



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La Inhibición Farmacológica de la Cinasa GSK3-beta modula diferencialmente la estabilidad del cofactor transcripcional Ski en hepatocitos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q. F. B. Reyna Edith Rosales Alvarez

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Paula Licona Limón (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dra. Guadalupe Reyes Cruz (CINVESTAV-IPN)

Ciudad de México. Agosto, 2017.



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.

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

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

## **AGRADECIMENTOS ACADÉMICOS**

A la Dra. Marina Macías, por su valiosa asesoría en la realización de este proyecto, tanto en aspectos técnicos como teóricos, así como su contribución en mi formación académica.

A la Biól. Marcela Sosa, Técnica Académica del laboratorio, por su ayuda en las técnicas experimentales de este proyecto.

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas a lo largo de este proyecto.

A los laboratorios del Dr. Adolfo García Sáinz, del Dr. Dimitris Georgellis, del Dr. Fernando López Casillas, y de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por su apoyo técnico en el préstamo de reactivos y equipos.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Paula Licon Limón y Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por sus observaciones y consejos que contribuyeron a enriquecer mi formación académica, por dar seguimiento y guiarme en este proyecto.

A los miembros del jurado para la obtención de grado: Dr. Adolfo García Sáinz, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dra. Martha Robles Flores, Dr. José Vázquez Prado y Dra. Susana Castro Obregón, por sus oportunas observaciones y correcciones de este trabajo escrito.

A los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM: Dr. Fernando García Hernández y Dra. Fabiola Jaimes Miranda, por su asesoría, apoyo técnico y servicios prestados.

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

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

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

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

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el financiamiento de congresos.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante el posgrado.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi familia, por su apoyo constante e incondicional que me otorgaron al emprender este proyecto.

A la Dra. Marina Macías Silva, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de Maestría en su laboratorio, por todas las enseñanzas y el apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio 225 Norte: Genaro, Diana, Yuli, Marcela, Anabel, Cassandre, Paula, David, Marintia, Isabel y Lucía, por todo el apoyo y las experiencias compartidas.

A los amigos y otros compañeros que me han ayudado a lo largo de este proyecto.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	10
1 INTRODUCCIÓN	11
1.1 El TGF- $\beta$	11
1.1.1 El Papel del TGF- $\beta$ en el Contexto Hepático	12
1.1.2 Molécula del TGF- $\beta$	13
1.1.3 Vía de Señalización del TGF- $\beta$	14
1.1.4 Mecanismos de Control de la Vía del TGF- $\beta$	17
1.2 La proteína SKI	18
1.2.1 Funciones Biológicas de la Proteína SKI	19
1.2.2 Estructura de la Proteína SKI	20
1.2.3 Mecanismos de Regulación de SKI	22
1.3 La Cinasa GSK3 como Regulador de Distintos Procesos Celulares	23
1.3.1 GSK3: Mecanismos de Acción y de Regulación	24
1.3.2 GSK3 y la Vía de Wnt	26
1.3.3 GSK3 y la Vía de PI3K/Akt	28
1.3.4 Zonación hepática y el papel de las vías Wnt y PI3K/Akt	30
1.3.5 Interacción entre GSK3 y Componentes de la Vía del TGF- $\beta$	32
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
2.1 Antecedentes	33
2.2 Hipótesis	36
2.3 Objetivos	36
3 METODOLOGÍA	37
3.1 Cultivo Celular	37
3.2 Tratamientos y Estímulos	37
3.3 Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida y Western Blot	38
3.4 Análisis Estadístico	39

4 RESULTADOS	40
4.1 Los Niveles de la Proteína SKI son Regulados Diferencialmente por Inhibidores de la Cinasa GSK3	40
4.1.1 Los inhibidores de GSK3: BIO y LiCl regulan de manera diferencial los niveles de SKI	40
4.1.2 Los factores de crecimiento contenidos en el medio de cultivo con suero reprimen el efecto mediado por BIO y por LiCl sobre los niveles de SKI	45
4.1.3 La disminución de los niveles de SKI es independiente de los cambios en la abundancia de $\beta$ -catenina	49
4.2 No se Observa una Interacción entre SKI y GSK3	52
4.2.1 La Formación del complejo SKI/GSK3 no fue detectada mediante inmunoprecipitación/Western blot (IP/WB)	52
4.3 Mecanismos Moleculares Implicados en la Regulación de los Niveles de la Proteína SKI por el Tratamiento con los Inhibidores BIO Y LiCl	54
4.3.1 SKI es regulada por diferentes inhibidores de GSK3 de manera independiente a la vía del TGF- $\beta$	54
5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
6 CONCLUSIONES	70
7 PERSPECTIVAS	71
8 REFERENCIAS	72
9 ANEXOS	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Los niveles de SKI se regulan diferencialmente al inhibir GSK3 con BIO o con LiCl	44
<b>Figura 2</b>	Factores de crecimiento contenidos en medio con suero reprimen el efecto mediado por BIO y por LiCl sobre los niveles de SKI	48
<b>Figura 3</b>	La disminución de SKI es independiente a la regulación de $\beta$ -catenina	51
<b>Figura 4</b>	La inmunoprecipitación de SKI y de GSK3 indica que no hay interacción entre estas proteínas	53
<b>Figura 5</b>	Los compuestos BIO y LiCl promueven la degradación de SKI por mecanismos independientes a la vía del TGF- $\beta$	57

## ABREVIATURAS

ALK5 ó	Nombre en inglés Activin Receptor-Like Kinase 5, o Receptor de TGF- $\beta$
T $\beta$ RI	tipo I
ADP	Difosfato de Adenosina
AMH	Hormona AntiMulleriana
APC	Producto del gen Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Trifosfoato de Adenosina
BIO	6-bromoindirubina-3'-oxima
BMP	Proteínas Morfogénicas de Hueso
BPNT	bifosfato-3'-nucleotidasa
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
CHX	Cicloheximida
CK1	Cinasa de Caseína 1
COX	Ciclooxigenasa
DHD	Dachshund Homology Domain
DYRK	Nombre en inglés Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylated And - Regulated Kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRM	Membranas Resistentes a Detergente
Dvl	Nombre en inglés de la proteína Disheveled
ECM	Matriz Extracelular
eIF2B	Factor Eucariote de Iniciación 2B
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
ERK	Cinasa Regulada por Señales Extracelulares
FBS	Suero Fetal Bovino
FOXO	Nombre del factor transcripcional en inglés Forkhead box protein O
Fussel-15	Nombre en inglés Functional Smad Suppressing Element on Chromosome 15
Fussel-18	Nombre en inglés Functional Smad Suppressing Element on Chromosome 18
Fzd	Frizzled
GDFs	Factores de Crecimiento y Diferenciación
GEF	
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G
GS	Glucógeno Sintetasa
GSK3	Cinasa de Glucógeno Sintetasa 3
HDAC	Desacetilasa de Histona
HIPK	Nombre en inglés Homeodomain-Interacting Protein Kinase
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
IKK $\epsilon$ ,	Nombre en inglés Inhibitory $\kappa$ B Kinase
IMPA	Inositol Monofosfatasa
IP	Inmunoprecipitación
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
LAP	Proteína Asociada a la Latencia, del inglés Latency Associated Protein

LEF	Factor Activador Linfoide
LRP5/6	Proteína Asociada al Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad 5 ó 6
LZ	Cremallera de Leucina
MAPs	Proteínas Asociadas a Microtúbulos
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MEK1	Nombre en inglés Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1
mESC	Células Troncales Embrionarias de Ratón
MIS	Sustancia Mulleriana Inhibitoria
mTOR	Blanco de Rapamicina en Mamíferos
MVE	Endosomas Multivesiculares
N-CoR	Co-represor de Receptor Nuclear
NDRM	Membranas No Resistentes a Detergente
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plaminógeno-1
PARsilación	Poli-ADP-Ribosilación
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PI3K	Nombre en inglés Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI4KII $\alpha$	Nombre en inglés Phosphatidylinositol 4-kinase II $\alpha$
PIM	Nombre en inglés Provirus Integration Site for Moloney Murine Leukaemia Virus
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
PTM	Modificación Postraducciona
PYK2	Nombre en inglés Ca <sup>2+</sup> -sensitive Praline-rich Tyrosine Kinase 2
RB	Proteína Retinoblastoma
SAND	SP100, AIRE1, NucP41/75 and DEAF1
SARA	Nombre en inglés: Smad Anchor for Receptor Activation
SBE	Elementos de Unión a Smad
SKVs	Virus Sloan-Kettering
SmMLCK	Nombre en inglés Smooth-Muscle Myosin Light-Chain Kinase
SNON	Ski Novel Gene
SRPK	Nombre en inglés Serine-Arginine Protein Kinase
TANK1/2	Tankirasa 1/2
TCF	Factor de Células T
TSC	Nombre en inglés Tuberous Sclerosis Complex
T $\beta$ RII	Receptor de TGF- $\beta$ Tipo II
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$
UPS	Sistema Ubiquitina Proteosoma
WB	Western Blot
$\beta$ -Arr2	$\beta$ -Arrestina 2
$\beta$ -Trecp	Nombre en inglés $\beta$ -Transducin repeat-containing protein

## RESUMEN

El TGF- $\beta$  es una citocina que regula diversos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, y la migración, entre otros. En el hígado, la vía del TGF- $\beta$  es importante para mantener la homeostasis celular. Las proteínas SKI y SNON son co-reguladores transcripcionales que inhiben la vía del TGF- $\beta$ , por lo que resulta importante estudiar los mecanismos que regulan a SKI y SNON para tratar de entender la respuesta celular frente al TGF- $\beta$ .

Este trabajo se centra en estudiar a la proteína SKI, cuya estabilidad y localización subcelular son controladas por múltiples mecanismos, que pueden involucrar modificaciones postraduccionales. Un estudio *in silico* demostró que SKI tiene secuencias consenso para ser sustrato de la cinasa GSK3, por lo que en este trabajo se estudió si GSK3 puede regular a SKI y los mecanismos implicados en esta regulación.

GSK3 es una cinasa que induce la inactivación o degradación de muchos de sus sustratos. Algunos mecanismos que regulan la actividad de GSK3 son la fosforilación en su extremo amino que induce su inactivación y la accesibilidad a sus sustratos. Estos mecanismos son mediados por las vías PI3K/Akt y Wnt, respectivamente.

Los experimentos realizados consistieron en el uso de inhibidores farmacológicos de la cinasa GSK3 para evaluar efectos en los niveles de SKI mediante ensayos de Western blot e inmunoprecipitación/Western blot, usando como modelo de estudio la línea celular C9 de hepatocitos de rata.

Este trabajo muestra que los niveles de SKI son regulados por la actividad de GSK3. Sin embargo, no queda claro si GSK3 favorece o reprime la abundancia de SKI debido a que al inhibir a GSK3 con distintos inhibidores, los efectos sobre SKI son diferentes. Los inhibidores BIO, SB21 y LiCl (a tiempo cortos de tratamiento) disminuyen la abundancia de SKI, mientras que el LiCl a tiempos largos de tratamiento aumenta sus niveles.

Adicionalmente, los resultados obtenidos sugieren que GSK3 puede regular a SKI pero no directamente, sino que mediante un mecanismo indirecto. Dentro de los mecanismos probables que se evaluaron, se descartó que la regulación de Ski por la cinasa GSK3 fuera dependiente de la vía del TGF- $\beta$  y de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Al final, se plantean estrategias para identificar en el futuro el mecanismo molecular implicado en esta regulación.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL TGF- $\beta$

El Factor de Crecimiento Transformante beta o TGF- $\beta$  (del inglés Transforming Growth Factor - $\beta$ ) es una citocina que activa la vía de señalización que lleva el mismo nombre, es decir, la vía del TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  regula gran número de respuestas celulares como la proliferación, la diferenciación, el crecimiento, la apoptosis, la homeostasis, la migración, y la respuesta inmune, entre otros (Massagué, 1990; Liu *et al.*, 2001; Shi y Massagué, 2003).

El TGF- $\beta$  es una molécula de naturaleza proteica que se ha agrupado junto con otras citocinas dentro de la superfamilia del TGF- $\beta$ , las cuales comparten secuencias y motivos estructurales similares, además de que están involucrados en el control de procesos fisiológicos como el crecimiento, el desarrollo y la morfogénesis, entre otros (Massagué, 1990; Kingsley, 1994). De acuerdo con la similitud de secuencia y los efectores intracelulares que activan, los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  se han clasificado en dos subgrupos. Uno de los grupos de la superfamilia comprende a TGF- $\beta$ , Activinas, Nodal, Inhibinas y Miostatina, entre otros; mientras que el otro subgrupo está conformado por las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMPs, por su nombre en inglés Bone Morphogenic Proteins), los Factores de Diferenciación y Crecimiento (GDFs, del inglés Growth and Differentiation Factors), la Hormona AntiMulleriana (AMH, del inglés AntiMüllerian Hormone) y la Sustancia Mulleriana Inhibitoria (MIS, del inglés Müllerian Inhibiting Substance), entre otros (Shi y Massagué, 2003).

El TGF- $\beta$  se considera una citocina pleiotrópica debido a que la respuesta celular que induce depende del contexto celular, es decir, que depende de factores como el tipo celular o el tejido, y de las condiciones fisiológicas o patológicas, entre otros. Por ejemplo, el TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de la mayoría de las células epiteliales y hematopoyéticas. Para ejercer su efecto antiproliferativo, el TGF- $\beta$  puede activar a inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CDKs, del inglés Cyclin-Dependent protein Kinases) o inhibir la expresión del gen *Myc*, estos dos blancos del TGF- $\beta$  son factores importantes en la progresión del ciclo celular (Liu *et al.*, 2001). Por otro lado, el TGF- $\beta$  ejerce un efecto proliferativo en células mesenquimales y del músculo liso, ya que estimula la acción del

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés Platelet Derived Growth Factor), una proteína que está implicada en procesos de crecimiento y diferenciación celular. Respecto a procesos patológicos, en células cancerosas, por ejemplo, se pierde la respuesta antiproliferativa del TGF- $\beta$  por mecanismos que no se conocen detalladamente. Sin embargo, el TGF- $\beta$  favorece el crecimiento del tumor al inhibir la respuesta inmune y activar el proceso de EMT (siglas en inglés de Transición Epitelio-Mesénquima); este proceso de EMT está relacionado directamente con la metástasis de células tumorales.

Debido a que el TGF- $\beta$  controla numerosos procesos fisiológicos, el estudio de los mecanismos que regulan su vía de transducción permitirá tener una mejor comprensión de las respuestas celulares que ejerce de acuerdo al contexto celular y fisiológico.

### **1.1.1 El papel del TGF- $\beta$ en el contexto hepático**

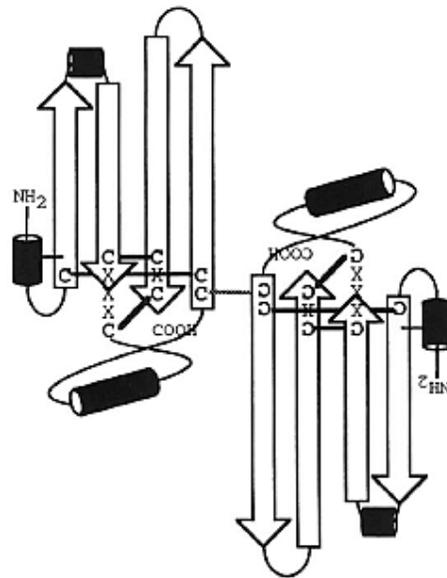
En el hígado, el TGF- $\beta$  controla procesos fisiológicos y patológicos relevantes, por esto el interés de estudiar la vía en este contexto. En condiciones fisiológicas, la vía del TGF- $\beta$  regula la homeostasis hepática, controlando el crecimiento y la proliferación de los hepatocitos; cuando el hígado completa su desarrollo y alcanza su tamaño normal, el TGF- $\beta$  se encarga de mantener a los hepatocitos en arresto celular. Además, el hígado es el órgano con mayor capacidad de regeneración en mamíferos, y tras sufrir un daño la señal del TGF- $\beta$  participa en este proceso induciendo la reconstrucción de la matriz extracelular (ECM, del inglés Extracellular Matrix), y también inhibiendo procesos inflamatorios (Bissel *et al.*, 2001; Dooley y ten Dijke, 2012).

Por otro lado, cuando el daño al hígado llega a ser crónico, la sobre-estimulación por TGF- $\beta$  puede desencadenar procesos de fibrosis, provocar una pérdida en el control del crecimiento, y finalmente dar lugar al cáncer hepatocelular. Cabe mencionar que en el caso de neoplasias, la respuesta al TGF- $\beta$  sufre un cambio a manera de “switch”. Esto debido a que en las etapas tempranas del cáncer, el TGF- $\beta$  actúa como un inhibidor de la proliferación. Mientras tanto, en un estadio avanzado, el TGF- $\beta$  promueve la metástasis e inhibe la respuesta inmune y la inflamación, de manera que promueve un cáncer más agresivo (Bissel *et al.*, 2001; Dooley y ten Dijke, 2012).

### 1.1.2 Molécula del TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es sintetizado como un dímero que a su vez está unido en su extremo amino terminal a un pre-dominio denominado proteína asociada a la latencia (LAP, del inglés Latency Associated Protein). Este complejo se exporta a la matriz extracelular, donde permanece latente hasta ser activado por diversas señales como: integrinas, plasmina, trombospondina-1, cambios de pH, y presencia de especies reactivas de oxígeno, entre otras. La activación del TGF- $\beta$  implica la escisión de la proteína LAP en una región rica en residuos de aminoácidos básicos, lo cual lleva a la liberación de la forma activa del TGF- $\beta$  (Massagué, 1990; Kingsley, 1994; Annes *et al.*, 2003; Shi y Massagué, 2003; Munger y Shepard, 2011).

La forma activa del TGF- $\beta$  contiene cuatro enlaces disulfuro formados por ocho residuos de cisteína dentro de cada monómero, y localizados en un motivo estructural que se conoce como nudo de cisteínas; esta región de cisteínas es importante para estabilizar la estructura de la proteína. La molécula del TGF- $\beta$  también consta de una  $\alpha$ -hélice en el extremo amino terminal de cada monómero y cuatro hojas  $\beta$  antiparalelas. Un noveno residuo de cisteína participa en la estabilización del dímero mediante la formación de un quinto enlace disulfuro intermolecular (**Esquema 1.1**) (Kingsley, 1994; Shi y Massagué, 2003).



**Esquema 1.1. Estructura del dímero de TGF-β.** Diagrama en que se muestra de manera general la estructura del TGF-β constituido por dos monómeros, cada uno con un nudo de cisteínas, cuatro hojas β antiparalelas y un segmento de α-hélice (sombreado en negro), se muestra también los enlaces disulfuro que forman parte de la unión entre cada monómero de TGF-β. Tomado de Kingsley, 1994.

### 1.1.3 Vía de Señalización del TGF-β

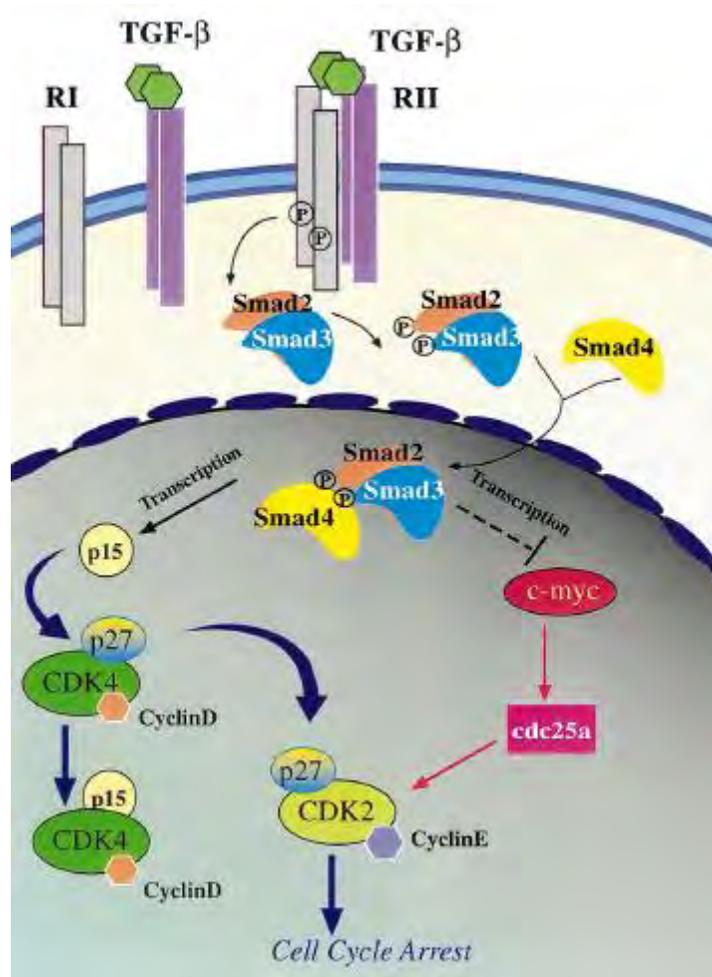
La vía de señalización canónica del TGF-β se representa en el **Esquema 1.2**, y comienza con la unión de la forma activa del TGF-β a su receptor tipo II, denominado TβRII. El receptor TβRII es un receptor constitutivamente activo con actividad de cinasa de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr). El TGF-β en unión al TβRII reclutan al receptor tipo I, denominado TβRI o ALK5 (por su nombre en inglés Activin Receptor-Like Kinase 5). Para ser activado, el receptor TβRI es fosforilado por el receptor TβRII en su dominio GS (dominio rico en residuos de Glicina y Serina). Una vez activo, el receptor ALK5, que también tiene actividad de cinasa de residuos de Ser y Thr, puede fosforilar a los efectores de la vía denominados proteínas Smad (Liu *et al.*, 2001; Shi y Massagué, 2003; Akhurst y Padgett, 2015).

Las proteínas Smad son componentes tanto de la vía del TGF-β como de otras vías de los miembros de la superfamilia, de los cuales se han identificado ocho isoformas que se

clasifican según la función que desempeñan. Dentro de la clasificación, se encuentran las que son reguladas por el receptor, llamadas R-Smads, comprenden las isoformas 1, 2, 3, 5, y 8, de las cuales las isoformas 2 y 3 son específicas para TGF- $\beta$  y activinas, mientras que las BMPs activan principalmente a las isoformas 1, 5 y 8. Otro tipo de proteína Smad es el mediador común Co-Smad, correspondiente a la isoforma Smad4, y es la única que participa en todas las vías de señalización. El tercer grupo de proteínas Smad son las inhibitorias o I-Smad cuyas isoformas son la 6 y la 7, su función inhibitoria repercute sobre las propias vías de señalización de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Akhurst y Padgett, 2015).

En cuanto a la vía del TGF- $\beta$ , las proteínas Smad2 y Smad3 son fosforiladas por el receptor ALK5 y de esta forma se asocian con Smad4, el mediador común, para formar un complejo activo. El complejo R-Smad/Co-Smad se traslada al núcleo, donde controla la expresión de genes blanco mediante su unión a sitios en los promotores, denominados elementos de unión a Smad o SBE (del inglés Smad Binding Elements). La regulación de los genes puede ser positiva o negativa, dependiendo de que el complejo R-Smad/Co-Smad interaccione con co-activadores o co-represores transcripcionales, lo que también varía de acuerdo al contexto celular (Liu *et al.*, 2001; Shi y Massagué, 2003; Akhurst y Padgett, 2015).

Algunos genes blanco que se activan al final de la vía son el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (*PAI-1*, por su nombre en inglés Plasminogen Activator Inhibitor-1) y *Smad7*. Como se mencionará más adelante, *Smad7* es un inhibidor del TGF- $\beta$  y la inducción de su gen constituye un asa de regulación negativa de la vía. Por otro lado, *Myc* es un ejemplo de genes cuya expresión se inhibe por activación de la vía del TGF- $\beta$  (Liu *et al.*, 2001).



**Esquema 1.2 Vía canónica del TGF-β.** El TGF-β inicia su vía de señalización por la unión a los receptores TβRII y TβRI, que tienen actividad de cinasa de residuos de Ser y Thr. La señal continúa por las proteínas efectoras R-Smad que al ser fosforiladas por el receptor TβRI se unen a la Co-Smad formando un complejo activo que se traslada al núcleo para regular la expresión de genes blanco. En este esquema se representan la activación de p15 y la represión de *Myc* que tienen por respuesta el arresto del ciclo celular. Tomado de Liu *et al.*, 2001.

Por otro lado, existen vías no canónicas del TGF-β que son independientes de las proteínas Smad, algunas de éstas están relacionadas con las vías de MAPKs (por su nombre en inglés Mitogen Activated Protein Kinases), GEFs (por su nombre en inglés Guanine nucleotide Exchange Factors), mTOR (por su nombre en inglés mammalian Target of Rapamicyn) y PI3K/Akt, entre otras (Akhurst y Padgett, 2015).

### 1.1.4 Mecanismos de Control de la Vía del TGF- $\beta$

A lo largo de la vía del TGF- $\beta$  existen diversos puntos de control en donde se regula su activación. En el espacio extracelular, por ejemplo, la forma activa del TGF- $\beta$ , es decir, libre de la proteína LAP, condiciona la cantidad de ligando disponible para unirse a sus receptores. La unión del ligando a los receptores también puede regularse por proteínas que atrapan al ligando activo, como la molécula decorina que es un proteoglicano y la proteína circulante  $\alpha$ 2-macroglobulina (Shi y Massagué, 2003).

Otro punto de control involucra el acceso de las proteínas Smad a los receptores, lo cual puede ser facilitado por la proteína SARA (por su nombre en inglés Smad Anchor for Receptor Activation), que recluta a las proteínas Smad y las mantiene cercanas a la membrana celular (Tsukazaki *et al.*, 1998). También existen mecanismos que bloquean la activación de alguno de los receptores del TGF- $\beta$ , por ejemplo FKBP12 es una proteína citoplasmática que se une al dominio GS del receptor ALK5, este dominio es el que es fosforilado para que el receptor ALK5 se active, de manera que la unión FKBP12 a ALK5 impide la activación de este receptor (Chen *et al.*, 1997).

La proteína Smad7 es otro inhibidor de la vía del TGF- $\beta$  que actúa en varios puntos de la vía. A nivel de receptores, Smad7 se une a ALK5 activado y evita la fosforilación de las R-Smads, también, Smad7 recluta ligasas de ubiquitina E3 para la degradación de ALK5, vía el proteosoma. Adicionalmente, Smad7 en el núcleo inhibe la transcripción de genes blanco del TGF- $\beta$ , al interactuar con represores transcripcionales como algunas desacetilasas de histonas (Yan *et al.*, 2009).

Otros dos inhibidores importantes de la vía del TGF- $\beta$  son las proteínas SKI (por su nombre en inglés Sloan Kettering Institute) y SNON (por su nombre en inglés SKI Novel Gene). El mecanismo principal de SKI y de SNON para inhibir la vía del TGF- $\beta$  depende de su actividad como co-reguladores transcripcionales negativos. SKI y SNON se unen a los complejos activos R-Smad/Co-Smad, localizados en los sitios SBE, y reclutan otros co-represores como N-CoR, HDAC (desacetilasa de histonas) y Sin3A. Adicionalmente, SKI y SNON inhiben la unión de los co-activadores que interactúan con el complejo de proteínas Smad en la vía canónica. Aunado a esto, SKI y SNON desestabilizan el complejo

R-Smad/Co-Smad, ya que compiten contra pSmad2 (forma fosforilada) por el sitio de unión a Smad4 (Akiyoshi *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999a; Suzuki *et al.*, 2004; Ueki y Hayman, 2003; Xu *et al.*, 2000). De manera particular, en el citoplasma SKI inhibe la fosforilación de R-Smads al unirse al receptor T $\beta$ RI (Ferrand *et al.*, 2010).

Por otro lado, existe un mecanismo de retroalimentación negativa en el cual los genes *Skil* (SNON) y *Smad7* son activados por la misma vía del TGF- $\beta$  y al expresarse estas proteínas ejercen su efecto negativo. Este mecanismo de regulación controla de manera rigurosa la activación e inactivación de la vía (Deheunink y Luo, 2009; Yan *et al.*, 2009).

## 1.2 LA PROTEÍNA SKI

SKI es una proteína que se localiza principalmente en el núcleo celular, y cuyo papel como inhibidor de la vía del TGF- $\beta$  es importante para la regulación de procesos celulares que dependen de la activación de esta vía. A nivel celular, su función principal es como co-factor transcripcional que se asocia con factores transcripcionales para regular la expresión de genes blanco, ya sea que inhiban su expresión como en el caso de genes blanco del TGF- $\beta$  o también puede promover su activación como el caso del gen de miogenina (Liu *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2007).

Inicialmente *Ski* fue indentificado por el grupo de Stavnezer (Li *et al.*, 1986) como una secuencia genómica común de distintas clonas del virus Sloan-Kettering (cuyas siglas en inglés son SKVs). Este grupo de virus SKVs constituye una clase de virus aviar, y cuyo producto proteico, al que denominaron v-Ski, tenía la capacidad de inducir transformación celular. Posteriormente, se identificó una secuencia homóloga en células no infectadas por el virus que codifica para una proteína funcional y de mayor tamaño, a la que se le denominó c-Ski, y que también se caracteriza por su función transformante y oncogénica.

A modo de aclaración, la proteína celular c-Ski en este trabajo se denomina SKI, de acuerdo con las Guías de Nomenclatura de Genes (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice y Rat Genome and Nomenclature Committee, 2015; Klionsky *et al.*, 2012). La forma viral de la proteína, v-Ski, no se indica con otra notación, más bien se mantiene de acuerdo a como está publicado en Li *et al.*, 1986.

En humanos, el gen *SKI* se localiza en la región 1p36.33, es decir, en el cromosoma 1 del brazo corto (p), específicamente en la región 36.33. Personas que presentan deleciones u otras mutaciones dentro de este sitio desarrollan el síndrome de Shprintzen-Goldberg, caracterizado por signos como hábito marfanoide (complexión alta y delgada) y dificultad de aprendizaje, así como anomalías craneofaciales, musculo-esqueléticas y cardiovasculares. Estos signos corresponden con las mismas alteraciones observadas en ratones transgénicos que no expresan a la proteína SKI (Carminnac *et al.*, 2012; Doyle *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013).

El gen *Ski* también se ha identificado en diversas especies de mamíferos, de aves, de anfibios, de peces, en nemátodos e incluso en moscas (Li *et al.*, 1986; Nomura *et al.*, 1989; Ludolph *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1999; Kaufman *et al.*, 2000).

Otras proteínas que forman parte de la familia de SKI son: SNON que se ha descrito anteriormente como otro inhibidor importante de la vía del TGF- $\beta$ ; Fused-18 (por su nombre en inglés Functional Smad Suppressing Element on Chromosome 18) y Fused-15 (por su nombre en inglés Functional Smad Suppressing Element on Chromosome 15). Éstos últimos se identificaron años más tarde, pero conservan un alto grado de homología con SKI y SNON, además de que interaccionan con las R-Smads e inhiben a las vías del TGF- $\beta$  y de las BMPs; sin embargo, la expresión de estos homólogos es específica del tejido nervioso (Arndt *et al.*, 2005; Arndt *et al.*, 2007).

### **1.2.1 Funciones Biológicas de la Proteína SKI**

Durante el desarrollo embrionario de los ratones, los niveles de SKI aumentan principalmente en dos etapas. El primer aumento tiene lugar durante el cierre del tubo neural y la migración de células de la cresta neural, el segundo incremento ocurre durante el desarrollo del músculo esquelético. Trastornos en la función de SKI en esas etapas del desarrollo, trae como consecuencia alteraciones craneofaciales y una disminución de la masa muscular, además de una muerte prematura de los fetos (McGannon *et al.*, 2006). La sobreexpresión de SKI, por otro lado, provoca una hipertrofia muscular en ratones transgénicos (Sutrove *et al.*, 1990a).

En la etapa adulta SKI se expresa en bajos niveles en casi todos los tejidos en comparación a los niveles que alcanza durante las etapas del desarrollo embrionario. SKI promueve la diferenciación celular, principalmente de las células de Schwann del sistema nervioso, de las células del tejido muscular y de las células hematopoyéticas (Jacob *et al.*, 2008; Deheunink y Luo, 2009; Bonnon y Atanasoski, 2012).

Otro efecto que ejerce SKI es la transformación oncogénica, el cual se estudió inicialmente en fibroblastos de pollo. Mientras tanto, en tumores ya desarrollados como los de melanoma, carcinoma colorrectal, y cáncer pancreático, entre otros, los niveles de SKI se encuentran aumentados, y al reducir los niveles de SKI por medio de la expresión de miRNAs u otras estrategias, el proceso canceroso disminuye, lo que sugiere una relación causal entre los niveles de SKI y el cáncer (Deheunink y Luo, 2009; Bonnon y Atanasoski, 2012).

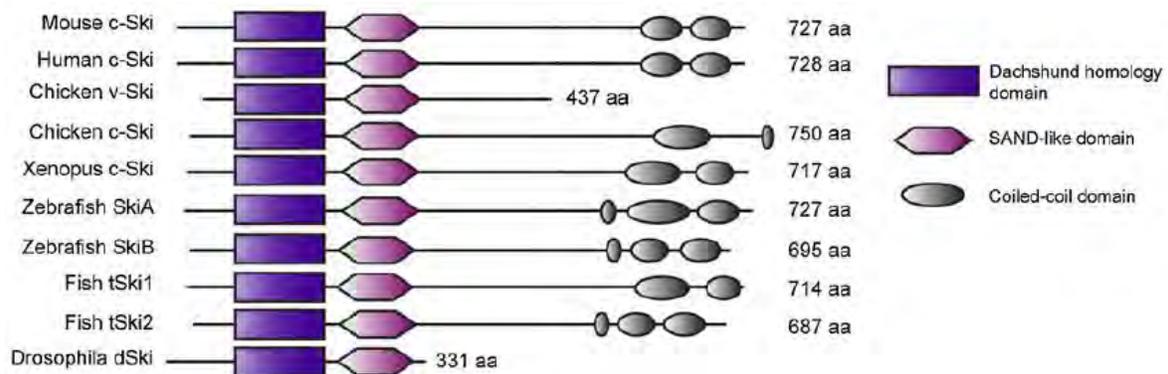
### 1.2.2 Estructura de la Proteína SKI

La proteína SKI de humano consta de 728 residuos de aminoácidos (**Esquema 1.3**). El homólogo v-Ski (derivado de virus) es un fragmento de menor tamaño, 437 residuos de aminoácidos, que corresponde a la región amino terminal de la versión de pollo. Ambas proteínas, tanto la forma celular como viral, contienen una región que les confiere su función transformante, para la forma celular SKI (también denotada como c-Ski en el **Esquema 1.3**) esta región se encuentra entre los residuos 76 y 304 (Wilson *et al.*, 2004). Cabe mencionar que la región amino terminal es la que conserva mayor homología entre los miembros de la familia de SKI y también entre proteínas homólogas de diferentes especies, en esta región se localizan dos dominios principales: DHD y SAND-like (dominio homólogo de SAND). El primer dominio, DHD (por su nombre en inglés Dachshund Homology Domain) se encuentra entre los residuos 91 y 192, y su principal función es la interacción con otras proteínas como los factores de transcripción R-Smad, N-CoR y Skip (Kim *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2004; Dahl *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999; Akiyoshi *et al.*, 1999; Ueki y Hayman, 2003). El dominio homólogo de SAND (SP100, AIRE1, NucP41/75 y DEAF1), que se encuentra próximo al dominio DHD, está constituido por cerca de 80 aminoácidos y contiene el sitio de unión para Smad4 (Wu *et al.*,

2002). Los dominios Dachshund y SAND se han caracterizado en otras proteínas por ser elementos de unión al DNA, sin embargo, para los miembros de la familia de SKI, sus regiones homólogas presentan alguna modificación que no les permite unir directamente al DNA.

El extremo carboxilo terminal de SKI es la región más variable entre los miembros de la familia. Esta región permite la formación de oligómeros, ya sean homodímeros o heterodímeros. Este extremo carboxilo consta de un dominio *Coiled-coil* que a su vez está constituido por repeticiones en tándem y un motivo de cremallera (*zipper*) de leucina (LZ, del inglés Leucine Zipper) que forman una estructura de  $\alpha$ -hélice. Este motivo también se ha identificado en SNON y en otras formas de SKI (Liu *et al.*, 2001; Deheunink y Luo, 2009; Bonnon y Atanasoski, 2012).

Otros motivos estructurales de relevancia de la proteína SKI son una región rica en residuos de prolina entre los residuos 61 a 69 (región amino terminal), una zona donde abundan residuos de aminoácidos básicos comprendida entre 296 y 398 (zona intermedia), y entre los sitios 493 y 509 se identifica una región rica en residuos de Ser y Thr, que constituye una zona potencial para sitios de fosforilación (Wilson *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2001).



**Esquema 1.3. Dominios y motivos estructurales de miembros de la familia de SKI.**

Diagrama comparativo de diferentes proteínas SKI expresadas en diferentes especies. Se indica la longitud de las secuencias, y los dominios DHD, los dominios Homólogo de SAND y los dominios *Coiled-coil*. Modificado de Bonnon y Atanasoski, 2012.

### 1.2.3 Mecanismos de Regulación de SKI

Los niveles de SKI pueden regularse a nivel de transcripción, de traducción y de estabilidad de la proteína, sin embargo no se han estudiado ampliamente los mecanismos que regulan la actividad transcripcional de su gen. En cuanto a la traducción de su RNA mensajero, se han identificado algunos miRNAs dirigidos contra el mRNA de *Ski* que lo regulan de manera negativa. Por último, los mecanismos que regulan los niveles de la proteína son los que más ampliamente se han explorado, entre estos mecanismos se encuentran vías y factores que inducen la degradación de la proteína SKI, y otros que cambian su localización subcelular (Deheunink y Luo, 2009).

Los niveles de SKI disminuyen tras la estimulación con TGF- $\beta$ . El mecanismo de degradación implica la unión de SKI a las R-Smad fosforiladas (activas), estas R-Smad fosforiladas reclutan a enzimas con función de ligasas E3 de ubiquitina que a su vez promueven la poliubiquitinación de SKI y su posterior degradación vía el proteosoma (Sun et al., 1999b; Nagano et al., 2007). De manera similar, SNON es degradado vía el proteosoma tras el estímulo con TGF- $\beta$ ; sin embargo, hasta ahora solo se han identificado los sitios de ubiquitinación en SNON (Stroschein *et al.*, 2001), mientras que para SKI todavía no se conocen. Otro mecanismo de regulación que ejerce el TGF- $\beta$  sobre SNON es activando la expresión de su gen, ya que es un blanco de la vía, mientras que el gen *Ski* no es blanco del TGF- $\beta$  (Deheunink y Luo, 2009).

Los niveles de SKI también dependen del ciclo celular, ya que esta molécula se estabiliza durante la mitosis debido a una interacción con las proteínas CDC34, una enzima E2 conjugadora de ubiquitina; y CDC2/ciclina B que tiene actividad de cinasa. Además, SKI presenta una redistribución hacia el huso mitótico y los centrosomas durante la mitosis, lo cual fue observado por su co-localización con  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tubulina, respectivamente (Macdonald *et al.*, 2004; Marcelain y Hayman, 2005).

La dinámica del citoesqueleto de actina constituye otro mecanismo de regulación de los niveles de SKI. Vázquez-Victorio *et al.* (2015a) reportan que las condiciones que promueven la polimerización de actina, como la activación de la vía de RhoA/ROCK por GPCRs, y el uso de fármacos como Jasplakinolida (que induce la formación de filamentos de actina), provocan la degradación de la proteína SKI vía el sistema ubiquitina proteosoma

(cuyas siglas en inglés son UPS). Mientras tanto, las condiciones que inducen la forma globular de actina, como el tratamiento con Latrunculina B, estabilizan los niveles de SKI. En el mismo trabajo se reportó que SKI está asociado a endosomas multivesiculares (MVE), lo que sugiere que puede participar en el tráfico vesicular.

Al tomar en cuenta esta gran variedad de mecanismos de regulación sobre la proteína SKI, que influyen tanto en su estabilidad como en su localización subcelular, se propone que estos mecanismos pueden depender de modificaciones postraduccionales, sin embargo esto aún no se ha estudiado detalladamente. Con respecto a estas modificaciones, SKI es una proteína que es fosforilada a nivel endógeno (Sutrave *et al.*, 1990b; Del Valle-Espinosa, 2013), pero para identificar a algunos de los sitios de fosforilación de la proteína se han utilizado sistemas de sobreexpresión y condiciones *in vitro* (Band *et al.*, 2009; Nagata *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2016). Por otro lado, otra modificación postraducciona que sufre SKI es la poliubiquitinación, sin embargo tampoco se han identificado los sitios donde se añaden las unidades de ubiquitina. Debido a estas observaciones, en el presente trabajo se retomó el estudio de la regulación de SKI por fosforilación, ya que es una modificación que puede regular distintos procesos como actividad, asociación con diferentes moléculas y localización subcelular, entre otros. Cabe mencionar que el estudio de la fosforilación de la proteína SKI endógena puede contribuir a entender los diversos mecanismos que regulan la estabilidad de esta proteína.

De acuerdo con un análisis *in silico* realizado para predecir los probables sitios de fosforilación en la secuencia de SKI, se sugiere que esta proteína es un posible blanco de la cinasa GSK3 (Del Valle-Espinosa, 2013), por lo que el presente trabajo se desarrolla en torno a demostrar si la estabilidad de la proteína SKI depende de la actividad de dicha enzima.

### **1.3 LA CINASA GSK3 COMO REGULADOR DE DISTINTOS PROCESOS CELULARES**

La cinasa 3 de la glucógeno sintasa o GSK3 (por su nombre en inglés Glycogen Synthase Kinase 3) es una enzima que fosforila residuos de serina y treonina. Se estima que

es una de las cinasas con mayor cantidad de sustratos a nivel celular, y por lo tanto regula una amplia gama de procesos celulares y fisiológicos como son la proliferación, la apoptosis, la renovación de células troncales, el desarrollo embrionario, el metabolismo, la motilidad, la diferenciación y el ritmo circadiano, entre otros (Meijer *et al.*, 2004; Tejeda-Muñoz y Robles-Flores, 2015). Esta proteína presenta dos isoformas codificadas por genes diferentes: GSK3 $\alpha$  (peso aproximado de 51 KDa) y GSK3 $\beta$  (47 KDa), las cuales tienen un alto grado de homología en su región catalítica, pero difieren en mayor grado en sus extremos amino y carboxilo. Aun así, ambas isoformas se expresan de manera ubicua en diferentes tejidos y algunas de sus funciones son redundantes entre sí (Meijer *et al.*, 2004; Tejeda-Muñoz y Robles-Flores, 2015).

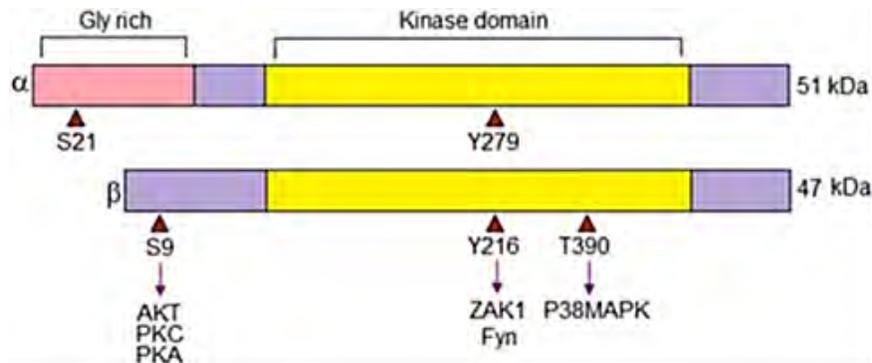
### 1.3.1 GSK3: Mecanismos de Acción y de Regulación

El mecanismo general de acción de GSK3 es reconociendo a un sustrato que previamente se encuentre fosforilado, y agregando un segundo grupo fosfato en residuos de serina o treonina que se encuentren cuatro residuos hacia el extremo amino de la primera fosforilación. Esta modificación constituye una marca de reconocimiento para otras proteínas, principalmente ligasas de ubiquitina que promueven la degradación de diversas proteínas vía el proteosoma (Cohen y Frame, 2001; Meijer *et al.*, 2004).

GSK3 participa en múltiples señales de transducción, por ejemplo en la vía Wnt, GSK3 promueve la degradación de  $\beta$ -catenina por fosforilación. Por otro lado, en el metabolismo de carbohidratos, GSK3 fosforila e inactiva a la enzima glucógeno sintasa (GS) en condiciones de ayuno (Cohen y Frame, 2001; Meijer *et al.*, 2004).

La actividad de GSK3 puede regularse por modificaciones postraduccionales, los principales sitios de modificación caracterizados se muestran en el **Esquema 1.4**. En el extremo amino de GSK3, los residuos Ser21 (GSK3 $\alpha$ ) o Ser9 (GSK3 $\beta$ ) son fosforilados. Esta fosforilación inhibe su actividad enzimática debido a que la región amino se pliega y puede ser reconocida como un pseudosustrato, actuando como un inhibidor competitivo. Los residuos de Tyr279/216 (isoformas  $\alpha/\beta$ , respectivamente) que se localizan en el dominio catalítico de la enzima son fosforilados, lo cual promueve su activación, ya que la

forma no fosforilada dificulta el ingreso del sustrato al sitio catalítico (Meijer *et al.*, 2004; Tejeda-Muñoz y Robles-Flores, 2015).



**Esquema 1.4 Modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de GSK3.** Representación de las secuencias de las isoformas GSK3α y GSK3β, se señalan los sitios de fosforilación que regulan su actividad, también se identifican el dominio catalítico o de cinasa altamente conservado y una región rica en residuos de glicina en el extremo amino de la forma GSK3α. Tomado de Tejeda-Muñoz y Robles-Flores, 2015.

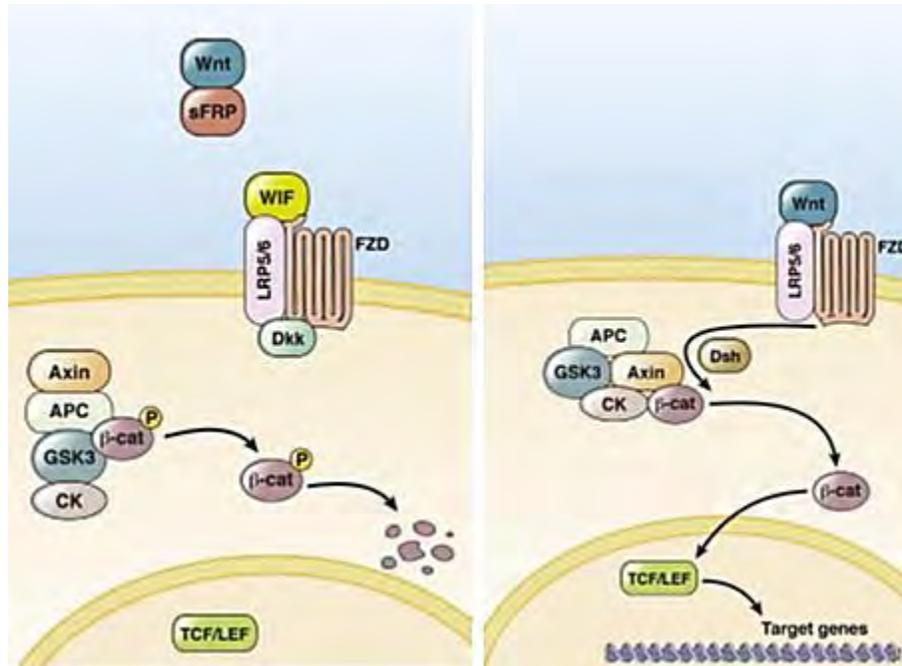
El mecanismo de inhibición de GSK3 por fosforilación en Ser 21/9 es realizado principalmente por la cinasa Akt; aunque también PKC y PKA, entre otras, pueden fosforilar estos sitios. En cuanto a los mecanismos que promueven la fosforilación de GSK3 en los residuos Tyr279/216, aun se desconocen; sin embargo, al respecto solo se han sugerido algunas cinasas de residuos de Tyr que pudieran participar en este proceso como SAK1 (por su nombre en inglés Zaphod Kinase 1), FYN, PYK2 (por su nombre en inglés Ca<sup>2+</sup>-sensitive Praline-rich Tyrosine Kinase 2), y MEK1 (por su nombre en inglés Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1) (Meijer *et al.*, 2004). En el **Esquema 1.4** también se muestra un tercer sitio de fosforilación en la Thr390, el cual es regulado por P38 MAPK y confiere un efecto inhibitorio sobre GSK3.

Otros mecanismos que regulan la acción de GSK3 son la interacción con otras proteínas que dirigen su actividad hacia determinados sustratos, la accesibilidad a sustratos previamente fosforilados, cambios en su nivel de expresión, y su localización subcelular (Meijer *et al.*, 2004; Tejeda-Muñoz y Robles-Flores, 2015).

### 1.3.2 GSK3 y la Vía de Wnt

La vía de Wnt constituye una de las principales vías de señalización en las que participa GSK3. Esta vía regula la proliferación y la sobrevivencia celular, de manera que su relevancia incide en distintas etapas del desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular en el adulto. Además, la vía Wnt frecuentemente se encuentra alterada en procesos tumorales como en los carcinomas de colon, debido a mutaciones en alguno de sus componentes.

En el **Esquema 1.5** se muestra la vía canónica de Wnt. En ausencia del ligando Wnt (que lleva el mismo nombre de la vía) se forma un complejo multiproteico constituido principalmente por GSK3 $\beta$ , la cinasa de caseína 1 (CK1 por su nombre en inglés Casein Kinase 1), APC (producto del gen cuyo nombre en inglés es Adenomatous Polyposis Coli),  $\beta$ -catenina que es el efector de la vía, y axina, que sirve de andamio para la interacción entre las demás proteínas. Este complejo también es denominado complejo de destrucción debido a que promueve la constante degradación de  $\beta$ -catenina. Este mecanismo de degradación consiste en una primera fosforilación de  $\beta$ -catenina en el residuo Ser45 realizada por CK1, posteriormente GSK3 reconoce este sitio fosforilado y fosforila los sitios de Ser33, Ser37 y Thr41. Esta forma fosforilada de  $\beta$ -catenina es reconocida por  $\beta$ -Trcp, una ligasa de ubiquitina que la poliubiquitina y la manda a degradación vía el proteosoma. Por otro lado, cuando se activa la vía (panel derecho del **Esquema 1.5**), el ligando Wnt actúa a través del receptor Frizzled (abreviado Fzd) y del co-receptor que es la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 ó 6 (LRP5/6 por su nombre en inglés Low Density Lipoprotein-Related Protein 5 o 6), tanto el receptor como el co-receptor se encuentran asociados a la membrana. Esta asociación entre ligando y proteínas receptoras activa a la proteína Dvl (Disheveled) mediante fosforilación y ésta promueve la disociación del complejo de destrucción. Al disociarse el complejo de destrucción,  $\beta$ -catenina se estabiliza y se trasloca al núcleo, en donde se asocia con factores transcripcionales, principalmente con factores de la familia TCF/LEF (por sus nombre en inglés T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) y regula la expresión de genes blanco de la vía (Monga, 2015).



**Esquema 1.5 Vía canónica de Wnt.** En ausencia de ligando (panel izquierdo)  $\beta$ -catenina se asocia al complejo de destrucción y es degradada constantemente. Al activarse la vía por el ligando Wnt,  $\beta$ -catenina se libera, en esta forma activa puede traslocar al núcleo, asociarse con factores de transcripción y regular la expresión de genes blanco de la vía. Modificado de Monga, 2015.

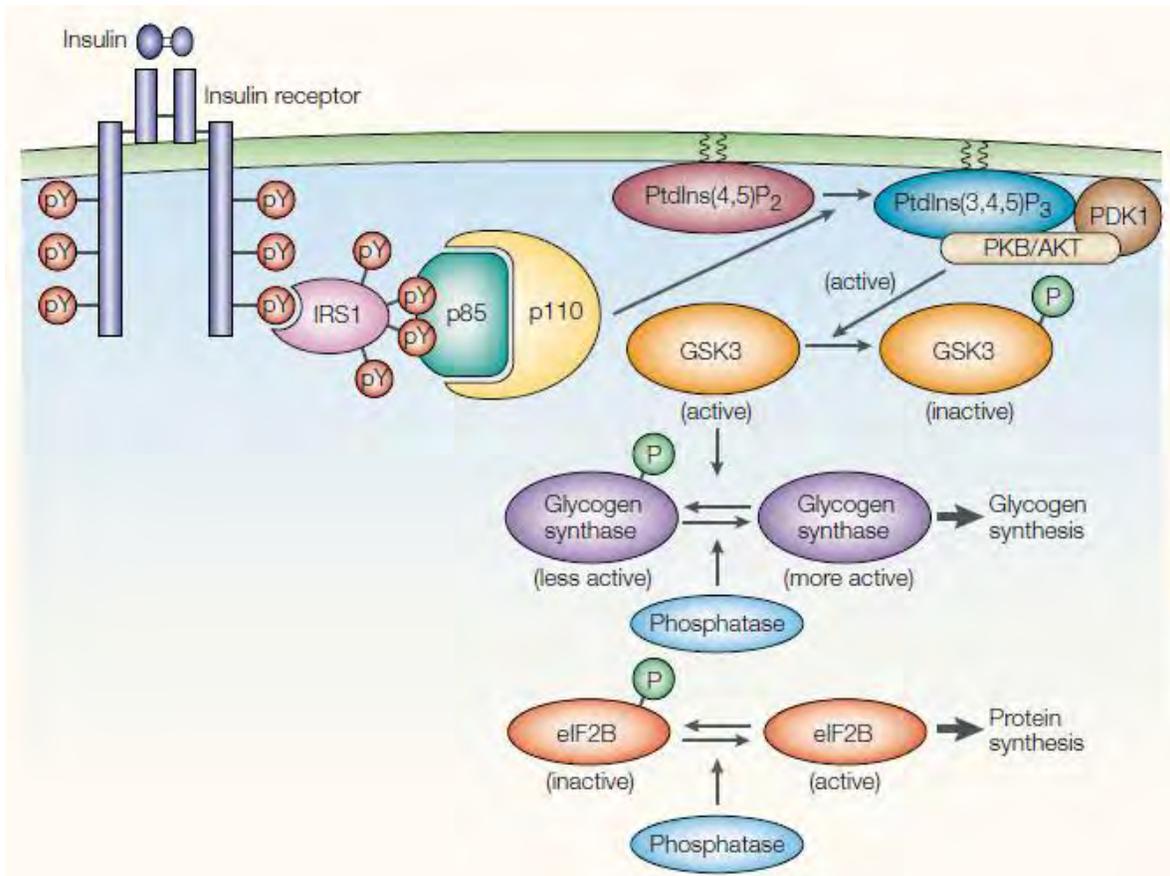
Debido a que GSK3 promueve la degradación de  $\beta$ -catenina, cuando ambas se encuentran en el complejo de destrucción, entonces cuando se inhibe a GSK3 con el uso de inhibidores farmacológicos, de siRNAs u otras estrategias, se puede mimetizar la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. El mecanismo por el cual  $\beta$ -catenina es estabilizada en respuesta al ligando Wnt aún no se conoce a detalle. Una de las propuestas describe que GSK3 se internaliza en endosomas multivesiculares junto con otros componentes de la vía (Taelman *et al.*, 2010); curiosamente, este compartimiento subcelular coincide con la localización de SKI en este organelo (Vázquez-Victorio *et al.*, 2015a), lo cual puede sugerir una posible interacción entre SKI y GSK3. Por otro lado, Tejeda-Muñoz *et al.* (2016) demostraron que la cinasa PKC $\zeta$  fosforila y activa a GSK3 en el residuo Ser147, y que la dinámica de esta fosforilación cambia en respuesta al ligando Wnt.

En el contexto hepático, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina regula múltiples procesos, por ejemplo, promueve la proliferación celular durante el desarrollo embrionario, en los primeros días de la etapa post-natal y durante procesos de regeneración (Thompson y Monga, 2015). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina es la principal vía que regula la zonación hepática, la cual se refiere a una localización diferencial de los hepatocitos en el lóbulo hepático, de acuerdo a las diferentes funciones metabólicas en que se especializan. Algunas de estas funciones metabólicas son reguladas por la vía Wnt, y comprenden al metabolismo de carbohidratos y de amonio, así como al procesamiento de xenobióticos (Colnot y Perret 2011). En respuesta al estrés oxidativo y a los niveles de insulina,  $\beta$ -catenina se activa y regula la expresión de genes mediante la unión a los factores de transcripción FOXO (por su nombre en inglés Forkhead box protein O) (Monga, 2015). En varias patologías, algunos de los componentes de la vía Wnt se han encontrado mutados o alterados en procesos tumorales como el cáncer hepatocelular, los hepatoblastomas, las neoplasias benignas de hígado y los colangiocarcinomas, entre otros (Thompson y Monga, 2015).

### 1.3.3 GSK3 y la Vía de PI3K/Akt

Otra vía de transducción que regula la actividad de GSK3 es la de PI3K (por su nombre en inglés Phosphatidylinositol 3-Kinase)/Akt (también conocida como PKB, o proteína cinasa B), que como se mencionó anteriormente es una vía que inactiva a GSK3 mediante la fosforilación de su extremo amino. En el **Esquema 1.6** se muestra un diagrama de la activación de la vía PI3K/Akt, en este ejemplo la vía es activada por la insulina, la cual tiene receptores membranales con función de cinasa de residuos de tirosina. Estos receptores actúan en dímeros transfosforilando varios sitios entre sí; los residuos de tirosina fosforilados (pY) interaccionan con sustratos de los mismos receptores denominados IRS (por su nombre en inglés Insulin Receptor Substrate), que a su vez son fosforilados en residuos de tirosina. Las proteínas IRS fosforiladas reclutan a la PI3K mediante su interacción con la subunidad p85, de manera que la PI3K queda cercana a la membrana y su subunidad p110 puede catalizar la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub> o PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, como se representa en el esquema) a fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP<sub>3</sub> o PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, como se representa en el esquema). El PIP<sub>3</sub> se asocia con PDK1 (por su

nombre en inglés 3-Phosphoinositides-Dependent protein Kinase 1) y con Akt, la PDK1 fosforila y activa a Akt. Akt a su vez inactiva a GSK3 al fosforilarla en su región amino terminal (Ser21 y Ser9 para las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente). Como consecuencia de la inactivación de GSK3, algunos de sus sustratos son defosforilados por fosfatasas, lo que conlleva a un cambio en su actividad; en el esquema se muestran como ejemplo a la glucógeno sintasa (GS) y al factor eucariote de inicio de la transcripción 2B (eIF2B) que se activan al remover los grupos fosfato que previamente añadió GSK3.



**Esquema 1.6 Inhibición de GSK3 mediante señales que activan la vía PI3K/Akt.**

Esquema que representa la activación de la vía PI3K/Akt mediante la unión de Insulina a sus receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina, estos receptores al activarse fosforilan a proteínas sustrato denominadas IRS que a su vez reclutan a la cinasa PI3K, conformada por las subunidades p85 y p110. La cinasa PI3K promueve la formación de PIP<sub>3</sub> (representado como PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) y PIP<sub>3</sub> se

asocia a las cinasas PDK1 y Akt, ésta última es la responsable de fosforilar a GSK3 (forma inactiva de GSK3), de manera que proteínas blanco de GSK3 como glucógeno sintasa y eIF2B se activan al remover los grupos fosfato que tenían. Tomado de Cohen y Frame, 2001.

Otras señales que regulan la fosforilación de GSK3 en su extremo amino son las de los factores de crecimiento que pueden activar también a la vía PIK3/Akt o a la vía MAPKs, así como aminoácidos libres que activan la vía mTOR (Blanco de Rapamicina en Mamíferos, o su nombre en inglés mammalian Target of Rapamicyn) y señales que inducen la formación de cAMP (adenosín monofosfato cíclico) (Cohen y Frame, 2001).

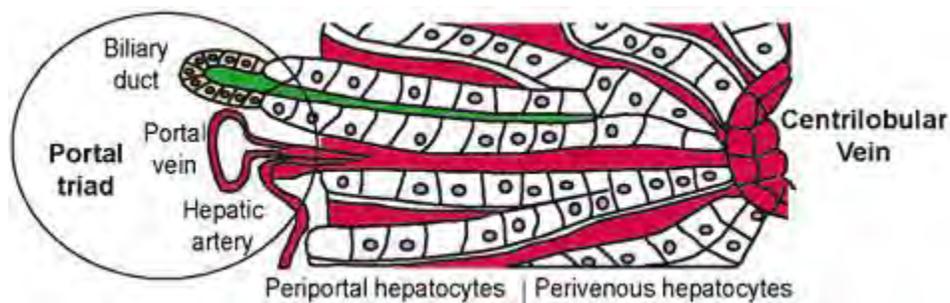
En el modelo de hígado, la señal de PI3K/Akt, particularmente promovida por insulina, puede regular funciones metabólicas como la síntesis de glucógeno, ya que al inhibir la actividad de GSK3 se activa la enzima GS.

#### **1.3.4 Zonación hepática y el papel de las vías Wnt y PI3K/Akt**

El proceso de zonación hepática representa un contexto fisiológico del hígado normal, en el que puede verse implicada la regulación de la actividad de GSK3 ya sea por la vía Wnt o por PI3K/Akt, por lo que a continuación se explica brevemente en qué consiste este proceso.

Los hepatocitos son células altamente especializadas que realizan gran número de funciones metabólicas, algunas de estas funciones resultan opuestas, como vías catabólicas y anabólicas, por lo que para mantener la homeostasis del hígado estas funciones se realizan en distintas zonas del lóbulo hepático, lo que se conoce como zonación hepática. El lóbulo hepático es la unidad anatómica y funcional del hígado, tiene forma hexagonal y está constituido por dos grupos principales de hepatocitos: periportales, que se encuentran cercanos a la periferia del lóbulo; y pericentrales, que se localizan próximos a la región central (**Esquema 1.7**). Estos tipos de hepatocitos periportales y pericentrales son los que realizan funciones diferentes, de manera que establecen la zonación hepática. Entre los procesos metabólicos que se han caracterizado por ser dependientes de la zonación hepática se encuentran el metabolismo de glucosa y de lípidos, la destoxificación del amonio, y el

metabolismo de xenobióticos, entre otros (Colnot y Perret, 2011; Gebhardt y Matz-Soja, 2014).



**Esquema 1.7. Diagrama del lóbulo hepático.** Representación del lóbulo hepático conformado por hepatocitos periportales (lado izquierdo) y hepatocitos pericentrales (lado derecho), también se muestra la localización de la triada hepática (vena porta, arteria hepática y ducto biliar) en la periferia del lóbulo y la vena central adyacente a los hepatocitos pericentrales. Modificado de Colnot y Perret, 2011.

La zonación hepática es regulada a nivel molecular principalmente por la presencia o ausencia de APC. En los hepatocitos pericentrales, la proteína APC está ausente, lo que trae como consecuencia la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, debido a que APC es un componente del complejo de destrucción de la vía. Debido a esto, los hepatocitos pericentrales se caracterizan por tener un perfil transcripcional propio de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. En contraposición, APC está presente en los hepatocitos periportales y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, así como su perfil transcripcional, no están activos (Colnot y Perret, 2011; Gebhardt y Matz-Soja, 2014).

Con base en esta clasificación de los hepatocitos periportales y los pericentrales, se sugiere que la enzima GSK3 esté siendo regulada por las vías Wnt/ $\beta$ -catenina y PI3K/Akt en estos tipos celulares. Por ejemplo, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina que se encuentra activa en hepatocitos pericentrales puede inhibir la actividad de GSK3. Por otro lado, en los hepatocitos periportales tienen lugar la gluconeogénesis (síntesis de glucosa) y la glucogénesis (síntesis de glucógeno), aunque no al mismo tiempo (Colnot y Perret, 2011; Kudryavtseva *et al.*, 1992; Chen y Katz, 1988). Estos procesos son regulados por GSK3 a través de la respuesta a insulina (Cohen y Frame, 2001), esto sugiere que GSK3 es regulada por la vía PI3K/Akt en hepatocitos periportales.

En cuanto a la vía del TGF- $\beta$ , aún no se han reportado estudios que involucren a esta vía en el proceso de zonación hepática.

### **1.3.5 Interacción entre GSK3 y componentes de la vía del TGF- $\beta$**

Algunos estudios hacen referencia a la interacción entre GSK3 y las proteínas Smad, como el caso de Smad3, de Smad4 y de Smad1 en su forma activa (forma fosforilada o pSmad1). En esta interacción, GSK3 fosforila a estas proteínas Smad y promueve su degradación vía el proteosoma (Guo *et al.*, 2008; Demagny y De Robertis, 2016; Fuentealba *et al.*, 2007). De manera adicional se sabe que GSK3 fosforila a las proteínas Smad2/3 en su región linker, que corresponde a modificaciones que involucran vías no canónicas del TGF- $\beta$  (Abushahba *et al.*, 2012).

El proceso de la transición de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGF- $\beta$  se estudió en relación con la activación de la vía Wnt, ya sea activando a  $\beta$ -catenina o inhibiendo la actividad de GSK3. Se demostró que al activar a la vía Wnt, este proceso de diferenciación se bloquea en fibroblastos de piel y de pulmón (Liu *et al.*, 2012; Baarsma *et al.*, 2012).

Respecto a la interacción entre la cinasa GSK3 y el co-factor transcripcional SKI que se propone estudiar en el presente trabajo, hasta el momento no se ha demostrado que la proteína SKI sea un blanco de GSK3.

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

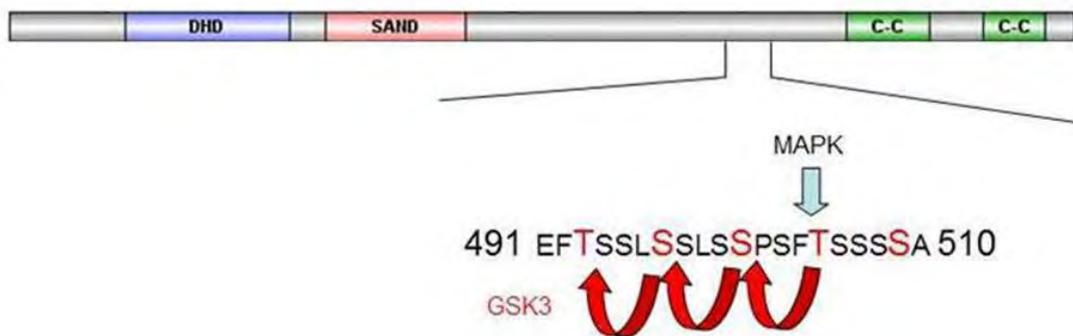
### 2.1 ANTECEDENTES

La estabilidad de la proteína SKI es regulada por múltiples mecanismos, entre los que se encuentran la vía del TGF- $\beta$ , los cambios en la dinámica de citoesqueleto de actina, la localización en endosomas multivesiculares (MVE), y el proceso de la división celular, entre otros. Estos mecanismos implican la regulación de la estabilidad de la proteína SKI por medio de modificaciones postraduccionales; siendo la fosforilación y la ubiquitinación, las que se han descrito hasta el momento. En el presente proyecto se decidió estudiar el efecto de la fosforilación de SKI sobre su estabilidad, debido a que esta modificación está implicada en la regulación de una gran variedad de mecanismos como la estabilidad, la localización subcelular y la activación de muchas proteínas con diferentes funciones.

Desde que se caracterizó a la proteína SKI se determinó que es una proteína con alto grado de fosforilación en residuos de serina, localizados principalmente en la región carboxilo (Sutrave *et al.*, 1990b). Posteriormente, Band *et al.* (2009) identificaron a la treonina 458 como un sitio de fosforilación de SKI, así como una señal de degradación mediada por Akt. Nagata *et al.* (2010) reportaron que el residuo de serina 515 es también un sitio de fosforilación de SKI, sin embargo, no se determinó algún posible efecto funcional ni la cinasa responsable. Más recientemente, Rivas *et al.* (2016) demostraron que SKI es blanco de la cinasa Aurora A (AURKA), de manera que fosforila los sitios Ser326 y Ser383 de SKI y promueve la inestabilidad de la proteína. Es preciso mencionar que en estos trabajos, las determinaciones se realizaron con sistemas de sobreexpresión o *in vitro*, de manera que no reflejan exactamente lo que ocurre en condiciones *in vivo*, por lo que hace falta demostrar si estas fosforilaciones ocurren en la proteína SKI endógena, así como determinar la relevancia que puedan tener en un contexto fisiológico.

En nuestro laboratorio se realizaron algunos experimentos tratando de identificar algunas modificaciones postraduccionales de la proteína SKI endógena, sin embargo no se han obtenido resultados concluyentes (Del Valle-Espinosa, 2013). Debido a estas dificultades, se decidió llevar a cabo un estudio en el que se evaluó el efecto de cinasas particulares sobre la estabilidad de la proteína SKI. Con base en un análisis *in silico* para

determinar sitios de fosforilación de la proteína SKI (Del Valle-Espinosa, 2013), se identificaron tres sitios potenciales, en una secuencia consenso, para ser fosforilados por GSK3, que corresponden a los residuos Ser501, Ser497 y Thr493 (**Esquema 2.1**). Como se mencionó anteriormente, GSK3 reconoce a la mayoría de sus sustratos por una fosforilación previa, en SKI esta fosforilación se predijo en el residuo Ser505 y que puede ser fosforilado por MAPK.



**Esquema 2.1. La proteína SKI posee tres sitios potenciales para ser fosforilados por GSK3.** Representación de los sitios potenciales de fosforilación que pueden ser modificados por GSK3 (T493, S497 y S501) en la secuencia lineal de la proteína SKI, así como el posible sitio de fosforilación cebadora modificado por MAPK (T505), datos obtenidos mediante predicciones *in silico*. Modificado de Del Valle-Espinosa (2013).

Tomando en cuenta que GSK3 puede regularse a través de su relocalización en endosomas multivesiculares (MVE) promovida por la activación de la vía Wnt (Taelman *et al.*, 2010), también se sugiere que pueda interactuar con SKI en este organelo.

Al analizar estas observaciones sobre sitios potenciales de fosforilación de la proteína SKI, y sobre la localización en MVE tanto de SKI como de GSK3, se propuso estudiar si la cinasa GSK3 ejerce algún efecto sobre la proteína SKI. Los resultados de este estudio permitirían establecer una posible interacción entre las vías de transducción en que estas dos proteínas están involucradas, por ejemplo demostrar si la vía TGF- $\beta$  puede interactuar con Wnt o con PI3K/Akt a través de SKI y GSK3. Determinar nuevas

interacciones entre estas vías de transducción en el contexto hepático contribuye a entender las distintas respuestas celulares que tienen lugar tanto en procesos fisiológicos como patológicos y que son reguladas por dichas vías de transducción.

Para llevar a cabo este estudio se planteó como estrategia el uso de inhibidores farmacológicos que regulan la actividad de la cinasa GSK3, debido a que GSK3 se encuentra activa cuando se retira el suero del medio de cultivo celular (Stambolic y Woodgett, 1994) y se puede bloquear su actividad mediante estos inhibidores. Se esperaba que al inhibir la actividad de GSK3 se observaría algún efecto en la abundancia de la proteína SKI, debido a que GSK3 promueve la degradación de un gran número de proteínas.

Para este proyecto se planteó utilizar la línea celular C9 de hepatocitos normales de rata, debido a que es en este modelo que se encontró que la proteína SKI no sólo se localiza en el núcleo, como se había observado en otros tipos celulares, sino que también se encuentra en el citoplasma; además, en esta línea celular de hepatocitos se caracterizaron otros mecanismos de regulación de la proteína SKI, como son los provocados por cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina, y su localización en MVE. También se ha observado que algunos de estos mecanismos de regulación se presentan en cultivos primarios de hepatocitos, por lo que esta similitud permite que los datos obtenidos sean comparables a lo que ocurre en condiciones *in vivo*; sin embargo, los cultivos primarios de hepatocitos tienen el inconveniente de que no es posible mantenerlos por periodos prolongados (más de cinco días) sin que sufran transdiferenciación hacia células con características de fibroblastos, lo cual representa un cambio en su identidad celular. Por otro lado, en el caso de las líneas celulares de hepatomas, como las HepG2 y AS30D, la localización de SKI es prácticamente nuclear, y no responde a los mismos mecanismos de regulación previamente descritos en hepatocitos normales (Caligaris *et al.*, 2015).

## **2.2 HIPÓTESIS**

Los niveles de la proteína SKI son regulados por la cinasa GSK3 en la línea celular C9 de hepatocitos de rata.

## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.3.1 Objetivo General**

Estudiar los mecanismos moleculares por los cuales la cinasa GSK3 controla los niveles de la proteína SKI.

### **2.3.2 Objetivos Particulares**

1. Evaluar si los niveles de la proteína SKI se modifican al regular la actividad de GSK3 mediante el uso de inhibidores farmacológicos de esta cinasa.
2. Determinar si las proteínas SKI y GSK3 interactúan entre sí.
3. Establecer si el mecanismo que regula los niveles de SKI al inhibir a GSK3 es dependiente de algún mecanismo conocido que regula la estabilidad de la proteína SKI, como la vía del TGF- $\beta$ .

## **3 METODOLOGÍA**

### **3.1 CULTIVO CELULAR**

Se empleó la línea celular C9 que es una línea inmortalizada, pero no transformada, de hepatocitos de rata. Las células se cultivaron en medio DMEM adicionado con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 mg/mL), haciendo un recambio del medio cada tercer día. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%.

### **3.2 TRATAMIENTOS Y ESTÍMULOS**

Los tratamientos y estímulos de las células C9 en cultivo, se realizaron en medio sin suero, a no ser que se especifique lo contrario. El medio de cultivo utilizado para los estímulos fue DMEM adicionado con glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 mg/mL), pero sin suero. Los tiempos de incubación sin suero fueron de 14 a 16 h para tratamientos y estímulos de máximo 8 h; para tratamientos de 24 h el tiempo de incubación sin suero fue de 2 h, para evitar daño a las células. En el caso de células tratadas en condiciones con suero, las células se matuvieron con el mismo medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal de bovino (FBS) y los antibióticos penicilina y estreptomicina (mismas concentraciones que el medio sin suero).

Los inhibidores de GSK3 empleados y sus respectivas concentraciones fueron: BIO, 5 µM; LiCl, 30 mM; y SB216763, 5 µM. Otros inhibidores empleados fueron XAV939 (inhibidor de tankirasas y de la vía Wnt) a una concentración de 5 µM; y SB431542 (inhibidor del Receptor tipo I del TGF-β, TβRI o ALK5) a una concentración de 10 µM. El estímulo con TGF-β se realizó a una concentración de 0.2 nM.

### **3.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT**

Las células que recibieron algún tratamiento o estímulo se lisaron con buffer de lisis RIPA (1 mL por cada muestra), adicionado con inhibidores de fosfatasa y proteasas, y trabajando en hielo, las muestras se recolectaron en microtubos y se incubaron a 4 °C en agitación por inversión durante 1 h. En seguida, los tubos se centrifugaron 5 min, a 13000 rpm a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se realizó la cuantificación de las proteínas totales por el método de Bradford, para esto se mezclaron 800 µL de agua desionizada, 200 µL del reactivo de Bradford y 2-4 µL de cada muestra, se dejaron alrededor de 5 min incubando y se realizaron lecturas de absorbancia a 595 nm, los datos obtenidos se interpolaron en una curva de calibración. Si se realizó una inmunoprecipitación (para los ensayos de Western blot-inmunoprecipitación), entonces se tomaron de las muestras cantidades iguales de proteínas y se incubaron con el anticuerpo adecuado a 4 °C en agitación por inversión, toda la noche; luego se añadieron 75 µL de proteína G-sefarosa, diluida 1 a 5 en TNTE al 0.1%, incubando nuevamente a 4 °C en agitación por inversión, durante 1 h. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C por 1 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con 1 mL de buffer TNTE, los lavados consistieron en resuspender, luego centrifugar a máxima velocidad durante 15 s y retirar el sobrenadante. Antes de la electroforesis, todas las muestras fueron desnaturalizadas adicionando solución Laemmli y calentando a 100 °C durante 5 min en tubos cerrados (ver anexos).

Las proteínas desnaturalizadas en solución Laemmli se cargaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y SDS. Los geles empleados incluyen un gel concentrador al 4% y un gel separador al 7.5 % de acrilamida. La resolución de las muestras se realizó en cámaras de electroforesis, empleando buffer de corrida. Al término de la corrida, las proteínas inmersas en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivideno (PVDF) en una cámara de electroforesis especial para transferencia y utilizando buffer de transferencia, el proceso se realizó a 100 V durante 1 h ó 320 mA durante 3 h, en frío y con agitación del buffer. Después, la membrana se bloqueó con solución de leche descremada al 5 % en buffer TBS-T 1X durante 1 h, luego se incubó con un anticuerpo

primario de Santa Cruz Biotechnology en una concentración 0.2 µg/mL (dilución 1:1000); o a una concentración de 0.5 µg/mL (dilución 1:2000) si era de Cell Signaling o Sigma; la dilución se realizó en buffer TBS-T 1X y se incubó a 4 °C toda la noche. A continuación, se lavó la membrada tres veces con buffer TBS-T 1X, dejando en agitación 5 min por cada lavado; se realizó la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a HRP con una dilución 1:10000 en el buffer TBS-T 1X durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación. Al finalizar este paso, se realizan otros tres lavados de 5 min cada uno con buffer TBS-T 1X. El revelado de las proteínas se realizó con un kit de quimioluminiscencia de marca Millipore® o Thermo Scientific®. La señal se detectó con placas de autorradiografía sensibles al azul (Ver anexos).

El análisis de densitometría de las señales se realizó con el software de acceso libre ImageJ. Los datos de densitometría se indican en algunos Western Blots como veces de cambio respecto al control; en el caso de Western Blots de lisados totales, los datos están normalizados con respecto al control de carga.

### **3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis estadístico de los datos de densitometría obtenidos a partir de los resultados de Western Blot, utilizando la prueba t-Student de dos colas, considerando una diferencia estadísticamente significativa con un valor de  $P < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 LOS NIVELES DE LA PROTEINA SKI SON REGULADOS DIFERENCIALMENTE POR INHIBIDORES DE LA CINASA GSK3

Con el fin de estudiar el efecto de la cinasa GSK3 sobre la proteína SKI, se planteó evaluar si se presentaba algún cambio en la abundancia de SKI cuando se modula la actividad de GSK3. GSK3 se encuentra activa en ausencia de suero (Stambolic y Woodgett, 1994), por lo que se utilizó esta condición activa y se comparó al emplear inhibidores farmacológicos que bloquearan su actividad. La cinasa GSK3 participa en múltiples vías de señalización como Wnt, PI3K/Akt, mTOR y Hedgehog, entre otras; sin embargo, no se utilizaron ligandos que inhibieran la actividad de GSK3. Esto debido a que cada una de estas vías puede activar vías canónicas y no canónicas, de manera que activarían diversos mecanismos que dificultarían el análisis e interpretación de los resultados.

#### 4.1.1 Los inhibidores de GSK3: BIO y LiCl regulan de manera diferencial los niveles de SKI

Primero se analizaron los efectos de dos inhibidores farmacológicos de GSK3. Uno de los compuestos empleados fue BIO (6-bromoindirubina-3'-oxima), caracterizado por ser un inhibidor altamente selectivo que bloquea la actividad de la enzima de manera específica al unirse al sitio de unión a ATP (Panel A de la **Figura 1**) (Meijer *et al.*, 2003). El otro compuesto que se usó es LiCl, que aunque es un inhibidor inespecífico ha sido ampliamente usado en terapia para reducir la actividad de GSK3. El mecanismo de inhibición por litio consiste en bloquear la unión de Mg, un cofactor necesario para la actividad enzimática de GSK3, pero también induce la activación de Akt, que a su vez fosforila e inactiva a GSK3 en los residuos de Ser21 y de Ser9 de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente (Panel C de la **Figura 1**) (Ryves y Harwood, 2001; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999). En esta primera parte se realizaron tratamientos con cada uno de los inhibidores a diferentes intervalos de tiempo en la línea celular C9, que son hepatocitos de rata no transformados, y posteriormente se realizaron ensayos de Western blot para evaluar

los niveles de la proteína SKI y de otras proteínas de interés como  $\beta$ -catenina, que es un blanco de GSK3, y de la misma enzima GSK3.

En el Panel B de la **Figura 1** se muestra el resultado representativo de dos cursos temporales en los que se empleó el compuesto BIO. Como se observa en la inmunoprecipitación (IP) de SKI, así como en los lisados totales, los niveles de la proteína disminuyen alrededor de las 2 y 4 h de tratamiento, mientras que a las 24 h parece que el efecto se pierde y los niveles de SKI se recuperan. Esto posiblemente se debe a que el compuesto BIO tenga un tiempo de vida limitado dentro de las células, y que a tiempos largos sea metabolizado e inactivado. Es preciso mencionar que de las tres bandas que detecta el anticuerpo dirigido contra SKI, el efecto de degradación mediado por BIO es más notorio en la banda inferior, que corresponde a la isoforma de menor peso molecular. El hecho de que SKI disminuye cuando se inhibe la actividad de GSK3 llama mucho la atención, porque se esperaba que aumentaran sus niveles, tal como sucede con otras proteínas que son blanco directo de GSK3 (Taelman *et al.*, 2010).

De manera adicional, se analizaron los niveles de  $\beta$ -catenina y GSK3 $\beta$  (total) para confirmar la eficacia del inhibidor y verificar si hay algún efecto en la abundancia de la enzima. El análisis de  $\beta$ -catenina por WB representa un control para corroborar la eficacia del inhibidor, ya que se espera que sus niveles aumenten al inhibir a GSK3. Los resultados de WB (Panel B de la **Figura 1**) muestran que la  $\beta$ -catenina se detecta como una banda muy abundante del tamaño esperado (85 KDa) y otras bandas menos abundantes, con un menor peso molecular. Con respecto a la banda superior, se observó que no hay un cambio significativo en sus niveles, aún al revelar las placas fotosensibles a un menor tiempo de exposición. Mientras tanto, los niveles de las bandas inferiores sí cambian a lo largo del curso temporal, siendo más abundantes a las 2 h de tratamiento con BIO, pero a tiempos más largos la intensidad de la señal regresa a su estado basal, lo que sugiere nuevamente que el compuesto BIO es probablemente inactivado por las células. El WB de GSK $\beta$  (total) se realizó para verificar si existe o no un cambio en sus niveles; sin embargo, los resultados no muestran cambios significativos en sus niveles.

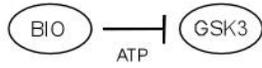
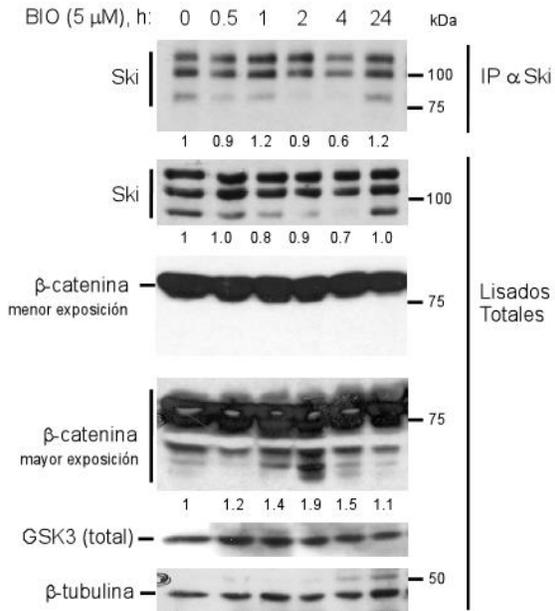
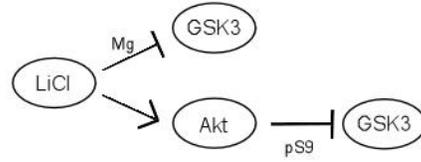
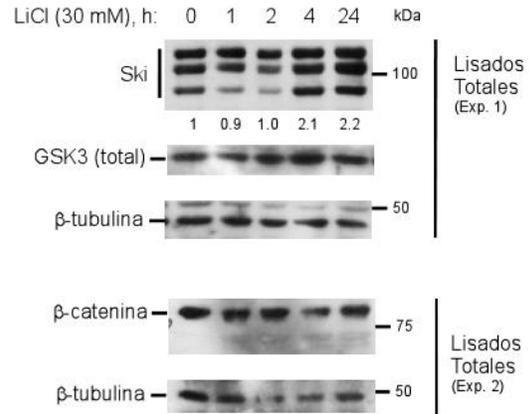
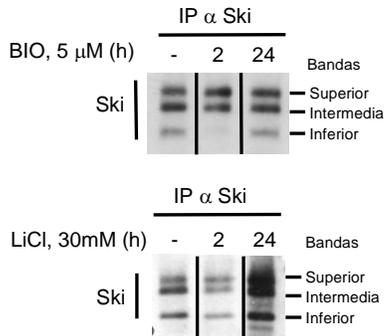
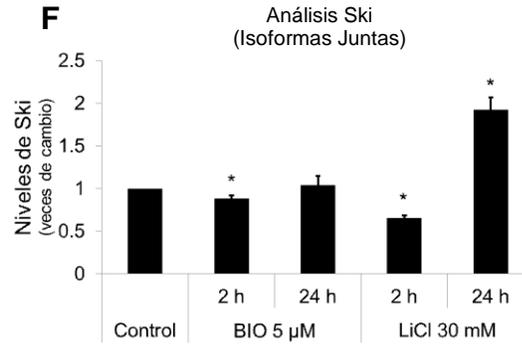
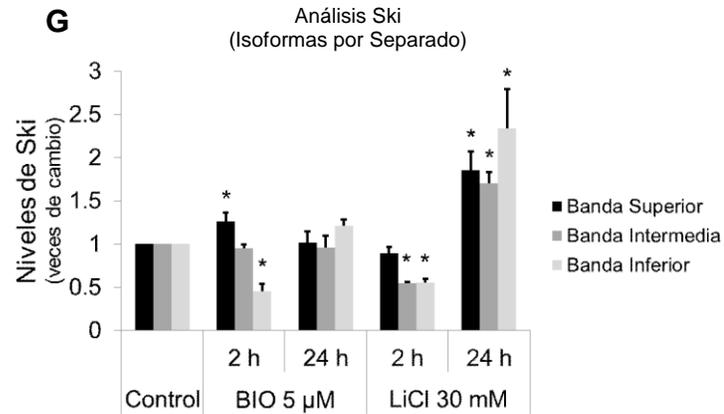
Respecto a los tratamientos con LiCl (Panel D de la **Figura 1**), se realizó otro curso temporal para analizar los niveles de las proteínas SKI,  $\beta$ -catenina y GSK3 $\beta$  (total). Los resultados muestran que a tiempos cortos (alrededor de las 2 h) los niveles de SKI

disminuyen, mientras que de manera inesperada se encontró que a tiempos largos (alrededor de 24 h) aumentan sus niveles casi al doble. Este resultado también es relevante debido a que el aumento de SKI a las 24 h difiere a la respuesta que se tiene, ya sea con BIO o con litio a las 2 h de tratamiento, lo cual sugiere que los efectos sobre la abundancia de SKI pueden ser dependientes de los mecanismos de acción de los inhibidores. Por esta razón se propuso estudiar con mayor detalle dichos mecanismos y sus efectos sobre la proteína SKI. Respecto al análisis de GSK3 y de  $\beta$ -catenina no se observa que haya un cambio significativo en sus niveles.

Los resultados de IP/WB de SKI fueron analizados por densitometría para observar los cambios en los niveles de la proteína; se eligieron los tiempos de 2 y 24 h de tratamiento, ya que son aquellos en los que se observaron los efectos más relevantes. En estos resultados también se observa que las tres isoformas de la proteína SKI (correspondientes a las tres bandas que se muestran en los resultados de Western Blot) responden de manera diferente a los tratamientos, por lo que en este análisis de densitometría se evaluaron dos aspectos: el cambio en los niveles totales de la proteína SKI, es decir, analizando las tres bandas en conjunto, y por otro lado, el cambio en cada una de las isoformas.

En el panel E de la **Figura 1** se muestra un resultado representativo de distintos experimentos independientes (en el pie de figura se indica cuantas réplicas de cada punto se analizaron), en que se indican los tratamientos y los tiempos evaluados, así como las isoformas correspondientes a la proteína SKI, denotadas según su peso molecular de cada una de las bandas: superior, intermedia e inferior. En el panel F de la **Figura 1** se muestran los cambios en los niveles de la proteína SKI al cuantificar a las tres isoformas en conjunto. Se observa que aunque BIO a las 2 h induce una ligera disminución en los niveles de SKI (disminución del 12 %) el cambio es estadísticamente significativo, mientras que no hay diferencia aparente entre la condición control y 24 h de tratamiento con BIO. El tratamiento de 2 h con litio promueve una disminución de los niveles de SKI, incluso en mayor grado que 2 h con BIO, pero a las 24 h con litio los niveles de SKI aumentan casi al doble del nivel basal. Aunado a esto, en el Panel G de la **Figura 1**, en que se analizan los cambios de cada una de las isoformas de SKI, se observa que con BIO a las 2 h de tratamiento, la isoforma de mayor peso molecular (correspondiente a la señal de la banda superior) se

enriquece ligeramente, la isoforma intermedia no tiene un cambio significativo, y la isoforma de menor peso disminuye considerablemente. Adicionalmente, la disminución de la banda inferior (Panel G) es más notoria que la disminución de la proteína total (Panel F) al tratar con BIO por 2 h. El tratamiento de BIO durante 24 h no presenta cambios significativos en los niveles de SKI. El tratamiento con LiCl por 2 h promueve una disminución de los niveles de SKI, principalmente de las bandas intermedia e inferior, mientras que a las 24 h las tres isoformas de SKI aumentan sus niveles. Este análisis por separado de las isoformas de SKI puede explicar por qué el efecto que se observa en la proteína total con el tratamiento de BIO por 2h es una ligera disminución con respecto al nivel basal. Con base en el análisis de estos datos, se demuestra que las diferentes isoformas de SKI responden de manera diferente a los tratamientos con BIO y LiCl.

**A****B****C****D****E****F****G**

**Figura 1. Los niveles de SKI se regulan diferencialmente al inhibir GSK3 con BIO o con LiCl.** A y C: Representación de los mecanismos de inhibición de los compuestos BIO y LiCl en la actividad de GSK3. B, D y E: Ensayos de Western blot de las proteínas SKI,  $\beta$ -catenina, GSK $\beta$  (total) y  $\beta$ -tubulina a partir de muestras obtenidas de inmunoprecipitados de la proteína SKI y de extractos totales de células C9, según se indique. Los números debajo de algunos Western blots indican las veces de cambio de la señal con respecto al control y en el caso de lisados totales están normalizadas con el control de carga. B: Curso temporal de BIO (5  $\mu$ M), resultados representativos de 2 experimentos independientes. D: Curso temporal de LiCl (30 mM), resultados representativos de 2 experimentos independientes, en este caso los WB de SKI y de GSK3 (total) corresponden a uno de los experimentos (Exp. 1) y el de  $\beta$ -catenina corresponde al otro experimento (Exp. 2), ambos con su respectivo control de carga ( $\beta$ -tubulina). E: Western blot representativo de SKI a partir de inmunoprecipitados de la proteína, correspondiente a los tratamientos con BIO y LiCl a las 2 y 24 h, las líneas negras entre cada carril indican que no son continuos. F y G: Gráficas de barras del promedio en las veces de cambio de los niveles de la proteína SKI con respecto al control, a partir de la señal de IP/WB, analizando la proteína total (D) o las tres isoformas por separado (E), réplicas analizadas: BIO (2 h), n=7; BIO (24 h), n= 3; LiCl (2 h), n=5; LiCl (24 h), n=8. \* $P < 0.05$  para una prueba de *t*-Student de dos colas.

#### **4.1.2 Los factores de crecimiento contenidos en el medio de cultivo con suero reprimen el efecto mediado por BIO y por LiCl sobre los niveles de SKI.**

Como consecuencia de que el uso de los inhibidores BIO y LiCl induce efectos diferentes sobre los niveles de SKI, se decidió explorar otras condiciones que regulan la actividad de GSK3. A continuación se propuso evaluar el efecto mediado por factores de crecimiento, ya que promueven la inhibición de GSK3 por fosforilación en la serina 9 (S9) por acción de cinasas como Akt, de manera similar al mecanismo mediado por LiCl. El experimento que se propuso consistió en evaluar si los efectos de BIO y LiCl son aditivos al emplear otra condición que inhiba a GSK3. Para esto, se realizaron tratamientos de BIO y litio en ausencia o presencia de suero, ya que el suero contiene factores de crecimiento que pueden inhibir la actividad de GSK3. Para esta condición las células se mantuvieron en

medio de crecimiento con FBS (Suero Fetal Bovino) al 10%. En estos experimentos también se decidió evaluar la abundancia de la forma pGSK3 (S9) para ver cómo se comporta bajo los diferentes tratamientos inhibitorios.

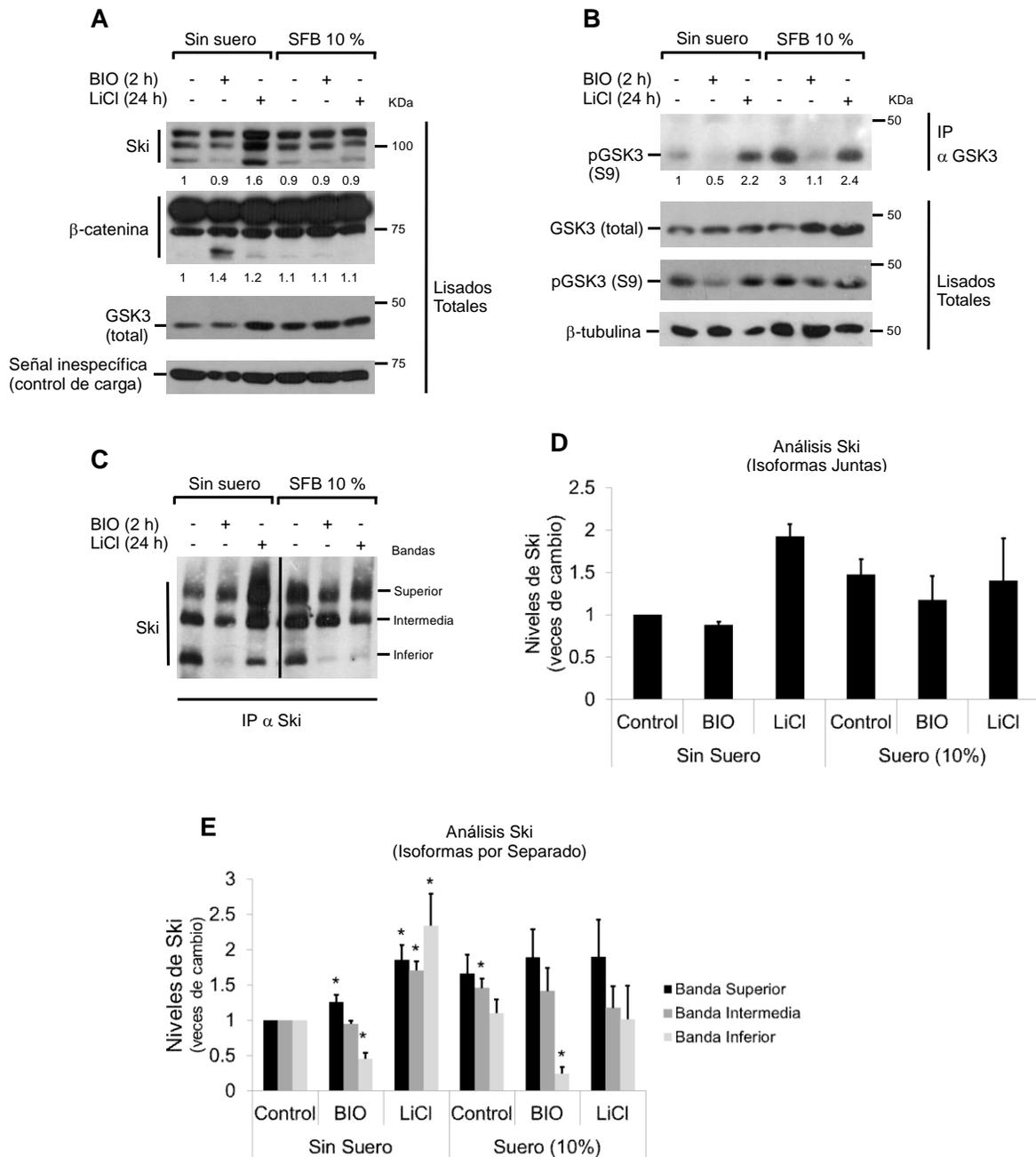
Como se muestra en la **Figura 2**, nuevamente se realizaron análisis de WB. En el Panel A se observa cómo cambian los niveles de SKI después de los tratamientos con BIO y LiCl en condiciones sin suero, corroborando que BIO promueve una disminución de SKI a las 2 h de estímulo (principalmente de la isoforma de menor peso molecular), y el tratamiento con LiCl la aumenta a las 24 h. Mientras tanto, en condiciones con suero los tratamientos de BIO y LiCl disminuyeron su efecto, ya que los niveles de SKI se mantuvieron cercanos a los niveles basales. En el mismo panel A (**Figura 2**) se muestra el WB de  $\beta$ -catenina, en donde se observa el mismo patrón de bandas que se describió anteriormente: una banda muy intensa en la parte superior (alrededor de 85 KDa) y varias bandas menos abundantes en la parte inferior. Como resultado, sólo con el tratamiento de BIO en medio sin suero aumenta la intensidad de la banda de menor peso molecular, pero no con el tratamiento con BIO en presencia de suero. Esto indica que a pesar de que tanto BIO como los factores de crecimiento contenidos en el suero sean inhibidores de GSK3, dichos factores de crecimiento afectan las acciones que BIO tiene sobre la estabilidad de  $\beta$ -catenina.

Por otro lado, al analizar a la proteína GSK3 total, se encontró que sus niveles no cambian considerablemente con los tratamientos (Panel A, **Figura 2**). Sin embargo, en un experimento independiente (Panel B, **Figura 2**) se analizó la forma inactiva pGSK3 $\beta$  (S9). Los resultados muestran que LiCl aumenta la forma pGSK3 $\beta$  (S9) en ausencia de suero; pero con suero los niveles de pGSK3 $\beta$  (S9) se encuentran elevados y el uso conjunto de litio y suero no aumenta la forma inactiva de la enzima, lo que sugiere que no hay un efecto aditivo entre estas dos condiciones. Por otro lado, BIO reduce la forma pGSK3 $\beta$  (S9) sólo en ausencia de suero, y esta respuesta se pierde al emplear suero. Estas observaciones nuevamente sugieren que los factores de crecimiento contenidos en el suero bloquean los efectos de ambos inhibidores, BIO y LiCl. Aunado a esto, en este mismo panel (Panel B, **Figura 2**), se analizaron tanto la inmunoprecipitación de GSK3 como los lisados totales, para descartar que el efecto de BIO no se deba a una disminución en los niveles de GSK3, ya que en los resultados de IP de GSK3 se observa que su señal es poco intensa en los

tratamientos en que se utilizó BIO, sin embargo los niveles de la proteína total se mantienen constantes en los extractos totales. Una posible explicación es que la unión de BIO a GSK3 modifique el plegamiento de la proteína, de manera que el anticuerpo utilizado para realizar la inmunoprecipitación no pueda reconocer a GSK3 en estas condiciones, pero sí la puede reconocer cuando la proteína se desnaturaliza al emplear SDS en los pasos de electroforesis.

En el panel C de la **Figura 2**, se muestra un resultado representativo del cambio en los niveles de SKI frente a los diferentes tratamientos con muestras de inmunoprecipitados de la proteína. Nuevamente, se trazaron gráficas de barras correspondientes a los promedios de veces de cambio para cada tratamiento indicado, analizando a la proteína SKI total (panel D, **Figura 2**) y a las isoformas de manera individual (panel E, **Figura 2**). En el panel D (**Figura 2**) resalta el hecho de que en condiciones con suero se reduce el efecto mediado por BIO y por LiCl, ya que la variación en los resultados es mayor y la diferencia entre los tratamientos no es significativa en comparación con las condiciones sin suero. En el panel E (**Figura 2**) se muestra que el tratamiento con BIO en condiciones de suero sí tiene un efecto significativo únicamente sobre la isoforma de menor peso molecular de SKI. Por otro lado, al analizar los niveles de SKI en las condiciones control, con y sin suero, se observa que no hay diferencias significativas entre estas dos condiciones, salvo por la isoforma intermedia, a pesar de que el promedio de los niveles de SKI es mayor en condiciones con suero que en su ausencia.

Estos resultados apoyan la propuesta de que la actividad de GSK3 es regulada por mecanismos distintos y que esta modulación a su vez tiene un impacto diferencial sobre la abundancia de SKI. Adicionalmente, al observar que LiCl y los factores de crecimiento contenidos en el suero aumentan la forma inactiva de GSK3, se sugiere que las condiciones que inducen la inhibición de GSK3 mediante fosforilación en su extremo amino pueden generar un aumento en la abundancia de SKI, sin embargo esto requiere comprobarse con otros experimentos.



**Figura 2. Factores de crecimiento contenidos en medio con suero reprimen el efecto mediado por BIO y por LiCl sobre los niveles de SKI.** A, B y C: Ensayos de Western blot de las proteína SKI,  $\beta$ -catenina, GSK $\beta$  (total), pGSK3 (S9) y  $\beta$ -tubulina (control de carga) en muestras de inmunoprecipitados de SKI o de GSK3 y de extractos totales de células C9, según se indique, con tratamientos de BIO (5  $\mu$ M) y LiCl (30 mM) en ausencia o presencia de suero (FBS 10%). A: Western blot de SKI,  $\beta$ -catenina y

GSK $\beta$  (total), la señal inespecífica (control de carga) se registró en el Western Blot de SKI, resultados representativos de 2 experimentos independientes. B: Western blot de GSK $\beta$  (total), pGSK3 (S9) y  $\beta$ -tubulina, resultados representativos de 2 experimentos independientes. C: Western Blot representativo de SKI a partir de inmunoprecipitados de la proteína bajo los tratamientos indicados, la línea negra en el centro indica que los carriles no son continuos. D y E: Gráficas de barras que representan el promedio de las veces de cambio en los niveles de la proteína SKI con respecto al control, analizando la proteína total (D) o las tres isoformas por separado (E), réplicas analizadas: BIO sin suero, n=7 y con suero, n=3; LiCl sin suero, n=8, y con suero, n=4; Control con suero, n=4. \* $P < 0.05$  para una prueba de  $t$ -Student de dos colas.

#### **4.1.3 La disminución de los niveles de SKI es independiente de los cambios en la abundancia de $\beta$ -catenina**

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento, se sugiere que diferentes mecanismos de inhibición de la cinasa GSK3 pueden tener un impacto diferencial sobre los niveles de la proteína SKI. Al comprar con lo que se ha reportado, se encontró un estudio realizado por Ding *et al.* (2000), en donde proponen que hay dos fracciones de GSK3 que son reguladas por mecanismos independientes y los efectos sobre sustratos de GSK3 varían de acuerdo a qué mecanismo se esté activando. En ese trabajo muestran que al inhibir a GSK3 por activación de la vía Wnt, la  $\beta$ -catenina es estabilizada, pero no hay efecto sobre la enzima glucógeno sintasa (GS), otro blanco de GSK3 que se esperaba que se activara al inhibir a GSK3. El otro mecanismo de inhibición de GSK3 que se caracterizó (Ding *et al.*, 2000) está dado por la vía PI3K/Akt activada con insulina, que induce la forma inactiva pGSK3 (S9), como resultado solo observaron una activación de la enzima GS, pero no un aumento en los niveles de  $\beta$ -catenina.

Al correlacionar estos antecedentes con los resultados que se han obtenido hasta ahora en este proyecto, se demuestra que el inhibidor BIO tiene un efecto sobre los niveles de  $\beta$ -catenina y parece mimetizar la vía Wnt, mientras que el LiCl y los factores de crecimiento contenidos en el suero generan una respuesta semejante a la de la insulina al promover la forma inactiva de la enzima y no alterar los niveles de  $\beta$ -catenina. Por esta

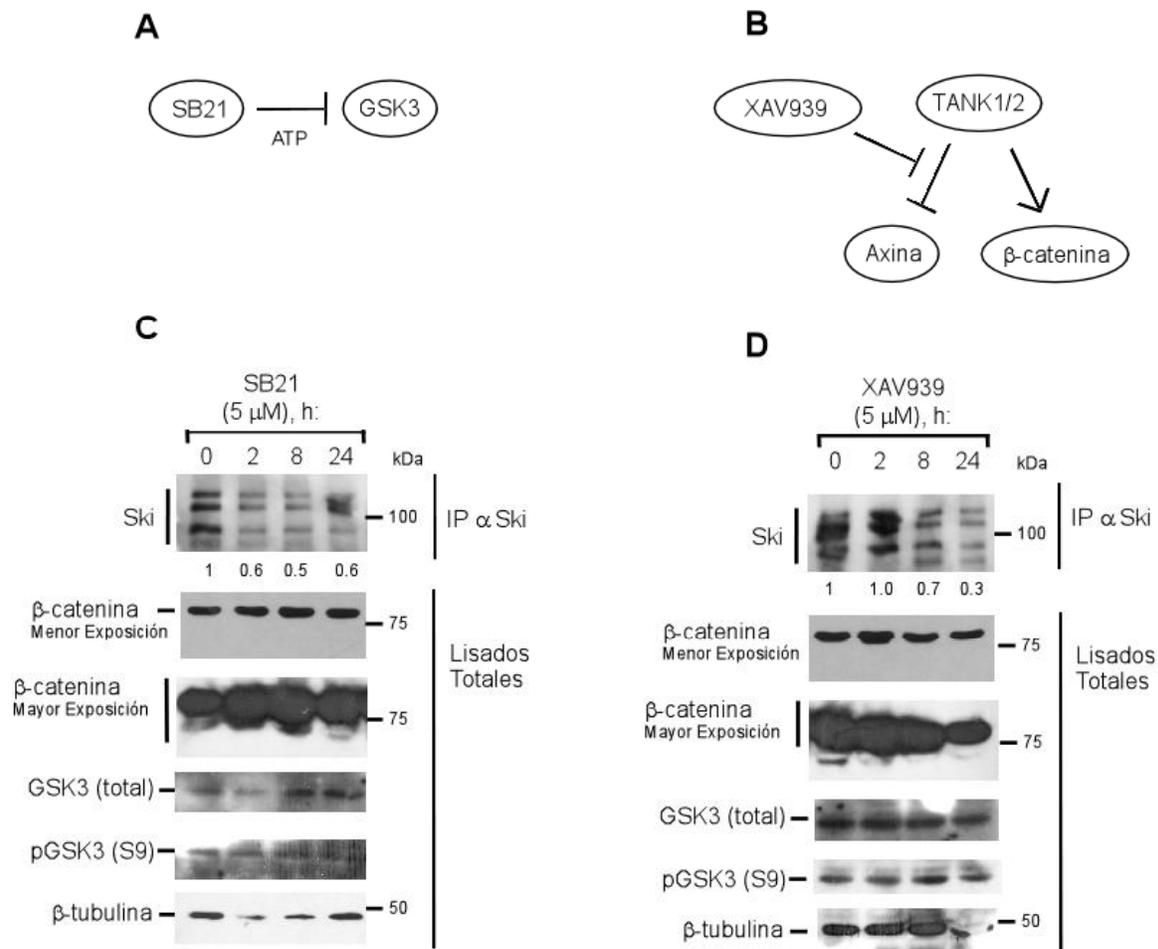
razón, en los siguientes experimentos, se planteó corroborar si hay cambios en los niveles de la proteína SKI al regular la fracción de GSK3 que está asociada a la vía Wnt, con el fin de corroborar los efectos observados con el uso del compuesto BIO.

Para esto, se realizaron tratamientos con otros dos compuestos, uno es el SB216763 (por simplicidad se denotará SB21), que también inhibe a GSK3 mediante el bloqueo del sitio de unión de ATP (Panel A, **Figura 3**) (Coghlan *et al.*, 2000). Al usar SB21 se espera que tenga una respuesta similar a BIO, es decir, que disminuya la abundancia de SKI y que aumente la abundancia de  $\beta$ -catenina.

El otro compuesto empleado es XAV939, un inhibidor de las enzimas tankirasas, que promueve la estabilidad de axina, uno de los componentes del complejo proteico de destrucción de la vía Wnt, y por lo tanto tiene un efecto inhibitorio sobre la misma vía al promover la degradación de  $\beta$ -catenina (Panel B, **Figura 3**) (Huang *et al.*, 2009). Cabe mencionar que las tankirasas TANK1/2 (isoformas 1 y 2) son enzimas que añaden grupos de ADP-ribosa sobre residuos de ácido glutámico en sus proteínas blanco. Esta modificación postraducciona (PTM) se conoce como PARsilación (Poli-ADP-Ribosilación), y en el caso de axina esta modificación constituye una marca para ser reconocida por el sistema de degradación ubiquitina-proteosoma (Riffel *et al.*, 2012). El inhibidor XAV939 se empleó con el fin de determinar si la vía Wnt/ $\beta$ -catenina influye en la regulación de SKI. Este planteamiento surge de la idea de que BIO mimetiza la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, por lo que la disminución que se observa de SKI podría ser consecuencia de mecanismos que ocurren río abajo de la inhibición de GSK3 y del aumento de  $\beta$ -catenina. Por esto, se espera que el uso de XAV939 aumente los niveles de SKI.

En el panel C de la **Figura 3** se muestran los resultados de los tratamientos con SB21 a diferentes tiempos. Los niveles de SKI disminuyen por estos tratamientos, mientras que  $\beta$ -catenina muestra un aumento. Aunado a esto, los niveles de GSK3 total y de su forma fosforilada en S9 se mantienen estables con los tratamientos, lo que descarta que SB21 tuviera algún efecto sobre la abundancia de GSK3. Estos resultados son semejantes a los que se obtienen cuando se utiliza BIO, y sugieren que la fracción de GSK3 que es blanco de estos inhibidores favorece la abundancia de SKI.

Por otro lado, en el Panel D de la **Figura 3** se presentan los resultados de los experimentos con el tratamiento con XAV939 a diferentes tiempos. De manera opuesta a lo esperado, se observa que los niveles de SKI disminuyen. Los niveles de  $\beta$ -catenina también disminuyen, lo cual era de esperarse ya que la inhibición de las tankirasas promueve su degradación. Los niveles de GSK3 total y pGSK3 (S9) no cambian con los tratamientos. Estos resultados sugieren que la fracción de GSK3 asociada a Wnt no requiere del aumento de  $\beta$ -catenina para regular los niveles de SKI; sin embargo el efecto de XAV939 sobre SKI puede ser a causa de otro mecanismo en que participen las tankirasas.



**Figura 3. La disminución de SKI es independiente a la regulación de  $\beta$ -catenina.** A y B: Representación de los mecanismos de acción de los compuestos SB216763 y XAV939. C y D: Ensayos de Western blot de las proteínas SKI,  $\beta$ -catenina, GSK $\beta$

(total), pGSK3 (S9) y  $\beta$ -tubulina en muestras de inmunoprecipitados de la proteína SKI y de extractos totales de células C9, según se indique. A: Tratamientos con SB216763 (5  $\mu$ M). B: Tratamientos con XAV939 (5  $\mu$ M). Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

## **4.2 NO SE OBSERVA UNA INTERACCIÓN ENTRE SKI Y GSK3**

### **4.2.1 La formación del complejo SKI/GSK3 no fue detectada mediante inmunoprecipitación/Western blot (IP/WB)**

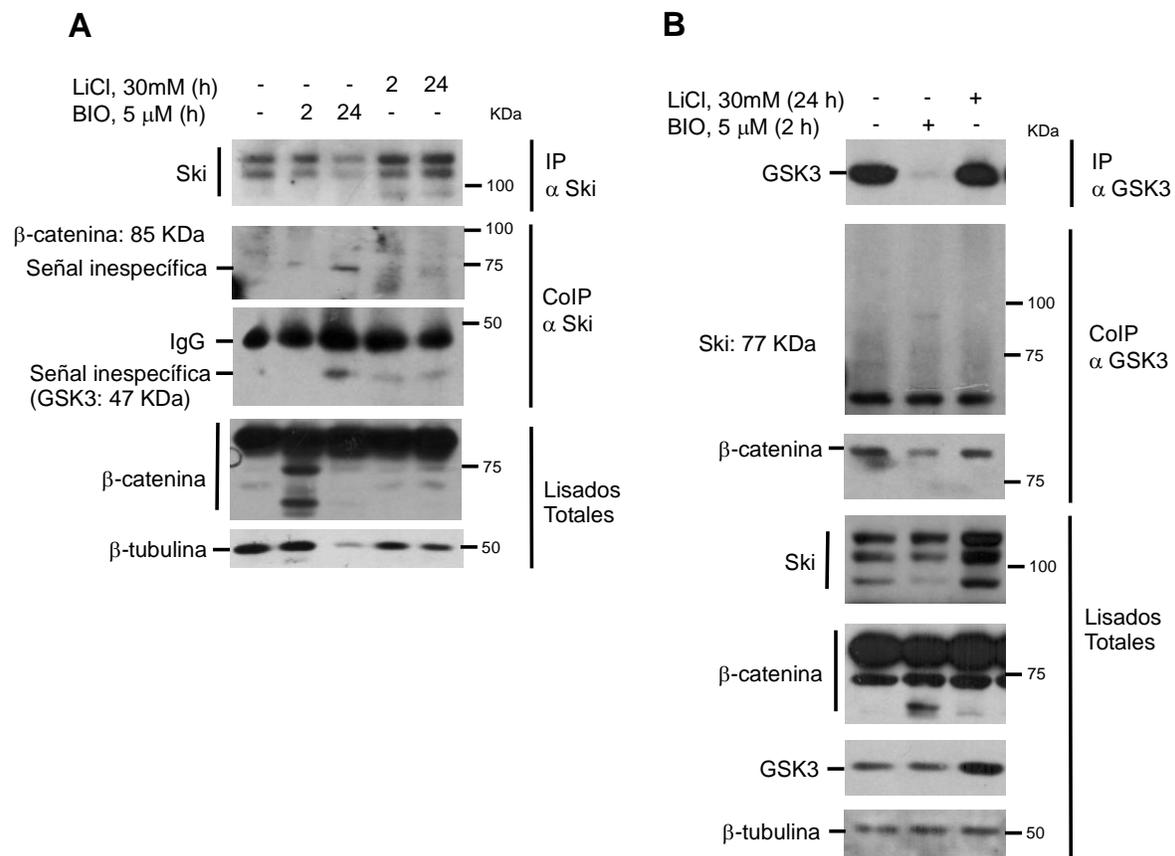
Debido a que el uso de inhibidores de GSK3 no permite concluir si SKI es sustrato o no de GSK3, se planteó identificar si SKI forma algún complejo con GSK3. Esto podría sugerir o descartar que GSK3 regule o no de manera directa a SKI, a pesar de que algunos datos previos sugieren que la regulación es indirecta.

Para estudiar esto, se decidió utilizar el ensayo de IP/WB, usando anticuerpos específicos anti-GSK3 y anti-SKI. Se analizó por un lado si GSK3 se identifica en la Co-IP (co-inmunoprecipitación) con SKI y viceversa, es decir, si SKI se observa en la Co-IP con GSK3. En ambos casos se realizaron tratamientos con los inhibidores BIO y LiCl debido a que son las condiciones que están modulando la estabilidad de SKI de manera diferencial y cuyo mecanismo nos interesa estudiar.

Como se muestra en la **Figura 4** Panel A, en la IP de SKI se realizó un blot de GSK3, pero la señal que se alcanza a observar resulta ser inespecífica debido a que esta señal se detectó en el WB de SKI que se realizó previamente en la membrana. En la IP de SKI también se buscó a  $\beta$ -catenina con el fin de encontrar otra posible interacción, pero tampoco se observó su señal; solamente se distingue una posible señal inespecífica con los tratamientos con BIO, ya que la banda observada tiene un peso menor a 75 KDa. En cambio, en los lisados totales las señales de  $\beta$ -catenina sí son claras, ya que se aprecia nuevamente una banda muy intensa en la parte superior y otras menos intensas en la parte inferior.

En el panel B de la **Figura 4**, se observa que al analizar la Co-IP de GSK3, en el WB de SKI hay una banda muy tenue por debajo de 100 KDa en el punto que corresponde al tratamiento con BIO, sin embargo esta señal no se aprecia en otras repeticiones del experimento y se descarta que corresponda a SKI. Con excepción de este caso, en la Co-IP de GSK3 la señal de SKI no aparece, pero sí la de  $\beta$ -catenina, que representa un control de que esta proteína sí se encuentra asociada a GSK3.

Cabe resaltar que en la IP de GSK3 (Panel B, **Figura 4**), el WB muestra una disminución en los niveles de GSK3 al tratar con BIO, mientras que en lisados totales los niveles de esta proteína no varían significativamente, lo cual nuevamente sugiere que BIO altera a la enzima de manera que no es detectada por el anticuerpo correspondiente al momento de hacer la inmunoprecipitación.



**Figura 4. La inmunoprecipitación de SKI y de GSK3 indica que no hay interacción entre estas proteínas. A y B: Ensayos de Western blot de las proteínas SKI,  $\beta$ -catenina,**

GSK $\beta$  (total), y  $\beta$ -tubulina en muestras de inmunoprecipitados de SKI o de GSK3 y de extractos totales de células C9 con tratamientos con BIO (5  $\mu$ M) y LiCl (30mM) según los tiempos indicados. A: Inmunoprecipitación de SKI y búsqueda en la Co-IP de  $\beta$ -catenina y GSK3, resultados representativos de 2 experimentos independientes. B: Inmunoprecipitación de GSK3 y búsqueda en la Co-IP de SKI,  $\beta$ -catenina y GSK3, resultados representativos de 2 experimentos independientes. En los Western blots en que no se encontró la señal esperada solamente se indica la proteína y el peso que se esperaba detectar.

### **4.3 MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA SKI POR EL TRATAMIENTO CON LOS INHIBIDORES BIO Y LiCl**

Debido a que los resultados anteriores sugieren que los efectos mediados por BIO y LiCl sobre SKI involucran la participación de componentes intermediarios entre GSK3 y SKI, se planteó estudiar si estos cambios sobre SKI son dependientes de otros mecanismos ya conocidos que regulan su estabilidad, como serían la vía del TGF- $\beta$ , la dinámica del citoesqueleto de actina, y la síntesis y degradación general de las proteínas, entre otros.

A continuación se presentan sólo los resultados en que se evaluó la interacción con la vía del TGF- $\beta$ . Esto debido a que parte de los objetivos de este proyecto incluyen ver cómo repercute la interacción entre GSK3 y SKI en la vía del TGF- $\beta$ , que a su vez pueda mediar alguna respuesta celular en el contexto hepático. En cuanto a la participación de los otros mecanismos mencionados, aún no se han explorado detalladamente y quedarían contemplados dentro de las perspectivas de este proyecto.

#### **4.3.1 SKI es regulada por diferentes inhibidores de GSK3 de manera independiente a la vía del TGF- $\beta$**

La vía del TGF- $\beta$  induce la degradación de SKI vía el proteosoma, y este mecanismo requiere que SKI se asocie a las proteínas pSmad2/3 (forma activa), que a su vez reclutan a

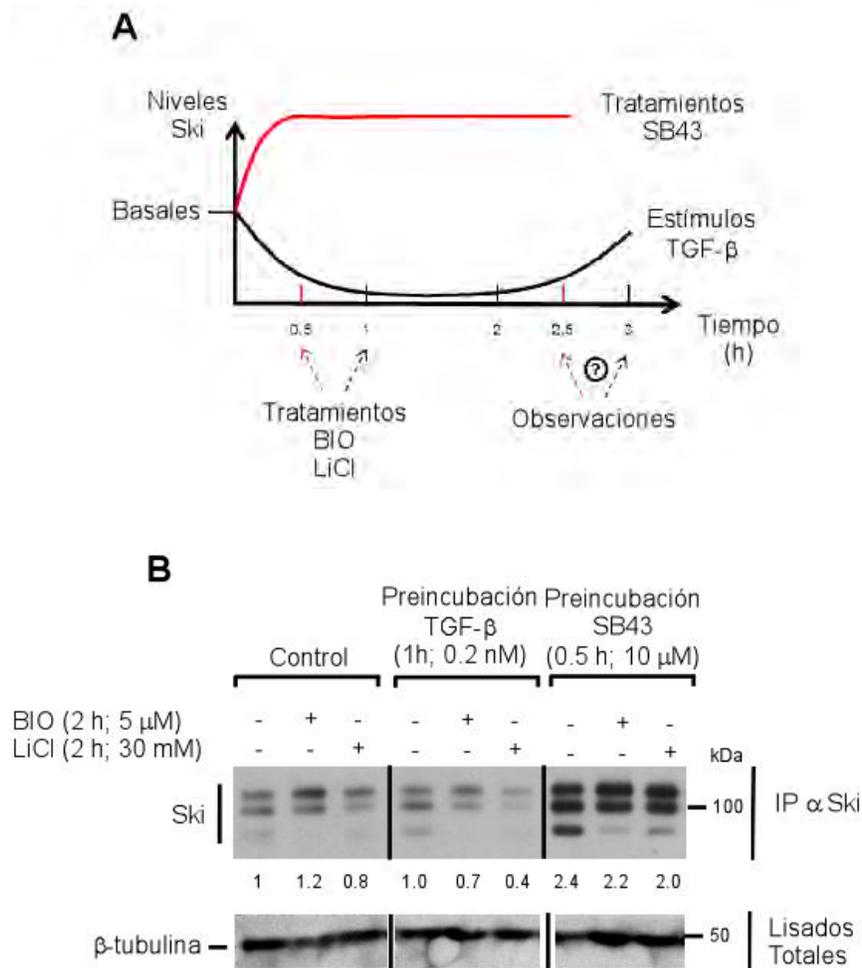
ligasas de Ubiquitina E3 (Nagano *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 1999b). Por lo tanto, se planteó evaluar si la disminución en los niveles de SKI promovida por los inhibidores BIO y LiCl (a tiempos cortos) requiere también de la presencia de pSmad2/3. Esto sugeriría que GSK3 bloquea la formación del complejo SKI/Smad2/3, y por tanto estaría contribuyendo a mantener o aumentar los niveles de SKI. Para esto, se empleó SB431542, un inhibidor del receptor ALK5 (receptor tipo I de TGF- $\beta$ ), que inhibe la fosforilación de Smad2/3. En el panel A de la **Figura 5** se muestra una curva (color rojo) de cómo varían los niveles de SKI con el uso de SB43, así como los tiempos de incubación de los tratamientos realizados.

Por otro lado, también se realizaron estímulos con TGF- $\beta$  para activar la vía y comparar los efectos cuando se usan los inhibidores de GSK3. La finalidad de este experimento es evaluar dos mecanismos que regulan los niveles de SKI y ver cuál de sus efectos predomina sobre el otro. GSK3 interacciona con algunas isoformas Smad y las fosforila, ya sea para inducir su degradación o para activar mecanismos no canónicos, por lo que puede interferir en la vía del TGF- $\beta$ . En el Panel A de la **Figura 5**, se representa cómo cambian los niveles de SKI en respuesta a TGF- $\beta$  (curva color negro) en células C9. El TGF- $\beta$  induce la degradación de SKI tras un estímulo de 1 h, mientras que después de 3 h se recuperan sus niveles (Vázquez-Victorio *et al.*, 2015a; Caligaris *et al.*, 2015). El mecanismo que involucra la recuperación de SKI no se conoce, sin embargo se sabe que la fracción de SKI que se recupera se acumula en vesículas ricas en balsas lipídicas (Vázquez-Victorio *et al.*, 2015a). En este experimento se evaluaron los niveles de SKI al realizar estímulos de 3 h totales con TGF- $\beta$ , tiempo en el cual los niveles de SKI se recuperan (Panel A, **Figura 5**). Los tratamientos con los inhibidores BIO o LiCl fueron de 2 h, pero se añadieron a las células cuando llevaban 1 h de preincubación con TGF- $\beta$ . Con este experimento se pretende evaluar si la acción de los inhibidores de GSK3 impiden la recuperación de los niveles de SKI aun en presencia del TGF- $\beta$ , lo que sugeriría que GSK3 actúa por un mecanismo independiente a la vía del TGF- $\beta$ .

En el panel B de la **Figura 5** se muestran los resultados de los experimentos. Se observa que 3 h de tratamiento con TGF- $\beta$  (carril 4, en que sólo se indica 1 h de preincubación, pero al considerar las 2 h de los tratamientos son 3 h totales de estímulo), mantiene los niveles de SKI en un valor similar a las condiciones basales. El tratamiento con SB43, el inhibidor de TGF- $\beta$  (carril 7), induce un aumento en la abundancia de SKI.

Por otro lado, el uso tanto de BIO como de LiCl inducen una disminución de SKI, independientemente de si las células se preincubaron con TGF- $\beta$  o con el inhibidor SB43.

Estos resultados indican que la fracción de GSK3 regulada por BIO y LiCl (a tiempos cortos) mantiene o aumenta los niveles de SKI, pero este efecto no depende de que las proteínas Smad2/3 estén activas, como se observa con el uso de SB43. Por otro lado, la disminución de SKI promovida por BIO y Litio cuando se activa la vía del TGF- $\beta$  puede sugerir que GSK3 mantiene o aumenta los niveles de SKI por un mecanismo independiente a la vía, ya que a pesar de que la vía se encuentra activa, la inhibición de GSK3 mantiene los niveles de SKI disminuidos. Sin embargo, otra interpretación es que la actividad de GSK3 puede ser necesaria para restablecer los niveles de SKI cuando se estimulan las células por 3 h con TGF- $\beta$  y que al inhibir su actividad no hay una recuperación en los niveles de SKI. Esta interpretación aun requeriría comprobarse, ya que se desconoce el mecanismo por el cual el TGF- $\beta$  induce la recuperación de SKI. Lo que sí es claro en los resultados es que la regulación mediada por los inhibidores de GSK3, BIO y litio, es independiente a la regulación ejercida por la vía del TGF- $\beta$ , ya que dichos inhibidores siguen promoviendo la disminución de los niveles de SKI independientemente de que la vía del TGF- $\beta$  esté activa o inhibida.



**Figura 5. Los compuestos BIO y LiCl promueven la degradación de SKI por mecanismos independientes a la vía del TGF- $\beta$ .** A: Gráfica que representa el cambio en los niveles de Ski cuando se tratan las células C9 a diferentes tiempos con TGF- $\beta$  o con SB43; las flechas y líneas negras corresponden a los experimentos con TGF- $\beta$ ; y las rojas corresponden a los experimentos con SB43. B: Ensayos de Western blot de las proteínas SKI y  $\beta$ -tubulina en muestras de inmunoprecipitados de SKI y de extractos totales de células C9 con tratamientos con BIO (5  $\mu$ M), LiCl (30 mM), TGF- $\beta$  (0.2 nM) y SB43 (10 $\mu$ M) según se indica. Las líneas negras entre carriles indican que no son continuos. Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

## 5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como planteamiento inicial de este proyecto se propuso investigar si la proteína SKI era un sustrato directo de la cinasa GSK3, de manera que regulara su abundancia. Como estrategia experimental se emplearon diferentes inhibidores farmacológicos de GSK3 que bloquean su actividad mediante distintos mecanismos, y se evaluaron los niveles de la proteína SKI en respuesta a estos tratamientos.

Los inhibidores empleados fueron los compuestos BIO, SB216763 y LiCl. El compuesto BIO (6-bromoindirubina-3'-oxima) es un compuesto derivado de indirubinas, es permeable a la membrana celular, y actúa como un inhibidor altamente selectivo de la cinasa GSK3 al unirse al sitio de unión a ATP dentro del dominio catalítico de la enzima (Meijer *et al.*, 2003). SB216763 es también un inhibidor específico de GSK3 que se une al sitio de unión a ATP (Coghlan *et al.*, 2000), de la misma forma en que BIO actúa. Sin embargo, BIO tiene una constante de inhibición ( $IC_{50} = 0.005 \mu\text{M}$ ; Meijer *et al.*, 2003) menor a SB21 (  $IC_{50} = 0.034 \mu\text{M}$ ; Coghlan *et al.*, 2000) y por tanto se espera que BIO sea más efectivo. El litio es menos específico para inhibir a GSK3 ( $IC_{50} = 2000 \mu\text{M}$ ; Klein y Melton, 1996), sin embargo los compuestos de litio se utilizan frecuentemente en la terapia de desórdenes y enfermedades mentales por su capacidad de inhibir a esta enzima (Freland y Beaulieu, 2012; Lazzara y Kim, 2015). Litio inhibe a GSK3 al competir directamente con el sitio de unión a  $Mg^{2+}$ , un cofactor necesario para la actividad enzimática (Ryves y Harwood, 2001), y de manera indirecta, el litio activa a Akt lo cual resulta en la fosforilación de GSK3 en la Ser9, y con esto GSK3 adquiere una conformación inactiva (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999). La cinasa Akt se inactiva al formar un complejo con  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -Arr2) y con la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A por sus siglas en inglés), PP2A defosforila e inactiva a Akt. La formación de este complejo requiere de  $Mg^{2+}$ , por lo que Litio desestabiliza la formación del complejo al competir con  $Mg^{2+}$  (Beaulieu *et al.*, 2008). A diferencia de BIO, Litio no es específico de GSK3 y también afecta la actividad enzimática de otras proteínas que dependen de  $Mg^{2+}$  como cofactor; entre estas proteínas se encuentran la ciclooxigenasa (COX), la  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -Arr2), la bifosfato-3'-nucleotidasa (BPNT), y las monofosfatasas de inositol (IMPAs), entre otros (Freland y Beaulieu, 2012; Lazzara y Kim, 2015).

Los resultados muestran que BIO, SB21 y LiCl (a tiempos cortos de tratamiento, es decir, al rededor de 2h) inducen una disminución de SKI, lo cual contrasta con lo que se esperaba. Esto debido a que muchos de los sustratos de la cinasa GSK3 son fosforilados para luego ser degradados vía el proteosoma, y al inhibir la actividad de GSK3 se promueve la estabilidad general de sus sustratos (Kim *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Taelman *et al.*, 2010; Acebron *et al.*, 2014). Por tanto, los resultados sugieren que GSK3 induce la degradación de algún componente intermediario que pudiera estabilizarse al inhibir a GSK3 y promover a su vez la disminución de SKI. Por otro lado, el tratamiento de LiCl a tiempos largos (24 h) sí promueve un aumento en los niveles de SKI. Este resultado también es relevante porque difiere de la respuesta mediada por el mismo litio a tiempos cortos o por los otros inhibidores BIO y SB21, además de que sí sugiere que SKI pueda ser blanco de GSK3 debido a que en este caso sí aumentan sus niveles. A pesar de esto, los resultados no permiten concluir si SKI es o no un blanco de GSK3.

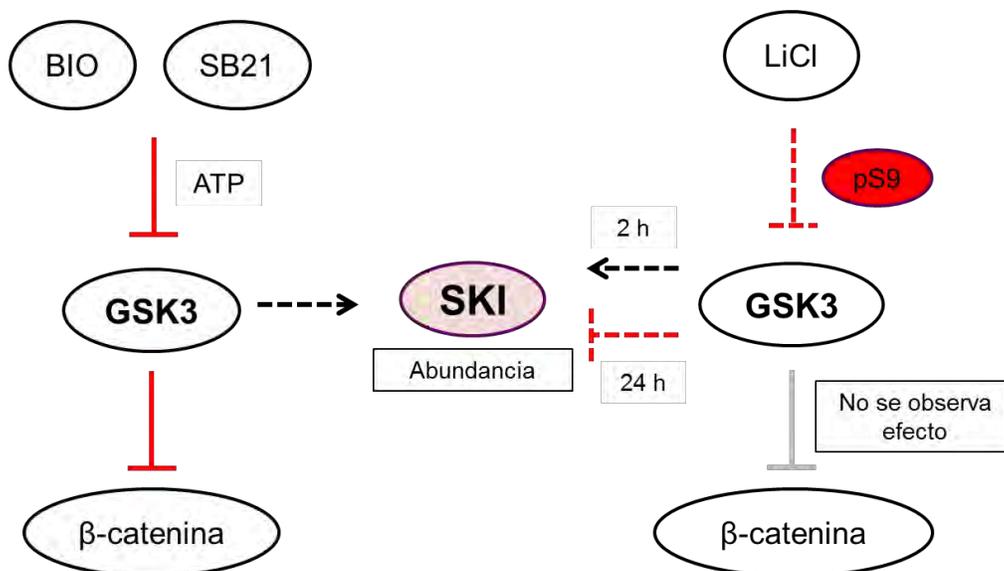
El análisis de la abundancia de  $\beta$ -catenina (sustrato de GSK3) y de la forma inactiva pGSK3 (S9) permitió evaluar si los inhibidores son efectivos bajo las condiciones en que se emplearon, ya que al generar distintas respuestas en los niveles de SKI surge la duda de si realmente están inhibiendo a GSK3. La efectividad en el uso de BIO y de SB21 se corrobora por el aumento de los niveles de  $\beta$ -catenina, pero no ejercen cambios en la forma pGSK3 (S9). Mientras tanto, LiCl también inhibe a GSK3, pero esto se confirma por un aumento de pGSK3 (S9), y no por cambios en la abundancia de  $\beta$ -catenina, ya que no se observó algún aumento en sus niveles. Sin embargo, una propuesta para corroborar la inactivación de GSK3 es medir directamente su actividad.

Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta que generan los inhibidores de GSK3 puede ser dependiente de los mecanismos a través de los cuales inhiben a la enzima o de efectos secundarios ejercidos por los mismos inhibidores.

Respecto a la diferencia entre mecanismos de inhibición de GSK3, en el trabajo de Ding *et al.* (2000) se propone que hay dos fracciones de GSK3 reguladas por mecanismos independientes: la vía Wnt y la vía de PI3K/Akt activada por insulina. De acuerdo al mecanismo que se active, se observan efectos distintos sobre los sustratos  $\beta$ -catenina y glucógeno sintetasa (GS). Cuando Wnt se activa,  $\beta$ -catenina se estabiliza, pero no hay cambios en la actividad de GS; mientras que al utilizar insulina, GS se activa, pero no se

observa un aumento en la estabilidad de  $\beta$ -catenina. Los resultados obtenidos con los inhibidores BIO, SB21 y litio pueden correlacionarse con la propuesta de Ding *et al.* (2000). Al observar que BIO y SB21 aumentan los niveles de  $\beta$ -catenina, se sugiere que mimetizan los efectos de la vía Wnt, lo cual también es apoyado por diversos estudios en que se utilizan inhibidores farmacológicos de GSK3 como estrategia para activar esta vía (Stambolic *et al.*, 1996; Wu y Pan, 2010). Adicionalmente, la fracción de GSK3 asociada a la vía Wnt no es regulada por fosforilación en S9 (Beurel *et al.*, 2015). Respecto a los resultados obtenidos con LiCl a tiempos largos, la abundancia de pGSK3 (S9) promovida por este compuesto sugiere que está actuando sobre la fracción de GSK3 que se regula por la vía PI3K/Akt, ya que se sabe que LiCl puede activar a Akt (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999). A pesar de que no se evaluó la actividad de GS, al usar LiCl no se detectó un aumento de  $\beta$ -catenina, apoyando hasta cierto grado la propuesta de los mecanismos diferenciales que inhiben a GSK3 (Ding *et al.* 2000).

Este planteamiento de que hay distintas fracciones de GSK3 reguladas por mecanismos independientes resulta interesante, ya que puede sugerir que SKI sea sensible a ambas pozas de GSK3, pero además que es regulada de manera distinta por cada fracción de la enzima (**Esquema 5.1**). De tal forma que se sugiere que la fracción de GSK3 que es regulada por BIO y SB21 mantiene o aumenta los niveles de SKI, mientras que la fracción de GSK3 regulada por litio disminuye a SKI a tiempos largos, pero a tiempos cortos también aumenta a SKI.



**Esquema 5.1. Los niveles de SKI responden de manera diferente al mecanismo de por el cual se inhibe la actividad de GSK3.** Esquema que muestra los dos mecanismos que regulan la actividad de GSK3 mediados por los inhibidores BIO y SB21, o por LiCl. Se proponen dos fracciones de GSK3 que regulan diferencialmente la abundancia de SKI. Las flechas negras ( $\uparrow$ ) indican un efecto positivo en la abundancia de la proteína, las flechas rojas con extremo romo ( $\dashv$ ) indican inactivación de enzimas o reducción en la abundancia de proteínas, las flechas grises con extremo romo indican un efecto inhibitorio que no está presente en el mecanismo de regulación de GSK3, pero que sí se presenta en el otro mecanismo mostrado; las flechas de línea continua indican un efecto directo y las flechas con línea discontinua indican un efecto que puede ser mediado por mecanismos intermediarios.

Otra propuesta que explica las diferentes repuestas generadas por los inhibidores de GSK3 sobre los niveles SKI, es que dichos inhibidores interaccionen con otros blancos inespecíficos, denominados *off-targets*. Un ejemplo de esto se observa en el trabajo de Kirby *et al.* (2012), en donde se emplean diferentes inhibidores de GSK3 para evaluar su capacidad de mantener células troncales embrionarias de ratón (mESC) en un estado pluripotente, y observan que a pesar de que SB21 es un inhibidor menos específico que BIO, es más efectivo para mantener a estas células en estado pluripotente y evitar su diferenciación.

De manera similar, BIO que es el inhibidor con mayor grado de especificidad para inhibir a GSK3 que se utilizó en los experimentos, es el que reduce en menor medida los niveles de SKI (disminución de 12 %), en comparación con SB21 (disminución de 35 %) y LiCl (disminución de 35 %), que son inhibidores menos específicos.

Debido a esto, se realizó una investigación bibliográfica de posibles *off-targets* de los inhibidores de GSK3. La información recabada se muestra en la **Tabla 5.1**, en que se comparan los valores de IC<sub>50</sub> (Concentración Inhibitoria 50) de los inhibidores con otras enzimas o el porcentaje de actividad remanente de la enzima al utilizar el inhibidor, según se indique. La IC<sub>50</sub> indica la concentración a la cual el fármaco inhibe a la enzima a la mitad de la respuesta total y refleja de manera cuantitativa la efectividad de una sustancia de inhibir algún proceso biológico, en este caso particular refleja la efectividad de los inhibidores de cinasas sobre su actividad enzimática. Los *off-targets* que aparecen en la tabla son aquellos que se reportaron con valores muy bajos de IC<sub>50</sub>, cercanos a la IC<sub>50</sub> para GSK3, o también se incluyen *off-targets* con porcentajes de actividad remanente baja. La mayoría de estos *off-targets* son cinasas dependientes de ciclina (CDKs) debido a que el sitio activo de GSK3 y de las CDKs es similar. Inclusive, algunos derivados de indirrubinas inhiben tanto a GSK3 como a CDKs (Leclerc *et al.*, 2001). BIO a pesar de que es altamente selectivo para GSK3 (Meijer *et al.*, 2003) posiblemente podría interaccionar también con algunas CDKs.

**Tabla 5.1 Efecto de los inhibidores BIO, SB216763 y litio sobre la actividad de diferentes enzimas.**

Inhibidor	Especie Química	Enzima blanco	IC <sub>50</sub> (μM) o Porcentaje de Actividad Remanente*	Referencias
BIO	Derivado de indirrubina	GSK3α/β CDK5/p25 CDK2/Ciclina A CDK1/Ciclina B	IC <sub>50</sub> = 0.005 IC <sub>50</sub> = 0.085 IC <sub>50</sub> = 0.30 IC <sub>50</sub> = 0.32	Meijer <i>et al.</i> , 2003
SB21	Derivado de Maleimida	GSK3 CDK1/Ciclina B DYRK1A SRPK1 ERK8 HIPK2 PIM3 CDK2/Ciclina A	IC <sub>50</sub> = 0.034; 2 ± 2 % IC <sub>50</sub> = 0.550 8 ± 4 % 16 ± 1 % 12 ± 1 % 15 ± 1 % 29 ± 7 % 52 ± 5 %	Coghlan <i>et al.</i> , 2000; Meijer <i>et al.</i> , 2004; Bain <i>et al.</i> , 2007
Litio	Catión	GSK3 SmMLCK HIPK3 IKKε	IC <sub>50</sub> = 2000; 30 ± 4 % 43 ± 6 % 50 ± 8 % 51 ± 8 %	Klein y Melton, 1996; Bain <i>et al.</i> , 2007

\* Para determinar los porcentajes de actividad se utilizó SB216763 2 μM y LiCl 10 mM (Bain *et al.*, 2007).

Abreviaturas: CDK, cinasa dependiente de ciclina; DYRK, nombre en inglés dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase; ERK, nombre en inglés extracellular-signal-regulated kinase; HIPK, nombre en inglés homeodomain-interacting protein kinase; IKKε, nombre en inglés inhibitory κB kinase; PIM, nombre en inglés provirus integration site for Moloney murine leukaemia virus; SmMLCK, nombre en inglés smooth-muscle myosin light-chain kinase; SRPK, nombre en inglés serine-arginine protein kinase.

Para discernir entre las dos propuestas que explican los diferentes efectos ejercidos por los inhibidores de GSK3, se propone realizar otras pruebas que sean controles de los experimentos evaluados. Dentro de estos controles se plantean estímulos con los ligandos

de las vías Wnt y PI3K/Akt; evaluar la activación de genes blanco de la vía Wnt o también ensayos de gen reportero para  $\beta$ -catenina para corroborar si se activa o no la vía con el uso de los inhibidores. También se propone el uso de RNAs de interferencia para silenciar la expresión de los genes de GSK3 $\alpha/\beta$  o sobreexpresar formas mutadas de GSK3, una que se encuentre constitutivamente activa y otra inactiva; esto contribuiría a discernir si los efectos que se observan en SKI son propios de la inhibición de GSK3 o si se deben a efectos secundarios de los inhibidores.

Por otro lado, uno de los resultados relevantes de este trabajo es el análisis individual de las isoformas de SKI. Los datos de los tratamientos con BIO muestran que estas isoformas responden de manera diferente, aun bajo las mismas condiciones. La isoforma de mayor peso molecular aumenta su abundancia con el tratamiento con BIO por 2 h, mientras que la de menor peso molecular disminuye sus niveles, esto explica que el cambio global en los niveles de SKI se vea enmascarado por la respuesta individual de cada isoforma. Hasta el momento no hay una explicación sobre la detección de las tres bandas en los ensayos de WB de SKI, sólo se han asociado a modificaciones postraduccionales de la proteína (Del Valle-Espinosa, 2013). Algunos intentos realizados para caracterizar las diferencias en la regulación o localización subcelular de cada isoforma de SKI mostraron que no hay diferencias en su distribución entre el núcleo y el citoplasma, ni tampoco entre membranas resistentes a detergentes (DRM) y membranas no resistentes a detergentes (NDRM), que son compartimientos subcelulares en los que se localiza SKI (Vázquez-Victorio, 2015b). Sin embargo, el uso de inhibidores del transporte vesicular disminuyen preferentemente la abundancia de la isoforma de menor tamaño (Vázquez-Victorio, 2015b). Al comparar dichos resultados con los datos obtenidos con los tratamientos con BIO, se sugiere que la isoforma de SKI de menor peso molecular es más sensible a disminuir en comparación con las otras dos.

Por otro lado, no se encontró que SKI y GSK3 formaran un complejo proteico, al menos no bajo las condiciones evaluadas. Al respecto se sugiere que se evalúen condiciones que promuevan la localización de ambas proteínas en MVE, debido a que es el sitio subcelular que se ha caracterizado que tienen en común (Taelman *et al.*, 2010; Vázquez-Victorio *et al.*, 2015). A pesar de que se proponga evaluar otras condiciones que

regulen la localización de GSK3 y de SKI, los resultados de los experimentos realizados hasta el momento descartan que GSK3 regule a SKI de manera directa.

En un intento por caracterizar mecanismos indirectos que mediaran la regulación de SKI por GSK3, una de las propuestas fue analizar el papel de  $\beta$ -catenina como posible regulador de SKI. Esto debido a que  $\beta$ -catenina es un blanco directo de GSK3 que se estabiliza cuando se utilizan los inhibidores BIO y SB21, por lo que puede regular otros mecanismos. Los resultados descartan esta posible regulación debido a que los niveles de SKI disminuyeron de manera independiente al aumento o disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina. Por lo que se sugiere que la fracción de GSK3 que responde a BIO y SB21 no requiere de  $\beta$ -catenina para mantener o aumentar los niveles de SKI. Al respecto, no hay reportes de que SKI y  $\beta$ -catenina interaccionen entre sí o que el gen *Ski* sea regulado por  $\beta$ -catenina. Únicamente se ha reportado que  $\beta$ -catenina puede unir a las proteínas Smad (Monga, 2015), pero no se ha determinado si esto altera de alguna forma a SKI. Por otro lado, el uso del compuesto XAV939, que se empleó para disminuir los niveles de  $\beta$ -catenina, también disminuye los niveles de SKI, pero se propone que el mecanismo involucrado es independiente a la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y también a GSK3. XAV939 que es un inhibidor de TNK1/2 (Tankirasa 1/2), y estas enzimas regulan diversos procesos como la estabilidad de telómeros y la formación del uso mitótico durante la fase de división celular, entre otros (Riffel *et al.*, 2012), lo que se correlaciona con la asociación de SKI al uso mitótico y centrosomas (Marcelain y Hayman, 2005).

También se evaluó la vía del TGF- $\beta$  para verificar si GSK3 depende de esta vía para regular los niveles de SKI. Uno de los mecanismos que se evaluó es la degradación de SKI mediada por su asociación con las proteínas pSmad2/3, que a su vez reclutan ligasas de ubiquitina y promueven la degradación a SKI (Sun *et al.*, 1999b). Una propuesta que involucrara la participación de GSK3 en este mecanismo era que GSK3 bloqueara la formación del complejo SKI/pSmad2/3, ya que GSK3 induce la degradación de algunas isoformas de Smad y como consecuencia induciría un aumento en SKI. Sin embargo, los resultados obtenidos al inhibir GSK3 con BIO o con LiCl, aún al reducir los niveles de pSmad2/3 (mediante el uso de SB43) indican que GSK3 mantiene o aumenta los niveles de SKI por otro mecanismo que no involucra la formación del complejo SKI/Smad2/3.

El otro mecanismo que se evaluó es la recuperación de los niveles de SKI inducida por TGF- $\beta$  a las 3 h de estímulo (Vázquez-Victorio *et al.*, 2015a; Caligaris *et al.*, 2015). El mecanismo por el cual ocurre esto aún no se conoce, pero el propósito del experimento era evaluar dos mecanismos que regulan los niveles de SKI y ver cuál de sus efectos predomina sobre el otro. Los resultados muestran que SKI disminuye por el uso de los inhibidores BIO y LiCl a pesar de la activación de la vía del TGF- $\beta$ , que en este caso induce la recuperación de sus niveles. Esto indica que la regulación de los niveles de SKI por la inhibición de GSK3, predomina sobre el efecto que induce TGF- $\beta$  en la recuperación de los niveles de SKI, por lo que GSK3 actúa de manera independiente a esta vía. Un posible mecanismo que se plantea para explicar este resultado es que GSK3 puede actuar por una vía alterna a TGF- $\beta$ , y que converge en el punto en que regula a SKI, pero este punto de convergencia queda río abajo de la vía del TGF- $\beta$ . Otra posibilidad es que GSK3 puede participar en la recuperación de los niveles de SKI, por lo que al inhibir la actividad de GSK3 también se bloquea el mecanismo que induce esta recuperación. Para evaluar esta última posibilidad haría falta caracterizar detalladamente el mecanismo por el cual el TGF- $\beta$  induce la recuperación de SKI. Otro planteamiento que surge como explicación, pero que no se está evaluando, implica que la actividad de GSK3 pueda ser regulada por el TGF- $\beta$ . Para esto se propondría evaluar la actividad de GSK3 al usar el ligando o el inhibidor de la vía. Sin embargo, los datos obtenidos parecen indicar que no ocurre una regulación de la cinasa GSK3 mediada por TGF- $\beta$ .

Mientras tanto, otros mecanismos que no se evaluaron detalladamente en este trabajo pero que también pueden estar involucrados en el mecanismo de regulación de los niveles de SKI por GSK3, incluyen a la degradación de SKI vía el proteosoma, el transporte vesicular, la dinámica de citoesqueleto de actina y de microtúbulos, y el recambio de proteínas. La degradación vía el proteosoma es la principal vía de degradación de SKI, ya sea por estímulos como la activación de la vía del TGF- $\beta$  (Nagano *et al.*, 2007) y la formación de filamentos de actina (Vázquez-Victorio *et al.*, 2015a), entre otros. Se espera corroborar si los efectos mediados por los inhibidores BIO, SB21 y LiCl (a tiempos cortos de tratamiento) ocurre a través de esta vía de degradación. De ser así, estos resultados contribuirían a indicar que los cambios observados en los niveles de SKI son por regulación de la estabilidad de la proteína, y no por otro mecanismo que regule la expresión del gen de

*Ski*. Algunos datos preliminares (no mostrados) sugieren que la disminución de SKI al inhibir GSK3 con BIO o con LiCl (a tiempos cortos) sí involucra su degradación vía el proteosoma.

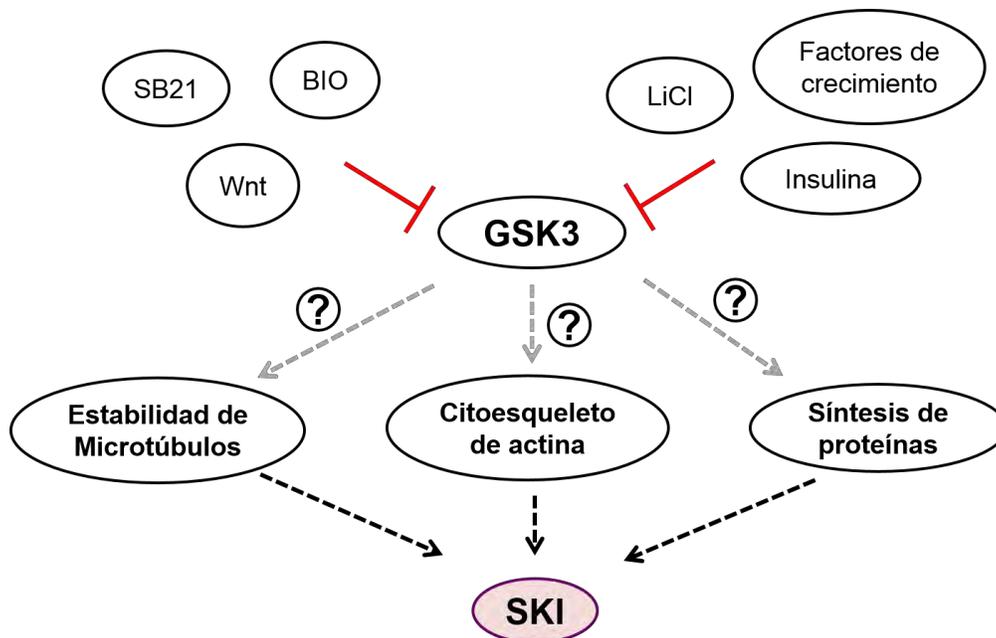
Respecto al transporte vesicular, ya se mencionó previamente que algunos inhibidores del tráfico vesicular como brefeldina A y monensina inducen una disminución de SKI, principalmente de la isoforma de menor peso molecular (Vázquez-Victorio, 2015b), lo que se asemeja al efecto mediado por BIO sobre SKI. Existen muy pocos reportes que establecen un papel de GSK3 en el transporte vesicular, entre ellos el trabajo de Taelman *et al.* (2010) que demuestra que después de activar la vía Wnt, GSK3 junto con el complejo proteico de destrucción es secuestrado en MVE. Otros estudios reportan una regulación de GSK3 sobre proteínas que regulan el transporte vesicular como Rab11 y PI4KII $\alpha$  (Yoon *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2014).

SKI es regulado por cambios en la dinámica de citoesqueleto de actina y de los microtúbulos. Los niveles de SKI disminuyen al inducir la forma filamentosa de actina o al inhibir la polimerización de microtúbulos, mientras que un aumento en la forma globular de actina promueve un aumento en los niveles de SKI (Vázquez-Victorio *et al.*, 2015a; Caligaris *et al.*, 2015). GSK3 controla el rearrreglo del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos, lo que se ha observado en podocitos y queratinocitos, entre otros tipos celulares (George *et al.*, 2011; Koivisto *et al.*, 2003; Koivisto *et al.*, 2004). GSK3 regula la dinámica de microtúbulos al fosforilar proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como las proteínas tau y MAP1B (Grimes y Jope, 2001; Jope y Johnson, 2004). Debido a estas observaciones, se propone evaluar si los inhibidores BIO, Litio y SB21 promueven un cambio en el citoesqueleto de actina y de los microtúbulos.

SKI es una proteína con alto grado de recambio, por lo que al inhibir la síntesis de proteínas los niveles de SKI disminuyen rápidamente (Caligaris *et al.*, 2015). GSK3 inhibe también el proceso de síntesis de proteínas, principalmente por fosforilación de dos de sus sustratos: eIF2B (Factor Eucariote de Iniciación 2B) y TSC2. eIF2B es un factor necesario para el inicio de la traducción de proteínas que se inactiva al ser fosforilado por GSK3. La vía mTOR es una de las principales vías que regula la maquinaria de traducción de proteínas y se activa por TSC2, pero sólo cuando TSC2 no ha sido fosforilada por GSK3. Como alternativa para bloquear la actividad de GSK3 y promover la síntesis de proteínas

resulta útil activar mecanismos que fosforilan e inhiben a GSK3 en su extremo amino (Jope y Johnson, 2004; Proud, 2007).

Con base en los mecanismos sugeridos (estabilidad de microtúbulos, dinámica de citoesqueleto de actina y síntesis de proteínas) que podrían intervenir en la regulación de la estabilidad de la proteína SKI mediada por GSK3 y que aún faltan por explorar, se construyó el **Esquema 5.2**. En este esquema se muestran los inhibidores de GSK3 que se utilizaron en este trabajo, estos inhibidores están agrupados según su mecanismo de acción. También se incluyen los estímulos o tratamientos cuyo efecto se sugiere que es mimetizado por los inhibidores utilizados. De esta forma el ligando Wnt se asocia con BIO y SB21, mientras que los factores de crecimiento e insulina se asocian con LiCl. Estas asociaciones son especulativas y hace falta corroborarse, sin embargo ya se discutió anteriormente los resultados que sugieren dichas asociaciones.



**Esquema 5.2. Mecanismos probables que están relacionados con la regulación en la actividad de GSK3 y sus efectos sobre SKI.** Esquema que representa los mecanismos propuestos a través de los cuales GSK3 pueden regular la abundancia de SKI. También se muestran los distintos tratamientos o estímulos que regulan la actividad de GSK3, agrupados según su mecanismo de inhibición, aunque no todos se evaluaron en este proyecto. Las flechas negras (↑) indican un efecto regulatorio sobre la abundancia de la

proteína, las flechas grises indican un mecanismo de GSK3 propuesto que no se ha estudiado en hepatocitos, las flechas rojas con extremo romo ( $\dashv$ ) indican inactivación; las flechas de línea continua indican un efecto directo y las flechas con línea discontinua indican un efecto que puede ser mediado por mecanismos intermediarios.

En el contexto hepático las vías Wnt y PI3K/Akt se activan en hepatocitos pericentrales y periportales, respectivamente (Colnot y Perret, 2011), por lo que se sugiere que GSK3 puede ser regulada de manera diferente en cada tipo de hepatocitos, según la vía que se active. Como consecuencia resultaría interesante evaluar si los niveles de SKI responden de manera diferencial en hepatocitos pericentrales y periportales a través de la regulación de GSK3.

## 6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que GSK3 participa entre los diversos mecanismos que regulan los niveles de la proteína SKI. Sin embargo, no es posible discernir si la actividad de GSK3 favorece o reprime la abundancia de SKI. Esto debido a que el uso de diferentes inhibidores farmacológicos de GSK3 produce efectos diferentes sobre los niveles de la proteína SKI, en la línea celular C9 de hepatocitos de rata. Los inhibidores BIO y SB216763 inducen una disminución de los niveles de la proteína SKI; el uso de litio a tiempos cortos de tratamiento también induce la disminución de SKI, sin embargo a tiempos largos de tratamiento, el litio promueve un aumento de los niveles de la proteína.

GSK3 regula los niveles de SKI a través de un mecanismo indirecto, el cual aún hace falta investigar. Sin embargo se encontró que la regulación de SKI por GSK3 no es dependiente de la vía del TGF- $\beta$  o de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

## 7 PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas de este proyecto, se propone identificar al mecanismo a través del cual GSK3 regula los niveles de SKI, como propuestas se contempla la participación de la dinámica del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, así como la regulación de la síntesis de proteínas. Para evaluar la dinámica de componentes del citoesqueleto se propone evaluar si los inhibidores BIO, SB21 y litio inducen algún cambio en el citoesqueleto de actina y en la organización de los microtúbulos en las células C9.

Otro mecanismo que se propone evaluar es la participación de la síntesis de novo de las proteínas, que se podría analizar con estímulos conjuntos de los inhibidores BIO, SB21 y LiCl con cicloheximida que es un fármaco que inhibe la síntesis de proteínas.

También resultaría interesante observar la localización subcelular de GSK3 y de SKI, para explorar si los efectos mediados por BIO, SB21 y LiCl tienen un efecto selectivo sobre su localización subcelular, ya que se plantea que existen diferentes fracciones de la enzima GSK3 que pueden ser las que se regulan de manera diferencial por estos inhibidores, y adicionalmente, se propone evaluar si GSK3 se localiza en los mismos compartimientos subcelulares que SKI, a pesar de que los resultados obtenidos sugieren que no forman parte del mismo complejo.

Otros experimentos que se propone realizar es ver si los compuestos empleados también producen efectos similares en otras líneas celulares, ya sean cultivos primarios de hepatocitos, células de hepatocarcinoma o incluso de otros tejidos, con el fin de determinar si los efectos observados son únicos de la línea celular de hepatocitos normales o también de otros contextos celulares.

Finalmente se propone evaluar si GSK3 se regula diferencialmente en hepatocitos periportales y pericentrales; además de analizar cómo se modulan los niveles de SKI en respuesta a estos mecanismos de regulación.

## 8 REFERENCIAS

Abushahba, W., Olabisi, O. O., Jeong, B-S., Boregowda, R. K., Wen, Y., Liu, F., Goydos, J. S., Lasfar, A., Cohen-Solal, K. A. (2012). Non-Canonical Smads Phosphorylation Induced by the Glutamate Release Inhibitor, Riluzole, through GSK3 Activation in Melanoma. *PLoS ONE* 7(10): e47312.

Acebron, S. P., Karaulanov, E., Berger, B. S., Huang, Y-L., Niehrs, C. (2014). Mitotic Wnt Signaling Promotes Protein Stabilization and Regulates Cell Size. *Molecular Cell* 54: 663-674.

Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., Kawabata, M. (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in Transforming Growth Factor- $\beta$  signaling through interaction with SMADs. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 35269-35277.

Akhurst, R. J., Padgett, R. W. (2015). Matters of context guide future research in TGF $\beta$  superfamily signaling. *Science Signalling* 8(399) re10.

Annes, J. P., Munger, S., Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science* 116, 217-224.

Arndt, S., Poser, I., Schubert, T., Moser, M., Bosserhoff, A. K. (2005). Cloning and functional characterization of a new Ski homolog, Fussel-18, specifically expressed in neuronal tissues. *Laboratory Investigation* 85: 1330–1341.

Arndt, S., Poser, I., Moser, M., Bosserhoff, A. K. (2007). Fussel-15, a novel Ski/Sno homolog protein, antagonizes BMP signaling. *Molecular and Cellular Neurosciences* 34: 603-611.

Baarsma, H. A., Engelbertink, L. HJM., van Hees, L. J., Menzen, M. H., Meurs, H., Timens, W., Postma, D. S., Kerstjens, H. AM., Gosens, R. (2012). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) regulates TGF- $\beta$ 1-induced differentiation of pulmonary fibroblasts. *British Journal of Pharmacology* 169 : 590–603.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R., Cohen, P. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal* 408, 297-315.

Band, A. M., Björklund, M., Laiho, M. (2009). The Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway Regulates Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling by Destabilizing Ski and Inducing Smad7. *The Journal of Biological Chemistry* 284(51): 35441-35449.

Beaulieu, J. M., Marion, S., Rodriguiz, R. M., Medvedev, I. O., Sotnikova, T. D., Ghisi, V., Wetsel, W. C., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. (2008). A  $\beta$ -arrestin 2 Signaling Complex Mediates Lithium Action on Behavior. *Cell* 132(1): 125-136.

Beurel, E., Grieco, S. F., Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 148: 114-131.

Bissell, D. M., Roulot, D., George, J. (2001). Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 34(5): 859-867.

Bonnon, C., Atanasoski, S. (2012). c-Ski in health and disease. *Cell and Tissue Research* 347: 51-64.

Caligaris, C., Vázquez-Victorio, G., Sosa-Garrocho, M., Ríos-López, D. G., Marín-Hernández, A., Macías-Silva, M. (2015). Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850(9):1832-1841.

Carmignac, V., Thevenon, J., Ades, L., Callewaert, B., Julia, S., Thauvin-Robinet, C., Gueneau, L., Courcet, J.B., Lopez, E., Holman, K., Renard, M., Plauchu, H., Plessis, G., De Backer, J., Child, A., Arno, G., Duplomb, L., Callier, P., Aral, B., Vabres, P., Gigot, N., Arbustini, E., Grasso, M., Robinson, P.N., Goizet, C., Baumann, C., Di Rocco, M., Sanchez Del Pozo, J., Huet, F., Jondeau, G., Collod-Beroud, G., Beroud, C., Amiel, J., Cormier-Daire V., Rivière, J.B., Boileau, C., De Paepe, A., Faivre, L. (2012). In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant Shprintzen-Goldberg syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 91: 950-957.

Chalecka-Franaszek, E., Chuang, D.-M. (1999). Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(15): 8745-8750.

Chen, K. S., Katz, J. (1988). Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *The Biochemical Journal* 255: 99-104.

Chen, Y. G., Liu, F., Massagué, J. (1997). Mechanism of TGF- $\beta$  receptor inhibition by FKBP12. *The EMBO Journal* 16(13): 3866-3876.

Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A. E., Corcoran, S. L., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Cox, L. R., Mills, D., Brown, M. J., Haigh, D., Ward, R. W., Smith, D. G., Murray, K. J., Reith, A. D., Holder, J. C. (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chemistry & Biology* 7: 793-803.

Cohen, P., Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(10): 769-776.

Colnot, S., Perret, C. 2011. "Liver Zonation" en Monga (ed.), *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Springer US. [En línea]. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7107-4\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7107-4_2) [Accesado el día 10 de marzo de 2017]

Dahl, R., Wani, B., Hayman, M. J. (1998). The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42. *Oncogene* 16: 1579-1586.

Deheunink, J., Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Cell Research* 19: 47-57.

Del Valle-Espinosa, E. (2013). Estudio de las modificaciones postraduccionales que modulan la función y estabilidad de la oncoproteína Ski. Tesis de Maestría.

Demagny, H., De Robertis, E. M. (2016) Point mutations in the tumor suppressor Smad4/DPC4 enhance its phosphorylation by GSK3 and reversibly inactivate TGF- $\beta$  signaling. *Molecular & Cellular Oncology* 3:1, e1025181

Ding, V. W., Chen, R-H., McCormick, F. (2000). Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  by Insulin and Wnt Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 275(42): 32475-32481.

Dooley, S., ten Dijke, P. (2012). TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 347: 245–256.

Doyle, A.J., Doyle, J.J., Bessling, S.L., Maragh, S., Lindsay, M.E., Schepers, D., Gillis, E., Mortier, G., Homfray, T., Sauls, K., Norris, R.A., Huso, N.D., Leahy, D., Mohr, D.W., Caulfield, M.J., Scott, A.F., Destree, A., Hennekam, R.C., Arn, P.H., Curry, C.J., Van Laer, L., McCallion, A.S., Loeys, B.L., and Dietz, H.C. (2012). Mutations in the TGF- $\beta$  repressor

SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nature Genetics* 44: 1249-1254.

Ferrand, N., Atfi, A., Prunier, C. (2010). The Oncoprotein c-Ski Functions as a Direct Antagonist of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor. *Cancer Research* 70: 8457-8466.

Freland, L., Beaulieu, J. M. (2012). Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5(14): 1-7.

Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M., De Robertis, E. M. (2007). Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal. *Cell* 131: 980–993.

Gebhardt, R., Matz-Soja, M. (2014). Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World Journal of Gastroenterology* 20(26): 8491-8504.

George, B., Vollenbröcker, B., Saleem, M. A., Huber, T. B., Pavenstädt, H., Weide, T. (2011). GSK3 $\beta$  inactivation in podocytes results in decreased phosphorylation of p70<sup>S6K</sup> accompanied by cytoskeletal rearrangements and inhibited motility. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 300: F1152–F1162.

Grimes, C. A., Jope, R., S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Progress in Neurobiology* 65: 391–426.

Guo, X., Ramirez, A., Waddell, D. S., Li, Z., Liu, X., Wang, X-F. (2008). Axin and GSK3- $\beta$  control Smad3 protein stability and modulate TGF- $\beta$  signaling. *Genes & Development* 22:106–120.

Huang, C. J., Lin, J. Y., Tsai, H. J. (1999). Two distinct c-ski cDNAs of fish, tilapia (*Oreochromis aurea*). *Molecular Reproduction and Development* 54: 223-231.

Huang, S-M. A., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., Hild, M., Shi, X., Wilson, C. J., Mickanin, C., Myer, V., Fazal, A., Tomlinson, R., Serluca, F., Shao, W., Cheng, H., Shultz, M., Rau, C., Schirle, M., Schlegl, J., Ghidelli, S., Fawell, S., Lu, C., Curtis, D., Kirschner, W., Lengauer, C., Finan, P. M., Tallarico, J. A., Bouwmeester, T., Porter, J. A., Bauer, A., Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signaling. *Nature* 461: 614-620.

International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, Rat Genome and Nomenclature Committee. (2015). Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat. *Mouse Genome Informatics*. [En línea]. Disponible en: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>

Jacob, C., Grabner, H., Atanasoski, S., Suter, U. (2008). Expression and localization of Ski determine cell type specific TGF- $\beta$  signaling effects on the cell cycle. *The Journal of Cell Biology* 182(3): 519-530.

Jope, G. V., Johnson, R. S. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *TRENDS in Biochemical Sciences* 29(2): 95-102.

Kaufman, C. D., Martínez-Rodríguez, G., Hackett, P. B., Jr. (2000). Ectopic expression of c-ski disrupts gastrulation and neural patterning in zebrafish. *Mechanisms of Development* 95: 147-162.

Kim, N. G., Xu, C., Gumbiner, B. M. (2009). Identification of targets of the Wnt pathway destruction complex in addition to  $\beta$ -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(13): 5165-5170.

Kim, S. S., Zhang, R. G., Braunstein, S. E., Joachimiak, A., Cvekl, A., Hegde, R. S. (2002). Structure of the retinal determination protein Dachshund reveals a DNA binding motif. *Structure* 10: 787-795.

Kingsley, D. M. (1994). The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* 8: 133-146.

Kirby, L. A., Schott, J. T., Noble, B. L., Mendez, D. C., Caseley, P. S., Peterson, S. C., Routledge, T. J., Patel, N. V. (2012). Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) Inhibitor, SB-216763, Promotes Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 7(6): e39329.

Klein, P. S., Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8455-8459.

Klionsky, D. J., Bruford, E. A., Cherry, J. M., Hodgkin, J., Laulederkind, S. J. F., Singer, A. G. (2012). In the beginning there was babble.... *Autophagy* 8(8): 1165–1167.

Kobayashi, N., Goto, K., Horiguchi, K., Nagata, M., Kawata, M., Miyazawa, K., Saitoh, M., Miyazono, K. (2007). c-Ski activates MyoD in the nucleus of myoblastic cells through suppression of histone deacetylases. *Genes to Cells* 12: 375-385.

Koivisto, L., Alavian, K., Hakkinen, L., Pelech, S., McCulloch, C. A., Larjava, H. (2003). Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *Journal of Cell Science* 116: 3749-3760.

Koivisto, L., Häkkinen, L., Matsumoto, K., McCulloch, C. A., Yamada, K. M., Larjava, H. (2004). Glycogen synthase kinase-3 regulates cytoskeleton and translocation of Rac1 in long cellular extensions of human keratinocytes. *Experimental Cell Research* 293: 68 - 80.

Kudryavtseva, M. V., Sakuta, G. A., Stein G. I., Kudryavtsev, B. N. (1992). The Metabolic Zonation of Glycogen Synthesis in Rat Liver after Fasting and Refeeding. *Tissue and Cell* 24(1): 31-35.

Lazzara, C. A., Kim, Y-H. (2015). Potential application of lithium in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroscience* 9: 110 páginas.

Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernati, J., Wui, Y-Z., Mandelkowi, E-M., Eisenbrand, G., Meijer, L. (2001). Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. A Property Common to Most Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors?. *The Journal of Biological Chemistry* 276(1): 251-260.

Li, Y., Turck, C.M., Teumer, J.K., Stavnezer, E. (1986). Unique Sequence, *ski*, in Sloan-Kettering Avian Retroviruses with Properties of a New Cell-Derived Oncogene. *Journal of Virology* 57(3): 1065-1072.

Liu, J., Wang, Y., Pan, Q., Su, Y., Zhang, Z., Han, J., Zhu, X., Tang, C., Hu, D. (2012) Wnt/ $\beta$ -catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF- $\beta$ 1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *Journal of Dermatological Science* 65: 38-49.

Liu, X., Sun, Y., Weinberg, R. A., Lodish, H. F. (2001). Ski/Sno and TGF- $\beta$  Signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12: 1-8.

Ludolph, D. C., Neff, A.W., Parker, M.A., Mescher, A.L., Smith, R.C., Malacinski, G.M. (1995). Cloning and expression of the axolotl protooncogene *ski*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1260: 102-104.

Luo, X., Stroschein, S. L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., Zhou, Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the SMAD proteins to repress TGF $\beta$  signaling. *Genes & Development* 13: 2196-2206.

Macdonald, M., Wan, Y., Wang, W., Roberts, E., Cheung, T. H., Erickson, R., Knuesel, M. T., Liu, X. (2004). Control of cell cycle-dependent degradation of c-Ski proto-oncoprotein by Cdc34. *Oncogene* 23: 5643–5653.

Marcelain, K., Hayman, M. J. (2005). The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* 24: 4321–4329.

Massagué, J. (1990). The Transforming Growth Factor- $\beta$  Family. *Annual Reviews of Cell Biology* 6: 597-641.

McGannon, P., Miyazaki, Y., Gupta, P.C., Traboulsi, E.I., Colmenares, C. (2006). Ocular abnormalities in mice lacking the Ski proto-oncogene. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47: 4231-4237.

Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Greengard, P. (2003). GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chemistry & Biology* 10: 1255–1266.

Meijer, L., Flajolet, M., Greengard, P. (2004). Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 25(9): 472-480.

Monga, S. P., (2015).  $\beta$ -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury and Tumorigenesis. *Gastroenterology* 148:1294–1310.

Munger, J. S., Sheppard, D. (2011). Cross Talk among TGF- $\beta$  Signaling Pathways, Integrins, and the Extracellular Matrix. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 3(11): a005017.

Nagano, Y., Mavrakis, K. J., Lee, K. L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, H., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., Episkopou, V., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2007). Arkadia Induces Degradation of SnoN and c-Ski to Enhance Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 282(28): 20492-20501.

Nagata, M. Nagata, S., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2010). Identification of a phosphorylation site in c-Ski as serine 515. *Journal of Biochemistry* 148(4): 423–427.

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

Nomura, T., Khan, M.M., Kaul, S.C., Dong, H.D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I., Ishii, S. (1999). Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes & Development* 13: 412-423.

Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *The Biochemical Journal* 403, 217–234.

Riffel, J. L., Lord, C. J., Ashworth, A. (2012). Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nature Reviews* 11: 923-936.

Rivas, S., Armisen, R., Rojas, D. A., Maldonado, E., Huerta, H., Tapia, J. C., Espinoza, J., Colombo, A., Michea, L., Hayman, M., Marcelain, K. (2016). The Ski Protein is Involved in the Transformation Pathway of Aurora Kinase A. *Journal of cellular biochemistry* 117: 334-343.

Rios-Doria, J., Kuefer, R., Ethier, S. P. Day, M. L. (2004). Cleavage of  $\beta$ -Catenin by Calpain in Prostate and Mammary Tumor Cells. *Cancer Research* 64: 7237–7240,

Robinson J. W., Leshchyn'ska, I., Farghaian, H., Hughes, W. E., Sytnyk, V., Neely G. G., Cole A. R. (2014). PI4KII $\alpha$  phosphorylation by GSK3 directs vesicular trafficking to lysosomes. *The Biochemical Journal* 464(1): 145-56.

Ryves, W. J., Harwood, A. J. (2001). Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 by Competition for Magnesium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280(3): 720-725.

Shi, Y., Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113: 685–700.

Stambolic, V., Woodgett, J. R. (1994). Mitogen Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in Intact Cells Via Serine 9 Phosphorylation. *Biochemical Journal* 303(Pt 3): 701–704.

Stambolic, V., Ruel, L., Woodgett, J. R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signalling in intact cells. *Current Biology* 6(12): 1664-1668.

Stroschein, S. L., Bonni, S., Wrana, J. L., Luo, K. (2001). SMAD3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes & Development* 15: 2822-2836.

Sun, Y., Liu, X., Eaton E. N., Lane, W. S., Lodish, H. F., Weinberg, R. A. (1999a). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGFbeta signaling. *Molecular Cell* 4: 499–509.

Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H. F., Weinberg, R. A. (1999b). SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(22): 12442-12447.

Sutrave, P., Kelly, A. M., Hughes, S. H. (1990a) Ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes & Development* 4: 1462-1472.

Sutrave, P., Copeland, T. D., Showalter, S. D., Hughes, S. H. (1990b). Characterization of Chicken c-ski Oncogene Products Expressed by Retrovirus Vectors. *Molecular And Cellular Biology* 10(6): 3137-3144.

Suzuki, H., Yagi, K., Kondo, M., Kato, M., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2004). c-Ski inhibits the TGF- $\beta$  signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 23: 5068–5076.

Taelman V. F., Dobrowolski, R. Plouhinec, J-L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D., De Robertis, E. M. (2010). Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143: 1136–1148.

Tejeda-Muñoz, N., Robles-Flores, M. (2015). Glycogen Synthase Kinase 3 in Wnt Signaling Pathway and Cancer. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 67(12): 914–922.

Tejeda-Muñoz, N., González-Aguilar, H., Santoyo-Ramos, P., Castañeda-Patlán, M. C., Robles-Flores, M.. (2016). Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Is Positively Regulated by Protein Kinase C $\zeta$ -Mediated Phosphorylation Induced by Wnt Agonists. *Molecular and Cellular Biology* 36(5):731-41.

Thompson, M. D., Monga, S. P. S. (2015). WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling in Liver Health and Disease. *Hepatology* 45: 1298-1305.

Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE Domain Protein that Recruits Smad2 to the TGF $\beta$  Receptor. *Cell* 95, 779–791.

Ueki, N., Hayman, M., J. (2003). Direct interaction of Ski with either SMAD3 or SMAD4 is necessary and sufficient for Ski-mediated repression of transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 32489-32492.

Vázquez-Victorio, G., Caligaris, C., Del Valle-Espinosa, E., Sosa-Garrocho, M., González-Arenas, N. R., Reyes-Cruz, G., Briones-Orta, M. A., Macías-Silva, M. (2015a). Novel Regulation of Ski Protein Stability and Endosomal Sorting by Actin Cytoskeleton Dynamics in Hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 290(7): 4487–4499.

Vázquez-Victorio, G. (2015b). La Vía de Señalización del TGF- $\beta$  y la Dinámica del Citoesqueleto de Actina Controlan la Estabilidad de la Oncoproteína Ski. Tesis de Doctorado.

Wilson, J. J., Malakhova, M., Zhang, R., Joachimiak, A., Hegde, R.S. (2004). Crystal Structure of the Dachshund Homology Domain of Human SKI. *Structure* 12: 785–792.

Wu, D., Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 35(3): 161–168.

Wu, J. W., Krawitz, A. R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K., Shi, Y. (2002). Structural mechanism of SMAD4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF- $\beta$  signaling. *Cell* 111: 357-367.

Xu, C. Kim, N. G., Gumbiner, B. M. (2009). Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle* 8(24): 4032-4039.

Xu, W., Angelis, K., Danielpour, D., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Stavnezer, E., Medrano, E. E. (2000). Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5924-5929.

Yan, X., Liu, Z., Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- $\beta$  signaling by Smad7. *Acta Bioquímica et Biophysica Sinica* 41(4): 263-272.

Yoon, S. O., Shin, S., Mercurio, A. M. (2005). Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Research* 65(7): 2761-2769.

Zhu, X., Zhang, Y., Wang, J., Yang, J.F., Yang, Y.F., and Tan, Z.P. (2013). 576 kb deletion in 1p36.33-p36.32 containing SKI is associated with limb malformation, congenital heart disease and epilepsy. *Gene* 528: 352-355.

## 9 ANEXOS

### A. REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### Cultivo celular

El suero fetal bovino, los antibióticos penicilina/estreptomicina [100X], la glutamina [200 mM] y el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) fueron adquiridas de la compañía GIBCO (Invitrogen).

#### Estímulos o tratamientos

Medio de ayuno	
Medio DMEM	500 mL
Antibióticos	1X
penicilina/estreptomicina	
Glutamina	4 mM

El TGF- $\beta$  humano recombinante fue adquirido de la compañía PreproTech. Los inhibidores BIO, SB216763, XAV939 y SB431542 se adquirieron de la compañía Tocris. Cloruro de litio se adquirió de Sigma.

#### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y Western Blot

Buffer de lisis RIPA	
Tris HCl pH 7.4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Deoxicolato de sodio	0.5%
Nonidet P40	1 %
SDS	0.1 %

#### Buffer de lisis con inhibidores de fosfatasa y proteasas

Inhibidores de fosfatasa:	
NaF 40X	25 mM
NaPPi 100X	1 mM
NaVO <sub>4</sub> 100X	1 mM
Inhibidores de proteasas:	
PMSF 200X	1mM
Inhibidor de Tripsina 500X	0.1 mg/mL
Pepstatina A	0.1 mg/mL
Leupeptina	0.1 mg/mL
Benzamida	0.1 mg/mL
B-glicerofosfato	0.1 mg/mL

Buffer TNTE		
Tris pH 7.4		50 mM
NaCl		150 mM
Triton		0.5 %
EDTA		1 mM

Solución de Laemmli 2X		
Tris pH 6.8		100 mM
Glicerol		20 %
SDS		2 %
Azul de bromofenol		0.05 %
DTT		100 mM

#### Geles de poliacrilamida y SDS

	Gel concentrador (3.4 %)	Gel Separador (7.5 %)
Agua desionizada	11.9 mL	21.7 mL
Tris pH 6.8, 0.5 M	5 mL	-
Tris pH 8.8, 1.5 M	-	11-25 mL
Acrilamida/bis (30 % : 0.8 %)	2.7 mL	11.25 mL
Solución de SDS al 10 %	200 µL	450 µL
Solución de APS al 10 %	220 µL	350 µL
TEMED	15 µL	25 µL

Los reactivos acrilamida, bis-metilano-acrilamida y APS (persulfato de sodio) se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Buffer de corrida 10 X, pH 8.3	
Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
Solución de SDS al 10 %	100 mL
Aforo a 1 L con agua deionizada	

Buffer de transferencia 10X	
Tris base	30.3 g
Glicina	144.15 g
Aforo a 1 L con agua desionizada	

Buffer de transferencia 1X	
Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20 %
Aforo a 1 L con agua	

Buffer TBS 10X  
Tris base                    24.2 g  
NaCl                         80 g  
HCl 1 N                     38 mL  
Aforo a 1 L con agua

Buffer TBS-T 1X  
TBS 10X                    100 mL  
Tween-20                    1 mL  
Aforo a 1 L con agua

Reactivo de Bradford se adquirió de la compañía BioRad. La proteína G acoplada a agarosa y la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se adquirieron de Millipore. El reactivo de quimioluminiscencia Immobilon también se adquirió de Millipore, mientras que el reactivo Super Signal West Pico se obtuvo de la compañía Thermo.

El anticuerpo primario anti-pGSK3 (S9) (9336S) se adquirió de Cell Signaling, el anticuerpo primario anti- $\beta$ -tubulina (T5293) se adquirió de Sigma y los anticuerpos primarios anti-SKI (H-329 SC-9140), anti- $\beta$ -catenina (E-5, SC-7963) y anti-GSK3  $\beta$  (H-76, SC-9166) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. El anticuerpo secundario anti-conejo "Light chain"(L) acoplado a HRP (211-032-171) se adquirió de la compañía Jackson ImmunoResearch Laboratories y el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP (SC-2005) se adquirió de Santa Cruz.