



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ Regulación de la estabilidad proteica de los co-represores Ski y SnoN
en hepatocitos normales y en hepatocarcinoma ”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Cassandre Caligaris Benoit

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jorge Vázquez Ramos (Facultad de Química, UNAM)
Dr. Félix Recillas Targa (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

MÉXICO, D. F., Agosto 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.

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

El proyecto fue apoyado por los donativos de PAPIIT/DGAPA/UNAM No. IN206012 y IN208115, y de CONACYT No. 101826 y No. 240224.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Marina Macías por sus valiosas enseñanzas.

A la Biól. Marcela Sosa, Técnica Académica del laboratorio, por su asesoría en las técnicas para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio, por su apoyo en las partes teóricas y técnicas de este proyecto.

A la M. en C. Diana Ríos López, por su invaluable ayuda en la parte técnica de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Félix Recillas Targa y Dr. Jorge Vázquez Ramos, gracias por haber seguido el desarrollo de este trabajo y por sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Álvaro Marín Hernández, por colaborar en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios de generación de oligonucleótidos y secuenciación: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros del taller del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortíz Benavides, por su aportación en el mantenimiento del equipo del laboratorio.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios prestados: M. en C. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo y Ing. Ivett Rosas Arciniega, y demás miembros de la unidad.

Al Dr. Fernando García Hernández, miembro de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico.

A los miembros de Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo y Dr. Héctor Malagón.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado, por el financiamiento de numerosos congresos científicos que enriquecieron mi formación.

A CONACYT, por la beca otorgada para la realización del posgrado.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
1. Hígado sano	5
2. Hepatocarcinoma (HCC) y enfermedades crónicas hepáticas	6
3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)	9
A. Superfamilia de citocinas del TGF- β	9
B. Vías de señalización del TGF- β	12
C. Versatilidad de la señalización del TGF- β	14
D. Regulación de la vía de transducción del TGF- β	16
E. Respuestas celulares y genes blanco de la vía del TGF- β	20
4. Ski y SnoN : antagonistas de la vía de TGF-β	23
A. Familia de co-represores Ski	23
B. Ski y SnoN como antagonistas de la vía del TGF- β	27
C. Papel dual de Ski y SnoN en cáncer	34
D. Los niveles proteicos de Ski y SnoN son críticos para el mantenimiento de la homeostasis celular	37

ANTECEDENTES	39
1. Regulación de Ski y SnoN por la vía de TGF-β y otras vías de señalización	39
2. TGF-β, Ski y SnoN en hígado sano y hepatocarcinoma (HCC)	41
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
JUSTIFICACIÓN	44
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
METODOLOGÍA	46
Líneas celulares	46
Tratamientos	47
Cultivo primario de hepatocitos de rata	47
Obtención del hepatoma de rata AS30D	48
Extracción de proteínas	48
Fraccionamiento núcleo/citoplasma	48
Inmunoprecipitación de extractos celulares (IP)	49
Electroforesis en geles de poliacrilamida	49
Western Blot (WB)	49
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	50
Inmunofluorescencia	52
RT-PCR	52
Análisis estadístico	53

RESULTADOS	54
A. Las células de hepatocarcinoma expresan altos niveles de Ski y SnoN.	54
B. TGF- β induce genes dependientes e independientes de Smad4 en hepatocitos normales y hepatocarcinoma pero con cinéticas diferentes.	57
C. TGF- β regula diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN en hepatocitos normales y hepatocarcinoma.	62
D. Ski y SnoN tienen diferente patrón de localización subcelular en hepatocitos normales y hepatocarcinoma.	64
E. Ski y SnoN son proteínas muy estables en hepatocarcinoma pero tienen una vida media corta en hepatocitos normales: la inhibición de la síntesis de proteína modula los niveles de Ski y SnoN únicamente en hepatocitos normales.	69
F. Ski y SnoN son proteínas muy estables en hepatocarcinoma pero tienen una vida media corta en hepatocitos normales: la inhibición de la transcripción también modula los niveles de Ski y SnoN únicamente en hepatocitos normales.	72
G. La adhesión celular regula la estabilidad proteica de Ski y SnoN solamente en hepatocitos normales pero no en hepatocarcinoma.	74
H. Los cambios en el citoesqueleto de actina regulan diferencialmente la estabilidad proteica de Ski y SnoN exclusivamente en hepatocitos normales.	79
I. La depleción de ambos co-represores Ski y SnoN afecta la cinética de la transcripción dependiente de TGF- β /Smads.	83
J. El recambio de Ski y SnoN es crítico para su posicionamiento sobre los promotores de genes responsivos a TGF- β /Smads.	87

DISCUSIÓN	92
CONCLUSIONES	106
PERSPECTIVAS	107
BIBLIOGRAFÍA	109
APÉNDICE	115

ÍNDICE DE CUADROS, ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS

Cuadro 1	6
Esquema 1	8
Esquema 2	11
Esquema 3	14
Esquema 4	25
Esquema 5	30
Figura 1	56
Figura 2	59
Figura 3	61
Figura 4	64
Figura 5	68
Figura 6	71
Figura 7	73
Figura 8	78
Figura 9	82
Figura 10	85
Figura 11	86
Figura 12	91
Modelo 1	93
Modelo 2	104
Tabla 1	117

ABREVIATURAS

ActD	Actinomicina D (inhibidor de la transcripción)
AS	Hepatoma de rata AS30D
C9	Línea celular de hepatocitos inmortalizados de rata C9
cAMP	AMP cíclico
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (<i>Chromatin immunoprecipitation</i>)
Colch	Colchicina (inhibidor de la polimerización de los microtúbulos)
CytD	Citocalasina D (inhibidor de la polimerización de actina)
CHX	Cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Acido desoxirribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
DUBs	Desubiquitinasas (<i>Deubiquitinating enzymes</i>)
F-actina	Actina filamentosa (<i>Filamentous actin</i>)
G-actina	Actina globular (<i>Globular actin</i>)
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IP	Inmunoprecipitación de proteína
IP/WB	Ensayo de inmunoprecipitación y Western Blot
HCC	Carcinoma hepatocelular (<i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HC	Cultivos primarios de hepatocitos de rata
HDAC	Deacetilasas de histonas (<i>Histone deacetylase</i>)
Hep	Línea celular de hepatoma humano HepG2
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
HS	Hepatocitos de rata en suspensión
HSC	Células estrelladas hepáticas (<i>Hepatic stellate cells</i>)
I-Smad	Smad inhibitoria (<i>Inhibitory Smad</i>)
Jasp	Jasplakinolida (inductor de la polimerización de actina)
kDa	Kilodaltones
LatB	Latrunculina B (inductor de la despolimerización de actina)

MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
N-terminal	Amino terminal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pS2	Smad2 fosforilada
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
R-Smad	Smad activada por receptor (<i>Receptor-activated Smad</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa y transcripción inversa
S2/3	Smad2/Smad3
SB43	SB431542 (inhibidor del T β RI)
SBE	Elemento de unión a Smads (<i>Smad binding element</i>)
Ski	<i>Sloan-Kettering Institute proto-oncogene</i>
SnoN	<i>Ski-related novel gene N</i>
TβR	Receptor tipo I o tipo II del TGF- β
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
WB	Western Blot

RESUMEN

Las proteínas Ski y SnoN son conocidas como los co-represores transcripcionales de la vía del TGF- β , una vía de señalización muy importante en el contexto hepático. Participan en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, y alteraciones en sus niveles proteicos pueden afectar la señal del TGF- β , causando alteraciones en la proliferación celular y carcinogénesis. En este estudio llevamos a cabo un análisis comparativo de la regulación de las proteínas Ski y SnoN por el estímulo de TGF- β , y por modificaciones en la adhesión celular y en el rearrreglo del citoesqueleto de actina en el contexto hepático, haciendo uso de un modelo comparativo de hepatocitos normales y hepatocarcinoma (HCC). Caracterizamos los mecanismos que controlan la estabilidad de los co-represores y el impacto de éstos en la expresión de genes dependiente de TGF- β /Smads. Demostramos que los niveles proteicos de Ski y SnoN son muy elevados en HCC y bajos en hepatocitos normales. Los co-represores tienen una alta estabilidad y una localización estrictamente nuclear en HCC, a diferencia de los hepatocitos normales, en los que Ski y SnoN tienen una vida media corta y una localización tanto nuclear como citoplasmática. Mientras que los hepatomas se caracterizan por una activación fuerte y sostenida de los genes responsivos a TGF- β , los hepatocitos normales muestran una activación transcripcional transitoria y relativamente corta. De manera novedosa, también reportamos que la interferencia en los procesos de síntesis de proteína, así como cambios en la adhesión celular y en la dinámica del citoesqueleto de actina, regulan diferencialmente la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN, exclusivamente en hepatocitos normales. Las células derivadas de HCC carecen o tienen alterados estos mecanismos de regulación proteica. Interesantemente, la modulación de los niveles de expresión de las proteínas Ski y SnoN afecta el patrón de expresión genética dependiente de la vía TGF- β /Smads en hepatocitos normales. Concluimos que los mecanismos de regulación que controlan la estabilidad proteica, la localización subcelular y la expresión de dichos co-represores de la vía de TGF- β son numerosos, complejos y muy poco caracterizados en hepatocitos normales, y se encuentran alterados o ausentes en el HCC.

ABSTRACT

Ski and SnoN proteins function as transcriptional co-repressors in the TGF- β pathway. They regulate cell proliferation and differentiation, and their aberrant expression results in altered TGF- β signalling, malignant transformation, and alterations in cell proliferation. We carried out a comparative characterization of the endogenous Ski and SnoN protein regulation by TGF- β , cell adhesion disruption and actin-cytoskeleton rearrangements between normal and transformed hepatocytes; we also analyzed Ski and SnoN protein stability, subcellular localization, and how their protein levels impact the TGF- β /Smad-driven gene transcription. Ski and SnoN protein levels are lower in normal hepatocytes than in hepatoma cells. They exhibit a very short half-life and a nuclear/cytoplasmic distribution in normal hepatocytes opposed to a high stability and restricted nuclear localization in hepatoma cells. Interestingly, while normal cells exhibit a transient TGF- β -induced gene expression, the hepatoma cells are characterized by a strong and sustained TGF- β -induced gene expression. A novel finding is that Ski and SnoN stability is differentially regulated by cell adhesion and cytoskeleton rearrangements in the normal hepatocytes. Also, the inhibition of protein turnover caused the down-regulation of both Ski and SnoN co-repressors impacting the kinetic of expression of TGF- β -target genes, exclusively in normal cells. In conclusion, the normal regulatory mechanisms controlling Ski and SnoN stability, subcellular localization and expression are altered in hepatocarcinoma cells. This work provides evidence that Ski and SnoN protein regulation is far more complex in normal than in transformed cells, since many of the normal regulatory mechanisms are lost in transformed cells.

INTRODUCCIÓN

1. Hígado sano

El hígado es la glándula más voluminosa de la anatomía, y una de las más importantes en cuanto a la actividad metabólica de los organismos vertebrados. Desempeña funciones únicas y vitales como la síntesis de proteínas plasmáticas, el almacenaje de vitaminas y glucógeno, la secreción de bilis y desintoxicación.

En lo relativo a la digestión el hígado es relevante por la producción de bilis, una mezcla de agua, sales biliares, colesterol y bilirrubina capaz de emulsificar las grasas provenientes de la dieta. En lo relativo al metabolismo, dado que el flujo sanguíneo originario del sistema digestivo pasa a través de la vena porta hepática, el hígado es responsable del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, pero también del proceso de detoxificación, convirtiendo numerosas toxinas en metabolitos inactivos.

Los hepatocitos constituyen alrededor del 80% de la población celular del tejido hepático, sin embargo el hígado contiene también macrófagos (células de Kupffer) y células estrelladas, cuya función normal es el almacenaje de la vitamina A y la producción de tejido conectivo. En el Cuadro 1 se detalla la relevancia fisiológica de las principales funciones hepáticas.

	FUNCIÓN	RELEVANCIA
	Producción de bilis	Digestión de los alimentos
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	Gluconeogénesis	Formación de glucosa
	Glucogenólisis	Fragmentación del glucógeno para liberar glucosa en sangre durante el ayuno
	Glucogenogénesis	Síntesis de glucógeno a partir de la glucosa para el almacenamiento de energía
METABOLISMO DE LÍPIDOS	Síntesis de colesterol y triglicéridos	Mantenimiento de tejidos corporales, de la integridad celular, producción de hormonas, almacenamiento de energía
	Síntesis de albúmina y lipoproteínas	Transporte de hormonas, ácidos grasos, fármacos y drogas
	Síntesis de factores de coagulación	Correcta coagulación de la sangre para evitar hemorragias
	Desintoxicación	Neutralización de toxinas y fármacos
	Desarrollo embrionario	Producción de glóbulos rojos en el feto

Cuadro 1. Principales funciones del hígado en un organismo.

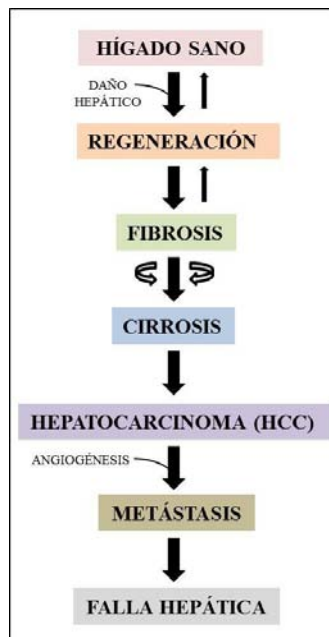
2. Hepatocarcinoma (HCC) y enfermedades crónicas hepáticas

La importancia del hígado para el mantenimiento de tantos procesos vitales implica que cualquier disfunción del órgano tiene graves consecuencias para la salud. Desafortunadamente, el carcinoma hepatocelular (HCC) es uno de los tipos de cáncer más comunes en el mundo, causante de 780 mil muertes al año, siendo el segundo tipo de cáncer más frecuente (GLOBOCAN, 2012). Hasta hace pocos años su diagnóstico se

realizaba en fases avanzadas de la enfermedad, cuando el tumor ya había alcanzado gran tamaño, por tanto, el pronóstico a corto plazo solía ser malo. En los últimos años, la introducción de la ecografía, los avances en las técnicas de imagen y el seguimiento oportuno de los pacientes con un riesgo potencial, han permitido el diagnóstico de este tumor en un estadio más inicial, en el que es posible la aplicación de un tratamiento con un mejor pronóstico de vida. Aún así, la gran heterogeneidad clínica típica del HCC, aunada a la falta de marcadores para el diagnóstico y la falta de estrategias de tratamiento, hacen de esta enfermedad un reto difícil de enfrentar; la alta tasa de mortalidad (95% de los pacientes en 2012) lo demuestra. Hay grandes variaciones en cuanto a los factores de riesgo para desarrollar el HCC según género, área geográfica y raza (Dooley et al., 2009; GLOBOCAN). En los últimos años también se ha notado una tendencia hacia la incidencia de la enfermedad en personas más jóvenes (40-60 años de edad).

Los factores de riesgo más importantes para el cáncer hepático son las enfermedades crónicas hepáticas, las cuales llevan a un proceso progresivo de destrucción y regeneración del parénquima hepático que termina en la fibrosis y/o cirrosis del órgano, dada por la acumulación de matriz extracelular, específicamente colágena. Un ejemplo de enfermedades hepáticas son las infecciones virales (hepatitis B y C) así como la ingesta de aflatoxinas. Otros factores de riesgo son la enfermedad alcohólica del hígado, la esteatosis hepática, la obesidad y la diabetes. Cualquier daño al hígado, independientemente de su etiología, genera una respuesta de regeneración que busca reparar el tejido hepático. El evento inicial es el estrés de las células epiteliales, que resulta en muerte por necrosis o apoptosis. Las señales de muerte celular inducen la

activación de las células de Kupffer y de las células estrelladas (HSC), quienes dan inicio a la cascada de procesos inflamatorios y de cicatrización. Si el daño se hace crónico, persiste la inflamación y la sobreproducción de matriz extracelular (fibrosis), el hígado puede alcanzar un estado irreversible de cirrosis, en el cual se pierde la arquitectura del órgano y se da una regeneración aberrante del hígado, hay un desarrollo de nódulos de regeneración y alteraciones vasculares. La cirrosis representa un ambiente favorable para el desarrollo del hepatocarcinoma (Esquema 1). La respuesta hepática a cualquier daño se conforma por diferentes fases que involucran a los distintos tipos celulares presentes en el órgano (Dooley et al., 2012).



Esquema 1. Curso natural de la evolución del hepatocarcinoma.

Ante cualquier tipo de daño hepático (infección viral, hepatotoxinas) ocurre una respuesta inflamatoria y comienza un proceso de reparación o regeneración en el que los hepatocitos proliferan y las células estrelladas promueven la degradación y síntesis de matriz extracelular. La inflamación y la sobreproducción de matriz extracelular pueden llevar a la fibrosis, favoreciendo la instauración del estado irreversible de cirrosis. Eso conlleva al desarrollo del HCC, a la pérdida de la función del órgano y a la metástasis de las células cancerosas a otros órganos vitales, ocasionando la muerte.

La patofisiología molecular del cáncer hepático permanece todavía poco entendida, pero una de las principales vías de señalización implicadas es la del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β). Se han encontrado niveles elevados de TGF- β en plasma de pacientes con HCC, correlacionándose esto con la progresión y el mal pronóstico de la enfermedad (Coulouarn et al., 2008).

3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

A. Superfamilia de citocinas del TGF- β

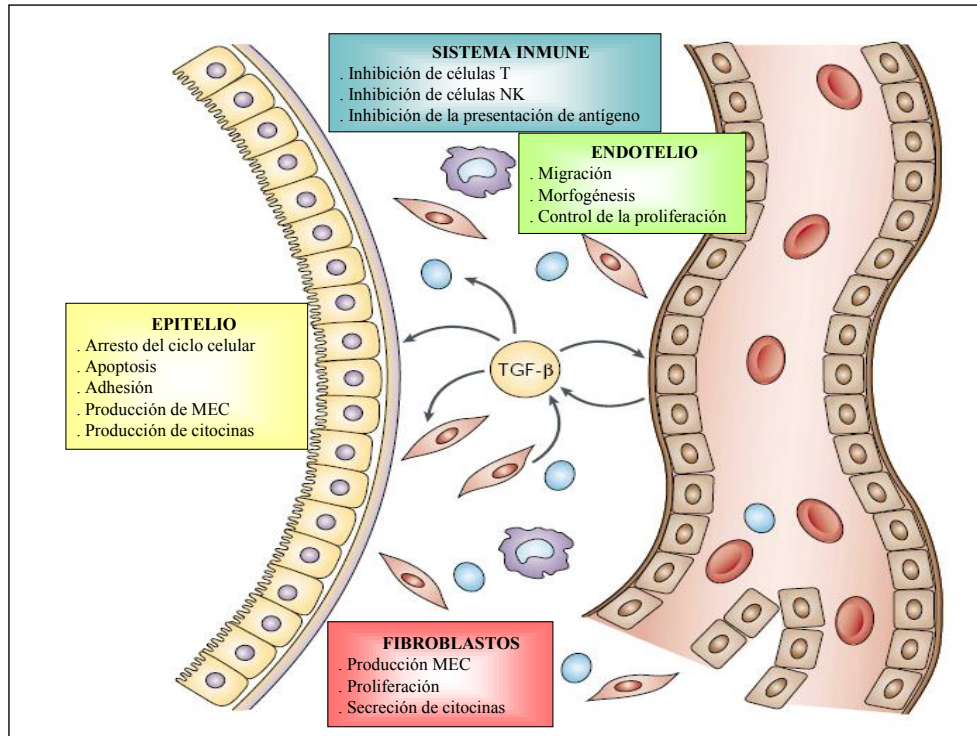
Los miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes-beta (TGF- β , del inglés *Transforming Growth Factor-beta*) que incluyen a los TGF- β s, las activinas y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), son citocinas secretadas, que están estructuralmente relacionadas y presentes en diferentes *phyla* de organismos (desde gusanos e insectos hasta mamíferos). Estas citocinas regulan procesos fisiológicos importantes como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, la migración y la adhesión celular, así como el desarrollo embrionario (Massagué et al., 2006). La señalización desregulada de miembros de la superfamilia del TGF- β está implicada en varias enfermedades humanas.

El TGF- β , miembro representativo de la gran familia, contribuye a la inmunomodulación, a procesos apoptóticos, a la vasculogénesis y a la angiogénesis, así como a la producción de matriz extracelular (Esquema 2). Sin embargo, si su función se

encuentra alterada, es responsable de desórdenes autoinmunes, carcinogénesis, desórdenes vasculares y de la fibrosis de varios órganos.

En ratones, la delección del gen de TGF- β 1 (*knockout*) resulta en una inflamación letal proveyendo así un modelo importante para el estudio de las enfermedades autoinmunes.

A las tres semanas de edad, los ratones TGF- β ^{-/-} desarrollan un síndrome inflamatorio progresivo y letal: los análisis histológicos muestran una importante infiltración de linfocitos y macrófagos además de una necrosis tisular en numerosos órganos como el bazo, los nodos linfáticos, el estómago, el hígado, el páncreas, el colon y las glándulas salivares. Estas lesiones se asemejan a las características de los desórdenes autoinmunes sugiriendo un papel prominente del TGF- β en la regulación de la proliferación de células del sistema inmune y su extravasación en tejidos (Dünker et al., 2000). De hecho, la función central del factor de crecimiento en el sistema inmune es el mantenimiento de la tolerancia inmunológica a través de la regulación de la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de linfocitos, células NK (natural killer), células dendríticas y macrófagos. Además, TGF- β controla la iniciación y terminación de las respuestas inflamatorias mediante la regulación de procesos quimiotácticos (Li et al., 2006).



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

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

El TGF-β también juega un papel importante en procesos carcinogénicos funcionando a la vez como factor anti-proliferativo (supresor de tumores) y promotor de metástasis dependiendo de la etapa en la que se encuentre el tumor (Wakefield et al., 2002; Derynk et al., 2001). Como se mencionó anteriormente, TGF-β es un factor central en el mantenimiento de la homeostasis hepática. Durante la regeneración hepática, el factor de crecimiento controla la proliferación e inhibición del crecimiento de diferentes tipos celulares presentes en el hígado, regulando también la restauración de la matriz extracelular y siendo por tanto responsable de eventos fibróticos en enfermedades hepáticas (Neuman, 2003). El hecho de que TGF-β tenga tantas funciones en los

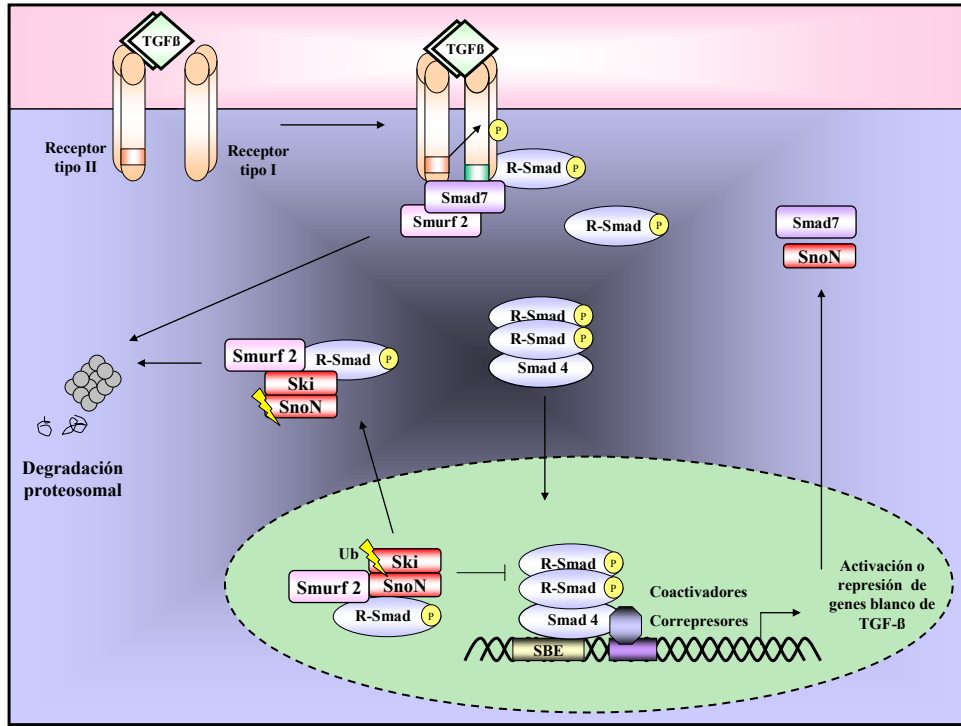
organismos, ha generado un gran interés por comprender a detalle las vías de señalización de los miembros de la superfamilia del TGF- β .

B. Vías de señalización del TGF- β

El TGF- β se sintetiza inicialmente como un precursor, que puede ser almacenado en el espacio extracelular hasta ser activado por proteólisis. La activación permite al ligando su unión al receptor celular. La vía de señalización más conocida de la familia del TGF- β es la señalización a través de las Smads, proteínas de unión a DNA que tienen la capacidad de reclutar co-activadores o co-represores de la transcripción con el fin de activar o reprimir genes blanco del TGF- β .

TGF- β induce respuestas celulares mediante la formación de complejos heterotetraméricos de receptores específicos tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII) con actividad de cinasa de serinas y treoninas. Estos receptores son proteínas transmembranales (atravesan una sola vez la membrana) que al activarse forman un tetrámero. El receptor tipo II es una cinasa constitutivamente activa que tiene mayor afinidad por el ligando que el receptor tipo I. Después de unirse el ligando al receptor tipo II, éste forma un complejo heterotetramérico con el receptor tipo I, al cual transfosforila en el dominio GS, en residuos de serinas y treoninas. Así, el receptor tipo I activado es capaz de fosforilar y activar a su vez a sus principales proteínas efectoras: las proteínas R-Smad (*Receptor-activated Smad*), específicamente las Smad2 y Smad3 (Macías-Silva et al., 1996). Al ser fosforiladas por el T β RI en las últimas serinas del motivo conservado –SSXS, las R-

Smad activadas son capaces de formar dímeros entre ellas y posteriormente asociarse, formando un heterotrímero, con una Co-Smad (*Common-partner Smad* o Smad4). Es importante notar que, en ausencia de ligando, las R- y Co-Smad se encuentran en citoplasma, pero ante el estímulo de TGF- β éstas proteínas se acumulan en el núcleo. De esta manera, el complejo trimérico de Smads activas viaja a través del citoplasma y penetra el núcleo, donde reconoce secuencias de DNA específicas denominadas SBE (*Smad-Binding Element*, GTCTAGAC) conllevando a la regulación positiva o negativa de cientos de genes (Attisano et al., 2000; Itoh et al., 2000; Javelaud et al., 2004; Massagué et al., 2006; Moustakas et al., 2001; ten Dijke et al., 2000) (Esquema 3). A pesar de que se consideran a las Smads como los principales mediadores de las señales del TGF- β , la citocina también tiene la capacidad de activar vías alternas (independientes de Smads) tales como las vías de las MAPK (específicamente Ras/Erk, JNK y p38), de PI3K/Akt y de GTPasas pequeñas como RhoA (Derynck et al., 2003).



Esquema 3. Vía de señalización del TGF-β dependiente de Smads.

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

C. Versatilidad de la señalización del TGF-β

Las proteínas Smad consisten de dos dominios globulares MH1 y MH2 (*Mad Homology*) unidos entre sí por una región flexible conocida como región *linker* (región

puente). En el estado basal los dominios MH1 y MH2 interactúan el uno con el otro inhibiéndose mutuamente; sin embargo, la fosforilación de las R-Smads por el T β RI revierte esta inhibición permitiendo la función de los dos dominios. El dominio MH2 permite la interacción con el receptor (específicamente mediante el asa o *loop* L3), con proteínas de andamiaje y facilita la formación de homo- y hetero-dímeros, confiriendo también la actividad transactivadora de estas proteínas (Itoh et al., 2000; Moustakas et al., 2001). El dominio MH1 está involucrado en la importación nuclear, en la unión al sitio SBE presente en el DNA (Zawel et al., 1998) y en la asociación con otros factores de transcripción. El dominio de unión a DNA se encuentra presente en las Smad3 y Smad4 en forma de una horquilla beta (*β -hairpin*) responsable del contacto directo con la secuencia SBE. Smad2 carece de la capacidad de unión a DNA porque contiene una secuencia extra, codificada por el exón3, localizada junto a la horquilla beta. Se han identificado secuencias tipo SBE en los promotores de numerosos genes entre los cuales se encuentran *smad7*, *skil*, *pai-1*, *IgA*, *junB*, *c-Jun* y el gen de la colágena tipo IV entre otros (ten Dijke et al., 2000).

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

Aunque la secuencia SBE es crítica para la inducción de la expresión génica dependiente del TGF- β /Smads, dicha inducción no se basa solamente en la unión específica al SBE: la combinación específica de Smads y otros factores transcripcionales determina la región del DNA que será reconocida, y si se reclutarán co-activadores o bien co-represores transcripcionales. Esto es porque la afinidad de las Smads por el DNA es baja y estas proteínas requieren de otros factores para unirse fuertemente a los promotores de los genes responsivos. De hecho los sitios SBE están frecuentemente localizados cerca de sitios de unión para otros factores transcripcionales como FAST-1, AP-1, Sp1, TFE-3, ATF-2 (ten Dijke et al., 2000), FOX, HOX, RUNX, E2F y CREB (Massagué et al., 2005; Feng et al., 2005). Así, las respuestas genéticas al TGF- β se clasifican según los grupos de genes controlados por una combinación específica de Smads/co-factores. La disponibilidad de estos co-factores depende del tipo y contexto celular, hecho que explica en gran parte la amplia gama de respuestas generadas por TGF- β en cada célula.

Por todo lo anteriormente mencionado resulta claro que las proteínas Smad son extremadamente versátiles, lo cual concuerda con las acciones pleiotrópicas del TGF- β .

D. Regulación de la vía de transducción del TGF- β

Como cualquier vía de transducción, la vía del TGF- β se encuentra estrictamente regulada tanto positiva como negativamente. La regulación positiva es crítica para la amplificación de la señal y para que se dé la respuesta celular al estímulo. La regulación

negativa es crucial en la terminación de la señal y se manifiesta generalmente mediante un proceso de retroalimentación negativa.

Regulación positiva de la vía

Se sabe que el TGF- β puede inducir la expresión de su propio gen a manera de auto-regulación positiva: las tres isoformas presentes en mamífero, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 son auto-inducidas por diferentes isoformas de TGF- β (Kim et al., 1990). Por su parte, las Smads son moduladas positivamente por el mismo TGF- β (siendo activadas por el receptor después de la unión del ligando) y también por otras vías de señalización: el TGF- β es capaz de activar a las MAPK como Erk, p38 y JNK (Derynck et al., 2003) y se ha visto que c-Jun y ATF-2 (factores transcripcionales activados por JNK y p38 respectivamente) tienen la capacidad de interactuar directamente con las Smad3 y Smad4 potenciando su capacidad para inducir la expresión de genes blanco del TGF- β (Zhang et al., 1998).

Regulación negativa de la vía

La vía de transducción del TGF- β se encuentra regulada por inhibidores y co-represores específicos. La Smad inhibitoria (I-Smad, *Inhibitory Smad*) Smad7 actúa como inhibidor de la vía, y su gen es un blanco directo del TGF- β por lo que la misma vía induce su expresión para participar como una asa de retroalimentación negativa. Al tener capacidad de unión al sitio catalítico del receptor tipo I, Smad7 inhibe la actividad de cinasa del receptor. El receptor I es entonces incapaz de fosforilar y activar a las R-

Smad por lo que ningún complejo de Smads activo se formará, evitando así la transcripción de genes dictada por TGF- β . Esta proteína inhibitoria Smad7 también recluta a las ligasas de ubiquitina Smurf-2 (*Smad Ubiquitination-Related Factor-2*) y APC (*Anaphase-promoting Complex*) promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma de las Smads activas y de los receptores tipo I y II. Así, Smad7 funciona como un adaptador para el reclutamiento de las Smurfs al complejo de receptores, mediando así la degradación de éstos y el apagado de la señal del TGF- β (Izzi et al., 2004; Miyazono, 2000).

Es importante notar que además de ser inducida por TGF- β (por el posicionamiento del complejo Smad3/4 sobre el promotor de *smad7*), Smad7 puede ser inducida por otros estímulos extracelulares incluyendo factores de crecimiento peptídicos y estrés. Se ha visto que las células tratadas con IFN- γ (Interferón gama) se vuelven resistentes a los efectos del TGF- β , porque dicha citocina pro-inflamatoria, activando la vía de JAK/STAT, induce la expresión de *smad7*, hecho que conlleva a la inhibición de la señalización del TGF- β (Ulloa et al., 1999).

Los co-represores de la vía del TGF- β son, además de TGIF (*TG3-Interacting Factor*), las proteínas conocidas como Ski y SnoN. Estas proteínas nucleares con alta afinidad por las Smads, interactúan directamente con Smad2, 3 y 4 reprimiendo su capacidad de activar genes blanco del TGF- β . Mientras que los co-activadores transcripcionales se encuentran frecuentemente asociados a acetiltransferasas de histonas (HATs), los co-represores como Ski y SnoN, después de unirse a los heterotrímeros activos de Smads, son capaces de reclutar deacetilasas de histonas (HDACs) que existen

a manera de complejos multiproteicos con proteínas represoras como Sin3, NcoR (*Nuclear hormone corepressor*) y SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor*). De esta manera Ski y SnoN logran reprimir la señal dada por TGF- β . Ski y SnoN también pueden reprimir la vía secuestrando a los complejos de Smad en el citoplasma e impidiendo su translocación nuclear y la posterior transactivación genética (ten Dijke et al., 2000; Stroschein et al., 1999).

Sin embargo, los mismos co-represores de la vía del TGF- β se regulan dinámicamente y estrictamente: al activarse la vía y para que el TGF- β pueda señalizar, las Smads activas son capaces de unir a Ski y SnoN, funcionando como adaptadores para reclutar ligasas de ubiquitina como Smurf2 y APC, que llevan a la ubiquitinación de estos co-represores (Bonni et al., 2001). Así, Ski y SnoN se degradan vía el proteosoma permitiendo la señalización del TGF- β . Posteriormente, las mismas Smads inducen la transcripción del gen *snoN* y la acumulación de dicho co-represor conlleva al apagado de la señal de TGF- β , siendo este otro caso de un asa de retroalimentación negativa.

Resulta importante notar que la regulación de la vía es extremadamente estricta y se da a cada paso de la cascada de señalización. Hay regulación desde el nivel de la activación de las formas latentes del TGF- β , a nivel del número de receptores para TGF- β presente en una célula y a nivel de la cantidad o poza de Smads presentes (cuyos niveles son regulados por las Smurfs, aún en condiciones basales). Además se sabe que algunas vías (independientes del factor de crecimiento transformante-beta) son capaces de regular negativamente la señal por TGF- β : EGF e IFN- γ inducen la expresión de *smad7*, las Erks (activadas por EGF, HGF y también por el mismo TGF- β) son capaces

de fosforilar a las R-Smads en la región *linker* inhibiendo su translocación nuclear (Massagué J., 2000), y Ras, frecuentemente sobreactivado en tumores, conlleva a la inhibición de la acumulación nuclear de las Smads generando una resistencia celular a los estímulos antiproliferativos del TGF- β (Kretzschmar et al., 1999; ten Dijke et al., 2000).

E. Respuestas celulares y genes blanco de la vía del TGF- β

El TGF- β es una citocina pleiotrópica, y como tal induce una amplia gama de respuestas en numerosos tejidos. Como se mencionó anteriormente, el pleiotropismo en las acciones del TGF- β se debe principalmente a que las diferentes combinaciones de Smads son capaces de asociarse con numerosos factores transcripcionales y complejos multiproteicos de la maquinaria transcripcional (co-activadores y co-represores), los cuales a su vez dependen del tipo y contexto celular. De esta forma la señal del TGF- β /Smads regula positiva o negativamente numerosos genes, entre los cuales destacan genes relativos al ciclo celular, la proliferación y diferenciación celular, apoptosis, migración y matriz extracelular.

Hoy en día se conocen muchos genes responsivos a TGF- β y las Smads, pero en realidad, poco se sabe del mecanismo molecular específico. El TGF- β es conocido como un potente factor anti-proliferativo en células epiteliales, por lo que es lógico pensar que controle positivamente la expresión de inhibidores del ciclo celular, con el fin de mantener las células en un estado quiescente. Efectivamente, en células epiteliales la

citocina induce la expresión de los inhibidores de CDK's (quinasas dependientes de ciclinas), p21 y p15 como parte de su programa citostático. En el promotor de *p21*, el complejo Smad3/4 interactúa con FoxO (parte de la familia de factores transcripcionales *Forkhead*) para inducir la transcripción de *p21*. FoxO se une a un sitio distal del promotor de *p21* y las Smads interactúan también con Sp1, factor transcripcional que se posiciona en una región proximal del promotor tanto de *p21* como de *p15* (Feng et al., 2005). Los complejos Smad/Sp1 también son capaces de activar la transcripción de genes como *$\alpha 2(I)$ colágena*, *integrina $\beta 5$* , *pai-1* y *smad7*. Además de interactuar con los factores *Forkhead*, las Smads también interactúan con los factores transcripcionales de la familia bHLH, caracterizados por un dominio básico de hélice-asa-hélice. Por ejemplo, el complejo Smad3/TFE3 participa en la transcripción del gen del inhibidor del activador de plasminógeno (*pai-1*) y de *smad7*.

Otro ejemplo de regulación positiva de genes por los complejos de Smads, es la transcripción del co-represor de la vía de TGF- β , SnoN: el complejo Smad2/4 es el responsable de inducir la transcripción del gen, mientras que el complejo Smad3/4 reprime dicha transcripción (Zhu et al., 2005). Este es un ejemplo interesante que demuestra una vez más que la respuesta al estímulo de TGF- β dependerá de la combinación específica de Smads.

Aunque hasta el momento se tengan pocos datos acerca de los genes reprimidos por la vía canónica del TGF- β , se conocen algunas interacciones importantes.

Así como inducen la expresión de genes que participan en la inhibición de la proliferación celular (*p15*, *p21*), los complejos de Smads también participan en la represión de genes involucrados con la proliferación: todo esto es parte del complejo

mecanismo por el cual TGF- β ejerce sus efectos citostáticos. La inhibición del oncogen *c-myc* por la unión del complejo Smad3/4 al sitio TIE presente en el promotor del oncogen (Frederick et al., 2004) es un ejemplo claro de represión genética dependiente de TGF- β /Smads. Además de impedir la proliferación celular, la señal de TGF- β también inhibe la miogénesis o diferenciación muscular: Smad3 reprime la actividad de los factores miogénicos (MyoD y miogenina) mediante su interacción directa con los dominios HLH de ambos factores transcripcionales (Liu et al., 2001), interfiriendo con su heterodimerización, imposibilitando la unión de estas proteínas al DNA y por ende evitando la transcripción de genes que favorecen la miogénesis. Se sabe también que la estimulación celular con TGF- β provoca el reclutamiento de p53, Smad2/4 y SnoN a secuencias adyacentes *SBE* y *p53* dentro de las regiones regulatorias del gen de la alfa-fetoproteína, llevando a la represión transcripcional de dicho gen (Wilkinson et al., 2005), sugiriendo que en este caso específico, SnoN estaría cooperando con las proteínas Smad, actuando como un supresor tumoral.

Así, la señal de TGF- β /Smads puede regular positiva o negativamente diferentes tipos de genes con el fin de mediar su amplia gama de efectos.

4. Ski y SnoN: antagonistas de la vía de TGF- β

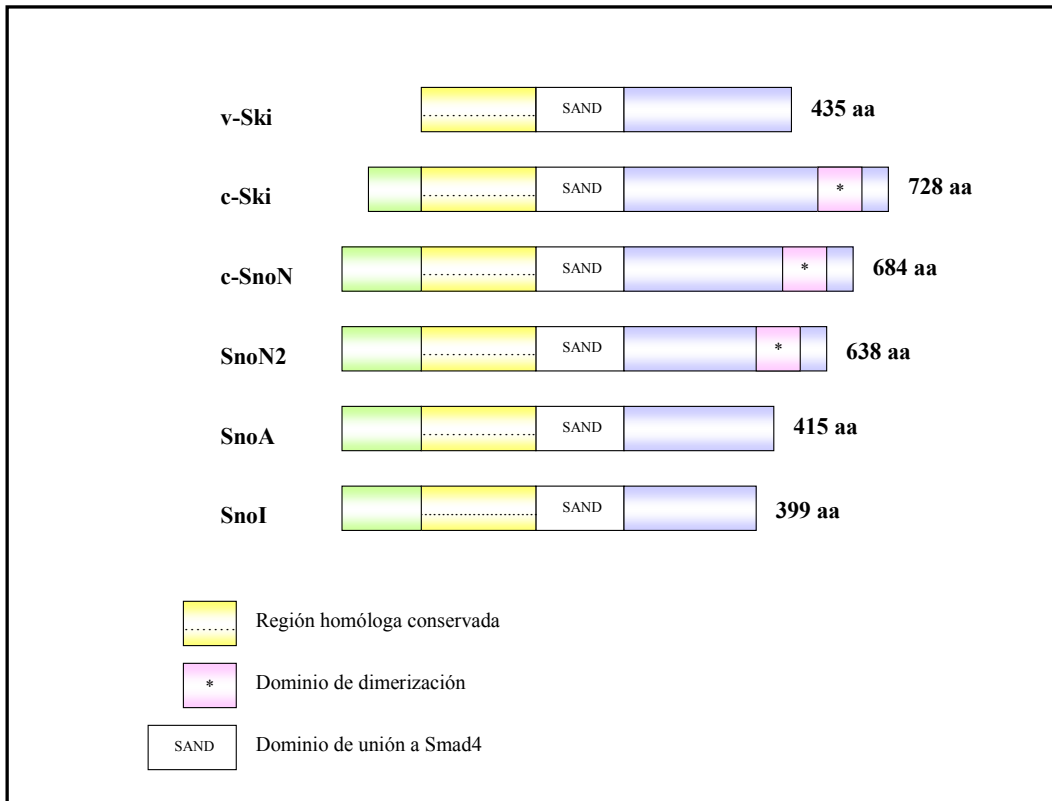
A. Familia de co-represores Ski

La familia de co-represores nucleares Ski comprende a Ski y Sno (ésta última en las diferentes isoformas SnoN, SnoN2, SnoA y SnoI), proteínas muy importantes en procesos del desarrollo embrionario, y capaces de inducir transformación y diferenciación celular estando sobreexpresados (Esquema 4). Se conocen principalmente por ser antagonistas de la señal del TGF- β , aunque también se les ha atribuido funciones en otras vías de señalización.

Ski (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*), y más específicamente v-Ski, fue la primera proteína transformante identificada del retrovirus aviario de Sloan-Kettering, capaz de inducir transformación oncogénica en células embrionarias de pollo (Li et al., 1986). Posteriormente se pudieron clonar el homólogo humano c-Ski y la proteína relacionada c-SnoN (*Ski-related novel gene N*) con sus tres isoformas derivadas de procesamiento o *splicing* diferencial (SnoN2, SnoI, SnoA). El oncogen v-Ski es una versión truncada del proto-oncogen celular c-Ski (Colmenares et al., 1991). v-Ski carece de una región de 292 aminoácidos del extremo C-terminal presente en c-Ski pero conserva la región rica en cisteínas del extremo N-terminal responsable de la capacidad transformante de *ski* (Tokitou et al., 1999). La sobreexpresión de c-Ski o v-Ski induce transformación celular o diferenciación a tejido muscular en fibroblastos embrionarios. Las proteínas nucleares humanas c-Ski y c-SnoN consisten de 728 y 684 aminoácidos respectivamente (Ski con peso molecular de 90 kDa y SnoN con peso molecular de 70

kDa). Su extremo N-terminal, contrariamente al C-terminal poco conservado, contiene una región de aproximadamente 270 residuos aminoácidos muy conservada y con alto grado de homología entre v-Ski, c-Ski y c-SnoN. La región conservada de Ski y SnoN es la que les permite ejercer su actividad transformante e inductora de diferenciación, mientras que la región C-terminal es la que posibilita procesos de homo- y heterodimerización.

Es importante resaltar que Ski y SnoN tienen numerosas funciones, algunas siendo paradójicas: son capaces de promover tanto proliferación celular como diferenciación a músculo esquelético (caracterizada por un arresto en el ciclo celular). Así, afectan las respuestas de los mioblastos induciéndolos a proliferar o a diferenciarse (Pearson-White et al., 1997). De igual forma tienen un papel dual todavía poco comprendido en cáncer, al tener funciones de supresores tumorales o de oncogenes.



Esquema 4. Estructura de las proteínas de la familia Ski
(Modificado de Luo K., 2004.)

Los modelos de heterocigosis y *knockout* han sido muy útiles para comprender la importancia de las dos oncoproteínas no solo en la vía del TGF- β sino en procesos tan importantes como el desarrollo embrionario y la génesis de distintas enfermedades. Al parecer, Ski y SnoN tienen importantes funciones en el desarrollo embrionario, la diferenciación y la proliferación celular, por lo que mutaciones en sus genes o alteraciones en las mismas proteínas están directamente ligadas a defectos del desarrollo embrionario y a procesos carcinogénicos.

Ski

Ski es indispensable durante el desarrollo, ya que los ratones *knockout* (*ski*^{-/-}) mueren en la etapa perinatal por eventos de exencefalia (cerebro localizado fuera del cráneo) debidos a defectos en el cierre neural (Berk et al., 1997). Estudios *in vivo* en oocitos de *Xenopus* y en ratones demuestran que *ski* tiene un papel esencial en el desarrollo de tejidos neuronales y musculares (Berk et al., 1997). En *Xenopus*, la sobreexpresión de *ski* induce la formación de un segundo eje neural y la expresión de genes específicos de células neuronales en explantes de ectodermo. La habilidad de Ski para inducir un fenotipo neuronal se debe a su capacidad de interacción con proteínas Smad, puesto que mutantes de Ski defectuosas en la unión con Smads son incapaces de inducir la expresión de genes específicos de neuronas (Wang et al., 2000). Además de las fallas en el desarrollo de tejidos del sistema nervioso, los ratones *knockout* para *ski* también muestran menor masa de músculo esquelético, probablemente debido a defectos en la proliferación o sobrevivencia de mioblastos (Luo K., 2004), demostrando el importante papel que Ski juega en la diferenciación muscular.

SnoN

A pesar del alto grado de homología con Ski, SnoN tiene un papel diferente en el desarrollo embrionario. El *knockout* de *sno* es letal antes del día 3 embrionario porque la proteína es esencial para el correcto desarrollo del blastocisto (Shinigawa et al., 2000). Ratones con deleciones en la región promotora del mismo gen son viables aunque muestran defectos en la activación de linfocitos T (Luo K., 2004).

SnoN, al igual que Ski, puede convertir células embrionarias en células de músculo esquelético y su sobreexpresión induce la proliferación independiente de adhesión en fibroblastos embrionarios de pollo. Además, los niveles de esta proteína se encuentran elevados en células cancerosas sugiriendo un papel de promotor tumoral. Recientemente también se ha vinculado a SnoN con procesos de desarrollo de sistema nervioso, al estar involucrado en la elongación de los axones neuronales (Stegmüller et al., 2006).

B. Ski y SnoN como antagonistas de la vía del TGF- β

Los cambios en la expresión genética en respuesta a estímulos externos es un fenómeno complejo que necesita procesos coordinados de activación y represión génica mediados por activadores y represores transcripcionales, además de todos los demás complejos proteicos que conforman la maquinaria de transcripción. Los eventos transcripcionales implican cambios en la estructura de la cromatina seguidos de la unión de la maquinaria transcripcional. La condensación o relajación de la cromatina y los eventos de metilación, desmetilación y acetilación de histonas son ejemplos de cambios en la estructura del DNA que preceden el ensamblaje de la maquinaria transcripcional formada por los factores basales (e.g, RNA polimerasa), los activadores (factores transcripcionales que reconocen secuencias consenso incrementando la eficiencia de unión de la maquinaria basal) y los co-activadores (factores que no unen directamente el DNA pero que actúan como puentes proveyendo una conexión entre la maquinaria basal y los activadores).

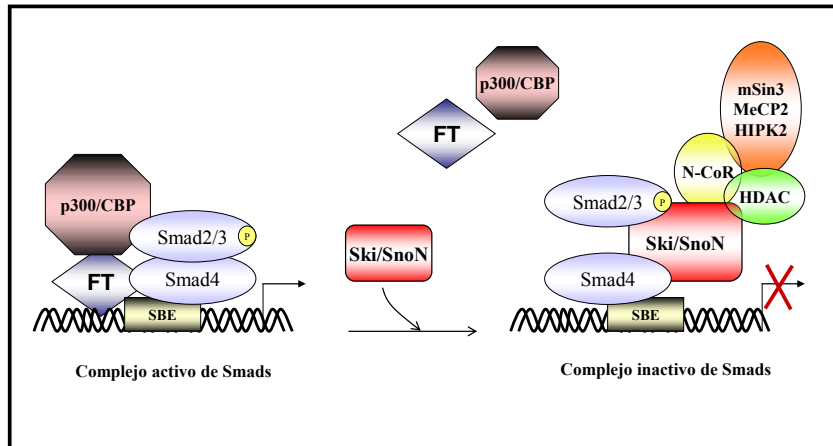
Dentro de los cambios en la estructura de la cromatina, los procesos de metilación y desacetilación del DNA resultan de suma importancia. La expresión génica se encuentra asociada a eventos de desmetilación y acetilación mientras que la represión génica se asocia a eventos de metilación y desacetilación. En estos procesos de remodelación de la cromatina, los reguladores transcripcionales (co-activadores y co-represores) juegan un papel muy importante.

Los co-represores, como Ski y SnoN, tienen por función reprimir la transcripción uniéndose al DNA indirectamente, a través de otros complejos multiproteicos como factores transcripcionales y deacetilasas de histonas entre otros, impidiendo la función de los activadores génicos (e.g, Smads). La regulación de la interacción de los co-represores con otros componentes de la maquinaria de represión es crítica para la función biológica normal, por lo que alteraciones en dichas interacciones dan lugar a trastornos fisiológicos de suma importancia (Burke et al., 2000).

La principal característica que hace de Ski y SnoN los reguladores negativos de la vía del TGF- β , es su capacidad de unión a las Smad2, 3 y 4 (Sun et al., 1999; Ueki et al., 2003; Esquema 5). Ambos co-represores poseen una alta afinidad por los complejos heterotriméricos de Smads activos e interactúan directamente con ellos reprimiendo su habilidad para activar genes blanco del TGF- β . De hecho, el aumento en la expresión de Ski y SnoN tiene como consecuencia un decremento en la inducción transcripcional dada por las Smads, fenómeno que se ha asociado a los desórdenes proliferativos característicos del cáncer.

Ski y SnoN se encuentran en las células preferencialmente formando heterodímeros Ski:SnoN mediante su extremo C-terminal y se asocian al dominio MH2 de Smad3 y 4

(Cohen et al., 1999). En ensayos de co-inmunoprecipitación se comprobó la capacidad de unión de c-Ski a Smad2 y Smad3 (Ueki et al., 2003). Se sabe además que las oncoproteínas mutadas en su sitio de unión con las Smads, son incapaces de inhibir el arresto del ciclo celular dado por TGF- β y no muestran actividad transformante, por lo que su capacidad oncogénica está dada en gran parte por su capacidad de unión a las proteínas Smad (He et al., 2003). Además se sabe que la interacción de Ski y SnoN con Smad3 o Smad4 es necesaria y suficiente para la actividad represora de estas oncoproteínas (Ueki et al., 2003). Al ser proteínas predominantemente nucleares, Ski y SnoN son capaces de reconocer secuencias SBE presentes en el DNA, a las cuales se unen indirectamente mediante las proteínas Smad (específicamente Smad4) y ejercen sus mecanismos de represión mediante el reclutamiento de complejos de co-represores transcripcionales (como N-CoR, SMRT y Sin3A) y deacetilasas de histonas (HDACs). El reclutamiento de esta maquinaria de represión transcripcional impide la unión de los co-activadores transcripcionales (p300/CBP entre otros) que normalmente se unen a los complejos de Smads permitiendo la expresión de genes blanco de TGF- β (Zhu et al., 2005).



Esquema 5. Mecanismo de represión de las Smads por Ski y SnoN en el núcleo.

En el núcleo celular, los complejos activos de Smads reconocen secuencias SBE en el DNA y, junto con otros factores transcripcionales y co-activadores (p300/CBP), regulan la expresión de genes blanco de TGF- β . Los co-represores Ski y SnoN inhiben la actividad transactivadora de las Smads uniéndose directamente a ellas y reclutando elementos de la maquinaria de represión transcripcional entre los cuales se encuentran las deacetilasas de histonas (HDAC). FT: Factores Transcripcionales; SBE: Elementos de unión a Smads. (Modificado de Luo K., 2004)

Como ya se mencionó, Ski y SnoN son conocidos como co-represores de la vía del TGF- β porque son capaces de reconocer y unirse a la secuencia consenso GTCTAGAC (Nicol et al., 1998), secuencia identificada posteriormente como el sitio SBE también reconocido por las Smads. Como ejemplo específico de la represión mediada por Ski y SnoN, es importante mencionar que, en condiciones basales (sin estímulo de TGF- β), el complejo Ski/SnoN/Smad4 se encuentra unido a la región SBE del promotor de *smad7* reprimiendo la expresión de dicha Smad inhibitoria (Denissova et al., 2004; Briones-Orta et al., 2006). Al tratar las células con TGF- β , Ski y SnoN son desplazados del promotor de *smad7* y son reemplazados por complejos activos de Smad2/Smad3. Se cree que el desplazamiento de los co-represores se debe a la degradación inducida a tiempos cortos por la citocina. Sin embargo, después de 2 horas de tratamiento con TGF- β , Ski y SnoN se posicionan nuevamente en el promotor del gen,

a manera de un mecanismo conocido como asa de retroalimentación negativa. Así, Ski y SnoN son importantes para la represión basal y para el apagado de *smad7*, gen responsivo a TGF- β .

Es importante mencionar que, aunque se han identificado numerosos genes blanco de TGF- β , se conocen muy pocos genes regulados directamente por Ski y SnoN, hay pocos estudios que demuestren la unión indirecta de Ski y SnoN a promotores génicos. El gen *smad7* es uno de los pocos genes para los cuales se ha caracterizado más detalladamente el mecanismo de represión mediado por los dos co-represores (Denissova et al., 2004; Briones-Orta et al., 2006). También se conoce que SnoN regula de manera negativa la expresión de su propio gen, *skil*, por medio del complejo SnoN/Smad4 unido al elemento de respuesta a TGF- β (TRE, *TGF- β responsive element*) que consta de cuatro secuencias SBE (Tecalco-Cruz et al., 2012). Así, *smad7* y *skil* son dos genes para los cuales se ha demostrado directamente que son regulados negativamente por Ski y SnoN.

Otros estudios más indirectos sugieren que la sobreexpresión de Ski y SnoN inhibe la inducción de *p15* y *p21* dada por las Smads, anulando los efectos anti-proliferativos del TGF- β (Sun et al., 1999).

Aunque Ski y SnoN son reconocidas como proteínas nucleares, existen ya varios reportes que demuestran su presencia en el compartimento citoplasmático. Reed y colaboradores (2001) analizaron 44 muestras humanas de melanoma y detectaron altos niveles proteicos de Ski y alteraciones en su localización subcelular, cambiando de una localización nuclear en melanomas pre-invasivos, a nuclear y citoplasmática en melanomas invasivos y metastásicos. También demostraron que el Ski citoplasmático es capaz de secuestrar a los complejos de Smad activos en el citoplasma de células de

melanoma, interfiriendo así con la señal de la citocina. Posteriormente, Krakowsky (2005) sugirió por primera vez que en células epiteliales normales SnoN parece tener una localización predominantemente citoplásmica, demostrando que es capaz de interferir con la señal del TGF- β secuestrando a las Smad en citoplasma. La función de Ski y SnoN en citoplasma permanece muy poco caracterizada, solamente se ha descrito la interacción del Ski citoplasmático con la proteína C184M, la cual parece funcionar, junto con Ski, como un regulador negativo de la señal del TGF- β (Kokura et al., 2003). El estudio en cuestión trazó una correlación entre los niveles de C184M y la presencia de Ski en citoplasma, y describió que C184M impide la translocación nuclear de Smad2/3, por lo que este podría ser otro mecanismo por el cual Ski inhibe la señal de la citocina desde el citoplasma. En el año 2010, Ferrand y colaboradores detectaron, en células transformadas, la presencia de Ski en citoplasma y su interacción con el receptor tipo I de TGF- β (T β RI). La interacción de Ski con el T β RI parece ser independiente de Smad2 y Smad4, pero resulta en la estabilización de complejos T β RI/Smad2/3/Ski, interfiriendo con la disociación de las Smads activas del receptor, bloqueando así la migración de las Smads al núcleo y la posterior inducción de genes responsivos a la citocina.

Todos los mecanismos arriba mencionados aluden a eventos de co-represión por parte de Ski y SnoN, donde dichas proteínas funcionan como antagonistas de la señalización del TGF- β . Sin embargo, sobre todo para Ski, se han descubierto interacciones con otras proteínas en vías diferentes a la del TGF- β , y tanto mecanismos de represión como de activación, hecho que sugiere que Ski y SnoN, además de ser antagonistas del eje TGF- β /Smads, tienen numerosas funciones como co-represores y co-activadores en otras vías de señalización.

Ski actúa como co-activador favoreciendo la inducción transcripcional de proteínas específicas de músculo como la miogenina (Ichikawa et al., 1997) y el *enhancer* de la cadena ligera de la miosina (Engert et al., 1995). También participa en la activación de la vía Wnt/ β -catenina interaccionando con el factor transcripcional FHL2: Ski coopera para favorecer la transcripción de los genes *FHL2*, *β -catenina* y *Nr-CAM* en células de melanoma induciendo un aumento en el crecimiento, sobrevivencia y motilidad celular (Chen et al., 2003). Por otra parte, Ski actúa como co-represor formando parte de la maquinaria de represión junto con MeCP2 y N-CoR (Kokura et al., 2001), para inhibir la señalización de las vías de receptores nucleares como la de vitamina D (Ueki et al., 2003), estrógenos y ácido retinoico. De hecho, en casos de leucemia mieloide aguda, Ski se encuentra sobreexpresado y se une al receptor de ácido retinoico (RAR, *Retinoic acid receptor*) inhibiendo su capacidad transactivadora (Ritter et al., 2006). Ski coopera en los mecanismos de represión mediados por Mad, por la hormona tiroidea β (Nomura et al., 1999) y por Rb; sin embargo, en éste último ejemplo, la sobreexpresión de Ski provoca que éste sea capaz de inhibir el arresto en la fase G1 dado por Rb (Prathapam et al., 2002). En el caso de SnoN, se tiene el dato de que puede unirse directamente a p53 y competir con la ligasa Mdm2, interfiriendo con la ubiquitinación y degradación de p53, estabilizando de esta forma a p53 (Pan et al., 2012). SnoN también puede cooperar con p53 en el control de genes específicos como p21 y el gen de la alfa-fetoproteína (AFP). En el caso de p21, SnoN actúa como un co-activador, potenciando la transcripción del gen dependiente de p53. También se ha reportado la interacción de SnoN con el receptor nuclear de estrógenos (ER α): SnoN interactúa con este receptor en el núcleo potenciando la transcripción de sus genes blanco, y favoreciendo así el desarrollo del cáncer de mama

dependiente de estrógenos (Band et al., 2012); así SnoN se considera un co-factor importante para el ER α .

C. Papel dual de Ski y SnoN en cáncer

Al igual que TGF- β , el papel de Ski y SnoN en procesos tumorigénicos es complejo. Estas proteínas son consideradas oncoproteínas porque su sobreexpresión resulta en la transformación oncogénica de las células *in vitro*. Además, se ha detectado un incremento en la expresión de Ski y SnoN en diferentes tipos de cánceres humanos como el melanoma, el cáncer de mama, de esófago, de pulmón, de estómago, de próstata y en el carcinoma colorrectal, fenómeno que explicaría la resistencia de las células malignas a los estímulos anti-proliferativos del TGF- β .

Es importante notar que el aumento en la expresión de estas oncoproteínas puede tener diferentes orígenes: puede deberse a procesos de amplificación génica, alteraciones en la expresión génica a nivel transcripcional o bien a alteraciones a nivel post-traduccionales. En tumores esofágicos se ha observado una amplificación de la región 3q26 del cromosoma humano conteniendo al gen de *snoN* (Imoto et al., 2001). Sin embargo, se ha visto que en cánceres pulmonares el aumento en la expresión de *snoN* ocurre a nivel transcripcional. La realidad es que poco se conoce acerca de los mecanismos responsables por la expresión alterada de Ski y SnoN en la tumorigénesis.

La progresión de tumores no solo se debe a una expresión exacerbada de Ski y SnoN sino también a una alteración en su localización subcelular, esto es porque la localización

subcelular puede ser relevante para modular la estabilidad de las dos proteínas. Se suele considerar a estos co-represores como proteínas nucleares, pero estudios recientes reportan su localización citoplasmática en algunos cánceres. Los datos son controversiales: algunos estudios reportan que en células de tumores avanzados Ski y SnoN cambian su localización nuclear por una localización citoplasmática (Reed et al., 2001; Zhang et al., 2003), pero también existe un estudio que afirma que SnoN es exclusivamente citoplasmático en células epiteliales normales, sosteniendo que la localización nuclear es propia de las células tumorales (Krakowski et al., 2005).

Acerca de los mecanismos por los cuales Ski y SnoN se comportan como oncogenes, se sabe que su actividad transformante depende de su capacidad de unión a las Smads, porque las oncoproteínas mutantes en el sitio de unión a Smads son incapaces de inhibir la señal del TGF- β y de inducir transformación celular (He et al., 2003). Pero Ski y SnoN también pueden interactuar con proteínas supresoras de tumores tan importantes como Mad, Rb (Retinoblastoma) y p53. Tanto v-Ski como c-Ski pueden unirse a Mad, impidiendo que esta última ejerza sus efectos inhibitorios sobre la proliferación en forma del heterodímero Mad/Max. También pueden unirse a Rb e impedir el control que éste supresor tiene sobre el arresto de ciclo celular en G1/S (Tokitou et al., 1999; Prathapam et al., 2002). Importantemente, Ski puede regular negativamente los niveles de p53 mediante el aumento de la actividad de Mdm2, una ligasa de tipo E3 responsable de ubiquitinar e inducir la degradación de p53 (Ding et al., 2012). Así, aunque todavía hagan falta muchos estudios, queda claro que, bajo ciertos contextos celulares, Ski y SnoN definitivamente son capaces de promover la transformación celular interactuando con proteínas supresoras de tumores clave.

Aunque Ski y SnoN fueron reconocidos en primera instancia como oncogenes por su capacidad de transformación (Li et al., 1986) y posteriormente por su sobreexpresión en numerosos cánceres, de manera sorprendente, los animales heterocigos para *ski* y *sno* (*ski*^{+/-} y *sno*^{+/-}, respectivamente) presentan una fuerte susceptibilidad a desarrollar tumores en presencia o ausencia de carcinógenos. Además, el ratón *sno*^{+/-} desarrolla linfomas de manera espontánea comparado con el ratón silvestre *sno*^{+/+} (Pearson-White et al., 2003). En el mismo estudio también se vio que los fibroblastos embrionarios de ratón *ski*^{+/-} y *ski*^{-/-} proliferan más rápidamente que los fibroblastos *ski*^{+/+} silvestres, mostrando más tendencia a estar en la fase S del ciclo celular (Shinigawa et al., 2001). Wilkinson y colaboradores (2005) también describieron un modelo cooperativo entre SnoN, p53 y las Smads en la modificación de la cromatina y la represión transcripcional del gen de la alfa-fetoproteína (*AFP*), un importante marcador tumoral. En este modelo SnoN estaría actuando más como supresor tumoral, cooperando con p53 en la represión de *AFP*. También se sabe que SnoN es capaz de unirse a p53, compitiendo con la ligasa Mdm2, y protegiendo así a p53 de la ubiquitinación y posterior degradación. SnoN también coopera con p53 en los promotores responsivos a éste (Pan et al., 2012). Por ende, SnoN es capaz de regular procesos de senescencia celular junto con p53, sugiriendo que tiene un papel importante como supresor tumoral.

A pesar de la controversia entre los numerosos estudios abocados a dilucidar el papel de Ski y SnoN en cáncer, la mayoría sugiere que la sobreexpresión de Ski y SnoN siempre se relaciona con eventos tumorales, por el simple hecho de que Ski y SnoN son antagonistas de la citocina anti-proliferativa por excelencia, TGF- β . Sin embargo, queda claro que los niveles proteicos de Ski y SnoN deben ser finamente regulados en una

célula, puesto que cualquier desequilibrio parece promover el desarrollo tumoral. También hace falta mucha información acerca de los genes controlados por Ski y SnoN para comprender su papel dual en la tumorigénesis.

D. Los niveles proteicos de Ski y SnoN son críticos para el mantenimiento de la homeostasis celular

El hecho de que los ratones *knockout* para Ski y Sno (*ski*^{-/-} y *sno*^{-/-}) muestren un fenotipo letal, así como la observación de que los ratones heterocigotos (*ski*^{+/-} y *sno*^{+/-}) son susceptibles a desarrollar tumores espontáneos y el que la sobreexpresión de Ski y SnoN esté relacionada con eventos tumorigénicos, deja claro que los niveles de Ski y SnoN tienen que estar finamente regulados con el fin de mantener la homeostasis celular. Existen numerosos datos que muestran una elevada expresión de Ski y SnoN en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, alteraciones en los niveles de Ski y SnoN no solamente se han detectado en cáncer sino también en la fibrosis de algunos órganos, como la fibrosis renal, trastorno caracterizado por la acumulación de fibroblastos y un exceso de proteínas de matriz extracelular. Durante el desarrollo de la fibrosis renal, los niveles proteicos de Ski y SnoN disminuyen, y son tan bajos que permiten la señalización pro-fibrótica mediada por TGF- β y las Smads, que se encargan de inducir genes promotores de la fibrosis como los relativos a la colágena (Col1a1, Col1a2, Col1a2 entre otros) y los relativos a la remodelación de la matriz extracelular como el inhibidor de metaloproteasas TIMP-1 (Lan HY., 2011). Las causas de estos cambios en los niveles de

Ski y SnoN pueden ser muchas, incluyendo mecanismos dependientes e independientes de la vía de señalización de TGF- β . Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos capaces de regular la expresión de los co-represores Ski y SnoN.

ANTECEDENTES

1. Regulación de Ski y SnoN por la vía de TGF- β y otras vías de señalización

Resulta claro que los niveles de Ski y SnoN en la célula son importantes tanto para determinar la respuesta al estímulo de TGF- β como para promover o no la transformación celular o el desarrollo de alguna patología. Por ello, Ski y SnoN son proteínas que están estrictamente reguladas a nivel transcripcional y post-traducciona. El principal regulador conocido de Ski y SnoN es el mismo TGF- β , quien mediante las Smads, es capaz de degradar efectivamente ambas proteínas por el sistema de Ubiquitina-proteosoma (UPS, *Ubiquitin-proteasome system*). Por lo tanto, TGF- β regula a Ski y SnoN a nivel post-traducciona a través de las ligasas de ubiquitina. Las ligasas más conocidas reguladoras de Ski y SnoN son las de tipo E3 como Smurf2, APC y Arkadia, y su mecanismo representa un paso básico que permite la señalización por TGF- β . De hecho, en algunos tipos de cáncer se ha detectado la baja expresión de alguna ligasa tipo E3, hecho que puede en parte explicar los altos niveles de Ski y SnoN (Inoue et al., 2008). También se sabe que la cinasa TAK1, activada por el estímulo de TGF- β , regula la estabilidad de SnoN, porque es capaz de fosforilarlo, favoreciendo su posterior ubiquitinación y degradación vía el proteosoma, y contribuyendo así a la inducción de genes dependientes de TGF- β en las células epiteliales HaCaT (Kajino et al., 2007).

Así como los procesos de ubiquitinación son fuertes reguladores de la estabilidad de los diferentes componentes de la vía de TGF- β , incluyendo a Ski y SnoN, las desubiquitininasas (DUBs, Deubiquitinating enzymes), enzimas encargadas de remover

ubiquitinas conjugadas a proteínas específicas, también son importantes reguladoras de la señal de la citocina. Aunque algunas DUBs se han relacionado con la vía de TGF- β /Smads, y con un alto riesgo para el desarrollo de metástasis, hasta la fecha no se han descrito DUBs específicas para Ski y SnoN (Zhang et al., 2014).

A nivel transcripcional, y a través del complejo Smad2/4, TGF- β también induce la expresión SnoN a manera de auto-regulación negativa, para apagar la señal y restaurar el estado basal de la célula. Además de TGF- β , existen reportes de que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte growth factor*), también es capaz de inducir la transcripción de SnoN mediante la activación de la vía de Erk1/2, contrarrestando así los efectos pro-fibróticos de TGF- β en riñón (Tan et al., 2007). En cuanto a la regulación transcripcional de Ski se sabe muy poco pues su promotor no está caracterizado.

Existen algunos reportes que describen la regulación de Ski por microRNAs (miRNAs), dentro de los cuales destacan miR-127-3p, miR-155 y miR-21. Jiang y colaboradores (2014) descubrieron que Ski es un blanco del miR-127-3p. Al parecer la expresión del miR-127-3p se abate durante el desarrollo del glioblastoma, hecho que lleva a tener altos niveles de Ski que promueven la proliferación del tumor. Al restaurar la expresión del miRNA, bajan los niveles de Ski y se induce un arresto de las células en fase G1, reduciendo la capacidad proliferativa del glioblastoma.

También se tiene el dato de que Ski es blanco del miR-155: en un modelo de melanoma parece que los niveles de miR-155 son muy bajos y esto ocasiona que la proteína Ski se sobreexpresen (Levati et al., 2011).

Nuestro laboratorio también demostró que las señales de GPCRs (receptores transmembranales asociados a proteínas G) y del citoesqueleto de actina modulan la estabilidad proteica de Ski: mientras que la polimerización desestabiliza a Ski, la despolimerización de los filamentos de actina estabiliza al co-represor (Vázquez-Victorio et al., 2015). Puesto que los cambios en el citoesqueleto participan en incontables fenómenos fisiológicos y patológicos, la relevancia de este nuevo mecanismo de regulación de Ski es obvia, por lo que se hace necesario investigar más acerca de dicho fenómeno en diferentes modelos celulares donde la dinámica del citoesqueleto cobre importancia.

2. TGF- β , Ski y SnoN en hígado sano y hepatocarcinoma (HCC)

TGF- β es conocido como un factor anti-proliferativo por excelencia en células epiteliales, y sus efectos citostáticos sobre los hepatocitos son muy reconocidos, pues es capaz de inducir arresto de la proliferación celular (inhibiendo la fase de síntesis de DNA) y apoptosis en hepatocitos (Russel, 1988), además de controlar la terminación de la regeneración hepática. En un hígado normal las células no-parenquimales secretan niveles casi indetectables de TGF- β .

Importantemente, ante cualquier daño hepático y durante la regeneración del hígado, los niveles de TGF- β aumentan considerablemente; la mayoría de los hepatocarcinomas también se caracterizan por altos niveles de TGF- β (mRNA y proteína). Mientras que durante la regeneración hepática la función del TGF- β consiste en interferir con la

proliferación excesiva de hepatocitos para mantener el hígado en su tamaño normal, durante la secuencia de procesos fibróticos y cirróticos que ultimadamente llevan al desarrollo del HCC, TGF- β pasa de ser un supresor de tumores a una citocina pro-tumoral. Este cambio o *switch* de citocina supresora de tumores a citocina pro-tumorigénica se explica porque se van perdiendo los efectos citostáticos del TGF- β pero se conservan otros efectos de la citocina como la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT, *Epithelial-mesenchymal transition*), un paso clave para el aumento de la migración celular y por tanto, de la capacidad invasiva del tumor (metástasis). Se dice que las células de HCC se vuelven selectivamente resistentes a la señal del TGF- β , volviéndose insensibles a algunos efectos (e.g, efectos citostáticos) pero exacerbando la respuesta de otros efectos (e.g, migración celular).

Al existir un incremento de TGF- β en el plasma de pacientes con HCC, TGF- β es considerado como un marcador de la progresión del HCC. Las células tumorales son capaces de sintetizar y secretar TGF- β continuamente y responder a las señales autocrinas de la citocina. También se ha reportado menor cantidad y alteraciones en la localización subcelular de los receptores para la citocina (T β RI y II). Durante el desarrollo del HCC, como en el desarrollo de otros tipos de cáncer, también pueden darse mutaciones en los receptores y en otros componentes de la vía del TGF- β . Aunque los mediadores Smad4 y Smad2 se han encontrado mutados en algunos tumores (cáncer de páncreas y colon, respectivamente), en el HCC en realidad son muy raras dichas mutaciones, por lo que la vía del TGF- β parece estar intacta en la mayoría de los casos de HCC. Importantemente, se ha detectado que durante el proceso secuencial de fibrosis/cirrosis/HCC, aumenta la cantidad de Smads fosforiladas en la región *linker* (denominadas PSmadL) comparado

con las fosforiladas en la región carboxilo terminal por el T β RI (PSmadC), promoviendo el cambio o *switch* que favorece las señales pro-oncogénicas dadas por las PSmadL por sobre las señales anti-tumorales propias de las PSmadC. Así, el escape a las acciones citostáticas de la vía de las PSmadC es un paso crítico para que las células adquieran un fenotipo maligno (Matsuzaki, 2012).

Es de esperarse que la transcripción genética dependiente de TGF- β /Smads también se modifique durante el desarrollo del HCC, y efectivamente, la existencia de PSmadL y PSmadC lo comprueba, pues sus genes blanco son diferentes. Importantemente, también se tiene el concepto de que existen “firmas” de HCCs tempranos y HCCs avanzados (referidas como “*early and late HCC signatures*” en el reporte de Coulouarn et al., 2008), dadas por la expresión de conjuntos de genes específicos dependientes de TGF- β /Smads. La identificación del tipo de “firma” podría predecir el estadio del tumor, el pronóstico y la posibilidad de metástasis. Aun así, hacen falta numerosos estudios para determinar a qué otros niveles se encuentra afectada la señal del TGF- β en el cáncer hepático.

En el HCC se han detectado alteraciones en los niveles de TGF- β , y a nivel de las fosfoisoformas de Smads (PSmadC/PSmadL), pero realmente se sabe muy poco acerca de la participación de Ski y SnoN. Aunque se tiene el antecedente de la sobreexpresión frecuente de Ski y SnoN en numerosos tumores, no se ha reportado nada en HCC, por lo que se hace necesario estudiar a los dos co-represores en este tipo de cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La gran mayoría de la información que se tiene acerca de la vía del TGF- β y de sus co-represores Ski y SnoN se ha generado en modelos de células transformadas o usando técnicas de sobreexpresión. Debido a que las células transformadas se encuentran profundamente alteradas en diferentes niveles, no debieran de ser el mejor modelo para caracterizar mecanismos que se dan de manera fisiológica. Así, se hace necesario caracterizar la regulación de Ski y SnoN en células normales, y de manera específica en el contexto hepático, dada la relevancia del TGF- β en la homeostasis de dicho órgano.

JUSTIFICACIÓN

Es relevante caracterizar a fondo la regulación de los co-represores Ski y SnoN porque sus niveles proteicos son críticos para la homeostasis celular, además de que están afectados en patologías tan relevantes como la fibrosis y el cáncer.

HIPÓTESIS

Si los niveles de Ski y SnoN se ven alterados en patologías como el cáncer, esto podría deberse a cambios importantes en su regulación.

Además, si Ski y SnoN son co-represores de la vía del TGF- β , entonces cualquier alteración en la regulación de Ski y SnoN podría tener un impacto directo en la respuesta genética dependiente de TGF- β .

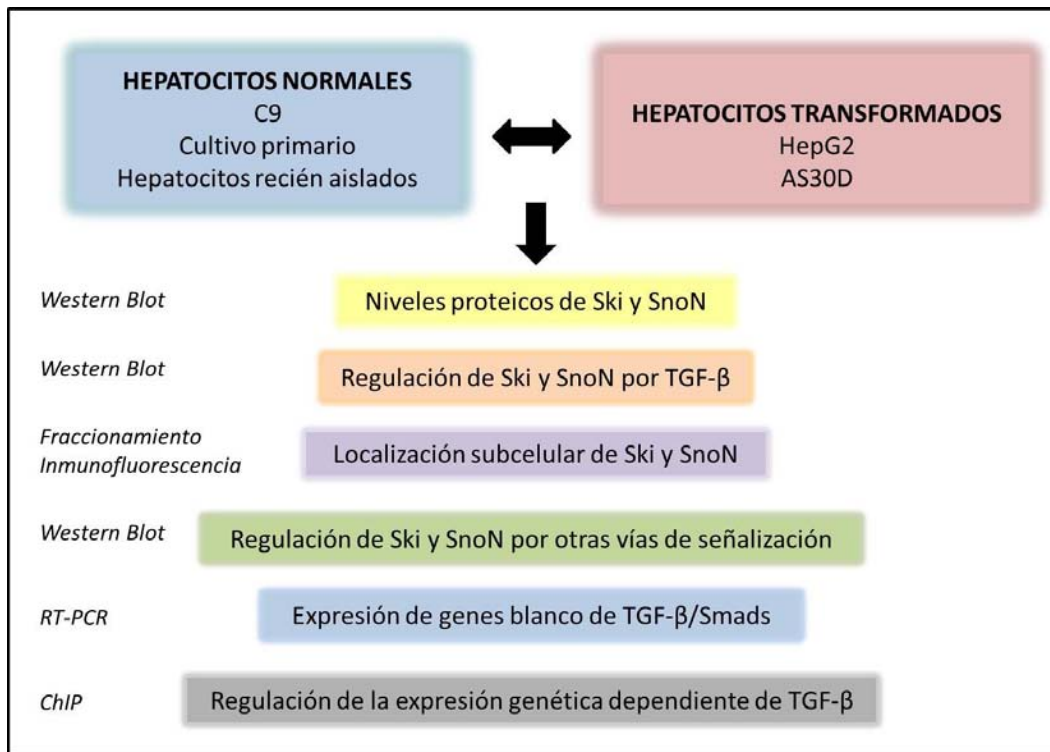
OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos de regulación que controlan la estabilidad proteica de Ski y SnoN en un modelo comparativo de hepatocitos normales y hepatocarcinoma (HCC).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar y comparar los niveles proteicos de Ski, SnoN y otros componentes de la vía del TGF- β en hepatocitos normales y células de hepatocarcinoma.
2. Analizar y comparar la regulación transcripcional de genes blanco de la vía TGF- β /Smads en hepatocitos normales y células de hepatocarcinoma.
3. Investigar si los mecanismos de regulación de la estabilidad proteica de Ski y SnoN por TGF- β y otros estímulos en hepatocitos normales están conservados en células de hepatocarcinoma.
4. Estudiar el efecto de la regulación de la estabilidad proteica de Ski y SnoN sobre la cinética de expresión de genes regulados por la vía TGF- β /Smads.

METODOLOGÍA



- **Líneas celulares**

La línea celular C9 (línea hepática inmortalizada y no transformada de rata) fue mantenida a 37°C (5% CO₂) en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% suero fetal bovino y 1% penicilina/streptomina. La línea de hepatocarcinoma humano HepG2 fue mantenida en medio MEM (*Minimal essential medium*) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% piruvato de sodio y 1% penicilina/estreptomina.

- ***Tratamientos***

Antes de cada experimento, las células (90% de confluencia) se ayunaron por 12 h con medio sin suero fetal bovino. El TGF- β (específicamente la isoforma TGF- β 1) se usó a una concentración de 0.3 nM. Para los ensayos de depleción de calcio extracelular con EGTA, las células se pre-incubaron por 10 min en un medio isotónico (140mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl₂, 5mM glucosa, 20mM Hepes, 1mM CaCl₂, pH 7.4), y posteriormente se incubaron en el mismo medio carente de CaCl₂ pero adicionado con 1mM EGTA.

- ***Cultivo primario de hepatocitos de rata***

Los hígados de ratas Wistar se digirieron con colagenasa, y los hepatocitos se separaron del resto de las células por centrifugación (400 rpm, 2 min), usando el protocolo reportado por Macías-Silva et al., 2002. La viabilidad de las células se determinó por exclusión al azul tripano. Los hepatocitos viables (95%) se seleccionaron por centrifugación con Percoll. Algunos hepatocitos (hepatocitos frescos en suspensión, HS) fueron mantenidos a 37° (5% CO₂) en medio William's E y estimulados dentro de las dos horas posterior al aislamiento. En el caso del cultivo primario (hepatocitos cultivados, HC), los hepatocitos se sembraron en cajas Petri previamente tratadas con 1% de colágena tipo-I para permitir su adherencia, durante 4 horas en presencia del medio *Attachment*. Posteriormente se les cambió a un medio similar pero libre de suero, para estimularlos al día siguiente o dentro de las 24 h posteriores.

- ***Obtención del hepatoma de rata AS30D***

El hepatoma de rata AS30D se mantuvo por inoculación intraperitoneal en ratas Wistar hembras como previamente descrito (Rodriguez-Enriquez et al., 2000). Las células se aislaron de los fluidos ascíticos de la rata a los 5 a 7 días post-inoculación, se contaron, sembraron en cajas Petri (20×10^6), y se mantuvieron a 37°C (5% CO₂) por un máximo de 5 h en medio William's E suplementado con 1mM Hepes y 1% penicilina/estreptomicina.

- ***Extracción de proteínas***

Al finalizar la estimulación celular a los tiempos deseados y con los ligandos necesarios, se aspiró el medio, se lavó la caja con PBS 1X frío y se lisaron las células en 1ml de solución RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1% Nonidet40) adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas. Después de una incubación de 1 h en frío, se centrifugaron las muestras 5 min a 14 000 rpm para bajar los restos celulares. Posterior a la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, se usaron 80 µg de proteína para los controles de carga, y 1-3mg de proteína para el ensayo de inmunoprecipitación (IP).

- ***Fraccionamiento núcleo/citoplasma***

Mediante esta técnica se busca separar los compartimentos nucleares y citoplasmáticos de las células para analizar la localización subcelular de las proteínas de interés.

Después de la estimulación, las células C9, AS30D o HepG2 se lavaron con PBS y se resuspendieron en buffer de homogenización (3mM Imidazole pH 7.4, 250mM sacarosa e inhibidores de proteasas) y se pasaron 20 veces a través de una jeringa (22x25). El

homogenado se centrifugó a 3400 rpm por 15 min a 4°C y la fracción citoplasmática (sobrenadante) se separó de la fracción nuclear (pellet). Cada fracción se lisó en solución RIPA por 1 h a 4°C. Finalmente se centrifugaron las muestras a velocidad máxima por 5 min para remover el material insoluble. Los extractos proteicos de cada fracción se analizaron por inmunoprecipitación/Western blot (IP/WB).

- ***Inmunoprecipitación de extractos celulares (IP)***

Los extractos proteicos cuantificados se incubaron con 2 µl de anticuerpo específico (α Ski, α SnoN, α Smad4 o α Smad2/3) toda la noche a 4 °C en rotación. Posteriormente se inmunoprecipitaron los complejos con 60 µl de Proteína G/agarosa, incubando en rotación y a 4°C por 1.5 h. Después de dicha incubación, el pellet de agarosa/Proteína G se lavó 3 veces con 1ml de solución RIPA fría. Finalmente se removió el líquido con una punta larga, dejando la pastilla completamente seca. Finalmente se resuspendió cada muestra en 30µl de solución de Laemmli 2X y se hirvieron las muestras a 100 °C durante 4min.

- ***Electroforesis en geles de poliacrilamida***

Se usaron geles de poliacrilamida al 7.5% para correr las muestras obtenidas puesto que las proteínas analizadas tienen un peso molecular de 50 a 90 kDa. Se corrió el gel a 100 Volts.

- ***Western blot (WB)***

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en un proceso conocido como Western blot. Esta técnica se caracteriza por transferir a las proteínas del gel a una membrana PVDF y, posteriormente, por incubar

dicha membrana con un anticuerpo primario que reconoce la proteína de interés. Después de esto, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a una enzima (en este caso la peroxidasa de rábano o HRP, del inglés *horseradish peroxidase*), el cual reconoce al anticuerpo primario unido a la proteína deseada. Al poner la membrana en contacto con el sustrato de la enzima del anticuerpo secundario, se induce una reacción de quimioluminiscencia que permite visualizar la proteína de interés mediante autoradiografía.

- ***Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)***

El ChIP es una técnica que permite detectar interacciones endógenas de proteínas con secuencias propias de promotores génicos, para la detección de complejos proteicos unidos a regiones de DNA de interés.

Preparación de la cromatina

Se usaron las células a un 90% de confluencia, previamente ayunadas. Después de la estimulación, las células se trataron con formaldehído al 1% a 37°C durante 12 min con el fin de entrecruzar las proteínas con el DNA. Se detuvo la reacción con glicina 0.2 M. Se recolectaron las células y se procedió a la extracción de núcleos con soluciones específicas (Buffers 1, 2 y 3, Apéndice). Posteriormente se sonicaron las muestras en hielo 8 veces cada una (30 seg de sonicación y 1 min de descanso). La cromatina sonicada obtenida se incubó toda la noche (4°C, en agitación) con 90µl de Proteína G-agarosa previamente bloqueada con BSA y DNA de esperma de salmón. Posteriormente, se centrifugaron las muestras y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo (cromatina “limpia”). Dicha cromatina se almacenó a -70°C.

Inmunoprecipitación de cromatina

La cromatina “limpia” obtenida en el paso anterior se utilizó para la precipitación de las proteínas de interés (en este caso Ski, SnoN, Smad2/3 y Smad4) mediante el uso de anticuerpos específicos α Ski, α SnoN, α Smad2/3 y α Smad4. En este punto también se tomaron 100 μ l de cromatina para el *Input*, el cual asegurará que se partió de una cantidad de cromatina igual para cada condición. La mezcla de cromatina/anticuerpo se incubó toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente se incubaron las muestras con 30 μ l de Proteína G-agarosa (2 h a 4°C, en agitación) con el fin de precipitar los complejos cromatina/proteína/anticuerpo. Las perlas se lavaron con solución RIPA (3 lavados de 10 min cada uno) y posteriormente fueron resuspendidas en una solución de buffer TE, RNasa, SDS y proteinasa K para remover proteínas y RNA no deseados (esto mismo se realiza con las muestras “input”). Las muestras se incubaron a 55 °C durante 3 h y a 65°C durante toda la noche.

Recuperación del DNA

Posteriormente se realizó la precipitación y purificación del DNA por extracción con fenol-cloroformo. El pellet de DNA obtenido se resuspendió en agua.

PCR

Dependiendo del gen de interés, se diseñaron oligonucleótidos específicos (enlistados en la Tabla 1, Apéndice) para la amplificación de la región. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

- ***Inmunofluorescencia***

Las células C9 se sembraron sobre cubreobjetos redondos estériles y previamente tratados con poli-L-lisina en placas de 24 pozos. Después del estímulo, se procedió a la fijación por 15 min, con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS a 37°C. Posteriormente se realizó la permeabilización de las células con Tritón X-100 al 0.1% en PBS por 10 min a 4°C. Se incubó con la solución de bloqueo conteniendo 1% de albúmina de suero por 1 h a temperatura ambiente. Después se incubó por 12 h a 4°C con el anticuerpo primario específico (dilución 1:100). Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo secundario (1:500) por 1 h a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se detectó α -actina por falloidina acoplada a Alexa 594 (1:40). Los portaobjetos se montaron usando el medio de montaje Vectashield. Se empleó un microscopio confocal Olympus 60X y el software Olympus para la adquisición y procesamiento de imágenes.

- ***RT-PCR***

Los mRNAs de los genes *smad7*, *ski*, *snoN/snoN2*, *pai-1*, *gadd45b* y β -actina se analizaron por RT-PCR. Después de los tratamientos pertinentes, el RNA total se aisló mediante TriZol y se usaron 2 μ g de RNA para la síntesis de cDNA con hexámeros y la retrotranscriptasa viral M-MLV. La reacción de PCR se llevó a cabo usando el kit Taq PCR Master Mix junto con los oligonucleótidos específicos listados en la Tabla 1 (Apéndice). El programa fue el siguiente: 95°C por 5 min, 95°C por 45 seg, 55°C o 60°C por 30 seg, 72°C por 1 min. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

- *Análisis estadístico*

Se realizó la prueba estadística tipo *Student t* para calcular la significancia estadística. El valor $p < 0.05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS

A. Las células de hepatocarcinoma expresan altos niveles de Ski y SnoN.

Decidimos llevar a cabo nuestro estudio en un modelo comparativo de hepatocitos normales y hepatocarcinoma (HCC) pues pensamos que dicho modelo puede ser valioso en el entendimiento de los mecanismos regulatorios de Ski y SnoN por las siguientes razones: la relevancia de la señal del TGF- β en la homeostasis del hígado ha sido probada de muchas formas, aun así no hay datos concretos sobre la regulación y participación de Ski y SnoN en un hígado sano y el HCC.

Lo primero que se decidió hacer en este estudio fue validar el modelo comparativo, analizando la expresión de los co-represores Ski y SnoN en los dos contextos: hepatocitos normales y HCC. Los hepatocitos normales (N) analizados fueron hepatocitos de rata recién aislados (HF) y en suspensión (HS) y la línea celular no transformada de hepatocitos de rata (C9); los hepatocitos transformados (T) que se utilizaron a lo largo del estudio fueron las células AS30D (AS, hepatoma de rata) y la línea HepG2 (Hep, hepatoma humano).

El análisis comparativo llevado a cabo demostró que los niveles proteicos de Ski y SnoN son mucho más elevados en HCC comparado con hepatocitos normales (Figura 1A y B). Para el caso de Ski, pudimos analizar los niveles de la proteína en las diferentes condiciones directamente en extractos totales (100 μ g de proteína, Figura 1A) efectuando un Western blot (WB). Para el caso de SnoN, fue preciso realizar una inmunoprecipitación (IP/WB) con anticuerpos específicos para poder detectar la proteína

(Figura 1B). En ambos casos los hepatocitos normales siempre mostraron tener menores niveles proteicos de los co-represores, mientras que los hepatocitos transformados mostraban niveles elevados de Ski y SnoN. Interesantemente, otro componente importante de la vía de señalización del TGF- β , Smad4, no mostró cambios de expresión en una u otra condición, por lo que las alteraciones en las cantidades de proteína fueron específicas de Ski y SnoN. Interesantemente, dentro del mismo grupo de hepatocitos normales (HS y C9) notamos una gran diferencia en cuanto a los niveles proteicos de Ski (Figura 1A): las células C9 tienen aproximadamente 3 veces más proteína Ski comparado con su contraparte HS. Es posible que las células C9, al ser una línea celular inmortalizada (aunque no cancerosa), pierdan un tanto su similitud con los hepatocitos directamente aislados de la rata; esto tiene sentido, pues se conoce que el solo cultivo de los hepatocitos aislados puede causar que éstos pierdan las características de los hepatocitos *in vivo*.

Al no estar claros los mecanismos implicados en el aumento de los niveles de Ski y SnoN reportado en algunos cánceres como el pulmonar, de próstata y melanoma, decidimos investigar si el aumento de Ski y SnoN detectado por nosotros en el HCC se debía a un aumento de la transcripción de sus genes. Para esto, llevamos a cabo una RT-PCR comparativa con el fin de analizar los niveles de mRNAs de *ski* y *snoN/snoN2* en las diferentes condiciones (Figura 1C). Nos sorprendimos al darnos cuenta de que los niveles de mRNA no correlacionaban con los niveles de proteínas en las células analizadas, sugiriendo que los altos niveles de Ski y SnoN en HCC se deben a un importante aumento en la estabilidad de las proteínas más que a una transcripción incrementada.

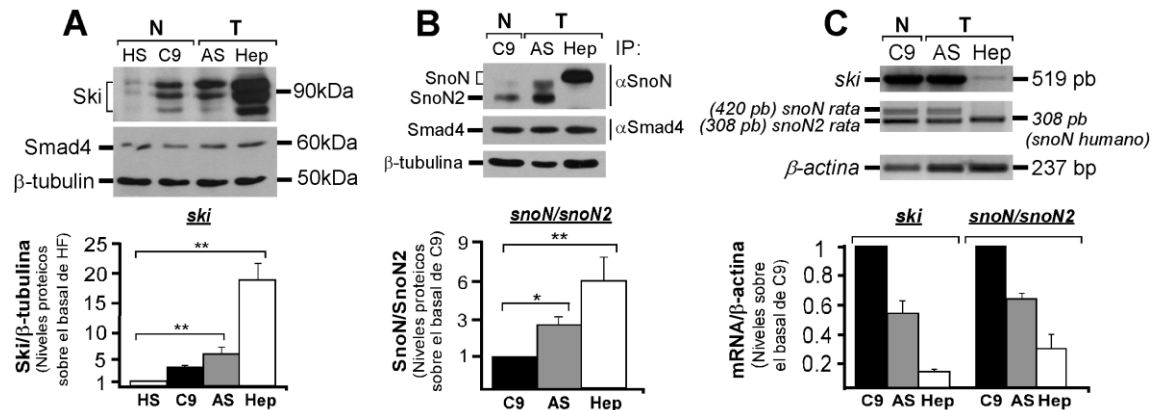


Figura 1. Las células de hepatocarcinoma expresan altos niveles proteicos de Ski y SnoN comparado con los hepatocitos normales.

(A) Los niveles proteicos de Ski y Smad4 se analizaron por WB a partir de extractos totales obtenidos de hepatocitos Normales (hepatocitos recién aislados en suspensión [HS] y línea C9) y Transformados (hepatoma de rata AS30D [AS] y hepatoma humano HepG2 [Hep]). La proteína β -tubulina se usó como control de carga. (B) Los niveles proteicos de SnoN/SnoN2 y Smad4 se analizaron por IP/WB en hepatocitos Normales (C9) y Transformados (AS y Hep). La proteína β -tubulina se usó como control de carga. (C) RT-PCR comparativa entre hepatocitos Normales y Transformados que muestra los niveles de mRNA de ski (rata y humano 519 pb), snoN (humano 308 pb; rata 420 pb), snoN2 (rata 308 pb) y β -actina (rata y humano 237 pb). Las gráficas reflejan el análisis densitométrico de los niveles proteicos (páneos inferiores A y B) y de mRNA (pánel inferior C) de Ski y SnoN/SnoN2 en los diferentes tipos celulares analizados. Los datos están representados como la desviación estándar de 3 experimentos independientes; * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparado con el control (HS o C9).

B. TGF- β induce genes dependientes e independientes de Smad4 en hepatocitos normales y hepatocarcinoma pero con cinéticas diferentes.

Al existir tan altos niveles de Ski y SnoN en hepatocitos transformados, y al ser Ski y SnoN antagonistas de la señal del TGF- β , enseguida razonamos que la vía del TGF- β /Smads se encontraría bloqueada en HCC. Para demostrar nuestra hipótesis, llevamos a cabo una serie de RT-PCRs para detectar la expresión de genes blanco del TGF- β en hepatocitos normales y HCC. Smad4 es una proteína necesaria para el mecanismo represor mediado por Ski y SnoN, pues los co-represores no se unen directamente al DNA, sino que reprimen la transcripción mediante su unión con Smad4. Por esto, decidimos analizar tanto genes que se han reportado como Smad4-dependientes (que necesitan a Smad4 para su inducción) como genes que se han reportado como Smad4-independientes (que no necesitan a Smad4 para su inducción). Dentro de la primera categoría se encuentran genes como *smad7* y *snoN/snoN2*, y en la segunda categoría tenemos de ejemplo a *gadd45b* y *pai-1*.

Anteriormente explicamos que Smad7 y SnoN son antagonistas de la señal del TGF- β y son inducidos por las mismas Smads a manera de asa de retroalimentación negativa para apagar oportunamente la vía de señalización y permitir el regreso de la célula a su estado basal. Gadd45b es una proteína que participa en ciclo celular y respuesta a daño al DNA, se reconoce como un gen controlado por la vía TGF- β /Smads que se expresa en condiciones de arresto del ciclo celular, condiciones de estrés celular o de daño al DNA. Pai-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1) es el principal inhibidor del activador del plasminógeno y la uroquinasa, y por tanto participa en la inhibición de la fibrinólisis

(la eliminación fisiológica de los trombos sanguíneos). Pai-1 es un reconocido gen blanco de la vía TGF- β /Smads, de hecho, la mayoría de los genes reporteros que se utilizan para probar la actividad transcripcional dependiente de TGF- β (e.g, 3TPLux), están elaborados a partir de repeticiones en tándem de la secuencia promotora del gen PAI-1.

Los resultados obtenidos al realizar las RT-PCRs comparativas demostraron, para nuestra sorpresa, que las células de hepatoma (en este caso, HepG2 y AS30D) tienen en realidad una fuerte respuesta transcripcional ante el estímulo de TGF- β : los genes se expresan de una manera sostenida, hasta 6 horas posteriores al estímulo (Figura 2A y B). Contrariamente, lo que sucede en hepatocitos sanos (en este caso C9), es una activación transcripcional transitoria, con un pico transcripcional a la hora post-tratamiento, finalizándose la transcripción antes de las 3 horas posteriores a la estimulación (Figura 2C). Así, pudimos observar una diferente cinética de los programas transcripcionales inducidos por TGF- β en hepatocitos normales y HCC.

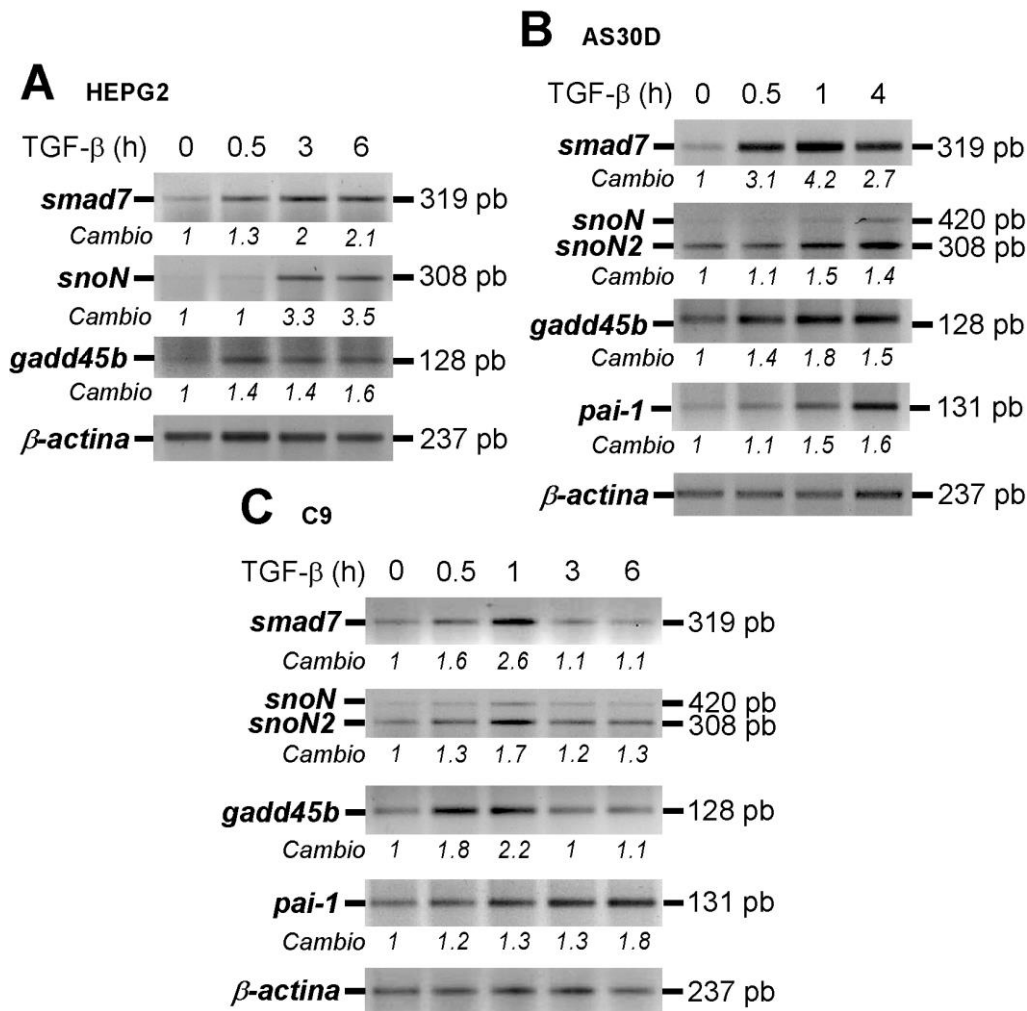


FIGURA 2. TGF-β induce genes dependientes e independientes de Smad4 con diferentes cinéticas en hepatocitos normales y transformados.

Los niveles de mRNA de los genes dependientes (*gadd45b*, *pai-1*) e independientes (*smad7*, *snoN/snoN2*) de *Smad4* se analizaron por RT-PCR en los hepatomas (A) HepG2 y (B) AS30D y en los hepatocitos normales C9 (C). Las diferentes células se estimularon con 0.3nM de TGF-β1 por los tiempos indicados. Después de la purificación del RNA total, se analizaron los niveles de mRNA de los diferentes genes por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos (secuencias mostradas en la Tabla 1, Apéndice). Los datos presentados son representativos de 3 experimentos independientes. El incremento (veces de cambio sobre el basal normalizado contra β-actina) se calculó para el experimento representativo.

En el caso de los hepatomas, la presencia sostenida de los mRNA de los genes controlados por TGF- β , puede ser consecuencia de un proceso de transcripción activo por varias horas o de una importante estabilización del mRNA: en el caso de *smad7* parece ser una transcripción sostenida, pues la inhibición de la transcripción (mediante el uso de actinomicina D, ActD) posterior a dos horas de reto con TGF- β , abate la inducción del gen por el estímulo de TGF- β (Figura 3). De forma similar, el tratamiento con el inhibidor del receptor tipo I del TGF- β (SB431542, SB43), aplicado después de una estimulación de 2 h con TGF- β , también abate la inducción del gen por la citocina, y esto puede explicarse por la inhibición de la fosforilación y activación de las Smads, que tiene como consecuencia que dichos factores de transcripción no migren al núcleo ni activen la transcripción de sus genes blanco. El efecto del SB43 también podría sugerir que las Smads participan en la estabilización del mRNA, tal y como ya se ha demostrado para el gen de la elastina (Kucich et al., 2002). Interesantemente, el gen de *sno* se comporta de diferente forma: los post-tratamientos con el inhibidor SB43 o el inhibidor transcripcional ActD, afectan solo parcialmente la inducción del gen dependiente de la citocina (Figura 3). Esto sugiere que la presencia sostenida del mRNA de *sno* se debe mayoritariamente a mecanismos de estabilización del mRNA, aparentemente independientes de las Smads en este caso, y en menor proporción a un proceso activo de transcripción.

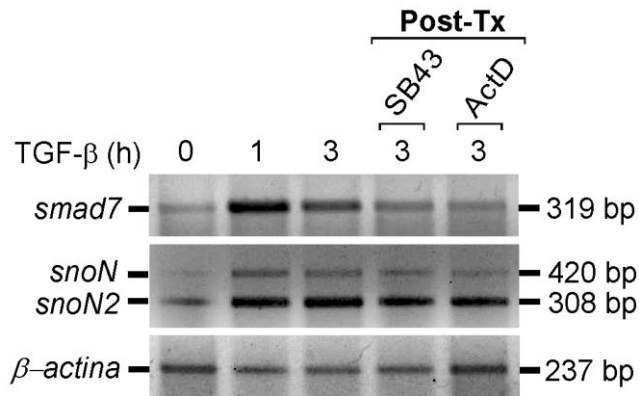


FIGURA 3. En células de hepatoma AS30D, la presencia sostenida del mRNA de los genes blanco de TGF- β se debe a la transcripción activa o a la estabilización del mRNA.

Las células de hepatoma AS30D se estimularon con 0.3nM de TGF- β . Donde se indica, se añadió en forma de post-tratamiento (Post-Tx) 10 μ M de SB4314542 (SB43, inhibidor del T β RI) o 5 μ g/ml de actinomicina D (ActD, inhibidor de la transcripción) 2 h después del estímulo de TGF- β . Se analizó el mRNA de los genes *smad7* y *sno* (*snoN/snoN2*) por RT-PCR.

En cualquier caso, lo más relevante de los datos aquí presentados es que el hecho de que la transcripción sea sostenida en HCC sugiere fuertemente que al asa de retroalimentación negativa dada por Ski y SnoN, y responsable del apagado de la vía de señalización, se encuentra funcional en hepatocitos sanos, pero está ausente en los hepatomas.

C. TGF- β regula diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN en hepatocitos normales y hepatocarcinoma.

Dado que las profundas diferencias en los patrones de transcripción inducidos por TGF- β , que se observaron entre los hepatocitos normales y las células de HCC, podrían estar dadas por una expresión diferencial de los antagonistas de la señal, decidimos caracterizar la regulación de Ski y SnoN por TGF- β en ambos contextos (Figura 4).

Como se esperaba según los antecedentes, una estimulación de 0.5 h con TGF- β induce la degradación de las proteínas Ski y SnoN en hepatocitos normales, y eventualmente, 1 h de tratamiento con la citocina provoca la recuperación de los niveles proteicos de SnoN por la inducción de la expresión de su gen dependiente de las Smads (Figura 4A y B). En el caso de Ski, detectamos una recuperación en sus niveles desde las 2-3 h post-tratamiento, aunque por antecedentes sabemos que no responde a una inducción transcripcional pues *ski* no es un gen inducido por TGF- β . En el hepatoma HepG2 (Figura 4C), también observamos una rápida y fuerte degradación de los co-represores ante el estímulo con TGF- β , así como la subsecuente recuperación de SnoN característica de las 2 h post-tratamiento. Sin embargo, en este hepatoma decidimos analizar un curso temporal más largo, porque notamos que los niveles basales de SnoN y especialmente de Ski, no logran recuperarse sino hasta tiempos muy largos de estimulación (24 h), que interesantemente coinciden con el momento en el que la señal de la citocina se apaga, dado por la disminución de los niveles Smads fosforiladas (pS2). Así, pensamos que en las células HepG2 la degradación de Ski y SnoN por TGF- β y por las Smads es muy

fuerte. En el caso de SnoN, sus niveles pueden recuperarse parcialmente pues también su expresión es inducida, así que es un equilibrio entre inducción y degradación; en el caso de Ski, al no ser gen blanco de las Smads, solamente es degradado y sus niveles se mantienen indetectables hasta que la señal de la citocina se apaga.

En contraste con los panoramas arriba mencionados, las observaciones que hicimos en el hepatoma de rata AS30D fueron muy diferentes: las proteínas Ski y SnoN son resistentes a la degradación por TGF- β , pues la citocina no logra causar ningún decremento en sus niveles (Figura 4D). Al hacer esta observación, inmediatamente pensamos que la vía del TGF- β no era funcional en dicho hepatoma: para nuestra sorpresa la vía se activa sin problema alguno, pues la fosforilación de las Smads se da exitosamente (pS2) y hasta perdura por varias horas después del estímulo. Además, también notamos la subida en los niveles de SnoN a las 2 h post-tratamiento, la cual concuerda con la inducción del gen de *sno* dependiente de las Smads. Por ende, en el hepatoma AS30D, Ski y SnoN son resistentes a la degradación por TGF- β pero no es porque la vía no sea funcional, es probable que algunos mecanismos que influyen en la estabilidad de los co-represores se encuentren alterados en este hepatoma.

Los datos obtenidos en esta figura demuestran que Ski y SnoN son regulados diferencialmente en hepatocitos normales y HCC, existiendo profundas diferencias también entre los diferentes tipos de hepatoma analizados, reforzando así la idea de que los hepatocarcinomas pueden ser muy heterogéneos entre ellos.

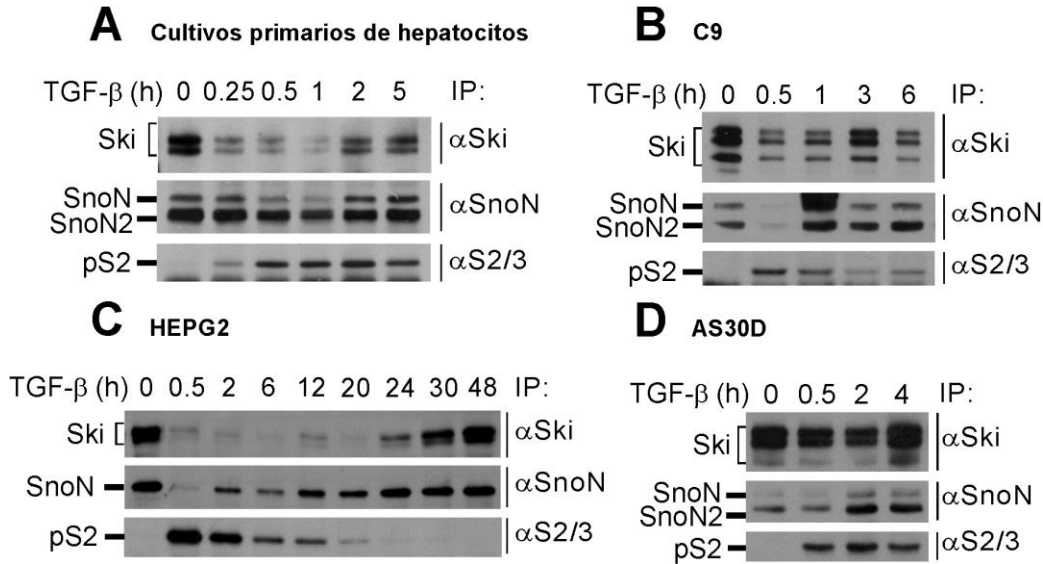


FIGURA 4. TGF- β regula diferencialmente la estabilidad proteica de Ski y SnoN en hepatocitos normales y transformados.

(A) Cultivos primarios de hepatocitos de rata, (B) hepatocitos normales C9 y los hepatomas (C) HepG2 y (D) AS30D se trataron con 0.3nM de TGF- β 1 por los tiempos indicados. Los niveles proteicos de Ski, SnoN/SnoN2 y pSmad2 (pS2) se detectaron por IP/WB. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

D. Ski y SnoN tienen diferente patrón de localización subcelular en hepatocitos normales y hepatocarcinoma.

De acuerdo a reportes anteriores, sabemos que existe una relación entre la localización subcelular de Ski y SnoN y su estabilidad proteica: en algunos cánceres se ha demostrado que Ski y SnoN pueden cambiar su localización nuclear por una ubicación citoplasmática que les conferiría resistencia a la degradación dependiente del sistema Ubiquitina/Proteosoma (UPS, *Ubiquitin-Proteasome System*). Por ello, quisimos evaluar

la localización subcelular de ambas proteínas en nuestro modelo comparativo, con el fin de poder explicar las diferencias en los niveles proteicos y la regulación de Ski y SnoN en hepatocitos normales y HCC. Para ello recurrimos a la técnica de fraccionamiento celular, en la cual se separa la fracción citoplasmática de la fracción nuclear. La pureza de las dos fracciones se evalúa mediante el análisis de proteínas estrictamente nucleares (e.g., lámina B) o citoplasmáticas (e.g., tubulina). Los fraccionamientos realizados demuestran que la localización de Ski y SnoN en células de hepatoma (HepG2 y AS30D) es estrictamente nuclear (Figura 5A y B). Tanto en HepG2 como en AS30D, las proteínas Smad2 fosforiladas (pS2) migran del compartimento citoplasmático al nuclear y también se asocian con Smad4 ante el estímulo con TGF- β , hecho que refuerza una vez más que la señalización de la citocina se activa exitosamente en ambos hepatomas. De manera interesante en AS30D (Figura 5B) también detectamos una fuerte interacción de Ski y SnoN con Smad4 en el núcleo, lo cual sugeriría que Ski y SnoN debieran poder reprimir sin obstáculos los genes blanco de TGF- β , puesto que se encuentran en núcleo y uniendo a Smad4, proteína clave que les permite ejercer su mecanismo represivo en el DNA. Además de los puntos ya mencionados, la Figura 5B deja claro que Ski y SnoN son resistentes a la degradación inducida por TGF- β en el hepatoma AS30D.

De manera interesante, mientras que la localización de Ski y SnoN es estrictamente nuclear en HCC, determinamos que los co-represores se localizan tanto en la fracción nuclear como en la citoplasmática de los hepatocitos normales (Figura 5C). Existe un solo estudio, llevado a cabo por Krakowsky y colaboradores (2005), que reporta la localización citoplasmática de SnoN en células epiteliales no tumorales, afirmando que el SnoN citoplasmático es resistente a la degradación por TGF- β e inhibe a la vía

secuestrando a las Smads en dicho compartimento impidiéndoles la entrada al núcleo. En nuestro modelo, si bien detectamos la presencia de Ski y SnoN en citoplasma en hepatocitos normales, no encontramos que las proteínas citoplasmáticas fueran resistentes a la degradación por TGF- β (las dos pozas se degradan igual de efectivamente ante el estímulo); tampoco vimos que su localización citoplasmática afectara la migración de pS2 al núcleo: el fraccionamiento en hepatocitos C9 (Figura 5C) deja claro que pS2 se enriquece en la fracción nuclear ante el estímulo de TGF- β . Smad4, por su parte, existe en las dos fracciones celulares, donde interactúa con SnoN y también con Ski (datos no mostrados). Así, la función de Ski y SnoN en citoplasma queda todavía poco clara, aunque es evidente que forman complejo con Smad4 y que no impiden la translocación de las Smads al núcleo.

También demostramos que las dos pozas de Ski y SnoN se regulan de manera similar: al pre-tratar las células C9 con SB431542 (SB43), un inhibidor del receptor tipo I de TGF- β (T β RI), observamos una importante estabilización de ambas fracciones (nuclear y citoplasmática, Figura 5D). El SB43 actúa inhibiendo la fosforilación de las Smads dependiente del T β RI, por lo que ya no se genera ninguna Smad activa: de esta forma se bloquea la degradación basal o inducida por TGF- β mediada por los complejos de Smads/ligasas E3 de ubiquitina, acumulando los niveles de Ski y SnoN en la célula. La Figura 5D comprueba que, en hepatocitos normales, ambas pozas de Ski y SnoN se degradan (por T β RI) y se estabilizan (por SB43), por lo que no son pozas independientes, sino que están en comunicación. Aun así, hacen falta más estudios para caracterizar a detalle la regulación de las dos fracciones presentes en hepatocitos normales.

Los datos obtenidos hasta ahora demuestran que en los hepatocitos sanos los co-represores Ski y SnoN existen tanto en núcleo como en citoplasma en bajos niveles y ambas fracciones son reguladas por TGF- β ; contrariamente, en los hepatomas la localización citoplasmática de Ski y SnoN se ha perdido, existiendo altos niveles de los co-represores solamente en núcleo, siendo éstos resistentes a la degradación inducida por TGF- β en algunos tipos de HCCs. Importantemente, los cambios en la localización subcelular de Ski y SnoN en HCC no explican el aumento tan drástico en los niveles de los antagonistas, así que deben existir otros mecanismos todavía desconocidos que permitan que Ski y SnoN sean proteínas tan estables en los hepatomas.

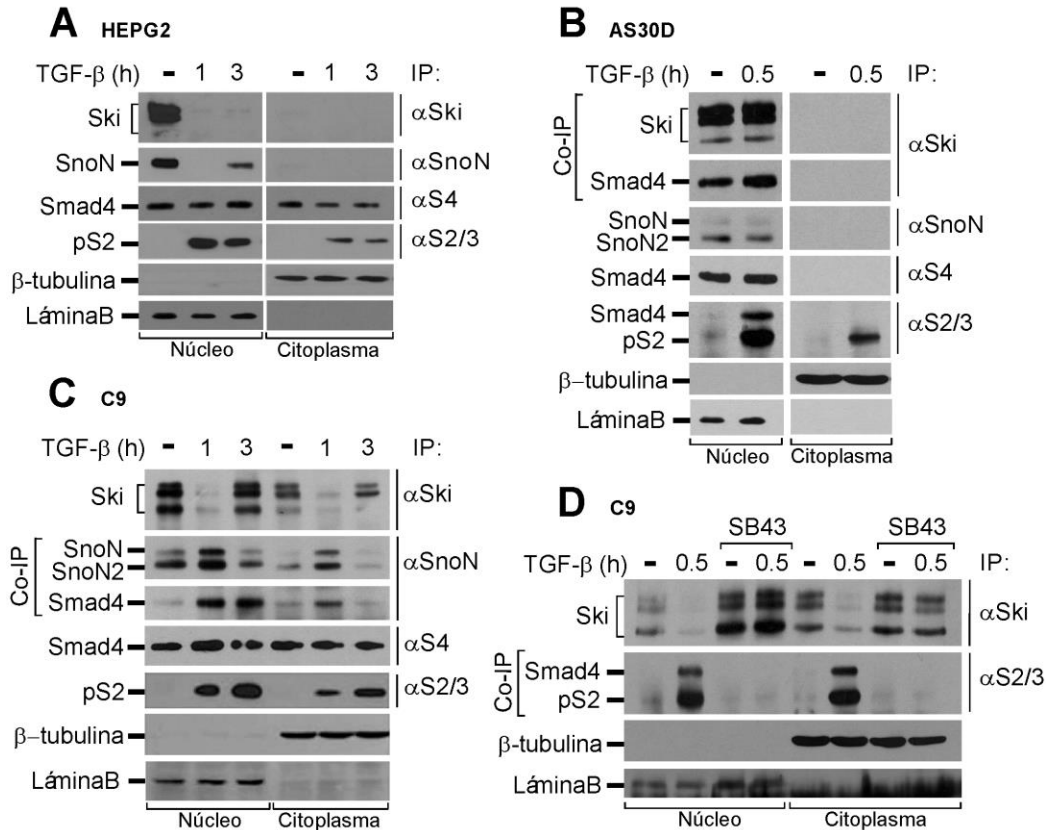


FIGURA 5. Ski y SnoN muestran una diferente localización subcelular en hepatocitos normales y hepatocarcinoma.

Las células (A) HepG2, (B) AS30D y (C) C9 se trataron con 0.3nM TGF- β 1 por los tiempos indicados. Después de realizar un fraccionamiento celular (núcleo/citoplasma), se detectaron los niveles proteicos de Ski, SnoN/SnoN2, Smad4 y pSmad2 (pS2) por IP/WB. En algunos casos también se analizó la co-inmunoprecipitación (Co-IP) de Ski y SnoN con Smad4. (D) Las células C9 se pre-trataron o no con 10 μ M de SB431542 (SB43, inhibidor del receptor T β RI) por 40 min, y se estimularon posteriormente con 0.3nM de TGF- β 1 por 0.5h. Después de realizar el fraccionamiento celular, los niveles proteicos de Ski, SnoN/SnoN2, Smad4 y Smad2/3 se analizaron por IP/WB. En algunos casos se detectó la co-inmunoprecipitación (Co-IP) con Smad4. β -tubulina y LáminaB se usaron como marcadores específicos de citoplasma y núcleo, respectivamente. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos individuales.

E. Ski y SnoN son proteínas muy estables en hepatocarcinoma pero tienen una vida media muy corta en hepatocitos normales: la inhibición de la síntesis de proteína modula los niveles de Ski y SnoN únicamente en hepatocitos normales.

Dado que la estabilidad de Ski y SnoN no parece depender de su localización subcelular, decidimos evaluar la vida media de ambas proteínas usando el fármaco cicloheximida (CHX). CHX es un inhibidor de la síntesis de proteínas producido por la bacteria *Streptomyces griseus*, y ejerce su efecto interfiriendo con el paso de la translocación, el movimiento de las dos moléculas de tRNA y el mRNA en relación con el ribosoma, bloqueando de esta forma la fase de elongación durante la traducción.

Al tratar las células de hepatoma con CHX (Figura 6A y B) por diferentes tiempos, no observamos ningún efecto en la estabilidad de Ski y SnoN, sin embargo los hepatocitos normales C9 resultaron ser extremadamente sensibles tanto al tratamiento con CHX (Figura 6C): los niveles de Ski y SnoN disminuyeron muy rápidamente, desde los 15 min post-tratamiento. El tratamiento con CHX no afectó los niveles proteicos del control de carga β -tubulina, por lo que Ski y SnoN específicamente parecen ser muy sensibles a CHX. También demostramos que la degradación de los co-represores inducida por CHX no está causada por un cambio en los niveles de mRNA (Figura 6F).

Aun así fue interesante notar que, tanto en hepatoma como en hepatocitos normales, la recuperación de Ski y de SnoN después de la degradación inducida por el tratamiento con TGF- β , es dependiente de síntesis *de novo* de proteína: la recuperación tardía de Ski en HepG2 que se da hasta las 24 h post-tratamiento, cuando las Smads dejan de estar activas, es dependiente de síntesis *de novo* porque se bloquea cuando las células son

incubadas con CHX (Figura 6D). Lo mismo sucede en los hepatocitos normales C9: la rápida recuperación de Ski y SnoN a las 2 h también depende de síntesis *de novo*, pues el pre-tratamiento con CHX impide su recuperación (Figura 6E).

Así, los datos demuestran que Ski y SnoN son proteínas muy estables y con un recambio muy lento en HCC, mientras que son proteínas de vida media muy corta, muy inestables y con un alto recambio en hepatocitos normales. Esto sugiere que las células normales poseen numerosos mecanismos, desconocidos hasta la fecha, capaces de regular la estabilidad de Ski y SnoN. Estos mecanismos se han perdido en las células de hepatoma, hecho que explica los elevados niveles proteicos de los dos co-represores.

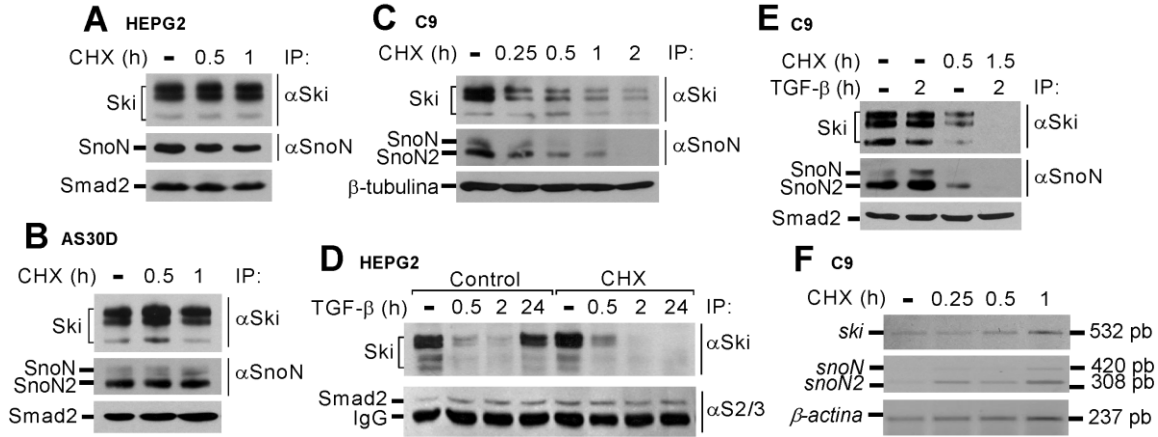


FIGURA 6. Exclusivamente en hepatocitos normales, las proteínas Ski y SnoN tienen una vida muy corta, y son muy sensibles a inhibidores de la traducción como la cicloheximida.

Los hepatomas (A) HepG2 y (B) AS30D y los hepatocitos normales (C) C9 se estimularon o no con 20 μ g/ml de cicloheximida (CHX, inhibidor de la síntesis de proteínas) por los tiempos indicados. (D) Las células transformadas HepG2 se pre-trataron o no con 20 μ g/ml de CHX y se estimularon posteriormente con 0.3nM de TGF- β 1 por diferentes tiempos. (E) Los hepatocitos normales C9 se pre-trataron o no con 20 μ g/ml de CHX por 0.5 y 1.5 h, y se estimularon posteriormente con 0.3nM de TGF- β 1 por 2 h. En todos los casos (A-E) se analizaron los niveles proteicos de Ski y SnoN/SnoN2 por IP/WB, y se usaron 80 μ g de extractos totales para detectar a Smad2 o a β -tubulina como control de carga. (F) Los hepatocitos normales C9 se trataron o no (-) con 20 μ g/ml de de CHX por los tiempos indicados. Se detectaron los niveles de mRNA de ski, snoN/snoN2 y β -actina por RT-PCR. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

F. Ski y SnoN son proteínas muy estables en hepatocarcinoma pero tienen una vida media muy corta en hepatocitos normales: la inhibición de la transcripción también modula los niveles de Ski y SnoN únicamente en hepatocitos normales.

Decidimos seguir evaluando la vida media de Ski y SnoN ahora haciendo uso de actinomicina D (ActD), inhibidor de la transcripción. ActD, también es un antibiótico producido por las bacterias del género *Streptomyces*, y es un potente inhibidor de la transcripción, pues se une al DNA en el complejo de inicio de la transcripción, impidiendo la elongación por la RNA polimerasa. El tratamiento con ActD no tuvo ningún efecto en las células de hepatoma (Figura 7A y B). También demostramos que la degradación de Ski y SnoN inducida por ActD en hepatocitos normales no está asociada con un cambio en los niveles de mRNA (Figura 7D), sino que se restringe a una regulación de la estabilidad proteica.

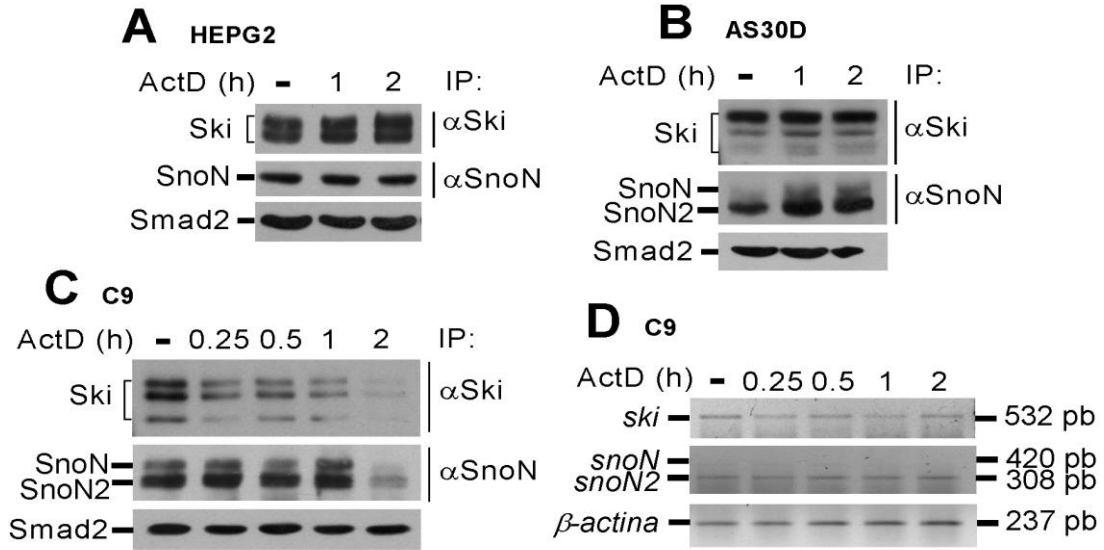


FIGURA 7. Exclusivamente en hepatocitos normales, las proteínas Ski y SnoN son poco estables y altamente sensibles a inhibidores de la transcripción como la actinomicina D.

Los hepatomas (A) HepG2 y (B) AS30D y los hepatocitos normales (C) C9 se estimularon o no con 5µg/ml de actinomicina D (ActD, inhibidor de la transcripción) por los tiempos indicados. En todos los casos (A-C) se analizaron los niveles proteicos de Ski y SnoN/SnoN2 por IP/WB, y se emplearon 80µg de extractos totales para detectar a Smad2 como control de carga. (D) Los hepatocitos normales C9 se trataron o no (-) con 5µg/ml de ActD por los tiempos indicados. Se detectaron los niveles de mRNA de ski, snoN/snoN2 y β-actina por RT-PCR. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

G. La adhesión celular regula la estabilidad proteica de Ski y SnoN en hepatocitos normales pero no en hepatocarcinoma.

Hasta la fecha, el regulador más conocido de los niveles de Ski y SnoN es TGF- β . Pero el hecho de que hayamos descubierto que en hepatocitos normales Ski y SnoN se expresan en bajos niveles, se localicen en núcleo y citoplasma, y tengan una vida media muy corta siendo muy susceptibles a la degradación, nos hizo pensar que otras vías diferentes al TGF- β podrían estar regulando la estabilidad de los dos co-represores, exclusivamente en células normales. Nos dimos a la tarea de probar numerosos inhibidores farmacológicos y hormonas, observando que numerosos estímulos eran efectivamente capaces de modular dinámicamente los niveles proteicos de Ski y SnoN. El denominador común entre todos los fármacos y hormonas probados resultó ser cualquier modificación en la adhesión celular y del citoesqueleto de actina: todos los estímulos probados eran capaces de modularlo de alguna forma. Por ello, razonamos que Ski y SnoN podrían ser regulados por cambios en la adhesión celular y el citoesqueleto.

En el reporte de Vázquez-Victorio *et al.* (2015), nuestro grupo describió la regulación de Ski por cambios en el citoesqueleto de actina en hepatocitos no transformados: mientras que las señales inducidas por la activación de GPCRs (receptores acoplados a proteínas G) por la vía de Rho y la polimerización de actina degradan a Ski, las señales inducidas por la activación de GPCRs por la vía de AMP cíclico y la despolimerización de actina tienden a estabilizar a Ski. Este importante antecedente nos llevó a analizar si los cambios en el citoesqueleto eran capaces de modular igualmente a Ski que a SnoN, tanto en hepatocitos normales como en HCC.

Para esto, la primera aproximación que tomamos fue modular las uniones célula-célula y la adhesión celular mediante el tratamiento con el quelante de calcio EGTA. Las uniones célula-célula y la adhesión celular son procesos dependientes de calcio, por lo que el EGTA resulta ser un tratamiento efectivo para interferir con dichos procesos fisiológicos. Cuando tratamos las células cancerosas HepG2 y AS30D con 1mM EGTA, observamos que EGTA no tuvo ningún efecto en la estabilidad de Ski y SnoN (Figura 8A, paneles superior y medio) por lo que claramente Ski y SnoN son insensibles a cambios en la adhesión celular en hepatocarcinoma. Interesantemente, el mismo tratamiento con EGTA causó una dramática reducción en los niveles proteicos de Ski y SnoN en hepatocitos normales (Figura 8A, panel inferior). Interesantemente, EGTA no indujo la activación de la vía del TGF- β porque no favoreció la aparición de formas fosforiladas de Smads (Figura 8A, panel inferior): así, el mecanismo mediante el cual EGTA induce la degradación de Ski y SnoN no parece involucrar a la vía del TGF- β . El efecto de EGTA también se analizó por medio de una inmunofluorescencia en la cual se aprecia la depleción de Ski en núcleo y citoplasma así como los cambios en las fibras de actina ante el estímulo de EGTA en células C9 (Figura 8B). Así, los cambios en la adhesión celular tienen un efecto muy fuerte sobre Ski y SnoN, solamente en hepatocitos normales, llevando a la degradación de ambos co-factores.

A continuación decidimos caracterizar más a fondo los efectos de EGTA en los hepatocitos C9. Descubrimos que EGTA induce una degradación de Ski y SnoN dependiente del proteosoma, puesto que el inhibidor del proteosoma MG132 bloqueó el efecto del quelante de calcio (Figura 8C). Aunque proponemos que el mecanismo de degradación de EGTA sobre Ski y SnoN no utiliza a las Smads activadas (Figura 8A), de

manera interesante, al tratar las células con SB43, el inhibidor del T β RI, apreciamos un bloqueo en la degradación de Ski y SnoN por EGTA, sugiriendo que este mecanismo depende en algún nivel de la señal del TGF- β (Figura 8D). Independientemente de los elementos de la vía del TGF- β que necesite EGTA para mediar la degradación de los co-represores, comprobamos que la degradación es dependiente del sistema ubiquitina/proteosoma.

Finalmente quisimos evaluar el efecto de la depleción de Ski y SnoN por el tratamiento con EGTA en la formación de los complejos Smad2/3/4, que son los complejos clave que permiten la respuesta celular al estímulo de TGF- β . Aunque Ski y SnoN presentes en la fracción citoplasmática no demostraron interferir con la translocación nuclear de pSmad2 (Figura 5C), pensamos que podrían entonces interferir con la translocación de Smad4, dificultando así la formación de los complejos pSmad2/Smad4 y la transcripción de genes blanco de las Smads. Los experimentos de fraccionamiento celular revelaron que la depleción de Ski y SnoN inducida por EGTA no afecta los niveles de Smad4, su localización nuclear, ni la formación de los complejos Smad4/pSmad2 ante el estímulo de TGF- β (Figura 8E).

El análisis detallado de los datos obtenidos en las Figura 7 reveló que, de manera muy interesante, los efectos de EGTA sobre la estabilidad de Ski y SnoN son muy similares a los efectos de CHX (ver Figura 6): ambos estímulos regulan de la misma forma a los dos co-represores, causando una fuerte degradación de ambas proteínas a tiempos muy cortos (Figura 6C y Figura 8A, panel inferior). Esta observación nos llevó a revisar los datos bibliográficos hasta encontrar varios reportes que demuestran la

inhibición de la síntesis de proteína por depleción de calcio extracelular en hepatocitos (Barrit et al., 2008; Brostrom et al., 1986).

Esto da pie a pensar que el tratamiento con EGTA, más que controlar a Ski y SnoN por cambios en la adhesión celular, podría estar interfiriendo con la síntesis *de novo* de las dos proteínas, proceso que ya hemos documentado es de suma importancia para mantener los niveles de los dos co-represores en la célula.

Así, los datos obtenidos en hepatocitos normales indican que la inhibición del recambio de proteínas y los cambios en las interacciones célula/célula son potentes reguladores de la estabilidad de Ski y SnoN, aunque los mecanismos finos de esta regulación permanecen desconocidos, así como las causas por las que dichos mecanismos se encuentran ausentes en células de hepatocarcinoma.

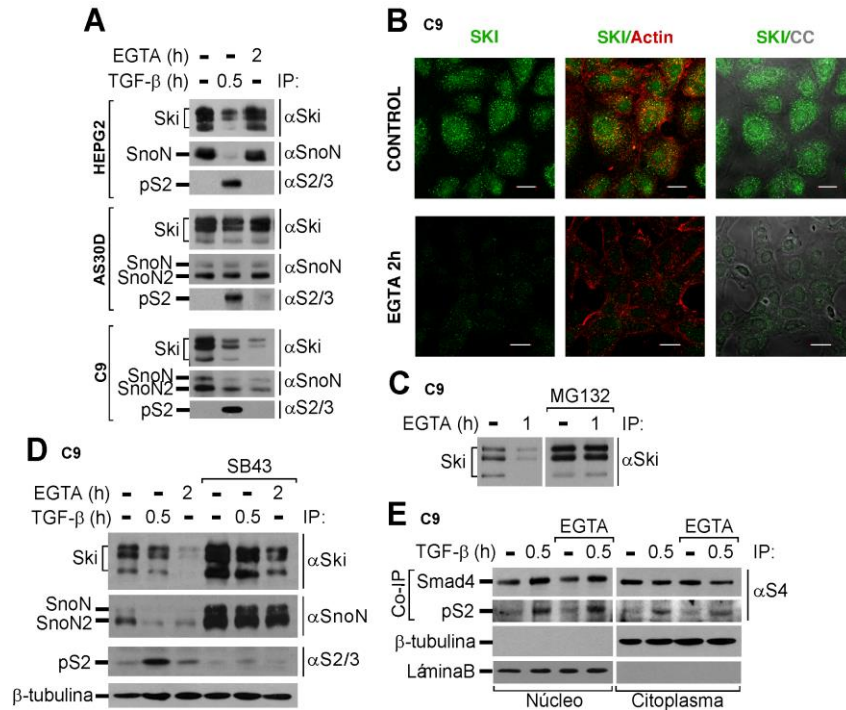


FIGURA 8. Alteraciones en la adhesión celular y en la síntesis de proteína controlan la estabilidad de Ski y SnoN en hepatocitos normales.

(A) Los hepatocitos transformados HepG2 (panel superior) y AS30D (panel medio) y los hepatocitos normales C9 (panel inferior) se trataron o no (-) con 0.3nM de TGF-β1 por 0.5 h o con 1mM de EGTA por 2 h. Se analizaron los niveles proteicos de Ski, SnoN/SnoN2 y pS2 por IP/WB. (B) Los hepatocitos C9 se pre-trataron o no (Control) con 1mM de EGTA por 2 h. Se detectaron las proteínas Ski (verde) y Actina (rojo) por inmunofluorescencia. (C) Las células C9 se incubaron 1 h con el inhibidor del proteosoma MG132 (25μM) y se trataron o no (-) con 1mM de EGTA por 1 h. Los niveles proteicos de Ski se evaluaron por IP/WB. (D) Las células C9 se pre-incubaron o no con 10μM de SB431542 (SB42) por 40 min y se estimularon o no (-) con 0.3nM de TGF-β1 por 0.5 h, o con 1mM de EGTA por 2 h. Se detectaron los niveles proteicos de Ski, SnoN/SnoN2 y pS2 por IP/WB. β-tubulina se detectó a partir de 80μg de extractos totales. (E) Los hepatocitos C9 se pre-trataron o no con 1mM de EGTA por 2 h, y fueron estimulados posteriormente con 0.3nM de TGF-β1. Los niveles proteicos de Smad4 se analizaron por IP/WB. Por co-inmunoprecipitación (Co-IP) también se detectó el complejo Smad4/pSmad2.

H. Los cambios en el citoesqueleto de actina regulan diferencialmente la estabilidad proteica de Ski y SnoN exclusivamente en hepatocitos normales.

Como segunda aproximación, decidimos provocar cambios en el citoesqueleto de actina, para determinar si esto también tiene la capacidad de afectar los niveles de Ski y SnoN en hepatocitos normales y HCC. Para ello utilizamos primeramente la citocalasina D (CytD), un potente inhibidor de la polimerización de actina. Es preciso mencionar que la inhibición de la polimerización y elongación de las fibras de actina repercute en la morfología celular y en procesos fisiológicos tan importantes como la división celular. El tratamiento con CytD no tuvo efecto alguno sobre la estabilidad de los co-represores en las células de hepatoma (Figura 9A, paneles superior y medio), pero para nuestra sorpresa tuvo un efecto diferencial sobre la estabilidad de Ski y SnoN en hepatocitos normales, por un lado provocando una fuerte y rápida degradación de Ski, y por otro lado estabilizando importantemente a SnoN (Figura 9A, panel inferior). CytD, al igual que EGTA, tampoco activa la vía de TGF- β porque no induce la aparición de formas fosforiladas de Smad2 (datos no mostrados). Estos datos apoyan nuevamente la idea de que Ski y SnoN son proteínas muy sensibles a la degradación en hepatocitos normales y son proteínas extremadamente estables en HCC.

Importantemente, determinamos que el incremento significativo de SnoN por CytD no se debe a un aumento en la transcripción del gen, sino que se limita a un incremento en la estabilidad proteica de SnoN (Figura 9B). De manera interesante, hasta ahora hemos encontrado que los numerosos estímulos que modulan a Ski y SnoN en hepatocitos normales, lo hacen a nivel de la estabilidad de proteína y no a nivel

transcripcional. Contrariamente al efecto del EGTA, el mecanismo empleado por CytD para modular diferencialmente los niveles de Ski y SnoN parece ser totalmente independiente de las Smads porque el pre-tratamiento con SB43 no potenció ni interfirió con el efecto de CytD (Figura 9C).

El hecho de que los rearrreglos en el citoesqueleto parecen controlar diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN nos llevó a analizar el efecto de otros moduladores de la polimerización de actina como latrunculina B (LatB, inhibidor de la polimerización de actina), jasplakinolida (Jasp, inductor de la polimerización de actina) y colchicina (Colch, inhibidor de la polimerización de microtúbulos). Comprobamos nuevamente que estos moduladores del citoesqueleto afectan la estabilidad de Ski y SnoN, sin provocar cambios en la estabilidad de Smad2 (Figura 9D). Mientras que Jasp modula diferencialmente a Ski y SnoN, bajando los niveles del primero y subiendo los del segundo, LatB y Colch regulan preferencialmente a Ski aumentando o decrementando, respectivamente, sus niveles proteicos.

Razonamos a continuación, que la mejor manera de demostrar que los cambios en el citoesqueleto y la adhesión celular modulan a Ski y a SnoN, era usando un modelo fisiológico donde se dieran de manera normal estos fenómenos, evitando así el uso de cualquier fármaco. Para ello utilizamos un modelo de células adherentes y células en suspensión (Figura 9E), en el cual analizamos los niveles proteicos de nuestras dos proteínas de interés. Las células adherentes fueron cultivos primarios de rata mantenidos en cajas Petri previamente tratadas con colágena tipo I para permitir la correcta adhesión de los hepatocitos. Las células en suspensión fueron hepatocitos recién aislados de rata mantenidos en suspensión por menos de dos horas a 37°C (5% CO₂). Las células se

trataron o no con TGF- β por 0.5 h con el fin de analizar la degradación inducida por la citocina. Los datos muestran que efectivamente Ski y SnoN se modulan de manera diferencial ante cambios en la adhesión celular y rearrreglos del citoesqueleto: Ski resultó ser más abundante en los hepatocitos en suspensión (HS) comparado con los hepatocitos adherentes (HC), además, en los HS la proteína Ski mostró ser más resistente a la degradación por TGF- β . De manera contraria, SnoN se detectó en mayores niveles en los hepatocitos adherentes (HC) comparado con su contraparte en suspensión (HS) (Figura 9E). Estos datos demuestran que los rearrreglos en el citoesqueleto controlan diferencialmente los niveles de Ski y SnoN de manera fisiológica, sugiriendo que bajo ciertas condiciones específicas del organismo Ski y SnoN podrían regularse por este mecanismo.

Importantemente los rearrreglos citoesqueléticos modulan diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN, lo cual es muy interesante puesto que se suele pensar que Ski y SnoN se comportan de igual forma dada su estrecha similitud estructural. Esto da pie a pensar que los numerosos procesos fisiológicos que modulan el citoesqueleto de manera normal tendrán una repercusión en la respuesta a la señal del TGF- β al modular diferencialmente a sus antagonistas. También queda claro que estos mecanismos de regulación de Ski y SnoN están totalmente perdidos en HCC, hecho que refuerza la idea de que las células cancerosas se vuelven insensibles a algunas señales de su entorno.

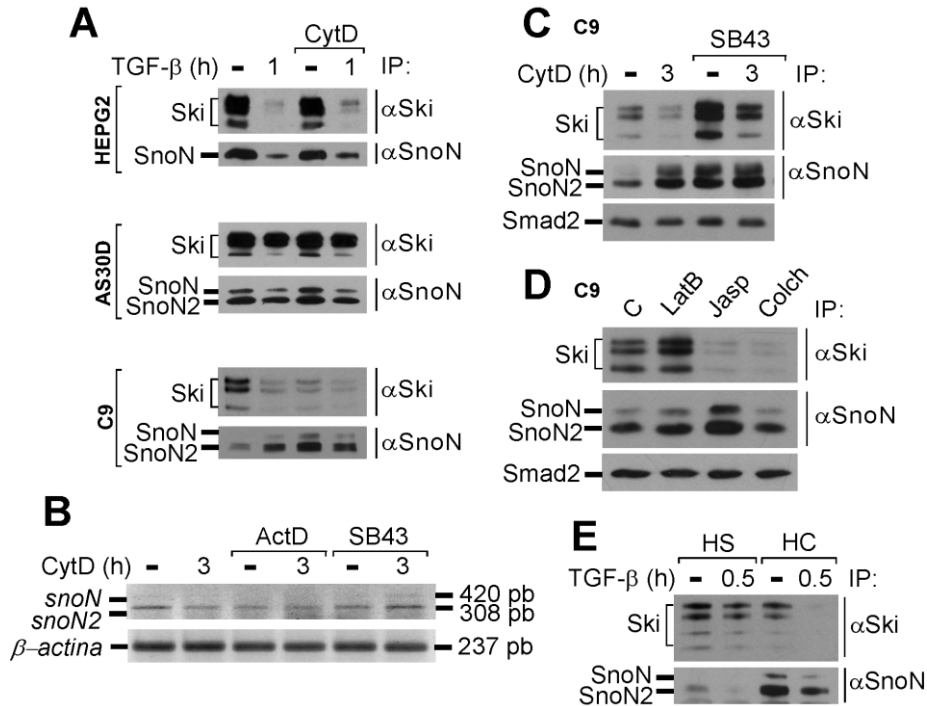


FIGURA 9. Los cambios en el citoesqueleto de actina regulan diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN exclusivamente en hepatocitos normales.

(A) Las células HepG2, AS30D y C9 se pre-trataron o no con $5\mu\text{M}$ de citocalasina D (CytD, inhibidor de la dinámica del citoesqueleto de actina) por 3 h para inducir rearrreglos del citoesqueleto. Posteriormente se retó con 0.3nM de TGF- β 1 por 1 h. Los niveles proteicos de Ski y SnoN se detectaron por IP/WB. (B) Los hepatocitos C9 se pre-incubaron con $5\mu\text{g/ml}$ de ActD o con $10\mu\text{M}$ SB43 (inhibidor del T β RI) por 40 min y se estimularon con $5\mu\text{M}$ de CytD por 3 h. Los niveles de mRNA de snoN/snoN2 se analizaron por RT-PCR usando los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 2 (Apéndice). (C) Las células C9 se pre-trataron o no con $10\mu\text{M}$ de SB43 por 40 min y se estimularon con $5\mu\text{M}$ de CytD por 3 h. (D) Las células C9 se trataron o no con $1\mu\text{M}$ de latrunculina B (LatB), $1\mu\text{M}$ de jasplakinolida (Jasp), o $15\mu\text{M}$ colchicina (Colch) por 4 h. (C y D) Los niveles proteicos de Ski y SnoN/SnoN2 se analizaron por IP/WB. Se usaron $80\mu\text{g}$ de extractos totales para detectar a Smad2. (E) Hepatocitos de rata en suspensión (HS, hepatocitos recién aislados) o adherentes (HC, hepatocitos en cultivo) se trataron o no con 0.3nM de TGF- β 1 por 0.5 h. Los niveles de Ski y SnoN/SnoN2 se analizaron por IP/WB. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

I. La depleción de ambos co-represores Ski y SnoN afecta la cinética de la transcripción dependiente de TGF β /Smads.

Ski y SnoN son los co-represores más conocidos de la señal del TGF- β , así, es lógico pensar que cualquier cambio en sus niveles proteicos dentro de la célula tendrá un impacto sobre la transcripción de genes dependiente de TGF- β /Smads. Al descubrir que los cambios en el citoesqueleto regulan dinámicamente tanto a Ski como a SnoN en hepatocitos normales, razonamos que dichos rearrreglos podrían afectar la regulación genética dependiente de TGF- β .

Para probar esta hipótesis decidimos inducir la degradación de ambos co-represores (mediante el tratamiento con EGTA) o provocar la degradación de solo uno de los antagonistas (mediante los tratamientos con CytD o Jasp). Esto nos generaría dos condiciones de estudio interesantes: una condición en la que la célula se encuentra libre de los antagonistas y una condición en la que solamente está presente uno de los dos represores de la señal del TGF- β . De esta forma, podríamos determinar la relevancia de los niveles proteicos de Ski y SnoN en el patrón de expresión dependiente de TGF- β . Para esto, pre-tratamos las células C9 con EGTA, CytD o Jasp para modular los niveles de Ski y SnoN, y luego retamos con TGF- β por los tiempos indicados para eventualmente analizar por RT-PCR la expresión de los genes blanco de las Smads (en este caso *smad7* y *snoN/snoN2*) (Figura 10). Al pre-tratar las células con EGTA constatamos que el patrón de expresión genética inducido por TGF- β , cambió de un patrón transitorio (con pico de expresión a 1 h post-tratamiento) a una activación transcripcional sostenida que duró hasta 3 h post-tratamiento (Figura 10A y B). Inmediatamente razonamos que al darse una

completa degradación de ambos Ski y SnoN con EGTA, las células estarían libres de cualquier antagonista, por lo que la señal del TGF- β no tendría ningún asa de retroalimentación negativa para apagar la señal.

De manera opuesta, el patrón transitorio de expresión de *smad7* y *snoN/snoN2* se conservó en las células pre-tratadas con CytD o Jasp (Figura 10C, 10D, 10E y 10F). Creemos que esto se explica porque estos pre-tratamientos solo causan la degradación de uno de los co-represores (Ski) mientras que causan un aumento del otro (SnoN), provocando que la célula siempre tenga a uno de los antagonistas para apagar la señal del TGF- β mediante un asa de retroalimentación negativa que pone fin a la inducción transcripcional mediada por las Smads.

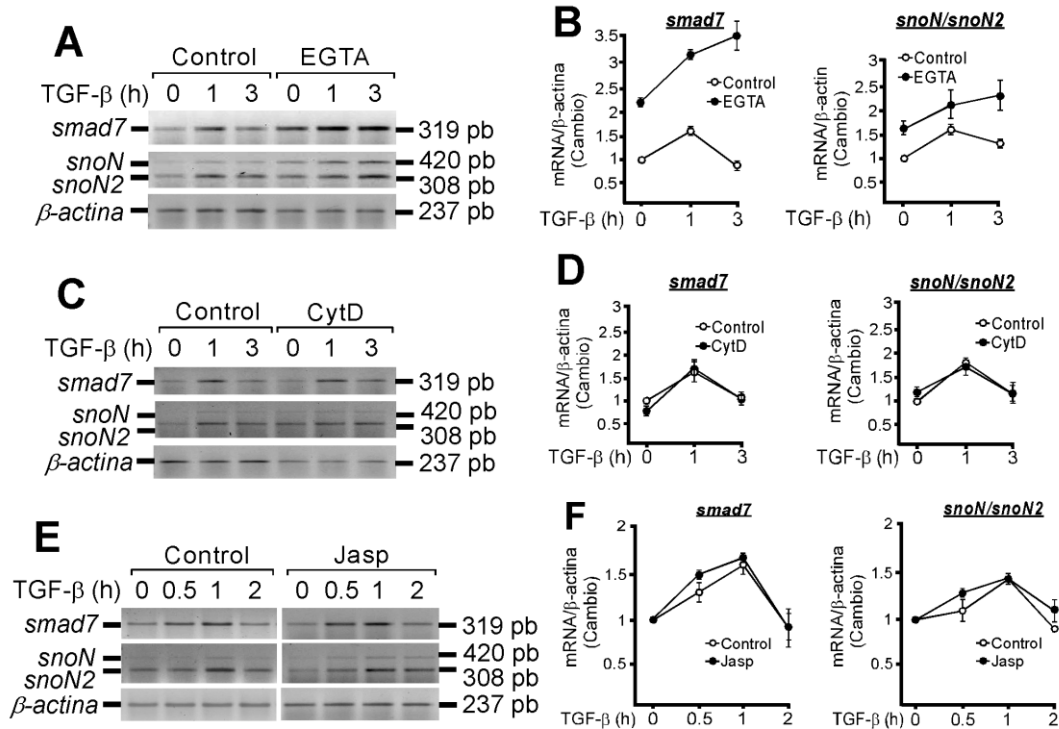


FIGURA 10. La depleción de ambos co-represores Ski y SnoN afecta la cinética transcripcional dependiente de TGF- β /Smads.

(A, C, E) Los hepatocitos normales C9 se pre-trataron o no con (A) 1mM de EGTA por 2 h, con (C) 5 μ M de citocalasina D (CytD) por 3 h o con (E) 1 μ M de jasplakinolida (Jasp) por 2 h, y fueron posteriormente estimulados con 0.3nM de TGF- β 1 por los tiempos indicados. Se muestran las RT-PCR representativas. (B, D, F) Las gráficas muestran el análisis densitométrico de los niveles de mRNA de *smad7*, *snoN/snoN2* como cambio sobre el basal (Control, puntos blancos; pre-tratamiento con EGTA, CytD o Jasp, puntos negros). Los datos están representados como la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Al recordar que los efectos del EGTA sobre la estabilidad de Ski y SnoN eran similares a los de CHX en el caso de los hepatocitos normales, decidimos realizar el mismo experimento de RT-PCR efectuado en la Figura 10, pre-tratando las células C9 con el inhibidor de la síntesis de proteína, CHX. Interesantemente, el pre-tratamiento con CHX tuvo, una vez más, un efecto muy similar al de EGTA sobre el patrón de transcripción inducido por TGF- β (Figura 11), favoreciendo una transcripción sostenida por varias horas, y reforzando la idea que tanto EGTA como CHX afectan directamente el patrón de expresión genética de los genes responsivos de la vía TGF- β /Smads por interferir con el proceso de recambio de proteínas.

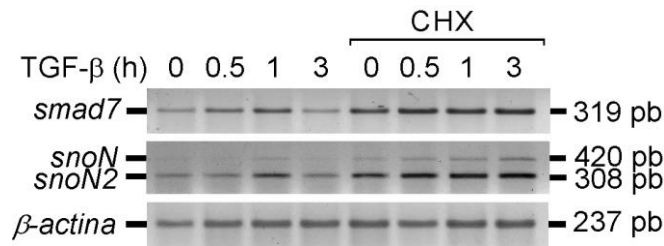


FIGURA 11. La depleción de ambos co-represores Ski y SnoN por la inhibición de la síntesis de proteína afecta la cinética del programa transcripcional dependiente de TGF- β /Smads.

Los hepatocitos normales C9 se pre-incubaron con 20 μ g/ml de CHX por 30 min y se estimularon posteriormente con 0.3nM de TGF- β 1 por los tiempos indicados. Los niveles de mRNA de smad7, snoN/snoN2 y β -actina se analizaron por RT-PCR usando los oligonucleótidos específicos enlistados en la Tabla 1 (Apéndice).

En conclusión, estos datos nos indican que los rearrreglos en el citoesqueleto, aunque son potentes reguladores de la estabilidad proteica de Ski y SnoN en hepatocitos normales, modulan de manera opuesta los niveles de Ski y SnoN, provocando que la célula siempre tenga a uno u otro co-represor, y no causan en realidad una alteración en los patrones transcripcionales inducidos por la señal del TGF- β . Sin embargo, el uso de moduladores que causan una interferencia en los procesos de recambio de proteínas, parecen afectar por igual a ambos co-represores provocando su degradación, y causan profundas alteraciones en la transcripción dependiente de la citocina.

J. El recambio de Ski y SnoN es crítico para su posicionamiento sobre los promotores de genes responsivos a TGF- β /Smads.

Por antecedentes bibliográficos y de nuestro laboratorio, sabemos que Ski y SnoN pueden regular la expresión de los genes *smad7* y *sno* (Denissova et al., 2004, Briones-Orta et al., 2006 y Tecalco-Cruz et al., 2012). De hecho son los únicos dos genes para los que se tiene caracterizado el mecanismo represor de Ski y SnoN, a pesar de la gran cantidad de genes que se sabe son controlados por la señal de TGF- β .

Al saber que los co-represores Ski y SnoN participan en el asa de retroalimentación negativa que controla la duración de la expresión de los genes blanco de las Smads y al describir que la modulación de la estabilidad proteica de Ski y SnoN puede afectar la cinética de transcripción dependiente de TGF- β (Figuras 10 y 11), resultó lógico pensar que Ski y SnoN son directamente responsables de los cambios en la cinética de expresión

de genes regulados por la citocina. Razonamos que el uso de un iRNA (RNA de interferencia) para abatir los niveles de Ski o SnoN sería un método correcto para probar esta hipótesis. Así, empleamos el plásmido pRS/shSnoN/pEGFP (previamente probado por nuestro laboratorio en otras líneas celulares tumorales de humano) para expresar un RNA capaz de abatir los niveles de SnoN. Transfectamos las células C9 con el plásmido, y después de comprobar la transfección exitosa por microscopía, descubrimos que los niveles de SnoN se abatían exitosamente en diferentes líneas celulares (e.g, AD293), pero nunca se modificaban en las células C9, la línea de nuestro interés. Después de numerosos intentos y modificaciones a la técnica de transfección, concluimos que, aunque sí se transfectan, las células normales (como nuestro modelo C9) pueden tener mecanismos para inactivar la expresión de los iRNA.

Por tanto tuvimos que idear otra forma de demostrar que Ski y SnoN están directamente involucrados en el asa de retroalimentación negativa que apaga la transcripción de los genes responsivos a TGF- β . La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) pareció ser una muy buena alternativa pues es una técnica que permite detectar la unión de factores a una región específica del DNA.

Así, decidimos evaluar si los cambios en los niveles proteicos de Ski y SnoN provocados por los pre-tratamientos con EGTA o los moduladores del citoesqueleto (CytD, Jasp), afectan directamente el posicionamiento de los co-represores sobre los promotores de los genes blanco de la citocina. Para ello, primeramente caracterizamos a nivel de proteína el efecto de EGTA y Jasp: realizamos un experimento de IP/WB en el cual las células C9 fueron pre-tratadas con EGTA o Jasp (para modular los niveles de Ski y SnoN) y tratadas posteriormente con TGF- β por 0.5 y 2 h (Figura 12A). De esta forma mostramos que el

pre-tratamiento con EGTA induce una fuerte y sostenida degradación de SnoN, interfiriendo con la inducción de SnoN por TGF- β a las 2 h de tratamiento y con la formación de complejos SnoN/Smad4 (Figura 12A, carriles 4 a 6). Esto sugiere que la degradación por EGTA es más fuerte que la inducción transcripcional de SnoN por TGF- β , lo cual lleva a que los niveles proteicos de SnoN permanezcan indetectables mientras que EGTA se encuentre presente; además refuerza la idea de que EGTA inhibe la síntesis *de novo* de proteínas. El pre-tratamiento con Jasp causó un aumento en los niveles de SnoN, pero no interfirió con la degradación (0.5 h) ni con la inducción (2 h) de SnoN por TGF- β , y tampoco con la interacción de SnoN con Smad4 (Figura 12A, carriles 7 a 9). Adicionalmente, determinamos que la fosforilación de Smad2 y la formación de los complejos Smad2/Smad4 promovidos por el estímulo de TGF- β , no se ven afectados por EGTA o Jasp.

Bajo las mismas condiciones experimentales, analizamos entonces la unión de las proteínas endógenas Ski, SnoN, Smad2/3 y Smad4 a la región SBE del promotor de *smad7*, mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (Figura 12B). Tal y como lo esperábamos, una estimulación de 0.5 h con TGF- β provocó un decremento en la unión de Ski y SnoN al promotor de *smad7* en la condición control y con el pre-tratamiento con Jasp, induciendo simultáneamente la unión de Smad2/3 al promotor génico (Figura 12A, carriles 2 y 8). La unión de Smad2/3 y el decremento de Ski y SnoN explican la correcta inducción del gen de *smad7* desde la media hora de tratamiento con la citocina (ver Figura 2). Interesantemente, el pre-tratamiento con EGTA, causante de la reducción drástica en los niveles proteicos de Ski y SnoN, provocó que dichos co-represores unieran muy pobremente la región promotora de *smad7*,

induciendo simultáneamente la unión de las Smad2/3 (Figura 12B, carriles 4 a 6). De manera interesante, la unión de las Smad2/3 al promotor de *smad7* se mantuvo hasta 2 h después del estímulo de TGF- β en presencia de EGTA y Jasp (Figura 12A, carriles 6 y 9). El carril 6 de la Figura 12B demuestra que la poca unión de Ski y SnoN al promotor de *smad7* en presencia de EGTA puede ser el mecanismo responsable por la activación transcripcional sostenida de los genes blanco de TGF- β en presencia de EGTA (ver Figura 10A): al estar tan bajos los niveles de Ski y SnoN, éstos no logran re-posicionarse en el promotor para ejercer el asa de retroalimentación negativa y apagar así la expresión de los genes blanco de la citocina.

En conjunto, estos datos demuestran que la cinética transcripcional del gen blanco de TGF- β *smad7*, se modifica cuando ambos co-represores Ski y SnoN son desestabilizados; cuando solamente se altera la estabilidad de uno de ellos no hay consecuencias sobre la transcripción dependiente de TGF- β /Smads.

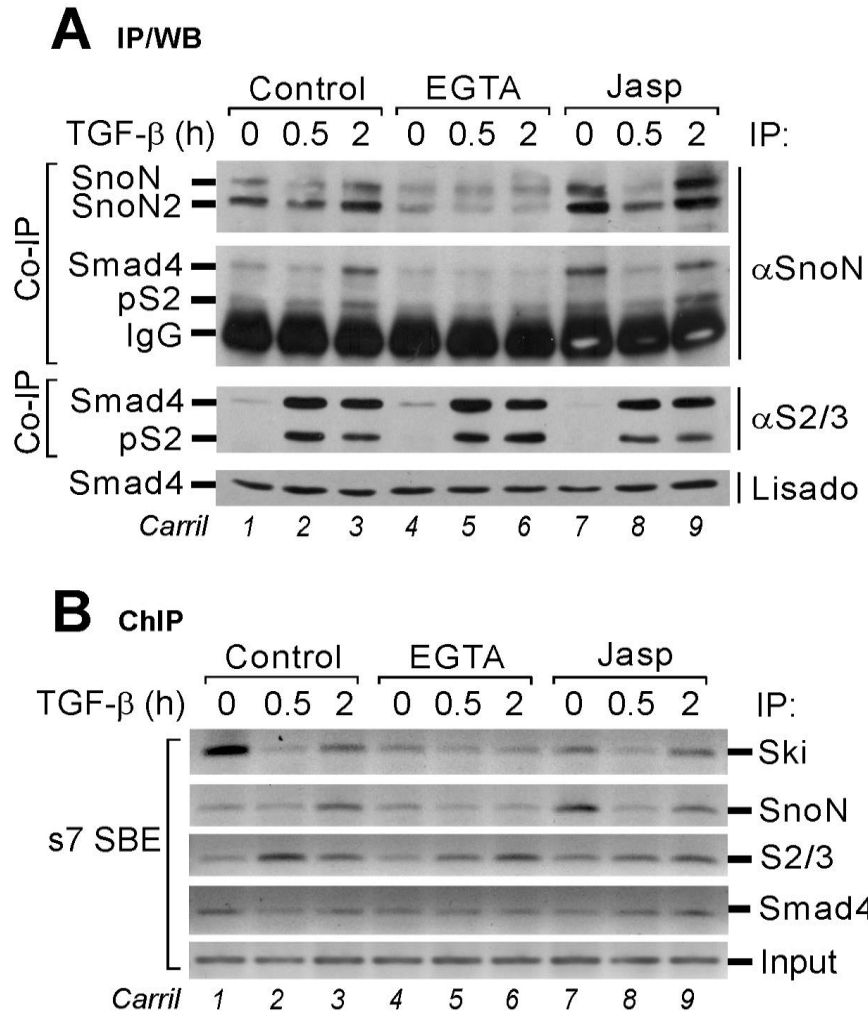


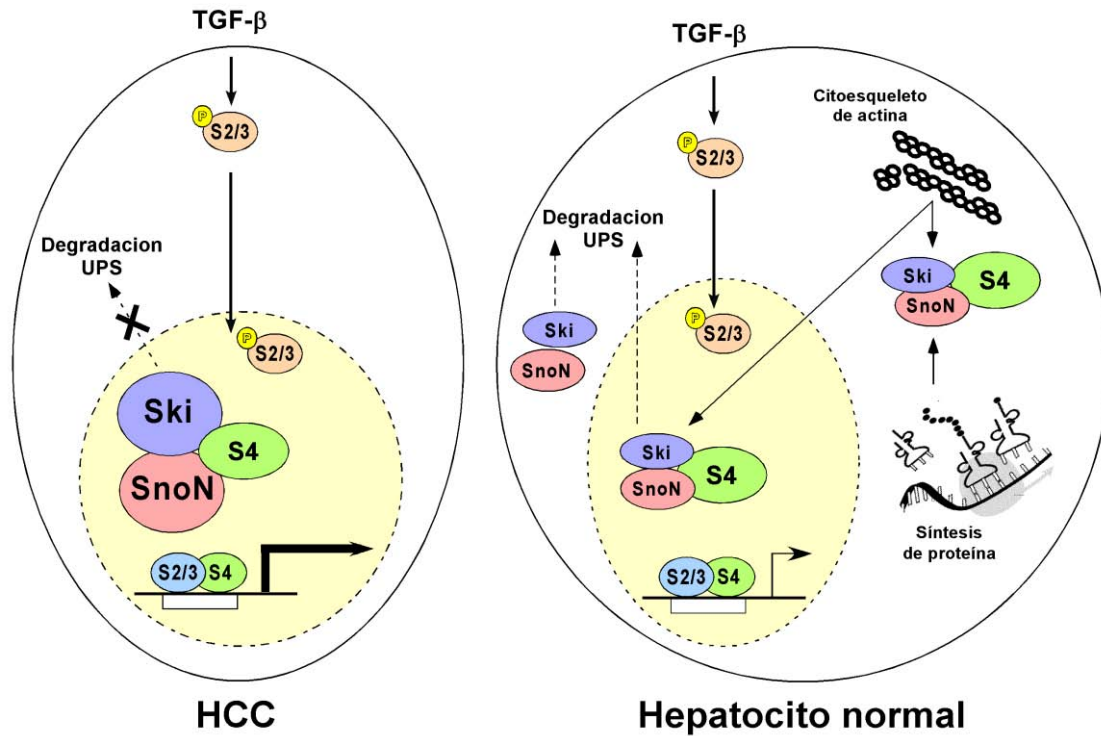
FIGURA 12. El recambio de las proteínas Ski y SnoN es crítico para regular la unión de los co-represores a los promotores de los genes responsivos a TGF- β .

Los hepatocitos normales C9 se pre-trataron por 2 h en presencia o ausencia (Control) de 1mM de EGTA, o con 1 μ M de Jasp, y se estimularon posteriormente con 0.3nM de TGF- β 1 por 0.5 y 2 h. Se efectuó (A) un Western Blot (WB) y (B) una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) bajo estas mismas condiciones experimentales, usando anticuerpos específicos α SnoN, α Ski, α Smad4 o α Smad2/3. Para el ensayo de ChIP, se llevaron a cabo PCRs con oligonucleótidos específicos para el promotor endógeno de smad7 (región -142 a -274; 132 pb).

DISCUSIÓN

La vía de señalización de TGF- β es una señal citostática importante que se encarga de mantener en la fase G0 a los hepatocitos, contribuyendo de esta forma a la homeostasis del órgano. Esta función se pierde en algunas enfermedades como la fibrosis y el cáncer. El desarrollo del hepatocarcinoma es un proceso complejo y con varias etapas bien caracterizadas, y que involucra numerosas alteraciones en todo el órgano y en sus diferentes tipos celulares, incluidos los hepatocitos. A pesar de que se han caracterizado mutaciones específicas en uno o más componentes de la vía del TGF- β en diferentes tipos de cáncer, muy pocos hepatocarcinomas muestran mutaciones en los componentes de la vía. Esto sugiere que los hepatocitos transformados tienen la vía de TGF- β intacta y funcional, tal y como se demostró en este estudio (Figuras 3 y 4). Las células cancerosas pueden volverse resistentes a los efectos supresores de tumor del TGF- β por diferentes mecanismos, y uno de ellos implica un aumento en la expresión de los inhibidores de la vía como Ski y SnoN. Numerosos estudios han reportado niveles incrementados de los dos co-represores en diferentes tipos de tumores, aun así, el papel de las dos proteínas durante la carcinogénesis permanece poco entendido; además no existe información acerca de la regulación de los co-factores en el hepatocarcinoma. En este estudio comparamos la regulación de la estabilidad de Ski y SnoN en un contexto de hígado sano y HCC, descubriendo que los mecanismos son muy diferentes en las dos condiciones fisiológicas, siendo evidente que las células cancerosas están profundamente alteradas y pueden perder muchos mecanismos que existen originalmente en las células normales (Modelo 1). Comprendimos de esta forma que las células transformadas

comúnmente utilizadas para llevar a cabo investigaciones, no son siempre la mejor opción para encontrar respuestas.



Modelo 1. Los mecanismos de regulación de los co-represores Ski y SnoN son numerosos y más complejos en hepatocitos normales comparado con hepatocitos cancerosos (HCC).

En HCC, los niveles proteicos de Ski y SnoN se encuentran muy elevados y la regulación de su estabilidad es bastante sencilla: los co-represores son regulados exclusivamente por TGF-β y las proteínas Smad. Sin embargo, los hepatocarcinomas son tan heterogéneos que en algunos casos ni TGF-β es capaz de regular a los co-factores: Ski y SnoN se vuelven insensibles a la degradación. Probablemente, esto se debe a la falta de alguna ligasa de ubiquitina específica, porque la señalización de la citocina se encuentra intacta. Interesantemente, a pesar de los altos niveles de los co-represores, los hepatomas muestran una fuerte y sostenida transcripción de genes blanco de TGF-β.

De manera opuesta, los hepatocitos normales tienen bajos niveles de Ski y SnoN y numerosos mecanismos diferentes a TGF- β son capaces de regular su estabilidad proteica: los co-represores son muy sensibles a cualquier cambio en el proceso de síntesis de proteína y en la estructura del citoesqueleto de actina.

Desde el principio de nuestro estudio, quedó claro que las células de HCC muestran niveles significativamente más altos de Ski y SnoN que los hepatocitos normales (Figura 1, Modelo 1), lo cual concuerda con lo que se sabe acerca de otros tipos de tumor. Así, proponemos que los hepatocarcinomas se suman a la lista de tumores caracterizados por altos niveles de Ski y SnoN. En el caso de los HCC analizados afirmamos que el aumento en los niveles de Ski y SnoN es consecuencia del incremento en la estabilidad de los dos co-represores. Razonamos que los altos niveles de Ski y SnoN en dichos hepatomas estarían muy probablemente bloqueando los efectos citostáticos de TGF- β inhibiendo directamente las Smad2/3 o afectando la formación de complejos activos Smad2/3/4, bloqueando así la transcripción de genes dependientes de Smads. Sin embargo, demostramos que TGF- β induce exitosamente la expresión de sus genes blanco en HCC: hay una fuerte y sostenida expresión de genes dependientes e independientes de Smad4 en las células de hepatoma (Modelo 1), a pesar de los altos niveles nucleares de Ski y SnoN y de la existencia de los complejos Ski/SnoN/Smad4, los cuales, según los antecedentes, debieran funcionar como complejos represores de la transcripción. Estos resultados difieren de muchos estudios donde la sobreexpresión de Ski y SnoN interfiere con las respuestas transcripcionales dependientes de Smads. Interesantemente, existe un estudio que es consistente con nuestros datos: en un modelo de melanoma, Mauviel y

colaboradores (2011) determinaron que las células de melanoma tienen niveles endógenos muy altos de Ski y SnoN comparado con los melanocitos normales, sin embargo, los altos niveles de estas proteínas no causan la inhibición de la expresión de los genes blanco de TGF- β ni bloquean los efectos pro-tumorigénicos de la citocina. Este estudio resulta valioso porque los investigadores, al igual que nosotros, analizaron las proteínas endógenas, evitando las técnicas de sobreexpresión de proteínas que, a pesar de ser sistemas útiles para numerosos fines científicos, son técnicas que forzan los sistemas biológicos.

Si bien creemos que la ausencia de represión por parte de Ski y SnoN en los hepatomas HepG2 y AS30D es por la falta de algún otro factor de represión clave para que Ski y SnoN ejerzan su función, fue interesante darnos cuenta de que los hepatomas analizados tienen una fuerte expresión de los genes dependientes de TGF- β , en este caso *smad7*, *sno*, *pai-1* y *gadd45b*, de hecho la inducción genética en HCC es más fuerte que la que se da en los hepatocitos normales; irónicamente, parece que en HCC, a TGF- β se le facilita más expresar sus genes blanco a pesar de los altos niveles proteicos de los antagonistas Ski y SnoN. Un estudio que vale la pena mencionar en este punto es el de Coulouarn y colaboradores (2008), que explica la existencia de una gran heterogeneidad dentro de los hepatocarcinomas, existiendo diferentes “firmas” de expresión genética (*gene expression signatures*, en inglés) dependientes de TGF- β que serían marcadores útiles para el pronóstico de la enfermedad. Hay “firmas” de expresión genética características de un tumor temprano (*early signature*): los genes que caen dentro de esta categoría son precisamente *sno*, *smad7* y *TGIF*, inhibidores de la señal del TGF- β , así como *gadd45a*, *gadd45b*, *gadd45c*, inductores de arresto celular y apoptosis.

Contrariamente, TGF- β también puede inducir genes que forman parte de las “firmas tardías o avanzadas” (*late signatures*), que anuncian una enfermedad más avanzada, un cáncer más agresivo y un pronóstico negativo: esta “firma” está caracterizada por la expresión de genes involucrados en la organización del citoesqueleto, la adhesión celular y la remodelación de la matriz extracelular, hecho que refuerza la función de TGF- β como un regulador del estroma y un inductor del proceso de transición epitelio-mesénquima. Otro estudio relacionado (Dzieran et al., 2013) también explica que la gran heterogeneidad observada en las líneas celulares derivadas de HCC representa las diferentes etapas de la enfermedad. En el trabajo, los autores analizan la señalización de TGF- β en más de diez líneas celulares de HCC, caracterizando cada componente de la señal de la citocina. Observan que las líneas celulares comúnmente utilizadas HepG2, Hep3B y HuH7 son hepatomas responsivos a la inhibición de la proliferación y a la inducción de apoptosis por TGF- β , y se caracterizan por expresar bajos niveles endógenos de Smad7 y TGF- β , por una sostenida fosforilación de Smad2 y por una expresión exitosa de genes dependientes de las Smads. Por otro lado, las líneas celulares HLE y HLF son hepatomas insensibles al efecto citostático de TGF- β y muestran una fosforilación transitoria de Smad2 junto con una alta fosforilación de Erk (que denota la activación de las vías no canónicas), poca inducción de los genes reporteros y altos niveles endógenos de TGF- β y Smad7. En el estudio también detectaron líneas celulares de hepatoma con una fosforilación sostenida de Smad2/3 pero en las que no existe activación de los genes reporteros dependientes de TGF- β : explican que este fenómeno puede estar causado por alteraciones en la localización subcelular de las R-Smad o bien por la fosforilación de las R-Smad en la región *linker* (denotada “pSmadL”) inducida por

la activación de las vías no canónicas (e.g, JNK); esto interfiere con la expresión de genes que son parte del programa citostático de la citocina. Concluyen entonces que los niveles de Smad7 así como la duración de la fosforilación de las proteínas Smad, son factores determinantes para que las células sean sensibles o no a la señal del TGF- β .

Aunque la cinética transcripcional de los hepatomas HepG2 y AS30D difiere mucho de la cinética que se da en los hepatocitos normales (Figura 2), pensamos que los hepatomas analizados en este estudio son hepatomas todavía poco agresivos, pues conservan un programa transcripcional característico de los estadios tempranos del HCC, dado por la inducción de los represores de la señal del TGF- β (*sno*, *smad7*) y por proteínas que participan en reparación del DNA (*gadd45b*). El hallazgo de que en los hepatocitos normales TGF- β induce una expresión transitoria de sus genes blanco (dada por un pico a la hora post-tratamiento), diferente a la activación sostenida observada en los hepatomas, va de acuerdo con estudios anteriores que describen el asa de auto-regulación negativa dada por Ski y SnoN, mecanismo necesario para controlar la señal del TGF- β . Nuestros datos demuestran que esta asa de retroalimentación negativa está presente en hepatocitos normales pero se ha perdido en hepatocitos transformados.

Los resultados obtenidos en este trabajo comprueban que los hepatocitos normales, y posiblemente de manera general las células normales, poseen diversos mecanismos encargados de mantener un estricto control sobre los niveles proteicos de Ski y SnoN (Modelo 2). De hecho, los niveles de Ski y SnoN se recuperan muy rápidamente después de la degradación dependiente del TGF- β en hepatocitos normales, a pesar de que la vía sigue activa y de que todavía existen Smads fosforiladas capaces de seguir degradando a los co-represores. En cambio, en el hepatoma HepG2, TGF- β lleva a una

degradación fuerte y sostenida de los dos co-factores, que persiste mientras que las Smads se encuentren fosforiladas (20 a 24 h post-tratamiento). Interesantemente, en el hepatoma AS30D, Ski y SnoN son resistentes a la degradación por TGF- β : esta resistencia no se debe a que la señal del TGF- β no se active, puesto que las Smads son fosforiladas y son capaces de inducir la expresión de sus blancos; es probable que la resistencia de Ski y SnoN a la degradación se deba a la ausencia de una ligasa de ubiquitina tipo E3 en este hepatoma. Así, este estudio es de los primeros en dejar claro que la regulación proteica de Ski y SnoN es muy diferente entre hepatocitos sanos y cancerosos, además también puede ser distinta entre diferentes hepatomas: esto afecta directamente la magnitud, la duración y la respuesta celular al estímulo de TGF- β . Al inicio de este estudio una de las primeras hipótesis que planteamos implicaba que la regulación diferencial de Ski y SnoN según el contexto celular podría deberse a diferencias en su localización subcelular o a su vida media. Efectivamente encontramos diferencias en cuanto a la localización subcelular de Ski y SnoN, enfatizando que las proteínas se encuentran tanto en el compartimento nuclear como en el citoplasmático en hepatocitos sanos, mientras que en HCC parecen estar restringidas al núcleo. Sería interesante investigar si la localización citoplasmática de Ski y SnoN en hepatocitos normales depende de la interacción con otras proteínas que retengan a los co-represores en dicho compartimento. En este momento es importante recordar a C184M, una proteína citoplasmática, sobre la que se conoce muy poco, pero para la que se tiene descrita la interacción con Ski (Kokura et al., 2003). También se ha sugerido que la localización citoplasmática de Ski y SnoN podría conferirles resistencia a la degradación (Krakowsky et al., 2005): nuestro trabajo demuestra que la poza citoplasmática de Ski y SnoN es igual

de sensible a la degradación por TGF- β que la poza nuclear, además de que no impide la migración de Smad2/3 y Smad4 al núcleo, ni la formación de complejos Smad2/3/4. Esta observación plantea como perspectiva investigar si Ski y SnoN podrían tener otras funciones todavía no caracterizadas en citoplasma, tal vez participando en otras vías de señalización diferentes a la de TGF- β . Además, el hecho de que Ski y SnoN se localicen en el núcleo tampoco garantiza que sean sensibles a la degradación por TGF- β , así como lo observamos en el hepatoma AS30D. De esta forma concluimos que la localización subcelular de Ski y SnoN no explica su notable estabilidad en los hepatomas. Encontramos que las dos proteínas tienen una vida media muy larga en HCC, opuesto a una vida corta en hepatocitos normales: cualquier interferencia con los procesos de transcripción y síntesis de proteínas, y cualquier modificación en el citoesqueleto de actina regula la estabilidad de Ski y SnoN únicamente en hepatocitos normales. Así, la vida media de Ski y SnoN en hepatoma es tan larga porque los diferentes mecanismos que regulan a dichas proteínas en las células normales se encuentran perdidos durante el desarrollo del tumor.

El hecho de que en hepatocitos normales Ski y SnoN sean regulados diferencialmente por el citoesqueleto es muy interesante porque se suele pensar que las dos proteínas se comportan igual debido a su alta homología y similitud: nuestro estudio deja claro que Ski y SnoN tienen diferentes dinámicas dentro de una célula normal. Concluimos que la polimerización de actina favorece la degradación de Ski mientras que promueve la estabilidad de SnoN, sugiriendo que dicho estímulo utiliza un adaptador específico todavía no caracterizado, que tendría como función permitir la interacción de Ski con alguna ligasa de ubiquitina para llevar a la degradación del co-represor de manera

independiente de las Smads. Este adaptador sería específico para Ski puesto que SnoN no se degradada. Interesantemente, Koinuma y colaboradores (2011) descubrieron a la proteína RB1CC1, una proteína de andamiaje (*scaffold*) que resultó ser un importante co-factor de la ligasa tipo E3 Arkadia, y que demostró promover exclusivamente la degradación de Ski y no de SnoN, aumentando la actividad de Arkadia sobre Ski, incrementando así la degradación del co-represor. Por tanto este factor tendría selectividad para Ski, y podría ser un ejemplo del posible “AdaptadorX” propuesto en nuestro modelo (Modelo 2). Un mecanismo como este podría explicar la modulación diferencial de Ski y SnoN descrita en nuestro trabajo, resultando esto importantísimo pues implica que existen condiciones específicas en las que solamente uno de los dos co-represores es degradado, mientras que el otro conserva o aumenta sus niveles. Nuevamente, esto apoya la idea de que Ski y SnoN, a pesar de su alta homología, no siempre funcionan igual ni están implicados en los mismo procesos, ni regulados por los mismos factores. Este nuevo mecanismo de regulación diferencial de Ski y SnoN es muy relevante porque bajo condiciones específicas, puede estabilizarse un co-represor y desestabilizarse el otro, por tanto cada uno de ellos podría regular diferentes tipos de genes, modulando así la respuesta celular a un estímulo dado. De hecho, es muy posible que Ski y SnoN tengan funciones independientes de TGF- β y participen en otras vías de señalización como co-represores o bien como co-activadores.

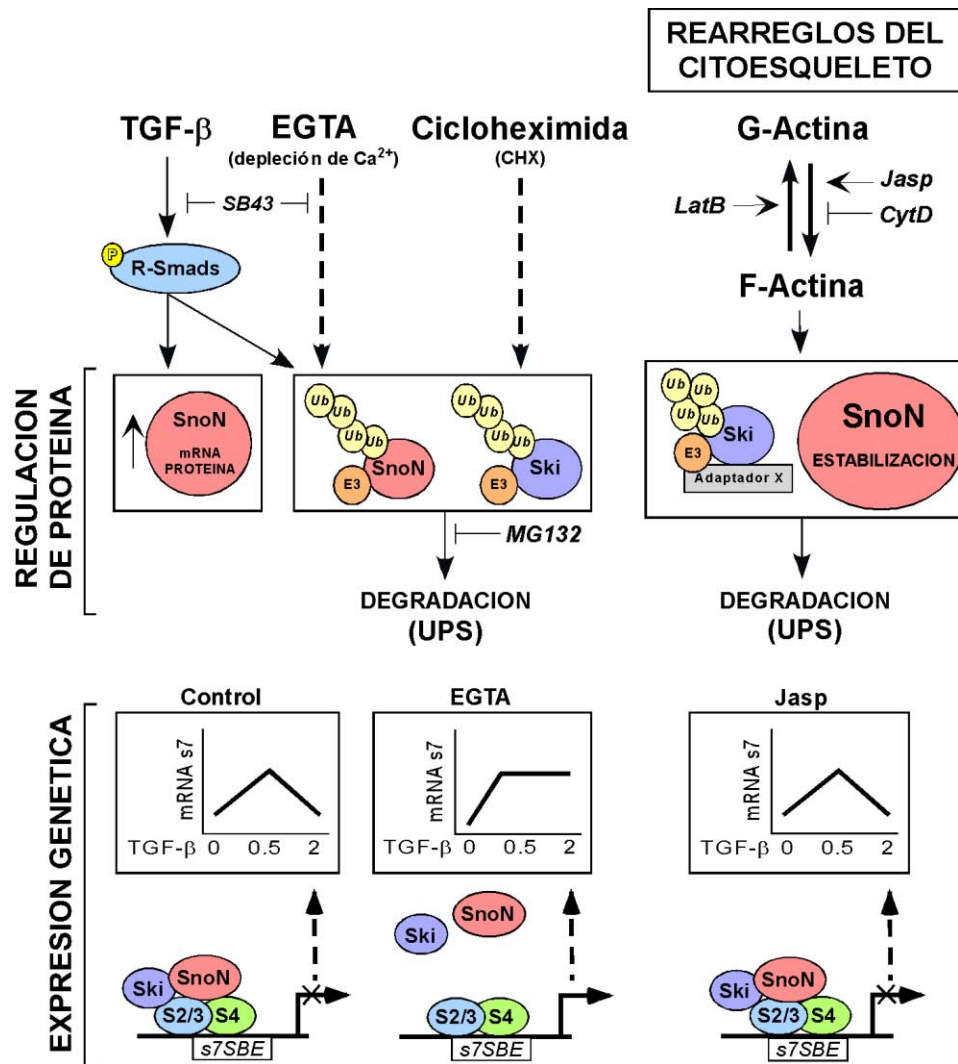
En este estudio trazamos una conexión entre el citoesqueleto de actina y la vía del TGF- β , mediante la modulación de las proteínas Ski y SnoN. El movimiento celular es un fenómeno vital para la mayoría de los procesos biológicos, incluyendo la morfogénesis embrionaria, la función del sistema inmune, la angiogénesis, la reparación

de tejidos y la regeneración. La dinámica del citoesqueleto participa en cada uno de estos procesos, favoreciendo la formación de estructuras importantes como lamelipodios, adhesiones focales y fibras de estrés, siendo característica de estos procesos la transición dinámica entre el estado de actina monomérica (G-actina) y actina filamentosa (F-actina). Dicha transición está controlada por una variedad de proteínas de unión a actina (ABPs, *Actin binding proteins*), las cuales están a su vez reguladas por mecanismos río arriba, como estímulos extracelulares por diferentes ligandos y hormonas, incluyendo ligandos de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs). Es evidente que cualquier alteración en la función de los componentes del citoesqueleto sea una causa o un agravante para el desarrollo de patologías como el cáncer, entre muchas otras. De hecho se ha detectado la sobreexpresión de algunas proteínas de unión a actina (ABPs) en cáncer colorectal, melanoma, cáncer de pulmón y de mama: esto tiene consecuencias sobre la movilidad y capacidad invasiva de la células tumorales. Sabemos ahora que las señales que modulan el citoesqueleto provocando la polimerización de actina, degradan a Ski y causan la simultánea estabilización de SnoN. Estas señales pueden ser consecuencia de la activación de GPCRs por ligandos fisiológicos como la esfingosina (S1P) y de la subsecuente activación de la vía de Rho (Vázquez-Victorio et al., 2015), responsable del rearreglo del citoesqueleto. Puesto que los efectos de los moduladores farmacológicos del citoesqueleto (específicamente Jasp y CytD) sobre la estabilidad de Ski y SnoN son evidentes en nuestro estudio, se hace por tanto necesario estudiar el efecto de hormonas y estímulos fisiológicos que controlen el citoesqueleto *in vivo*, para comprender la relevancia de este nuevo mecanismo de regulación diferencial de los co-represores Ski y SnoN.

El hecho de que la regulación de la estabilidad de Ski y SnoN sea regulada tan dinámicamente en células normales, nos llevó a pensar que la transcripción de genes dependiente del TGF- β podría verse afectada. Efectivamente, comprobamos que la modulación de los co-represores puede tener un impacto muy fuerte en el patrón de transcripción dependiente de las Smads, modificando profundamente la cinética de transcripción. Paralelamente, el hecho de que en los hepatomas estén ausentes los mecanismos regulatorios de Ski y SnoN puede explicar porque dichas células malignas tienen diferentes cinéticas transcripcionales. Además, la regulación diferencial de Ski y SnoN podría ser muy relevante en otras patologías diferentes al cáncer, como la fibrosis por ejemplo, donde los rearrreglos en el citoesqueleto pudieran modular la estabilidad de los co-represores, en dado caso promoviendo las acciones pro-fibróticas de TGF- β . Además, los cambios en el citoesqueleto tienen relevancia durante procesos fisiológicos de suma importancia como proliferación, control del movimiento celular, migración, mantenimiento de la integridad de los tejidos y desarrollo embrionario. Será necesario comenzar a estudiar las consecuencias fisiológicas que tiene la modulación dinámica de Ski y SnoN en células normales, utilizando modelos de investigación donde el citoesqueleto se encuentre involucrado.

En conclusión, además del estímulo de TGF- β , el proceso de recambio de proteínas y los cambios en la adhesión celular y el citoesqueleto, modulan la estabilidad de los co-represores Ski y SnoN únicamente en células normales: estos mecanismos numerosos y poco caracterizados se encuentran perdidos en los hepatocarcinomas. La señal del TGF- β puede entonces converger con las señales generadas por la dinámica del citoesqueleto con el fin de regular la estabilidad de Ski y SnoN, lo cual impacta

directamente en la respuesta a TGF- β . Esto podría en parte explicar el papel dual de Ski y SnoN (y del mismo TGF- β) en cáncer. Por ende, resulta de suma importancia caracterizar a fondo los mecanismos de regulación de Ski y SnoN en células normales. Este estudio deja claro que los modelos de células transformadas más comúnmente usados, no son los más adecuados para estudiar mecanismos de regulación, pues las células cancerosas pueden modificarlos profundamente o hasta perderlos. Hasta ahora, los estudios en células cancerosas sugerían que el regulador más importante de Ski y SnoN era TGF- β , sin embargo, en este trabajo descubrimos que las dos proteínas son reguladas dinámicamente por otros numerosos estímulos, únicamente en células normales. Adicionalmente, creemos que Ski y SnoN pueden ser blancos de diversos fármacos moduladores del citoesqueleto usados de rutina para tratar diferentes patologías, por lo que la utilización de dichos fármacos tendrá un efecto directo, y que deberá contemplarse, sobre las señales inducidas por TGF- β .



Modelo 2. Mecanismos que participan en la regulación de la estabilidad de Ski y SnoN en hepatocitos normales.

Modelo generado a partir de los datos obtenidos en este estudio, que describe los mecanismos encargados de controlar la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN en hepatocitos normales. TGF- β induce la degradación de Ski y SnoN mediante la activación de las Smads y el sistema de Ubiquitina-Proteosoma (UPS). Interesantemente, la inhibición del recambio de proteínas (por EGTA y CHX) también es un potente regulador negativo de la estabilidad de Ski y SnoN pues induce una fuerte degradación de los co-represores Ski y SnoN mediada por el sistema UPS. La degradación de ambos Ski y SnoN conlleva a una expresión sostenida del gen blanco de TGF- β smad7, debido a que los co-represores no pueden posicionarse en el promotor del gen blanco para

reprimir su expresión. Adicionalmente, en hepatocitos normales, la dinámica del citoesqueleto de actina también regula la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN. Los rearrreglos en el citoesqueleto regulan diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN, aumentando los niveles de SnoN y bajando los niveles de Ski, independientemente de las Smads y sin causar una alteración en el patrón de expresión genética dependiente de TGF- β .

CONCLUSIONES

- Los hepatocitos transformados tienen altos niveles de Ski y SnoN debido a un aumento en su estabilidad proteica.
- Ski y SnoN se regulan diferencialmente por TGF- β en hepatocitos normales y hepatocarcinoma.
- Ski y SnoN son proteínas muy estables en hepatocarcinoma y de vida media muy corta en hepatocitos normales.
- Ski y SnoN se regulan diferencialmente por alteraciones en los procesos de recambio de proteínas y por cambios en el citoesqueleto y en la adhesión celular, exclusivamente en hepatocitos normales.
- La inhibición de la síntesis de proteínas, al degradar tanto a Ski como a SnoN, afecta el posicionamiento de los co-represores sobre los promotores de los genes blanco de las Smads, alterando el patrón transcripcional dependiente de TGF- β .
- Los numerosos mecanismos de regulación de Ski y SnoN presentes en células normales están alterados o perdidos en hepatocarcinoma, por lo que las células transformadas no son el mejor modelo para estudiar sus funciones y regulación normal.

PERSPECTIVAS

En hepatocarcinoma

- ¿Por qué Ski y SnoN son resistentes a la degradación por TGF- β en algunos hepatocarcinomas como AS30D? Estudiar los mecanismos que participan en la protección de Ski y SnoN a la degradación.
- ¿Sufren Ski y SnoN alguna modificación post-traducciona que les confiere estabilidad en hepatocarcinoma? Buscar modificaciones post-traduccionales como fosforilación y sumoilación.
- ¿Por qué se pierde la localización citoplasmática de Ski y SnoN en hepatocarcinoma? Determinar si el cambio en la localización subcelular de Ski y SnoN en hepatocarcinoma se debe a la presencia o ausencia de alguna proteína específica en núcleo o citoplasma, o bien a la interacción de los co-represores con alguna proteína que los retenga en el núcleo celular.
- ¿Por qué los altos niveles de Ski y SnoN no bloquean la transcripción dependiente de TGF- β ? Descubrir cuales factores relativos a la maquinaria de represión transcripcional hacen falta en los hepatocarcinomas para que Ski y SnoN ejerzan su efecto represor.
- Caracterizar la estabilidad, localización subcelular y regulación de Ski y SnoN por TGF- β en otras líneas celulares hepáticas transformadas haciendo un estudio comparativo entre líneas de hepatocarcinoma temprano, hepatocarcinoma avanzado y hepatocarcinoma metastásico y altamente invasivo, para comprender

como se van alterando los mecanismos de regulación de Ski y SnoN durante las diferentes etapas del desarrollo del hepatocarcinoma.

- Caracterizar la estabilidad, localización subcelular y regulación de Ski y SnoN en un modelo animal *in vivo* de desarrollo de hepatocarcinoma

En hepatocitos normales

- ¿Qué funciones tiene la poza citoplasmática de Ski y SnoN? Comprender como Ski y SnoN participan en la vía de TGF- β u otras vías de señalización estando en el citoplasma.
- ¿Cuál es el mecanismo que permite la estabilización de SnoN por los cambios en el citoesqueleto? Comprender porque los cambios en el citoesqueleto ejercen un efecto opuesto sobre los niveles de Ski y SnoN.
- ¿En qué otros contextos fisiológicos cobra importancia el nuevo mecanismo regulatorio de Ski y SnoN descrito en este estudio?

BIBLIOGRAFÍA

- Ammanamanchi S., Brattain M. (2004). Restoration of transforming growth factor- β signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 279: 32620-32625.
- Attisano L., Wrana JL. (2000). Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 235-243.
- Band AM., Laiho M. (2012). SnoN oncoprotein enhances estrogen receptor- α transcriptional activity. *Cell Signal.* 24: 922-930.
- Barritt GJ., Chen J., Rychkov GY. (2008), Ca₂₊-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology. *Biochim Biophys Acta.* 1783: 651-672.
- Berk M., Desai S., Heyman H., Colmenares C. (1997). Mice lacking the *ski* proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning and skeletal muscle development. *Genes Dev.* 11: 2029-2039.
- Bonni S., Wang H., Causing C., Kavsak P., Stroschein S., Luo K., Wrana JL. (2001). TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature Cell Biology.* 3: 587-595.
- Briones-Orta MA., Sosa-Garrocho M., Moreno-Alvarez P., Fonseca-Sánchez MA., Macías-Silva M. (2006). *BBRC.* 341: 889-894.
- Brostrom CO., Bocckino SB., Brostrom MA., Galuska EM. (1986). Regulation of protein synthesis in isolated hepatocytes by calcium-mobilizing hormones. *Mol Pharmacol.* 29: 1004-1011.
- Burke L., Baniahmad A. (2000). Co-repressors 2000. *FASEB J.* 14: 1876-1888.
- Chen CR., Kang Y., Massagué J. (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells : a loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 992-999.
- Chen D., Xu W., Bales E., Colmenares C., Conacci-Sorrell M., Ishii S., Stavnezer E., Campisi J., Fisher D., Ben-Ze'ev A., Medrano E. (2003). Ski activates Wnt/ β catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res.* 63: 6626-6634.
- Cohen S., Zheng G., Heyman H., Stavnezer E. (1999). Heterodimers of the SnoN and ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agents. *Nucleic Acid Res.* 27: 1006-1014.
- Colmenares C., Sutrave P., Hughes S., Stavnezer E. (1991). Activation of the c-ski oncogene by overexpression. *J Virol.* 65: 4929-4935.
- Coulouarn C., Factor V.M., Thorgeirsson S.S. (2008). Transforming Growth Factor- β gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology,* 47: 2059-2067.
- Denissova N.G., Liu F. (2004). Repression of endogenous Smad7 by Ski. *J Biol Chem.* 279: 28143-28148.
- Derynk R., Akhurst R., Balmain A. (2001). TGF- β signaling in tumour suppression and cancer progression. *Nature Genetics.* 29: 117-129.

- Derynk R., Zhang Y. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature*. 425: 577-584.
- ten Dijke P., Miyazono K., Heldin C. (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *TIBS*. 25: 64-70.
- Ding B., Sun Y., Huang J. (2012). Overexpression of Ski oncoprotein leads to p53 degradation through regulation of Mdm2 protein sumoylation. *J Biol Chem*. 287: 14621-14630.
- Dooley S., ten Dijke P. (2012). TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*. 347: 245-256.
- Dooley S., Weng H., Mertens PR. (2009). Hypotheses on the role of transforming growth factor-beta in the onset and progression of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*. 27: 93-101.
- Dünker N., Krieglstein K. (2000). Targeted mutations of transforming growth factor- β genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem*. 267: 6982-6988.
- Dzieran J., Fabian J., Feng T., Coulouarn C., Ilkavets I., Kyselova A., Breuhahn K., Dooley S., Meindl-Beinker N. (2013). Comparative analysis of TGF- β /Smad signaling dependent cytostasis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *PLoS One*. 9 (5):e95952.
- Engert JC., Servaes S., Sutrave P., Hughes SH., Rosenthal N. (1995). Activation of a muscle-specific enhancer by the Ski proto-oncogene. *Nucleic Acids Res*. 23: 2988-2994.
- Feng X., Derynck R. (2005). Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21: 659-666.
- Ferrand N., Atfi A., Prunier C. (2010) The oncoprotein c-Ski functions as a direct antagonist of the transforming growth factor- β type I receptor. *Cancer Res*. 70: 8457-8466.
- Frederick JP., Liberati N., Waddell D., Shi Y., Wang XF. (2004). Transforming growth factor β -mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol Cell Biol*. 24: 2546-2559.
- He J., Tegen S., Krawitz A., Martin G. Luo K. (2003). The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *J Biol Chem*. 278: 30540-30547.
- Ichikawa K., Nagase T., Ishii S., Asano A., Mimura N. (1997). Trans-regulation of myogenin promoter/enhancer activity by c-ski during skeletal-muscle differentiation: the C-terminus of the c-Ski protein is essential for transcriptional regulatory activity in myotubes. *Biochem J*. 328: 607-613.
- Imoto I., Pimkhaokham A., Fukada Y., Yang ZQ., Shimada Y., Nombra N., Iria H., Imamura M., Inazawa J. (2001). SON is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem Biophys Res Commun*. 286: 559-565.
- Inoue Y., Imamura T. (2008). Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci*. 99: 2107-2112.

- Itoh S., Itoh F., Goumans M., ten Dijke P. (2000). Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* 267: 6954-6967.
- Izzi L., Attisano L. (2004). Regulation of the TGF- β signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 23: 2071-2078.
- Javelaud D., Mauviel A. (2004). Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pathological roles. *IJBCB.* 36: 1161-1165.
- Jiang H., Jin C., Hua D., Zhou F., Lou X., Zhao N., Lan Q., Huang Q., Yoon JG., Zheng S., Lin B. (2014). Next generation sequencing analysis of miRNAs: MiR-127-3p inhibits glioblastoma proliferation and activates TGF- β signaling by targeting SKI. *OMICS.* 3:196-206.
- Kajino T., Omori E., Ishii S., Matsumoto K., Ninomiya-Tsuji J. (2007). TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *J Biol Chem.* 282: 9475-9481.
- Kim S., Angel P., Lafyatis R., Hattori K., Kim K., Sporn M., Karin M., Roberts A. (1990). Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol.* 10: 1492-1497.
- Koinuma D., Shinozaki M., Nagano Y., Ikushima H., Horiguchi K., Goto K., Chano T., Saitoh M., Imamura T., Miyazono K., Miyazawa K. (2011). RB1CC1 protein positively regulates transforming growth factor- β signaling through the modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem.* 286: 32502-3512.
- Kokura K., Kim H., Shinagawa T., Khan MM., Nomura T., Ishii S. (2003). The Ski-binding protein C184M negatively regulates tumor growth factor- β signaling by sequestering the Smad proteins in the cytoplasm. *J Biol Chem.* 278: 20133-20139.
- Krakowski AR., Laboureau J., Mauviel A., Bissell MJ., Luo K. (2005). Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- β signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 12437-12442.
- Kretschmar M., Doody L., Timokhina I., Massagué J. (1999). A mechanism of repression of TGF- β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13: 804-816.
- Kokura K., Kaul S., Wadhwa R., Nomura T., Khan M., Shinigawa T., Yasukawa T., Colmenares C., Ishii S. (2001). The ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem.* 276: 34115-34121.
- Kucich U., Rosenbloom JC., Abrams W., Rosenbloom J. (2002). Transforming growth factor- β stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, Protein Kinase C- δ and p38. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26: 183-188.
- Lan HY. (2011). Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 7: 1056-1067.
- Levati L., Pagani E., Romani S., Castiglia D., Piccinni E., Covaciu C., Caporaso P., Bondanza S., Antonetti FR., Bonmassar E., Martelli F., Alvino E., D'Atri S. (2011). MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24: 538-550.

- Li Y., Turck CM., Teumer JK., Stavnezer E. (1986). Unique sequence, *ski*, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J Virol.* 57: 1065-1072
- Li M., Wan Y., Sanjabi S., Robertson A., Flavell R. (2006). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 24: 99-146.
- Liu D., Black BL., Derynck R. (2001). TGF- β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 15: 2950-2966.
- Luo K. (2004). Ski and SnoN : negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 14: 65-70.
- Macías-Silva M., Abdollah S., Hoodless PA., Pirone R., Attisano L., Wrana JL. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell.* 87: 1215-1224.
- Massagué J. (2000). How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1: 169-178.
- Massagué J., Gomis R. (2006). The logic of TGF- β signaling. *FEBS Letters.* 580: 2811-2820.
- Massagué J., Seoane J., Wotton D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19: 2783-2810.
- Matsuzaki K. (2012). Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. *Cell Tissue Res.* 347:225-243.
- Medrano EE. (2003). Repression of TGF- β signaling by the oncogenic protein SKI in human melanomas: consequences for proliferation, survival, and metastasis. *Oncogene.* 22: 3123-3129.
- Miyazono K. (2000). Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *Journal of Cell Science.* 113: 1101-1109.
- Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C. (2001). Smad regulation in TGF- β signal transduction. *Journal of Cell Science.* 114: 4359-4369.
- Neuman M. (2003). Cytokines: central factors in alcoholic liver diseases. *Alcohol Res Health.* 27: 307-316.
- Nicol R., Stavnezer E. (1998). Transcriptional repression by v-Ski and c-Ski mediated by a specific DNA binding site. *J Biol Chem.* 273: 3588-3597.
- Nomura T., Khan MM., Kaul SC., Dong HD., Wadhwa R., Colmenares C., Kohno I., 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.
- Pearson-White S., Crittenden R. (1997). Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucleic Acid Res.* 25: 2930-2937.
- Pearson-White S., McDuffie M. (2003). Defective T-cell activation is associated with augmented transforming growth factor β sensitivity in mice with mutations in the *sno* gene. *Mol Cell Biol.* 23: 5446-5459.

- Prathapam T., Kühne C., Banks L. (2002). Ski interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acid Research*. 30: 5261-5268.
- Reed JA., Bales E., Xu W., Okan NA., Bandyopadhyay D., Medrano EE. (2001). Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor- β signaling. *Can Res*. 61: 8074-8078.
- Reed JA., Lin Q., Chen D., Mian I.S., Medrano EE. (2005). Ski pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*. 24: 265-272.
- Ritter M., Kattmann D., Teichler S., Hartmann O., Samuelsson MK., Burchert A., Bach JP., Kim TD., Berwanger B., Thiede C., Jager R., Ehninger G., Schafer H., Ueki N., Hayman MJ., Eilers M., Neubauer A. (2006). Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 20: 437-443.
- Rodriguez-Enriquez S., Torres-Marquez ME., Moreno-Sanchez R. (2000). Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 375: 21-30.
- Russel WE. (1988). Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits hepatocyte DNA synthesis independently of EGF binding and EGF receptor autophosphorylation. *J Cell Physiol*. 135:253-261.
- Shinagawa T., Nomuta T., Colmenares C., Ohira M., Nakagawara A., Ashii S. (2001). Increased susceptibility to tumorigenesis of *ski*-deficient heterozygous mice. *Oncogene*. 20: 8100-8108.
- Siegel PM., Massagué J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 3: 807-821.
- Stegmüller J., Konishi Y., Huynh M., Yuan Z., DiBacco S., Bonni A. (2006). Cell-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the Cdh1-APC target SnoN. *Neuron*. 50: 389-400.
- Stroschein S., Wang W., Zhou S., Zhou Q., Luo K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*. 286: 771-774.
- Sun Y., Liu X., Ng-Eaton E., Lodish H., Weinberg R. (1999). SnoN and ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *PNAS*. 96: 12442-12447.
- Tan R., Zhang X., Yang J., Li Y., Liu Y. (2007). Molecular basis for the cell type specific induction of SnoN expression by Hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol* 18:2340-2349.
- Tokitou F., Nomura T., Khan MM., Kaul SC., Wadhwa R., Yasukawa T., Kohno I., Ishii S. (1999). Viral ski inhibits retinoblastoma protein (Rb)-mediated transcriptional repression in a dominant negative fashion. *J Biol Chem*. 274: 4485-4488.
- Ulloa L., Doody J., Massagué J. (1999). Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signaling by the interferon- γ /STAT pathway. *Nature*. 397: 710-713.

- Ueki N., Hayman M. (2003). Direct interaction of Ski with either Smad3 or Smad4 is necessary and sufficient for Ski-mediated repression of transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem.* 278: 32489-32492.
- Ueki N., Hayman M. (2003). Signal-dependent N-CoR requirement for repression by the Ski oncoprotein. *J Biol Chem.* 278: 24858-24864.
- Vázquez-Victorio G., Caligaris C., Del Valle-Espinosa E., Sosa-Garrocho M., González-Arenas NR., Briones-Orta MA., Macías-Silva M. (2015). Novel regulation of Ski protein stability and endosomal sorting by actin cytoskeleton dynamics in hepatocytes. *J Biol Chem.* 290: 4487-4499.
- Wakefield L., Roberts A. (2002). TGF- β signaling : positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 22-29.
- Wang W., Mariani F., Harland R., Luo K. (2000). Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 14394-14399.
- Wilkinson D., Orden S., Stratton S., Piechan J., Nguyen T., Smulian G., Craig Barton. (2005). A direct intersection between p53 and transforming growth factor β pathways targets chromatin modification and transcription repression of the α -fetoprotein gene. *Mol Cell Biol.* 25: 1200-1212.
- Zawel L., Dai J., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K., Vogelstein B., Kern S. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell I.* 4: 611-617.
- Zhang F., Lundin M., Ristimaki A., Heikkila P., Lundin J., Isola J., Joensuu H., Laiho M. (2003). Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor-beta signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Res.* 63: 5005-10.
- Zhang J., Zhang X., Xie F., Zhang Z., van Dam H., Zhang L., Zhou F. (2014). The regulation of TGF- β /Smad signaling by protein deubiquitination. *Protein Cell.* 5: 503-517.
- Zhang Y., Feng X., Derynck R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription. *Nature.* 394: 909-913.
- Zhu Q., Pearson-White S., Luo K. (2005). Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor β -induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol.* 25: 10731-10744.

APÉNDICE

1. *FRACCIONAMIENTO CELULAR / INMUNOPRECIPITACIÓN / WESTERN BLOT*

Buffer de homogenización

250mM Sacarosa

3mM Imidazole (pH 7.4)

Inhibidores de proteasas y fosfatasas

Inhibidores de fosfatasas y proteasas

10µl Ortovanadato de sodio 100mM

10µl Pirofosfato de sodio 100mM

25µl Fluoruro de sodio 1M

5µl PMSF 1M

2µl β-glicerofosfato 0.5M

2µl Benzamidina 50mg/ml

2µl Inhibidor de tripsina 50mg/ml

2µl Dihidrocloruro de antipaina

2µl Aprotinina 5mg/ml

2µl Pepstatina 5mg/ml

2µl Leupeptina 5mg/ml

Proteína G-agarosa (1:5)

Tomar 2ml del stock de proteína G agarosa y lavar las perlas con buffer TNTE 0.1% por 3 veces, centrifugando a 1000rpm por 1min y descartando el sobrenadante cada vez.

Finalmente diluir 1:5 con TNTE 0.1%.

Buffer TE (100ml)

1ml Tris 1M (pH 7.4)

0.2ml EDTA 0.5M

98.8ml dH₂O

TNTE 0.1% (100ml)

10ml TN10X

0.2ml EDTA 0.5M (pH 8)

1ml Tritón 10%

89ml d dH₂O

2. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Solución de Formaldehído 11% (Solución de entrecruzamiento)

11% Formaldehído, 0.1M NaCl, 1M EDTA (Ph 8), 0.5M EGTA (Ph 8), 50 Mm Hepes (Ph 8).

Extracción de núcleos

Buffer 1

50Mm Hepes-KOH (Ph 7.5)

140Mm NaCl

1Mm EDTA (Ph 8)

10% Glicerol

0.5% NP-40

0.25% Tritón X-100

Buffer 2

200Mm NaCl

1Mm EDTA (Ph 8)

0.5Mm EGTA (Ph 8)

10Mm Tris-HCl (Ph 8)

Buffer 3

1Mm EDTA (Ph 8)

0.5Mm EGTA (Ph 8)

10Mm Tris-HCl (Ph 8)

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de usar.

Proteína G

Se bloquean 500µl de proteína G con 30µl de DNA de esperma de salmón (10mg/ml) y 15µl de albúmina sérica bovina (BSA, 20mg/ml) mezclando durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la proteína G se lava 3 veces con buffer RIPA, centrifugando a 3000rpm por 2min y descartando el sobrenadante. La proteína G bloqueada se resuspende en buffer TE (1:1).

Buffer de inmunoprecipitación

Para cada inmunoprecipitación utilizando 500µl de cromatina previamente bloqueada (“cromatina limpia”):

400µl TE

100µl Tritón 10%

50µl Desoxicolato de sodio 10%

10µl Mezcla de inhibidores de proteasas (Leupeptina y Aprotinina)

Buffer RIPa

50Mm Hepes (Ph 7.6)

1Mm EDTA

0.7% Desoxicolato de sodio

0.5M Cloruro de litio

1% NP-40

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de usar.

PCR

En la **Tabla 1** se enlistan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes y promotores de interés.

Abreviaturas [S: sentido; A: antisentido; pb: pares de bases

Gen	Secuencia del oligonucleótido 5'-- 3'	T.A (temperatura de alineamiento)	Ciclos	Tamaño (pb)
<i>ski</i> (humano/rata)	S: cac cct cgc cag cgc ctt tc A: ctt gcc gca ggt gct cca ac	60°C	28	519
<i>smad7</i> (humano/rata)	S: gcc ctc tet gga tat ctt ct A: gct gca taa act cgt ggt ca	55°C	26	319
<i>snoN</i> (humano)	S: ctt ctg ctg tat ccc agt cta A: tca caa gaa gcg gag atg aag c	60°C	23	308
<i>snoN/snoN2</i> (rata)	S: ctg ctg cgt ccc agt cta A: tga act gct cag cat ctc cac ctc cat	60°C	23	420/308
<i>pai-1</i> (rata)	S: gta gca cag gca ctg caa aa A: gcc gaa cca caa aga gaa ag	55°C	24	142
<i>gadd45b</i> (humano/rata)	S: caa cgc ggt tca gaa gat gc A: tgt cgg ggt cca cat tca tc	60°C	23	128
<i>β-actina</i> (humano/rata)	S: ggg tca gaa gga ttc cta tg A: ggt ctc aaa cat gat ctg gg	55°C	21	237
Promotor de smad7 (humano/rata)	S: cct ctg ctc ggc tgg ttc cac tgc A: tag aaa ccc gat ctg ttg ttt gcg	65°C	29	132