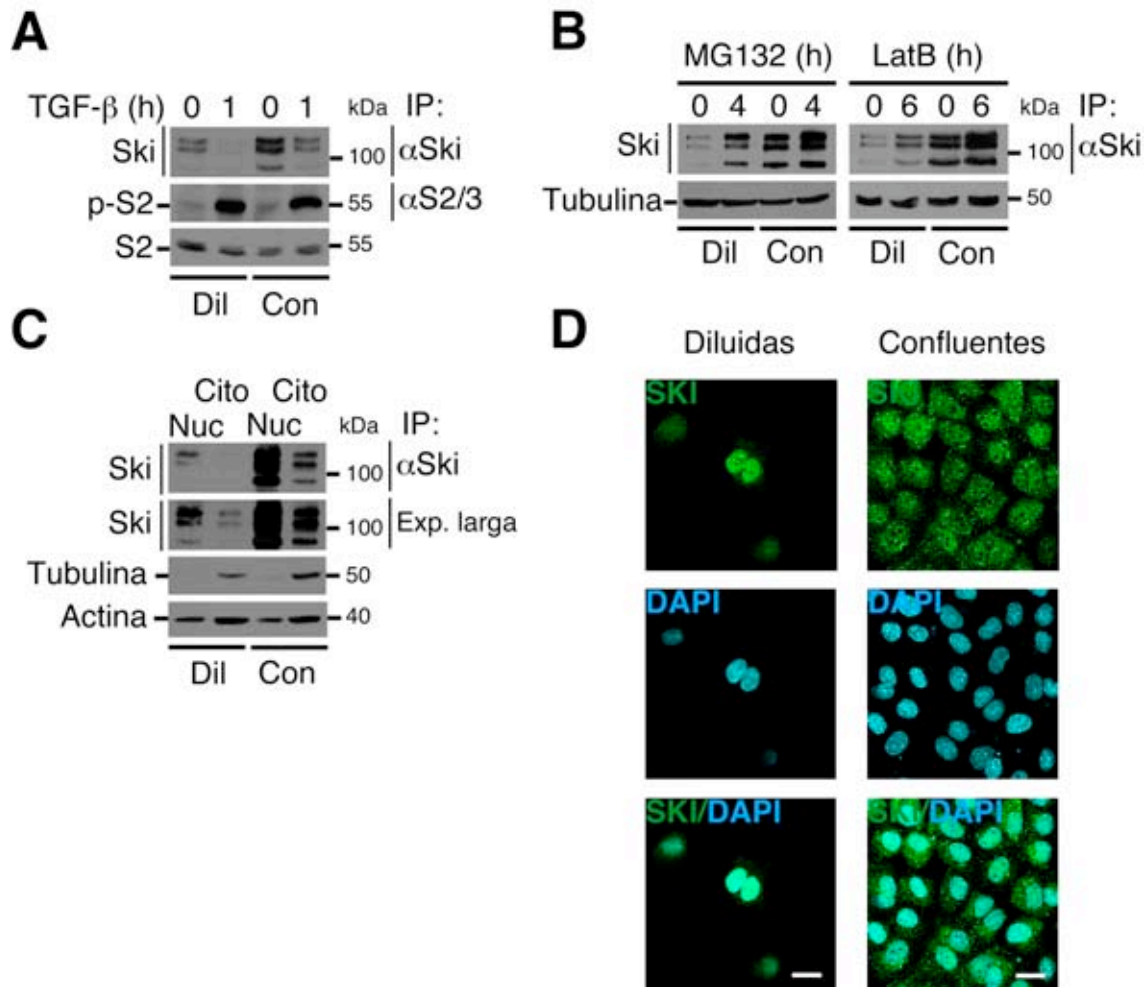


**Figura 15. Los cambios en el citoesqueleto de actina regula la estabilidad de la proteína Ski en la línea celular C9.** (A) Regulación de la estabilidad de la proteína Ski por la formación de monómeros de actina (G-actina) o la formación de filamentos de actina (F-actina). Las células C9 confluentes fueron incubadas con latrunculina B (LatB), estabilizador de G-actina, y jasplakinolida (Jasp), estabilizador de F-actina, a diferentes tiempos; las células se lisaron en solución de SDS al 1%. La proteína Tubulina se utilizó como control de carga. (B) Interacción de la proteína Ski con actina en las células C9. Las células en condiciones control e incubadas con 1  $\mu$ M de LatB y 0.5  $\mu$ M de Jasp se lisaron con solución de RIPA. (C) Aislamiento de las DRM las células C9 incubadas por 6 horas con los moduladores LatB y Jasp. (D) Immunolocalización de la proteína Ski (verde) por microscopia confocal en condiciones controles e incubadas por 30 min con Jasp en células C9. El compuesto DAPI fue utilizado como marcador de núcleo. (E) Coinmunolocalización de la proteína Ski (verde) y la proteína Flotilina-2 (rojo) por microscopia confocal en las células C9 incubadas por 30 min con Jasp. Las flechas indican los puntos de colocalización de ambos fluorocromos. La escala es una representación de 20  $\mu$ m. Los cambios en los niveles de las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot.

Una de las señales más influyentes en la dinámica del citoesqueleto de actina (la estabilización de G-actina o la formación de F-actina) en las células epiteliales, como es el caso de los hepatocitos, son las uniones intercelulares, o uniones célula-célula. Mientras más células existan alrededor de una célula en particular, más uniones formará esa célula; esto es lo que llamamos estado de confluencia. Las células que poseen uniones intercelulares en todos sus lados (confluentes) tiene una mayor cantidad de G-actina mientras que las células que tienen pocas uniones intercelulares porque están muy alejadas unas de las otras (dispersas) tienden a polimerizar su citoesqueleto de actina y aumentan sus niveles de F-actina. Teniendo conocimiento de esto nos decidimos a evaluar los cambios en la estabilidad de la proteína Ski en condiciones dispersas o confluentes en los hepatocitos. Se utilizaron células C9 dispersas o en condiciones de confluencia y, en condiciones controles y estimulados con TGF- $\beta$ . Como se había predicho, en la condición de células dispersas (más F-actina) los niveles de Ski son muy bajos en comparación con la condición de confluencia (más G-actina) donde los niveles de la proteína Ski son muy abundantes (Figura 16A). La fosforilación de Smad2 es de la misma intensidad en ambos casos, lo cual se relaciona con lo que había reportado previamente Godoy *et al.*, en hepatocitos en cultivo, en donde la fosforilación de Smad2 no varía independientemente de las condiciones de cultivo. Para corroborar que esta regulación en la estabilidad de Ski es a través de los cambios en el estado del citoesqueleto de actina y, probablemente, mediante el uso de sistema UPS, utilizamos el modulador LatB y el inhibidor MG132, respectivamente, en condiciones de confluencia y de células dispersas. Ambos compuestos aumentaron los niveles de la proteína Ski en la condición de células dispersas aunque, en el caso de LatB, este aumento no alcanzó los niveles basales correspondientes a la condición de confluencia; (Figura 16B). Al no poder restablecerse completamente los niveles de Ski en las células en dispersión por el uso del compuesto LatB, esto nos sugiere que los niveles de Ski podrían ser controlados por otro tipo de señales independientes a la dinámica del citoesqueleto de actina.

Por último, se analizaron los efectos de los cambios en el estado del citoesqueleto de actina sobre la localización de la proteína Ski. Existen reportes en la literatura que demuestran que Ski puede relocalizarse en la célula por señales como el TGF- $\beta$  o procesos como la división celular (Marcelain *et al.*, 2005). Para evaluar si la proteína Ski era localizada en alguna región en particular por los cambios en el citoesqueleto de

actina, realizamos experimentos de fraccionamiento en células C9 en condiciones de células dispersas y de confluencia. Se observó que los niveles de la proteína Ski disminuyeron en las células dispersas en comparación con los niveles observados en las células en estado de confluencia, sin embargo, Ski muestra la misma distribución en ambas condiciones (Figura 16C). También hicimos uso de la técnica de IF. Se utilizaron células C9 en condiciones de células dispersas y de confluencia para confirmar esta acumulación de Ski tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células C9. Las células confluentes mostraron una señal más fuerte para la proteína Ski y esta acumulación de la proteína se distribuyó tanto en núcleo como en el citoplasma mientras que en las células dispersas Ski mostró una señal prácticamente nuclear (Figura 16D).



**Figura 16. La confluencia celular regula la estabilidad de la proteína Ski.** (A) Regulación en la estabilidad de la proteína Ski por la confluencia celular. Las células C9 en condiciones de confluencia (Con) o diluidas (Dil) fueron incubadas en condiciones control y de estimulación con 0.2 nM de TGF- $\beta$ . La proteína Smad2 se utilizó como control de carga; la fosforilación de Smad2 (p-S2) se utilizó como control de activación de la señal del TGF- $\beta$ . (B) Inhibición de la disminución de los niveles de Ski por MG132 y LatB. Las células C9 en condiciones de confluencia o diluidas se preincubaron por 4h con 1  $\mu$ M LatB o 25  $\mu$ M de MG132. (C) Fraccionamiento de núcleo (Nuc) y citoplasma (Cito) en condiciones de confluencia o diluidas. La proteína Tubulina se utilizó como control de fraccionamiento (citoplasma) mientras la proteína Actina se utilizó como control de carga. (D) Inmunolocalización de la proteína Ski (verde) por microscopia confocal en condiciones de confluencia o dispersas en células C9. La señal del compuesto DAPI es utilizada como marcador de núcleo. La escala es una representación de 20  $\mu$ m. Los cambios en los niveles de las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot.

Otra manera de evaluar la importancia de las uniones celulares como señal regulatoria de la estabilidad de la proteína Ski es través de la ruptura de estas uniones por la eliminación del ión  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. El ión calcio es indispensable para la formación

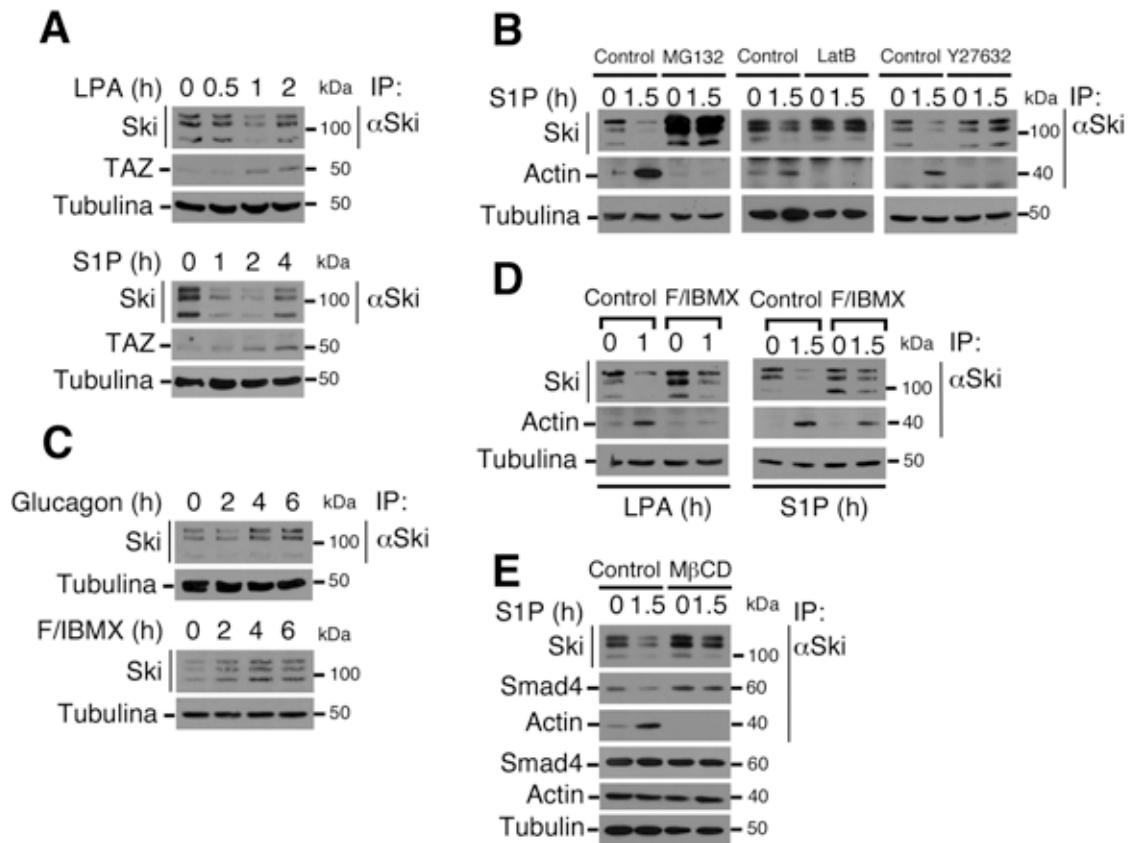
de las uniones intercelulares. Con este propósito utilizamos el compuesto EGTA, que es una molécula que atrapa eficientemente al calcio extracelular. Se realizó un curso temporal en células C9 confluentes incubadas con 1mM de EGTA. La incubación con EGTA disminuyó los niveles de la proteína Ski a partir de 1 h de incubación (Figura 17A). Evaluamos si esta disminución dependía de la degradación de Ski a través del proteosoma. Se preincubaron las células con MG132 en condiciones controles e incubadas con EGTA. El inhibidor MG132 bloqueó los efectos del EGTA sobre la proteína Ski (Figura 17B). También comparamos los efectos de EGTA con la señal del TGF- $\beta$ ; se observó que la molécula EGTA parece ejercer efectos muy similares al TGF- $\beta$  en la disminución de los niveles de Ski; sin embargo, el EGTA no promueve la fosforilación de la proteína Smad2, lo que sugiere que usa un mecanismo diferente al empleado por la señal del TGF- $\beta$  (Figura 17C). Una vez caracterizado el efecto de la ruptura de las uniones intercelulares sobre la proteína Ski hicimos uso de esta metodología para evaluar si los niveles de Ski cambian de manera constante dependiendo del contexto en que la célula se encuentre. El uso del EGTA nos permitía estudiar mejor este objetivo debido a que al usar los compuestos LatB o Jasp tendríamos que asegurarnos que las células quedaran completamente libres de la acción de estos compuestos, en el caso del EGTA, la sola reconstitución de los niveles del ión  $\text{Ca}^{2+}$  aseguraba la formación de las uniones intercelulares nuevamente. Con este fin, incubamos a las células C9 confluentes con 1mM de EGTA por 1h para después retirar el EGTA y, posteriormente, restituir los niveles de calcio extracelular (aprox. 1mM) con la adición del medio de cultivo a diferentes tiempos. Sorpresivamente, se observó que los niveles de la proteína Ski cambian continuamente. La incubación de EGTA por 1h disminuyó los niveles de Ski en proporciones similares a los observados en células dispersas mientras que la proteína Ski regreso a sus niveles basales cuando se adicionó nuevamente el medio de cultivo a las células confluentes (Figura 17D). Todos estos datos demostraron que la estabilidad de la proteína Ski es modulada tanto por la dinámica del citoesqueleto de actina, la estabilización de G-actina o la formación de F-actina y las señales que la regulan, así como por las uniones intercelulares; siendo la primera vez que se reporta que Ski es regulada por una señal distinta al TGF- $\beta$  o al ciclo celular.

y, junto con el recambio de la ECM, producen cambios en el citoesqueleto de actina. Ya se había demostrado que las características fisicoquímicas de la MEC tenían efectos en la señal del TGF- $\beta$  en los hepatocitos (Godoy *et al.*, 2009). Por tanto, nos enfocamos en las señales que actúan a través de los GPCR y como estas podrían regular la estabilidad de la proteína Ski. Primeramente, decidimos utilizar dos ligandos que actúan a través de los GPCR que promovieran la formación de F-actina: el ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina-1-fosfato (S1P). Se conoce que los hepatocitos poseen receptores para ambos ligandos, además de que los receptores para la S1P tienen un papel importante en el proceso de regeneración hepática. Hicimos un curso temporal con los tratamientos con LPA y S1P en células C9 confluentes. Sorprendentemente, se observó que ambos ligandos disminuyeron los niveles de la proteína Ski a diferentes tiempos, LPA a 1 h de incubación y S1P a las 2 h de estímulo (Figura 18A). Como control de activación utilizamos el aumento en los niveles de la proteína TAZ, que se sabe son controlados por ambos ligandos (Yu *et al.*, 2012). Se conoce que los GPCR activan la polimerización de actina a través de la activación del eje  $G\alpha_{12/13}$ -RhoA-ROCK. La proteína  $G\alpha_{12/13}$  activa a la GTPasa de RhoA y, esta a su vez, activa a la cinasa ROCK; esta cinasa junto con RhoA promueven la polimerización de actina (fibras de estrés). Decidimos estudiar si la S1P utiliza este mecanismo para regular negativamente los niveles de Ski y si esta regulación dependía de la degradación vía proteosoma. Células C9 confluentes fueron preincubadas con el inhibidor MG132, LatB o con el compuesto Y27632, inhibidor de la cinasa ROCK, y posteriormente, fueron estimuladas con S1P. Todos los compuestos bloquearon eficientemente los efectos de la S1P, como se había predicho; para nuestra sorpresa, el estímulo con S1P promovió la interacción de Ski con la proteína actina de la misma manera que lo hace el modulador Jasp y este efecto fue bloqueado al igual que la regulación negativa de Ski por S1P por los inhibidores arriba mencionados (Figura 18B). Por tanto, la regulación de S1P, y probablemente la de LPA, sobre la estabilidad de la proteína Ski es a través de la degradación vía proteosoma mediada por el eje  $G\alpha_{12/13}$ -RhoA-ROCK. Es importante resaltar que la activación de este eje es la primera señal fisiológica que se reporta, además de la señal del TGF- $\beta$ , que puede degradar a la proteína Ski. Debido a que las señales de los GPCR que activan la polimerización de actina, como el LPA y la S1P degradan a la proteína Ski, entonces quisimos evaluar los efectos de los ligandos que señalicen a través de los GPCR que promueven la despolimerización de actina. Estos GPCR aumentan los niveles de G-



actina mediante la síntesis del segundo mensajero cAMP. Decidimos evaluar dos tipos de señales: la hormona glucagon y la mezcla de isobutilmetilxantina (IBMX) y forskolina (F). El uso de la mezcla F/IBMX tiene la finalidad de subir los niveles de cAMP a través de inhibir a las fosfodiesterasas y estimular la actividad de la enzima adenilato ciclasa, respectivamente. También se conoce que el glucagon aumenta los niveles de cAMP en los hepatocitos (Yu *et al.*, 2012). Hicimos un curso temporal con glucagon y IBMX/Fsk en las células C9 confluentes. Como se esperaba, ambas señales aumentaron los niveles de Ski a partir de las 2 h de incubación (Figura 18C). Pudimos concluir que la regulación de la estabilidad de Ski por los GPCR es a través de las señales que modifican la dinámica del citoesqueleto de actina.

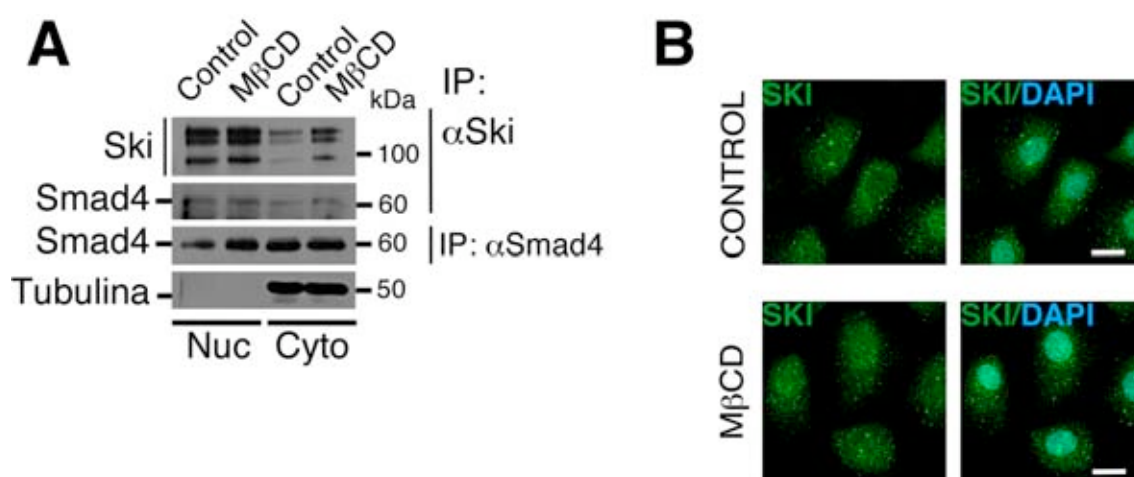
La siguiente pregunta fue evaluar si los efectos en la proteína Ski por estas señales eran antagonicos, como es el caso del antagonismo reportado entre estas señales en la regulación de las proteínas YAP/TAZ (Yu *et al.*, 2012). Preincubamos las células C9 con F/IBMX y, posteriormente, se estimularon las células con el LPA y la S1P. Se observó un bloqueo parcial del efecto de S1P y LPA por el incremento de los niveles de cAMP al igual que se observó una disminución de la unión de Ski con la proteína actina (Figura 18D). Otros grupos reportan cantidades mayores de F/IBMX para bloquear eficientemente los efectos de la polimerización de actina lo que podría explicar el bloqueo parcial que observamos. Finalmente, es de suma importancia, destacar el hallazgo reportado sobre la regulación de la estabilidad de la proteína Ski por señales que actúan a través de los GPCR; señales que tienen un papel esencial en el proceso de regeneración hepática y, en muchos otros procesos fuera del hígado, donde el papel de la señal de TGF- $\beta$  también se ve regulado. Por último, nos preguntamos si la regulación a través de los GPCRs tenía alguna relación con la presencia de la proteína Ski en los *lipid rafts*. Para resolver este punto, se preincubaron las células C9 con el detergente M $\beta$ CD, que atrapa específicamente al colesterol, y posteriormente se estimularon con S1P. Interesantemente, la preincubación con M $\beta$ CD bloqueó el efecto de S1P sobre la degradación de la proteína Ski además de interrumpir la unión de Ski con la proteína actina pero no su interacción con Smad4 (Figura 18E).



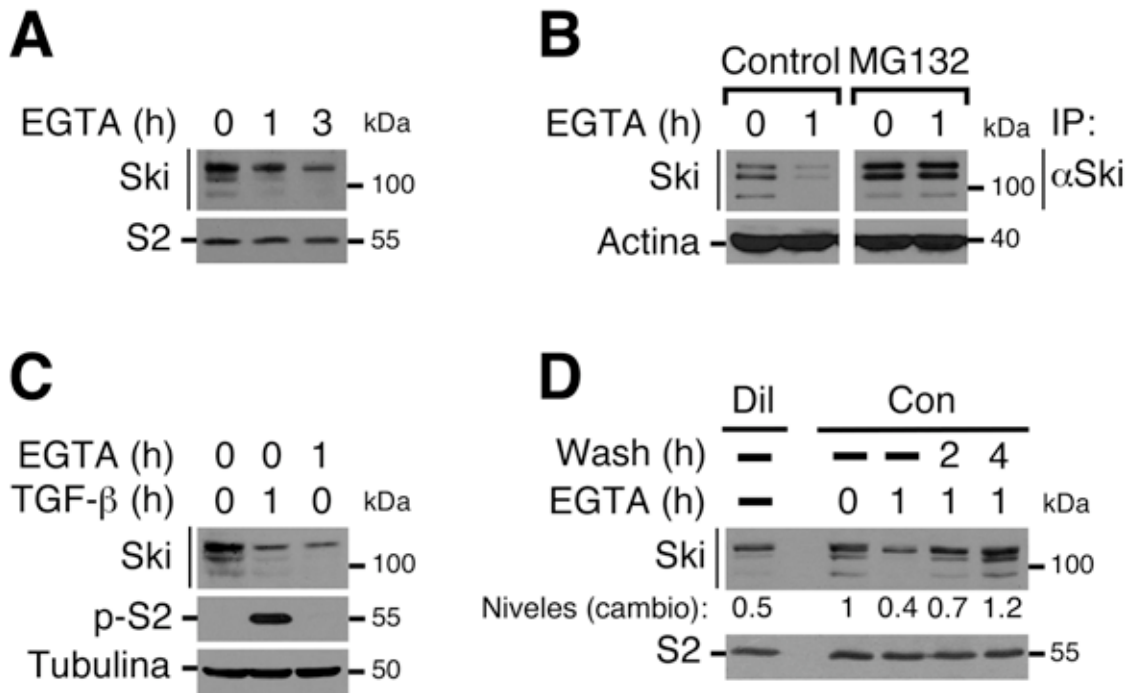
**Figura 18. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) controlan la estabilidad de la proteína Ski.**

(A) Regulación negativa de los niveles de la proteína Ski por los GPCR que promuevan polimerización de actina (F-actina). Las células C9 confluentes se incubaron en condiciones controles y estimuladas con 1  $\mu\text{M}$  de LPA o 1  $\mu\text{M}$  de S1P a diferentes tiempos. La proteína TAZ se utilizó como marcador de la activación de las señales LPA y S1P; la proteína Tubulina se utilizó como control de carga (B) Efectos de los inhibidores [25  $\mu\text{M}$ ] MG132, [1  $\mu\text{M}$ ] LatB y [30  $\mu\text{M}$ ] Y27632 en las células C9 confluentes. Las células fueron preincubadas con los inhibidores por 4 horas en condiciones controles o estimuladas con 1  $\mu\text{M}$  de S1P. La proteína Tubulina se utilizó como control de carga. (C) Regulación positiva de la proteína Ski por los GPCR que promuevan la despolimerización de actina (G-actina). Las células C9 confluentes se incubaron en condiciones controles y estimuladas con 2  $\mu\text{M}$  de Glucagon o 1  $\mu\text{M}$  de Forskolina/100  $\mu\text{M}$  de IBMX (F/IBMX) a diferentes tiempos. La proteína Tubulina se utilizó como control de carga. (D) Antagonismo de las señales de los GPCR en el control de la estabilidad de Ski. Las células C9 confluentes se preincubaron por 4h con F/IBMX y se estimularon, posteriormente, con 1  $\mu\text{M}$  de LPA o 1  $\mu\text{M}$  de S1P. La proteína Tubulina se utilizó como control de carga. Los cambios en los niveles de las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot. (E) La desestabilización de los lipid rafts bloquea los efectos de S1P. Las células C9 se preincubaron con 5 mM de M $\beta$ CD por 4h y posteriormente se estimularon con 1  $\mu\text{M}$  de S1P por 1.5h. Los cambios en la interacción entre las proteínas Ski, Smad4 y actina se analizaron por IP e inmunoblot.

Al observar que el desmantelamiento de los lipid rafts, por el uso del detergente M $\beta$ CD, interrumpía la acción de la hormona S1P, nos preguntamos si el efecto de este compuesto se debía a que la proteína Ski, al ser removida de las DRMs era relocalizada al núcleo de los hepatocitos en donde Ski no interacciona con la proteína actina. Así las células C9 se incubaron con M $\beta$ CD y se observó su localización subcelular a través de fraccionamiento celular e IF. Para nuestra sorpresa, el tratamiento con M $\beta$ CD no produjo ninguna relocalización de la proteína Ski en las células C9 (Figura 19A). Además no se observó algún cambio en la distribución vesicular de la proteína Ski en el citoplasma (Figura 19B). Estos datos sugieren que la distribución de Ski en vesículas no está determinada por su localización en DRM, sin embargo, si determina el efecto que tiene S1P sobre la estabilidad de la proteína Ski.



**Figura 19. El desmantelamiento de los lipid rafts no tiene efectos en la localización de Ski.** (A) La proteína Ski no se relocaliza por el tratamiento con M $\beta$ CD. Células C9 confluentes fueron incubadas con 2.5 mM de M $\beta$ CD por 3h; posteriormente se realizó un fraccionamiento de núcleo (Nuc) y citoplasma (Cito). Todas las fracciones fueron lisadas con solución de RIPA. La proteína Tubulina se utilizó como marcador de la fracción citoplasmática. Las proteínas Ski y Smad4 se analizaron por IP e inmunoblot. (B) La incubación de M $\beta$ CD no perturba la distribución vesicular de la proteína Ski. Células C9 confluentes fueron incubadas con 2.5 mM de M $\beta$ CD por 3h. La distribución de Ski se analizó por IF y microscopía confocal.



**Figura 17. Las uniones intercelulares regulan los niveles de la proteína Ski en la línea celular C9.** (A) Rompimiento de las uniones intercelulares en células en confluencia con 1  $\mu$ M de EGTA. Las células se lisaron con SDS al 1%. La proteína Smad2 (S2) se utilizó como control de carga. (B) Inhibición de la degradación de la proteína Ski por EGTA en las células C9. Las células en confluencia se preincubaron por 4h con 25  $\mu$ M de MG132 en condiciones controles e incubadas con 1  $\mu$ M de EGTA. (C) Las células C9 en confluencia se incubaron con 1  $\mu$ M de EGTA o 0.2 nM de TGF- $\beta$ . La fosforilación de Smad2 (p-S2) se utilizó como control de activación de la señal del TGF- $\beta$ ; las células se lisaron con solución SDS al 1%. La proteína Tubulina se utilizó como control carga. (D) Cambios en los niveles Ski por el rompimiento y la recuperación de las uniones intercelulares. Las células C9 en confluencia se incubaron con 1  $\mu$ M de EGTA y, posteriormente, se lavaron con medio de cultivo para recuperarse a diferentes tiempos; las células diluidas se utilizaron como control niveles bajos de la proteína Ski. La proteína S2 se utilizó como control de carga. Los cambios en los niveles de las proteínas fueron analizadas por inmunoprecipitación (IP) e inmunoblot.

### **5.6 Los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR) regulan los niveles de la proteína Ski a través de los cambios en la dinámica del del citoesqueleto de actina.**

Una amplia gama de señales además de las uniones intercelulares regulan la dinámica del citoesqueleto de actina. En el proceso de la regeneración hepática los niveles de las proteínas Ski y SnoN cambian durante todo este proceso; muchas de las señales presentes en la regeneración podrían influir en los niveles ambas proteínas. Ligandos que señalizan a través de los GPCR tienen una gran efecto en la regeneración hepática

## 6. DISCUSIÓN

Las proteínas Ski y SnoN tienen un papel importante en el desarrollo embrionario temprano (Berk *et al.*, 1997; Shinagawa *et al.*, 2000; Tsuneyoshi *et al.*, 2012). También ambas proteínas están relacionadas a patologías como el cáncer (Deheuninck *et al.*, 2009). No obstante su importancia, la única señal descrita capaz de regular su estabilidad, de forma independiente del ciclo celular, es la vía de señalización del TGF- $\beta$ , a través de la fosforilación de sus efectores, las proteínas R-Smad (Deheuninck *et al.*, 2009). En este trabajo demostramos claramente que los cambios en el estado del citoesqueleto de actina regulados por diferentes señales tienen un efecto en la estabilidad de la proteína Ski siendo la polimerización de actina, o la formación de filamentos (F-actina), una señal de degradación mientras que el aumento de la actina monomérica (G-actina), o la despolimerización de los filamentos, es una señal de estabilización. Esta regulación parece ser independiente de la señal de TGF- $\beta$ /Smads. Aún falta por dilucidar los mecanismo moleculares particulares que participan en la regulación de la estabilidad de la proteína Ski por la dinámica del citoesqueleto de actina. No obstante, existen algunas proteínas cuya estabilidad también depende del citoesqueleto de actina que podrían darnos algunos indicios. Además del conocido caso de las proteínas YAP/TAZ de la vía de Hippo (Hadler *et al.*, 2012), existen otras proteínas cuya estabilidad es controlada por los cambios en el citoesqueleto de actina. El factor transcripcional p21 es estabilizado por la ruptura de los filamentos de actina. La actividad de la GTPasa Rho y la cinasas MST1/2 participan en esta regulación (Coleman *et al.*, 2006; Densham *et al.*, 2009). La estabilidad de la fosfatasa de tirosinas PTPN14 es regulada por la confluencia celular adquiriendo más estabilidad conforme aumenta la densidad celular; la degradación de PTPN14 por este mecanismo es dependiente de la ligasa E3 de ubiquitina CRL2<sup>LRR1</sup> (Wang *et al.*, 2012).

Esta nueva regulación puede no ser particular del contexto hepático lo que nos daría una mejor comprensión de los mecanismos que controlan la función de la proteínas Ski en los diferentes procesos fisiológicos en los que esta proteína participa. Recientemente, el grupo de la doctora Luo reportó que la proteína Ski regula negativamente al coregulador transcripcional TAZ. La expresión exógena o la ausencia de Ski afectan la progresión del cáncer de mama mediada por la proteína TAZ (Rashidian *et al.*, 2015). La regulación de la estabilidad de la proteína Ski por los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina podría jugar un papel importante en este contexto debido a que

mientras la polimerización de actina estabiliza a la proteína TAZ y la acumula en el núcleo, a su vez podría mantener bajos los niveles de Ski a través de la degradación vía proteosoma. En un contexto muy diferente, Jacob *et al.* en 2008, demostró que el aumento en los niveles de cAMP estabilizan a la proteína Ski en las células de Schwann. Nuevamente, esto sugiere que estas células podrían regular los niveles de Ski mediante los cambios en su citoesqueleto de actina debido a que el aumento en los niveles cAMP lleva a la despolimerización de los filamentos de actina a través de la activación de la cinasa PKA (Yu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013).

Es importante destacar que la localización de la proteína Ski dentro de la fracción insoluble al detergente no iónicos, Tritón X-100, en las diferentes células hepáticas utilizadas en este trabajo, fue un paso importante para el posterior descubrimiento de la regulación de la estabilidad de Ski por la polimerización de actina que además fomenta la formación de los complejos Ski-actina. Después de asegurarnos que podíamos analizar a la proteína Ski en su totalidad, se demostró claramente que ambas proteínas son degradadas a través del sistema UPS por TGF- $\beta$  en los hepatocitos dentro del proceso de regeneración; también se logró recuperar los complejos Ski-actina que se encuentran enriquecidos en el proceso de regeneración. Los mecanismos de regulación de este complejo sobre la estabilidad y localización de la proteína Ski aún quedan por ser aclarados. El factor transcripcional relacionado a miocardina A (MRTF-A) interacciona directamente con la actina monomérica y esta interacción fomenta su localización en citoplasma (Mouilleron *et al.*, 2011). Cuando la proporción de G-actina disminuye por la formación de filamentos estos factores transcripcionales se localizan en el núcleo; este proceso es regulado por la activación de las proteínas RhoA-ROCK. Contrario al caso del factor MRTF-A, la polimerización de actina fomenta el complejo Ski-actina donde este complejo parece no formar parte de los filamentos de actina. El complejo Ski-actina parece darle estabilidad a Ski en los hepatocitos debido a que aumenta la formación de este complejo cuando los niveles de la proteína Ski son más altos en el proceso de regeneración. El complejo de la proteína Ski con actina parece ser parte de un complejo proteico localizado en membranas celulares (endosomas) debido a que la disociación de los lipid rafts por la M $\beta$ CD rompe este complejo; además de que la incubación con Jasplakinolida enriquece la presencia de la proteína Ski en vesículas alrededor del núcleo.

La localización de la proteína Ski parcialmente asociada a membranas DRM (*lipid rafts*) y también su localización en endosomas multivesiculares en el citoplasma de los hepatocitos abre un panorama más complejo en las funciones en las que podría participar esta proteína en las células. Hasta este momento, se había descrito la localización de la proteína Ski endógena en vesículas de tipo de endosomas tempranos en las células de Schwann (Jacob *et al.*, 2008). En este modelo, la translocación de Ski de núcleo a citoplasma es mediada por TGF- $\beta$ , donde este factor de crecimiento promueve la proliferación, debido a que la proteína Ski captura al factor transcripcional Rb en el citoplasma impidiendo que realice sus funciones de inhibición del crecimiento en el núcleo. Aunque en este trabajo no se hizo una descripción más detallada del tipo de vesículas que participan en esta regulación si nos muestra que los cambios en la localización de Ski pueden modificar la señal del TGF- $\beta$  de promotora del arresto celular a proliferativa. Esto no se ha investigado más a fondo, probablemente a que muchos de los estudios sobre la proteína Ski se han realizado expresando la proteína exógena que no es capaz de mimetizar la localización citoplasmática de la proteína endógena mostrando siempre un patrón nuclear en interfase con una pequeña localización en centriolos (Marcelain *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2006; Mosquera *et al.*, 2011); además Ski tiene una localización únicamente nuclear en las líneas celulares donde se ha estudiado. Krakowski *et al.* en 2005 también demostró cambios en la localización de SnoN. Esta proteína se localiza en el citoplasma de las células en los tejidos normales de mama mientras que su translocación al núcleo aparece en los tejidos malignos o líneas celulares transformadas. En este trabajo se asocia el aumento de la proteína SnoN en el núcleo con la disminución en la capacidad proliferativa de estas células aunque no se ahondó más en los mecanismos. Resaltando la importancia de la localización de la proteína Ski en las células, Caligaris *et al.* recientemente demostró que en un estado normal, no transformado, las proteínas Ski y SnoN están presentes tanto en el núcleo como en el citoplasma de los hepatocitos, donde ambas proteínas responden a los cambios en el citoesqueleto de actina y a la degradación mediada por TGF- $\beta$ . Esto tiene como consecuencia que la expresión de los genes dependientes de la señal de TGF- $\beta$ /Smads sea regulada de manera positiva durante un periodo corto de tiempo como consecuencia del hasa de retroalimentación negativa mediada principalmente por la proteína SnoN como se ha propuesto (Zhu *et al.*, 2005; Tecalco *et al.*, 2012; Tsuneyoshi *et al.*, 2012). Sin embargo, este modelo de regulación en la

expresión de los genes dependientes de TGF- $\beta$  se ve alterado en los hepatocitos transformados donde la localización de Ski y SnoN es únicamente nuclear.

El mecanismo de cómo la proteína Ski se localiza en los endosomas multivesiculares (MVE) es uno de los puntos que quedan por estudiarse. Ski es una proteína que no posee secuencias de localización para algún tipo de organelo (péptido señal) o regiones transmembranales que le permitan localizarse en este tipo de vesículas. Aunque el mecanismo que le permite a la proteína Ski llegar a los MVE no es claro este podría ser a través de la interacción con proteínas pertenecientes al complejo ESCRT como es el caso de la proteína ALIX que al igual que Ski muestra una localización en centrosomas y en los *midbodies* de células en citocinesis (Morita *et al.*, 2007);. Otro mecanismo probable es a través de su interacción directa con el receptortipo I del TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI) (Ferrand *et al.*, 2010). Ski podría introducirse a los MVE al hacer complejo con el receptor T $\beta$ RI endocitado por la misma señal del TGF- $\beta$ , que como se demostró en este trabajo es la señal que acumula a la proteína Ski en los MVE siendo un mecanismo similar al observado para la cinasa GSK3 $\beta$  (Drobowoiski *et al.*, 2012). Otro punto importante a considerarse es la función de la proteína Ski en este tipo de endosomas. En las células de Schwann, la proteína Ski captura a la proteína Rb fosforilada en el citoplasma para mantenerla fuera de sus funciones como factor transcripcional (Jacob *et al.*, 2008). Nagata *et al.* observó la acumulación de la proteína Ski en el citoplasma de células epiteliales por la inhibición del proteosoma, mostrando que esta acumulación impedía la translocación de las proteínas Smad por la señal del TGF- $\beta$  hacia el núcleo; este efecto es muy similar a lo reportado por Ferrand *et al.* en células de melanoma. Nosotros observamos un efecto similar debido a que el inhibidor MG132 favoreció una mayor protección de la proteína Ski a la degradación por proteinasa K en los hepatocitos, lo que sugiere que Ski está siendo dirigido al citoplasma, específicamente a los MVE, de manera constante. Estos datos previos sugieren que Ski podría tener una función de proteína secuestradora de las Smads (o alguna otra proteína) en este tipo de endosomas o, la localización de Ski en los MVE mantiene aislada a esta proteína de los componentes sobre los que ejerce alguna regulación siendo este un mecanismo parecido a la regulación de la cinasa GSK3 $\beta$  por la señal de WNT (Taelman *et al.*, 2010).



La importancia de los efectos de la regulación de la estabilidad de la proteína Ski a través de la dinámica del citoesqueleto de actina por diferentes señales va más allá de su función como regulador negativo la vía de señalización del TGF- $\beta$ . Ski interacciona con varios reguladores transcripcionales donde su función principal es regular, de manera negativa, los complejos transcripcionales con los que esta proteína interacciona. Los receptores nucleares destacan dentro de estos regulares transcripcionales. (Deheuninck *et al.*, 2009). Por tanto, cuando se estudien estos factores transcripcionales será importante considerar sí las señales moduladoras del citoesqueleto de actina promueven algún cambio en la regulación de estos complejos transcripcionales a través de controlar la estabilidad de la proteína Ski. Además de su función como coregulador transcripcional, Ski tiene también participación en el proceso de división celular; una disminución en los niveles de Ski en las fases de división podría provocar anaploidía como se observa en las células carentes de esta proteína (Marcelain *et al.*, 2012). Adicional a lo reportado para la proteína Ski en los hepatocitos, Caligaris *et al.* demostró que los cambios en el citoesqueleto de actina también afectan a la proteína SnoN de manera opuesta a Ski. La polimerización de actina es una señal de estabilización para proteína SnoN. Esto hace aún mas complejo el papel que podrían estar jugando ambas proteínas en los diferentes procesos en los que participan en conjunto.

En el caso particular de vía de señalización del TGF- $\beta$ , se ha reportado que las uniones intercelulares regulan la translocación de las proteínas R-Smad al núcleo aunque su fosforilación o la formación de los complejos heterotetraméricos con la proteína Smad4 no se ven afectados (Xaralabos *et al.*, 2010). Las uniones intercelulares también regulan la activación de la GTPasa RhoA mediada por TGF- $\beta$  (Fan *et al.*, 2007). No obstante, los cambios en la dinámica de actina no afectan la activación de las Smads, la regulación de los genes dependientes de la señal del TGF- $\beta$  prodría ser modulada mediante los cambios en la estabilidad de Ski por cambios en el estado del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, este mecanismo podría estar presente en el proceso de regeneración hepática en donde paradójicamente la activación de las proteínas Smad ocurren durante todo el proceso de regeneración formando complejos con las proteínas Ski y SnoN sin que estas últimas sean degradadas a través del sistema UPS. Por el contrario, los niveles de ambas proteínas suben durante el proceso de regeneración (Macías-Silva *et al.*, 2002). Este aumento en los niveles de las proteínas Ski y SnoN se

ha propuesto como mecanismo para contrarrestar los efectos de inhibición del crecimiento mediado por la señal del TGF- $\beta$  durante la regeneración hepática. Además de la señal del TGF- $\beta$ , en el proceso de regeneración participan muchas señales que podrían estar regulando el estado del citoesqueleto de actina, dentro de todas ellas resaltan el recambio de la ECM, el desmantelamiento y la formación de uniones intercelulares y la activación de los GPCR por diferentes hormonas (Taub, 2004). La resistencia a la degradación por TGF- $\beta$  que muestran las proteínas Ski y SnoN en el proceso de regeneración hepática podría ser regulada por las señales mencionadas anteriormente teniendo mayor influencia una sobre la otra dependiendo del estado de regeneración en el que el hígado se encuentre. En el caso particular de los GPCR se ha reportado que la S1P, a través de su receptor S1PR2, inhibe la proliferación de los hepatocitos en la regeneración hepática (Ikeda *et al.*, 2009); este efecto es dependiente de la activación de la GTPasa RhoA. Señales tales como la S1P o el glucagon, que controlan de manera temporal la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos, podrían estar cambiando el estatus de la señal del TGF- $\beta$  durante el proceso de regeneración hepática de una señal inhibitoria del crecimiento a una señal promotora de la EMT y fibrogénesis que son indispensables en el proceso regenerativo.

Finalmente, es importante destacar que existe una relación entre la localización de Ski en membranas ricas en *lipid rafts* (probablemente MVE) y la regulación de su estabilidad por los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina. A pesar que el modelo de la línea celular C9 nos permitió avanzar rápidamente en el análisis de los mecanismos que controlaban los niveles de Ski por los cambios en el citoesqueleto de actina, probablemente sea necesario regresar al modelo de hígado o a hepatocitos aislados o cultivos primarios donde no existe transformación celular alguna, para poder evaluar la relación entre la localización de Ski y su regulación por el citoesqueleto de actina en un contexto normal o en algunos procesos fisiológicos como lo son la regeneración hepática o el desarrollo de fibrosis en el hígado. Uno de nuestros principales problemas fue basarnos en los datos obtenidos de líneas celulares en donde la proteína Ski está localizada totalmente en el núcleo y su completa extracción sólo requiere de detergentes no iónicos (Tritón X-100). En estas líneas celulares transformadas muchas de las señales estudiadas en este trabajo no perturban la estabilidad de la proteína Ski (Caligaris *et al.*, 2015). Por tanto, es indispensable

considerar no sólo el contexto celular que pudiera estar regulando el citoesqueleto de actina sino también si las células continúan regulando a las proteínas Ski y SnoN, a través de estos mecanismos, para poder tener una mejor visión de cómo la señal del TGF- $\beta$  está ejerciendo sus efectos.

## 7. MÉTODOS

*Hepatectomía parcial (PH) y aislamiento de extractos nucleares.* Todas las ratas manipuladas en este trabajo se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Ratas de 250 a 300 gramos fueron anestesiadas con una mezcla de anestésicos Ketamina y Xilacina. En las ratas anestesiadas se realizó una laparotomía y se removieron 2/3 del hígado (lóbulos mayores), aproximadamente un 70% del volumen total. Los tiempos de regeneración se cuentan desde la suturación del abdomen de la rata. Se extrajeron los hígados a 0, 2, 48, 120 h después de la PH. Se emplearon ratas *Sham* de 2h; se realizó una laparotomía con la sola manipulación del hígado sin la remoción de ningún lóbulo hepático. Para la preparación de los extractos nucleares de hígado, se colectaron fragmentos de hígado de aproximadamente de 1 a 2 g y se lavaron con PBS 1X frío. Las muestras se maceraron en solución RBS (10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 10 mM de NaCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>) más inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los homogenados se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min a 4°C. Los sobrenadantes (citoplasma) se retiraron y los núcleos se incubaron en buffer C (20 mM de HEPES pH 7.9, 420mM de NaCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de EDTA más Glicerol al 25%), más inhibidores de proteasas y fosfatasa, por 2 o 3h en hielo. Los extractos se centrifugaron a 13,200 rpm por 5min y los sobrenadantes se cuantificaron por el método de Bradford (BioRad).

*Aislamiento de hepatocitos de hígado de rata, cultivos primarios de hepatocitos y cultivo de líneas celulares.* Se perfundieron por 10 min hígados en estado de quiescencia y en estado de regeneración, de ratas de 250 a 300 g de peso, con solución isotónica Krebs-Ringer-Bicarbonato (120 mM de NaCl, 4.75 mM de KCl, 1.2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 24 mM de NaHCO<sub>3</sub>) en ausencia del ión Ca<sup>2+</sup> en condiciones de gaseo (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente se agregó la enzima colagenasa tipo II o tipo IV (10-20 mg) en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato más Ca<sup>2+</sup> (1.27 mM de CaCl<sub>2</sub>) por 10 a 15 min. Después del tiempo de digestión el hígado se filtró con tela y las hepatocitos se colectaron centrifugando las células a 400 rpm por 2 min; el sobrenadante contiene a las células no parenquimatosas. Los hepatocitos se lavaron 3 veces con solución Krebs-Ringer-Bicarbonato más calcio. Los hepatocitos se resuspendieron en medio Williams E y se agregó la misma cantidad de solución de Percoll (1:1). Las células se centrifugaron a 800 rpm por 5 min a 4°C. Los hepatocitos sedimentados se resuspendieron en medio Williams E. El Percoll nos permitió trabajar

con una alta viabilidad de los hepatocitos. El aislamiento de los hepatocitos de hígados en regeneración requirió de ciertas modificaciones descritas previamente. Los hepatocitos en regeneración contienen una gran cantidad de vesículas en su citoplasma lo que los hace mucho menos densos. Por tanto, se tiene que reducir la cantidad de solución de Percoll empleada. Para los experimentos con los hepatocitos aislados se utilizaron de 150 a 200 mg de hepatocitos húmedos. Los hepatocitos aislados se incubaron en medio Williams E en los tiempos indicados a 37°C. Para el cultivo primario de hepatocitos, se sembraron  $4 \times 10^6$  de hepatocitos en cajas de cultivo de 100 mm de diámetro ( $\emptyset$ ), cubiertas con colagena tipo I de cola de rata en medio de adherencia (*Attachment*) por un mínimo de 3 h. Posterior al pegado de los hepatocitos, se recambió el medio con medio de manutención (*Feeding*) por 24 h antes de los tratamientos (un día de cultivo). La línea celular C9 se cultivó en medio DMEM con baja glucosa complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S); el recambio de medio se realizó cada tercer día. Las células C9 se ayunaron por 16 h (*overnight*) en medio DMEM sin FBS más 1% de P/S complementado con 2mM de glutamina. Todas las células se utilizaron es estado de confluencia a menos que se mencione otro estado.

*Plásmidos y tranfecciones.* La construcción pcDNA3/mCherry-Flag-Ski fue elaborada a partir de la construcción pcDNA3/Flag-Ski (humano) que fue un obsequio de la Dra. Céline Prunier. La construcción pCR3.1/mCherry-CD63 fue obsequio del Dr. Paul D. Bieniasz. La construcción de pmCherry-C2/hAlix se adquirió de la compañía Addgene (plasmid No. 21504). Todas las construcciones fueron transfectadas con lipofectamina 2000 como lo describe la compañía (Invitrogen). En breve, se incubaron 10  $\mu$ l de lipofectamina 2000 y 10-30  $\mu$ g de DNA (plásmidos) en 500  $\mu$ l de medio OptiMEM por separado, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente (TA). Ambas mezclas se juntaron e incubaron por 20 min a TA. Después de la incubación, la mezcla final se agregó a las células sembradas en una caja de cultivo de 100 mm de  $\emptyset$  con medio DMEM complementado con FBS al 10% más P/S al 1% y se dejó incubando de 4 a 6 h; las células C9 se tranfectaron a una confluencia de aproximadamente del 70% o más. Después de la incubación, se recambia el medio de cultivo y las células se utilizan a partir de las 48 o 72 h postranfección.

*Disminución del ión calcio extracelular.* Este método se realizó como se describe previamente por Fan *et al.*, en 2007. Las células en confluencia se ayunaron de 12 a 16 h en medio DMEM sin FBS. Después del ayuno, las células se preincubaron con medio isotónico por 10 min (20 mM de HEPES pH 7.4, 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de glucosa) y, posteriormente, se incubaron, por los tiempos indicados, con medio isotónico sin Ca<sup>2+</sup> complementado con 1 mM de EGTA.

*Lisados celulares.* Inicialmente, los hepatocitos fueron lisados en solución de lisis con Tritón X-100 o con TNTE (50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA más Tritón X-100 al 0.5%); los hepatocitos se lavaron una vez con 5 ml de PBS 1X y se incubaron con 1 ml de TNTE en agitación por 30 min a 4 °C; los extractos se centrifugaron a 13,200 rpm por 5 min. Posteriormente, todos los lisados celulares se llevaron a cabo en solución de lisis RIPA (50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, desoxicolato de sodio al 0.5%, Nonidet 40 al 1% más SDS al 0.1%); las células se incubaron con 1 ml de RIPA en agitación por 1h o más a 4°C, y los extractos se centrifugaron a 13,200 rpm por 5 min. Para la extracción completa de proteínas, las células se lisaron con solución de lisis de SDS (50mM de Tris-HCl, 0.5mM de EDTA, 1mM de EGTA más SDS al 1%); las células (sembradas en pozos de una caja de 6 pozos) se lisaron con 200 µl de solución de SDS al 1% a T.A. y los extractos se hirvieron por 10 min a 100 °C, para desnaturalizar el DNA. Esta técnica no deja material insoluble a detergente (*pellet*). En el caso de los lisados de extractos nucleares o a partir de RIPA se agregó de 75 a 100 µg de proteína por muestra y se desnaturalizó con Laemmli 6X, mientras que en los lisados de SDS al 1%, que no pueden cuantificarse, se agregó 40 µl de cada muestra complementada con Laemmli 6X. En el caso de la separación de las fracciones solubles e insolubles al detergente Triton X-100, la misma cantidad de células se incubó en TNTE en agitación por 30 min a 4°C y los extractos se centrifugaron a 13,200 rpm por 15 min para recuperar la mayor cantidad de material insoluble. La fracción insoluble o *pellet*, se solubilizó con RIPA en agitación por 2h a 4°C; las muestras se centrifugaron a 13,200 rpm por 5 min. Para hacer la comparación de extracción, las células se lisaron inicialmente con RIPA por 2h a 4°C. Se tomó 30 µl de cada extracción para los controles de carga.

*Inmunoprecipitación (IP) e inmunoblots.* Los ensayos de IP se realizaron con extractos celulares obtenidos de la lisis con solución de RIPA a partir de 1 o 2 cajas (100 mm de Ø) de células confluentes. Los extractos se normalizaron mediante la cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford; para cada experimento todas las IP fueron normalizadas al máximo de concentración posible. Se agregaron a los extractos de 2 a 3 µl de cada anticuerpo de un stock con una concentración de 200 µg/ml. Las muestras se incubaron *overnight* en agitación a 4°C. Al día siguiente, se incubó el lisado, con el anticuerpo, con 50 a 75 µl de solución de proteína G por 1 a 2 h en agitación a 4°C. Después de las 2h, la proteína G se centrifuga a 13,200 rpm por 30 seg. La proteína G se lava 3 veces con solución de lisis RIPA; se seca la proteína G antes de agregarse 30 µl de Laemmli 2X. Para el inmunoblot, las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5 o 10%. Las muestras se transfirieron a membranas de PVDF (polyvinylidene flouride) en cámara húmeda. Las membranas se bloquearon con leche sin grasas al 5% en solución de TBST (20 mM de Tris-HCl pH7.6, 137mM de NaCl más Tween-20 al 1%). Las membranas se incubaron en agitación *overnight* a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente a una dilución de 1:500 a 1:2000, dependiendo de la compañía o calidad del anticuerpo. Después de la incubación, las membranas se lavan 3 veces con TBST por 5 min. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó a una dilución de 1:10 000 hasta 1:40 000 en TBST con leche al 5% en agitación por 1h a TA. Las membranas se lavan 3 veces con TBST por 5 min. La reacción de quimioluminiscencia se realizó con los reactivos de SuperSignal West Pico (Thermo) y Immobilon (Millipore). La detección de la señal se realizó en películas fotosensibles al azul (Kodak).

*Fraccionamiento celular.* Se realizó el método descrito por Grewal *et al.* en 2000, con algunas modificaciones. En breve, después de las incubaciones las células (4 cajas de cultivo de 100 mm de Ø) se lavaron una vez con solución salina PBS 1X; posteriormente, se colectaron las células en solución de homogenización frío (3mM de Imidazol pH 7.4, 250mM de sacarosa) más inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las células suspendidas en la solución de homegenización se pasaron de 10 a 15 veces por una aguja de 22G. El homogenado se centrifugó a 3,400 rpm a 4°C por 10 min. Se colectó el sobrenadante (citoplasma) y los núcleos se lisaron en RIPA por 1h a 4°C en agitación; la fracción citoplasmática se incubó con RIPA 5X por 2 h a 4°C. Los lisados

se centrifugaron a 13,200 rpm por 5 min y los sobrenadantes se cuantificaron por el método de Bradford.

*Aislamiento de membranas resistentes a detergente (DRMs).* Se realizó el método reportado por Aït Slimane *et al.* en 2003, con algunas modificaciones. Se utilizaron 8 cajas de células confluentes (100 mm de Ø). Después de la incubación, las células se lavaron una vez con PBS 1X frío. Las células se colectaron en 1 ml de solución de homogenización (20mM de Tris-HCl pH 7.4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA más Tritón X-100 al 1%) con más inhibidores de fosfatasa y proteasas; el homogenado se pasó 5 veces por una aguja de 25G y se llevó a una concentración de sacarosa al 45% en 4 ml. La mezcla se colocó en fondo de un tubo de ultracentrifugación (13 ml) y se colocaron secuencialmente 4 ml de sacarosa al 35% y al 5% en solución de homogenización sin Tritón X-100. Las muestras se colocaron en un rotor de columpio Sorvall SW40Ti; se centrifugaron a 38,000 rpm por 20 h a 4°C. Las fracciones se colectaron de arriba (Top) hacia abajo (Bottom) tomando 1 ml por fracción (1-12). Cada fracción se incubó con CHAPS al 1% *overnight* a TA para la extracción de las proteínas presentes en las DRM. Todas las fracciones fueron IP con 2µl de anticuerpo contra la proteína Ski (monoclonal o policlonal).

*Ensayo de protección a la proteínasa K (PPA).* Este ensayo es una versión modificada del descrito por Taelman *et al.* en 2010. Posterior a las incubaciones las células confluentes (2 cajas de 100 mm de Ø) se lavaron una vez con PBS 1X en hielo y se colectaron con solución de homogenización (3mM de Imidazol pH 7.4, 250mM de sacarosa) más inhibidores de fosfatasa. Las células se pasaron de 10 a 15 veces por una aguja de 22G. Los homogenados se repartieron en tres partes y se incubaron de la siguiente manera: sin proteínasa K (control), con 0.25 µg/ml de proteínasa K y con 0.25 µg/ml de proteínasa K más Tritón al 0.1%; las muestras se incubaron por 10 min a TA. Después de la incubación se bloqueó inmediatamente la actividad de la proteínasa K con 20 mM de PMSF. Las muestras se lisaron con RIPA (5X) en agitación por 2h a 4°C; los extractos se centrifugaron a 13,200 rpm por 5 min y los sobrenadantes se IP. En el caso de los hígados en quiescencia y en estado regenerativo, se obtuvieron los extractos citoplasmáticos macerando un pedazo de hígado (aproximadamente de 1 a 2 g) en solución de homogenización (3mM de Imidazol pH 7.4, 250mM de sacarosa) más inhibidores de fosfatasa en hielo. Los homogenados se dividieron en tres partes,



incubándose de la siguiente manera: sin proteínasa K, con 0.5 µg/ml de proteínasa K y con 0.5 µg/ml de proteínasa K más Tritón al 0.5%; se utilizó un mayor porcentaje de Tritón X-100 debido a la dureza de las membranas en los hepatocitos. Las muestras se incubaron 20 min a TA y se bloqueó la actividad de la proteínasa K con 20 mM de PMSF.

*Inmunofluorescencia (IF).* Este método se modificó a partir del descrito por Sancak *et al.* en 2010. Las células fueron sembradas en cubreobjetos redondos previamente recubiertos de poli-L-lisina (0.1 mg/ml) colocados en cajas de 12 pozos. Las células se ayunaron *overnight* antes de cualquier estímulo en medio DMEM sin FBS. Después de cada estímulo, las células se lavaron una vez con 1 ml de PBS 1X tibio, y se incubaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS por 15 min a 37°C. El PFA se lavó 5 veces con PBS 1X y las muestras se incubaron con solución de permeabilización (Tritón al 0.1% en PBS 1X) por 10 min a TA. La solución de permeabilización se lavó 3 veces con PBS 1X y las muestras se incubaron con solución bloqueadora (Albumina bovina al 1% más suero fetal de caballo o cabra al 10% en PBS 1X, por 1h a TA en agitación. Cada preparación se incubó con el anticuerpo específico (dilución de 1:50 a 1:200) en solución de bloqueo toda la noche a 4°C, en condiciones de agitación. Posterior a la incubación, las muestras se lavaron 3 veces por 10 min en PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente en solución de bloqueo de 1 a 2 h a TA en agitación. Se lavaron las muestras 3 veces en PBS 1X por 10 min. Las preparaciones se lavan con 1 ml de H<sub>2</sub>O antes del montaje del cubreobjetos. Cada cubreobjetos fue montado sobre un portaobjetos con 10 µl o menos de solución de montaje Vectashield con DAPI. Todas las soluciones fueron filtradas por 0.22 µm, previamente; los anticuerpos secundarios se centrifugaron por 10 seg a 13,200 rpm antes de cada toma.

*Ensayo de viabilidad celular MTT.* Para este ensayo se sembraron 5 X 10<sup>5</sup> células en cajas de cultivo de 12 pozos. Después de adherirse las células fueron ayunadas en medio DMEM sin FBS de 12 a 16 h. Posteriormente, las células se incubaron con medio DMEM con FBS al 10%. La viabilidad y proliferación de las células fueron analizadas a las 24 y 48 h después de la adición del medio con FBS; después de cada tiempo se adiciono medio DMEM sin FBS con 0.25 mg/ml de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) por 4 h a 37°C. Los cristales de Formazan (morados),

producidos por la enzimas NAD(P) oxidoreductasas, fueron solubilizados en 500  $\mu$ l de DMSO en agitación por 30 min a TA. Las muestras (200  $\mu$ l por muestra) fueron cuantificadas a una absorbancia de 595 nm en una placa de 96 en el equipo ELx800 Absorbance Microplate Reader.

## 8. REFERENCIAS

1. **Aït Slimane, T, Trugnan, G, van Ijzendoorn, SCD and Hoekstra, D (2003).** Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: Role of distinct lipid microdomains. *Mol. Biol. Cell* 14: 611-624.
2. **Berk M, Desai SY, Heyman HC and Colmenares C (1997).** Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning and skeletal muscle development. *Genes & Development* 11:2029-2039.
3. **Bonni S, Wang H-R, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K and Wrana JL (2001).** TGF- $\beta$  induces assembly of a Smad2–Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature Cell Biology* 3: 587-595.
4. **Caligaris C, Vázquez-Victorio G, Sosa-Garrocho M, Ríos-López DG, Marín-Hernández A and Macías-Silva M (2015).** Actin-Cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes. *BBA – General Subjects*.
5. **Carmignac V and et. al. (2012).** In-Frame Mutations in Exon 1 of SKI Cause Dominant Shprintzen-Goldberg Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 91:950-957.
6. **Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M and Caplan MJ (2010).** Exosome release of  $\beta$ -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology* 190(6): 1079-1091.
7. **Chen C-L, Huang SS and Huang JS (2007).** Cholesterol Modulates Cellular TGF- $\beta$  Responsiveness by Altering TGF- $\beta$  Binding to TGF- $\beta$  Receptors. *Journal of Cellular Physiology* 215: 223-233.
8. **Chen D, Xu W, Bales E, Colmenares C, Conacci-Sorrell M, Ishii S, Stavnezer E, Campisi J, Fisher DE, Ben-Ze'ev A and Medrano EE (2003).** SKI Activates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Human Melanoma. *Cancer Research* 63: 6626-6634.
9. **Chen D, Lin Q, Box N, Roop D, Ishii S, Matsuzaki K, Fan T, Hornyak TJ, Reed JA, Stavnezer E, Timchenko NA and Medrano EE (2009).** Ski knockdown inhibits human melanoma tumor growth in vivo. *Pigment Cell & Melanoma Research* 22: 761-772.
10. **Chen YA and Scheller RH (2001).** SNARE-Mediated Membrana Fusion. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 2: 98-106.

11. **Cohen SB, Zheng G, Heyman HC and Stavnezer E (1999).** Heterodimers of the SnoN and Ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agents. *Nucleic Acids Research* 27(4):1006-1014.
12. **Coleman ML, Densham RM, Croft DR and Olson MF (2006).** Stability of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> CDK inhibitor protein is responsive to Rho A-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene* 25: 2708-2716.
13. **Colmenares C, Suttrave P, Hughes SH and Stavnezer E (1991).** Activation of the *c-ski* Oncogene by Overexpression. *Journal of Virology* 65(9): 4929-4935.
14. **Colmenares C, Heilstedt HA, Shaffer LG, Schwartz S, Berk M, Murray JC and Stavnezer E (2002).** Loss of the *SKI* proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain-dependent defects in *Ski*<sup>-/-</sup> mice. *Nature Genetics* 30:106-109.
15. **Deheuninck J and Luo K (2009).** Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Cell Research* 19: 47-57.
16. **Densham RM, O'Neill E, Munro J, König I, Anderson K, Kolch W and Olson MF (2009).** MST Kinases Monitor Actin Cytoskeletal Integrity and Signal via c-Jun N-Terminal Kinase Stress-Activated Kinase To Regulate p21<sup>Waf1/Cip1</sup> Stability. *Molecular and Cellular Biology* 29(24): 6380-6390.
17. **Dooley, S and ten Dijke, P (2012).** TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell and Tissue Research* 347: 245-256
18. **Doyle A and et al. (2012).** Mutations in the TGF- $\beta$  repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg Síndrome with aortic aneurysm. *Nature Genetics* 44(11): 1249-1254.
19. **Drobowski R and De Robertis EM (2012).** Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 13: 53-60.
20. **Fan L, Sebe A, Péterfi Z, Masszi A, Thirone ACP, Rotstein OD, Nakano H, McCulloch CA, Szászi K, Mucsi I and Capuz A (2007).** Cell Contact-dependent Regulation of Epithelial-Myofibroblast Transition via the Rho-Rho Kinase-Phospho-Myosin Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 18: 1083-1097.
21. **Ferrand N, Atfi A and Prunier C (2010).** The Oncoprotein c-Ski Functions as a Direct Antagonist of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor. *Cancer Research* 70(21):8457-8466.
22. **Gilgenkrantz H and de L'Hortet Collin (2011).** New insights into liver regeneration. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 35: 623-

23. **Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Müller A, Tuschl G, Müller SO and Dooley S (2009).** Extracellular Matrix Modulates Sensitivity of Hepatocytes to Fibroblastoid Dedifferentiation and Transforming Growth Factor  $\beta$ -Induced Apoptosis. *Hepatology* 49(6): 2031-2043.
24. **Hadler G, Dupont S and Piccolo S (2012).** Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Natures Reviews: Molecular Cell Biology*.
25. **Hanson PI and Cashikar A (2012).** Multivesicular Body Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 337-362.
26. **He J, Tegen SB, Krawitz AR, Martin GS and Lou K (2003).** The Transforming Activity of Ski and SnoN protein is Dependent on Their Ability to Repress the Activity of Smad Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 278(33): 30540-30547.
27. **Heyman HC and Stavnezer E (1994).** A Carboxyl-terminal Region of the Ski Oncoprotein Mediates Homodimerization as well as Heterodimerization with the Related Protein SnoN. *Journal of Biological Chemistry* 269(43): 26996-27003.
28. **Hynes NE, Ingham PW, Lim WA, Marshall CJ, Massagué J and Pawson T (2013).** Signalling Change: signal transduction through decades. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 14: 393-398.
29. **Ikeda H, Watanabe N, Ishii I, Shimosawa T, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Iitsuka S, Fujita R, Omata M, Chun J and Yatomi Y (2009).** Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. *Journal of Lipid Research* 50: 556-564.
30. **Jacob C, Grabner H, Atanasoski S and Suter U (2008).** Expression and localization of Ski determine cell type-specific TGF $\beta$  signaling effects on the cell cycle. *Journal of Cell Biology* 182(3): 519-530.
31. **Jean S and Cogger AA (2012).** Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 13: 463-470.
32. **Kim M, Kim M, Lee S, Kuninaka S, Saya H, Lee H, Lee S and Lim D-S (2013).** cAMP/PKA signalling reinforces the Lats-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *EMBO Journal* 1-13.
33. **Kobayashi N, Goto K, Horiguchi K, Nagata M, Kawata M, Miyazawa K, Saitoh M and Miyazono K (2007).** c-Ski activates MyoD in the nucleus of myoblastic

- cells through supresión of histone deacetylases. *Genes to Cells* 12: 375-385.
34. **Kokura K, Kim H, Shinagawa T, Khan MM, Nombra T and Ishii S (2003).** The Ski-binding Protein C184M Negative Regulates Tumor Growth Factor- $\beta$  Signaling by Sequestering the Smad Proteins in the Cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* 278(22): 20133-20139.
  35. **Krakowski AR, Laboureau J, Mauviel A, Bissell MJ and Luo K (2005).** Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- $\beta$  signaling by sequestration of the Smad proteins. *PNAS* 102(35): 12437-12442.
  36. **Lana DP, Leferovich JM, Nelly AM and Hughes SH (1996).** Selective expression of a *ski* Transgene Affects IIB Fast Muscles and Skeletal Structure. *Developmental Dynamics* 205: 13-23.
  37. **Leong G, et al. (2010).** The Ski proto-oncogene regulates body composition and suppresses lipogenesis. *Internacional Journal of Obesity* 34: 524-536.
  38. **Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V and Hill CS (2007).** Arkadia Activates Smad3/Smad4-Dependent Trasncription by Triggering Signaling-Induced SnoN Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 27(17): 6068-6083.
  39. **Macdonald M, Wan Y, Wang W, Roberts E, Cheung TH, Erickson R, Knuesel MT and Liu X (2004).** Control of cell cycle-dependent degradation of c-Ski proto-oncoprotein by Cdc34. *Oncogene* 23: 5643-5653.
  40. **Macías-Silva M, Li W, Leu JI, Crissey MA and Taub R (2002).** Up-regulated Transcriptional Repressors SnoN and Ski Bind Smad Proteins to Antagonize Transforming Growth Factor- $\beta$  Signals during Liver Regeneration. *Journal of Biological Chemistry* 277(32): 28483-28490.
  41. **Marcelain K and Hayman M (2005).** The Ski oncoproteín is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncegene* 24:4321-4329.
  42. **Marcelain K, Armisen R, Aguirre A, Ueki N, Toro J, Colmenares C and Hayman MJ (2012).** Chromosomal Instability in Mouse Embryonic Fibroblasts Null for the Transcripcional Co-Repressor Ski. *Journal of Cellular Physiology* 227: 278-287.
  43. **Massagué J, Seoane J and Wotton D (2005).** Smad transcription factors. *Genes & Development* 19: 2783-2810.
  44. **Massagué J (2012).** TGF- $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews: Molecular Cell*

*Biology* 13: 616-630.

45. **Mayoral R, Valverde A M, Llorente Izquierdo C, González-Rodríguez A, Boscá L and Martín-Sanz P (2010).** Impairment of Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling in Caveolin-1-deficient Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 285(6): 3633-3642.
46. **Meyer C, Godoy P, Bachmann A, Liu Y, Barzan D, Ilkavets I, Maier P, Herskind C, Hengstler JG and Dooley S (2010).** Distinct role of endocytosis for Smad and non Smad TGF- $\beta$  signaling regulation in hepatocytes. *Journal of Hepatology*.
47. **Meyer C, Liu Y, Kaul A, Peipe I and Dooley S (2013).** Caveolin-1 abrogates TGF- $\beta$  mediated hepatocyte apoptosis. *Cell Death and Disease* 4.
48. **Michalopoulos GK (2007).** Liver Regeneration. *Journal of Cellular Physiology* 286-300.
49. **Mizuide M, Hara T, Fuyura T, Takeda M, Kusanagi K, Inada Y, Mori M, Imamura T, Miyazawa K and Miyazono K (2003).** Two Short Segments of Smad3 Are Important for Specific Interaction of Smad3 with c-Ski and SnoN. *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 531-536.
50. **Mimura N, Ichikawa K, Asano A, Nagase T and Ishii S (1996).** A transient increase of snoN transcript by growth arrest upon serum deprivation and cell-to-cell contact. *FEBS letters* 397: 253-259.
51. **Morita E, Sandrin V, Chung H-Y, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK and Sundquist WI (2007).** Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO Journal* 26: 4215-4227.
52. **Mosquera J, Armasen R, Zhao H, Rojas DA, Maldonado E, Tapia JC, Colombo A, Hayman MJ and Marcelain K (2011).** Identification of Ski as a target for Aurora A kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409: 539-543.
53. **Moulleron S, Langer CA, Guettler S, McDonald NQ and Treisman R (2011).** Structure of a Pentavalent G-Actin-MRTF-A Complex Reveals How Actin Controls Nucleocytoplasmic Shuttling of a Transcriptional Coactivator. *Science Signaling* 4(177): 1-10.
54. **Nagase T, Mizuguchi G, Nomura N, Ishizaki R, Ueno Y and Ishii S (1990).** Requirement of protein co-factor for the DNA-binding function of the human *ski* proto-oncogene product. *Nucleic Acids Research* 18(2): 337-343.

55. **Nagase T, Nomura N and Ishii S (1993)**. Complex Formation between Proteins Encoded by the *ski* Gene Family. *Journal of Biological Chemistry* 268(18): 13710-13716.
56. **Nagano Y, Mavrakis KJ, Lee KL, Fujii T, Koinuma D, Sase H, Yuki K, Isogaya K, Saitoh M, Imamura T, Episkopou V, Miyazono K, and Miyazawa K (2007)**. Arkadia Induces Degradation of SnoN and c-Ski to Enhanced Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 282(28): 20492-20501.
57. **Nagata M, Goto K, Ehata S, Kobayashi N, Saitoh M, Miyoshi H, Imamura T, Miyazawa K and Miyazono K (2006)**. Nuclear and cytoplasmic c-Ski differently modulate cellular functions. *Genes to Cells* 11:1267-1280.
58. **Nomura N, Sasamoto S, Ishii S, Date T, Matsui M and Ishizaki R (1989)**. Isolation of human cDNA of *ski* and *ski-related gene, sno*. *Nucleic Acids Research* 17(14): 5489-5500.
59. **Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong H-D, Wadhwa R, Colmenares C, Cono I and Ishii S (1999)**. Ski is a component of the histone deacetylases complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes & Development* 13: 412-423.
60. **Pan D, Zhu Q and Luo K (2009)**. SnoN functions as a tumour suppressor by inducing premature senescence. *EMBO Journal* 28:3500-3513.
61. **Pearson-White S (1993)**. *Sno1*, a novel alternatively spliced isoform of the ski proto-oncogene homolog, *sno*. *Nucleic Acids Research* 21(19): 4632-4638.
62. **Pearson-White S, Deacon D, Crittenden R, Brady G, Iscove N and Quesenberry (1995)**. The ski/sno protooncogene family in hematopoietic development. *Blood* 86(6):2146-2155.
63. **Pearson-White S, Deacon D, Crittenden R, Brady G, Iscove N and Quesenberry PJ (1995)**. The *ski/sno* protooncogene family in hematopoietic development. *Blood* 86: 2146-2155.
64. **Pearson-White S and Crittenden R (1997)**. Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucleic Acids Research* 25(14): 2930-2937.
65. **Pearson-White S and McDuffie M (2003)**. Defective T-Cell Activation Is Associated with Augmented Transforming Growth Factor  $\beta$  Sensitivity in Mice with Mutations in the *Sno* Gene. *Molecular and Cellular Research* 23(15): 5446-5459.
66. **Pelzer T, Lyons GE, Kim S and Moreadith RW (1996)**. Cloning and



- Characterization of the Murine Homolog of the *son* Proto-Oncogene Reveals a Novel Sílice Variant. *Developmental Dynamics* 205: 114-125.
67. **Pols MS and Kulumperman J (2009)**. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 1584-1592.
  68. **Rajendran L and Simons K (2005)**. Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* 118: 1099-1102.
  69. **Rashidian J, Le Scolan E, Ji X, Zhu Q, Mulvihill MM, Nomura D and Luo K (2015)**. Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression. *Science Signaling* 8 (363): ra14.
  70. **Reed JA, Bales E, Xu W, Okan NA, Bandyopadhyay D and Medrano EE (2001)**. Cytoplasmic Localization of the Oncogenic Protein Ski in Human Cutaneous Melanomas in Vivo: Functional Implications for Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling. *Cancer Research* 61: 8074-8078.
  71. **Sancak, Y, Bar-Peled, L, Zoncu, R, Markhard, AL, Nada, S and Sabatini, DM (2010)**. Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 14: 290-303.
  72. **Shinagawa T, Dong H-D, Xu M, Maekawa T and Ishii S (2000)**. The *sno* gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO Journal* 19(10): 2280-2291.
  73. **Shinagawa T, Nombra T, Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A and Ishii S (2001)**. Increased susceptibility to tumorigenesis *ski*-deficient heterozygous mice. *Oncogene* 20:8100-8108.
  74. **Shinagawa T and Ishii S (2003)**. Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes & Development* 17: 1340-1345.
  75. **Siegel PM and Massagué J (2003)**. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nature Reviews: Cancer* 3: 807-820.
  76. **Stavnezer E, Barkas AE, Brennan LA, Brodeur D and Li Y (1986)**. Transforming Sloan-Kettering Viruses Generated from the Cloned *v-ski* Oncogene by In Vitro and In Vivo Recombinations. *Journal of Virology* 57(3): 1073-1083.
  77. **Stavnezer E, Broneur D and Brennan LA (1989)**. The *v-ski* Oncogene Encodes a Truncated Set of *c-ski* Coding Exons with Limited Sequence and Structural Relatedness to *v-myc*. *Molecular and Cellular Biology* 9(9): 4038-4045.
  78. **Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL and Luo K (2001)**. Smad3 recruits the

- anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes & Development* 15: 2822-2836.
79. **Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF and Weinberg RA (1999).** SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor  $\beta$  signaling. *PNAS* 96(22):12442-12447.
80. **Sutrave P, Copeland TD, Showalter SD and Hughes SH (1990).** Characterization of Chicken *c-ski* Oncogene Products Expressed by Retrovirus Vectors. *Molecular and Cellular Biology* 10(6): 3137-3144.
81. **Tabata T, Kokura K, Dijke Pt and Ishii S (2009).** Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF- $\beta$  target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes to Cells* 14: 17-28.
82. **Sutrave P, Nelly AM and Hughes SH (1990).** *ski* can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes & Development* 4: 1462-1472.
83. **Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec J-L, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD and De Robertis EM (2010).** Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143: 1136-1148.
84. **Taub R (2004).** Liver Regeneration: From Myth to Mechanism. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 5:836-847.
85. **Tecalco-Cruz, AC, Sosa-Garrocho, M, Vázquez-Victorio, G, Ortiz-García, L, Domínguez-Hüttinger, E and Macías-Silva, M (2012).** Transforming growth factor- $\beta$ /SMAD target gene *skil* is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *Journal of Biological Chemistry*. 287: 26764-26776.
86. **Théry C, Zytvogel L and Amigorena S (2002).** Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Natures Reviews: Immunology* 2: 569-579.
87. **Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji, Suemori H and Duna NR (2012).** The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells. *Genes & Development* 26: 2471-2476.
88. **Ueki N and Hayman MJ (2003).** Signal-dependent N-CoR requirement for repression by the Ski oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 278: 24858-24864.
89. **Ueki N, Zhang L and Hayman MJ (2004).** Ski Negatively Regulates Erythroid

- Differentiation through Its Interaction with GATA1. *Molecular and Cellular Biology* 24(23): 10118-10125.
90. **Wakefield LM and Hill CS (2013).** Beyond TGF- $\beta$ : roles of other TGF- $\beta$  superfamily members in cancer. *Nature Reviews: Cancer* 13: 328-341.
  91. **Wan Y, Liu X and Kirschner M W (2001).** The Anaphase-Promoting Complex Mediates TGF- $\beta$  Signaling by Targeting SnoN for Destruction. *Molecular Cell* 8:1027-1039.
  92. **Wang W, Huang J, Wang X, Yuan J, Li X, Feng L, Park J-L and Chen J (2012).** PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes & Development* 26: 1959-1971.
  93. **Wilkinson DS, et al. (2005).** A direct intersection between p53 and transforming growth beta pathways targets chromatin modification and transcription repression of the alpha-fetoprotein gene. *Molecular and Cellular Biology* 25: 1200-1212.
  94. **Xaralabos V, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, Rossant J and Wrana JL (2010).** The Crumbs Complex Couples Cell Density Sensing to Hippo-dependent Control of the TGF- $\beta$ -SMAD Pathway. *Developmental Cell* 19: 831-844.
  95. **Ye F, Lemieux H, Hoppel CL, Hanson RW, Hakimi P, Croniger CM, Puchowicz M, Anderson VE, Fujioka H and Stavnezer E (2011).** Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Mediates a *Ski* Oncogene-induced Shift from Glycolysis to Oxidative Energy Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 286(46):40013-40024.
  96. **Yu F-X, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan JH, Tumaneng K, Li H, Fu X-D, Mills GB and Guan K-L (2012).** Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell* 150: 780-791.
  97. **Yu F-X, Zhang Y, Park HW, Jewell JL, Chen Q, Deng Y, Pan D, Taylor SS, Lai Z-C and Guan K-L (2013).** Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes & Development* 27: 1223-1232.
  98. **Zhu Q, Pearson-White S and Luo K (2005).** Requirement for the SnoN Oncoprotein in Transforming Growth Factor  $\beta$ -Induced Oncogenic Transformation of Fibroblast Cells. *Molecular and Cellular Biology* 25(24): 10731-10744.

99. **Zhu Q, Krakowski AR, Dunham EE, Wang L, Bandyopadhyay, Berdeaux R, Martin GS, Sun L and Luo K (2007).** Dual Role of SnoN in Mammalian Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology* 27(1): 324-339.
100. **Zuo W and Chen Y-G (2009).** Specific Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors in Lipid Rafts Is Required for Epithelial Cell Plasticity. *Molecular Biology of the Cell* 20: 1020-1029.

## 9. APÉNDICES

### 9.1 Materiales

*Cultivo celular.* El medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), el medio OptiMEM, el suero fetal bovino, los antibióticos penicilina/estreptomicina [100X], el antimicótico anfotericina B [250 µg/ml], la glutamina [200 mM], el piruvato de sodio [100 mM], el buffer HEPES [1 M] y la solución balanceada de Hanks (HBSS) fueron adquiridos de la compañía GIBCO (Invitrogen). El medio Williams E, la mezcla Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) y la albumina de suero bovino (BSA) se compraron de Sigma-Aldrich. El Percoll se adquirió de la compañía GE healthcare. La colágena tipo I de cola de rata [~ 4 mg/ml] se adquirió de la compañía de BD Biosciences.

*Estimulos o preincubaciones.* El TGF-β humano recombinante fue adquirido de la compañía PreproTech. El ácido lisofosfatídico, la esfingosina-1-fosfato, la forskolina, la isobutil-metil-xantina, el péptido glucagon y la metil-β-ciclodextrina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los inhibidores MG132, SB431542 y LY27632 fueron comprados a la compañía Tocris. Los compuestos Latrunculin B y Jasplakinolide fueron adquiridos de Calbiochem.

*Detergentes y reactivos.* Los detergentes Triton<sup>TM</sup> X-100, duodecil sulfato de sodio (SDS), desoxicolato de sodio, 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), filipin II y Tween20 fueron comprados a la compañía Sigma-Aldrich. El detergente NP40 fue adquirido de Merck. El reactivo Tris Base, imidazol, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) y sacarosa se compraron a Sigma Aldrich.

*Inmunoprecipitación, inmunoblot e inmunofluorescencia.* La solución de Bradford se compró a BioRad. La acrilamida, la bis-metilano-acrilamida, el persulfato de sodio (APS), la glicina y la poli-L-lisina se adquirieron de Sigma-Aldrich. La proteína G acoplada a agarosa, la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y el reactivo Immobilon se adquirieron de la compañía Millipore. El reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico se compró a la compañía Thermo. La solución de montaje Vectashield se adquirió de Vector laboratorios. El compuesto *phalloidine*, el suero fetal de cabra (Goat) y el suero fetal de caballo (Horse) se adquirieron de Invitrogen.

*Anticuerpos secundarios.* Los anticuerpos secundarios anti-conejo (rabbit) y anti-ratón (mouse) IgG H+L acoplados a la enzima peroxidasa (HRP) se adquirieron de Molecular probes (Invitrogen) y Santa Cruz Biotechnology, respectivamente. El anticuerpo secundario anti-conejo *Light chain* (L) acoplado a HRP se compró a la compañía Jackson ImmunoResearch Laboratories. Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo IgG H+L acoplados a Alexa488 o Alexa594 fueron adquiridos de Molecular probes. El anticuerpo secundario, acoplado a Alexa594, anti-cabra se compró a Jackson ImmunoResearch Laboratories.

*Anticuerpos primarios.* Los anticuerpos anti-Smad2 y anti-YAP/TAZ fueron adquiridos de Cell Signaling. El anticuerpo anti- $\beta$ -tubulin fue comprado de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos anti-Ski (07-060), anti-phospho-Smad2 y anti-Smad4 fueron adquiridos de Millipore. Los anticuerpos anti-Smad2/3 (N-19), anti-Smad4 (C-20), anti-SnoN (H-317), anti-Ski (H-329), anti-Ski (G8), anti-HRS (V-20), anti-Flotillin-2 (B-6), anti- $\beta$ -actin y anti-PCNA fueron adquiridos de la compañía Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-EEA1 y anti-GM130 fueron comprados a la compañía Transduction Laboratories (BD Biosciences).

# Novel Regulation of Ski Protein Stability and Endosomal Sorting by Actin Cytoskeleton Dynamics in Hepatocytes\*

Received for publication, May 7, 2014, and in revised form, December 21, 2014. Published, JBC Papers in Press, January 5, 2015, DOI 10.1074/jbc.M114.579532

Genaro Vázquez-Victorio<sup>†1</sup>, Cassandre Caligaris<sup>‡</sup>, Eugenio Del Valle-Espinosa<sup>‡</sup>, Marcela Sosa-Garrocho<sup>‡</sup>, Nelly R. González-Arenas<sup>‡</sup>, Guadalupe Reyes-Cruz<sup>§</sup>, Marco A. Briones-Orta<sup>‡2</sup>, and Marina Macías-Silva<sup>‡3</sup>

From the <sup>†</sup>Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 04510, México and the <sup>§</sup>Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México, D. F. 07000, México

**Background:** The Ski oncoprotein and tumor suppressor is a negative regulator of the antimitotic TGF- $\beta$ /Smad pathway.

**Results:** The Ski protein is localized in the nucleus and cytoplasm of hepatocytes. Ski protein stability is controlled differentially by actin cytoskeleton dynamics.

**Conclusion:** TGF- $\beta$ /Smads and GPCR/actin cytoskeleton-dynamic signals regulate Ski protein stability via the proteasome in hepatocytes.

**Significance:** Stabilization of Ski protein may favor the proliferation of regenerating hepatocyte.

TGF- $\beta$ -induced antimitotic signals are highly regulated during cell proliferation under normal and pathological conditions, such as liver regeneration and cancer. Up-regulation of the transcriptional cofactors Ski and SnoN during liver regeneration may favor hepatocyte proliferation by inhibiting TGF- $\beta$  signals. In this study, we found a novel mechanism that regulates Ski protein stability through TGF- $\beta$  and G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. Ski protein is distributed between the nucleus and cytoplasm of normal hepatocytes, and the molecular mechanisms controlling Ski protein stability involve the participation of actin cytoskeleton dynamics. Cytoplasmic Ski is partially associated with actin and localized in cholesterol-rich vesicles. Ski protein stability is decreased by TGF- $\beta$ /Smads, GPCR/Rho signals, and actin polymerization, whereas GPCR/cAMP signals and actin depolymerization promote Ski protein stability. In conclusion, TGF- $\beta$  and GPCR signals differentially regulate Ski protein stability and sorting in hepatocytes, and this cross-talk may occur during liver regeneration.

Cell proliferation is positively regulated by a myriad of signaling pathways downstream of growth factor receptors and G protein-coupled receptors (GPCRs),<sup>4</sup> among others, and it is negatively regulated by homeostatic signals such as TGF- $\beta$ . Liver development and regeneration are excellent models for

studying cell proliferation in a physiological context that is distinct from cancer (1–3). The liver regenerates upon injury, and all hepatic cells coordinately go through the cell cycle to restore the original mass and function of the organ. Interestingly, the liver grows despite the presence of TGF- $\beta$ , a potent antiproliferative cytokine for epithelial cells. The TGF- $\beta$  pathway is a major modulator of hepatocyte proliferation and death. However, it is unclear how hepatocytes become insensitive to TGF- $\beta$  antiproliferative effects under conditions such as liver regeneration or hepatocarcinoma development (4–8).

Ligands of the TGF- $\beta$  family regulate gene expression through the activation of Ser/Thr kinase receptors and the phosphorylation of receptor-regulated Smads (R-Smads) (9–11). This canonical pathway is tightly regulated by negative feedback loops generated by the up-regulation of inhibitors such as Smad7 and SnoN, which are encoded by immediate-early genes regulated by the TGF- $\beta$ /Smad pathway (12). Any dysregulation of these negative feedback loops may contribute to the development of some diseases. TGF- $\beta$  also regulates the levels of the Ski and SnoN corepressors by inducing their degradation via the ubiquitin-proteasome system. The phosphorylated R-Smads act as adaptors to recruit the E3 ubiquitin ligases that catalyze the polyubiquitination of the Ski and SnoN proteins (12, 13). This process facilitates TGF- $\beta$ /Smad-induced transcriptional regulation of target genes. Therefore, any disruption of Ski and SnoN protein down-regulation might increase their protein levels and inhibit TGF- $\beta$  signals.

The Ski corepressor is a negative regulator of TGF- $\beta$ /Smad signaling that may also act as a transcriptional cofactor for some nuclear receptors and other transcriptional factors (14–17). Ski functions as a nuclear transcriptional corepressor for the Smad transcriptional factors by recruiting other corepressors, such as nuclear receptor co-repressor (NCoR) and Sin3A, and different histone deacetylases to repress TGF- $\beta$  target genes such as *smad7* and *skil* (12, 14, 18). However, the Ski protein is also localized in the cytoplasm of some cell types, where its function is less clear. It has been reported that overexpressed cytoplasmic Ski may escape from the down-regulation exerted by TGF- $\beta$  and that it may sequester the Smad proteins to block

\* This work was supported by PAPIIT/DGAPA/UNAM Grants IN222909 and IN206012) and CONACyT Grant 101826 (to M. M. S.).

<sup>1</sup> Student of the Ph.D. Program in Ciencias Biomédicas, UNAM and recipient of a fellowship from CONACyT.

<sup>2</sup> Present address: Foundation for Liver Research, Institute of Hepatology, London, UK.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México. Tel.: 52-55-56-22-5729; Fax: 52-55-56-22-5611; E-mail: mmacias@ifc.unam.mx.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin; S1P, sphingosine 1-phosphate; LPA, lysophosphatidic acid; F, forskolin; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; LatB, Latrunculin B; Jasp, jasplakinolide; RIPA, radioimmune precipitation assay; IP, immunoprecipitation; DRM, detergent-resistant membrane; WB, Western blot; PH, partial hepatectomy; MVE, multivesicular endosome; SN, supernatant.

## TGF- $\beta$ and GPCR Signals Regulate Ski Protein Levels

TGF- $\beta$  signals (17). To date, the TGF- $\beta$ -independent functions of Ski are poorly studied, particularly the function of cytoplasmic Ski (19, 20).

A major cross-talk among diverse signaling pathways occurs during liver regeneration, where the antiproliferative actions of TGF- $\beta$  may be under tight control exerted by different pathways, mainly those implicated in cell cycle promotion, such as the pathways downstream of growth factors receptors and GPCRs, among others (2). One of the mechanisms used by cells to prevent TGF- $\beta$ -induced antimitotic actions, which have been observed in normal and some cancer cells, is the up-regulation of negative modulators of the canonical pathway, such as the Ski and SnoN corepressors (12). We previously reported the up-regulation of Ski and SnoN during liver regeneration, mainly in proliferating hepatocytes, and we also suggested that the inhibitory actions of Ski and SnoN against the TGF- $\beta$ /Smad signals might explain why hepatocytes escape from TGF- $\beta$ -induced antiproliferative control during regeneration (21).

In this study, we demonstrate that Ski protein stability is regulated differentially by TGF- $\beta$  and GPCR signals in hepatocytes and that the molecular mechanisms involved are influenced by the dynamics of the actin cytoskeleton. Furthermore, we show that Ski protein stability is increased during liver regeneration, where it may facilitate hepatocyte proliferation by controlling TGF- $\beta$  signaling.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Recombinant hTGF- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ) was obtained from PeproTech. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), CHAPS, sphingosine 1-phosphate (S1P), lysophosphatidic acid (LPA), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and forskolin (F) were obtained from Sigma. Latrunculin B (LatB) and jasplakinolide (Jasp) compounds were obtained from Calbiochem. MG132 (a proteasome inhibitor), SB431542 (an ALK5 receptor inhibitor), and Y27632 (a Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor) were obtained from Tocris Bioscience. Culture reagents and media were obtained from Invitrogen. Anti-FLAG M2 and anti- $\beta$ -tubulin mouse monoclonal antibodies were obtained from Sigma. The following antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology: anti-SnoN (catalog no. H-317), anti-Ski (catalog no. H-329), and anti-hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) (catalog no. V-20) rabbit polyclonal antibodies; anti-Smad2/3 (catalog no. N-19) and anti-Smad4 (catalog no. C-20) goat-polyclonal antibodies; and anti-Ski (catalog no. G8) and anti-flotillin-2 (catalog no. B-6) mouse monoclonal antibodies. Anti-Ski (catalog no. 07-060), anti-Smad4, and anti-phospho-Smad2 rabbit polyclonal antibodies were from Millipore. Anti-EEA1 and anti-GM130 mouse monoclonal antibodies were obtained from BD Transduction Laboratories. Anti-Smad2 and anti-Yes-associated protein/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (YAP/TAZ) rabbit polyclonal antibodies were obtained from Cell Signaling Technology. Secondary anti-rabbit IgG and anti-rabbit IgG (light chain) HRP-coupled antibodies were from Zymed Laboratories Inc. and Jackson ImmunoResearch Laboratories, respectively. Secondary anti-mouse IgG HRP-coupled antibody was from Santa Cruz Biotechnology. Alexa Fluor 488 (anti-rabbit IgG) and Alexa Fluor 594 (anti-mouse IgG) second-

ary antibodies were from Molecular Probes. Alexa Fluor 594 anti-goat IgG secondary antibody was from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

**Animals and Partial Hepatectomy Model**—Studies were performed on male Wistar rats  $\sim$ 200–250 g of weight. Animals were maintained on an *ad libitum* diet and used according to institutional guidelines (Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)) for animal experimentation. Anesthetized rats were subjected to a ventral laparotomy, and the anterior two-thirds of the liver were removed. Animals were sacrificed 0, 2, 48, and 120 h after the 70% partial hepatectomy. The livers were harvested, and the nuclear extracts were obtained for protein analysis as described previously (21).

**Cell Lines, Hepatocyte Isolation, and Primary Culture**—The C9 (rat hepatocytes) and HepG2 (human hepatoma) cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS plus antibiotics (penicillin/streptomycin). Rat hepatocytes were isolated using the collagenase perfusion method adapted from the protocol of Snorri Thorgeirsson as described previously (21). For primary culture, hepatocytes were seeded on plastic Petri dishes coated with 1% rat tail collagen type 1 (BD Biosciences), and cells were cultured for 4 h at 37 °C in attachment medium with 10% FBS. Then the medium was changed to feeding medium (FBS-free), and hepatocytes were cultured for 24 h for further studies (22). Cells were serum-starved for 12 h before treatments. C9 cells were transiently transfected with the pcDNA3/mCherry-FLAG-Ski, pmCherry-C2/hAlix, or pCR3.1/CD63-mCherry constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The pcDNA3/FLAG-Ski WT construct was a gift from Dr. Céline Prunier (INSERM Bat Kourilsky, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France). The pCR3.1/CD63-mCherry construct was a gift from Dr. Paul D. Bieniasz (The Aaron Diamond AIDS Research Center, New York, NY). Addgene plasmid no. 21504 (pmCherry-C2/hAlix) was obtained from Dr. James Hurley (23).

**Immunoprecipitations and Western Blot Analyses**—To obtain whole cell protein extracts (total cell lysates), cells were lysed in SDS lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1% SDS plus protease and phosphatase inhibitors) and then boiled for 10 min at 100 °C, or cells were either lysed for 30 min with TNTE buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, and 1 mM EDTA plus protease and phosphatase inhibitors) or lysed for 1 h with modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS plus protease and phosphatase inhibitors). From whole cell lysates, 50–75  $\mu$ g of protein/lane was separated by SDS-PAGE and assayed by immunoblotting using specific antibodies, whereas  $\sim$ 1.5–2 mg of protein was used for each immunoprecipitation (IP). Proteins were detected by either Immobilon Western (Millipore) or Super-Signal West Pico chemiluminescent substrates (Thermo). Densitometric analysis was carried out with ImageJ 1.47 software (National Institutes of Health).

**Subcellular Fractionation and Detergent-resistant Membrane (DRM) and non-DRM Fraction Preparation**—Nuclear and cytoplasmic fractions were prepared according to a modi-



fied protocol described previously (24). C9 cells were harvested with homogenization buffer (250 mM sucrose and 3 mM imidazole (pH 7.4) plus protease and phosphatase inhibitors) and passed 10 times through a 22-gauge needle. The homogenate was centrifuged for 15 min at 3400 rpm at 4 °C. The supernatant contained the cytoplasmic fraction, and the nuclear fraction remained in the pellet. The nuclear fraction was lysed with modified RIPA buffer for 1 h at 4 °C and centrifuged at 13,200 rpm for 5 min. Modified RIPA buffer 5 $\times$  was added to the cytoplasmic fraction to get 1 $\times$  final concentration and then incubated for 1 h at 4 °C.  $\beta$ -Tubulin protein was used as a loading control. In addition, DRM (lipid raft-rich) and non-DRM were isolated from confluent cells as described previously with some modifications (25). In brief, cells were harvested with 1.5 ml of TNTE buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton X-100 plus protease and phosphatase inhibitors) and passed five times through a 25-gauge needle. Cell lysates were adjusted to 45% final concentration of sucrose (4 ml) and ultracentrifuged through a discontinuous sucrose gradient, formed previously by sequentially layering 35% sucrose (4 ml) and 5% sucrose (4 ml) at 38,000 rpm for 20 h in a Beckman SW40Ti rotor at 4 °C. Twelve fractions of 1 ml were harvested from the top of the gradient. Each fraction was solubilized for 12 h with 1% of CHAPS, and proteins were analyzed by IP and Western blot (WB). Subcellular markers such as flotillin-2 (lipid raft-associated membranes), GM130 (Golgi), and EEA1 (early endosome) proteins were used.

**Immunofluorescence Assays**—C9 cells were seeded on poly-L-lysine-coated glass coverslips in 24-well tissue culture plates, and immunofluorescence assays were performed as described previously (26). Briefly, cells were fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde in PBS at 37 °C. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min at 4 °C. Slides were incubated with blocking solution containing either 1% BSA, 10% goat serum, or 10% horse serum in PBS for 1 h at room temperature prior to incubation for 12 h at 4 °C with specific primary antibodies (diluted 1:50 or 1:100 in blocking solution). Slides were incubated with secondary antibodies (diluted 1:500 or 1:750) for 1 h at room temperature in the dark. Slides were mounted on glass coverslips using Vectashield with DAPI (Vector Laboratories). Confocal laser-scanning microscopes used were Fluoview FV1000 equipped with an oil immersion objective (Olympus PlanApoN  $\times$ 60, numerical aperture = 1.45) and Fluoview FV10i equipped with a water immersion objective (Olympus  $\times$ 60, numerical aperture = 1.2). FV10ASW software (Olympus) was used for images acquisition, processing, and analysis. The degree of colocalization was examined using the Colocalization Finder plug-in in ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/colocalization-finder.html>).

**Cell Proliferation**—C9 cells seeded at low density ( $5 \times 10^5$  cells) in 12-well tissue culture dishes were serum-starved for 24 h. Cell proliferation was stimulated with 10% FBS, and cell viability and proliferation were evaluated 24–48 h post-treatment. Medium was replaced with 2 ml of fresh medium plus 0.25 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) per well (6-well plate), and cells were incubated for 4 h at 37 °C. Then 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide formazan crystals were solubilized with 500  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide for 30 min at room

temperature and quantified at 595 nm in an ELx800 absorbance microplate reader.

**Protease Protection Assay**—Protease protection assays were performed as described previously (27) with some modifications. In brief, liver tissue was homogenized in 4 ml of buffer (250 mM sucrose, 3 mM imidazole (pH 7.4), plus phosphatase inhibitors) without protease inhibitors. Disrupted tissue was centrifuged at 2000 rpm for 10 min at 4 °C. The liver cytoplasmic fraction (30 mg of protein) was incubated for 20 min at room temperature with 0.5  $\mu$ g/ml Proteinase K (Ambion) in the absence or presence of 0.5% Triton X-100. We added 20 mM PMSF to stop the reaction, and samples were incubated for 2 h at 4 °C by adding 5 $\times$  modified RIPA. Supernatants were used for IP assays, and proteins were analyzed by WB.

**Statistical Analysis**—Student's *t* test was used to calculate statistical significance, and *p* < 0.05 was considered to be significant.

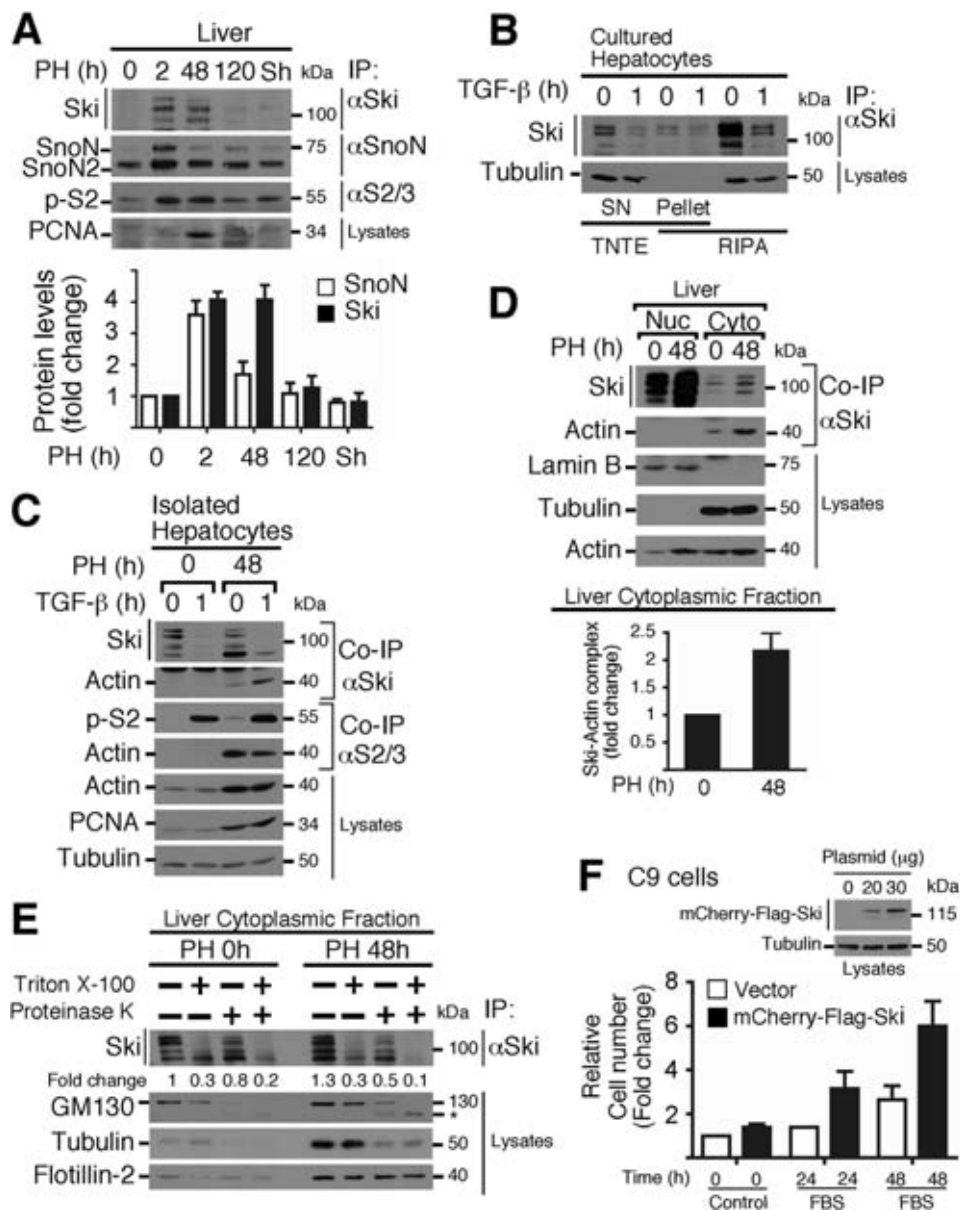
## RESULTS

**Ski Protein Is Transiently Up-regulated during Liver Regeneration**—The process of liver regeneration exhibits a spatio-temporal synchronization of many signaling pathways positively regulating cell proliferation. Paradoxically, some antimitotic signals, such as TGF- $\beta$ , are increased during liver regeneration. We reported previously that the up-regulation of TGF- $\beta$  pathway inhibitors such as Ski and SnoN may counteract TGF- $\beta$ -induced antiproliferative actions during mouse liver regeneration, allowing for other TGF- $\beta$  functions, such as extracellular matrix remodeling (21). At that time, we also proposed that the increase in Ski and SnoN protein levels and their association with the Smads might, in part, explain the resistance of hepatocytes to TGF- $\beta$  signals (21). Since then, we have been interested in discovering the mechanisms whereby hepatocytes become refractory to TGF- $\beta$ -induced antiproliferative signals, particularly in liver regeneration.

Initially, we observed that Ski and SnoN proteins were up-regulated in parallel with Smad2 protein phosphorylation in rat livers obtained from 2–120 h after partial hepatectomy but not in sham-operated rats (Fig. 1A). These data suggest that, in this cell context, the TGF- $\beta$ /Smad pathway seems to be unable to cause Ski and SnoN protein down-regulation. Interestingly, we found that a significant fraction of both proteins was associated with the Triton-insoluble fraction when primary cultured hepatocytes were lysed with TNTE buffer, whereas both proteins were better solubilized in RIPA buffer (data not shown). To gain insight into this outcome, we focused on investigating mainly the regulation of Ski protein stability in hepatocytes and the signals involved. In this study, we observed that the amount of Ski protein immunoprecipitated from RIPA lysates was higher than the amount obtained from TNTE lysates. Moreover, the effect of TGF- $\beta$  on Ski protein down-regulation was better observed in RIPA lysates (Fig. 1B). Therefore, most of the experiments were carried out with RIPA buffer unless indicated otherwise.

With this approach, we were able to detect a clear TGF- $\beta$ -induced regulation of Ski and SnoN protein levels in freshly isolated hepatocytes from normal (PH 0 h) and regenerating livers (PH 48 h) (Fig. 1C). Interestingly, we observed that Ski

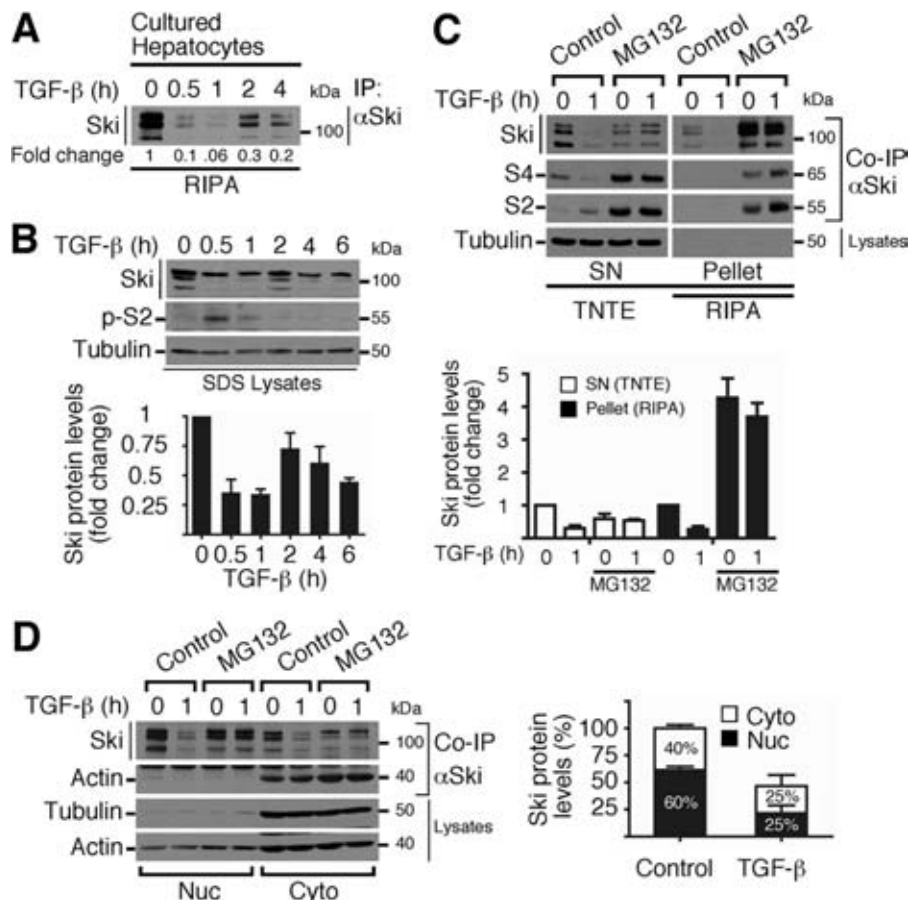
## TGF- $\beta$ and GPCR Signals Regulate Ski Protein Levels



**FIGURE 1. Ski protein levels are transiently up-regulated during liver regeneration after partial hepatectomy.** *A*, nuclear protein extracts from regenerating rat livers after PH at the indicated times (or 2-h sham-operated rats) were used to evaluate Ski, SnoN, SnoN2, phospho-Smad2, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein levels by IP/WB (top panel). Bottom panel, densitometric analysis of Ski and SnoN protein levels as -fold change induced by PH. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. PCNA protein was used as a cell proliferation marker. *B*, primary cultured hepatocytes were stimulated for 1 h without or with 0.2 nM TGF- $\beta$ . Cells were lysed with either RIPA or TNTe buffer to obtain two fractions: SN (Triton-soluble fraction) and pellet (Triton-insoluble fraction resuspended in RIPA). Immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates. *C*, hepatocytes were freshly isolated from livers obtained 0 or 48 h post-PH, stimulated for 1 h with 0.2 nM TGF- $\beta$ , and lysed with RIPA buffer. Ski and Smad2/3 proteins were immunoprecipitated, and immunoblot analyses were performed to identify the indicated proteins from IP or cell lysates. *D*, nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyto) protein extracts from regenerating rat livers after PH at the indicated times were used to evaluate the indicated proteins from IP or cell lysates (top panel). Bottom panel, densitometric analysis of the levels of cytoplasmic Ski-actin complexes expressed as -fold change induced by PH. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. *E*, cytoplasmic protein extracts were obtained from regenerating livers 0 or 48 h after PH, and then 35 mg of protein extracts was treated for 20 min with 0.5  $\mu$ g/ml proteinase K in the absence or presence of 0.5% Triton X-100. Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblot analyses were performed for the indicated proteins from IP or protein extracts. The densitometric analysis of Ski protein levels is shown as -fold change over the control. GM130, tubulin, and flotillin-2 were used as controls for protein degradation (asterisk, GM130 fragment). *F*, mCherry-FLAG-Ski protein levels were detected by immunoblot analysis of RIPA lysates from transiently transfected C9 cells with the indicated amounts of plasmid (top panel). Transiently transfected C9 cells with 30  $\mu$ g of plasmid were serum-starved for 24 h and then stimulated with 10% FBS for 24–48 h (bottom panel). Cell proliferation was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (relative cell number). Data are represented as means  $\pm$  S.D. from two independent experiments performed in triplicate.

and also Smad2 proteins were associated with actin protein (co-IP) at the proliferation phase analyzed (*i.e.* 48 h post-hepatectomy) (Fig. 1C). Additionally, Ski has been described previously as a soluble nuclear protein in many cell lines, including the hepatoma cell line HepG2. Therefore, it was unexpected to

observe that Ski protein was associated with a Triton-insoluble fraction in normal hepatocytes. When we analyzed subcellular localization of Ski in quiescent and regenerating livers (PH 48 h), the data showed that Ski exhibited mainly a nuclear localization. However, a significant fraction of Ski was cytoplasmic,



**FIGURE 2. TGF- $\beta$  induces a transient down-regulation of Ski protein via the proteasome in both the nucleus and cytoplasm of C9 cells.** *A*, primary cultures of rat hepatocytes were stimulated with 0.2 nM TGF- $\beta$  for the indicated times, and Ski protein levels were detected by IP/WB from RIPA lysates. The densitometric analysis of Ski protein levels is shown as -fold change induced by TGF- $\beta$ . *B*, C9 cells were stimulated with 0.2 nM TGF- $\beta$  for the indicated times, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from SDS buffer lysates (top panel). Bottom panel, densitometric analysis of Ski protein levels as -fold change induced by TGF- $\beta$ . Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. *C*, C9 cells were pretreated for 4 h without (control) or with 25  $\mu$ M MG132 and then stimulated for 1 h without or with 0.2 nM TGF- $\beta$ . Cells were lysed with either RIPA or TNTE buffer to obtain two fractions: SN (Triton-soluble fraction) and pellet (Triton-insoluble fraction resuspended in RIPA). Immunoblotting was performed for the indicated proteins from co-IP with Ski or cell lysates (top panel). Bottom panel, densitometric analysis of Ski protein levels as -fold change over basal. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments. *D*, C9 cells were pretreated for 4 h without (control) or with 25  $\mu$ M MG132, stimulated for 1 h with 0.2 nM TGF- $\beta$ , and then the nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyto) fractions were obtained. Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from co-IP or RIPA-lysates (left panel). Right panel, densitometric analysis of Ski protein levels as a percentage of total levels in the control (100%). Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of five independent experiments.

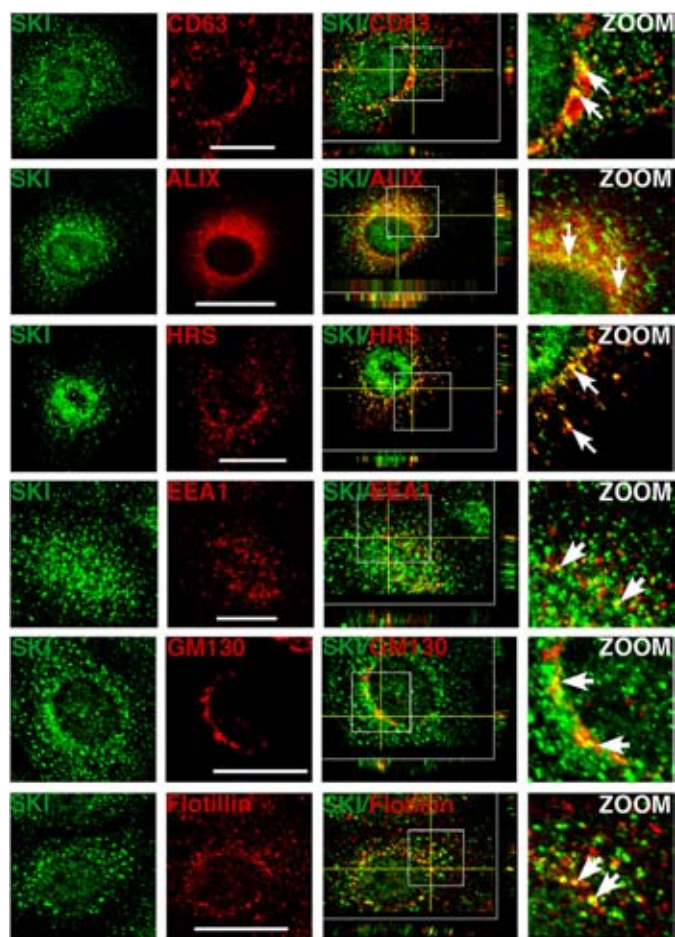
and, intriguingly, the levels of cytoplasmic Ski protein coimmunoprecipitated with actin were higher 48 h post-PH (Fig. 1D, top panel). Fig. 1D, bottom panel, shows that the levels of cytoplasmic Ski-actin complexes increased >2-fold after 48 h post-PH over the control (0 h).

In hepatocytes, Ski protein is partially localized to a Triton-insoluble fraction, which could be explained by a partial association with the cytoskeleton and/or with lipid raft-rich membranes. This hypothesis was proved to be correct by using a protease protection assay. We observed that proteinase K only partially degraded Ski protein from cytoplasmic fractions obtained from quiescent (PH 0 h) or regenerating hepatocytes (PH 48 h) in the absence or presence of 0.5% Triton X-100 (Fig. 1E). As controls, GM130, a cis-Golgi matrix protein, was degraded, whereas a protein associated with lipid raft domains such as flotillin-2 was resistant to degradation by proteinase K. The data suggest that a fraction of cytoplasmic Ski is protected from down-regulation in hepatocytes during regeneration, probably by recruitment to a lipid raft-rich compartment.

Next we analyzed whether the increase in Ski protein levels observed during liver regeneration may favor specific Ski functions, such as the promotion of cell proliferation. We observed that the proliferation rate of hepatic C9 cells in response to 10% FBS treatment for 24–48 h was increased (3- to 6-fold over the control) when Ski protein was transiently overexpressed (Fig. 1F). This result correlated well with the increase in Ski protein levels observed during the proliferative phase of liver regeneration (Fig. 1A) and in regenerating hepatocytes (Fig. 1C).

**TGF- $\beta$  Induces a Transient Down-regulation of Ski Protein via the Proteasome**—We first focused on studying the regulation of Ski protein stability and subcellular localization in normal hepatocytes. We observed that TGF- $\beta$  induced a transient down-regulation of the Ski protein in a time-dependent manner in primary cultured hepatocytes (Fig. 2A). As an additional cell model, we decided to use the C9 cell line because it exhibits similar features as normal hepatocytes. In C9 cells, TGF- $\beta$  also transiently decreased the levels of Ski protein and induced Smad2 phosphorylation (Fig. 2B). We observed that MG132





**FIGURE 3. Cytoplasmic Ski protein is partially localized at lipid raft-rich vesicles.** Immunofluorescence was performed for Ski protein in C9 cells. Ski protein exhibited a partial colocalization (arrows) with overexpressed CD63-mCherry and mCherry-Alix (MVE markers), endogenous HRS (an endosome marker), EEA1 (an early endosome marker), GM130 (a Golgi marker), and flotillin-2 (a lipid raft marker) in C9 cells. Endogenous proteins were detected by immunofluorescence. Scale bars = 20  $\mu$ m. Z stack images are shown.

inhibited TGF- $\beta$ -induced Ski down-regulation in C9 cells (Fig. 2C). Unexpectedly, MG132 treatment caused a differential distribution of the Ski protein and the Ski-associated Smad2/4 proteins (co-IPs) in both the Triton-soluble (SN) and Triton-insoluble (pellet) fractions (Fig. 2C, top panel). Fig. 2C, bottom panel, shows that MG132 increased >4-fold the Ski protein levels over the control in the RIPA lysates. We also observed that both the nuclear and cytoplasmic Ski proteins were evenly degraded via the proteasome after TGF- $\beta$  stimulus and, intriguingly, that the cytoplasmic Ski fraction is bound to actin (Fig. 2D).

**TGF- $\beta$  Controls Ski Protein Stability and Subcellular Localization**—Knowing that Ski and SnoN proteins mainly exhibit a nuclear localization in many cancer cell lines, including hepatoma cells, we analyzed Ski subcellular distribution in hepatic C9 cells by immunofluorescence. We observed that the Ski protein was localized to both the nucleus and cytoplasm. Surprisingly, control C9 cells exhibited punctate areas of Ski staining in the cytoplasm (Fig. 3).

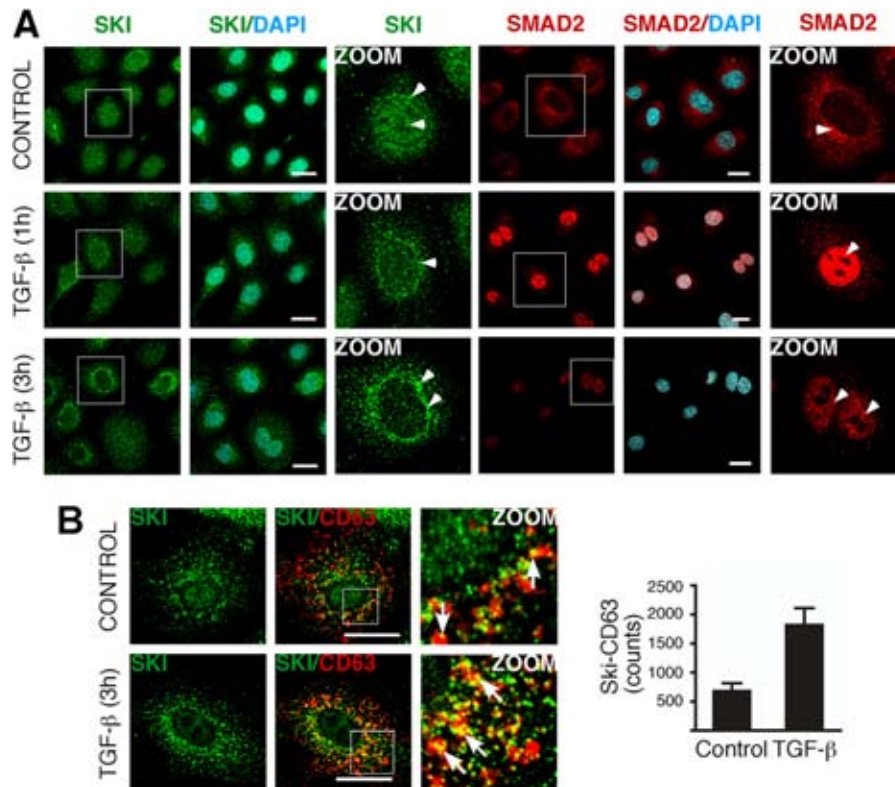
Our data show that cytoplasmic Ski exhibits a punctate pattern of localization, which is typical of the endosomal compartment. To further characterize the subcellular localization of

cytoplasmic Ski, we performed colocalization studies of Ski protein with different markers of multivesicular endosomes (MVE) and other organelles. Vesicles containing cholesterol-rich lipid rafts are commonly implicated in vesicular trafficking and also contribute to the formation of MVEs, which are relevant in different cellular processes such as protein degradation via lysosomes and protein export via exosomes. These MVEs may also serve as organelles able to temporally sequester or store signaling proteins, such as GSK3 (27). As shown in Fig. 3, endogenous Ski protein partially colocalized with the overexpressed MVE markers CD63-mCherry and mCherry-Alix and endogenous HRS. Additionally, Ski colocalized with flotillin-2, a lipid raft marker, and, to a lesser extent, with the early endosome marker EEA1 and with the Golgi marker GM130 (Fig. 3, Z stack images in merged images).

Furthermore, TGF- $\beta$  treatment for 1 h caused a down-regulation of Ski protein in both the nucleus and cytoplasm, which correlated with Smad2 nuclear localization (Fig. 4A). Intriguingly, TGF- $\beta$  also promoted a partial redistribution of cytoplasmic Ski protein to the perinuclear region after 3 h of treatment (Fig. 4A, magnified images). Additionally, TGF- $\beta$  treatment enhanced Ski protein colocalization with CD63-mCherry, a late endocytic MVE and exosome marker (Fig. 4B, left panel). The index of colocalization of Ski-CD63 corresponds to  $679 \pm 136$  counts (control) and  $1818 \pm 291$  counts (TGF- $\beta$ ) ( $p < 0.004$ ,  $n = 12$ ), as shown in Fig. 4B, right panel. These data indicate that TGF- $\beta$  treatment for 3 h promoted Ski-CD63 colocalization (2.7-fold over the control) in C9 cells. Together, our findings suggest that, in normal hepatocytes, cytoplasmic Ski protein exhibits different subcellular localizations, including its association with endosomes resembling MVEs, and it is also clear that Ski protein stability and its subcellular localization are regulated by TGF- $\beta$ .

**Ski Protein Is Partially Associated with Lipid Rafts**—Our findings indicating that a fraction of the whole Ski protein is partially associated with a Triton-insoluble fraction suggest that Ski might be located in cholesterol-rich vesicles. To test this, C9 cells were pretreated with the cholesterol-chelating agents filipin and M $\beta$ CD, followed by TGF- $\beta$  treatment for 1 h, and lysed with TNTE or RIPA buffer. Ski protein was detected by IP/WB. As shown in Fig. 5A, M $\beta$ CD treatment not only enriched Ski protein levels in the TNTE-soluble fraction but also disrupted the Ski-actin protein association in RIPA buffer. Despite the fact that neither agent altered the TGF- $\beta$  effect on Ski protein stability (Fig. 5A), the ability of M $\beta$ CD to extract cholesterol from the plasma membrane and intracellular compartments, promoting raft disruption and the solubilization of proteins from rafts (28), could explain the differential results obtained with M $\beta$ CD and filipin treatments on the Ski-actin protein association. Moreover, MG132 pretreatment of C9 cells partially increased Ski protein levels in the Triton-insoluble fraction (pellet) (25% from total) compared with the soluble fraction (SN) (16% from total), and M $\beta$ CD pretreatment blocked this effect (pellet) (13% from total) (Fig. 5B). These data suggest that Ski protein is partially associated with lipid rafts that are generally associated with the DRMs (29, 30).

Next we decided to analyze DRMs (cholesterol-rich) by separating DRM and non-DRM fractions from C9 cells. As shown



**FIGURE 4. TGF- $\beta$  promotes a transient localization of Ski protein at lipid raft-rich vesicles.** *A*, C9 cells were stimulated without (CONTROL) or with 0.2 nM TGF- $\beta$  for 1 and 3 h. Subcellular localization of the indicated proteins was analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy (arrowheads). Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 20  $\mu$ m. Magnified images are shown (ZOOM). *B*, C9 cells transiently overexpressing the MVE marker CD63-mcherry were incubated for 3 h without (CONTROL) or with 0.2 nM TGF- $\beta$ . Subcellular colocalization (arrows) of the indicated proteins was analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy. Scale bars = 20  $\mu$ m. Right panel, quantitative analysis of Ski-CD63 protein colocalization expressed as counts (number of pixels) induced by TGF- $\beta$ . Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

in Fig. 5C, Ski protein was localized in both the DRM and non-DRM fractions from control cells. Notably, Ski protein at non-DRMs was more sensitive to TGF- $\beta$ -induced down-regulation. It is possible that Ski protein becomes partially sequestered at MVEs to prevent total protein depletion after TGF- $\beta$  stimulation. MG132 induced an accumulation of Ski protein in both the DRM and non-DRM fractions, whereas M $\beta$ CD blocked Ski protein association with the DRM fraction (Fig. 5C). Therefore, our findings support the hypothesis that Ski protein is partially associated with lipid raft-rich vesicles in normal hepatocytes.

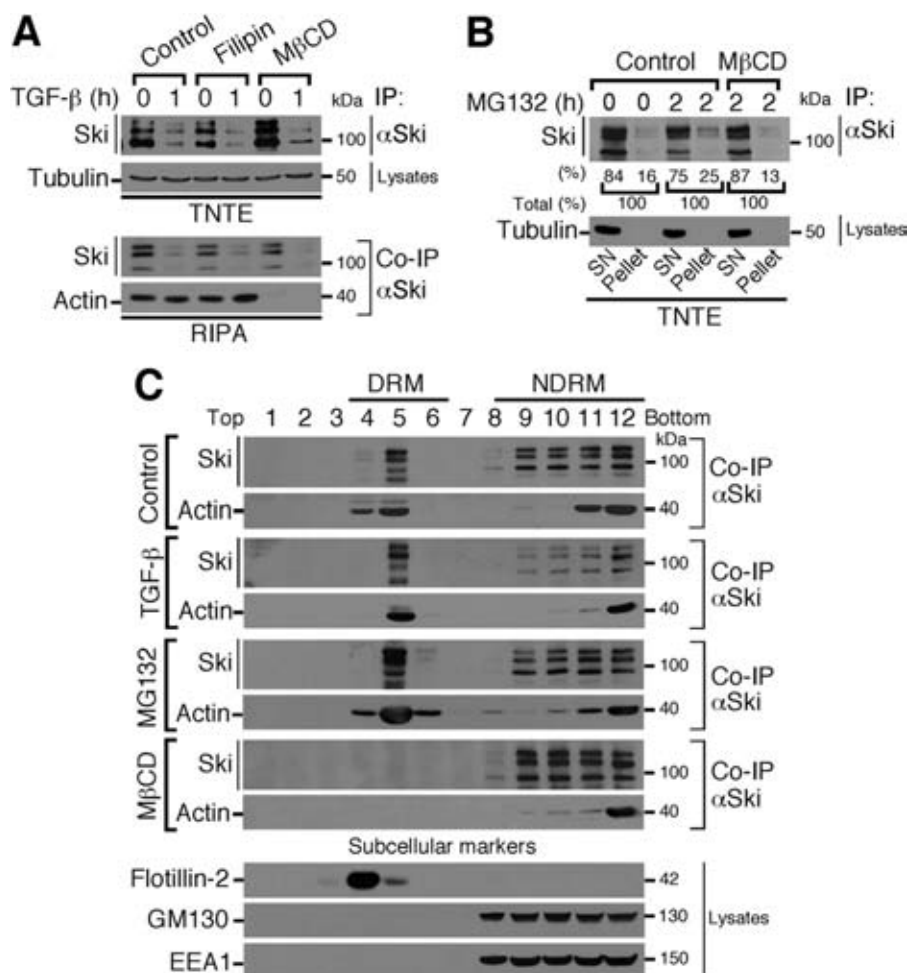
**Actin Cytoskeleton Dynamics Modulate Ski Protein Stability**—Our data suggesting that changes in actin cytoskeleton dynamics (actin polymerization or depolymerization) might control Ski protein stability led us to investigate different cellular contexts where the cytoskeleton rearrangement is relevant, such as cell-cell contact controlled by cellular confluence. Therefore, C9 cells were seeded at low (sparse) and high (confluent) density, and Ski protein stability was analyzed. As shown in Fig. 6A, Ski protein is highly stabilized in confluent C9 cells in both the nuclear and cytoplasmic compartments, suggesting that the Ski protein could be sensitive to actin cytoskeleton rearrangements that occur in cells when cell-cell junctions are decreased (sparse) or increased (confluent). Furthermore, TGF- $\beta$  treatment efficiently down-regulated Ski protein levels in both sparse and confluent cells (Fig. 6B, top panel). Fig. 6B, bottom panel, shows that the levels of Ski protein were 6-fold higher in confluent than in sparse C9 cells.

Next we tested whether pharmacological modulators of actin cytoskeleton dynamics might affect the stability of Ski protein and its association with actin. Strikingly, LatB, an inhibitor of actin polymerization, increased Ski protein stability (Fig. 6C), whereas Jasp, a potent inducer of actin polymerization, decreased Ski protein stability (Fig. 6C). Interestingly, actin cytoskeleton dynamics modulated Ski protein association to DRM and non-DRM fractions. Therefore, Jasp induced an increase in Ski protein levels associated with the DRM fraction, whereas LatB induced an increase in Ski protein levels associated with the non-DRM fraction and impaired the association of Ski protein with the DRM fraction (Fig. 6D). Notably, the Ski-actin interaction (co-IP) was increased in both the DRM and non-DRM fractions by Jasp treatment (Fig. 6D). Jasp treatment increased the levels of Ski-actin complexes 15-fold over the control, whereas LatB decreased such complexes 0.25-fold compared with the control (Fig. 6E). Neither LatB nor Jasp affected basal or TGF- $\beta$ -induced Smad2 phosphorylation (data not shown). All of these data indicate that actin cytoskeleton dynamics control Ski protein stability and also strongly suggest that a fraction of cytoplasmic Ski is associated, possibly along with actin, to a subset of vesicles containing cholesterol-rich lipid rafts.

**GPCR Signaling Pathways Differentially Modulate Ski Protein Stability**—Knowing that GPCRs control diverse pathways that are highly active during liver regeneration and that it has been reported recently that these receptors can differentially



## TGF- $\beta$ and GPCR Signals Regulate Ski Protein Levels

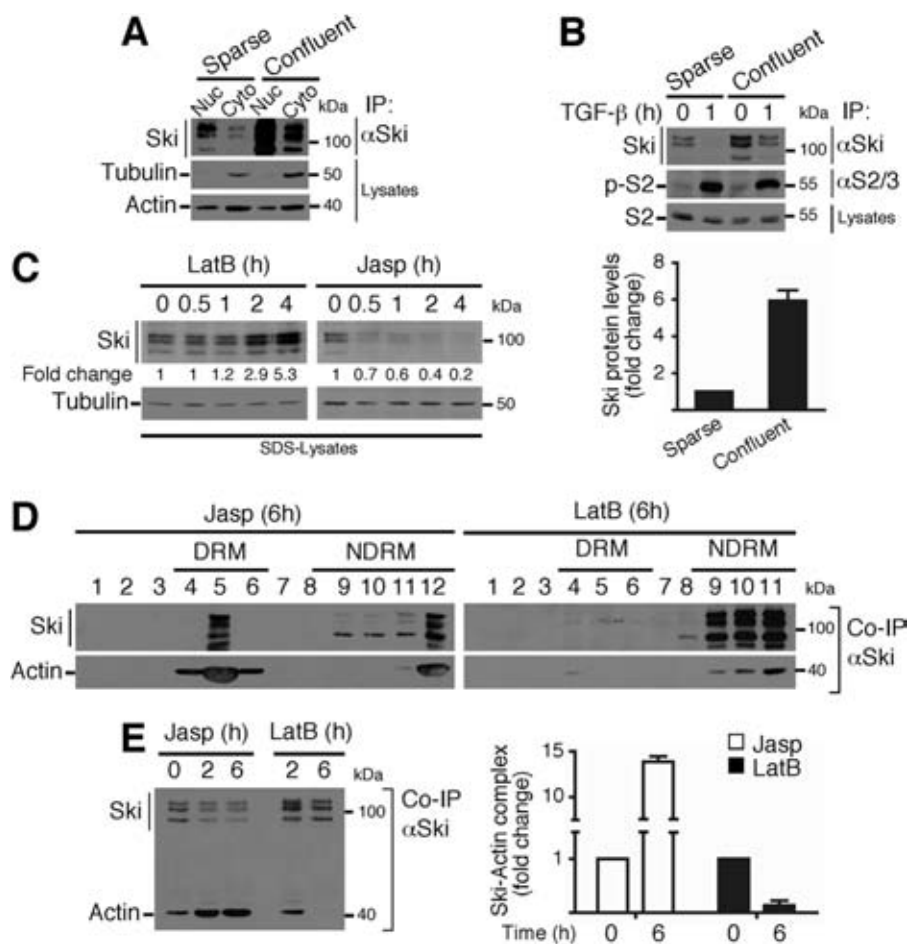


**FIGURE 5. Ski protein is localized in both the DRMs and non-DRMs.** *A*, C9 cells were pretreated for 4 h without (*Control*) or with 2.5  $\mu$ M filipin or 2.5 mM M $\beta$ CD, stimulated for 1 h with 0.2 nM TGF- $\beta$ , and lysed with TNE or RIPA buffer. Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates. *B*, C9 cells were preincubated for 4 h without (*Control*) or with 2.5 mM M $\beta$ CD, treated for 2 h without or with 25  $\mu$ M MG132, and lysed with TNE buffer to obtain two fractions: SN (Triton-soluble fraction) and pellet (Triton-insoluble fraction resuspended in RIPA). Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates. The partitioning of Ski protein between the SN and pellet after MG132 treatment is shown as a percentage of total Ski protein (100%). *C*, C9 cells were stimulated in the absence (*Control*) or presence of 0.2 nM TGF- $\beta$  for 1 h or incubated for 4 h with 25  $\mu$ M MG132 or 2.5 mM M $\beta$ CD. DRMs and non-DRMs were obtained. Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates. Subcellular markers were detected: flotillin-2 (lipid raft-associated), GM130 (Golgi), and EEA1 (early endosomes).

regulate the dynamics of the actin cytoskeleton to control the Hippo pathway (2, 31, 32), we further analyzed whether Ski protein stability was regulated by either GPCRs controlling cAMP levels, such as the glucagon receptor, or GPCRs coupled to G12/13 and Rho-GTPase activation, such as the S1P and LPA receptors. When C9 cells were treated for different times with LPA or S1P, we observed that both stimuli induced a transient down-regulation of Ski protein (Fig. 7A). As a positive control, we observed that TAZ protein stability was increased (Fig. 7A). Intriguingly, we did not see any significant modulation of Smad2 phosphorylation or its subcellular localization by agents controlling actin cytoskeleton dynamics or the Hippo pathway in hepatocytes (data not shown), even though it has been shown previously that the Hippo pathway controls Smad2 in embryonic cells (33). In addition, Ski protein down-regulation and Ski-actin association (co-IPs) induced by S1P were inhibited by pretreatment with MG132, LatB, and Y27632 (a ROCK inhibitor) (Fig. 7B). By contrast, we observed that stimulators of cAMP accumulation, such as glucagon or a mixture of F/IBMX,

induced an increase in Ski protein stability (Fig. 7C) and that F/IBMX pretreatment inhibited the LPA- and S1P-mediated reduction of Ski stability (Fig. 7D, *left panel*). Fig. 7D, *right panel*, shows that S1P and LPA increased the levels of Ski-actin complexes 15-fold over basal in control cells. Intriguingly, M $\beta$ CD treatment prevented Ski down-regulation induced by S1P and also the Ski-actin interaction (Fig. 7E), but it did not change the Ski/Smad4 interaction (Fig. 7, E and F) or Ski subcellular localization (Fig. 7, F and G). Together, these data suggest considering the possibility that the association between Ski and actin may rely on the participation of an adaptor or scaffold protein rather than a direct interaction. However, this remains to be investigated.

On the basis of these results, we show a model depicting the proposed mechanism (Fig. 8). Accordingly, TGF- $\beta$ /Smad pathway and/or the stabilization of actin filaments promoted by the GPCR/G13/Rho signaling axis can decrease Ski protein stability, whereas the GPCR/cAMP pathway disrupts actin filaments and, consequently, increases Ski protein stability in hepatocytes.



**FIGURE 6. Actin cytoskeleton dynamics modulate Ski protein stability.** *A*, the nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyto) fractions were obtained from sparse or confluent C9 cells, Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates. *B*, sparse or confluent C9 cells were treated for 1 h with TGF- $\beta$ . Ski and Smad2 proteins were immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates (top panel). Bottom panel, densitometric analysis of Ski protein levels as -fold change in sparse versus confluent C9 cells. *C*, C9 cells were treated with 1  $\mu$ M LatB or 0.5  $\mu$ M Jasp for the indicated times, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from SDS buffer lysates. The densitometric analysis of Ski protein levels is shown as -fold change over basal. *D*, C9 cells were treated for 6 h with 0.5  $\mu$ M Jasp or 1  $\mu$ M LatB, and DRMs and non-DRMs were obtained. Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from co-IP. *E*, C9 cells were treated for 2 and 6 h with 0.5  $\mu$ M Jasp or 1  $\mu$ M LatB. Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from co-IP (left panel). Right panel, densitometric analysis of Ski-actin complex levels as -fold change induced by Jasp or LatB. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

## DISCUSSION

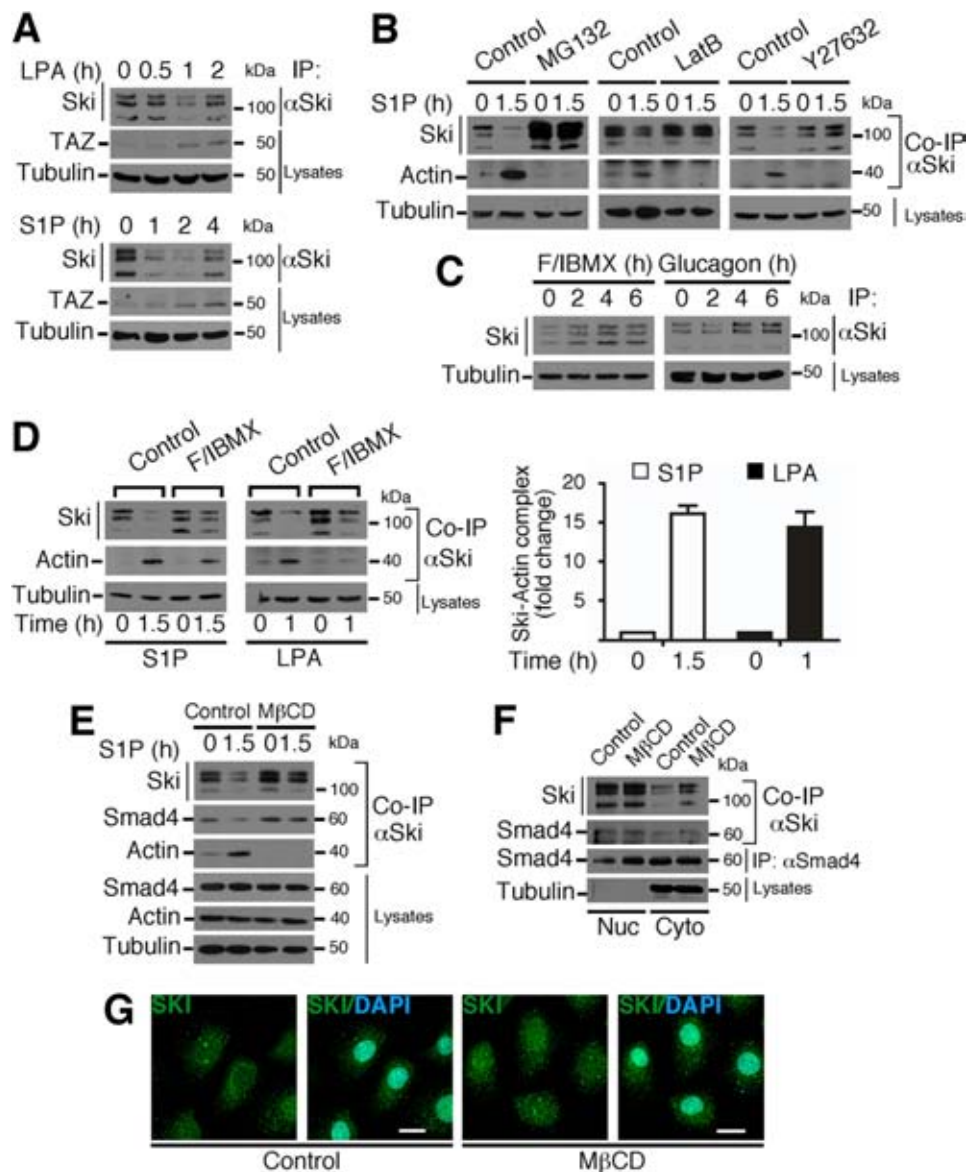
Ski protein is a major transcriptional corepressor for the TGF- $\beta$ /Smad pathway. Therefore, its levels may determine the TGF- $\beta$  signaling outcome (e.g. high Ski protein levels are associated with an inhibition of TGF- $\beta$ -induced signals). The relevance of maintaining appropriate Ski protein levels for homeostasis has been clearly demonstrated. Recently, several in-frame mutations in exon 1 of Ski (the R-Smad binding region) have been identified as the main cause of the human Shprintzen-Goldberg syndrome, and increased TGF- $\beta$  signaling has been associated with this pathogenesis (34). Furthermore, Ski knockout mice exhibit embryonic lethality, and heterozygous mice show a high sensitivity to developing cancer (35, 36). By contrast, transgenic mice overexpressing Ski protein exhibit increased muscle mass (17). Additionally, high levels of Ski protein have been involved in the switch from glycolysis to oxidative energy metabolism in cancer cells (37).

In many cancer cells, Ski overexpression occurs mainly in the nucleus, where it may recruit histone deacetylases to eventually

repress TGF- $\beta$  target genes. Some reports suggest that cytoplasmic Ski protein may act by sequestering Smad proteins and impairing their translocation to the nucleus. In some cancer cells, TGF- $\beta$  induces Ski protein down-regulation via the proteasome, whereas, in other cancer cells, Ski protein seems to be resistant to TGF- $\beta$ -induced degradation. Although the mechanisms underlying this cell-to-cell variability are unclear, it has been suggested that expression of specific E3 ubiquitin ligases may be important (38). Notably, there are very few studies of Ski and SnoN protein regulation and function in normal cells (39).

TGF- $\beta$ -induced signaling is highly modulated during many physiological processes. One example is its regulation in cells with an elevated proliferation rate, such as those found in liver regeneration and cancer. Hepatic regeneration is an excellent model for studying the regulation of cell proliferation and how hepatic cells can proliferate in the presence of an antimetabolic cytokine as TGF- $\beta$ , which has been an enigma. We have proposed that the up-regulation of Ski and SnoN inhibitors might explain the transient resistance to TGF- $\beta$  signals exhibited by

## TGF- $\beta$ and GPCR Signals Regulate Ski Protein Levels



**FIGURE 7. GPCR signaling pathways differentially modulate Ski protein stability.** *A*, C9 cells were stimulated with 1  $\mu$ M LPA or 1  $\mu$ M S1P for the indicated times. TAZ protein levels indicate LPA or S1P receptor activation. *B*, C9 cells were pretreated for 4 h without (*Control*) or with 25  $\mu$ M MG132, 5  $\mu$ M LatB, or 30  $\mu$ M Y27632 and then stimulated for 1.5 h with 1  $\mu$ M S1P. *C*, C9 cells were stimulated with a mixture of 1  $\mu$ M F/100  $\mu$ M IBMX mixture or with 2  $\mu$ M glucagon for the indicated times. *D*, C9 cells were preincubated for 1 h in the absence (*Control*) or presence of a mixture of 2  $\mu$ M F/100  $\mu$ M IBMX and then stimulated for 1.5 h with 1  $\mu$ M S1P or for 1 h with 1  $\mu$ M LPA (*left panel*). *Right panel*, densitometric analysis of Ski-actin complex levels as -fold change induced by S1P or LPA. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. *E*, C9 cells were pretreated without (*Control*) or with M $\beta$ CD for 4 h and stimulated with 1  $\mu$ M S1P for 1.5 h. *F*, C9 cells were treated with M $\beta$ CD for 3 h, and the nuclear (*Nuc*) and cytoplasmic (*Cyto*) fractions were obtained. In *A–F*, Ski protein was immunoprecipitated, and immunoblotting was performed for the indicated proteins from IP or cell lysates. *G*, C9 cells were treated with M $\beta$ CD for 3 h, and endogenous Ski protein was detected by immunofluorescence. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 20  $\mu$ m.

hepatocytes during liver regeneration (21). Surprisingly, during this study, we found a novel mechanism for the regulation of Ski protein stability in normal hepatocytes involving a convergence of TGF- $\beta$  and GPCR signals with actin cytoskeleton participation. Therefore, we focused on studying the molecular mechanisms involved in controlling Ski protein stability in normal hepatocytes.

In our model of normal hepatocytes, Ski protein appears to be distributed in both the nucleus and cytoplasm. Cytoplasmic Ski shows a punctate localization and partial association with the DRM fraction. We found that a fraction of cytoplasmic Ski is partially localized to a subset of lipid raft-rich vesicles, some of them containing MVE markers such as CD63 and Alix. We

also found that nuclear and cytoplasmic Ski are quite sensitive to proteasome-dependent down-regulation in response to TGF- $\beta$  or any stimulus that increases the polymerization of actin filaments, such as Jasp, S1P, or LPA. However, Ski protein stability is increased in response to any stimulus that decreases actin filament polymerization, such as LatB or glucagon-stimulated GPCR/cAMP signals (Fig. 7). To our knowledge, this is the first demonstration of Ski protein localization at the MVE in normal hepatocytes, and we also show that its stability is associated with the dynamics of the actin cytoskeleton. We suggest that this novel regulation of Ski protein stability is an event that possibly occurs during liver regeneration, when extracellular matrix remodeling modifies the architecture of the liver, caus-



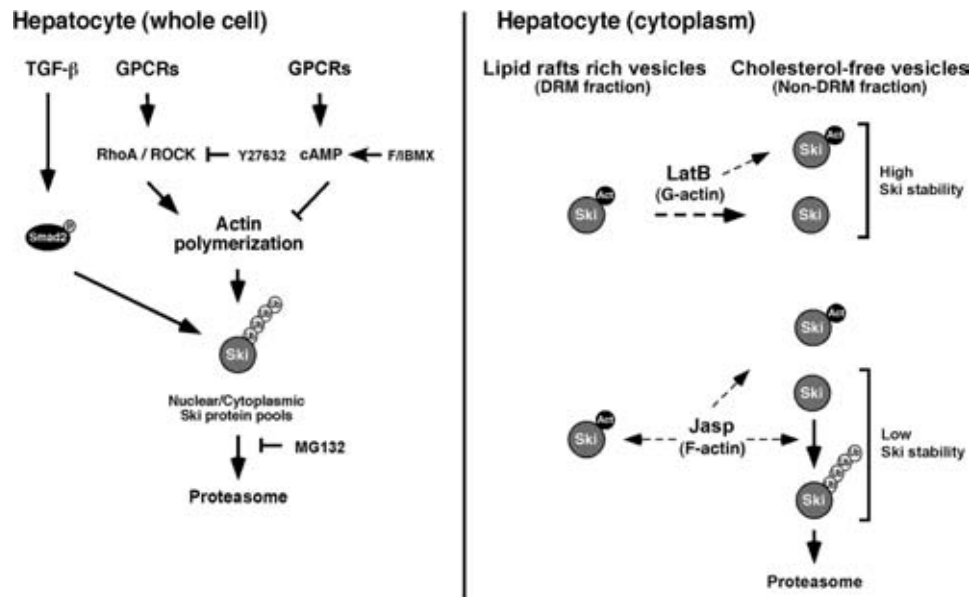


FIGURE 8. **Model showing the regulation of Ski protein by TGF- $\beta$  signaling and actin polymerization in hepatocytes.** All Ski protein pools (nuclear and cytoplasmic) are similarly sensitive to down-regulation induced by TGF- $\beta$  or actin polymerization independently of Ski subcellular localization (*left panel*). Intriguingly, cytoplasmic Ski protein stability regulated by the actin cytoskeleton dynamics depends on Ski-actin complex association, and the pool of Ski protein localized at lipid raft-rich vesicles seems to be protected from degradation induced by actin polymerization (*right panel*). (P = phosphate; Act = actin; Ub = ubiquitin).

ing hepatocytes to reorganize their cytoskeletons to migrate to new positions within the regenerating liver. Intriguingly, this novel regulation of Ski stability in normal hepatocytes seems to be lost in hepatoma cells.

Many signals are involved in regulating liver regeneration, and, possibly, many of them control the expression of the transcriptional coregulator Ski during this process. Therefore, our work is an initial approach to reveal the molecular mechanisms and the potential consequences of the regulation of Ski protein stability and sorting in hepatocytes. Although TGF- $\beta$  signaling is present during regeneration, its inhibitory action on Ski protein levels may be counteracted by other signals that modulate hepatocyte polarity, a tightly regulated process that takes place during regeneration (40). However, Ski is a transcriptional coregulator for other signaling pathways distinct from TGF- $\beta$ , such as Wnt, Shh, retinoic acid, and other pathways involving nuclear receptors (17). Further investigation will be required to determine whether the regulation of Ski stability and sorting in hepatocytes influences those other signaling pathways during the regenerative process.

Notably, there is also evidence suggesting a positive role for Ski during cell cycle progression because Ski seems to promote proliferation of some cell types, such as muscle cells, melanoma cells, and fibroblasts (41–43). The mechanisms are unknown, but they may be related to the inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling (44–46) or by the sequestration of the tumor suppressor Rb in the cytoplasm (47). Additionally, Ski has been localized at centrosomes and the mitotic spindle during cell mitosis (48). Here we found that Ski seems to favor the proliferation of normal hepatocytes. However, the mechanisms involved have also not been fully elucidated.

In conclusion, our work demonstrates a novel mechanism that regulates Ski protein levels in normal hepatocytes through different stimuli (Fig. 8). In these cells, Ski protein is able to

sense changes in actin cytoskeleton dynamics that control its own stability and endosomal sorting. Additionally, the regulation of Ski protein stability by GPCR pathways seems to be tightly associated with actin cytoskeleton dynamics.

*Acknowledgments*—We thank Drs. J. Vázquez-Prado and J. Chimal-Monroy for helpful discussions. We also thank Dr. J. A. García-Sáinz (IFC, UNAM) for the C9 and HepG2 cell lines and all members from Unidad de Imagenología, Bioterio, and Unidad de Cómputo at IFC, UNAM.

## REFERENCES

1. Taub, R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 836–847
2. Michalopoulos, G. K. (2007) Liver Regeneration. *J. Cell Physiol.* **213**, 286–300
3. Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J. G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., Braeuning, A., Budinsky, R. A., Burkhardt, B., Cameron, N. R., Camussi, G., Cho, C. S., Choi, Y. J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., Damm, G., Dirsch, O., Donato, M. T., Dong, J., Dooley, S., Drasdo, D., Eakins, R., Ferreira, K. S., Fonsato, V., Fraczek, J., Gebhardt, R., Gibson, A., Glanemann, M., Goldring, C. E., Gómez-Lechón, M. J., Groothuis, G. M., Gustavsson, L., Guyot, C., Hallifax, D., Hammad, S., Hayward, A., Häussinger, D., Hellerbrand, C., Hewitt, P., Hoehme, S., Holzhütter, H. G., Houston, J. B., Hrach, J., Ito, K., Jaeschke, H., Keitel, V., Kelm, J. M., Kevin Park, B., Kordes, C., Kullak-Ublick, G. A., LeCluyse, E. L., Lu, P., Luecke-Wheeler, J., Lutz, A., Maltman, D. J., Matz-Soja, M., McMullen, P., Merfort, I., Messner, S., Meyer, C., Mwyni, J., Naisbitt, D. J., Nussler, A. K., Olinga, P., Pampaloni, F., Pi, J., Pluta, L., Przyborski, S. A., Ramachandran, A., Rogiers, V., Rowe, C., Schelcher, C., Schmich, K., Schwarz, M., Singh, B., Stelzer, E. H., Stieger, B., Stöber, R., Sugiyama, Y., Tetta, C., Thasler, W. E., Vanhaecke, T., Vinken, M., Weiss, T. S., Widera, A., Woods, C. G., Xu, J. J., Yarborough, K. M., and Hengstler, J. G. (2013) Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* **87**, 1315–1530

## TGF- $\beta$ and GPCR Signals Regulate Ski Protein Levels

- Herrera, B., Alvarez, A. M., Beltrán, J., Valdés, F., Fabregat, I., and Fernández, M. (2004) Resistance to TGF- $\beta$ -induced apoptosis in regeneration hepatocytes. *J. Cell Physiol.* **201**, 385–392
- Romero-Gallo, J., Sozmen, E. G., Chytil, A., Russell, W. E., Whitehead, R., Parks, W. T., Holdren, M. S., Her, M. F., Gautam, S., Magnuson, M., Moses, H. L., and Grady, W. M. (2005) Inactivation of TGF- $\beta$  signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* **24**, 3028–3041
- Coulouarn, C., Factor, V. M., and Thorgeirsson, S. S. (2008) Transforming growth factor- $\beta$  gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology* **47**, 2059–2067
- Dooley, S., and ten Dijke, P. (2012) TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* **347**, 245–256
- Mu, X., Lin, S., Yang, J., Chen, C., Chen, Y., Herzig, M. C., Washburn, K., Half, G. A., Walter, C. A., Sun, B., and Sun, L. Z. (2013) TGF- $\beta$  signaling is often attenuated during hepatomorigenesis, but is retained for the malignancy of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE* **8**, e63436
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* **370**, 341–347
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996) MADR2 is a substrate of the TGF- $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**, 1215–1224
- Massagué, J. (2012) TGF- $\beta$  signaling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630
- Luo K. (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 65–70
- Imamura, T., Oshima, Y., and Hikita, A. (2013) Regulation of TGF- $\beta$  family signaling by ubiquitination and deubiquitination. *J. Biochem.* **154**, 481–489
- Luo, K., Stroschein, S. L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., and Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev.* **13**, 2196–2206
- Nomura, T., Khan, M. M., Kaul, S. C., Dong, H. D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I., and Ishii, S. (1999) Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and Thyroid hormone receptor. *Genes Dev.* **13**, 412–423
- Xu, W., Angelis, K., Danielpour, D., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Stavnezer, E., and Medrano, E. E. (2000) Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type  $\beta$  transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5924–5929
- Bonnon, C., and Atanasoski, S. (2012) c-Ski in health and disease. *Cell Tissue Res.* **347**, 51–64
- Tecalco-Cruz, A. C., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Victorio, G., Ortiz-García, L., Domínguez-Hüttinger, E., and Macías-Silva, M. (2012) Transforming growth factor- $\beta$ /SMAD target gene *skil* is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *J. Biol. Chem.* **287**, 26764–26776
- Atanasoski, S., Notterpek, L., Lee, H. Y., Castagner, F., Young, P., Ehrengruber, M. U., Meijer, D., Sommer, L., Stavnezer, E., Colmenares, C., and Suter, U. (2004) The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* **43**, 499–511
- Nagata, M., Goto, K., Ehata, S., Kobayashi, N., Saitoh, M., Miyoshi, H., Imamura, T., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2006) Nuclear and cytoplasmic c-Ski differently modulates cellular functions. *Genes Cells* **11**, 1267–1280
- Macías-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A., and Taub, R. (2002) Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- $\beta$  signals during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **277**, 28483–28490
- Delgado-Coello, B., Bravo-Martínez, J., Sosa-Garrocho, M., Briones-Orta, M. A., Macías-Silva, M., and Mas-Oliva, J. (2010) Plasma membrane calcium ATPase isoform 3 expression in single cell types isolated from rat liver. *Mol. Cell Biochem.* **344**, 117–124
- Lee, H. H., Elia, N., Ghirlando, R., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J. H. (2008) Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science* **322**, 576–580
- Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Wendt, D., Salomon, G., Enrich, C., Beisiegel, U., and Jäckle, S. (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J. Biol. Chem.* **275**, 33806–33813
- Slimane, T. A., Trugnan, G., Van Ijzendoorn, S. C., and Hoekstra, D. (2003) Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol. Biol. Cell* **14**, 611–624
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., and Sabatini, D. M. (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290–303
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D., and De Robertis E. M. (2010) Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**, 1136–1148
- Awasthi-Kalia, M., Schnetkamp, P. P., and Deans, J. P. (2001) Differential effects of filipin and methyl- $\beta$ -cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 77–82
- Simons, K., and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39
- Delgado-Coello, B., Briones-Orta, M. A., Macías-Silva, M., and Mas-Oliva, J. (2011) Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver Int.* **31**, 1271–1284
- Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X. D., Mills, G. B., and Guan, K. L. (2012) Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780–791
- Yu, F.-X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S. S., Lai, Z.-C., and Guan, K.-L. (2013) Protein kinase A activates the hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev.* **27**, 1223–1232
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B. G., Rossant, J., and Wrana, J. L. (2010) The crumbs complex couples cell density sensing to hippo-dependent control of the TGF- $\beta$ -Smad pathway. *Dev. Cell* **19**, 831–844
- Doyle, A. J., Doyle, J. J., Bessling, S. L., Maragh, S., Lindsay, M. E., Schepers, D., Gillis, E., Mortier, G., Homfray, T., Sauls, K., Norris, R. A., Huso, N. D., Leahy, D., Mohr, D. W., Caulfield, M. J., Scott, A. F., Destrée, A., Hennekam, R. C., Arn, P. H., Curry, C. J., Van Laer, L., McCallion, A. S., Loeyes, B. L., and Dietz, H. C. (2012) Mutations in the TGF- $\beta$  repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat. Genet.* **44**, 1249–1254
- Berk, M., Desai, S. Y., Heyman, H. C., and Colmenares, C. (1997) Mice lacking the *ski* proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev.* **11**, 2029–2039
- Shinagawa, T., Nomura, T., Colmenares, C., Ohira, M., Nakagawara, A., and Ishii, S. (2001) Increased susceptibility to tumorigenesis of *ski*-deficient heterozygous mice. *Oncogene* **20**, 8100–8108
- Ye, F., Lemieux, H., Hoppel, C. L., Hanson, R. W., Hakimi, P., Croniger, C. M., Puchowicz, M., Anderson, V. E., Fujioka, H., and Stavnezer, E. (2011) Peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) mediates a Ski oncogene-induced shift from glycolysis to oxidative energy metabolism. *J. Biol. Chem.* **286**, 40013–40024
- Briones-Orta, M. A., Levy, L., Madsen, C. D., Das, D., Erker, Y., Sahai, E., and Hill, C. S. (2013) Arkadia regulates tumor metastasis by modulation of the TGF- $\beta$  pathway. *Cancer Res.* **73**, 1800–1810
- Krakowski, A. R., Laboureau, J., Mauviel, A., Bissell, M. J., and Luo, K. (2005) Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- $\beta$  signaling by sequestering of the Smad proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 12437–12442
- Wang, L., and Boyer, J. L. (2004) The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* **39**, 892–899
- Soeta, C., Suzuki, M., Suzuki, S., Naito, K., Tachi, C., and Tojo, H. (2001) Possible role for the c-ski gene in the proliferation of myogenic cells in regenerating skeletal muscles of rats. *Dev. Growth Differ.* **43**, 155–164
- Reed, J. A., Lin Q., Chen, D., Mian, I. S., and Medrano, E. E. (2005) Ski pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis*

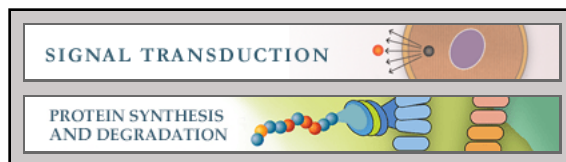
- Rev.* **24**, 265–272
43. Liu, X., Li, P., Liu, P., Xiong, R., Zhang, E., Chen, X., Gu, D., Zhao, Y., Wang, Z., and Zhou, Y. (2008) The essential role for c-Ski in mediating TGF- $\beta$ 1-induced bi-directional effects on skin fibroblast proliferation through a feedback loop. *Biochem. J.* **409**, 289–297
44. Kokura, K., Kim, H., Shinagawa, T., Khan, M. M., Nomura, T., and Ishii, S. (2003) The Ski-binding protein C184M negatively regulates tumor growth factor- $\beta$  signaling by sequestering the smad proteins in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **278**, 20133–20139
45. Prunier, C., Pessah, M., Ferrand, N., Seo, S. R., Howe, P., and Atfi, A. (2003) The oncoprotein Ski acts as an antagonist of transforming growth factor- $\beta$  signaling by suppressing Smad2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 26249–26257
46. Ferrand, N., Atfi, A., and Prunier, C. (2010) The oncoprotein c-ski functions as a direct antagonist of the transforming growth factor- $\beta$  type I receptor. *Cancer Res.* **70**, 8457–8466
47. Jacob, C., Grabner, H., Atanasoski, S., and Suter, U. (2008) Expression and localization of Ski determine cell type-specific TGF- $\beta$  signaling effects on the cell cycle. *J. Cell Biol.* **182**, 519–530
48. Marcelain, K., and Hayman, M. J. (2005) The Ski oncoprotein is up-regulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* **24**, 4321–4329

**Signal Transduction:**  
**Novel Regulation of Ski Protein Stability  
and Endosomal Sorting by Actin  
Cytoskeleton Dynamics in Hepatocytes**

Genaro Vázquez-Victorio, Cassandre  
Caligaris, Eugenio Del Valle-Espinosa,  
Marcela Sosa-Garrocho, Nelly R.  
González-Arenas, Guadalupe Reyes-Cruz,  
Marco A. Briones-Orta and Marina  
Macías-Silva

*J. Biol. Chem.* 2015, 290:4487-4499.

doi: 10.1074/jbc.M114.579532 originally published online January 5, 2015



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.579532](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579532)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 48 references, 18 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/290/7/4487.full.html#ref-list-1>