



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de los niveles de expresión del correpressor transcripcional SnoN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Biol. Diana Grisel Ríos López

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova (Facultad de Química, UNAM)
Dr. Félix Recillas Targa (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

MÉXICO, D. F. Octubre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Regulación de los niveles de expresión del correpressor transcripcional SnoN

RECONOCIMIENTO

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 comité tutorial que evaluó el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

- Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)
- Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova (Facultad de Química, UNAM)
- Dr. Félix Recillas Targa (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

El jurado de examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

- | | |
|-------------|---------------------------------|
| PRESIDENTE: | Dr. Jesús Adolfo García Sáinz |
| SECRETARIO: | Dr. Jesús Chimal Monroy |
| VOCAL: | Dr. Ángel Zarain Herzberg |
| VOCAL: | Dr. Roberto Hernández Fernández |
| VOCAL: | Dr. Leonardo Peraza Reyes |

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 Silva por su apoyo en mi formación académica y los valiosos consejos y enseñanzas compartidas

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

A la Dra. Cassandre Caligaris por permitirme ser parte de su proyecto, le agradezco sus valiosas enseñanzas y el apoyo teórico-técnico prestado en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y al Dr. Félix Recillas Targa, por su asesoriamiento y los invaluable comentarios realizados sobre mi 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 Ortínez 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 de los estudios de Posgrado (PAEP), por el financiamiento hacia diversas actividades académicas que enriquecieron mi formación científica.

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

Índice

Abreviaturas	7
RESUMEN.....	8
Abstract.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
El TGF β	10
Las proteínas Smad.....	11
Regulación transcripcional vía las Smads.....	14
La proteína SnoN	14
Estructura de SnoN	15
SnoN funciona como co-regulador transcripcional	15
El papel biológico de SnoN	16
SnoN contribuye al mantenimiento de la pluripotencia	16
SnoN y el proceso de angiogénesis.....	16
SnoN y la glándula mamaria	16
SnoN y la senescencia celular.....	17
SnoN tiene un papel dual en el cáncer	18
Regulación de la expresión de SnoN	18
Regulación transcripcional del gen que codifica para SnoN: el promotor del gen humano <i>skil</i> ...	19
El gen <i>sno/skil</i> es regulado por el TGFβ	20
Regulación Transcripcional del gen de SnoN por un <i>super enhancer</i>	21
Modulación de la estabilidad de la proteína SnoN.....	23
ANTECEDENTES	25
SnoN y la regeneración hepática	25
Señales alternas a la vía del TGFβ/R-Smad que regulan la expresión de SnoN	27
PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
Objetivos particulares:	29
RESULTADOS	35
I. Regulación de la expresión de SnoN por un <i>super-enhancer</i>	35
I.I Identificación de secuencias potenciales de enhancer en el gen <i>sno</i> de ratón.....	35
I.II Identificación de un super-enhancer putativo hacia la región 5' del gen de <i>sno</i> compuesto de un cluster de enhancers.....	37
II. Análisis de factores transcripcionales en el promotor de <i>sno</i>.....	38
II.Regulación de la expresión de SnoN en Hepatocitos.....	43
II.I En los hepatocitos, el mantenimiento de los niveles basales de la proteína SnoN depende de una traducción constante de su RNAm.	44
II.II La expresión de SnoN es regulada por la señal del TGF β a nivel de proteína y de transcrito en hepatocitos.....	45
II.III Los niveles de la proteína SnoN incrementan por compuestos que modulan la polimerización de actina	46
II. IV Los niveles de SnoN son incrementados por compuestos que modulan la polimerización de actina por un mecanismo independiente de los niveles de su transcrito.	48
II. IV El incremento de los niveles de SnoN por compuestos que modulan la polimerización de actina es un proceso independiente de la señalización por TGF β	49

DISCUSIÓN.....	49
Análisis de la regulación de la expresión de SnoN por un <i>super-enhancer</i>	49
El promotor del gen sno tiene sitios de unión para los factores TEAD	50
Regulación de la expresión de SnoN por cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina	52
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS.....	55
REFERENCIAS.....	56
Anexo1. Secuencias de posibles enhancer para <i>sno</i> en <i>Mus musculus</i>	61
Anexo 2 Propiedades de los compuestos empleados que modulan el citoesqueleto de actina	65
Anexo 3. Lista de Anticuerpos utilizados	65
Anexo 4. Soluciones empleadas	65
PUBLICACIONES.....	68

Abreviaturas

ActD	ActinomicinaD
APC	Complejo Promotor de la Anafase
C-Terminal	Carboxilo Terminal
Co-Smad	Smad Común
CHX	Cicloheximida
CitoD	Citocalasina D
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
HAT	Acetilasa de Histonas
HDAC	Desacetilasa de Histonas
I-Smad	Smad Inhibitoria
IP	Inmunoprecipitación
Jasp	Jasplaquinolida
LPA	Ácido Lisofosfatídico
MH1	Dominio 1 de unión a MAD
MH2	Dominio 2 de unión a MAD
N-Cor	Correpresor de receptor nuclear
MeCP2	Proteína de unión a CpG metiladas
mSin3A	Componente del core de un complejo correpresor modificador de la cromatina
R-Smad	Smad activada por el Receptor
S1P	Esfingosina 1 Fosfato
SBE	Elemento de unión a las Smad
Smurf 2	Factor relacionado a la ubiquitinización de las Smads
Ski	Sloan Kettering Institute
SnoN	Ski related Novel gene Non alu containing
TβRII	Receptor Tipo II de TGFβ
TEAD	TEA Domain Family Member 1
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante Beta
YAP	<u>Y</u> es-associated protein, por sus siglas en inglés
TAZ	<u>T</u> ranscriptional coactivator with PDZ-binding motif, también conocido como WWTR1
TFBS	Sitio de unión a un Factor transcripcional
TRE	Elemento de Respuesta a TGFβ en el promotor de un gen

RESUMEN

El TGF β es una citocina pleiotrópica que controla múltiples procesos celulares como la proliferación celular, la apoptosis, la producción de matriz extracelular entre otros procesos que dependen del tipo y contexto celular. La proteína SnoN es un corepresor transcripcional, de genes inducidos por la citocina TGF β y participa en procesos de proliferación celular, senescencia y diferenciación. Se ha establecido que el TGF β es una de las principales señales que controla la estabilidad de proteína y el transcrito de SnoN a través de sus efectores intracelulares, las proteínas R-Smad/Smad4.

SnoN presenta una expresión ubicua, con bajos niveles de expresión basal en células normales. Los niveles de SnoN son controlados estrictamente desde la transcripción del gen, a través de su promotor y/o *super-enhancer*, y a nivel de la estabilidad de la proteína por modificaciones postraduccionales. Alteraciones en sus niveles basales pueden tener consecuencias en la homeostasis celular y en la respuesta mediada por TGF β en las células. En un proceso de regeneración hepática se ha observado un aumento en los niveles de la proteína y del transcrito de SnoN, a pesar de que la señal del TGF β se mantiene activa durante este proceso y conociendo que es una señal que conduce a la degradación de SnoN; sin embargo, se desconoce la señal y los mecanismos que controlan la expresión de SnoN en dicho proceso y en particular en los hepatocitos en regeneración.

En este trabajo identificamos señales alternas a la vía TGF β /R-Smads que regulan los niveles de expresión de SnoN en los hepatocitos. Estudiamos la expresión de SnoN a nivel de una regulación transcripcional y a nivel de la estabilidad de la proteína. En el primer caso, se identificó mediante un análisis bioinformático, un *super-enhancer* putativo en una región distante al extremo 5' del promotor del gen de *sno*, que a diferencia del *super-enhancer* reportado en humano, este comprende 8 secuencias *enhancer* putativas definidas por marcas de cromatina como H3K4me1, H3K27ac, y por los factores Med-1, p300 y Pol II, que se distribuyen en una región de aproximadamente 22 kb. Adicional a ello, identificamos en el promotor del gen *sno* sitios de unión para el factor transcripcional TEAD1 que regula genes dependientes de los co-factores YAP y TAZ, los cuales son modulados por la dinámica del citoesqueleto de actina.

En cuanto a la regulación de la estabilidad de la proteína, observaciones previas del laboratorio mostraban que la proteína SnoN es regulada por compuestos que modulan la dinámica del citoesqueleto de actina. Los resultados de este trabajo muestran que los niveles de la proteína SnoN aumentan cuando se promueve la polimerización de actina, y este incremento en los niveles de la proteína no depende de la transcripción del gen *sno*. Además, los resultados muestran que otras señales independientes al TGF β , como las de los GPCRs, podrían controlar la estabilidad de SnoN en los hepatocitos, principalmente vía la regulación de la polimerización de actina.

Abstract

Transforming Growth Factor beta (TGF β) is a pleiotropic cytokine that regulate numerous cellular processes such as cell proliferation, apoptosis and production of extracellular matrix depending on cell type. SnoN function as transcriptional co-repressor of TGF β /Smad pathway, and participate in several processes like proliferation, differentiation and aging. TGF β is the main signal that regulates the stability of SnoN protein and its gene expression.

SnoN expression is controlled at transcripcional level by its gene promoter and a super-enhancer, whereas their protein stability is controlled by post-translational modifications. During hepatic regeneration induced by partial hepatectomy, the SnoN mRNA and protein are increased by an unknown mechanism. We decided to identify additional signals and mechanisms to the TGF- β pathway that control SnoN expression in hepatocytes . We identified a super-enhancer putative in the mouse *sno* gene, composed by a cluster of 8 enhancer sequences, which were defined by epigenetic marks such as H3K4me1, H3K27ac, and also by the presence of transcriptional factors as Med-1, p300 and Pol II distributed in a region of 22 Kb. Furthermore, we identified TEAD binding sites on *sno* gene promoter, these transcriptional factors are regulated by the cofactors YAP and TAZ that are modulated by cytoskeletal dynamics.

Furthermore, we showed that SnoN protein levels increased when actin polimerization was induced by compounds as Sphingosine 1-Phosphate, CytochalasinD and Jasplakinolide, and this increase of SnoN levels was independent of *sno* gene transcription. Data suggest that TGF β -independent signals like GPCRs can also regulate SnoN expression in hepatocytes by modulating actin polymerization.

INTRODUCCIÓN

La transducción de señales es un proceso mediante el cual las células perciben su entorno a través de receptores para diversas señales y generan una respuesta a la misma. Los procesos de señalización celular, son mecanismos básicos inherentes a la vida, lo cual permite la evolución, por que no hay cambio si no existe un receptor para percibir las señales, y todo un proceso orquestado para responder a dicha señal inductora del cambio, así como la capacidad de adaptarse al mismo.

Una misma señal puede ser percibida e interpretada de manera diferente dependiendo del tipo celular. Los elementos básicos que integran una vía de transducción de señales son: la presencia de un receptor para detectar la señal, uno o varios transductores (quienes son los encargados de transducir la señal al interior de la célula), la activación o no de amplificadores, y la producción de segundos mensajeros. El control o modulación de una vía de señalización esta dada a todos los niveles, desde la producción y disposición de ligandos, sus receptores y la activación o no de los transductores, y de las proteínas o ácidos nucleicos involucrados. Los mecanismos que operan son muy variados, y principalmente involucran interacciones proteína-proteína, modificaciones postraduccionales o interacciones proteína-ácidos nucleicos. Estas interacciones, dependiendo la naturaleza y función de los elementos participantes, van a promover procesos de activación o inactivación de enzimas, estabilidad o degradación de proteínas, secreción de vesículas, reordenamiento del citoesqueleto, así como inducción o represión de genes, entre otras.

En este trabajo nosotros nos enfocamos en el estudio de SnoN, un regulador negativo de la vía de la citocina TGF β .

El TGF β

El Factor de Crecimiento Transformante beta mejor conocido como TGF β fue identificado en 1980 por la Dra. Anita Roberts (NIH, E.U.) (Roberts *et al.* 1980). Esta citocina controla una amplia diversidad de procesos celulares que dependen del contexto celular; entre estos destacan el control de la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la producción de matriz extracelular y otros efectos.

EL TGFβ, a través de su vía de señalización canónica, activa receptores transmembranales, primero uniéndose a su receptor transmembranal tipo II (TβRII). Este receptor tiene un actividad constitutiva de cinasa de residuos de Ser/Thr, que al unir a su ligando permite reclutar al receptor tipo I o ALK5 (*Activin Receptor-Like Kinase 5*) (Figura 1). Una vez formado el complejo heterotetramérico de receptores y ligando, el receptor tipo II TβRII transfosforila al receptor tipo I TβRI (ALK5) en una secuencia rica en serinas y treoninas TTSGSGSG, denominada dominio GS. Esta fosforilación activa al receptor TβRI, quien propaga la señal intracelular al fosforilar a las proteínas R-Smads (Smad2 y Smad3) en el motivo SSXS en su extremo C-terminal, y promueve así su interacción con Smad4 (Massagué, 1998).

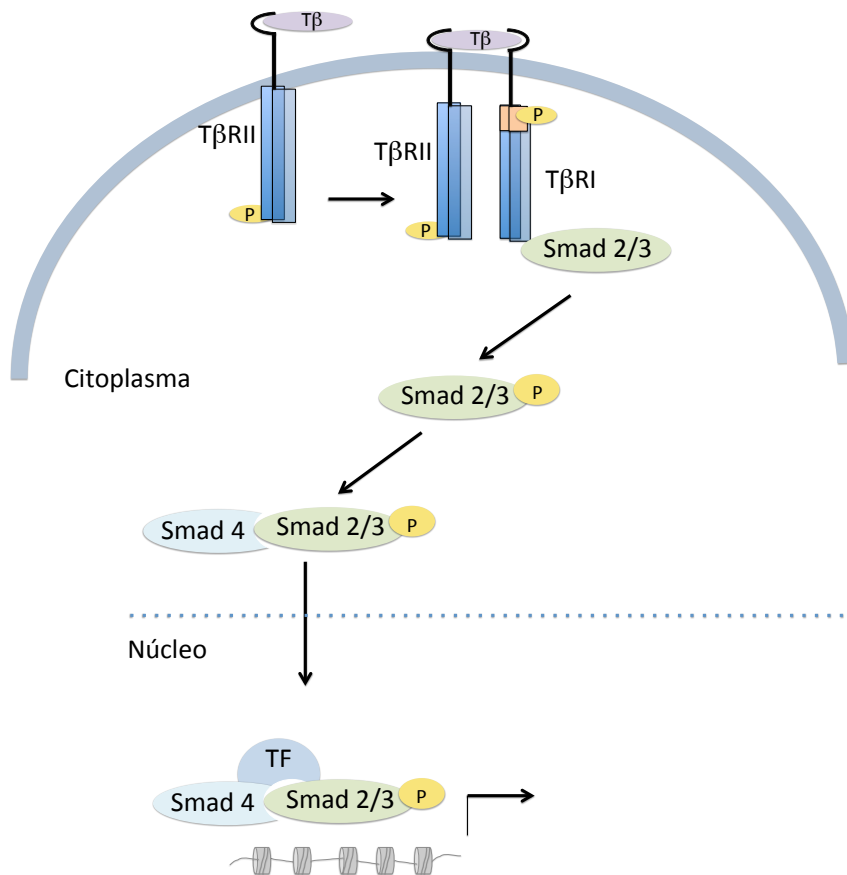


Figura 1. Vía de señalización canónica del TGFβ a través de las proteínas Smad2/3-Smad4. Un dímero de TGFβ se une al receptor tipo II y éste recluta y fosforila a TβRI para activar su función de cinasa. TβRI activo fosforila las proteínas Smad 2/3 en su extremo C-terminal y se promueve su oligomerización con Smad4. El complejo de Smads se transloca al núcleo y en conjunto con factores transcripcionales y los coactivadores regula a sus genes blanco.

Las proteínas Smad

Las proteínas Smads, denominadas así por la combinación de los nombres de las proteínas homólogas descubiertas en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (SMA: *small body size* y MAD: *Mad*),

Mother Against Decapentaplegic), son efectores de la vía canónica del TGF β y se clasifican en tres tipos:

1) R-Smads o Smads activadas por el receptor: Existen 5 proteínas R-Smad diferentes que son activadas dependiendo del miembro de la superfamilia del TGF β ; así, las Smad1, Smad5 y Smad8 responden a los estímulos de BMPs, MIS y GDFs, en tanto que las Smad2 y Smad3 se activan en respuesta a TGF β pero también en respuesta a Activina, Nodal y Miostatina (Massagué, 1998).

2) Co-Smad o Smad común. Es una Smad que funciona en la señalización de todos los miembros de la superfamilia del TGF β y se denomina Smad4.

3) I-Smads o Smads Inhibitorias: Estas son las proteínas Smad6 y Smad7 que funcionan dependiendo del miembro de la familia del TGF β de quien se trate; así, Smad6 es un regulador negativo principalmente para la vía de BMPs, mientras que Smad7 regula tanto la vía de TGF β como la de BMPs (Massagué, 1998).

Las proteínas Smad presentan 3 dominios estructurales característicos, a excepción de las I-Smads que solo presentan dos (Figura 2).

- En la porción N-terminal, el dominio MH1 (130 aa) de las R-Smads y de Smad4, se caracteriza por permitir la interacción de las Smads con el surco mayor del DNA, a través de su estructura de orquilla- β o “ β -hairpin”. Smad2 no tiene capacidad para interactuar con el DNA por contener una inserción en la secuencia de su exón 3 (Massagué, 1998).
- El dominio MH2 de 200 aa., localizado en la porción carboxilo, presenta el motivo SSXS que es fosforilado por el receptor tipo I (como ALK5), así como también contiene motivos para favorecer las interacciones con factores transcripcionales y favorece la heterodimerización entre las R-Smad y la Co-Smad (Massagué, 1998).
- Los dominios MH1 y MH2 están conectados por el dominio *linker*. Este dominio exhibe mayores diferencias, en cuanto a tamaño y similitud de secuencia, entre los diferentes tipos de Smads. A lo largo de esta secuencia, en las R-Smads se encuentran múltiples sitios de

fosforilación de serinas y treoninas para diferentes cinasas como CDK8/9, CDK4/6, Erk2 y GSK3 β que modulan la estabilidad, localización y función de las Smads, favoreciendo determinadas interacciones proteína-proteína (Alarcón et al. 2009, Alarcón et al. 2011).

En el dominio *linker* también se localiza el motivo PY, el cual es importante para mediar la interacción de las Smad con el dominio WW de ligasas de ubiquitina E3, como Smurf2, y así reclutarlas a sus sustratos como SnoN, para mediar su poliubiquitinación y posterior degradación vía el proteosoma.

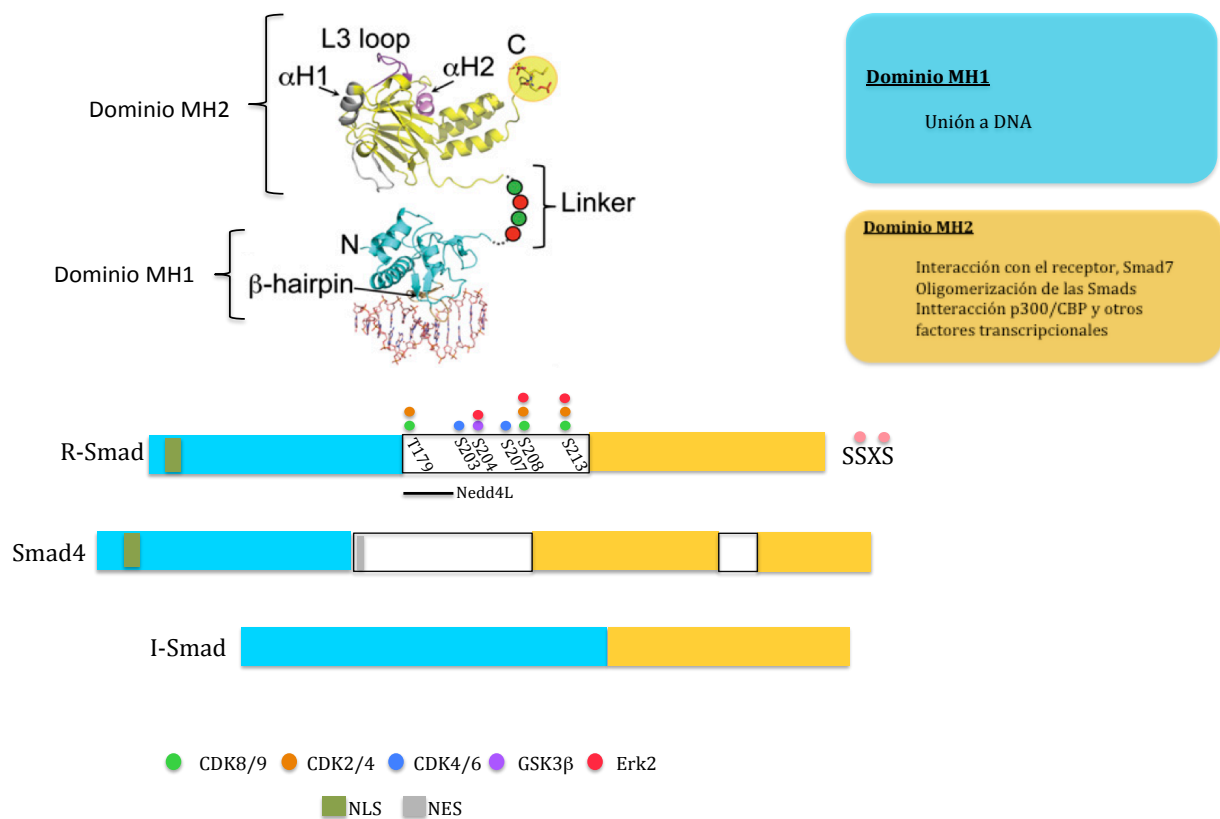


Figura 2. Esquema de los dominios estructurales de las proteínas Smad. En la parte superior se muestra una representación de los diferentes dominios de las Smads y algunas de sus funciones; abajo se esquematizan los diferentes dominios para las R-Smad, Smad4 y las I-Smad. De manera adicional se muestran los diferentes sitios de fosforilación para las R-Smad y la cinasa que participa. Modificado de Wrigton *et al.* 2009 y Alarcón *et al.* 2011.

Regulación transcripcional vía las Smads

La activación de las Smad2/3 por fosforilación y su oligomerización con Smad4 favorece la importación nuclear de estos heterotrímeros, en donde actúan principalmente como factores transcripcionales. El reconocimiento de las Smads por sus genes blanco se da por la interacción entre su estructura β -hairpin (horquilla beta) con el surco mayor del DNA. La secuencia reconocida por las Smads es corta, de entre 4 y 5 pares de bases (pb) 5'-CAGAC-3' y 5'-AGAC-3', y se denomina SBE (elementos de unión a las Smads) (Massagué y Wotton 2000). Las secuencias SBE son muy abundantes en el genoma, se repiten cada 1024 pb y las Smad se unen a ellas con una afinidad muy baja de 10^{-7} M, razón por la cual, las Smads requieren asociarse con una amplia diversidad de factores transcripcionales y con co-activadores transcripcionales como p300/CBP, a través de su extremo C-terminal para promover la regulación de sus genes blanco (Massagué y Wotton 2000). Los complejos de las proteínas R-Smad/Smad4 pueden asociarse también con correpresores transcripcionales como SnoN quien favorece el reclutamiento de un complejo correpresor conformado por HDACs y mSin3a para inhibir los genes blanco de las Smad.

La proteína SnoN

SnoN (*Ski novel protein Non Alu containing*) identificado inicialmente como una oncoproteína, consta de 684 a.a (aminoácidos). Su gen fue descubierto con base a su homología con el gen *v-ski* a partir de un tamizaje de librerías de cDNA (Nomura *et al.* 1989). SnoN es miembro de la familia de proteínas Ski (*Sloan Kettering Institute*); entre estas dos proteínas, hay una similitud del 50% entre sus aminoácidos y un 36 % de identidad. El gen que codifica para SnoN en humano, denominado *skil* (*ski-like*) puede dar lugar a 4 isoformas generadas por *splicing* alternativo denominadas: SnoN (684 aa), SnoN2 (638 aa), SnoA (*Alu-containing* de 415 aa) y SnoI (*Insertion* de 399 aa), mientras que en roedores como la rata y el ratón el gen denominado *sno* (*ski novel gene*) solo codifica para 2 isoformas: SnoN (684 aa) y SnoN2 (638 aa).

Cabe destacar que todas las isoformas son idénticas en los primeros 366 aa de su región N-terminal; sin embargo, se expresan diferencialmente: SnoN2 es una isoforma abundante en organismos como el ratón y la rata, mientras que en humano la isoforma más abundante es SnoN, en tanto que SnoI y SnoA se expresan principalmente en músculo esquelético del humano, (Figura 3) (Nomura *et al.* 1989; Zhu *et al.* 2012).

Estructura de SnoN

La proteína SnoN presenta hacia la región N-terminal dos dominios característicos muy conservados entre los miembros de la familia de proteínas Ski: el dominio DHD (*Dachshund Homology Domain*) y el dominio SAND (denominado así por las proteínas en que fue identificado: Sp100, AIRE1, NucP41/75 y DEAF1). El dominio DHD presenta una estructura globular y en algunas proteínas este dominio permite la interacción con el DNA; sin embargo, por estudios cristalográficos, se ha determinado que SnoN es incapaz de interactuar directamente con el DNA, por lo que a partir del dominio DHD, SnoN interactúa con proteínas y factores transcripcionales como Smad4, p53 y PML (Zhu *et al.* 2012). En cuanto a la región C-terminal, ésta es la más variable entre los miembros de la familia de Ski y entre las mismas isoformas de SnoN, pero es a través de esta región que se presenta la homo- o hetero-oligomerización entre SnoN y otras proteínas como Ski (Zhu *et al.* 2012) (Figura3).

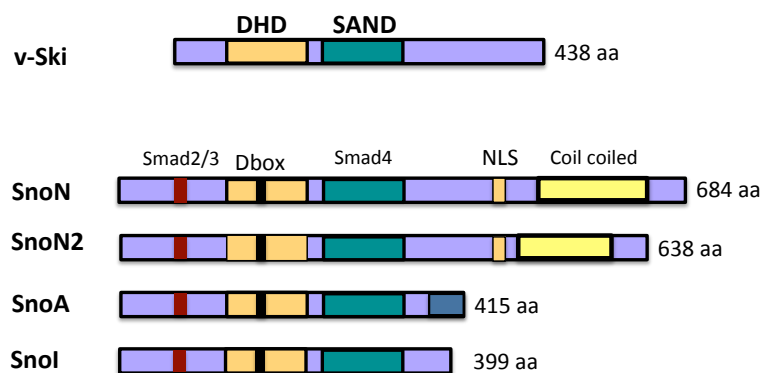


Figura 3. Dominios estructurales de SnoN y sus isoformas. Se resaltan los dominios estructurales característicos. En el N-terminal se muestra el DHS y SAND. También se muestran las isoformas de SnoN en humano como: SnoN2, SnoA y SnoI (Modificado de Deheuninck *et al.* 2012).

SnoN funciona como co-regulador transcripcional

Una de las principales funciones de SnoN es que actúa como coactivador o como correpresor transcripcional, dependiendo de con que proteínas se encuentre asociado en un tipo o contexto celular determinado. Ejemplo de esto ocurre en la vía del Factor de crecimiento Transformante beta o TGF β , en donde SnoN interacciona con las proteínas Smad2/3 y reprime su actividad transcripcional, al reclutar a otros correpresores, como mSin3A, N-CoR y HDACs, y con ello inhibe las acciones del TGF β . En otro contexto como la regeneración axonal, SnoN se asocia al complejo de coactivadores p300/CBP, que tienen actividad de acetiltransferasas y que promueven la expresión del gen que codifica para la proteína de andamiaje Ccd1 (Ikeuchi *et al.* 2009).

El papel biológico de SnoN

SnoN es expresado ubicuamente en todos los tejidos, desde los embrionarios hasta en los tejidos adultos en un nivel normalmente bajo; sin embargo, en determinados procesos fisiológicos se da un incremento en sus niveles proteicos, como por ejemplo en el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales, en la regeneración hepática, o en procesos patológicos como el cáncer (Pelzer et al. 1996, Macías Silva et al. 2002, Tsuneyoshi et al. 2012, Zhu y Luo 2012).

SnoN contribuye al mantenimiento de la pluripotencia

SnoN es un mediador de la función de las vías de señalización de Activina/Nodal, miembros de la superfamilia del TGF β que actúan a través de las proteínas Smad2 y Smad3. Ambas vías de señalización regulan la pluripotencia de células troncales, así como la especificación de linaje en mesodermo o endodermo respectivamente. En las células troncales, SnoN se encuentra en altos niveles y regula el mantenimiento del estado pluripotente al reprimir la expresión de genes de diferenciación de mesodermo, en tanto que al progresar la diferenciación, SnoN es degradado vía el sistema Ubiquitina Proteosoma y permite la expresión de genes de mesodermo y endodermo (Zhu *et al.* 2012; Tsuneyoshi et al. 2012).

SnoN y el proceso de angiogénesis

En el desarrollo embrionario, las vías de transducción de BMP9/BMP10 y de TGF β participan en la promoción de la angiogénesis, ambas vías activan al receptor tipo 1 ALK1 que activa a los efectores Smad1/Smad5. En este proceso, SnoN promueve la activación de las proteínas Smad1/Smad5 en células endoteliales, al facilitar la interacción de estas proteínas con el receptor ALK1 quien las fosforila para activarlas. De no ocurrir este proceso, se produce una angiogénesis defectuosa y malformaciones arteriovenosas, que conllevan a la letalidad embrionaria a los 12.5 días en los ratones embrionarios (Zhu *et al.* 2013).

SnoN y la glándula mamaria

Al final del embarazo y durante los primeros días de la lactancia hay un incremento en los niveles de SnoN, en tanto que sus niveles disminuyen durante la involución de la glándula mamaria y al final de la lactancia. Ratones transgénicos, que sobre-expresan una versión truncada de SnoN en el C-terminal

(correspondiente a una versión de solo 366 aa), tienen un incremento en la ramificación y en la proliferación alveolar en la glándula mamaria, lo que indica que SnoN es importante en el desarrollo de esta estructura (Jahchan *et al.* 2010).

SnoN y la senescencia celular

La proteína p53 ha sido considerada el guardián del genoma debido a que participa en mecanismos que aseguran la integridad y estabilidad del genoma. p53 es degradada continuamente por el sistema ubiquitina proteosoma para promover la progresión del ciclo celular. La proteína p53 se estabiliza por señales que generan daño al DNA como la radiación UV, roturas de doble cadena y detiene la progresión del ciclo celular de la fase G1/S hasta que no se haya reparado el daño al DNA. Cuando se mantiene una activación prolongada de p53, esto puede conllevar a apoptosis o a un proceso de senescencia celular.

La senescencia celular es un proceso fisiológico en el cual las células pierden su capacidad proliferativa. A diferencia de células en estado de quiescencia, las células senescentes presentan una disminución de proteínas de ciclo celular, expresan inhibidores de ciclo celular como CDKIs (p15, p21), secretan factores como TGF β , IGF, PAI1 así como factores pro-inflamatorios que de manera autocrina o paracrina reforzarán el estado de senescencia; además, las células senescentes son positivas a la tinción de SA- β -Galactosidasa (Muños y Serrano 2014).

Al intentar dilucidar las funciones de SnoN independientes de TGF β , la Dr. Kunxin Luo y su grupo de trabajo, desarrollaron un *knock-in* en ratón de una mutante de SnoN, incapaz de interactuar con las proteínas R-Smad y Smad4. Ellos observaron que los ratones *knock-in* presentan una disminución en su vida media, un decremento en su reproducción, el desarrollo de osteoporosis y la disminución de su capacidad regenerativa, similar a lo observado en ratones mutantes que expresan a p53 de forma activa. El mecanismo que interconecta a SnoN y p53, consiste en que SnoN regula positivamente la estabilidad de p53, favoreciendo el reclutamiento de esta a los cuerpos PML (*Promyelocytic Leukemia Virus*). La unión directa entre los a.a. 255-258 de SnoN y p53 estabiliza a esta última y evita su reconocimiento por la ligasa E3 Mdm2; así mismo, activa a p53 al favorecer su acetilación y fosforilación (Pan *et al.* 2009; Pan *et al.* 2012). Este es un ejemplo de cómo SnoN actúa como un supresor de tumores al favorecer la estabilidad de p53, que al ser estable y activa por un periodo prolongado de tiempo, conduce a un estado de células senescentes.

SnoN tiene un papel dual en el cáncer

SnoN fue identificado inicialmente como una proto-oncoproteína, sin embargo recientemente se ha demostrado que SnoN tienen un papel dual al actuar como supresor de tumores y como oncoproteína. Su papel como promotor de tumores está asociado a que sus niveles proteicos se han encontrado elevados en diferentes tipos de líneas celulares cancerosas, y en tejidos de carcinoma de esófago, melanoma y cáncer de mama positivo al receptor de estrógenos (Zhang *et al.* 2003, Poser *et al.* 2005 Akagi *et al.* 2008), en donde se cree que SnoN bloquea las acciones anti-proliferativas del TGF β .

En la glándula mamaria de ratones transgénicos que expresan el oncogen PyVmT (*Polyomavirus middle T*) se ha observado que si SnoN se sobre-expresa, entonces se incrementa la formación de múltiples adenocarcinomas y se presenta metástasis hacia pulmón (Jahchan *et al.* 2010); además, el gen de SnoN humano, localizado en el locus 3q26.2, se encuentra frecuentemente amplificado en cáncer de esófago, pulmón, ovario, cérvix, cuello y próstata (Imoto *et al.* 2001). En contraste, existe evidencia de que SnoN puede ser un supresor de tumores debido a que la delección de una copia de su gen en ratones, provoca un incremento en su susceptibilidad para desarrollar tumores por exposición a carcinógenos (Shinagawa *et al.* 2000). En el caso contrario, la disminución de la expresión de SnoN mediante shRNA, si bien inhibe la proliferación de las células cancerosas de pulmón y de mama *in vivo* e *in vitro* y por consiguiente el volumen tumoral, también promueve la transición epitelio-mesénquima y la metástasis (Zhu *et al.* 2007). Estos datos sugieren que un balance altamente regulado en los niveles proteicos de SnoN es muy importante para ejercer sus funciones adecuadamente.

Regulación de la expresión de SnoN

Dada la gran variedad de procesos en los que SnoN participa, se ha visto que la regulación de su expresión es finamente regulada a diferentes niveles, incluida la transcripción de su gen, la estabilidad de su proteína, y su localización subcelular.

A nivel transcripcional, el gen *sno* es inducido por la vía del TGF β y además puede ser regulado por otras señales como el estrés oxidativo, el daño tisular, el daño al DNA, por factores de crecimiento como el HGF, e inclusive por hormonas como la prolactina (Zhu *et al.* 2012; Pan *et al.* 2012).

Regulación transcripcional del gen que codifica para SnoN: el promotor del gen humano *skil*

Recientemente en el laboratorio se caracterizó el promotor del gen de SnoN en humano, el cual se denomina *skil* y en organismos como el ratón o la rata se denomina *sno* (Figura 6). En el promotor se han identificado diferentes sitios putativos de unión a factores transcripcionales y de manera particular, se ha demostrado la función de varios sitios SBES de unión para las Smads activadas por la vía del TGF β (Tecalco *et al.* 2012), (Figura 4). Cabe destacar que no se ha investigado la participación de todos los factores transcripcionales predichos en análisis *in silico*, los cuales curiosamente son factores transcripcionales activos en el proceso de regeneración hepática, como son los receptores de glucocorticoides y los del ácido retinoico, además de los factores C/EBPs α y β , y NF κ B; además se desconoce si estos pueden ser los responsables de la regulación del mRNA de SnoN en dicho proceso fisiológico. En la Figura 5 se muestran los factores transcripcionales predichos que podrían unirse al promotor del gen *skil*. Los factores mostrados son solamente aquellos que son capaces de interactuar con las R-Smads.

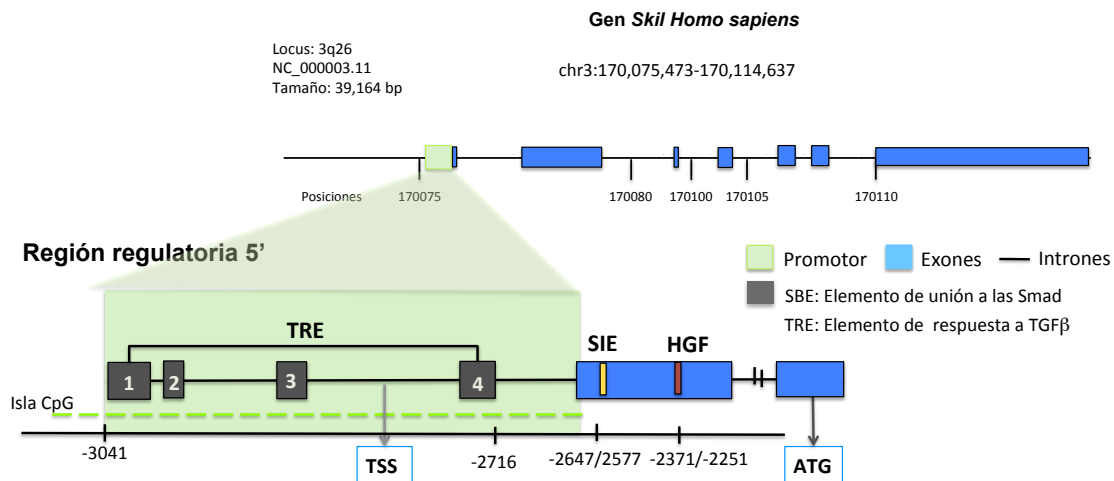


Figura 4. Promotor de *skil*. Se ejemplifica la localización del gen de *skil* en el cromosoma 3 humano y en una ampliación se detallan su secuencia promotora, resaltando los sitios de unión a las Smad, mostrados en recuadro gris, que en su conjunto conforman un TRE: elemento de respuesta a TGF β . También se muestra el SIE (Elemento Inhibitorio de las Smad) y el sitio de unión a HGF (Factor de Crecimiento de hepatocitos)

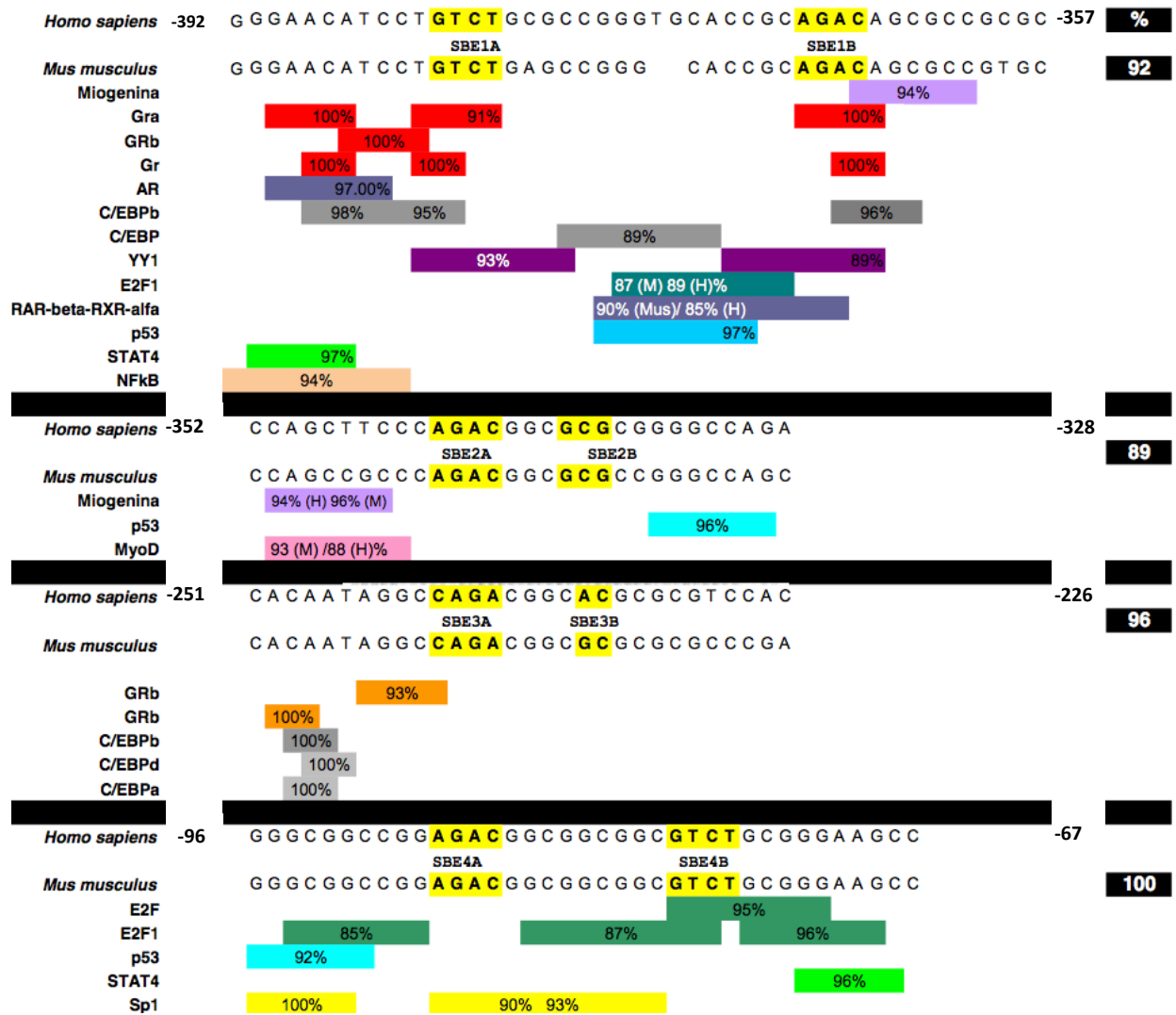


Figura 5. Sitios de unión a factores transcripcionales en el promotor de *skil*. Se muestran los TFBS cercanos a los elementos de respuesta a las Smads (SBES) y solo se muestran aquellos factores que pueden interactuar con las proteínas Smads. En cada recuadro de color se muestra el porcentaje de identidad de los TFBS putativos con relación a la secuencia consenso de la base de datos de Transfac, de acuerdo al programa Alggene. En los recuadros negros se muestra el grado de identidad entre las secuencias promotoras de humano y ratón (Modificado de Domínguez, 2008, y Tecalco *et al.* 2012).

El gen *sno/skil* es regulado por el TGFβ

De acuerdo a la caracterización del promotor del gen *skil*, se determinó el mecanismo mediante el cual este promotor es regulado por los efectores de la vía del TGFβ. El mecanismo consiste en que en estado basal; es decir, sin estímulo, la proteína Smad4 en conjunto con SnoN y HDACs regulan negativamente la expresión del gen que codifica para SnoN. La activación de la transcripción se da cuando la proteína SnoN es degradada vía el proteosoma, en respuesta al TGFβ, participando las proteínas Smad2/3 como adaptadoras para las diferentes ligasas de ubiquitina como Smurf2, APC y

Arkadia. Posteriormente, una vez que se degrada la proteína SnoN en respuesta al estímulo por TGFβ, el complejo Smad2/4 induce la transcripción del gen de SnoN, aumentando los niveles del RNAm y de la proteína, y cuando la proteína se acumula funciona como parte de una asa de retroalimentación negativa, esta reprime la expresión de probablemente varios de los genes controlados por las proteínas Smad2/3; un ejemplo de esos genes, es el propio gen de SnoN (Tecalco *et al.* 2012) (Figura 6).

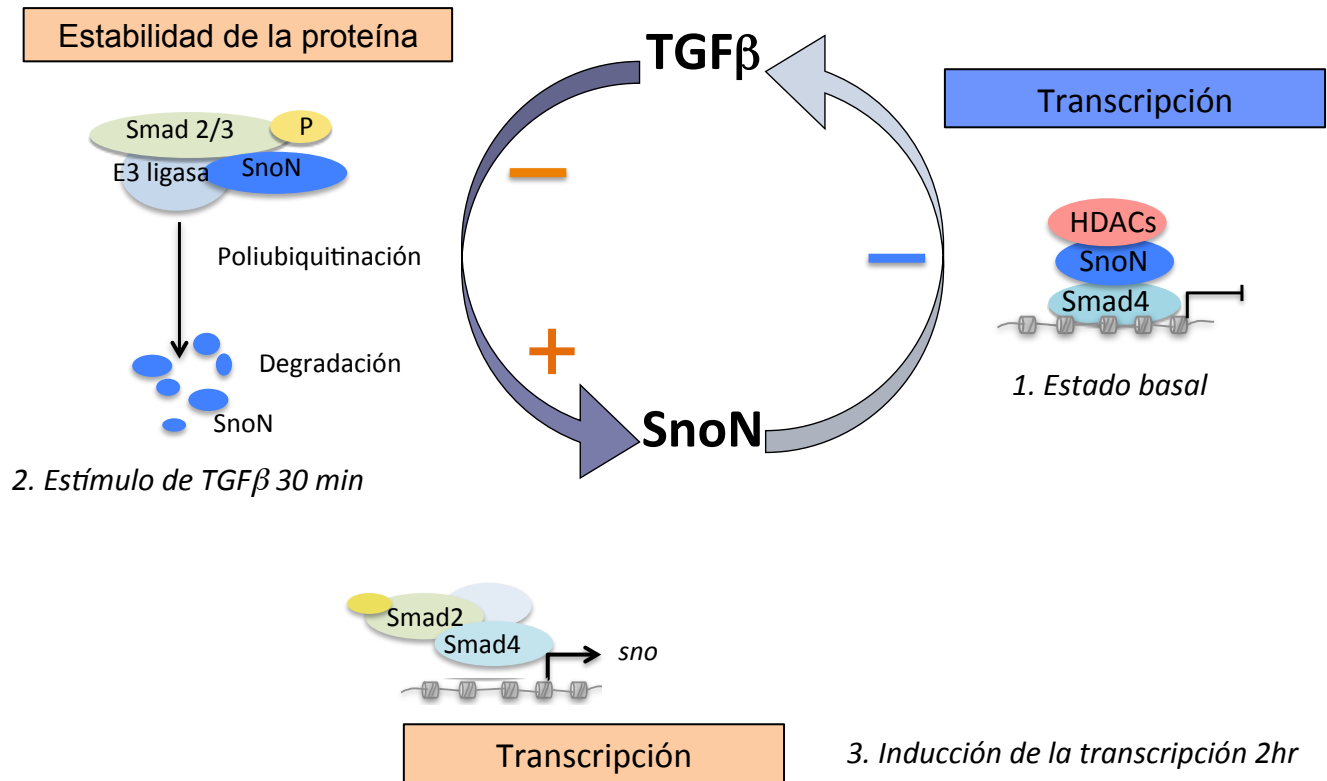


Figura 6. Regulación entre la vía del TGFβ y SnoN. En un estado basal se encuentra reprimida la expresión del gen *skil* por su propia proteína y a tiempos cortos de estimulación con TGFβ se degrada SnoN vía proteosoma por el complejo p-Smad2/3-E3 ligasa permitiendo la inducción de su gen a las 2 horas.

Regulación Transcripcional del gen de SnoN por un *super enhancer*

Un segundo mecanismo descrito para regular transcripcionalmente a SnoN, involucra la participación de un *super-enhancer* descrito para humano, localizado a -3.6 Kb del promotor de SnoN.

Un *enhancer* es una secuencia regulatoria que potencia la actividad transcripcional del gen sobre el que actúa y su acción es independiente de su orientación respecto a su gen blanco; actualmente estas

secuencias regulatorias se caracterizan por marcas de cromatina como la monometilación de la lisina 4 (H3K4me1), la acetilación de la lisina 27 (H3K27ac) y la presencia del factor p300 (Pott *et al.* 2015). Existe un subconjunto de enhancers denominados *super enhancers* definidos por las mismas marcas de cromatina de un enhancer como H3K4me1 y H3K27, y que además se caracterizan por presentar una alta densidad de sitios de unión a factores transcripcionales, sitios de unión a p300/CBP, un enriquecimiento en la unión del complejo Mediador Med1, así como a PolIII, cohesinas, eRNAs (transcritos no codificantes de la secuencia de enhancer), y adicional a ello la unión de los factores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog (Whyte *et al.* 2013). Otro subconjunto de los mismos es el que comprende aquellos que pueden organizarse a manera de “*clusters*”, que se refiere a regiones con varias secuencias de *enhancers* separadas una de otra por una distancia arbitraria no mayor a 12.5 Kb (Pott *et al.* 2015). Funcionalmente el modo de acción es igual al de un enhancer; sin embargo, estas secuencias regulatorias se han asociado a genes que controlan la pluripotencia de células troncales, y que están involucrados en la especificación de linajes celulares, así como a oncogenes (Hnisz *et al.* 2013).

En el caso particular del gen de SnoN en humano, el *super-enhancer* descrito se caracteriza por presentar sitios de unión para los factores de pluripotencia: Nanog, Oct4 y Sox2. A través de la unión de estos factores, así como de la unión de proteínas Smad2/4 en el promotor del gen de SnoN, es que se promueve la transcripción del gen en el estado de pluripotencia de las hESC (células troncales embrionarias de humano) (Tsuneyoshi *et al.* 2012).

Existen condiciones, en las cuales células adultas ya diferenciadas son capaces de volver a expresar temporalmente los factores de un estado embrionario pluripotente, tal es el caso de los hepatocitos que en el proceso de regeneración hepática inducida por una hepatectomía parcial, expresan Oct4 y Nanog (Bhave *et al.* 2011); sin embargo, se desconoce si un *super-enhancer* podría controlar también la expresión de SnoN durante la regeneración hepática o en un proceso de diferenciación de células multipotentes como los hepatoblastos. Además, tampoco se sabe si el *super-enhancer* descrito en humano esta conservado en otras especies como el ratón y la rata.

Modulación de la estabilidad de la proteína SnoN

En ensayos *in vitro* en líneas celulares, el TGF β induce la degradación de la proteína SnoN vía el proteosoma, a tiempos cortos de tratamiento de alrededor de 30 min (Tecalco *et al.* 2012). Este proceso es mediado por las proteínas Smad2/3, quienes actúan como adaptadoras para reclutar ligasas de ubiquitina E3 como: Smurf2, APC y Arkadia, quienes marcan por poliubiquitinación a SnoN, para que sea reconocido y degradado vía el proteosoma (Peters, 1999; Bonni *et al.* 2001; Nagano *et al.* 2007).

Smurfs

Las Smurfs (“Smad Ubiquitin Related Factor”) son ligasas de ubiquitina E3 de la familia HECT y pertenecen a la subfamilia C2-WW (Bonni *et al.*; 2001). Las proteínas Smurf interactúan a través de su dominio WW con el motivo PY en la región *linker* de Smad2, y ésta a su vez puede interactuar simultáneamente con SnoN. La unión de Smad2 con Smurf2 favorece la interacción del dominio HECT de Smurf2 (el cual posee la actividad catalítica para transferir la ubiquitina) al dominio carboxilo de SnoN, promoviendo su poliubiquitinación y degradación vía el proteosoma. (Figura 7a) (Bonni *et al.* 2001).

Complejo promotor de la Anafase (APC)

Los niveles proteicos de SnoN son regulados durante la progresión del ciclo celular por el complejo promotor de la anafase (APC), disminuyendo sus niveles durante la mitosis. APC es un complejo conformado por 11 subunidades, de las cuales APC 11 es quien tiene la capacidad de ligasa E3 de ubiquitina con una estructura de tipo “RING-finger”. Para llevar a cabo su actividad de ligasa, esta proteína se asocia con las proteínas CDC20 y CDH1 que le confieren especificidad para actuar sobre los motivos de destrucción (D-box) de sus proteínas blanco durante la mitosis o la fase G1, respectivamente (Peters, 1999). El complejo CDH1/APC interactúa con el motivo D-box de SnoN y éste es poliubiquitinado en las lisinas K440, K446 y K449, y entonces es degradado vía el proteosoma (Figura 7b).

Arkadia

La proteína Arkadia, también conocida como “*RING-finger 111*”, es una ligasa de ubiquitina E3 que interacciona con el dominio SAND de SnoN, y promueve su poliubiquitinación y degradación vía el proteosoma (Figura 7c) (Nagano *et al.* 2007).

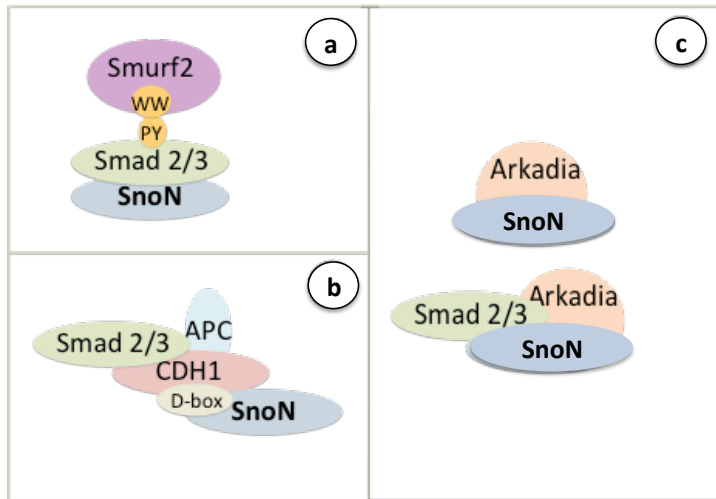


Figura 7. Mecanismos de regulación de SnoN por Smad2/3-E3 ligasas. (a) Smad2 favorece la interacción entre Smurf 2 y SnoN al interactuar el motivo PY de estas con el WW de Smurf2. (b) Smad2/3 y CDH1 median la interacción entre SnoN y APC a través del motivo D-box de SnoN. (c) Arkadia interacciona con SnoN de forma libre o en asociación con las Smads2/3.

Regulación de SnoN por sumoilación

Además de su ubiquitinación, SnoN es regulado por sumoilación. Sumo es una proteína de 11 kDa que se adiciona covalentemente a los residuos de lisina que se localizan en la secuencia consenso yKxE, en donde “y” corresponde a un aminoácido hidrofóbico, “K” es un residuo de lisina, “x” representa cualquier aminoácido y “E” es un residuo de ácido glutámico (Hannoun *et al.* 2010). El proceso de sumoilación es catalizado por 3 enzimas: E1, E2 y E3. La enzima E1 (Aos1/Uba2) activa a Sumo, la Enzima E2 (Ubc9) es la enzima de conjugación y la enzima E3 es quien transfiere a Sumo a la proteína blanco (Hannoun *et al.* 2010).

SnoN es modificado por sumoilación en las lisinas 50 y 383 en un proceso mediado por la enzima E2 (Ubc9) y la enzima E3 (PIAS1), y esto promueve que SnoN regule diferencialmente a los promotores de sus genes blanco, en particular, reprime la expresión de la miogenina (Han *et al.* 2006, Hsu *et al.* 2006).

TIF1 γ es otra enzima E3 que promueve la sumoilación de SnoN y no de SnoN2. La relevancia

funcional de esta modificación es que de esta manera SnoN bloquea el proceso de Transición Epitelio Mesénquima (EMT) mediado por la señal de TGF β en células NMuMG, en donde SnoN-Sumo correlaciona con una disminución de la expresión de genes relacionados a la EMT como Zeb1, Zeb2, *snail*, MMP9 y PAI-1 (Ikeuchi *et al.* 2014).

Todos estos mecanismos y niveles de regulación sobre la proteína de SnoN y su transcrito sugieren que una alteración o pérdida de los mecanismos de su regulación pueden tener repercusiones sobre la homeostasis y respuesta de la célula. Así por ejemplo, los niveles de la proteína de SnoN se incrementan en determinados contextos fisiológicos pero también en contextos patológicos; por lo tanto, comprender cuales son los mecanismos que operan en una célula normal para controlar los niveles de SnoN nos permitiría entender que procesos se modulan en un modelo proliferativo como la regeneración hepática.

ANTECEDENTES

SnoN y la regeneración hepática

El hígado es un órgano con un papel importante en la regulación de la homeostasis metabólica, que participa en la síntesis, almacenaje y redistribución de nutrientes como las proteínas, ácidos grasos, vitaminas, carbohidratos, urea, la secreción de ácidos biliares, y es el principal órgano de detoxificación (Michalopoulos 2007, Taub, 2004). Aparte de sus funciones metabólicas, el hígado posee capacidad regenerativa que se activa cuando se produce algún daño o como respuesta de un proceso de detoxificación; sin embargo, esta capacidad regenerativa disminuye ante daños crónicos causados por toxinas, el abuso del alcohol o la hepatitis, y si el daño se mantiene, puede conllevar a la cirrosis y el cáncer hepático (Taub, 2004).

La capacidad regenerativa del hígado puede ser estudiada a través de diferentes modelos animales que pueden ser químicos o quirúrgicos. En los modelos de daño químico se emplean compuestos como el tetracloruro de carbono CCl₄ o acetaminofeno, los cuales provocan la muerte de los hepatocitos y producen inflamación. La restitución de la masa hepática ocurre solo en el tejido dañado y normalmente involucra la participación de células troncales. El modelo quirúrgico por excelencia es la hepatectomía parcial desarrollada en roedores por Higgins y Anderson en 1931. El modelo consiste de una remoción quirúrgica de 2/3 partes del hígado (lóbulos mayores), y la masa hepática se restaura a

los 10 días después de que se realiza la cirugía. Las ventajas de este modelo es que no involucra inflamación, necrosis o fibrosis, y la restitución de la masa hepática se lleva a cabo por la proliferación de los tipos celulares restantes y no involucra células troncales o progenitoras como en los modelos químicos (Taub, 2004; Kang *et al.* 2012).

El proceso de regeneración hepática es complejo y en él, participan diversas señales, factores e inclusive cambios mecánicos que en su conjunto actúan sinérgicamente para restituir la masa hepática, promover el remodelaje de la matriz extracelular y reconstituir la vasculatura hepática. Dentro de los factores involucrados se encuentran los cambios en las proteínas que median los contactos célula-célula y célula-matriz, que se alteran por la propia hepatectomía o por la circulación portal, la cual aumenta después de la hepatectomía y acarrea un conjunto de señales que favorecen la regeneración. Una de las señales que regula la homeostasis de los hepatocitos es el TGF β , que tienen efectos antiproliferativos en este tipo celular y promueve la apoptosis en cultivos primarios. En la regeneración hepática, las células de *Kupffer* y las células endoteliales son los principales productores de esta citosina, y se cree que esta es una de las señales importantes para detener el proceso de hiperplasia en el hígado; sin embargo, la vía canónica del TGF β se encuentra activa durante las etapas tempranas del proceso de regeneración en los hepatocitos (Macías Silva *et al.* 2002).

En los hepatocitos, y no así en las células no parenquimatosas del hígado (como las células estrelladas, las células de *Kupffer* y las células epiteliales del ducto biliar, entre otras) se ha observado un aumento en los niveles de expresión de SnoN, al inducir el proceso de regeneración hepática por hepatectomía parcial, y este aumento se ve reflejado tanto a nivel de RNAm como de proteína (Vázquez-Victorio *et al.* 2015, Macías Silva *et al.* 2002). Este aumento ocurre alrededor de las 2 h posteriores a la hepatectomía y los niveles proteicos de SnoN se mantienen elevados al menos durante 48 h post-hepatectomía (Vázquez-Victorio *et al.* 2015; Macías Silva *et al.* 2002). El incremento en los niveles de SnoN sugiere que este puede ser uno de los mecanismos mediante los cuales se bloquean los efectos antiproliferativos del TGF β en los hepatocitos en los inicios de la regeneración hepática. No obstante, el TGF β es una de las principales señales que promueven la degradación de SnoN, y al tratar cultivos primarios de hepatocitos aislados a las 2 hrs post-hepatectomía, se ha observado que el TGF β promueve la degradación de SnoN (Vázquez-Victorio *et al.* 2015). Por lo tanto resulta interesante determinar que señales alternas a TGF β regulan la expresión de SnoN en los hepatocitos.

Los hepatocitos son células que perciben señales mecánicas y estas pueden determinar diferentes respuestas a una misma señal. Un elemento que determina como el hepatocito reconoce su medio extracelular es el citoesqueleto, una red interconectada de filamentos a través del cual se integran múltiples señales entre ellas las mecánicas, que repercuten en determinar la forma de la célula, ayudan para su migración, la organización de sus organelos, el tráfico del contenido intracelular, y modulan la respuesta a citocinas (Fletcher *et al.* 2010). Para llevar a cabo todas sus funciones, el citoesqueleto se compone de 3 principales tipos de filamentos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada uno de estos filamentos genera una red o estructura muy particular que va a responder a diferentes estímulos, dadas las propiedades particulares de cada filamento; así, las principales diferencias entre estos filamentos son su rigidez, la dinámica de su ensamblaje, su polaridad y el tipo de motores moleculares que se asocian a ellos (Fletcher *et al.* 2010).

Señales alternas a la vía del TGF β /R-Smad que regulan la expresión de SnoN

La regulación de la estabilidad de SnoN es dependiente del contexto celular; así, datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la regulación de SnoN es diferente en líneas celulares hepáticas transformadas *versus* no transformadas, detectando que existen varios mecanismos en hepatocitos que regulan la estabilidad de SnoN, los cuales no se observan en células cancerosas (Caligaris *et al.* 2015). Una de las observaciones más importantes al respecto, es que la modulación del estado de polimerización del citoesqueleto de actina vía Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs) afecta diferencialmente la estabilidad de Ski y SnoN en hepatocitos normales (Caligaris *et al.* 2015, Vázquez-Victorio *et al.* 2015). La esfingosina 1-Fosfato (S1P), un lisofosfolípido derivado del metabolismo de la esfingosina, y el ácido Lisofosfatídico (LPA: por sus siglas en inglés *Lisophosphatidic acid*), un lípido derivado del metabolismo del ácido fosfatídico el cual al ser desacetilado por la fosfolipasa A (PLA) genera el LPA, son compuestos que señalizan a través de GPCRs (Cyster *et al.* 2012, Swarthout *et al.* 2000). La activación de diferentes proteínas G promueve la activación de diferentes vías de señalización como la de adenilato ciclasa, PI3K/AKT, MAPK (JNK, ERK), PLC, por estos compuestos, y de manera particular en los hepatocitos regulan las vías de Rho y Rac, que regulan la polimerización del citoesqueleto de actina (Spiegel y Milsten, 2003, Brinkmann 2007).

Los trabajos de laboratorio indican que en células normales de manera alterna al TGF β , la polimerización de actina a través de vías como GPCR/G_{12/13}/Rho/ROCK y GPCR/Gs/cAMP, o por

compuestos químicos (LatrunculinaB o Citocalasina D, que promueven la despolimerización de actina, o Jasplaquinolida que promueve la polimerización de actina), controlan diferencialmente la estabilidad de las proteínas SnoN y Ski (Himes *et al.* 1976, Caligaris *et al.* 2015, Vázquez-Victorio *et al.* 2015). Mientras que cuando se favorece la polimerización de actina, los niveles de la proteína Ski disminuyen, los niveles proteicos de SnoN se ven incrementados, y por el contrario cuando se favorece un estado de despolimerización y se incrementan las cantidades de G-actina, los niveles de Ski incrementan (Vázquez-Victorio *et al.* 2015). Sin embargo, se desconocen los detalles de los mecanismos moleculares que controlan estos compuestos para inducir el incremento en los niveles de SnoN, y si este incremento es dependiente de la transcripción del gen *sno*.

Otro elemento a considerar en la regulación transcripcional del gen de SnoN, es que la expresión de su gen es regulada por un *super-enhancer* (Tsuneyoshi *et al.* 2012). Esta secuencia regulatoria se describió en células troncales pluripotentes de humano y presenta sitios de unión a los factores Oct4, Sox2 y Nanog. Los hepatocitos en un proceso de regeneración son células capaces de volver a expresar los factores Oct4 y Nanog (Bhave *et al.* 2011); sin embargo, se desconoce si el *super-enhancer* se encuentra conservado entre especies y si podría regular la expresión de SnoN en hepatocitos.

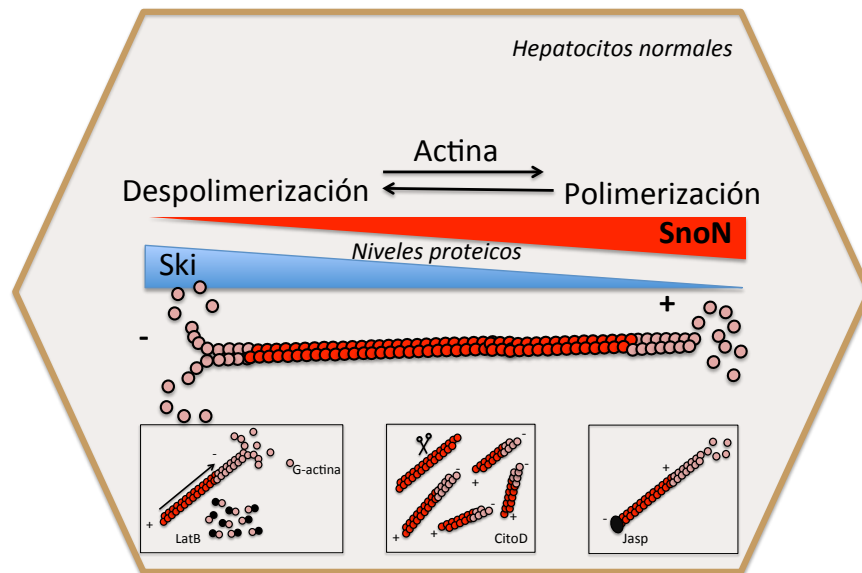


Figura 8. Las proteínas SnoN y Ski se regulan diferencialmente por la polimerización del citoesqueleto de actina. En este modelo se muestra que dos reguladores de la señalización de TGF β se regulan diferencialmente de acuerdo al estado de polimerización de la actina; así, los niveles de SnoN se incrementan cuando se favorece la polimerización de la actina, en tanto que los niveles de Ski aumentan cuando por el contrario hay un estado de actina monomérica y es de resaltar que este proceso es observado en hepatocitos normales (no cancerosos) y no así en líneas celulares transformadas de hepatocarcinoma.

PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

SnoN es un regulador negativo de las señales del TGF β , que inhibe la expresión de genes inducidos por esta citocina al actuar como correpressor transcripcional de las proteínas R-Smad. El TGF β ejerce diferentes respuestas celulares dependiendo del contexto celular y en células epiteliales como los hepatocitos actúa como un factor citostático y pro-apoptótico.

Durante la regeneración hepática, se ha observado un incremento en los niveles del transcrito y de la proteína de SnoN en los hepatocitos, a pesar de que la principal señal de degradación de esta proteína, el TGF β se mantiene activo durante este proceso. Esto hace considerar que SnoN podría controlar los efectos antiproliferativos de esta citocina en etapas tempranas de la regeneración hepática. Por lo tanto, es relevante conocer si hay otras señales, que en conjunto o independientemente a las ya establecidas por la vía TGF β /R-Smads, regulan la expresión de SnoN en los hepatocitos y el nivel al cual actúan.

HIPÓTESIS

Existen mecanismos moleculares, alternos a los usados por la vía TGF β /R-Smad, que regulan los niveles de expresión de SnoN en los hepatocitos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar a los mecanismos moleculares de regulación, adicionales a los usados por la vía del TGF β /R-Smad, que controlan la expresión de SnoN en hepatocitos.

Objetivos particulares:

I. Análisis in silico de las secuencias regulatorias del gen sno:

1. Investigar si el *super-enhancer* descrito para el gen *skil* en humano se encuentra conservado en otras especies como el ratón.

2. Identificar a los factores transcripcionales potenciales en el promotor del gen *sno* relevantes para los hepatocitos

II. Estudios de los mecanismos que regulan la estabilidad de la proteína SnoN en hepatocitos

1. Identificar las señales alternas al TGF β que modulan la expresión de la proteína SnoN en los hepatocitos, así como estudiar su mecanismo de acción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y reactivos

Se utilizó la línea celular C9 de hepatocitos de rata. Estas células fueron mantenidas en medio DMEM complementado con 10% de FBS (Suero fetal Bovino, por su siglas en inglés: *Fetal Bovine Serum*) más los antibióticos penicilina y estreptomina (Gibco), en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂.

Los compuestos Esfingosina 1 Fosfato (S1P, 1 μ M), Ácido Lisofosfatídico (LPA, 1 μ M), Citocalasina D (CytD, 5 μ M) y Actinomicina D (ActD, 5 μ g/ml) fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich*, SB431542 (10 μ M) de *Tocris Bioscience* mientras que Jasplaquinolida y Latrunculina B de *Calbiochem*, así como TGF β (0.3 nM) de *Pepru Tech*; cada compuesto se utilizó en los tiempos indicados.

Los anticuerpos empleados: anti-SnoN (H-317), anti-Smad4 (C20) y anti-Smad2/3 (N-19) fueron obtenidos de *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA), mientras que anti-fosfo-Smad2 fue de *Chemicon-Millipore* (Billerica, CA) y anti- β -tubulina de *Cell Signaling*.

RT-PCR

El RNA total fue aislado de células C9 por el método de Trizol. Para la síntesis de cDNA se usaron 2 μ g de RNA total, utilizando hexámeros al azar, y la enzima de *Moloney murine leukemia Virus* RT (M-MLV RT) (*Invitrogen*). Con el cDNA obtenido se realizó una PCR utilizando Taq PCR Master Mix (*Qiagen*), utilizando *primers* específicos para *sno* (24-25 ciclos), y β -*actina* (22 ciclos). Los productos

del PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio, y después se visualizaron y fotografiaron con luz UV.

Gen		Secuencia <i>primer 5'-3'</i>	Posición respecto ATG	Tamaño (pb)
sno	FW	CTGCTGCGTCCCAGTCTA	1582	308
	RW	TGAACTGCTCAGCATCTCCACCTCCAT	1871	
β -actina	FW	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	222	237
	RW	GGT CTCAAACATGATCTGGG	459	
	RW	GCTGCATAAACTCGTGGTCA	1162	

Fraccionamiento celular

Esta técnica fue empleada para determinar la localización subcelular núcleo-citoplasma de las proteínas de interés, para lo cual, las células C9 fueron lavadas con Buffer de PBS frío después de sus tratamientos, posteriormente las células fueron resuspendidas en Buffer de homogenización (3 mM Imidazol pH 7.4, 250 mM de sacarosa, complementado con inhibidores de proteasas), posteriormente las muestras fueron pasadas a través de una aguja de calibre 22, 20 veces continuas. La mezcla resultante fue centrifugada a 3400 rpm por 15 min a 4 °C y la fracción citoplásmica (sobrenadante) fue separada de la fracción nuclear (pellet). Cada fracción celular fue posteriormente lisada en Buffer de RIPA durante 1 h en rotación a 4 °C, para después centrifugar la muestra a 19,100 g por 5 min. Los extractos fueron sujetos a análisis por inmunoprecipitación (IP) y *Western Blot* (WB).

Inmunoprecipitación (IP)

Esta técnica se empleo para enriquecer la muestra de las proteínas Ski y SnoN las cuales no son abundantes en la línea celular C9. Antes de la IP, las células fueron sembradas en cajas petri de 100 mm de diámetro a una confluencia entre 90-100%; previo a cada estímulo, las células fueron mantenidas en medio sin suero durante 12-14 h y después se realizaron los tratamientos correspondientes. Una vez concluido el tratamiento de las células, las placas se colocaron en hielo y se les retiró el medio de ayuno; para remover los restos del medio, las células se lavaron con 5 ml de PBS frío y después se aspiró el medio. Una vez lavadas las células, estas se lisaron en 1 ml de Buffer RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet-P40, 0.5% desoxicolato de sodio y 0.1% SDS) complementado con un inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Anexo II). Una vez adicionado el buffer de lisis a las células, las muestras de cada tratamiento se transfirieron a tubos

de 1.5 ml y se mantuvieron en rotación a 4°C por 2 h; después, se centrifugaron por 10 min a 13.2 K rpm y se descartó el pellet. Se cuantificó la proteína del sobrenadante por el método de Bradford (800 µl H₂O desionizada + 2 µl muestra + 200 µl de Bradford de *Bio Rad*), leyéndose en un espectrofotómetro a 595nm.

Una vez cuantificadas las proteínas de las muestras, se utilizó entre 1.5 y 3 mg de extractos totales de proteína para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones. Las muestras se mantuvieron en rotación a 4 °C toda la noche cuando se trataba de una primer IP y para un segundo IP en la misma muestra, esta se dejó solamente 2 h en rotación a 4 °C. Después se les agregaron 50 µl de proteína G sefarosa (en dilución 1:5 con TNTE al 0.1%) de Gibco, durante 2 h para posteriormente centrifugarlas y guardar el sobrenadante a -70 °C. Se lavaron los pellets 3 veces (proteína G más proteínas inmunoprecipitadas) con 1 ml del Buffer RIPA (0.1% de SDS) frío, centrifugando entre cada lavado por 10 seg a 13 K rpm. Al final, se les retiró el exceso de líquido a las muestras y se les adicionaron 30 µl de solución de Laemmli 1x. Las muestras se calentaron por 3 min a ebullición y se guardaron a -20 °C hasta su separación por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).

Para el Western Blot directo, se apartaron 100 µg de extracto de proteína total para detectar β-tubulina, Smad2 o β-actina como controles de carga. Las muestras fueron calentadas a 100 °C por 3 min en solución de Laemmli 1x, centrifugadas por 10 seg a 13 K rpm y almacenadas a -20°C.

Western Blot (WB)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5 %. Al final de la corrida, las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF en una cámara de BioRad, a 100 V por 1 h y 25 min, y la membrana fue bloqueada con leche descremada “Svelty” al 5% en TBST durante 1 hr. Al cabo de ese tiempo, las membranas se lavaron con TBST 1X y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche en agitación a 4°C. Después se incubaron con un anticuerpo secundario, por una hora en agitación a temperatura ambiente. Para la detección de las proteínas se empleó el Kit de quimioluminiscencia de Millipore (diluido 1:10 en dH₂O).

Análisis del promotor del gen sno

Los análisis bioinformáticos de las regiones regulatorias del promotor y del *enhancer* del gen *sno* se realizaron en ratón, debido a que la región promotora de *sno* en rata no se encuentra secuenciada por

completo; pero el grado de identidad de la región promotora que consta del TRE (Elemento de respuesta a TGFβ por sus siglas en ingles: *TGFβ Response Element*) en el cual se ubican los sitios de unión a las Smads (SBE) es del 92% entre los promotores de rata y ratón; esta secuencia se localiza entre las posiciones -3041 a -2716 respecto al sitio de inicio de la traducción (ATG).

Para determinar si el gen *sno* puede ser regulado a nivel transcripcional por los factores YAP y TAZ de la vía de Hippo, se realizó una búsqueda *in silico* en las secuencias de los promotores de *sno* (444 pb) y *skil* (648 pb) clonados previamente por nuestro grupo (Tecalco *et al.* 2012), de los posibles sitios de unión para los factores TEAD, debido a que éstos son los factores principales con los que se asocian los coactivadores YAP y TAZ, para regular a sus genes blanco. Las predicciones se realizaron considerando las bases de datos *Jaspar* y *Transfac*.

Análisis del Super- Enhancer

Para determinar si es posible estudiar la función del *enhancer* descrito para el gen *skil* en humano en un modelo de línea celular de rata, se realizaron análisis bioinformáticos de la región regulatoria 5' río arriba del promotor del gen de ratón para determinar indirectamente si el *super-enhancer* descrito en humano se encuentra conservado entre este organismo y el ratón.

Se utilizó una secuencia de -3.6 kb descrita por Tsuneyoshi *et al.* 2012, (ubicada en la posición -6316 a -2716) correspondiente a la región regulatoria del gen de SnoN en humano, obtenida de NCBI con la referencia NC_000003.11 para alinearla con el cromosoma 3 de ratón en donde se ubica el gen de *sno* NC_000069.6. El alineamiento se realizó con el programa *Blastn*, para identificar si la secuencia del *super-enhancer* de humano se encontraba en ratón.

Parámetros Generales del Alineamiento (BLAST)		
Parámetro	Significado	Valor
Máximas secuencias Blanco	Máximo numero de secuencias alineadas que se muestran	100
<i>Short Query</i>	Ajuste automático del tamaño de palabras para mejorar los resultados de secuencias cortas	Automático
Umbral esperado (<i>Expected threshold</i>)	Número esperado de cambios en un modelo azaroso	10

Tamaño de palabra	La longitud de la secuencia semilla necesaria para iniciar el alineamiento	28
Parámetros de puntuación		
Puntuación de Coincidencias y no coincidencias	Recompensas y castigos por bases coincidentes y bases no coincidentes	1-2
Costo de Inserciones <i>Gap Costs</i>	Costo de crear o extender un gap en un alineamiento	Linear
Filtros y Mascaras		
Filtro	Regiones que por su composición y baja complejidad pueden causar resultados falsos	Bajas regiones de complejidad
Mascara	Se consulta a la mascara para determinar las secuencias semillas e iniciar el alineamiento	Mascara para consulta

Actualmente las secuencias regulatorias pueden ser definidas e identificadas de acuerdo al contexto de cromatina o marcas epigenéticas en el que se encuentren; por lo tanto, para confirmar la secuencia del *super-enhancer* en ratón se utilizó la base de datos de UCSC *Genome Browser on Mouse*, y se busco la presencia de marcas de histonas como H3K4me1 y H3K4ac, así como la presencia de la RNA polimerasa II y el factor p300 los cuales definen secuencias tipo *enhancer*. Además, se utilizaron las bases de datos *Jaspar* y la base de datos *Transfac* a través de los programas *Alggene* y *Alibaba* para identificar sitios de unión para los factores Nanog, Oct4, Sox2 y Med-1 en las secuencias enhancer identificadas.

RESULTADOS

I. Regulación de la expresión de SnoN por un *super-enhancer*

I.I Identificación de secuencias potenciales de enhancer en el gen *sno* de ratón

A nivel transcripcional, la expresión de SnoN se regula a través de la región promotora y de un *super-enhancer* localizados en el gen que lo codifica, el *super-enhancer* se describió en células troncales humanas y se caracteriza por presentar sitios de unión a los factores transcripcionales Oct4, Sox2 y Nanog (Tecalco *et al.* 2012, Tsuneyoshi *et al.* 2012).

Los factores Oct4, Sox2 y Nanog participan en el establecimiento de un programa transcripcional que ayuda al mantenimiento de la identidad de una célula pluripotente, pero su expresión no es exclusiva de células troncales. Se sabe que en un proceso de regeneración hepática inducido por una hepatectomía parcial, en los hepatocitos se induce la expresión de Oct4 y Nanog. Así, en este trabajo nos dimos a la tarea de determinar si el *super-enhancer* descrito en humano para SnoN, se encontraba conservado en cuanto a su posición en rata (*Rattus norvegicus*), con la finalidad de emplear un modelo de línea celular de hepatocito de rata para su estudio. Debido a que en *R. norvegicus* la región promotora del gen *sno* aún no ha sido completamente secuenciada, y tampoco se disponen de datos de ChIP o ChIP-seq para marcas epigenéticas de histonas que pudiéramos utilizar para predecir secuencias de *enhancers*, decidimos utilizar la región promotora de ratón para estos análisis, considerando que el grado de identidad entre sus regiones promotoras es de un 92% (posición -3041 a -2716 respecto al sitio de inicio de la traducción).

Para el análisis preliminar, se realizó un alineamiento local entre la secuencia de 3714 pb del *super-enhancer* de *skil* descrita por Tsuneyoshi *et al.* 2012 con el cromosoma 3 de ratón (NC_000069.6), en donde se encuentra el locus de *sno* en la posición 3 15.12 cM. El alineamiento se realizó mediante el programa Blastn (*Basic Local Alignment Search Tool*) que utiliza el algoritmo de Smith-Waterman para realizar los alineamientos locales.

En la Figura 9 se esquematiza la región regulatoria del gen *skil* que describió Tsuneyoshi, la cual incluye la región promotora en donde se localizan los SBE (Sitios de Unión a las proteínas Smad) y el *super-enhancer* en donde se incluyen los sitios de unión a las proteínas Oct4, Sox2 y Nanog (OSN).

Los resultados obtenidos muestran que la secuencia regulatoria del gen de *sno* de ratón no alinea completamente con la secuencia regulatoria en humano; solo la región promotora es la que alinea con un 80% de similitud; en tanto que la región de *super-enhancer* no se conserva entre estas dos especies. En la Figura 9 se muestra la localización de las secuencias alineadas.

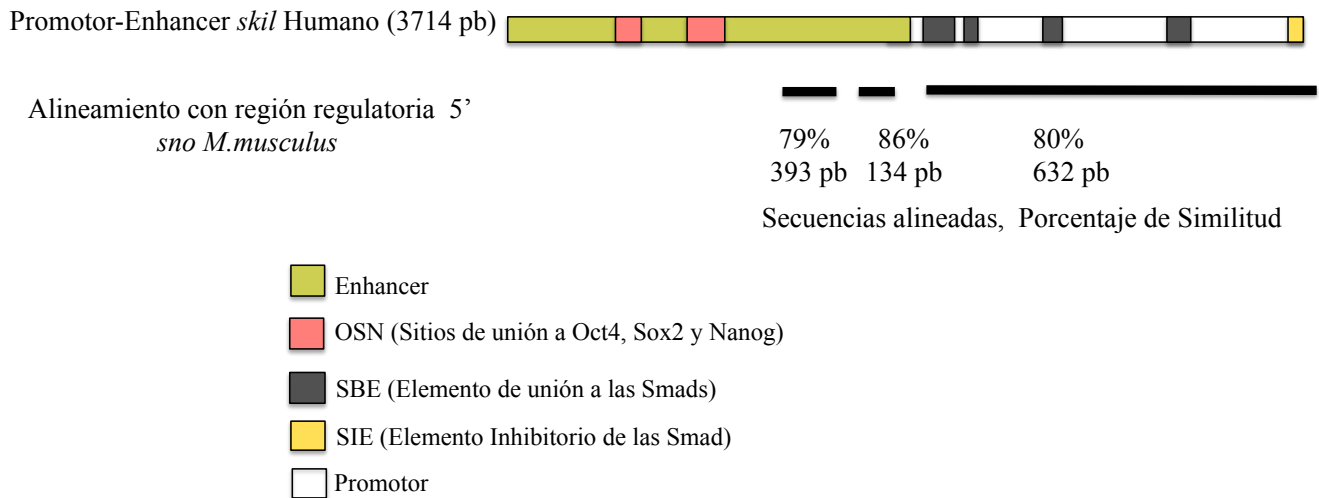


Figura 9. Esquema de la región regulatoria de *skil* de humano (Promotor/Super-Enhancer). En la parte superior se muestra un esquema de la región regulatoria de *skil*, indicando los sitios de unión a las Smad y los factores OSN. En líneas negras se muestra el alineamiento realizado entre la región regulatoria del gen de *SnoN* en humano y ratón empleando como base la secuencia de 3714 pb reportada por Tsuneyoshi. Los resultados del Blast muestran que solo hay un alineamiento entre las regiones promotoras de *sno* entre estas dos especies con un 80% de identidad en tanto que la secuencia de *super-enhancer* no se conserva.

Dado el resultado preliminar obtenido, se ha planteado que las secuencias regulatorias no necesariamente se conservan, pero si podría conservarse su función; por lo tanto, empleamos otra aproximación para identificar posibles secuencias de *enhancer* en el gen de *sno* a partir de marcas epigenéticas características de *enhancer*, como las marcas de histonas: Monometilación de la Lisina 4 en la Histona3 (H3K4me1), Acetilación de la Lisina 27 en Histona3 (H3K27ac), y la presencia de sitios para los factores p300 y Mediador (Med-1), y para la RNA polimerasa II, utilizando la base de datos del UCSC *Genome Browser on Mouse* (Kellis et al. 2014). Los datos de ChIP-seq utilizados para las marcas de H3K4me1 y H3K27ac fueron de aquellos análisis de ChIP-seq que se realizaron en hígados de ratones embrionarios de 14.5 días y en ratones adultos de 8 semanas, haciendo con ello específica nuestra identificación de marcas de histonas para un contexto hepático (Figura 10). Es preciso destacar que las secuencias de *enhancer* se seleccionaron a partir de la distribución de las marcas de histonas modificadas H3K4me1 y H3K27ac, mientras que los sitios de unión para los factores p300 y Pol II se

emplearon de manera complementaria, pero sus picos de distribución no corresponden necesariamente a las marcas de las histonas, esto puede ser debido a que esos datos vienen de una línea celular de ratón derivada de un linfoma de células B.

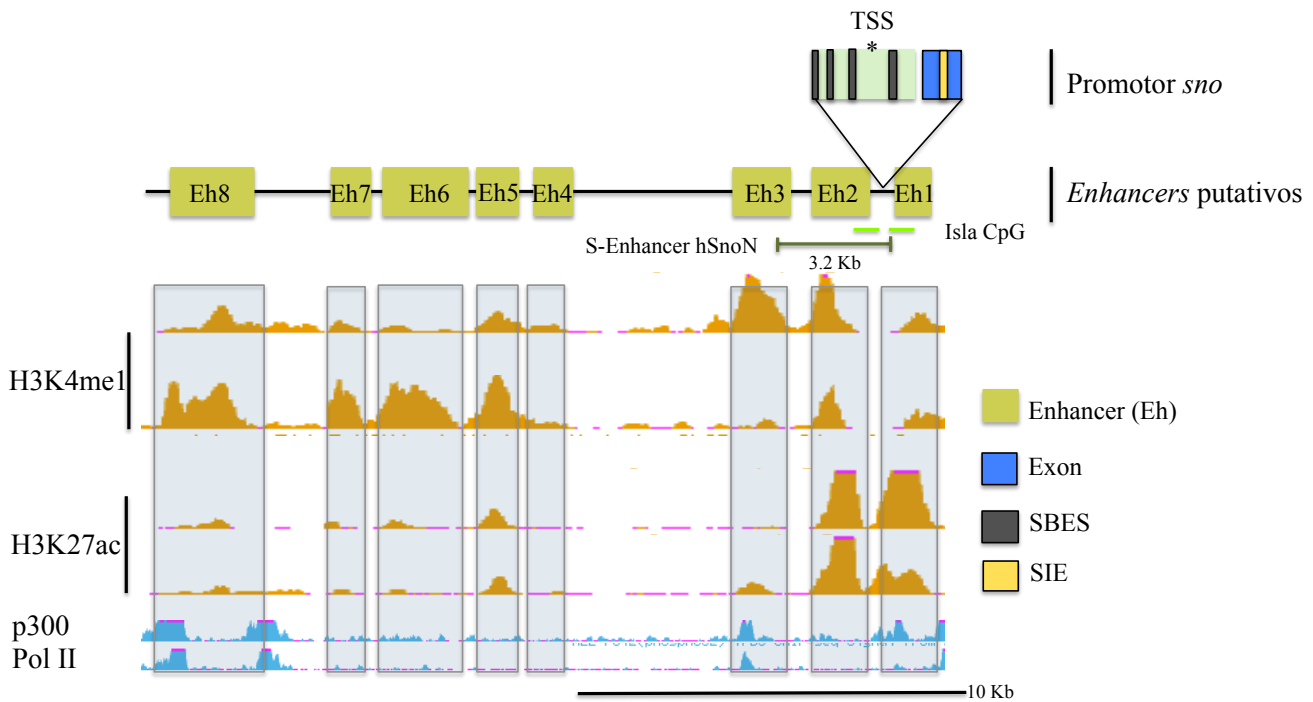


Figura 10. Identificación de secuencias de enhancer mediante marcas epigenéticas. En la parte superior se ejemplifica la región promotora de son así como las 8 secuencias enhancer identificadas en la región 5' de este gen a lo largo de una distancia de 22Kb. Las secuencias de enhancer se definieron de acuerdo a la presencia de marcas de histonas que se muestran abajo y corresponden a H3K4me1 H3K27ac, p300, Pol2.

Los resultados obtenidos indicaron la presencia de 8 potenciales secuencias de *enhancer* a lo largo de una región localizada aproximadamente 22 Kb río arriba del promotor del gen *sno*, los datos de estas secuencias se muestran en la Tabla 1.

I.II Identificación de un super-enhancer putativo hacia la región 5' del gen de *sno* compuesto de un cluster de enhancers

El *enhancer* de *skil* reportado por Tsuneyoshi *et al.* 2012, es un *super-enhancer* de 1.2 kb que presenta sitios de unión para los factores de reprogramación Oct4, Sox2 y Nanog. Por lo tanto, para validar si alguna de las secuencias identificadas como *enhancers* contiene sitios de unión para alguno de estos factores transcripcionales, se utilizaron los programas de *Alggene* y *Alibaba*, basados en la base

Transfac y en la base de datos Jaspár para predecir sitios de unión a los factores OSN; con este análisis solo se pudieron identificar sitios para Sox2 en todos los *enhancers* predichos con un mayor o menor número de sitios de unión (Tabla 1). Esto sugiere que el conjunto de secuencias de enhancer putativas de *M. musculus* puede representar en su conjunto un *super-enhancer* y que este a diferencia del de humano podría o no, ser regulado por los factores transcripcionales OSN, sugiriendo que de ser funcional este elemento regulatorio, su mecanismo de acción podría ser diferente al que lleva a cabo el identificado en el gen de humano.

Tabla 1: Detalle de las secuencias posibles de *enhancer* visualizadas a partir de *UCSC Genome Browser on Mouse*

Enhancer	Tamaño (pb)	Distancia (pb)	Transfac				Jaspár			
			Oct4		Sox2		Oct4*	Sox2*	Nanog*	Med-1**
1	757	310	0	0	3	0	0	3	0	6
2	464	-1455	0	0	6	0	0	5	0	9
3	1,321	-2841	0	0	12	0	0	11	0	10
4	1,600	-8360	0	0	15	0	0	16	0	13
5	1,081	-10439	0	0	12	1	0	9	0	6
6	2,161	-12358	0	0	19	0	0	23	0	12
7	1,120	-14758	0	0	9	12	0	5	0	4
8	2,120	-18397	0	0	19	2	0	15	0	13
			Alg	Alb	Alg	Alb				

*75%

**80%

En esta tabla se detallan las posiciones de las secuencias de *enhancer* putativas, identificadas mediante marcas de histonas en la región regulatoria 5' del gen de *sno*. Se emplearon las bases de datos Transfac y Jaspár para predecir sitios de unión a Oct4, Sox2 y Nanog y se anotó el número de sitios de unión para cada uno de estos factores se encuentran en cada *enhancer* putativo. De la base de transfac se emplearon dos programas Alg: (Alggen) o Alb (Alibaba) para realizar las predicciones. Los asteriscos *, ** indican el porcentaje de similitud a la secuencia de unión consenso de los factores transcripcionales considerando una identidad de 75 %y 80% respectivamente. Las distancias se definieron con respecto al SBE4, debido a que el TSS no está completamente definido en ratón, y en humano solo se sugiere que se localiza entre las secuencias del SBE3 y el SBE4.

II. Análisis de factores transcripcionales en el promotor de *sno*

El promotor del gen de *SnoN* ha sido caracterizado en humano y ratón (Zhu *et al.* 2005; Tecalco *et al.* 2012). Para determinar los factores de transcripción potenciales que puedan regular la expresión del

gen *sno* en los hepatocitos, se identificaron y seleccionaron aquellos factores transcripcionales que pudieran tener una función relevante en la regulación del gen *sno* en un modelo de hepatocitos.

Los hepatocitos son células que responden a muchos estímulos y de ellos, nosotros estamos interesados en aquellos derivados de la mecano-señalización, ya que recientemente reportamos que la estabilidad de los co-represores Ski y SnoN puede ser modulada por cambios en la dinámica de polimerización de la actina (Caligaris *et al.*, 2015; Vázquez-Victorio *et al.* 2015). Existen reportes sobre otros co-reguladores transcripcionales como YAP y TAZ, los cuales también responden a cambios en el citoesqueleto, y funcionan regulando a sus genes blanco a través de su interacción con los factores transcripcionales TEAD (también denominados TEF) (Halder *et al.* 2012). Esto nos hizo considerar que tal vez el gen de SnoN pudiera ser regulado a través de los factores TEAD; por lo tanto, nos dimos a la tarea de identificar tanto en el promotor del gen *skil* en humano como en el gen de *sno* de ratón sitios de unión a los factores TEAD, utilizando las secuencias promotoras caracterizadas previamente (Zhu *et al.* 2005, Tecalco *et al.* 2012). En la Figura 11 se muestra la secuencia logo consenso de TEAD.

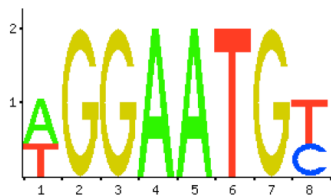


Figura 11 Secuencia logo del factor TEF-1 (TEAD1). Esta secuencia corresponde a la empleada por la base de datos Jaspar.

Para identificar sitios de unión de los factores TEAD, empleamos dos programas de bases de datos: *Transfac* y *Jaspar*; sin embargo, solo con la base de datos *Jaspar* logramos predecir sitios de unión para TEAD1 (TEF-1). Para esta identificación, se seleccionó un valor de similitud con la secuencia consenso del 70%, identificando con ello 7 posibles sitios para TEF-1 en el gen de humano y 4 sitios para del de ratón. En la Figura 12 se muestra una representación gráfica sobre los posibles sitios de unión a TEF-1 sobre la secuencia promotora del gen de SnoN, y en la Figura 13 se muestran en detalle estos sitios de unión.

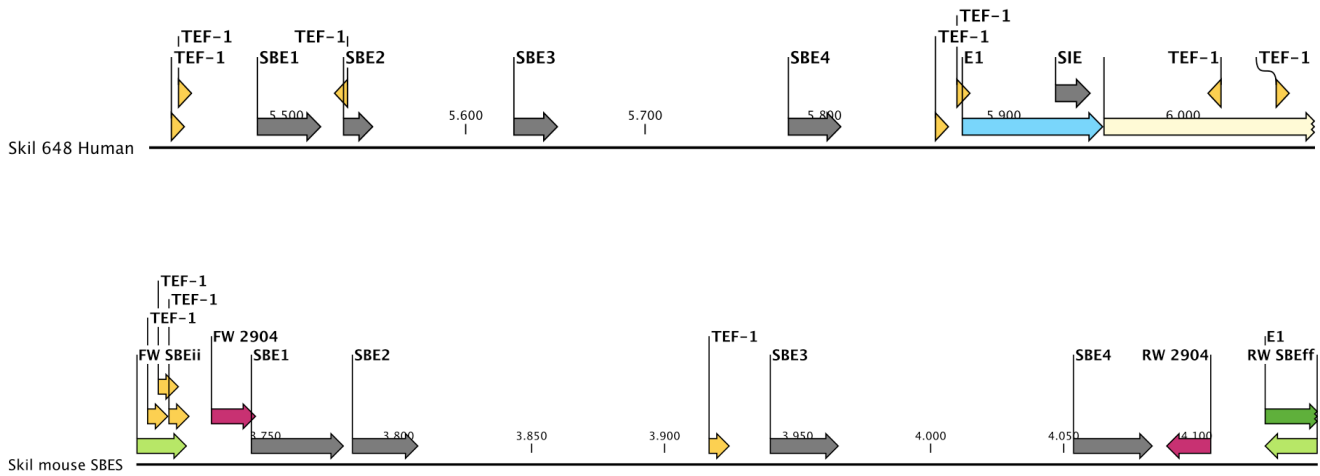
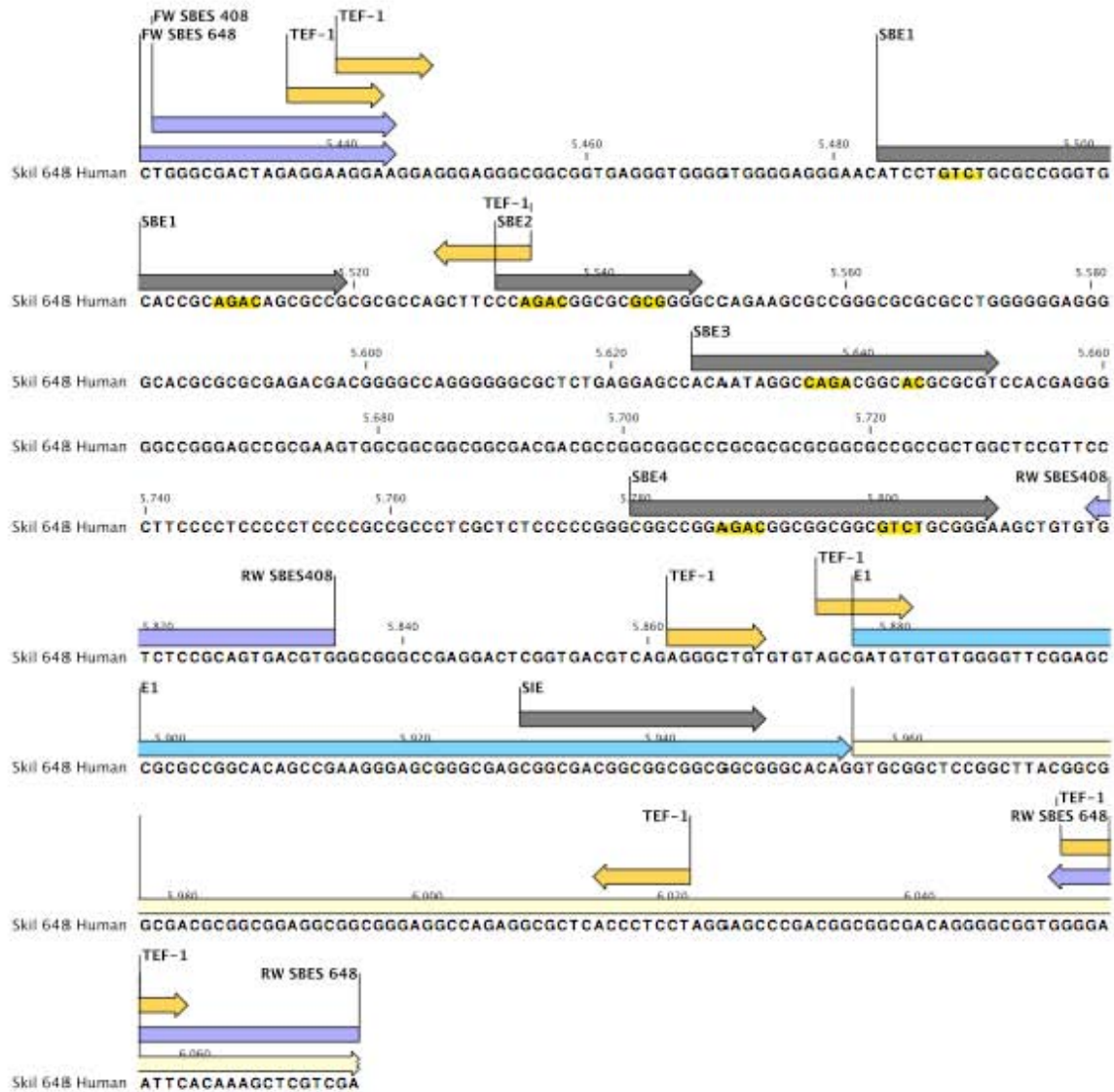


Figura 12. Mapa general de los sitios de unión a TEF1 (TEAD1) en las secuencias promotoras clonadas por Tecalco *et al.* 2012 de humano (*skil 648 Human*) y ratón (*sno mouse SBES*). En el caso del promotor de ratón se muestran los sitios de los primers utilizados para clonar estas secuencias y se muestran los elementos de respuesta a TGFβ (SBES). La dirección de las flechas indican si la secuencia de unión está en la cadena dirección 5'→ 3' (Flecha a la derecha) o en la cadena 3'→ 5' (Flecha a la izquierda) con respecto a la cadena codificante.



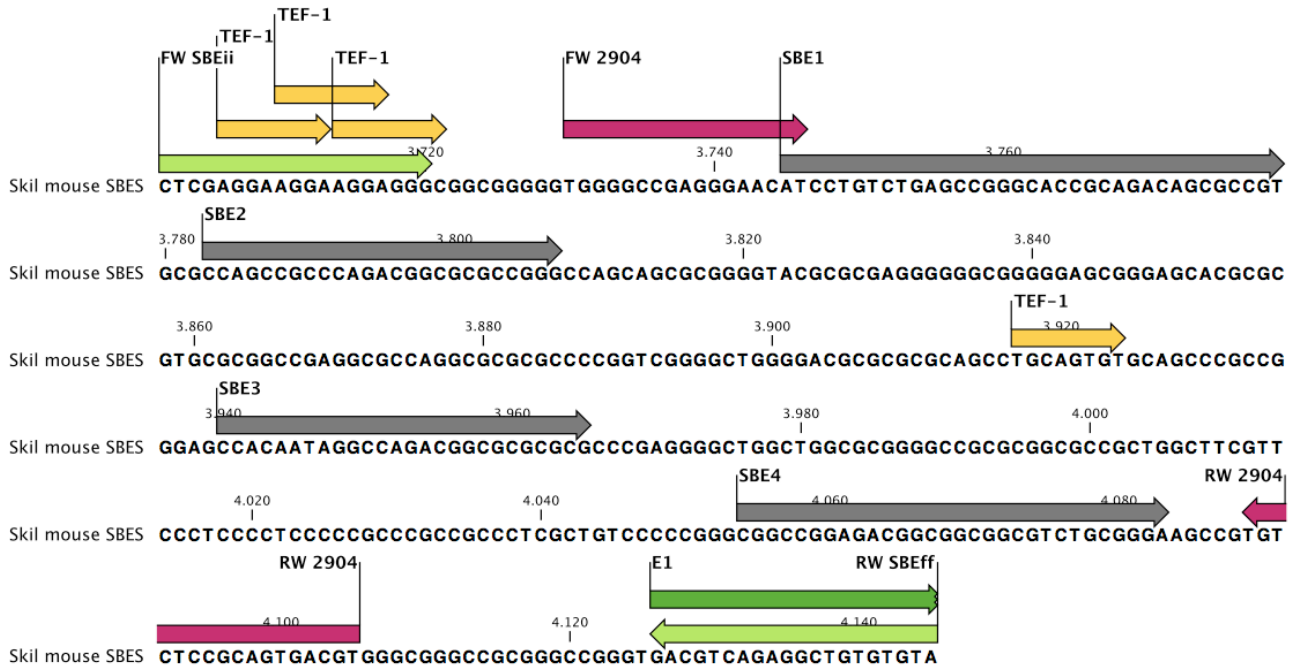


Figura 13. Identificación de sitios de unión a TEAD1 en el promotor de *sno*. Se muestra a detalle de secuencia, los sitios de unión a TEF-1 (TEAD1) en las secuencias promotoras clonadas por Tecalco *et al.* 2012 de humano (*skil* 648 Human) secuencia superior y ratón (*sno* mouse SBES) secuencia inferior. Las flechas a la derecha indican que el factor se une en la cadena con dirección 5'→3' en tanto que una flecha apuntando hacia la izquierda indica que el factor primer están sobre la secuencia en dirección 3'→5'. FW-indica primer en cadena 5'→3' y RW-primer en secuencia 3'→5'. En el promotor de humano se resaltan los sitios de unión a las Smads en el SBE.

Con este análisis bioinformático se identificaron sitios de unión a TEAD en el promotor del gen *sno* en ratón; y depurando las factores potenciales predichos por Tecalco *et al.* 2012, que potencialmente podrían regular al gen en los hepatocitos, se presenta la siguiente secuencia del promotor de ratón en donde se resaltan los factores transcripcionales y sus sitios de unión con relevancia para la regulación del gen *sno* en hepatocitos (Figura 14).

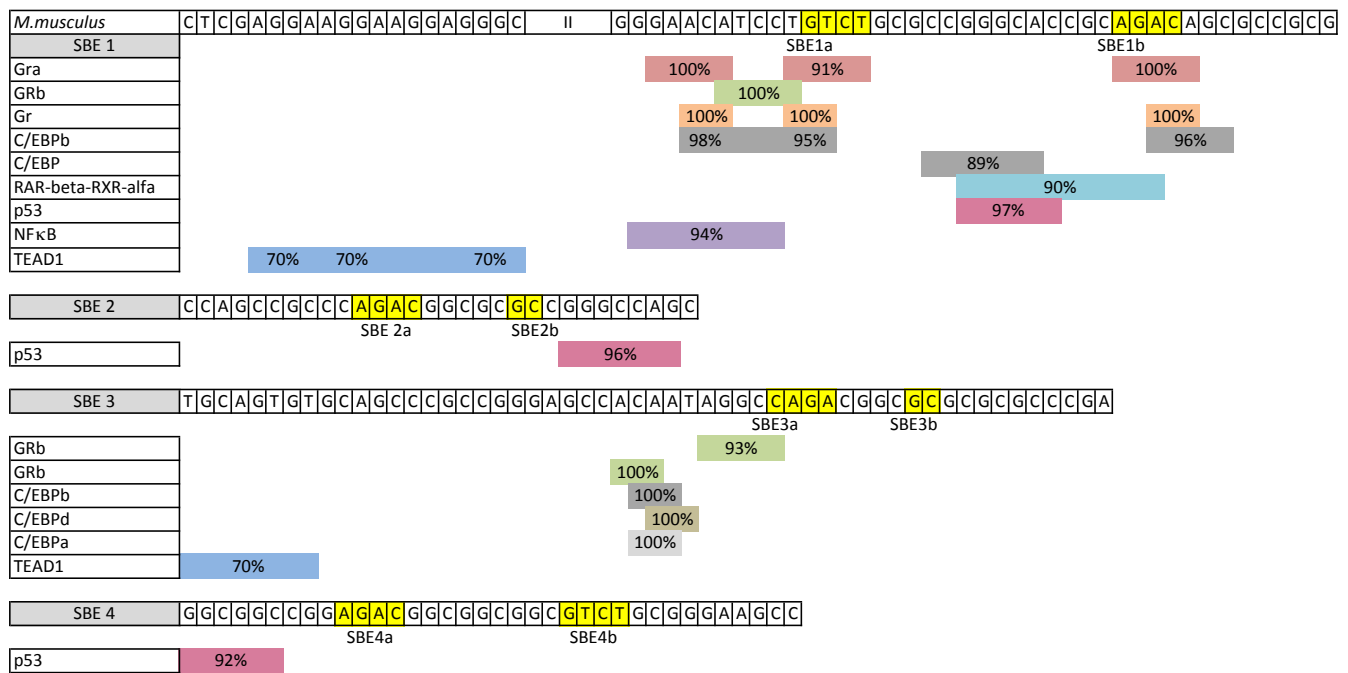


Figura 14. Secuencia del promotor de *sno*. Se muestra la secuencia promotora de *sno* en *M. musculus* que comprende los sitios de unión a las proteínas Smad (SBEs) y se resaltan los factores transcripcionales más relevantes para la regulación de SnoN en hepatocitos, los números en la fila de cada factor representan el porcentaje de similitud con su sitio de unión.

II. Regulación de la expresión de SnoN en Hepatocitos

SnoN es una proteína que puede ser regulada a diferentes niveles, y una de las principales señales que lo regula a nivel de expresión de su gen y transcrito es la del TGFβ. Como parte de nuestro segundo objetivo, intentamos determinar que otras señales regulan los niveles de SnoN en los hepatocitos. Como punto de partida se analizó la dinámica de expresión de SnoN a nivel de mRNA y de proteína en la línea celular de hepatocitos C9.

Nuestra primera aproximación fue determinar los niveles del transcrito de SnoN y SnoN2 en los hepatocitos. En organismos como la rata y el ratón, la principal isoforma que se expresa es SnoN2, como producto de *splicing alternativo*, y en menor medida la isoforma SnoN. Por RT-PCR se muestra en la (Figura 15a) que el transcrito de *snoN2* parece tener una vida media mayor a 2 h, esto debido a que al realizar un curso temporal con Actinomicina D (5 μg/ml), un inhibidor de la transcripción y analizando los niveles de los transcritos de SnoN y SnoN2, se observa que estos no cambian con el tratamiento al menos durante 2 h. Lo que nos sugiere que el transcrito de *sno* es muy estable.

Por otro lado, se realizó un curso temporal empleando el inhibidor de la traducción, la cicloheximida (20µg/ml), y se analizaron los niveles de RNAm de SnoN; observamos que hay una acumulación del transcrito de SnoN, esto puede ser debido a que Cicloheximida promueve la estabilización de muchos mRNA al inhibir su traducción, así mismo, debido a que también promueve un decremento en los niveles de la proteína SnoN (Figura 15b) quien es represor de su propio gen, es posible que esto favorezca parcialmente la expresión del gen *sno* por una señalización basal de TGFβ; sin embargo, esto falta por ser demostrado (Hernández Damián *et al.* 2013; Tecalco *et al.* 1012).

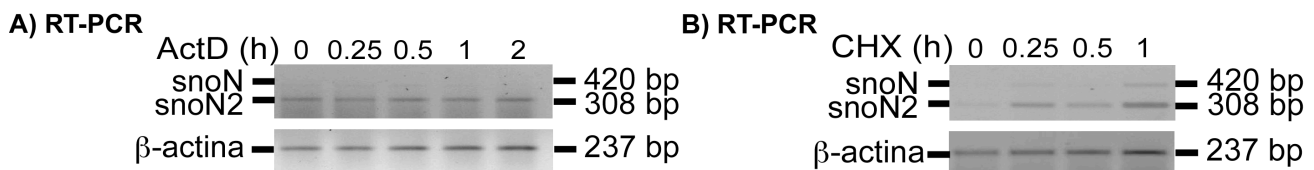


Figura 15. El transcrito de *sno2* es muy estable en los hepatocitos. En A y B se muestra el mRNA de *sno* por RT-PCR, de cursos temporales con Actinomicina D (ActD) (A) o Cicloheximida (CHX) (B) en células C9, los niveles de mRNA se analizaron a diferentes tiempos, indicados en horas (h). (-) indica tiempo cero o condición basal de los niveles de mRNA. Los datos son los representativos de tres o más experimentos.

II.I En los hepatocitos, el mantenimiento de los niveles basales de la proteína SnoN depende de una traducción constante de su RNAm.

Una vez analizado el comportamiento del transcrito de *sno* en la línea celular C9, se procedió a analizar los niveles proteicos de SnoN/SnoN2. Para ello se realizaron cursos temporales empleando ActD (5 µg/ml) un inhibidor de la transcripción y CHX (20µg/ml), un inhibidor de la traducción y se analizaron los niveles de las proteínas mediante IP/WB. Los resultados indican que después de 2h de tratamiento con ActD, los niveles proteicos de SnoN/SnoN2 disminuyen drásticamente, aunque en la Figura 15a se había mostrado que no había cambios en el transcrito de *sno* a este tiempo. Por lo tanto, se desconoce si su RNAm se continúa traduciendo, o si el efecto de ActD es indirecto, inhibiendo la expresión de algún componente que regule la estabilidad de SnoN. Por otra parte, analizando el efecto de CHX observamos que los niveles de las proteínas SnoN/SnoN2 disminuyen desde los 15 min de tratamiento con CHX, mostrando una vida media aproximada que va de entre 0.25-0.4 horas indicando que los niveles de las proteínas SnoN/SnoN2 requieren de una síntesis *de novo* constante para mantener sus niveles basales (Figura 16).

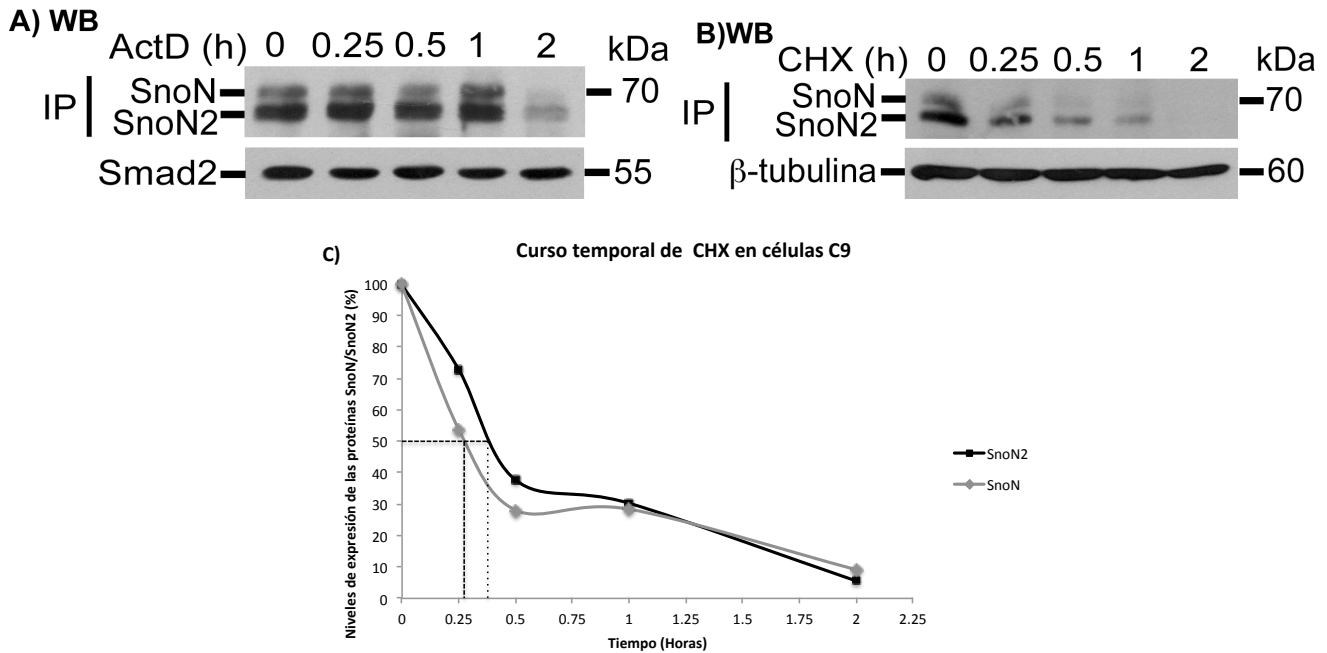


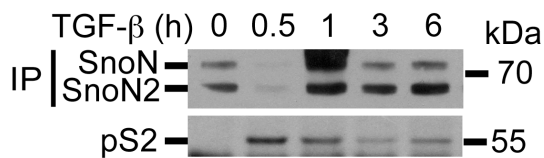
Figura 16. SnoN/SnoN2 tienen un alto recambio en los hepatocitos. En A y B se analizan los niveles de SnoN/SnoN2 mediante la técnica de IP/WB en células C9 de cursos temporales con Actinomicina D (ActD) y Cicloheximida (CHX), los resultados mostrados son representativos de tres o más experimentos independientes. El panel C es una gráfica representativa de la figura B donde se muestran los niveles de SnoN/SnoN2 cuando estos son tratados con CHX; la vida media de SnoN/SnoN2 realizando una interpolación de la gráfica cuando se tiene un 50% de proteína esta entre las 0.25-0.4 horas.

II.II La expresión de SnoN es regulada por la señal del TGF β a nivel de proteína y de transcrito en hepatocitos

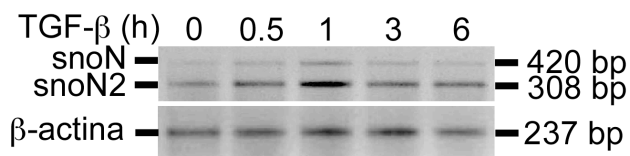
Una vez caracterizada la dinámica de expresión basal de SnoN a nivel de transcrito y proteína, se procedió a investigar que señales regulan la expresión de SnoN en los hepatocitos. Una de las principales vías de señalización que regulan a SnoN a nivel de transcrito y proteína es la vía del TGF β . Para determinar cómo se da la regulación de SnoN por TGF β en los hepatocitos, se efectuaron cursos temporales usando 0.3 nM de esta citocina y se analizaron los niveles tanto de proteína mediante IP/WB como de transcrito por RT-PCR. Los resultados obtenidos muestran que las proteínas SnoN/SnoN2 se degradan rápidamente, mostrando una máxima disminución a los 30 min de estimulación con TGF β , pero sus niveles vuelven a incrementar luego de 1 h de tratamiento, lo cual correlaciona con un incremento en su transcrito. Estos resultados concuerdan con los datos generados previamente por nuestro grupo (Tecalco *et al.* 2012), ya que reportamos que los niveles de las proteínas SnoN/SnoN2 disminuyen a los 30 min de un estímulo con TGF β , quien a su vez promueve la expresión

del gen *sno* a través de las proteínas Smad2/4 activas; esto resulta por lo tanto, en un incremento de los niveles de las proteína de SnoN/SnoN2 después de una hora de tratamiento (Figura 17). Además cabe resaltar que realizando un fraccionamiento celular, núcleo-citoplasma, las proteínas SnoN/SnoN2 se localizan mayoritariamente en el núcleo celular pero también se distribuyen en el citoplasma, y ambas regiones subcelulares son moduladas por la señal del TGF β . Estos datos han sido reportados recientemente por nuestro grupo (Caligaris *et al.* 2015).

A) WB



B) RT-PCR



C) WB

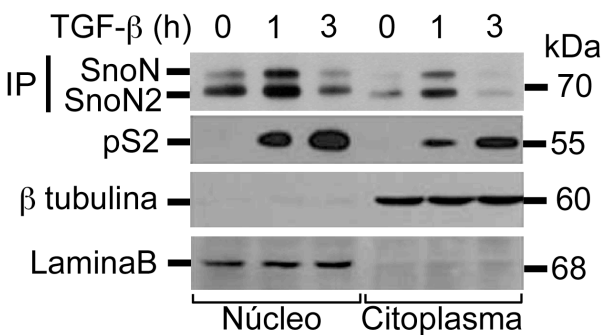


Figura 17. El TGF β regula a SnoN/SnoN2 a niveles de proteína y de transcrito en hepatocitos. En A y B se muestran cursos temporales efectuados en células C9 con 0.3 nM de TGF β y se analizan los niveles de SnoN por IP/WB y RT-PCR en los tiempos indicados. En C se muestra un fraccionamiento celular en la misma línea celular para indicar que SnoN/SnoN2 se distribuye en el núcleo y citoplasma. La proteína p-Smad2 (Smad2 fosforilada en el C-terminal) es un control positivo de la activación de la vía del TGF β , β -tubulina y LaminB son controles de carga y marcadores específicos de un compartimiento nuclear o citoplásmico. Los experimentos mostrados son representativos de al menos 3 o más experimentos independientes.

II.III Los niveles de la proteína SnoN incrementan por compuestos que modulan la polimerización de actina

A continuación, de acuerdo a nuestro segundo objetivo, nos enfocamos en identificar mecanismos alternos a la vía del TGF β /R-Smad que regulen la expresión de SnoN en los hepatocitos. Trabajos previos del laboratorio sugieren que SnoN puede ser regulado por cambios en la polimerización de actina, en particular se ha observado un aumento de los niveles de SnoN/SnoN2 en condiciones en que se promueve la polimerización de actina, empleando compuestos químicos u hormonas (Caligaris *et al.* 2015, Vázquez-Victorio *et al.* 2015).

Para determinar si la dinámica de la polimerización de la actina influye sobre los niveles de SnoN, empleamos 3 compuestos: a) Citocalasina D (5 μ M), un inhibidor de la polimerización de actina, b) Jasplaquinolida (1 μ M), un estimulador de la formación de filamentos de actina, que se une al extremo (-) del filamento, y c) La Esfingosina 1 Fosfato (1 μ M), que estimula la polimerización vía la activación del eje $G\alpha_{12/13}$ /Rho. Se analizaron los niveles proteicos de SnoN/SnoN2 mediante IP/WB. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de la proteína SnoN se incrementan por el tratamiento con estos tres compuestos (Figura 18). Estos resultados nos llevan a realizar las preguntas: ¿cuál es la relación entre el citoesqueleto de actina y la estabilidad de las proteínas SnoN/SnoN2?, y porque los niveles de estas proteínas se incrementan y de que depende este proceso?.

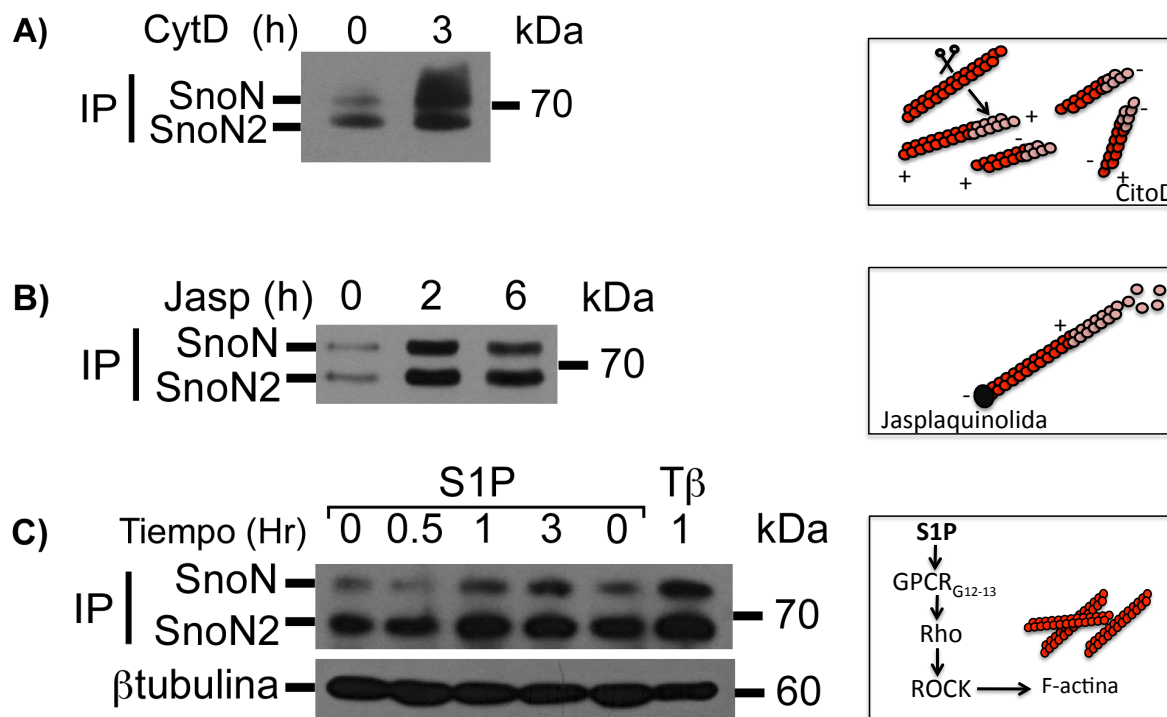


Figura 18. La dinámica del citoesqueleto de actina promueve un aumento en los niveles de SnoN. Se muestran por IP/WB los niveles proteicos de SnoN empleando CitocalasinaD (CitoD, 5 μ M), un inhibidor de la polimerización de actina, Jasplaquinolida (Jasp, 1 μ M) y Esfingosina 1 fosfato (S1P, 1 μ M) ambos promueven la formación de actina filamentosa. El TGF β se emplea como control positivo por que induce un incremento de la proteína de SnoN, y en los recuadros se muestra un modelo del modo de acción de cada compuesto utilizado. Las proteínas β -tubulina y Smad2 fueron detectadas como controles de carga en los geles. Los resultados son representativos de 2 o más experimentos.

II. IV Los niveles de SnoN son incrementados por compuestos que modulan la polimerización de actina por un mecanismo independiente de los niveles de su transcrito.

Las observaciones obtenidas sobre el incremento en los niveles de las proteínas SnoN/SnoN2 por compuestos que favorecen la polimerización de actina, nos hace pensar si parte del mecanismo implica la regulación de la expresión del gen de *sno*. Realizamos cursos temporales con el tratamiento de CytD (5 μ M) o S1P (1 μ M) en células C9, y evaluamos mediante RT-PCR los niveles de RNAm de *sno*. Los resultados sugieren que no hay ningún incremento en los niveles del transcrito que pudieran indicar un mecanismo dependiente de una regulación transcripcional y que explicará el incremento en los niveles de la proteína (Figura 19a,b). Así mismo, debido a que puede existir cierta expresión basal del gen de *sno* por una señal basal del TGF β , se decidió emplear un inhibidor de esta vía de señalización, el compuesto SB431542, que inhibe la actividad de cinasa del receptor tipo I de TGF β , y evaluamos nuevamente por RT-PCR la expresión del transcrito de *sno* tratando a las células con los compuestos CytD (5 μ M), S1P (1 μ M), y el Ácido Lisofosfatídico (LPA) (1 μ M); sin embargo, aún pre-tratando a las células con este compuesto durante 30 min no se observan cambios en los niveles del RNAm de *sno* (Figura 19c). Sugiriendo nuevamente que el aumento en los niveles de las proteínas SnoN/SnoN2, cuando se promueve la formación de actina filamentosa, es un proceso que actúa a nivel de la proteína o de la traducción de SnoN, y es independiente a la transcripción de su gen.

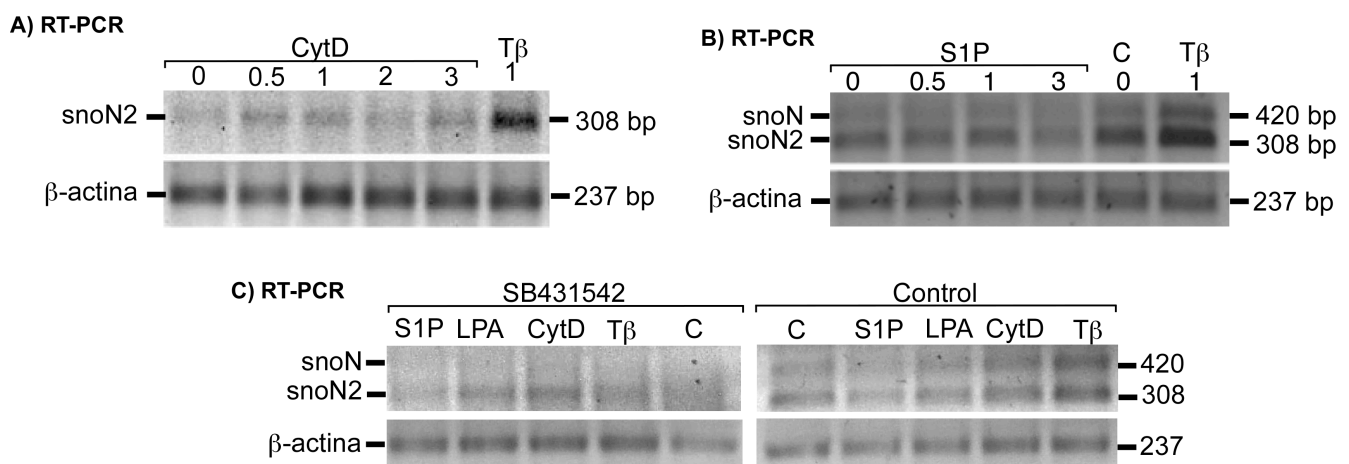


Figura 19. El incremento en los niveles de SnoN por moduladores del citoesqueleto de actina es un proceso independiente de la transcripción del gen de *sno*. En A y B se muestran RT-PCRs de cursos temporales con CitoD y S1P respectivamente evaluando los niveles de *snoN/snoN2* en hepatocitos y no se observa ningún incremento en los niveles de mensajero respecto al basal; como control se muestra la inducción de *snoN/snoN2* por TGF β . En C, Se muestra por RT-PCR que inhibiendo la expresión basal de *snoN* por TGF β tampoco permite detectar un incremento en el RNAm de SnoN por S1P, LPA o CitoD 1hr. β -actina se muestra como control de

carga en cada experimento. Los experimentos mostrados son representativos de dos o más experimentos independientes.

II. IV El incremento de los niveles de SnoN por compuestos que modulan la polimerización de actina es un proceso independiente de la señalización por TGFβ.

Nuestros resultados sugieren que una señal además del TGFβ podría regular los niveles de la proteína SnoN en los hepatocitos; sin embargo, era preciso determinar si el mecanismo llevado a cabo por los moduladores del citoesqueleto era independiente de la señal del TGFβ, por lo que se decidió analizar los niveles de SnoN/SnoN2 por IP/WB, tratando a las células C9 con CytD (5 μM) y llevando a cabo un pre-tratamiento de 30 min con el SB431542 (10 μM). Con los resultados obtenidos, observamos que un pre-tratamiento con SB43 conlleva a un incremento en los niveles basales de SnoN/SnoN2, y cuando se tratan a las células con la CytD, es difícil determinar si este compuesto sigue manteniendo su efecto al promover un incremento en los niveles de SnoN/SnoN2. Sin embargo, el resultado parece sugerir que el mecanismo empleado por la CytD es independiente a la vía de señalización por TGFβ; aunque experimentos adicionales son requeridos para comprobar esta observación.

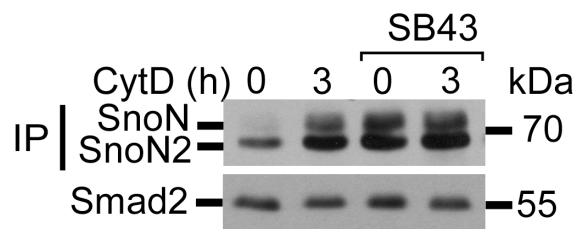


Figura 20. La regulación de los niveles de SnoN por moduladores del citoesqueleto de actina. Por IP/WB se muestran los niveles de SnoN cuando células son tratadas con CytD. Un pre-tratamiento con SB431542 no bloquea el efecto de CytD. La proteína Smad2 fue utilizada como control de carga.

DISCUSIÓN

Análisis de la regulación de la expresión de SnoN por un *super-enhancer*

Los *enhancers* son secuencias regulatorias que activan la transcripción de uno o varios genes independientemente de la distancia y orientación en el DNA (Pott *et al.* 2015). Se ha estimado que el 4.2% del genoma entre los mamíferos se encuentra filogenéticamente conservado y de este, el 68%

corresponde a regiones intrónicas e intragénicas, de las cuales un 30% se sobrelapa con regiones ricas en marcas de cromatina que definen *enhancers* (Rubinstein *et al.* 2013).

Tratando de definir si el *super-enhancer* descrito para el gen *skil* en humano es conservado en posición y secuencia en ratón, se hizo uso del concepto de *Phylogenetic footprinting*. Este concepto se basa en la idea de que las secuencias del DNA que tienen un papel funcional, evolucionan más lentamente que aquellas secuencias no funcionales, y por lo tanto si una secuencia se conserva, esta puede ser funcional. Con esto intentamos definir si la secuencia del *super-enhancer* de humano se encontraba conservada en ratón realizando alineamientos locales (Dermitzakis *et al.* 2002); sin embargo, no identificamos similitud alguna.

Considerando que las regiones no codificantes exhiben tasas de evolución más altas que las secuencias codificantes (Dermitzakis *et al.* 2002), razonamos que si bien no había una conservación en la secuencia del *super-enhancer* definido en humano, si podría haber una conservación en la función como ha propuesto Weirauch *et al.* 2009; es decir, nos interesaba investigar si había una secuencia tipo *super-enhancer* hacia la región 5' del gen de *sno*, y así, haciendo análisis bioinformáticos, logramos identificar 8 secuencias en una región de 22 Kb que cumplen con las marcas epigenéticas de *enhancer* como son: H3K4me1, p300, H3K27ac, Med-1, RNAPol II y Sox2, sugiriendo como hipótesis que el conjunto de estos *enhancers* podrían representar en su conjunto un *super-enhancer*.

Los *super-enhancer* son claves en el mantenimiento de la identidad celular y ayudan a determinar dónde, cuándo y cómo se expresan los genes que regulan (Whyte *et al.* 2013). En este trabajo se predijeron por análisis bioinformáticos una región de 22Kb que comprende 8 secuencias putativas de *enhancer*; sin embargo, es necesario investigar si el *super-enhancer* putativo identificado, es funcional como una unidad o si solo una o algunas secuencias de ese grupo de *enhancers* es funcional, debido a que existen reportes que indican que el agrupamiento de *enhancers* no es suficiente para definir un *super-enhancer* funcional (Pott *et al.* 2015), y es posible que solo alguna de las secuencias corresponda a un *enhancer* funcional, con potencial de regular a su gen.

El promotor del gen *sno* tiene sitios de unión para los factores TEAD

Debido a que la expresión de SnoN se regula a diferentes niveles y en cada uno de esos niveles hay varios mecanismos de regulación, en la segunda parte de nuestro trabajo, nos dedicamos a analizar la

región promotora del gen *sno*, identificando los sitios para diferentes factores transcripcionales, que pudieran tener funciones relevantes en los hepatocitos, y que pudieran regular la expresión de SnoN.

Dentro de los factores que ya habían sido predichos para el gen de *sno* y que nosotros destacamos por su importancia para los hepatocitos se encuentran: los receptores de glucocorticoides (GR, GR-alpha, GR-beta), el receptor de ácido retinoico (RAR-beta y RXR-alfa), los factores C/EBP-alpha,-beta, -y delta, y el factor p53.

Por trabajos generados en el laboratorio se conoce que los niveles de SnoN son incrementados a las 2h después de inducir la regeneración hepática por una hepatectomía parcial, y de manera interesante también descubrimos que sus niveles proteicos también se regulan en respuesta a la modulación del citoesqueleto de actina (Macías-Silva *et al.* 2002, Vázquez *et al.* 2015, Caligaris *et. al.* 2015). Por tal motivo, nosotros buscamos predecir la unión de otros factores transcripcionales adicionales a los reportados por nuestro grupo, que ejercieran su actividad sobre el promotor del gen *sno* en respuesta a cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina.

Entre los candidatos nosotros identificamos sitios de unión a los factores transcripcionales TEAD; estos factores transcripcionales, interactúan con los correguladores transcripcionales YAP y TAZ, los cuales a nivel de proteína también son modulados por cambios en el estado de polimerización de la actina y las adhesiones celulares (Low, *et al.* 2014). Cabe destacar que YAP y TAZ son correguladores transcripcionales que no unen directamente al DNA, y por ello uno de los principales factores transcripcionales con quienes interactúan para regular a sus genes blanco son los factores TEAD,

Así, mediante análisis bioinformáticos intentamos predecir sitios de unión para los factores TEAD, para determinar de manera indirecta si el gen de *sno* podría ser regulado por los cofactores YAP y TAZ, que son regulados por la dinámica del citoesqueleto. Los resultados obtenidos predicen 4 y 7 sitios putativos de unión para el factor TEAD en los promotores de *sno* y *skil* respectivamente, con un 70% de similitud, considerando la base de datos *Jaspar*, indicando que el gen *sno* podría ser regulado por YAP/TAZ, a través de los factores TEAD. Sin embargo, ensayos funcionales son necesarios para validar la predicción de los sitios de unión a TEAD en el promotor del gen codificante para SnoN; y así mismo, definir el contexto celular en que esto ocurre y las repercusiones funcionales al respecto. Además, cabe destacar que los factores TEAD no son los únicos factores transcripcionales con quienes interactúan YAP y TAZ, ya que estos cofactores son capaces de interactuar también con las proteínas

R-Smad. Así mismo, el cofactor Ski ha sido reportado por la Dr. K. Luo, que es capaz de interactuar con los 4 Factores TEAD y con ello, es posible que pueda usar otro mecanismo para regular la expresión del gen de *sno* (Rashidian *et al.* 2015).

Regulación de la expresión de SnoN por cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina

La proteína SnoN en los hepatocitos normales pero no en las células transformadas se modula por cambios en el citoesqueleto de actina (Caligaris *et al.* 2015). Al emplear compuestos que favorecen la polimerización de actina como S1P, CitoD y LPA se produce un aumento en los niveles proteicos de SnoN analizados mediante IP/WB pero no así de su transcrito, sugiriendo que el mecanismo que emplean para regular los niveles de SnoN es a nivel de proteína o de traducción. Así mismo, un pretratamiento con el inhibidor del receptor tipo I del TGF β , sugiere que el mecanismo llevado a cabo es independiente de la señal de TGF β porque aunque se bloquean los niveles basales de señalización de esta citocina, no se bloquea el efecto llevado a cabo por la CytD; sin embargo, se requieren experimentos adicionales empleando mutantes de SnoN, incapaces de interactuar con las proteínas Smad, para comprobar esta afirmación.

Los resultados obtenidos con los compuestos que modulan el citoesqueleto de actina resultan interesantes porque son un ejemplo más de cómo los niveles de una proteína no necesariamente se correlacionan con sus niveles de RNAm, y plantea preguntas como: ¿cuál es la relación entre SnoN y el citoesqueleto de actina? y ¿cuáles son los mecanismos que pudieran estar involucrados para controlar la estabilidad de SnoN?

Los datos obtenidos con Jasplaquinolida, S1P y LPA parecen sugerir que la polimerización de actina está involucrada en el mecanismo que estabiliza a la proteína de SnoN, aunque debido a que citocalasina D no promueve la polimerización de actina si no que rompe los filamentos de actina, indican que no solo la dinámica del citoesqueleto de actina está involucrada, y es posible que otra explicación sea que el citoesqueleto de los microtúbulos también se encuentre comprometido, debido a que la Citocalasina D también afecta el ensamblaje de los microtubulos (Himes y Houston 1976) .

La esfingosina 1-Fosfato (S1P) un lisofosfolípido derivado del metabolismo de la esfingosina que regula múltiples procesos celulares entre los que destaca el re-arreglo del citoesqueleto, las adhesiones

célula-célula y las interacciones célula-matriz, entre otros (Spiegel y Milsten, 2003). Este lípido bioactivo señala a través de diferentes receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que activan diferentes proteínas G, particularmente G_i , $G_{12/13}$ y G_q a través de los cuales puede conducir a la polimerización de la actina (Ikeda *et al.* 2003, Brinkmann 2007; Vázquez-Victorio *et al.* 2015; Vázquez-Victorio *et al.* 2015, en prensa). Los hepatocitos expresan los receptores $S1P_1R$ y $S1P_5R$ que activan a las proteínas G_i o $G_{12/13}$ respectivamente. Nosotros en este trabajo observamos que S1P induce un incremento en los niveles proteicos de SnoN, pero desconocemos la vía por la cual S1P podría regular los niveles de SnoN. Por resultados obtenidos de Vázquez-Victorio *et al.* 2015 en prensa, la vía a través de la cual se modulan positivamente los niveles de SnoN es a través de $S1P/G_{12/13}/Rho/ROCK$, debido a que si se bloquea esta vía empleando el inhibidor de Rho, el Y27632, se bloquea el efecto de la S1P sobre la estabilidad de SnoN en hepatocitos (Figura 21).

Cabe destacar que adicional a los resultados obtenidos encontramos que el RNAm de *sno* en los hepatocitos es muy estable, debido a que el tratamiento con Actinomicina D por 2 h no conlleva a una disminución de este mensajero, surgiendo así preguntas como: ¿cuáles son los mecanismos que regulan la estabilidad del mRNA de *sno*? y si este es accesible a la maquinaria de traducción.

Por otro lado, retomando los resultados obtenidos respecto a la proteína de SnoN, este trabajo deja abiertas preguntas sobre: ¿cuál es la relación entre SnoN y el citoesqueleto de actina?; datos no publicados por nuestro grupo, han encontrado que SnoN interacciona con actina pero se desconoce si ocurre con la actina en un estado de G-actina o F-actina, aunque los datos sugieren que podría ser F-actina; sin embargo, se desconocen los mecanismos que regulan esta interacción y cual es el papel de SnoN en este nuevo escenario.

La actividad transcripcional de los co-reguladores de la vía de Hippo: YAP y TAZ es regulada a través de señales mecánicas vía el citoesqueleto de actina (Dupont *et al.* 2011, Halder *et al.* 2012). Su vía de regulación implica una casacada de cinasas como Mst1/2 y Lats1/2. Una pregunta que plantea este trabajo incluye averiguar si el incremento en los niveles de SnoN cuando hay una mayor cantidad de F-actina, promueve la interacción de SnoN con los reguladores co-reguladores transcripcionales de la vía de Hippo YAP y TAZ, las cinasas que lo regulan o también si pueden interactuar con los factores transcripcionales TEAD, dado que S1P también promueve la activación de YAP y TAZ al inhibir la actividad de las cinasas Lats 1/2, quienes fosforilan a YAP y TAZ para inactivarlos (Yu *et al.* 2012). Otra evidencia que puede apoyar esta propuesta es el hecho de que la proteína Ski, que se encuentra

relacionada con la proteína SnoN, interactúa con los factores transcripcionales TEAD (Rashidian *et al.* 2015). Aunque es posible considerar que la interacción de YAP y TAZ con SnoN, también podría ser mediante las proteínas Smad, quienes también son capaces de interactuar con YAP y TAZ en respuesta a la densidad celular (Varelas *et al.* 2010).

CONCLUSIONES

1. En la región regulatoria 5' del promotor del gen de *sno* en ratón, se localiza un *super-enhancer* putativo de 22Kb que consta de 8 diferentes secuencias de *enhancer* definidas por marcas epigenéticas (H3K4me1, H3K27ac) y por los factores como polII, Med1 y p300 (Figura 21).
2. Los compuestos moduladores del citoesqueleto como CytD, S1P y LPA inducen un incremento en los niveles de la proteína SnoN que no depende de la transcripción del gen *sno* (Figura 21).

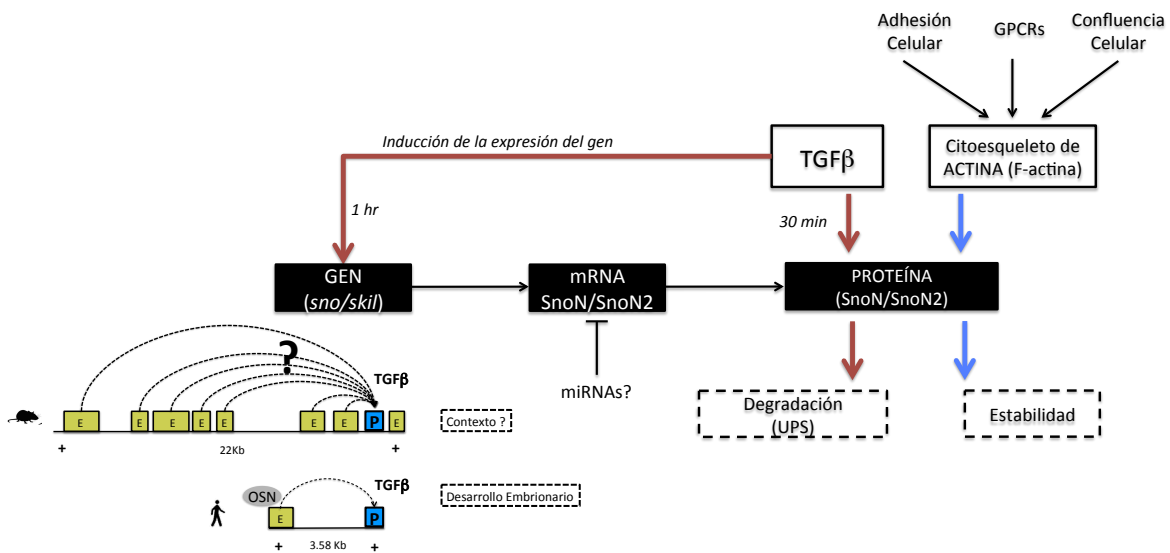


Figura 21. Modelo. Regulación de la expresión de SnoN en los Hepatocitos. En este modelo ejemplifican los diferentes niveles de regulación de SnoN/SnoN2 en hepatocitos. De izquierda a derecha, su gen es regulado a través de dos secuencias regulatorias: un promotor y un *super-enhancer* el cual solo se ha definido en humano en un contexto de células troncales pluripotentes pero no se ha identificado en ratón. En ratón este *super-enhancer* se predice que puede estar conformado por un agrupamiento de *enhancers*. A nivel de mRNA, miRNAs pueden potencialmente regular la estabilidad de su mRNA a través de sus regiones UTR. A nivel de proteína, la señal de TGFβ y el citoesqueleto de actina en particular condiciones que promuevan la polimerización de actina (hepatocitos en cultivo a baja densidad, estímulos vía GPCR_{G12/13/Rho}) regulan la estabilidad de proteína de SnoN/SnoN2.

PERSPECTIVAS

-Caracterización del Super-Enhancer regulador del gen sno:

1. Clonar el *super-enhancer* putativo y determinar si es funcional en ratón.
2. Determinar cuales de las secuencias que conforman el *super-enhancer* putativo son funcionales o si estas actúan en conjunto como una unidad.

-Caracterizar el papel de la dinámica del citoesqueleto de actina sobre la estabilidad de SnoN:

1. Determinar el mecanismo mediante el cual la dinámica de polimerización de actina incrementa los niveles de SnoN.
2. Determinar si S1P y LPA promueven el incremento de los niveles de SnoN por medio de alguna modificación postraduccional.
3. Caracterizar cual es la relevancia funcional de que se incrementen los niveles de SnoN por cambios en la polimerización de actina.

-Determinar la función de SnoN en los hepatocitos

-Identificar a los genes regulados por SnoN en los hepatocitos e investigar la relevancia biológica de su regulación.

REFERENCIAS

- Akagi I, Miyashita M, Makino H. (2008) SnoN overexpression is predictive of poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol **15**:2965- 2975
- Alarcón, C., A. I. Zaromytidou, Q. Xi, S. Gao, J. Yu, S. Fujisawa, A. Barlas, A. N. Miller, K. Manova-Todorova, M. J. Macias, G. Sapkota, D. Pan and J. Massagué (2009). "Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways." Cell **139**(4): 757-769.
- Aragón, E., N. Goerner, A. I. Zaromytidou, Q. Xi, A. Escobedo, J. Massagué and M. J. Macias (2011). "A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code." Genes Dev **25**(12): 1275-1288.
- Bhave VS, Paranjpe S, Bowen WC, Donthamsetty S, Bell AW, Khillan JS, Michalopoulos GK. (2011) Genes inducing iPS phenotype play a role in hepatocyte survival and proliferation in vitro and liver regeneration in vivo. Hepatology. **54**(4):1360-70.
- Bonni, S., H. R. Wang, C. G. Causing, P. Kavsak, S. L. Stroschein, K. Luo and J. L. Wrana (2001). "TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation." Nat Cell Biol **3**(6): 587-595.
- Brinkmann V. (2007) "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease". Pharmacol Ther. **115**(1):84-105.
- Caligaris C., Vázquez-Victorio G., Sosa-Garrocho M., Ríos-López DG., Marín-Hernández A., and Macías-Silva M. "Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes" Biochim Biophys Acta. **1850**(9):1832-41
- Consortium, E.P. (2004). "The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project". Science **306**: 636-640.
- Cyster, J. G. & Schwab, S. R. (2012). "Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs". Annu. Rev. Immunol. **30**: 69–94
- Deheuninck, J. and K. Luo (2009). "Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling." Cell Res **19**(1): 47-57.
- Dermitzakis ET1, Clark AG. (2002) "Evolution of transcription factor binding sites in Mammalian gene regulatory regions: conservation and turnover". Mol Biol Evol. **19**(7):1114-21.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore and S. Piccolo (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." Nature **474**(7350): 179-183.

- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). "Cell mechanics and the cytoskeleton". *Nature* **463**, 485-492.
- Halder, G., S. Dupont and S. Piccolo (2012). "Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(9): 591-600.
- Han Ying-R. Hsu, Sarker Krishna P., Pot, Isabelle Angela, Netherton Stuart J. and Bonni Shirin (2006) "Sumoylated SnoN Represses Transcription in a Promoter-specific Manner" *J. Biol. Chem.* **281**:33008-33018.
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R.T., and Hay, D.C. (2010). "Post-translational modification by SUMO." *Toxicology* **278**: 288-293.
- Hernandez-Damian, J., Tecalco-Cruz, A.C., Rios-Lopez, D.G., Vazquez-Victorio, G., Vazquez-Macias, A., Caligaris, C., Sosa-Garrocho, M., Flores-Perez, B., Romero-Avila, M., and Macias-Silva, M. (2013). "Downregulation of SnoN oncoprotein induced by antibiotics anisomycin and puromycin positively regulates transforming growth factor-beta signals". *Biochimica et biophysica acta* **1830**: 5049-5058.
- Himes, R.H., and Houston, L.L. (1976). "The action of cytochalasin A on the in vitro polymerization of brain tubulin and muscle G-actin". *Journal of supramolecular Structure* **5**: 81-90.
- Hnisz, D., Abraham, B.J., Lee, T.I., Lau, A., Saint-Andre, V., Sigova, A.A., Hoke, H.A., and Young, R.A. (2013). "Super-enhancers in the control of cell identity and disease". *Cell* **155**: 934-947.
- Hsu, Y.H., Sarker, K.P., Pot, I., Chan, A., Netherton, S.J., and Bonni, S. (2006). "Sumoylated SnoN represses transcription in a promoter-specific manner." *The Journal of biological chemistry* **281**: 33008-33018.
- Ikeuchi, Y., J. Stegmüller, S. Netherton, M. A. Huynh, M. Masu, D. Frank, S. Bonni and A. Bonni (2009). "A SnoN-Ccd1 pathway promotes axonal morphogenesis in the mammalian brain." *J Neurosci* **29**(13): 4312-4321.
- Imoto, I., A. Pimkhaokham, Y. Fukuda, Z. Q. Yang, Y. Shimada, N. Nomura, H. Hirai, M. Imamura and J. Inazawa (2001). "SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(3): 559-565.
- Jahchan, N. S. and K. Luo (2010). "SnoN in mammalian development, function and diseases." *Curr Opin Pharmacol* **10**(6): 670-675.
- Jahchan, N. S., Y. H. You, W. J. Muller and K. Luo (2010). "Transforming growth factor-beta regulator SnoN modulates mammary gland branching morphogenesis, postlactational involution, and mammary tumorigenesis." *Cancer Res* **70**(10): 4204-4213.
- Kang, L.I., Mars, W.M., and Michalopoulos, G.K. (2012). "Signals and cells involved in regulating liver regeneration". *Cells* **1**:1261-1292.

Kellis, M., Wold, B., Snyder, M.P., Bernstein, B.E., Kundaje, A., Marinov, G.K., Ward, L.D., Birney, E., Crawford, G.E., Dekker, J., et al. (2014). "Defining functional DNA elements in the human genome". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**, 6131-6138.

Low, B.C., Pan, C.Q., Shivashankar, G.V., Bershadsky, A., Sudol, M., and Sheetz, M. (2014). "YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth". FEBS letters **588**, 2663-2670.

Macias-Silva, M., W. Li, J. I. Leu, M. A. Crissey and R. Taub (2002). "Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration." J Biol Chem **277**(32): 28483-28490.

Massagué, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-791.

Massagué, J. and D. Wotton (2000). "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system." EMBO J **19**(8): 1745-1754.

Michalopoulos George K. (2007) "Liver Regeneration" J. Cell. Physiol. **213**: 286–300

Muñoz-Espín Daniel y Serrano Manuel. (2014) "Cellular senescence: from physiology to pathology" Cell **15**:482-496.

Nagano, Y., K. J. Mavrikis, K. L. Lee, T. Fujii, D. Koinuma, H. Sase, K. Yuki, K. Isogaya, M. Saitoh, T. Imamura, V. Episkopou, K. Miyazono and K. Miyazawa (2007). "Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **282**(28): 20492-20501.

Nomura, N., S. Sasamoto, S. Ishii, T. Date, M. Matsui and R. Ishizaki (1989). "Isolation of human cDNA clones of ski and the ski-related gene, sno." Nucleic Acids Res **17**(14): 5489-5500.

Pan, D., Q. Zhu, M. J. Conboy, I. M. Conboy and K. Luo (2012). "SnoN activates p53 directly to regulate aging and tumorigenesis." Aging Cell **11**(5): 902-911.

Pan, D., Q. Zhu and K. Luo (2009). "SnoN functions as a tumour suppressor by inducing premature senescence." EMBO J **28**(22): 3500-3513.

Pelzer, T., G. E. Lyons, S. Kim and R. W. Moreadith (1996). "Cloning and characterization of the murine homolog of the sno proto-oncogene reveals a novel splice variant." Dev Dyn **205**(2): 114-125.

Peters, J. M. (1999). "Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex." Exp Cell Res **248**(2): 339-349.

Poser I, Rothhammer T, Dooley S, Weiskirchen R, Bossert- hoff AK. (2005) Characterization of Sno expression in malignant melanoma. Int J Oncol **26**:1411-1417.

Pott Sebastian y Jason D Lieb. (2015)What are super-enhancers?. *Nature* **47**(1):1-12

Rashidian, J., Le Scolan, E., Ji, X., Zhu, Q., Mulvihill, M.M., Nomura, D., and Luo, K. (2015). "Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression". *Science signaling* **8**,:ra14.

Roberts, A. B., L. C. Lamb, D. L. Newton, M. B. Sporn, J. E. De Larco and G. J. Todaro (1980). "Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6): 3494-3498.

Rubinstein M y Souza FS (2013) "Evolution of transcriptional enhancers and animal diversity". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368(1632):20130017.

Shinagawa, T., H. D. Dong, M. Xu, T. Maekawa and S. Ishii (2000). "The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice." *EMBO J* **19**(10): 2280-2291.

Spiegel, S. & Milstien, (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4** (5): 397–407.

Swarthout, J.T., and Walling, H.W. (2000). "Lysophosphatidic acid: receptors, signaling and survival". *Cellular and molecular life sciences* : *CMLS* **57**, 1978-1985.

Taub, R. (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 836-847.

Tecalco Cruz, A. C., M. Sosa-Garrocho, G. Vázquez-Victorio, L. Ortiz-García, E. Domínguez-Hüttinger and M. Macías-Silva (2012). "Transforming growth factor-β/SMAD Target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4." *J Biol Chem* **287**(32): 26764-26776.

Tsuneyoshi, N., E. K. Tan, A. Sadasivam, Y. Poobalan, T. Sumi, N. Nakatsuji, H. Suemori and N. R. Dunn (2012). "The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells." *Genes Dev* **26**(22): 2471-2476.

Vázquez-Victorio G., Caligaris C., Del Valle-Espinosa E., Sosa-Garrocho M., González-Arenas NR., Reyes-Cruz G., Briones-Orta MA.,and Macías-Silva M. (2015). "Novel regulation of Ski protein stability and endosomal sorting by actin cytoskeleton dynamics in hepatocytes" *J Biol Chem.* **290**(7):4487-99.

Vázquez-Victorio G, González-Espinosa C, Espinosa-Riquer ZP, and Macías-Silva M. (2015). Chapter 9: GPCRs and Actin Cytoskeletal Dynamics, in the volume: G-protein-Coupled Receptors: Signaling, Trafficking and Regulation (edited by A.K. Shukla), in the serial entitled Methods in Cell Biology (Edited by L Wilson and P Tran) from Elsevier. (En prensa)

Weirauch MT, Hughes TR (2010) Conserved expression without conserved regulatory sequence: the

more things change, the more they stay the same. *Trends Genet.* **26**(2):66-74.

Whyte, W. A., D. A. Orlando, D. Hnisz, B. J. Abraham, C. Y. Lin, M. H. Kagey, P. B. Rahl, T. I. Lee and R. A. Young (2013). "Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes." *Cell* **153**(2): 307-319.

Yu, F. *et al.* Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling" *Cell*

Zhang, F., M. Lundin, A. Ristimäki, P. Heikkilä, J. Lundin, J. Isola, H. Joensuu and M. Laiho (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**(16): 5005-5010.

Zhu, Q., Y. H. Kim, D. Wang, S. P. Oh and K. Luo (2013). "SnoN facilitates ALK1-Smad1/5 signaling during embryonic angiogenesis." *J Cell Biol* **202**(6): 937-950.

Zhu, Q., A. R. Krakowski, E. E. Dunham, L. Wang, A. Bandyopadhyay, R. Berdeaux, G. S. Martin, L. Sun and K. Luo (2007). "Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis." *Mol Cell Biol* **27**(1): 324-339.

Zhu, Q. and K. Luo (2012). "SnoN in regulation of embryonic development and tissue morphogenesis." *FEBS Lett* **586**(14): 1971-1976.

Tesis

Domínguez Hüttinger Elisa. (2008). Análisis bioinformático del promotor de *sno* de *Homo sapiens* y *Mus musculus*. (Tesis de licenciatura inédito) Facultad de Ciencias, UNAM

Páginas Web

NCBI-BLAST

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAM_S=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&QUERY=&SUBJECTS=

Transfac

<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>

Alggene

http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

Jaspar-vertebrados

http://jaspar.binf.ku.dk/cgi-bin/jaspar_db.pl?rm=browse&db=core&tax_group=vertebrates

UCSC Genome Browser

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=353391719&clade=mammal&org=Mouse&db=0>

Anexo1. Secuencias de posibles enhancer para *sno* en *Mus musculus*

>Enhancer 1 mm9_dna range=chr3:30994293-30995049

ATTCTGGGACGGGTCAGCTGGGAGGGGATGGCGGTGCACTTGACCCGAGCCGCCGGGACCCAGGA
GACCTGGACCCTGGTCATCGCCGCCATCCCCGGCCGTCTGCGCTCGGCGGGGATGCCCCGGGCTG
GCCCCAGCTCTAAGCGTCCGGCGACGCGGGCTTCCGGGCTTGGCGCCTAACCTGCCCCGCGCCCCTG
TGGGTGCCACGGCTCAGGGTGGGTCAAGTGGGGGGAGGCGCAGCCCTGGGGCGCCTAGGTAACCC
TAGAGAACTTCCCGCGGGCCGGGGGCGTGGGGTATTTCCACCGGCGGGCCCCCGCAGTGGGGCGAT
GTGGGGAGGGCACTTAGGGTGTATCCAGTCACAGAGGTGGGGGTGGGAGGACTCTACTTCCTCT
GCCCCCTCTACCTACAGACGCCGGGAGTCCCCTGCTTCCCTGTCTTTGGGTTGATGATGAGTG
GGTGTCTCTGCGTGTGCGCAGGGCTGTGGGGGCGCCCCTGGTCTAGGTCATGCCTTCTGCCCTTTC
CTTGGCTCGCCTTGGCTGAGGTGTCCCTGTAGTGGCGAAAGTCACAGTACGGTGGCTAGGTGGCTT
TCGTCCATAATTCTCTGGGTTTGTGTTAACATAAATTGCTGGGAGTTTAGAAGCAAAGCTTTTTATT
TGTCGGCTTTTACTGGGTTTCTCCAGGGAGGGAAGTGGATGAATACTTTTTTCGCCACTCTGCCT
CCATTTGCATTCTTTGTGAGGTCTGTCTGC

>Enhancer 2 mm9_dna range=chr3:30992065-30992528

CTCAGTTATCTTGGTTTCTAAATTTGTTTTTTTCTGGTTAGATCCAGAGCCAGGTGCAAGGAGGCCA
GGTGCTCAGTCTCAGGACTATCCTGGCGTTGCGCCTCAGCTTTCAGTCGGGCTTATGAACATTCTG
GCGTTAGACCATCTATCCCCAGACTCGCAGATGCTGCTCTTCCCCACTGGCTCTGCACAGAAC
ATCATTATCTTTGCTGAGCTTCTGTCTCTATGGCAATAACAGATGGGAAGTGCTGCGGAATTATCA
TGTTACACAGGCAGTCAAGAAGCGTCGAGTAGGAGGTGGGAGAGGGGCATGACCTGGGAGCACG
GAGATGGGGGCCGACAGGAGCTGGGGCGGAGGCGGTGATGAGAGGTGACATTTGTTAGACCTATT
GTGGGGGTTAAAAAAAAAAGGACGAAAAATCCTCAAGCACAAAAGTATTCCAATTGGACAAC TG
C

>Enhancer 3 mm9_dna range=chr3:30989822-30991142

GCCTGGGAGATGATCACATATTCTTCAGTCTATACGTTCAATTAGGGGCATGTCACAATTTGAAGT
CCTCTTCTGCCATCTCTGCCTTGGCTTTGTTAGCTGTTGTTGTTAGTTCTGACTAATTACTAGTCTGT
CACTGCAGGTGTTGCCAGTACTAGACCTTGATGGTGTCTGCTAGCTGCTTATTGGACAGTCCTCTTT
CTCCTCTACGTGACTGGATTGCAGTTTATCACCGGCCTTACACCACTACGGTCTATGGATAGTTAAC
ACTTATCATAGTTACCAAGATGTGGCTGTAGTTTCCACGTGTTCCCTTCACTCTCATCTCCTTGTCTAGC
TGATGGCCTCTTTTCTGGACTAGGTTGATGCTTCTTGTGGAAGTGGAGGGAGCCAGCCAGACTGC
CAACACTTGCTCAACACCCTGTCCCTTCCCTGTTATCTGTCCACTTGGGTATCTCTTCTCCGGCTGTAA
GCCTCAGGTTTACGCCTCTGCCTTCCCAATCTCACCCCTGTGACTCTAACAGAGTTTGCTTTCACATT
TGTAGATTCTTGGATTCTACCATTACCAGACAGCTACACCTACTAATGAAGGGATATTTAGGTATCT
TGTCCCAGTCTTTACTATGTAACAGGAGAGGACCAGACACCCGGTCCCACTCCACCATCTGGAATTC
TTAGAACACTGGCATGCTCACACAGGTCTTGCTCCGCTCCAGCTGGCAGTGAAGGTGTGGCCTTGC
TGGAGGACTTGTTGCCTTGTGAGGAAGGGTGTCACTGGGAGTGGGCTCTGATGTTTCAAAGCC
TGCGTGAAGCCCAGTATTTCTCTCTCTGCCTGCAGATCAGGATGTAGCTCTCAACTCTTTCCTCATT
ACCATGCCTGCCATCGTGCTTCCCTGCTGTGATGATATTGGACTAAGCTCCTGAGACAGTAAGCCAG
CCCAACTAAAGGCTTTAAGAGTTGCCTTGGTCAATGCGGTCTCTTCACTGCACTAGAACAGTGATGA
AGACATTGTCCTTGGGTAGTTTTCCACCTATTTTTATTTAGAACAGTTTTGCCTGCATGTATGTATG
TACGTATGGGTGTCACGTTTATGTTAGGTGTTCCAGGAGGTCAGACGCCCTGGTACTGGAGTCACA
GACCGCTGTGAGCCACTGTGTGGGTGCTAAAAATTAACCTTCGATCCCTGTTAGAACAAGATGGC
TCACATGAACCATCTCTTACGCCTTCCACCTTACTTTTTGAGACAGGATCACCTATGGAGCCTGGAG
CTTACGGATCCAGTTAGGCTGGATGGCCAGTGAGCCCCGGGGATCTACCTT

>Enhancer 4 mm9_dna range=chr3:30984024-30985623

CTCTCTGGGCAACCCTCATGCTTTCTTTTTTCAGTGTAGGCATCTCAAACCAACATCATTTCAGGAGA
ACTTCCTGACATAACGGTGTGCCTCTGTGTTGTTTCAGCAGAGCCACTTGCCTACTTGAAGTATGCG
ATGAAGAGATTTGGTTTTTACTTTTCATTCATTTCAATGTAAGTGGCTCTGTTTGGGCAACACAGCTC
TCTTTCTTGCTAATGCTGATAGGTTTCTTCTGTGACCACAAGCAAAGAGCGCTGTTGGGAGTAGCAC
CAAGGTAGGCTTGCTGGTTGAACCCCTGCATTTGACTCAAGTGCCCATGGGGGGAAGGAGCAAAT
AGAAGAATTCTTTGTAGTGTCACTACTGCTGCCTTCCAGGTCCTTCTCAGATCCCAGCCTCTTAGG
ACTCCGCAGACTGCAGAGAGCAGAAAGTCACTTGGATTTGGTCTGGGGGAGCAGGAGCACCCAAA
GGCATGAAATCAGCATGGCCCCTGGATATACAATATATTTACTCTCCGTGAACACTGAGTTTTACCT
GTTTCCCCCAAATCTGCCTCATTGGCCACACGTGGCAACTTAGCTGACGACTTTCTACCTCATAG
CAGTAAACAGGACCACCCAAAGCTCTTGTCAACACACCAGCCAGGCTGAGGCTGTATTTCTCAGTG
TTCATTCCAAACGCTTCTAGCAAGGTACCCCTGGCCTAGGGTGGCTTATGTGTGCAGTCTTCTCC
GATTCCTGTGACTGAGAACAAGGCTAACTTTAGCTGTATGAAGCTCTGTGGGTTTTTTGGTTTTGT
TTTTGTTTTTTAAATGGCTATGTGGCTAAAGAGGGTGGTGGGAAAGGGACAGGCGAATAAATGGG
AGCTGGGCACGGTAGCACAAAGCCTTAATCCCAGCCCTTGAGAGGCAGAGGCAGGTGGAGTGTTT
GAGGCCAGCCTGGCCTACAAAGGGAGCTACAGGACAGCCAGGGCTGTTACACAGAGAAACCCTGT
CTCGAAAAACAAAGGAAAAATCATATCGAAACAAAGCAAGGGGCACTGGGGGTAGAGAAGCCCA
TGAGAGGCAACCACCATTCTCACTCCGATCCTTGGTGACCTGGTCCTTCTCTGAGTCCCCCTTCTCA
GGTTGTATAGTCTGTCTCCATAGCCTCCTTTGATGGAAGCTTCCCTACCCATGTTCCATTACAGCAG
GACTCTGCTGCCAGGTGACTAATTAGTCTGATGTAGACAACACTGACTAAATGGAAGAACTCACTTGA
GGAACAGAGAGCATCAGTTTCTCACTGAACAAGTGGGGATGAAATGGCCTATTGATTGGGGGGT
GGGGGGGGCAGGGGTTAGAGCCAAATAATCAAAGTTATTACCAAGAACAACCTTCTTCTTCTAATA
AAAACATTTCTGCTTAATCTATATGGCAACGAAACCGTCATGTCTTCTGGGGAGGTTAAGCATGTG
ATGCCAGGAGAATAGAATTACGGTG
TACCATGCACACATGAAAAGATCGAGAGGACAGCCTCGTGGAGCTTGCCCCTTTTTGAACTTCACA
TGGGTTCCAG

>Enhancer 5 mm9_dna range=chr3:30982464-30983544

CTTTCTCCTCCTCCTCTTCTTTCTCGCCTACTTCTCCTACCTATGCTATCCCAGCTGTCCACAAATTC
TGGACTCAGCAACACCCCCCACCCTCTCAACCCCCCACACCCGCCTTAGCCTTCTGAGT
AGCTGGCATAAGGGGCATGGCAGCTGTGCCACCCATTTTAATTGGCCCATGGATCTGGCAGTTTTTC
TGTTTCTAGCCCTGCCCTCTTAAACTCTTCCAGAATACATCTAGAATCTCCAGTTTCCCCCTCTGCCA
CATTAGGAAGCACCGATTTGAGGGTATGTCCCTGAGAGACAGGTGGAGGAACTGGTGTGGAGATA
TTTGGCCATCTGCCAAGGCTGACAAAACCGGCACTCTATGAGTTAATTGGGCCCTGGCTCACTGCC
TGTTAGGTTCTGACCCCGATTCTGTCAACAAACAAGATTGGATCTGGTCTGTGGCCAGGTTTACA
TTAACAAACTCGTAGCGCCATGAGCACGCAAGCCTCACAGCACAGTTAGCGTTAGAGAAGAGAC
TACATGTCATTAATGTGGAGTCTCCCCGCATACACGTGGTTTTGGGAAGCCCCACTACAATTGGAAG
GCTGCTCTGTGGTCAAGAAGTAAGAAAAGGGAAGTTAAATACATAACTTGGTTTTCTGAGCAGATTG
GGCCTGATTCGTAAATTTCCAAAAGTGAGCTAACATTTCCCGATCTTGCTGACTGACTTAAGCCTTCT
GAGCAATTTACTCATCTTGTGAATTTGTTAAGGCCACTGAGTAAAATTTCACTCAGAGAAGAAAAT
CATCTTTTTTCTTTAAAGGGAGTTTTGCAGGGTCCAGGAGAGAGTGACTAACTAAGACAACGGCAG
AGTTCCTAGGCAACTCAGAAAACACTACATGGGAACAGACAAGAGGACAGGCATTTGTATCCCCTGG
CTTTTCCCTCTCTTCTTTCAAAGCCATCAAGATTCACACACAGGAACCCCCATCCCTAGTGACTTAC
AAAAGCCTAATCACTAACACACACACCCCCAAAGGCCCGTAAACATTGTAATGTTCTTAATACTT
CACGATGGGTGAAAACACAA

>Enhancer 6 mm9_dna range=chr3:30979465-30981625

TTCGGGAGTGTCTGAAGATAGCTACAGTATACTTACATATAATCAATCAATCAATCTTAAAAAAA
AGAGCAGTTAAAAAAGACCTCACTTCTCATGCATAATTCCCATTCTGTCCATCAGTGAGC
ACCCACCATTGCTGATACAGGATGGAAAGACTGACAGATAAAATGACAGAGCTGTTAGTAAGACT
CAGTCAGTTTTACACATACTAGACATATATTTACAAGTAACCATTTTACTTGTACAGTAATAA
GCACACAAGTTATTTAGGTGCCACACGAGGGAGATGGCTCCGTGGGTAAAGTGCTTGTGAGCGA
GCATGAGACTGAGTTCAACCTCCAGCCCCATAGAGAAAGGTTAGGACTTGTATCCTCCCCACTGG
AGAGCTGGAGACAGGTGGGTCCCTTTGAGCTCCCTGGGCAGCCAGCCAGGCTGCTTGGGTAATCA
GGGTCCAGTGAGAGAGCTGGTGGACAGTTCCTGAAGAAAGAACCATATTGAGGTTGACCTCTGGC
CTCCATGTGTGTCCGCTCCCGCTGTACCCACAAAAGTACAGACTCAAAGAACATACACCCACAT
AGAGAAAAAAGGAGAGAGAGAAAGAAAGAGAAAAGCGGGGAGAGGGAGAGAGAAAAACCCA
CCAGTAATTAGGTCATAAGGAGCAAGTCTAGTTGGCTGACTGAACCCTTTGGCCAGGCTTTCTGGG
TCAGACTAAGTCCCTGGTTGCTGGCCAGCCTAGGGTTCAGGTCCCTTTCCCTGGTCTTTTCAATGCC
ATTCTTTCCCTCTGCAAGGGACTGCAGCCAGGCTGGTTTCTCTAGAGGAGGAGTTGTAAGGGTGCC
GGGCTCAGGGAAACAACACCGGTATTTCTCCTCACCCAATGACTTTGTTAGGATGAATTCTAAAAG
AGCAACCACCGAACAAAGACTATGGAAACATGCTAATTATGATACCCGACCTGTCAGATTTTTAAC
CATTATTTTTTCTTAATTAATTAATTTGTGTGTGTGTGGGGGGTGTTTACACACATGCGTGCA
GATGCAGAAATCAGAAGAGGACACTGCTCCATTACTCTCCAGTCTACTGAGACAGGGTCTCTCACT
GAACCTGGAGGTGGCGGACAAGCTCATGGATCCTCCTGTCCCCATGCCACAGCACTGGGTCTGCAG
AGTGGCTACATCTGACTGTTTAGAGGGGGCTGGACCGGAATTCAGCTCCTTGTGTGTAGAAAGCTT
CACTGACTCTCTGTCTTGTCTGCCAGCCCCTGTATTTTTCTTGATTTTCTATTCATATCCACCTAC
CAAATACCATAAATATGATGTTCCCTTTTTTTTTTCCAAGTGAGAAAACATGTAGAAAATGAAGTTTT
ATCTTTCCCTTCTCCTCCTCCTATGCCCTCCTTTCTACACCGGAATCCAACCGGGGTGTCAC
ACACGCTAGGCAAATACTCTAACTACACCACAGACCAACAGTTTCACTTTGGTAATCAACTTGCAT
TTGTAATAGTTGAACCTTACAATCTAGGTTGGTTTTGTTTGTGTTGATGTTTTGAGACTGAGTCT
CTCTGTGTAGACCTGGCTCTCCTGGATCTCACTCTGTAGACCAGGCTGGCTTCGAACGCAAAGATC
CATATGTATCAGCCTCCCGAGTGCTGGGATTAAGGGCGTGCACCAGCCCCCTGGCCTGTTCTTTGTT
TTGCTATGGACTTGTAGAGAAAGAATAAATTTGGGGAAATATTCATATCTCTAGAATGTTTCTATT
CCAAGGAAAGGTTAAGGCAGCTTGACTGTTTTGAGGAAGGTGAGACTGCAGGGCAGCGGGGAGAA
TGGCTCTTCAGGGCCTCTTCTTACTTAACTGTCCAGTTCTGTGAGCAAGTGCAGCAGATGCTACTGA
GGCAACGTAACCTCAGACAGAAGCAGGGATGCAGAGACCAACCCTACCCTCAGCTGAGTCTGCCT
CTGTACTTCCCTTCTGTCAGCCCAGCTGGCCTGTCTGAGAGTGGTCCCTGTGTCCCAGCCTCCTCCGT
CAGACTTCAGGTGGAGAATGTTCTCTGCTTTTTCTCATTGCATAGTTTATATTTTTATTATATTCCT
TATTATATGCTCCTTCCCTTGGTGCTGAGTCTCTCAAGCTT

>Enhancer 7 mm9_dna range=chr3:30978106-30979225

CAGACACACACACAGACACACACACAGAGACACACACACAGACACACACACAGACACACAGACACA
CACACAGACACACACACACAGACACACACACAGACACACACACAGACACACACACAGAGACACA
CACACAGACACACACACACACACAGAGACACACACACAGACACACACACACAGACACACATACA
GACACACAGACACACACACACAGACACACACACAGACACACACACACACAGAGACACACACA
CACACAGACACACACACACACAGAGGCACCCACCGATCCTGAAAGGACGGAGATGGTTCGCAGC
TGCTCAGCTGTAGCTGCATGTTTCTGATAGCTTGGTATCTGGACACTGAGTGCAGTGGTTGTTCTGG
CTGGCATTTTCTGGAAGCAAGACAGCAAACCTGGAGAGGTTGACAGCAGAGGAACTTCATGTTAGG
AAAAAGGTCTCAGGGGACACAGCAGGTGTGGCACTGCTGGTGAGGTCACAGAGGTCGGTTTGGGA
ACTGGCACTTCTTACTATTTACTTTGGCTGGGTGTGATCTCGGCTGTGTACATTCATAGATGGTC
CTGGGTGTGTGCGTTCGTGCGTGTGCGTTCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGGCCAGGGGAAGGGGTTTGGAGGTAATGATTGTTCCCTCAGTGCAGACAACTGTTACAG
CTAAGTAAATGTTAACACCTATTAGCAAGTTCTCCACATTTCTTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGT
TTGTTTGTGTTTTCGAGACAGGGTTTCTTTGTGTATCTCTGGCTGTCCCTGGAACCTCACTCTGTAGACC
AGGCTGGTCTTGAACCTCAGAAATCCACCTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCTGGGATTAAGGGCGTGCC

CCACCACCACCCGGCTTCTCCACATTCTTAAAATTATGGCAATGCAGTGTTTATCCTAATTTTGAAC
ATGTTAGAGATTTAAATATTGAATACCGAATGCCTGTCCCTTGTCCTCCAAGCGAGGGTGACCAA
AACTAATGAGGAAAACATCTAGAGTTTTACTTGACACACTGATTTATTTTAAAAATCAATAAAGTG

>Enhancer 8 mm9_dna range=chr3:30973467-30975586

GAATTCTCTAATGGACTCAGCCTGACCACGCCTGAGCATACTGATCAATCTCAATAGCCCAAACA
GAGAGACAGGAGCCACTGTGTGTCTTTTGTAACATGAGAAAGTAAACACACTCAAGTTGAATGTT
CTTGCTCTTCAAATCACAGGGGATTGGACAACATTTCTAACCTTTTTTGAAAAACAGCATCTTAGAG
ATCGAAGGCTGGCACCTAAAGCATGTATCCGAGGATGACCTTCCACGTCTGACCCTACTGCCACCA
TGCTCCAATTGCTGGGCTTATTAGCATGTACCACCAAGTCCAGTCTCTGCCATGCCGAGGATGGAG
CCCAGAGCTCATGGGTCTTAGGCAAGCACCTGGCCAGCTGAGCTGGATGCAATGGTTCCTGATACC
ATAAGGATGCAGCCTATAGAGCTAGATGATATCATAAGGATGAGCCCATAGGCTCAGAGTACAGG
GCCTTCTACAGGACAGTGGCAACTCCTTCAGTAAAGGAAATGTAAGGAAAAGAAGGTGGGTAGAT
AGATAAAGACCTTAAGGGATGTGTGAGTAGGCAGTATGTGTGTGTGCTTGATTCAAACACACAAAC
ACATGAACCACACAAACAAGTAAGCAAGTCTTCAAGAGACAGCTCAAACGCTGAACTCTGAGAAG
AACCATGGAGCTGTCCCTGAGTCCCTGTCAGCCACTGTAAGTATCACTGGCATTGTGCTTGTGTTA
TGGAGAGTTCTTCATGCGAGATATCACAGAGTACAGAGAAGCTAGTGTGGCCTGGCACTCTGGTTC
TACCAAGTGTTGCTACAGGGTGGGCTCTTTACCTAACAAAACCTGGAAAGCTGTCTTGAGTACCCA
GGCCTCTCTGACTTGTGAGAGAGTTTGTCTGTTGCCTGCAGAGATAGAGGCTCAGCCTTAGGCCT
GCAGAGCCAAGAAAATCCAGAATGGTTGGCAATTACGGTTGGTGTCTAATTGCTGGGTATGAACAT
GTCTGACTGGGCCAATGACAGGGATCGGTGGGGCCAGGGTAAATCAAAGAACAATTTCCCGGCAA
AAGCATTGAGTTTGTGGAAGAAAGAGGGGGAGGAATGGAGAAGAAAAGGAAGAAAAGGAAA
GAGAGGGACAGAGAGAGACAGGTACAGATAAGCTGGAGATAACACAGCCCCAGGCTATGTCTTCT
AGCCAGATTCTCCATCCCTACTTAGACATAAAGCTATACTTGAATGAAATCCATATTTTTTTGGCAGA
ACAGATGTTGCACACATCCATCTTTGACAGTCGCTAGAACGCGCCAGTGCCTAGTCAAGGTGGCAT
AAAAAAAAAATCAGCACACTTATCAACGTGACAGAGTAAGAACTGGTAGGAAATGCTCTACCAGG
AAAAAAGCCGTCCTTGGGGAGCCTGGCTGTGTTGATTTAGTGATAAGAATCTGTACACTAAGGTT
GTCAGCCAGCACAGGAAATTTCTCCTGGTGGTGAGCAGGCTTCTTAGTCGGGACGAATGGCCTCCA
GCCACATTGATTGGCTCCAAAGGGCATCTCTGAGACACAGGCAAAGGGCAACGCATCTAGATTTCT
GGGTACAGAAGGCCTTCTGACTTCTGAACGGGAGCGAAGGGCAAGGAAAGAGGCTGGAACCTT
ACTTCTTCGTGCCTATGAGTGGTTGGTTTTTTGTTTCATTTAAGACTGGGCCTGCAAGATGGCTCCAC
AGGTAAGGGTGTCACTGGTTAAGCCTGACAACCCACATTGAATCTCAGACCTATGAGGTGGAAG
GAACGAACTGATTCCAGCAAGTCATCTACTTGTACACATCAGGTGTTTTGTTTTGTTTGTCTGT
TTTAAAAAAGGGACAAGCAGAACCAGAACTGTTCCCTGAGAGTCTTTCACCAATAGCAGGATGTG
GGCTGGAACCAGCACAAACACATTAGGAGTTTTGCTGTTTTACCGGATAGGAAGTATTATCTATGT
GTTGGACTTGCAGAGAGGATGACTGCATTCAATTTTGCATTATCAAGGCCAAATACATTATTGAGA
GTAAAGGAACCAGGCCAAGCCTATGGAGGGCATGGTTATGGAGAAGATGTAGTCTTTGCTCTGGC
AAATTTTTATACCATAGC

Anexo 2 Propiedades de los compuestos empleados que modulan el citoesqueleto de actina

1. Características de los compuestos empleados que modulan la dinámica del citoesqueleto de actina.

Compuesto	Efecto sobre la polimerización de actina
Jasplaquinolida	Favorecen la formación de F-actina
Esfingosina 1 Fosfato (S1P)	
Ácido Lisofosfatídico (LPA)	
Citocalasina D (CytD)	Bloquea la dinámica de polimerización-despolimerización de actina
Latrunculina B	Promueve la despolimerización de actina

Anexo 3. Lista de Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Uso		Dilución utilizada	Almacen	Compañía
	IP	WB	WB		
SnoN-H317	+	+	1:1000	4°C	Santa Cruz Biotechnology
Smad2/3 N-19	+	-		4°C	Santa Cruz Biotechnology
p-Smad2 (Ser465/467)	-	+	1:2000	-20°C	Milipore
β -tubulina	-	+	1:2000	-20°C	Sigma Aldrich
β actina	-	+	1:2000	4°C	Santa Cruz Biotechnology

Anticuerpos secundarios	Dilución	Almacenaje	Compañía
HRP-Cabra anti conejo IgG	1:20000	4°C	Invitrogen
HRP-Cabra-anti-Ratón	1:2000	4°C	Zymed

Anexo 4. Soluciones empleadas

Medio de cultivo *Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM) (1L)*

1.5 g NaHCO₃
 1L dH₂O (* d = desionizada)
 pH 7.4

Una vez preparado el medio se esteriliza por filtración y es complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y con antibióticos como penicilina y estreptomina.

*Para medio de Ayuno el medio no se complementa con FBS y sólo se le adicionan los antibióticos penicilina y estreptomina.

Soluciones para lisis celular

PBS 1X

137mM NaCl
2.7mM Kcl
10mM Na₂HPO₄
1.8mM KH₂PO₄

Buffer de lisis RIPA 0.1% SDS

50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0.5% Nonidet-P40
0.5% desoxicolato de sodio
0.1% SDS

- Este Buffer debe ser complementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasas

Inhibidores de fosfatasas y proteasas

NaF (1M)
NaPPi (100mM)
NaVO₄ (100mM)

PMSF (1M)
Inhibidor de Tripsina (50mg/ml)
Pepstatina (5mg/ml)
Leupeptina (5mg/ml)
Antipaina (5mg/ml)
Benzamida (50mg/ml)
β-Glicerofosfato (0.5M)

Soluciones para inmunoprecipitación de proteínas

Buffer TNTE 0.1 % (100 ml)

150 mM NaCl
50mM Tris-HCl
1mM EDTA
0.5% Triton
dH₂O

Preparación de proteína G

Tomar del Stock 2 ml de proteína G-Sepharosa y lavarla con TNTE 0.1 % tres veces para retirar el exceso de etanol, centrifugando a 13 krpm en cada lavado y descartando el sobrenadante, al final resuspender la proteína G (1:5) con TNTE 0.1% y guardar a 4°C

Soluciones para electroforesis de proteínas

a) Laemmli 2x pH 6.8

4% SDS

10% 2-Mercaptoetanol

20% Glicerol

0.004% Azul de Bromofenol

0.125M Tris-HCl

b) *Buffer de corrida pH 8.3*

25mM Tris-base

190mM Glicina

0.1% SDS

c) *Buffer de transferencia*

25mM Tris.base

190mM Glicina

20% Metanol

d) *TBST 1X*

20mM Tris-base

150mM NaCl

0.1% Tween 20

e) *Solución de Bloqueo*

5% Leche *svelties* en TBST

PUBLICACIONES

-Capítulo de libro:

Robles-Flores Martha, Ríos-López Diana G., y Macías-Silva Marina. Las Vías De Señalización De TGF- β y Wnt: Reguladores Maestros De La Autorenovacion Y Diferenciacion De Las Celulas Troncales. EN EDICIÓN

-Artículo

Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not intranformed hepatocytes:

Biochimica et Biophysica Acta 1850 (2015) 1832–1841



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen



Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes



Cassandre Caligaris^a, Genaro Vázquez-Victorio^a, Marcela Sosa-Garrocho^a, Diana G. Ríos-López^a, Alvaro Marín-Hernández^b, Marina Macías-Silva^{a,*}

^a Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México

^b Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F., 14080, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2014

Received in revised form 21 April 2015

Accepted 12 May 2015

Available online 19 May 2015

Keywords:

TGF- β

Ski

SnoN

Protein stability

Transcriptional regulation

Hepatocarcinoma

ABSTRACT

Background: 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.

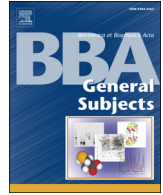
Methods: We carried out a comparative characterization of the endogenous Ski and SnoN protein regulation by TGF- β , cell adhesion disruption and actin-cytoskeleton rearrangements between normal and transformed hepatocytes; we also analyzed Ski and SnoN protein stability, subcellular localization, and how their protein levels impact the TGF- β /Smad-driven gene transcription.

Results: 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. The inhibition of protein turnover down-regulated both Ski and SnoN co-repressors impacting the kinetic of expression of TGF- β -target genes.

Conclusion: Normal regulatory mechanisms controlling Ski and SnoN stability, subcellular localization and expression are altered in hepatocarcinoma cells.

General significance: 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.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes



Cassandre Caligaris^a, Genaro Vázquez-Victorio^a, Marcela Sosa-Garrocho^a, Diana G. Ríos-López^a, Alvaro Marín-Hernández^b, Marina Macías-Silva^{a,*}

^a Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México

^b Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F., 14080, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2014

Received in revised form 21 April 2015

Accepted 12 May 2015

Available online 19 May 2015

Keywords:

TGF- β

Ski

SnoN

Protein stability

Transcriptional regulation

Hepatocarcinoma

ABSTRACT

Background: 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.

Methods: 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.

Results: 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. The inhibition of protein turnover down-regulated both Ski and SnoN co-repressors impacting the kinetic of expression of TGF- β -target genes.

Conclusion: Normal regulatory mechanisms controlling Ski and SnoN stability, subcellular localization and expression are altered in hepatocarcinoma cells.

General significance: 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.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

TGF- β is a pleiotropic cytokine that regulates a broad spectrum of cellular processes depending on cell type and context, such as proliferation, differentiation, migration and apoptosis [1]. The relevance of TGF- β /Smad signaling in controlling the liver homeostasis has long been recognized: TGF- β is a powerful cytostatic factor for hepatocytes, acting as an inhibitor of cell cycle and as an inducer of apoptosis, thereby

controlling the liver growth [2,3]. Any deregulation within the pathway promotes an increased turnover of hepatocytes, and predisposes to liver fibrosis and/or hepatocarcinogenesis [3–8]. The versatility of TGF- β effects relies on the variety of Smad2, Smad3 and Smad4 heteromeric complexes formed, as well on Smad interaction with a plethora of transcription factors whose expression is cell context-specific [1,9].

Nuclear Ski and SnoN proteins are known as potent co-repressors of Smad transcriptional factors due to their capacity to interact with R-Smad2/3 and Smad4, and by recruiting elements of the repressor machinery (e.g. HDACs, mSIN3A, or NCoR) on TGF- β /Smad target gene promoters [10–15]. Importantly, TGF- β is the main known signal that controls Ski and SnoN protein stability, which uses activated Smad complexes to target Ski and SnoN proteins for polyubiquitination and proteasome-dependent degradation [16]. TGF- β also induces the up-regulation of SnoN mRNA and protein as part of a negative feedback loop that eventually turns off the TGF- β signal, restoring the basal conditions [17]. Despite the fact that there are many characterized TGF- β /Smad-regulated genes, so far, only the negative regulation of two

Abbreviations: Hep, HepG2 human hepatoma; AS, AS30D rat hepatoma; FH, freshly isolated rat hepatocytes; HCC, hepatocarcinoma; TGF- β , transforming growth factor beta 1; T β R, TGF- β receptor I or II; pS2, phosphorylated Smad2; S2/3, Smad2/Smad3; CHX, cycloheximide; SB43, SB431542; ActD, actinomycin D; Jasp, jasplakinolide; CytD, cytochalasin D; LatB, latrunculin B; Colch, colchicine; WB, Western Blot; IP, immunoprecipitation; ChIP, Chromatin-immunoprecipitation.

* Corresponding author at: Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico. Tel.: +52 55 56 22 5729; fax: +52 55 56 22 5611.

E-mail address: mmacias@ifc.unam.mx (M. Macías-Silva).

genes, *smad7* and *sno/skil*, by Ski and SnoN co-repressors has been characterized [10,11,15].

Ski and SnoN proteins play important roles in regulating cell proliferation and differentiation [13,14]. Aberrant expression of these co-factors causes cell insensitivity to TGF- β signals, malignant transformation and alterations in cell cycle progression [14,18–21]. Likewise, it has been proposed that high levels of SnoN protein might lead to tumor growth whereas lower levels may favor tumor metastasis [20]. These findings strongly suggest that hyper- or hypo-expression of either Ski or SnoN may promote cell transformation.

Aside from the fact that Ski and SnoN can be transiently up-regulated during liver regeneration after partial hepatectomy or hepatic damage by carbon tetrachloride (CCl₄) treatment [22], little is known about their function and regulation in the context of a normal liver or in hepatocarcinoma (HCC). Herein, we set to characterize the regulation of Ski and SnoN protein stability in normal and transformed hepatocytes. We found major differences between the two cell contexts: in normal hepatocytes, Ski and SnoN proteins exhibit a short half-life, low stability, both nuclear and cytoplasmic subcellular localization, and are regulated by rearrangements of the cytoskeleton; importantly, TGF- β /Smad target genes show a transient up-regulation. Surprisingly, these features seen in normal cells are lost or deeply modified in hepatoma cells.

2. Material and methods

2.1. Material

Recombinant human TGF- β 1 (TGF- β 1) was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ). MG132 (proteasome inhibitor) and SB431542 (SB43, T β R1 receptor inhibitor) were obtained from Tocris Bioscience (Minneapolis, MN). Latrunculin B (LatB) and jasplakinolide (Jasp) compounds were obtained from Calbiochem-Millipore (Billerica, MA). Cycloheximide, actinomycin D and cytochalasin D were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Anti-LaminB, anti-Ski (H-329), anti-SnoN (H-317), anti-Smad4 (C20) and anti-Smad2/3 (N-19) rabbit polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phospho-Smad2 rabbit polyclonal antibody was from Chemicon-Millipore (Billerica, MA). Anti- β -tubulin mouse antibody was from Cell Signaling (Danvers, MA). Secondary anti-rabbit or anti-goat HRP-coupled antibodies were from Zymed-Invitrogen (Waltham, MA), while secondary anti-mouse HRP-coupled antibody was from Santa Cruz Biotech. Culture media and reagents were obtained from GIBCO-Invitrogen (Waltham, MA).

2.2. Cell lines culture and treatment

Rat C9 cell line (normal hepatocyte-like phenotype) was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. Human hepatoma HepG2 cell line was maintained in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10 % FBS, sodium pyruvate and penicillin/streptomycin. All cell lines were serum-starved for 12 h prior to each experiment; cells were treated with 0.3 nM TGF- β for indicated times. For acute Ca²⁺ removal, cells were pre-incubated for 10 min in an isotonic NaCl-based medium (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4 and 1 mM CaCl₂), and then incubated in the same medium without CaCl₂ plus 1 mM EGTA.

2.3. Rat hepatocyte primary cultures

Rat hepatocytes were isolated using the modified collagenase perfusion method from Berry and Friend as previously described [22]. Briefly, hepatocytes were isolated from collagenase-digested liver from Wistar rats and separated by centrifugation at 400 rpm for 2 min; viable hepatocytes (~95%) were isolated by iso-density percoll centrifugation

(Amersham-GE Life Science, Pittsburg, PA), and cell viability was evaluated by trypan blue exclusion. Fresh hepatocytes (FH, cells in suspension) were resuspended in William's E medium (Sigma-Aldrich), maintained at 37 °C (5% CO₂) and used within 1–2 h after isolation. For primary culture, hepatocytes were seeded on plastic Petri dishes coated with 1% rat-tail collagen type 1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cultured hepatocytes (CH, adherent cells) were allowed to adhere for 4 h in the presence of attachment medium, and then cells were cultured for 24 h in feeding medium (serum-free attachment medium) [23].

2.4. AS30D rat ascites hepatoma cells

AS30D hepatoma cells were grown by intra-peritoneal inoculation in female Wistar rats as previously described [24]. The cells were isolated from the rat ascites fluid at 5 to 7 days after inoculation, and immediately counted, seeded (20x10⁶ cells) in Petri dishes, and maintained at 37 °C (5% CO₂) for a maximum of 5 h in Williams E medium supplemented with 1 mM Hepes and penicillin/streptomycin.

2.5. Immunoprecipitation and Western blot

For protein analysis, cells were washed once with cold phosphate-buffered saline (PBS), and lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet) plus a protease and phosphatase inhibitors cocktail. After protein quantification, 80 μ g of protein was used for loading controls, and 1 to 3 mg of protein was used for the immunoprecipitation (IP) assays. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and detected by Western blot (WB) using enhanced chemiluminescence assay (ECL) (Millipore) or SuperSignal West Pico kit (Pierce-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Densitometric analysis was carried out with ImageJ 1.47 free software and data expressed as fold change over control.

2.6. Cell fractionation

The protocol used for cellular fractionation was modified from Grewal *et al.* [25]. Briefly, AS30D, HepG2 or C9 cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in homogenization buffer (3 mM imidazole pH 7.4, 250 mM sucrose and protease inhibitors cocktail) followed by 20 passages through a 22-gauge needle. The homogenate was centrifuged at 707 \times g for 15 min at 4 °C and the cytoplasmic fraction (supernatant) was separated from the nuclear fraction (pellet). Each fraction was lysed in RIPA buffer for 1 h at 4 °C, and then centrifuged at 19,100 \times g for 5 min. Protein extracts from each fraction were analyzed by IP/WB.

2.7. RT-PCR

The *smad7*, *ski*, *snoN/snoN2*, *pai-1*, *gadd45b* and β -*actin* mRNA levels were detected by RT-PCR as previously described [11,15]. Briefly, total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen), and 2 μ g of total RNA were used for cDNA synthesis using random hexamers (Roche, Basel, Switzerland) and M-MLV RT (Invitrogen). The PCR reaction was carried out using Taq PCR Master Mix kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) along with the specific primer sets described in the Supplementary Table S1, following the program: 95 °C for 5 min, 95 °C for 45 sec, 55 °C or 60 °C for 30 sec, 72 °C for 1 min. Products were analyzed by electrophoresis on 1.5 % agarose gels.

2.8. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were carried out as previously described [15]. Briefly, cells were treated with 1 % formaldehyde at 37 °C for 15 min and then sonicated on ice for 8 cycles of 30 s each with a Fisher Sonic

Dismembrator 300. The desired amount of protein-cross-linked DNA extract was pre-cleared in batches, and specific antibodies were used for immunoprecipitation. Primer sequences used for PCR are shown in Supplementary Table I. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels.

2.9. Statistical analysis

A Student's *t* test was used to calculate statistical significance. A *p* value < 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Hepatoma cells express higher levels of Ski and SnoN proteins than normal hepatocytes

We first analyzed the expression of negative co-regulators Ski and SnoN using two cell models: normal and transformed hepatocytes. The comparative analysis showed that Ski and SnoN protein expression levels were lower in Normal (freshly-isolated rat hepatocytes (FH) and C9 cells) than in Transformed hepatocytes (AS30D (AS) and HepG2 (Hep) hepatomas) (Fig. 1A and B). Surprisingly, *ski*, *snoN* and *snoN2* mRNA levels did not correlate with the protein levels in all hepatic cells studied (Fig. 1C), suggesting an uncoupling between mRNA levels and protein expression. Thus, the higher protein levels of Ski and SnoN found in hepatoma cells are probably due to an increase in protein stability and not to differences in gene transcription.

3.2. TGF- β induces Smad4-independent and -dependent genes in both normal and transformed hepatocytes but with different kinetics

We hypothesized that the high levels of Ski and SnoN co-repressors in hepatoma cells might inhibit the expression of TGF- β /Smad target genes. As Smad4 is a key component needed for the transcriptional repression mediated by Ski and SnoN [10,11], we analyzed mRNA levels of both Smad4-dependent (*gadd45b* and *pai-1*) and Smad4-independent (*snoN*, *snoN2* and *smad7*) TGF- β -target genes in hepatoma and C9 cells stimulated with TGF- β for the indicated times (Fig. 2). To our surprise, the hepatoma cells showed a strong expression and a sustained up-regulation of all the TGF- β -responsive genes analyzed (Fig. 2A and B). In contrast, almost all the TGF- β target genes evaluated were just transiently up-regulated in normal C9 cells (Fig. 2C). The differential expression kinetic of the TGF- β -target genes observed in normal and transformed hepatocytes suggests that the negative feedback

loop exerted by Ski and SnoN co-repressors, responsible for turning off the TGF- β -induced gene transcription, is present in normal cells but apparently absent in hepatoma cells.

3.3. Ski and SnoN protein stability is differentially regulated by TGF- β in normal and transformed hepatocytes

Since the different kinetics of gene expression induced by TGF- β in normal and hepatoma cells might depend on Ski and SnoN co-repressors levels, we further characterized the TGF- β -dependent Ski and SnoN protein regulation in normal and hepatoma cells (Fig. 3). As expected, Ski and SnoN protein levels were rapidly and transiently reduced upon TGF- β stimulation in normal hepatocytes, and only SnoN protein was up-regulated around 1–2 h after the stimulus (Fig. 3A and B). In the HepG2 hepatoma, we observed a rapid Ski and SnoN protein down-regulation and the subsequent SnoN induction upon TGF- β treatment; however, the time course was lengthened in these cells since the basal expression levels of SnoN and Ski proteins were recovered only until the TGF- β pathway was turned off, i.e., around 24 h post-treatment when the phosphorylated Smad2 (pS2) levels were decreased (Fig. 3C). By contrast, TGF- β barely down-regulated Ski and SnoN proteins in rat AS30D hepatoma cells (Fig. 3D); thus, both Ski and SnoN co-repressors seem to be resistant to TGF- β -induced degradation in this hepatoma cell type. However, TGF- β successfully induced Smad2 phosphorylation (pS2) and SnoN up-regulation in AS30D hepatoma, showing that the TGF- β pathway is normally activated. Taken together, our data show that Ski and SnoN protein levels are differentially regulated by TGF- β in both normal and transformed hepatocytes, and also among the different HCC cell lines tested.

3.4. Different subcellular localization of Ski and SnoN proteins between normal hepatocytes and hepatoma cells

According to previous reports, there is a link between the Ski and SnoN subcellular localization and their stability; thus, we evaluated Ski and SnoN subcellular localization in normal and transformed cells. As shown in Fig. 4A and B, Ski and SnoN localization was restricted to the nuclear compartment in hepatoma cells, and the nuclear Ski strongly interacted with Smad4 in both control and TGF- β treated AS30D cells (Fig. 4B). A striking observation was that Ski and SnoN proteins exhibited a clear resistance to the TGF- β -induced degradation in AS30D compared to HepG2 and C9 cells (Fig. 4B). Unexpectedly, we observed that Ski and SnoN were localized in both the nucleus and cytoplasm in normal C9 cells (Fig. 4C); importantly, the presence of Ski and SnoN in the

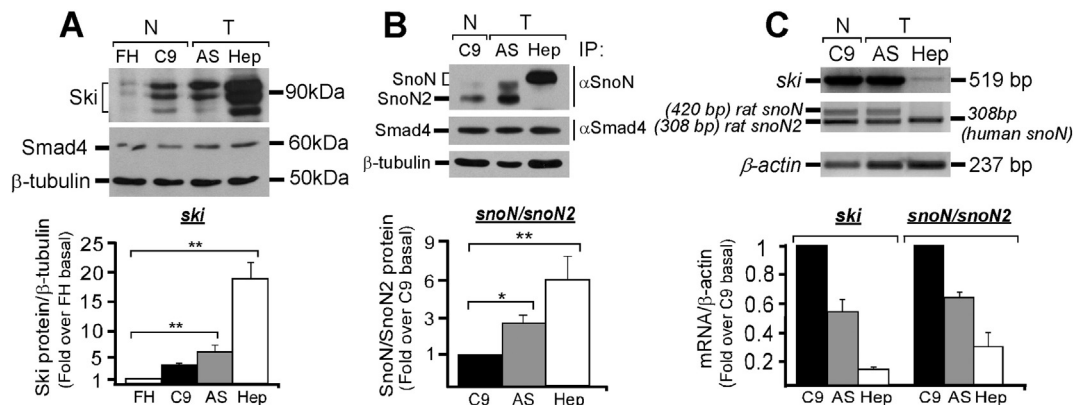


Fig. 1. Hepatoma cells express higher levels of Ski and SnoN proteins than normal hepatocytes. (A) Ski and Smad4 protein levels were analyzed by WB in whole cell lysates from Normal cells (freshly-isolated rat hepatocytes (FH) and C9 cell line) and Transformed cells (AS30D (AS) and HepG2 (Hep) hepatoma cells). (B) SnoN/SnoN2 and Smad4 protein levels in normal (C9) and transformed (HepG2, AS30D) hepatocytes were analyzed by IP/WB. (C) Comparative RT-PCRs show *ski* (human and rat 519 bp), *snoN* (human 308 bp; rat 420 bp), *snoN2* (rat 308 bp) and β -actin (human and rat 237 bp) mRNA levels in normal (N) and transformed (T) cells. Data are representative of 3 independent experiments. Graphics show densitometric analysis of Ski and SnoN/SnoN2 protein levels (A and B, lower panels) and mRNA levels (C, lower panel) as fold change over basal. Data are represented as mean \pm SD of three independent experiments; * *p* < 0.05 and ** *p* < 0.01 compared to control (i.e. FH or C9).

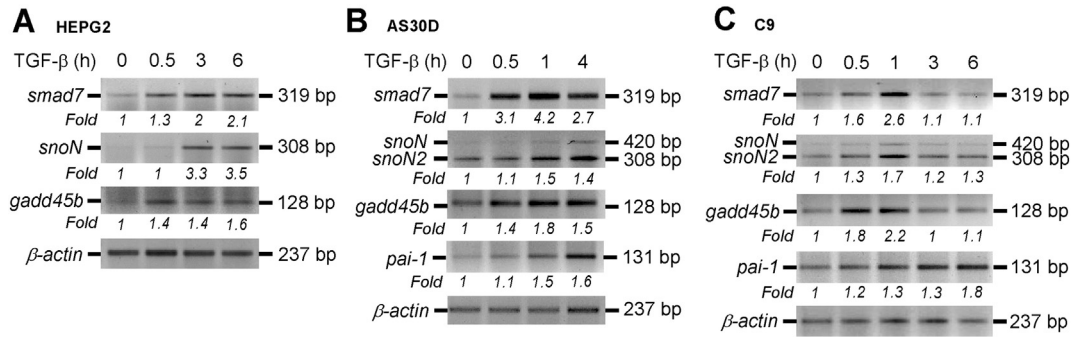


Fig. 2. TGF- β induces Smad4-independent and -dependent genes with different kinetics in normal and transformed hepatocytes. The mRNA levels of TGF- β /Smad4-independent (*smad7*, *snoN*, *snoN2*) and Smad4-dependent (*gadd45b*, *pai-1*) genes were analyzed in (A) HepG2 and (B) AS30D hepatoma cells, and in (C) C9 cells treated or not with 0.3nM TGF- β 1 for the indicated times. Total RNA was purified and mRNA levels were analyzed by RT-PCR with specific primers. Data are representative of at least 3 independent experiments. The fold change over basal (normalized to β -actin) is shown for the representative experiments.

cytoplasm of C9 cells did not interfere with the Smad translocation to nucleus (Fig. 4C); thus, Ski and SnoN function in the cytoplasm remains elusive. In addition, both the p-Smad2/Smad4 complex formation and the Ski protein down-regulation induced by TGF- β were prevented by the T β RI inhibitor SB431542 (SB43) in the nuclear and cytoplasmic compartments (Fig. 4D). These results show that Ski and SnoN localize in both the nucleus and cytoplasm of normal hepatocytes and are equally down-regulated by the TGF- β signal; intriguingly, the cytoplasmic localization of Ski and SnoN proteins is lost in hepatoma cells.

3.5. Ski and SnoN proteins exhibit a higher turnover in normal hepatocytes

Since Ski and SnoN protein stability does not seem to be influenced by the subcellular localization pattern in normal and transformed hepatocytes, we set to evaluate the half-life of both proteins using cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor. Ski and SnoN protein stability was not affected in hepatoma cells treated for different times with 20 μ g/ml CHX (Fig. 5A and B); also, their mRNA levels remained unchanged (data not shown). Surprisingly, the CHX treatment induced a rapid and strong down-regulation of Ski and SnoN proteins in C9 cells (Fig. 5C); whereas the transcription inhibitor actinomycin D (ActD) had differential effects on the co-repressors stability since it caused a more rapid decrease of Ski than SnoN levels (Fig. 5D), whereas ActD had no effect in hepatoma cells (Supplementary Fig. S1A and B). Also, the down-regulation of Ski and SnoN proteins induced by CHX and ActD in C9 cells was not associated with a decrease in their mRNA levels (Supplementary Fig. S1C and D). As expected, the time course of TGF-

β -stimulated HepG2 cells showed that Ski protein was *de novo* synthesized to reach basal levels after its early degradation induced by TGF- β (Fig. 5E); likewise the quick up-regulation of Ski and SnoN proteins after 2 h of TGF- β treatment seen in normal hepatocytes was also inhibited by CHX in C9 cells (Fig. 5F). Therefore, data show that Ski and SnoN proteins are very stable and have a very slow turnover in transformed hepatocytes, whereas they have a shorter half-life with a very high turnover in normal hepatocytes. This suggests that normal cells possess diverse, but yet unclear, mechanisms capable of efficiently regulating Ski and SnoN protein stability, which seem to be severely affected in transformed cells.

3.6. Cell adhesion and changes in the cytoskeleton assembly differentially regulate Ski and SnoN protein stability in normal hepatocytes

Recently, we reported that changes in the actin-cytoskeleton dynamics modulate Ski protein levels in regenerating hepatocytes [26]; here, we tested whether the rearrangements of actin-cytoskeleton and cell adhesion could affect Ski and SnoN protein levels in both normal and transformed hepatocytes. As a first approach, we used calcium-chelating EGTA treatment to inhibit cell-cell junctions and cell adhesion in normal and transformed hepatocytes. We observed that the EGTA treatment for 2 h had no effect on Ski and SnoN protein stability or Smad activation in hepatoma cells (HepG2 and AS30D) (Fig. 6A, upper and middle left-panels); hence, Ski and SnoN protein levels are insensitive to changes in cell adhesion in transformed hepatocytes. Surprisingly, EGTA treatment caused a dramatic reduction of Ski and SnoN protein

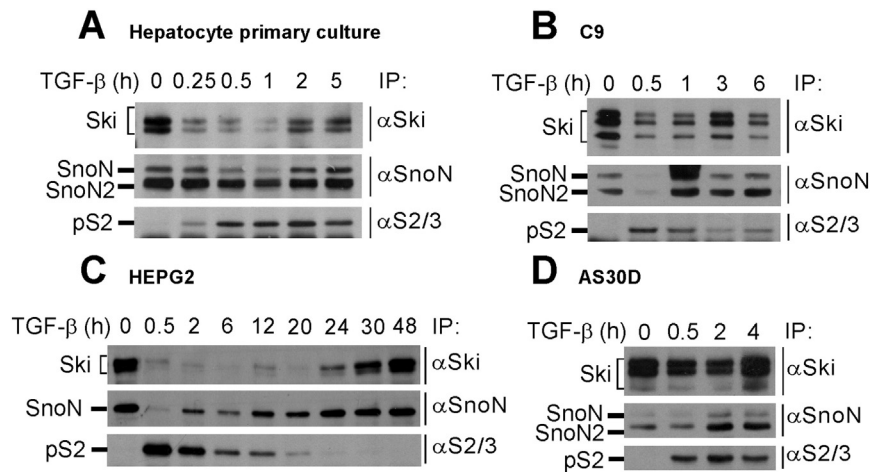


Fig. 3. Ski and SnoN protein stability is differentially regulated by TGF- β in normal and transformed hepatocytes. (A) Normal rat hepatocytes (primary cultures), (B) C9 cells, and (C) HepG2 or (D) AS-30D hepatoma cells were treated with 0.3 nM TGF- β 1 for the indicated times. Ski, SnoN/SnoN2 and pSmad2 (pS2) protein levels were detected by IP/WB. Data are representative of at least 4 independent experiments.

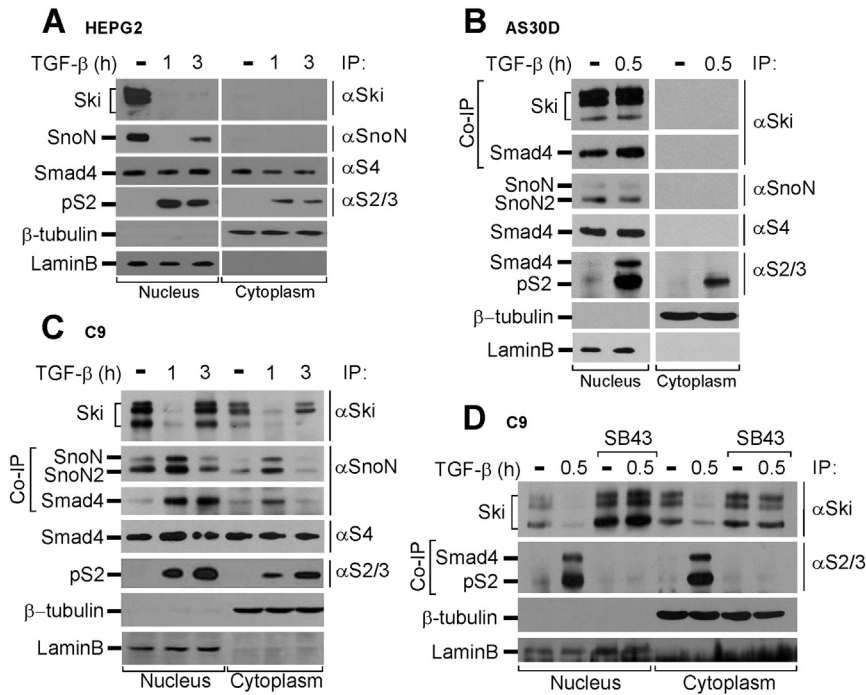


Fig. 4. Ski and SnoN proteins exhibit different subcellular localization in normal hepatocytes and in hepatoma cells. (A) HepG2 and (B) AS30D hepatoma cells, and (C) C9 cells were treated or not with 0.3 nM TGF- β 1 for the indicated times, and cellular nuclear/cytoplasmic fractionation was performed. Ski, SnoN/SnoN2, Smad4 and p-Smad2 protein levels were detected by IP/WB. When indicated, the Ski and SnoN Co-IP with Smad4 was assessed. (D) C9 cells were pre-treated or not for 40 min with 10 μ M SB431542 (SB43, T β RI inhibitor), then stimulated or not for 0.5 h with 0.3 nM TGF- β 1. After the nuclear/cytoplasmic fractionation, Ski, SnoN/SnoN2, Smad4, and Smad2/3 protein levels were analyzed by IP/WB. Some complexes with Smad4 were assessed by Co-IP. β -tubulin and Lamin B were used as cell-fractionation controls. All data are representative of at least 3 independent experiments.

levels in normal C9 cells (Fig. 6A, lower left-panel). We then analyzed the effect of actin-cytoskeleton rearrangements by using cytochalasin D (CytD), a known inhibitor of actin dynamics. CytD treatment had no effect on Ski and SnoN protein stability in hepatoma cells (Fig. 6A upper and middle right-panels), whereas to our surprise CytD differentially regulated Ski and SnoN protein stability in C9 cells, inducing a rapid and strong degradation of Ski protein and importantly stabilizing SnoN protein (Fig. 6A, lower right-panel). These data clearly demonstrate that normal hepatocytes exhibit a differential regulation of Ski and SnoN protein stability upon changes in the actin-cytoskeleton dynamics, a mechanism that is absent in hepatoma cells.

Even though cytoplasmic Ski and SnoN did not prevent pSmad2 nuclear translocation, we tested if they could sequester Smad4, interfering with pSmad2/Smad4 complex formation and with the Smad-dependent transcription. Cell-fractionation experiments revealed that Ski and SnoN depletion upon EGTA treatment did not affect or modify Smad4 nuclear and cytoplasmic levels and/or its localization at the nucleus; it also did not alter the pSmad2/Smad4 complexes formed after TGF- β treatment (Fig. 6B). We also found that EGTA-induced Ski and SnoN down-regulation was independent of activated Smads, since EGTA did not promote any Smad2 phosphorylation (Fig. 6B and C); yet, the T β RI inhibitor SB431542 (SB43) abolished the EGTA-dependent SnoN

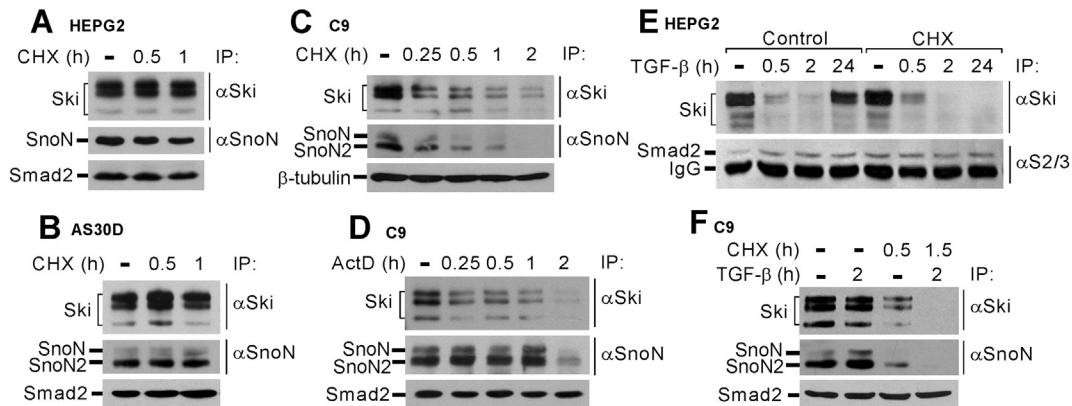


Fig. 5. Ski and SnoN proteins exhibit a higher turnover in normal hepatocytes. (A) HepG2 hepatoma, (B) AS30D hepatoma, and (C) C9 cells were stimulated or not with 20 μ g/ml cycloheximide (CHX, protein synthesis inhibitor) for the indicated times. (D) C9 cells were treated or not with 5 μ g/ml actinomycinD (ActD) for the indicated times. (E) HepG2 were pre-treated or not with 20 μ g/ml CHX, then stimulated with 0.3nM TGF- β 1 for different times. (F) C9 cells were pre-treated or not with 20 μ g/ml CHX for 0.5 or 1.5 h, and then stimulated with 0.3 nM TGF- β 1 for 2 h. In all cases (from A to F) Ski and SnoN/SnoN protein levels were analyzed by IP/WB, and total protein extracts were used to detect Smad2 or β -tubulin protein levels as a loading control. All data are representative of at least 3 independent experiments.

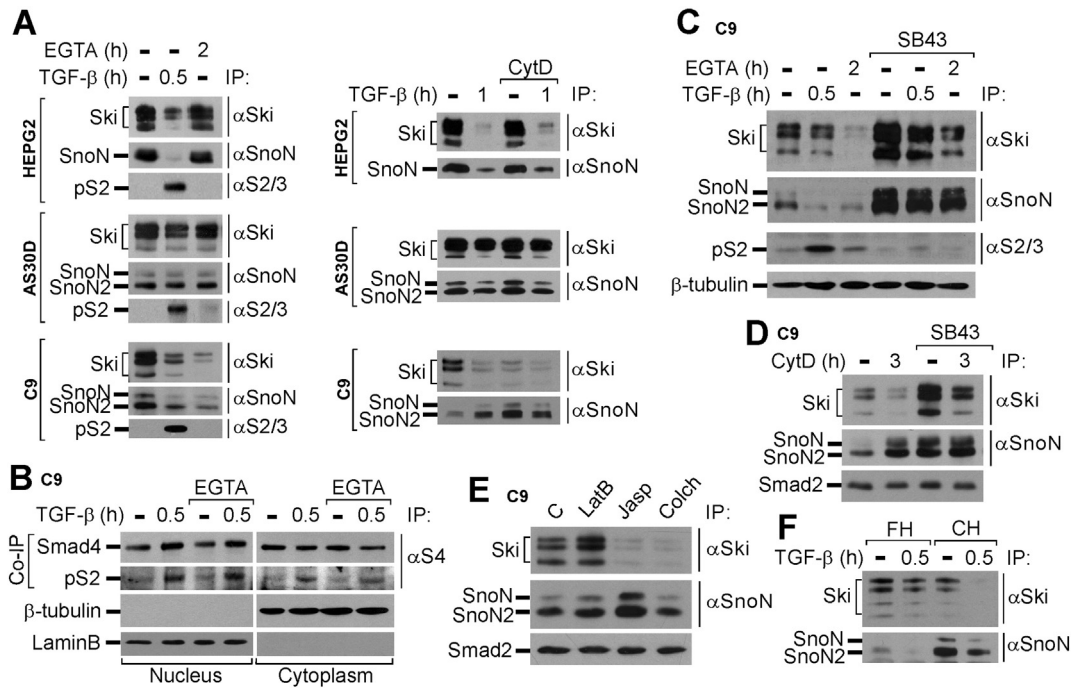


Fig. 6. Cell adhesion disruption and changes in the cytoskeleton assembly differentially regulate Ski and SnoN protein stability in normal hepatocytes. (A) HepG2, AS30D, or C9 cells were pre-treated or not with the calcium-chelating agent EGTA (1 mM) for 2 h (left panels), or were pre-treated with the inhibitor of actin dynamics cytochalasin D (CytD, 5 μ M) for 3 h in order to induce cytoskeleton rearrangements (right panels), and then treated or not with 0.3nM TGF- β 1 for 0.5 h. Ski, SnoN and pS2 proteins levels were detected by IP/WB. (B) C9 cells were pre-treated or not with 1 mM EGTA for 2 h, and then treated or not with 0.3nM TGF- β 1 for 0.5 h. Smad4 protein levels were analyzed by IP/WB. The pS2/Smad4 complex was assessed by Co-IP/WB. (C) C9 cells were pre-incubated or not with 10 μ M SB431542 for 40 min and then treated or not with 0.3nM TGF- β 1 for 0.5 h or 1 mM EGTA for 2 h. (D) C9 cells were pre-incubated or not with 10 μ M SB431542 for 40 min and then treated or not with 5 μ M CytD for 3 h. (E) C9 cells were treated or not with 1 μ M latrunculin B (LatB), 1 μ M jasplakinolide (Jasp), or 15 μ M colchicine (Colch) for 4 h. (F) Normal rat hepatocytes, either in suspension (FH, freshly isolated hepatocytes) or adherent (CH, primary cultured hepatocytes), were treated or not with 0.3nM TGF- β 1 for 0.5 h. (From C to F) Ski, SnoN/SnoN2 or pSmad2 protein levels were assessed by IP/WB. Total Smad2 and β -tubulin were detected in whole cell lysates by WB. All data are representative of 3 independent experiments.

degradation and partially blocked Ski degradation (Fig. 6C), suggesting that this regulatory mechanism may somehow depend on the TGF- β signal. We concurrently observed that the proteasome inhibitor MG132 blocked Ski and SnoN protein degradation induced by EGTA (data not shown).

Unlike EGTA, CytD seems to use a Smad-independent mechanism to regulate Ski and SnoN protein stability, since SB43 treatment did not interfere or synergize with the CytD effect on the co-repressors stability (Fig. 6D). Of note, CytD-mediated SnoN protein up-regulation was only observed at the post-translational level since SnoN mRNA levels remained unchanged (Supplementary Fig. S2).

The fact that cytoskeleton rearrangements differentially control Ski and SnoN protein stability led us to further investigate the effect of pharmacological modulators of the actin-cytoskeleton dynamics such as latrunculin B (LatB, inhibitor of actin polymerization) and jasplakinolide (Jasp, inducer of actin polymerization), and also the effect of colchicine (Colch, inhibitor of microtubule polymerization). We observed that cytoskeleton changes differentially regulated Ski and SnoN protein stability, with no changes in Smad2 protein stability (Fig. 6E). Intriguingly, both Jasp and colchicine treatments decreased Ski protein levels; whereas, Jasp increased only SnoN protein levels and LatB increased only Ski protein levels (Fig. 6E).

Next, we studied a model of non-adherent and adherent cells (Fig. 6F), assessing Ski and SnoN protein levels in freshly isolated rat hepatocytes (FH), maintained for a few hours in suspension, and in rat primary hepatocyte cultures (CH) grown on Petri dishes (adherent cultures). Cells were treated or not with TGF- β for 0.5 h to assess Ski and SnoN protein degradation. The results showed that Ski protein was more abundant in non-adherent hepatocytes (FH) than in adherent cells (CH), and also appeared more resistant to TGF- β -induced degradation in the non-adherent cell context. Contrariwise, SnoN protein was more abundant in adherent hepatocytes (CH) compared to cells in

suspension (FH) (Fig. 6F). These data demonstrate that physiological cytoskeleton rearrangements differentially control Ski and SnoN protein stability in normal hepatocytes.

It was a surprise to observe that the EGTA effects on Ski and SnoN protein down-regulation are very similar to those of CHX. In order to explain these results, we found several reports showing that calcium depletion in hepatocytes clearly impairs protein synthesis [27,28]. Therefore, it is very likely that EGTA pre-treatment could be blocking the Ski and SnoN protein turnover by inhibiting protein synthesis rather than by any disruption of cell adhesion. Taken together, our data suggest that the inhibition of protein turnover and the dynamics of actin-cytoskeleton differentially regulate Ski and SnoN protein stability in normal hepatocytes, through different and yet poorly understood mechanisms.

3.7. Downregulation of both Ski and SnoN co-repressors affects the kinetic of TGF- β /Smad-target gene expression

As Ski and SnoN are two important negative regulators of the TGF- β signaling, we reasoned that the modulation of their stability by cell adhesion or the cytoskeleton rearrangements in normal hepatocytes might impact the TGF- β /Smad-dependent gene expression [26–33]. To test this, we decided to down-regulate both co-repressors (with EGTA pre-treatment) or to downregulate Ski and up-regulate SnoN (with CytD or Jasp pre-treatments), and then evaluate the TGF- β -induced gene transcription in C9 normal cells (Fig. 7). As predicted, when C9 cells were pre-treated with EGTA for 2 h, the TGF- β -induced gene expression pattern of *smad7* and *snoN/snoN2* switched from a transient and quick up-regulation to a sustained gene expression that lasted up to 3 h post-treatment (Fig. 7A and B). Interestingly, CHX treatment showed a similar effect (Supplemental Fig. S3), suggesting that both pre-treatments could affect TGF- β -dependent gene transcription

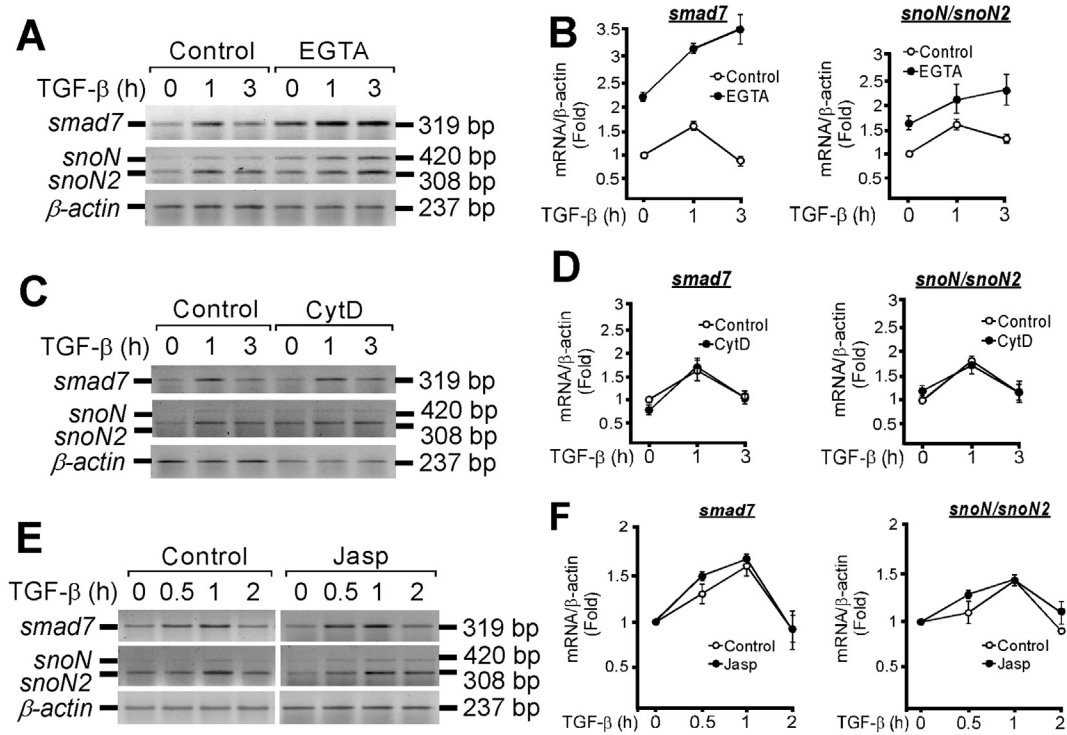


Fig. 7. Downregulation of both Ski and SnoN co-repressors affects the kinetic of TGF- β /Smad-target gene expression. (A, C, E) C9 cells were pre-treated or not with 1 mM EGTA for 2 h (A), with 5 μ M CytD for 3 h (C), or with 1 μ M jaspakinolide (Jasp) for 2 h (E), and then treated or not with 0.3 nM TGF- β 1 for the indicated times, and representative RT-PCRs are shown. (B, D, F) Graphics show densitometric analysis of *smad7* and *snoN/snoN2* mRNA levels as fold change over basal (Control, white dots; EGTA, CytD or Jasp pre-treated, black dots) from data shown in panels A, C and E, respectively. Data are represented as mean \pm SD of at least 3 independent experiments.

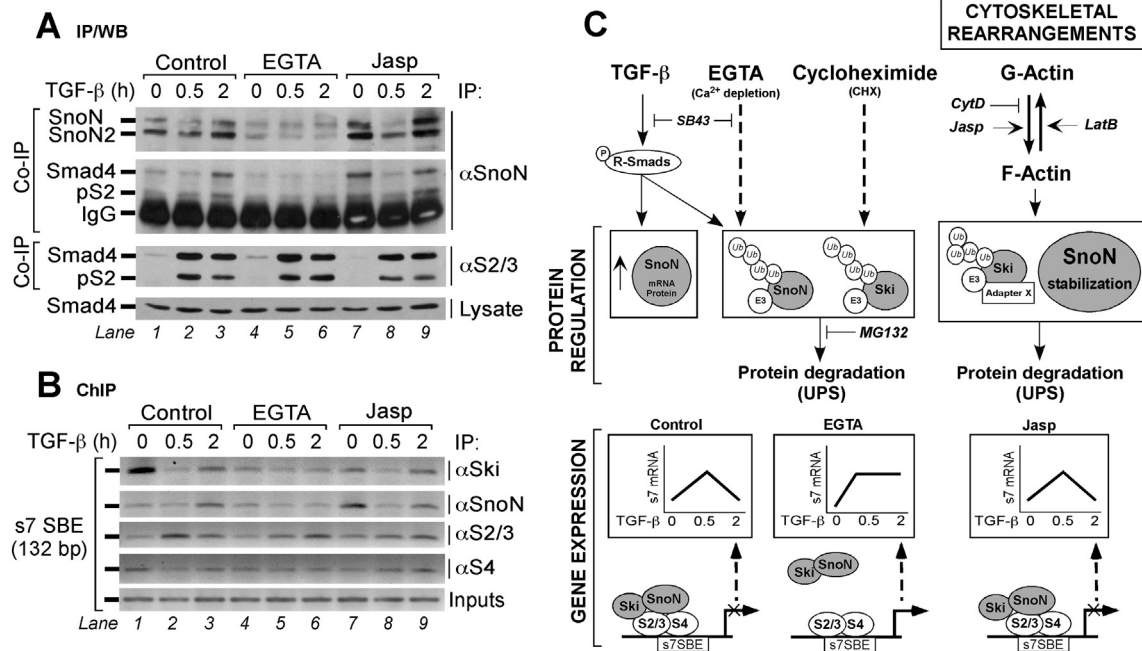


Fig. 8. Ski and SnoN protein turnover is critical to regulate the kinetic of gene expression induced by TGF- β in hepatocytes. C9 cells were pre-treated for 2 h in the absence (control) or presence of 1 mM EGTA or 1 μ M Jasp, and then incubated for 0.5 and 2 h with 0.3 nM TGF- β . Afterwards, WB/IP (A) and ChIP (B) assays were carried out using specific anti-SnoN, anti-Ski, anti-Smad4 or anti-Smad2/3 antibodies. For ChIP assays, PCRs were done with primers spanning the region -142 to -274 from the endogenous *smad7* gene promoter (132 bp). (C) Model depicting the mechanisms that control Ski and SnoN protein stability in normal hepatocytes. TGF- β induces Ski and SnoN protein degradation through activated Smads and the ubiquitin-proteasome system (UPS). Intriguingly, the inhibition of protein turnover (calcium depletion by EGTA or protein synthesis inhibition by CHX) leads to a sustained expression of TGF- β -target genes by inducing the downregulation of Ski and SnoN proteins via proteasome, but independently of Smad phosphorylation. In contrast, actin-cytoskeleton rearrangements (CytD or Jasp pre-treatments) differentially regulate Ski and SnoN stability, i.e. increasing SnoN and decreasing Ski protein levels, independently of Smad activation and also without modifying the kinetic of expression of TGF- β -target genes.

mainly by impairing Ski and SnoN protein turnover. By contrast, the transient gene up-regulation of *smad7* and *snoN/snoN2* induced by TGF- β was maintained in C9 cells pre-treated with CytD or Jasp, as these pre-treatments reduced only Ski protein levels but simultaneously increased SnoN protein levels (Fig. 7C, D, E and F). These data suggest that a highly regulated turnover of both Ski and SnoN proteins is critical to control the kinetic of TGF- β /Smad-dependent gene transcription, whereas any disruption of cell adhesion does not alter the tight regulation of TGF- β -target gene expression because it exerts opposite effects on Ski and SnoN protein stability.

3.8. *SnoN* and *Ski* protein turnover is critical to regulate the kinetic of gene expression induced by TGF- β in hepatocytes

Ski and SnoN co-repressors participate in a negative feedback loop that controls the duration of TGF- β -target gene expression; thus, we evaluated whether the changes in Ski and SnoN protein levels induced by EGTA pre-treatment or actin-cytoskeleton dynamics might impact the Ski and SnoN binding to the *smad7* gene promoter in response to TGF- β . First, we performed an IP/WB experiment in which C9 cells were pre-treated for 2 h with 1 mM EGTA or 1 μ M Jasp, in order to change the basal levels of Ski and SnoN proteins and then cells were treated with 0.3 nM TGF- β for 0.5 or 2 h to evaluate any effect on the TGF- β canonical pathway (Fig. 8A). Data showed that the EGTA pre-treatment strongly decreased Ski and SnoN protein levels, interfering even with the TGF- β -dependent SnoN up-regulation. By contrast, Jasp pre-treatment decreased Ski and increased SnoN protein levels but without affecting TGF- β -dependent SnoN up-regulation. In addition, we detected that the Smad2 phosphorylation and p-Smad2/Smad4 complex formation upon TGF- β stimulus were not affected by EGTA or Jasp pre-treatments (Fig. 8A). Under the exact same conditions, we then analyzed the dynamic of binding of endogenous Ski, SnoN, Smad2/3 and Smad4 to the *smad7* gene promoter by ChIP assays (Fig. 8B). As predicted, TGF- β -induced a transient decrease of Ski and SnoN binding to the *smad7* gene promoter in both control and Jasp pre-treated C9 cells, concomitant with an increase of Smad2/3 binding to the *smad7* promoter (Fig. 8B, lanes 2 and 8). By contrast, the EGTA pre-treatment that significantly reduces Ski and SnoN protein levels, caused a poor binding of Ski and SnoN to the *smad7* promoter (Fig. 8B, lanes 4, 5, 6). Intriguingly, the binding of Smad2/3 to the *smad7* promoter after TGF- β treatment for 2 h was maintained even in the presence of EGTA or Jasp (Fig. 8B, lane 6 and 9). Fig. 8B (lane 6) also shows that the poor binding of Ski and SnoN to *smad7* promoter after 2 h of TGF- β may explain why TGF- β drives a sustained induction of its target genes in the presence of EGTA (seen in Fig. 7A).

These data demonstrate that the kinetic of TGF- β /Smad-dependent *smad7* gene transcription is modified only after the down-regulation of both Ski and SnoN co-repressors rather than if the stability of only one of them is altered. Therefore, our data reveal that the inhibition of protein turnover acts as a new regulatory mechanism that probably impacts the expression of many other TGF- β -target genes.

4. Discussion

The TGF- β signaling pathway exerts potent anti-proliferative effects that maintain hepatocytes in the G0 phase of cell cycle contributing to liver homeostasis. This function is altered in many diseases such as cancer and fibrosis [2,3,6]. Development of hepatocarcinoma (HCC) is a complex and multistep process involving diverse alterations of hepatocytes [34]. While several components of the TGF- β signaling pathway can be lost or inactivated in various epithelial neoplasms, only a fraction of liver tumors exhibit inactivating mutations [4,8,35]. Whereas several mutations have been described in colorectal, pancreatic, ovarian, gastric and head and neck carcinomas, they are rare in HCC; this indicates that transformed hepatocytes may retain an intact TGF- β signaling machinery, just as we demonstrated in this study (Figs. 3 and 4). Cancer cells

circumvent the tumor suppressor effects of TGF- β by different ways, and one relevant mechanism involves the enhanced expression of some pathway inhibitors such as the Smad transcriptional co-repressors Ski and SnoN. Many studies have reported high levels of Ski and SnoN proteins in various types of tumors, nevertheless, the role of these transcriptional co-factors in tumorigenesis is complex and not fully understood [13,14,36,37]. Furthermore, there is very limited information concerning Ski and SnoN protein regulation in HCC. Herein, we compared the regulation of Ski and SnoN protein stability in normal and transformed hepatocytes, in order to elucidate why Ski and SnoN exhibit variability on their protein levels depending on the liver context. As TGF- β switches from a tumor-suppressor to a tumor-promoter cytokine during HCC development, it was plausible to expect that high levels of Ski and SnoN could inhibit the anti-proliferative TGF- β actions, most likely by competing with pSmad2 for the binding to Smad4, thereby blocking TGF- β /Smad-induced gene transcription. However, we demonstrate that TGF- β successfully induces Smad4-dependent and -independent target genes in a sustained fashion in all hepatoma cells analyzed, despite the high Ski and SnoN endogenous levels and the strong Ski/SnoN/Smad4 nuclear interaction. Our results differ from most previous studies showing that ectopically Ski and SnoN over-expression interferes with Smad-dependent transcriptional responses, although our data are consistent with one study performed in melanoma cells that analyzed endogenous proteins [38]; we propose that the deficiency of Ski/SnoN co-repressor activity on TGF- β /Smad pathway observed in hepatoma cells could be explained by missing components required to allow their repressive function. The finding that TGF- β induces a rather transitory gene transcription in normal hepatocytes agrees with previous studies describing that the TGF- β -induced down-regulation of Ski and SnoN is followed by the establishment of a negative feedback loop given by the up-regulation of both co-repressors, in order to control the duration of the TGF- β -target gene expression [15,17]. Our data support that this negative feedback loop is present in normal hepatocytes but it seems to be missing in hepatoma cells.

Based on our results, we suggest that normal hepatocytes possess diverse mechanisms to maintain a tight control of Ski and SnoN protein levels, since for instance, Ski and SnoN basal levels rapidly recover after the TGF- β induced degradation, despite a still active Smad signal. By contrast, TGF- β leads to a strong down-regulation of both co-repressors that lasts as long as the Smad signaling remains active (20 to 24 h post-treatment) in HepG2 hepatoma cells. Surprisingly, in the AS30D hepatoma, both Ski and SnoN are resistant to TGF- β -induced degradation, this could be explained by the absence of particular E3 ubiquitin ligases in these cancer cells. Thus, it is clear that Ski and SnoN protein regulation differs between normal and transformed hepatocytes, and even among different types of transformed cells; all these features directly impact the magnitude, duration and outcome of the TGF- β signaling in each hepatocyte context. We suggest that the differential Ski and SnoN regulation may be attributable to differences in their subcellular localization and/or protein half-life, among other mechanisms [16,39,40]. Interestingly, we found differences in the subcellular localization of Ski and SnoN, as these co-repressors exhibit a nuclear and cytoplasmic distribution in normal hepatocytes, whereas they are exclusively nuclear in hepatoma cells. However, our data show that cytoplasmic Ski and SnoN do not sequester the activated Smads (R-Smads or Smad4) in normal cells; therefore, the function of endogenous cytoplasmic Ski and SnoN proteins in hepatocytes remains elusive.

Surprisingly, we found that Ski and SnoN have a short half-life in normal hepatocytes, whereas they are very stable proteins in hepatoma cells. Unexpectedly, we found that Ski and SnoN proteins are differentially sensitive to changes in the cytoskeleton dynamics only in normal hepatocytes, i.e. the promotion of actin polymerization decreases Ski levels whereas it enhances SnoN protein stability (Fig. 8C). We propose that actin polymerization controls Ski and SnoN stability through a Smad-independent mechanism, which involves a yet unknown adapter

molecule that selectively leads to Ski degradation, meanwhile SnoN protein is stabilized (Fig. 8D). This novel regulation is relevant since Ski and SnoN are usually considered to behave similarly due to their structural homology; however, under specific conditions the two co-repressors may exert rather different functions, and hence, they could regulate different sets of genes. In fact, it is also possible that Ski and SnoN might have TGF- β -independent functions and also target different genes in normal cells, as well as they might function as transcriptional co-activators for some nuclear receptors and transcriptional factors involved in pathways other than TGF- β [18]. Furthermore, we provide evidence that the dynamic modulation of Ski and SnoN co-repressors in normal hepatocytes, deeply impacts the TGF- β transcriptional response. The observation that Ski and SnoN are refractory to any cytoskeleton rearrangement in HCC cells, might partially account for the different TGF- β transcriptional responses detected in hepatoma cells. In addition to HCC, liver fibrosis may represent another pathological condition in which the regulation of Ski and SnoN by cytoskeleton rearrangements could be relevant, as it may promote pro-fibrotic TGF- β signals [41]; however, the evaluation of these potentially new functions of Ski and SnoN requires further studies.

In conclusion, apart from the TGF- β stimulus, protein turnover, cell adhesion and cytoskeleton rearrangements differentially affect Ski and SnoN protein stability in normal hepatocytes, and this regulation is lost in transformed hepatocytes. The convergence of TGF- β signaling and the cytoskeleton dynamics on the regulation of Ski and SnoN co-repressors stability may be relevant for the outcome of TGF- β response (Fig. 8C), and might in part explain the dual role of Ski and SnoN in cancer. Therefore, it becomes crucial to further characterize Ski and SnoN protein regulation and identify their target genes in normal cells, since many of their crucial regulatory mechanisms are lost in transformed cells. Furthermore, our findings reveal that Ski and SnoN proteins may be indirect off-targets of diverse cytoskeletal drugs, like those used to treat different pathologies such as colchicine. Finally, we also demonstrate that any inhibition of protein turnover affects basal Ski and SnoN protein levels, and impacts the magnitude and duration of the TGF- β -target gene expression in normal cells such as hepatocytes.

Transparency Document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

We thank Dr. Roberto Sánchez-Olea and Dr. Mónica Calera for helpful discussions. We thank Dr. J.A. García-Sáinz (IFC, UNAM) for providing C9 and HepG2 cell lines. We thank all members from Bioterio, Unidad de Biología Molecular, Unidad de Imagenología, and Unidad de Cómputo at IFC, UNAM. C. Caligaris is a student of the Ph.D. Program in *Ciencias Bioquímicas*, UNAM and also a recipient of a fellowship from CONACyT. This work was supported by grants to MMS from the PAPI IT/DGAPA/UNAM (IN206012 and IN208115) and CONACyT (No. 101826).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.012>.

References

- [1] J. Massagué, TGF- β signalling in context, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 616–630.
- [2] R. Taub, Liver regeneration: from myth to mechanism, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 836–847.
- [3] S. Dooley, P. ten Dijke, TGF- β in progression of liver disease, *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 245–256.
- [4] C. Coulouarn, V.M. Factor, S.S. Thorgeirsson, Transforming growth factor- β gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer, *Hepatology* 47 (2008) 2059–2067.
- [5] R.J. Akhurst, A. Hata, Targeting the TGF- β signalling pathway in disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 790–811.
- [6] K. Matsuzaki, Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells, *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 225–243.
- [7] Y. Liu, C. Meyer, C. Xu, H. Weng, C. Hellerbrand, P. ten Dijke, S. Dooley, Animal models of chronic liver diseases, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304 (2013) G449–G468.
- [8] X. Mu, S. Lin, J. Yang, C. Chen, Y. Chen, M.C. Herzig, K. Washburn, G.A. Halff, C.A. Walter, B. Sun, L.Z. Sun, TGF- β signaling is often attenuated during hepatotumorigenesis, but is retained for the malignancy of hepatocellular carcinoma cells, *PLoS ONE* 8 (2013) e63436.
- [9] S. Ross, E. Cheung, T.G. Petrakis, M. Howell, W.L. Kraus, C.S. Hill, Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription, *EMBO J.* 25 (2006) 4490–4502.
- [10] N.G. Denissova, F. Liu, Repression of endogenous Smad7 by Ski, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 28143–28148.
- [11] M.A. Briones-Orta, M. Sosa-Garrocho, P. Moreno-Alvarez, M.A. Fonseca-Sanchez, M. Macías-Silva, SnoN co-repressor binds and represses smad7 gene promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 889–894.
- [12] T. Tabata, K. Kokura, P. Ten Dijke, S. Ishii, Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF- β target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5, *Genes Cells* 14 (2009) 17–28.
- [13] N.S. Jahchan, K. Luo, SnoN in mammalian development, function and diseases, *Curr. Opin. Pharmacol.* 10 (2010) 670–675.
- [14] C. Bonnon, S. Atanasoski, c-Ski in health and disease, *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 51–64.
- [15] A.C. Tecalco-Cruz, M. Sosa-Garrocho, G. Vazquez-Victorio, L. Ortiz-Garcia, E. Domínguez-Hüttinger, M. Macías-Silva, Transforming growth factor- β /SMAD Target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26764–26776.
- [16] T. Imamura, Y. Oshima, A. Hikita, Regulation of TGF- β family signalling by ubiquitination and deubiquitination, *J. Biochem.* 154 (2013) 481–489.
- [17] S.L. Stroschein, W. Wang, S. Zhou, Q. Zhou, K. Luo, Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein, *Science* 286 (1999) 771–774.
- [18] T. Nomura, M.M. Khan, S.C. Kaul, H.D. Dong, R. Wadhwa, C. Colmenares, I. Kohno, S. Ishii, Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor, *Genes Dev.* 13 (1999) 412–423.
- [19] J.S. Edmiston, W.A. Yeudall, T.D. Chung, D.A. Lebman, Inability of transforming growth factor- β to cause SnoN degradation leads to resistance to transforming growth factor- β -induced growth arrest in esophageal cancer cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 4782–4788.
- [20] Q. Zhu, A.R. Krakowski, E.E. Dunham, L. Wang, A. Bandyopadhyay, R. Berdeaux, G.S. Martin, L. Sun, K. Luo, Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis, *Mol. Cell Biol.* 27 (2007) 324–339.
- [21] C. Jacob, H. Grabner, S. Atanasoski, U. Suter, Expression and localization of Ski determine cell type-specific TGF β signaling effects on the cell cycle, *J. Cell Biol.* 182 (2008) 519–530.
- [22] M. Macías-Silva, W. Li, J.I. Leu, M.A. Crissey, R. Taub, Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- β signals during liver regeneration, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28483–28490.
- [23] B. Delgado-Coello, J. Bravo-Martinez, M. Sosa-Garrocho, M.A. Briones-Orta, M. Macías-Silva, J. Mas-Oliva, Plasma membrane calcium ATPase isoform 3 expression in single cells isolated from rat liver, *Mol. Cell. Biochem.* 344 (2010) 117–124.
- [24] S. Rodríguez-Enriquez, M.E. Torres-Marquez, R. Moreno-Sanchez, Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 375 (2000) 21–30.
- [25] T. Grewal, J. Heeren, D. Mewawala, T. Schnitgerhans, D. Wendt, G. Salomon, C. Enrich, U. Beisiegel, S. Jackle, Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33806–33813.
- [26] G. Vázquez-Victorio, C. Caligaris, E. Del Valle-Espinosa, M. Sosa-Garrocho, N.R. González-Arenas, G. Reyes-Cruz, M.A. Briones-Orta, M. Macías-Silva, Novel regulation of Ski protein stability and endosomal sorting by actin-cytoskeleton dynamics in hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 4487–4499.
- [27] G.J. Barritt, J. Chen, G.Y. Rychkov, Ca²⁺-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 651–672.
- [28] C.O. Brostrom, S.B. Bocckino, M.A. Brostrom, E.M. Galuska, Regulation of protein synthesis in isolated hepatocytes by calcium-mobilizing hormones, *Mol. Pharmacol.* 29 (1986) 104–1011.
- [29] S. Akiyoshi, H. Inoue, J. Hanai, K. Kusanagi, N. Nemoto, K. Miyazono, M. Kawabata, c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with smads, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 35269–35277.
- [30] W. Xu, K. Angelis, D. Danielpour, M.M. Haddad, O. Bischof, J. Campisi, E. Stavnezer, E.E. Medrano, Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 5924–5929.
- [31] J. He, S.B. Tegen, A.R. Krawitz, G.S. Martin, K. Luo, The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 30540–30547.

- [32] N. Ueki, M.J. Hayman, Direct interaction of Ski with either Smad3 or Smad4 is necessary and sufficient for Ski-mediated repression of transforming growth factor-beta signaling, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 32489–32492.
- [33] H. Suzuki, K. Yagi, M. Kondo, M. Kato, K. Miyazono, K. Miyazawa, c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements, *Oncogene* 23 (2004) 5068–5076.
- [34] P. Godoy, N.J. Hewitt, U. Albrecht, M.E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, et al., Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 1315–1530.
- [35] K. Hiwatashi, S. Ueno, M. Sakoda, F. Kubo, T. Tateno, H. Kurahara, Y. Mataka, K. Maemura, S. Ishigami, H. Shinchi, S. Natsugoe, Strong Smad4 expression correlates with poor prognosis after surgery in patients with hepatocellular carcinoma, *Ann. Surg. Oncol.* 16 (2009) 3176–3182.
- [36] T. Shinagawa, H.D. Dong, M. Xu, T. Maekawa, S. Ishii, The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice, *EMBO J.* 19 (2000) 2280–2291.
- [37] T. Shinagawa, T. Nomura, C. Colmenares, M. Ohira, A. Nakagawara, S. Ishii, Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice, *Oncogene* 20 (2001) 8100–8108.
- [38] D. Javelaud, L. van Kempen, V.I. Alexaki, E. Le Scolan, K. Luo, A. Mauviel, Efficient TGF-beta/SMAD signaling in human melanoma cells associated with high c-SKI/SnoN expression, *Mol. Cancer* 10 (2011) 2.
- [39] A.R. Krakowski, J. Laboureaud, A. Mauviel, M.J. Bissell, K. Luo, Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF-beta signaling by sequestration of the Smad proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 12437–12442.
- [40] M. Nagata, K. Goto, S. Ehata, N. Kobayashi, M. Saitoh, H. Miyoshi, T. Imamura, K. Miyazawa, K. Miyazono, Nuclear and cytoplasmic c-Ski differently modulate cellular functions, *Genes Cells* 11 (2006) 1267–1280.
- [41] P.S. Tsou, A.J. Haak, D. Khanna, R.R. Neubig, Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 8. Current and future drug targets in fibrosis: focus on Rho GTPase-regulated gene transcription, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307 (2014) C2–C13.