



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
Smad7 POR EL CORREPRESOR SnoN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
MARCO ANTONIO BRIONES ORTA

Tutor: DRA. MARINA MACÍAS SILVA



MÉXICO, D. F.

Agosto 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SMAD7 POR EL CORREPRESOR SNON”

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio de 225 Norte, del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. J. Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225N del Departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M. El alumno fue apoyado por una beca otorgada por el CONACyT y el complemento de beca por parte de la D.G.E.P. de la U.N.A.M., en el programa de Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la U.N.A.M. El proyecto fue apoyado por los donativos del CONACyT No. 36676-N y de la DGAPA No. IN218501 y IN230504.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marieta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A mi hermana y a mi padre

“No existe una prueba concreta de que el amor existe, y al parecer no puedo tenerla. No puedo purificarlo en un tubo de ensaye, clonar el gen que lo produce y cuya mutación evita que algunas personas lo tengan, en muy pocas ocasiones lo he observado y, para colmo, tampoco lo he experimentado en mí, pero aún así, aunque llegue a parecer un mal científico, creo que el amor está alrededor nuestro, actuando, tocándonos sutilmente, jugando con nosotros, si tenemos suerte dejándose entrever furtivamente, para ser el motor que mueve al universo entero. No necesito pruebas para creer en algunas cosas, así el amor se une a la interminable lista de fenómenos como cuerdas y bramas que, para desgracia de unos y fortuna de otros, la ciencia no puede explicar”.

*Febrero-2006
MA*

-Non, dit le petit prince. Je cherche des amis. Qu'est-ce que signifie "apprivoiser"?

-C'est une chose trop oubliée, dit le renard. Ça signifie "créer des liens..."

-Créer des liens?

-Bien sur, dit le renard. Tu n'es encore pour moi qu'un petit garçon tout semblable à cent mille petits garçons. Et je n'ai pas besoin de toi. Et tu n'as pas besoin de moi non plus. Je ne suis pour toi qu'un renard semblable à cent mille de renards. Mais, si tu m'apprivoises, nous aurons besoin l'un de l'autre. Tu seras pour moi unique au monde. Je serai pour toi unique au monde...

Le Petit Prince
Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS

Los oficiales

Mi agradecimiento más sincero a la Dra. Marina Macías por el voto de confianza que me otorgó al recibirme en su laboratorio. En ella encontré una persona llena de entusiasmo por la ciencia, inteligente y totalmente académica, todas cualidades importantes en el mundo científico, pero con la gran diferencia de que van acompañadas por una gran calidad humana, espero haber aprendido algo de ella.

Al Dr. Jesús A. García-Sainz, por el apoyo que me proporcionó durante el doctorado al formar parte de mi comité tutorial, al abrir la puertas y gavetas de su laboratorio para proporcionarnos reactivos o equipo cuando hacían falta, y además por las terapias y sabios consejos cuando negros nubarrones acechaban al proyecto.

Al Dr. Rolando Hernández por los comentarios y consejos que hizo al proyecto al formar parte de mi comité tutorial del doctorado.

Al comité revisor de la tesis, conformado por la Dra. Marieta Tuena, la Dra. Gloria Soberón, el Dr. Marco Antonio Cerbón, al Dr. Dimitris Georgellis y al Dr. López Casillas, por leer, corregir y aportar comentarios para enriquecer el trabajo.

A la Dra. Herminia Loza que también leyó esta tesis, como siempre la corrigió implacable, aunque esta vez con mejores comentarios que la anterior. Gracias por tu clases, tu tiempo, por tu entusiasmo contagioso, confianza y ver en mí a una persona capaz de realizar esto que ahora tiene entre sus manos.

A la bióloga Marcela Sosa por el apoyo en la parte experimental de este proyecto. Pero más te doy las gracias por tu amistad a prueba de balas.

A la Unidad de Cómputo del instituto, al Juan M. Barbosa C. e Ivette Rosas, por su asesoría técnica en el uso de los programas de cómputo. Y gracias por salvar esta tesis del limbo cibernético.

Al personal administrativo del Instituto de Fisiología Celular por la ayuda que brinda indirectamente a los proyectos en las numerosas tareas que desempeña.

También agradezco a la Unidad de Biología Molecular por su asesoría técnica y las facilidades que otorgaron para el uso de sus equipos.

A Jorge Bravo por su ayuda en algunas de las figuras utilizadas en la tesis.

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo que siempre me brindo, a la Dra. Rosario Muñoz y Jorge Vázquez y los demás maestros del programa.

A la M. en C. Blanca Delgado el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la que debo mi preparación académica desde el bachillerato hasta la fecha, y que me dio un azul y oro en mi camiseta cerca del corazón.

Para los amigos

Gracias a todas las personas sabias, pacientes, sinceras que estuvieron y están conmigo. Soy afortunado por los amigos que tengo y les pido perdón a todos aquellos que se me quedaron en el tintero, o mejor dicho en el teclado, ya sea por falta espacio, y que al no alcance a citarlos, pero tengan la seguridad de que los recuerdo y que por no hay casualidades en esta vida, y gracias a ustedes estoy aquí.

Al laboratorio 322 N.

Blanquita no puedo agradecerte todo lo que me has ayudado en este tiempo: tu amistad incondicional, tu alegría, el café; todo esto desde el primer día que te conocí (que fue el primer día que pise el IFC). Blanquita, todos tenemos mucha suerte de tenerte entre nosotros. Al Dr. Jaime Mas por mantener su política de puertas abiertas de su laboratorio hacia mi persona y por su “coucheo” que no siempre estuve dispuesto a observar, pero del que aprendí mucho. Al resto de sus miembros, que por orden histórico serían: la Neta, el peluche, Vicky, Natalia, Salvador, Neto, Pablo, Paola, me estuvieron apoyando, no solo en el doctorado, sino desde que llegue a hacer mi tesis de licenciatura. Finalmente y no por ser la más chiquita a la Animaga, que me soporta y me hace sentir alegre cada vez que la veo.

Al laboratorio 225N

A Aleida, José Miguel, Genaro, Paola, Cassandre, Jacky per restare, a Violeta per volare, y a Angelitos por aguantarme.

A los exploradores de todas las épocas, per non avere paura. En especial a John y a Jorge, con quiénes he descubierto más acerca de mi mismo.

A Sergio, per il italiano e tanti altre cose, buona sorte. A Mario y Jorge por el aprendizaje, pues no importan la religión, ni las frases sino los hechos.

The Oldies but the Goodies

A los compas tan lejanos como Suzel, Adrián, Ricardo, Kaburro, Nancy. Mi super equipo Alma y Sophia. Al SpiderMau y Genaro, a Ama y Violeta, por lo que cada uno me ayudo a crecer.

A Concha, por estar a solo unos metros de casa y a unos centímetros de mi corazón.

Ere, gracias por creer que podía hacerla en este negocio, y apoyarme cuando lo necesitaba más, y aún en los momentos que menos esperaba. Por andar entre Macondo y la abuela desalmada, en increíbles libros, viajes y anécdotas que no olvidare nunca. Sin ti esto no sería posible.

A mi Tía Julia, Lucas, Mónica, Mau, David y también a Ale y Yael, por abrir las puertas de su casa siempre y hacer de cada domingo una fiesta dispuesta a recibir a cualquiera, janch' io!

A la familia de San Luis Potosí, son muchos pero todos diferentes y especiales, ustedes saben que los quiero mucho. Gracias por hacerme sentir como en casa cada vez que estoy allá, sobre todo a la Güita Antonia, cuya energía nos carga a todos la batería y es un ejemplo de trabajo incansable.

ÍNDICE	página
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. VÍA DE SEÑALIZACION DEL TGF- β	13
1.1.1. El factor de crecimiento transformante beta TGF- β	13
1.1.2. Los receptores del TGF- β	18
1.1.3. Las proteínas Smads.....	19
1.1.4. Mecanismo de señalización del TGF- β	22
1.2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR LAS SMADS.....	25
1.2.1. Unión de las Smads al DNA.....	25
1.2.2. Factores asociados a las Smads.	26
1.2.3. Smad7.....	28
1.3. LAS ONCOPROTEÍNAS Ski Y SnoN.....	32
1.3.1. Ski.....	36
1.3.2. SnoN.....	36
1.4. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	39
1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
1.6. HIPÓTESIS.....	39
1.7. OBJETIVOS.....	40
1.7.1. Objetivo General.....	40
1.7.2. Objetivos Particulares.....	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
2.1. REACTIVOS.....	42
2.2. LÍNEAS CELULARES.....	42
2.3. INMUNOPRECIPITACIONES Y WESTERN BLOT	43
2.4. ENSAYO DE LUCIFERASA.....	43
2.5. RT-PCR.....	44
	44

2.6 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.....	44
2.6.1. Preparación de la cromatina.....	45
2.6.2. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	46
2.6.3. Recuperación del DNA.....	46
2.6.4. PCR.....	49
3. RESULTADOS.....	
3.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO DE Smad7 Y SnoN.....	49
3.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS Ski Y SnoN EN RESPUESTA AL TGF- β	50
3.3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE Smad7 POR Ski Y SnoN	52
3.4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.....	57
4. DISCUSIÓN.....	
4.1. EL TGF- β INDUCE UN AUMENTO EN RNAm DE Smad7 Y SnoN EN CÉLULAS A549 Y HEPG2.....	57
4.2. EL TGF- β REGULA LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS SnoN Y Ski.....	58
4.3. EL PROMOTOR DE Smad7 ES REGULADO POSITIVAMENTE POR EL TGF- β Y NEGATIVAMENTE POR SnoN.....	60
4.4. LA PROTEÍNA SnoN SE UNE AL PROMOTOR DE Smad7 PARA CONTROLAR LA DURACIÓN DEL LA SEÑAL DE TGF- β	62
5. CONCLUSIONES	68
6. PERSPECTIVAS.....	70
7. APÉNDICE.....	73
8. BIBLIOGRAFÍA.....	

ABREVIATURAS

Anisomicina — ANISO
BMP — proteínas morfogénicas de hueso
ChIP — inmunoprecipitación de cromatina
DNA — ácido desoxiribonucleico
DNAc — DNA complementario
Dpp — Decapentaplégico
EDTA — ácido etilendiaminotetraacético
EGF — factor de crecimiento epidermal
GDF — factores de crecimiento y diferenciación
HDAC — complejos de desacetilasas de histonas
Kb — kilobase
kDa — kiloDaltones
LAP — proteína asociada a la latencia
MAPK — cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MH — dominio de homología a Mad
MIS — sustancia inhibidora Mulleriana
mSin3A — mammalian transcriptional repressor Sin3A
N-Cor — nuclear receptor corepressor
pb — pares de base
PCR — reacción en cadena de la polimerasa
PI3-K — fosfatidilinositol 3 cinasa
PVDF — difluoruro de polivinilideno
r.p.m. — revoluciones por minuto
RNA — ácido ribonucleico
RNAi — RNA de interferencia
s — segundos
SBE — elemento de unión a Smads
Ski — Sloan-Kettering Institute
SMRT — silencing mediator of retinoid and th thyroid receptors
Smurf — factor relacionado a la ubiquitinación de Smads
Sno — Ski-novel related gene
TβRI — receptor tipo I del TGF-β
TβRII — receptor tipo II del TGF-β
TGF-β — factor de crecimiento transformante-β
TGF-α — factor de crecimiento transformante-α
Tricostatina — TSA
vol — volumen

RESUMEN

La vía de señalización del TGF- β tiene diferentes mecanismos para modular el encendido, la intensidad y duración de su señal. Un mecanismo de regulación negativa de la señal del TGF- β es la interacción de Smad7 con los receptores del TGF- β , que impide que las proteínas Smad2 y Smad3 puedan ser fosforiladas y que se asocien con Smad4 para regular la transcripción de genes en el núcleo. Por otros trabajos se sabía que este gen era regulado positivamente por el TGF- β a través de los complejos activados de las Smads2/3/4, que se unen al promotor del gen de *smad7* que elementos de unión a Smads (SBE) y que en condiciones basales es reprimido por la unión indirecta de la proteína Ski al SBE del promotor de *smad7* a través de la proteína Smad4. En este trabajo se estableció que SnoN, una proteína relacionada con Ski, también es capaz de reprimir la transcripción del gen *smad7* en condiciones basales al interactuar con el SBE de la región promotora de este gen. En células tratadas con TGF- β se activa la transcripción de *smad7*, las proteínas SnoN y Ski se degradan a través de un mecanismo que involucra a las Smads activadas, removiendo a SnoN y a Ski del promotor y permitiendo a las Smad2/Smad3 fosforiladas unirse al SBE. La transcripción del gen *sno* también es regulada positivamente por el TGF- β , permitiendo la recuperación de los niveles de esta proteína aproximadamente dos horas después al tratamiento con TGF- β . En este momento SnoN puede volver a colocarse en el promotor de *smad7*, al mismo tiempo que hay una disminución en la fosforilación de las Smads y los complejos activos ya no se encuentran unidos al promotor, con lo cual se recuperan las condiciones iniciales, donde el gen *smad7* está transcripcionalmente inactivo.

ABSTRACT

The TGF- β signaling pathway has different mechanisms to control the turning on, intensity and duration of the signal. One of this mechanisms is the interaction between Smad7 and the TGF- β receptor-activated complexes which interferes with phosphorylation of Smad2 and Smad3, thus preventing them from binding to Smad4, translocating to the nucleus where they modulate gene expression leading to specific cellular responses. In this study we show the regulation of *smad7*, a TGF- β target gene. *Smad7* gene is induced through Smad proteins interaction with a Smad binding element (SBE) located in *smad7* promoter. In contrast, without TGF- β , this gene is repressed by indirect binding of Ski and SnoN proteins to SBE in the promoter of this gene. In cells treated with TGF- β , *smad7* transcription is activated by a mechanism that involves Ski and SnoN degradation, thus allowing the positioning of Smad activated complexes in *smad7* promoter. Another gene whose transcription is induced by TGF- β pathway is *sno*. This transcription allows protein levels restoration approximately two hours after TGF- β treatment, leading to an ending of the TGF- β signal which coincides with the repositioning of SnoN protein and the removal of Smads activated in *smad7* promoter, thus completing the signaling pathway cycle and restoring the basal conditions of the cell.

*“Después de todo, qué complicado es el amor breve,
y en cambio, qué sencillo es el amor largo”*

Mario Benedetti

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- β

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un polipéptido cuya vía de señalización controla varios procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la respuesta inmune, la motilidad y la adhesión celular, entre otros (Massagué 1998). Por su importancia, tanto el mecanismo de señalización, así como las diferentes variables que lo regulan han sido ampliamente estudiados en los últimos años por diferentes grupos de investigación (Shi and Massagué 2003; Whitman and Raftery 2005). En la actualidad se cuenta con una gran cantidad de información acerca del TGF- β , su vía de señalización y elementos de regulación, junto con un gran número de trabajos sobre las enfermedades que están relacionadas con el mal funcionamiento de alguno de los componentes de la vía, como el cáncer o padecimientos fibróticos (Siegel and Massagué 2003; Leask and Abraham 2004; Kuang et al. 2006). Por lo tanto, en esta introducción se dará un esbozo de la vía, enfatizando en SnoN y Smad7, proteínas centrales de este trabajo.

1.1.1. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El TGF- β fue purificado en 1981 a partir de medios condicionados, gracias a su capacidad de promover la transformación de células normales a células transformadas o con características malignas (Anzano et al. 1982; Roberts et al. 1983). Estudios posteriores permitieron la identificación de tres isoformas para el TGF- β , que presentan una identidad del 70-80 % y están codificadas en tres genes independientes (Derynck et al. 1985). Se nombró TGF- β 1, al ligando que había sido aislado y caracterizado inicialmente, así como TGF- β 2 y TGF- β 3 a las isoformas adicionales (de Martin et al. 1987). Además, de estas isoformas existe el TGF- β 4 que se encuentra en pollo, y el TGF- β 5 que se encuentra en *Xenopus* (Kim et al. 1990).

El TGF- β forma parte de un grupo de péptidos altamente relacionados entre sí que funcionan como ligandos, siendo el TGF- β la molécula prototipo de este conjunto de ligandos. Todos ellos se han agrupado en la superfamilia del TGF- β , donde se encuentran las activinas, las inhibinas, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), la sustancia inhibidora Mulleriana (MIS) y las miostatinas (Massagué et al. 2005). En el humano se han identificado hasta la fecha 42 genes que codifican péptidos pertenecientes a la superfamilia del TGF- β (Massagué 1998).

Los péptidos de la superfamilia del TGF- β se puede dividir, basándose en su secuencia, en 3 subfamilias principales: 1) la de los TGF- β s, 2) la de las activinas y 3) la de las BMPs. Cada uno de los miembros de las subfamilias tiene una similitud en la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo de los precursores, que va del 25 al 90 % (Massagué 1990). Todos los ligandos de la superfamilia del TGF- β presentan al menos 7 cisteínas, conservadas a lo largo de su secuencia, que forman puentes disulfuros y dan lugar a una estructura conocida como nudo de cistinas. Debido a lo anterior, se ha propuesto que todos los ligandos evolucionaron a partir de un gen ancestral común (Roberts et al. 1990).

La estructura cristalográfica del monómero TGF- β revela una estructura similar a una “mano derecha” (Daopin et al. 1993). Los dos primeros dedos estarían formados por las hojas β antiparalelas 1 y 2 (β 1 y β 2), que son más pequeñas que las demás hojas β (Fig. 1). El tercer dedo comprende las hojas β antiparalelas 3 y 4, y el cuarto dedo lo forman las hojas β 5, 6 y 7. El pulgar lo formaría el amino terminal, la α -hélice 1, el bucle que va del residuo 8 al 14 (α 1) y el puente disulfuro de las cisteínas 7 y 16 (C7/C16). La palma de la mano se conformaría por la α -hélice 3, mientras que el dorso lo formaría el “nudo de cistinas” que se forma entre las cisteínas 15 y 78 (C15/C78), las cisteínas 44 y 109 (C44/109) y el último puente disulfuro formado por las cisteínas 48 y 111

(C48/C111). Cada monómero se dimeriza por medio de un puente disulfuro entre la cisteína 77 (C77) de cada monómero e interacciones hidrofóbicas, habiendo una orientación cabeza-cola entre los dos monómeros (Hinck et al. 1996).

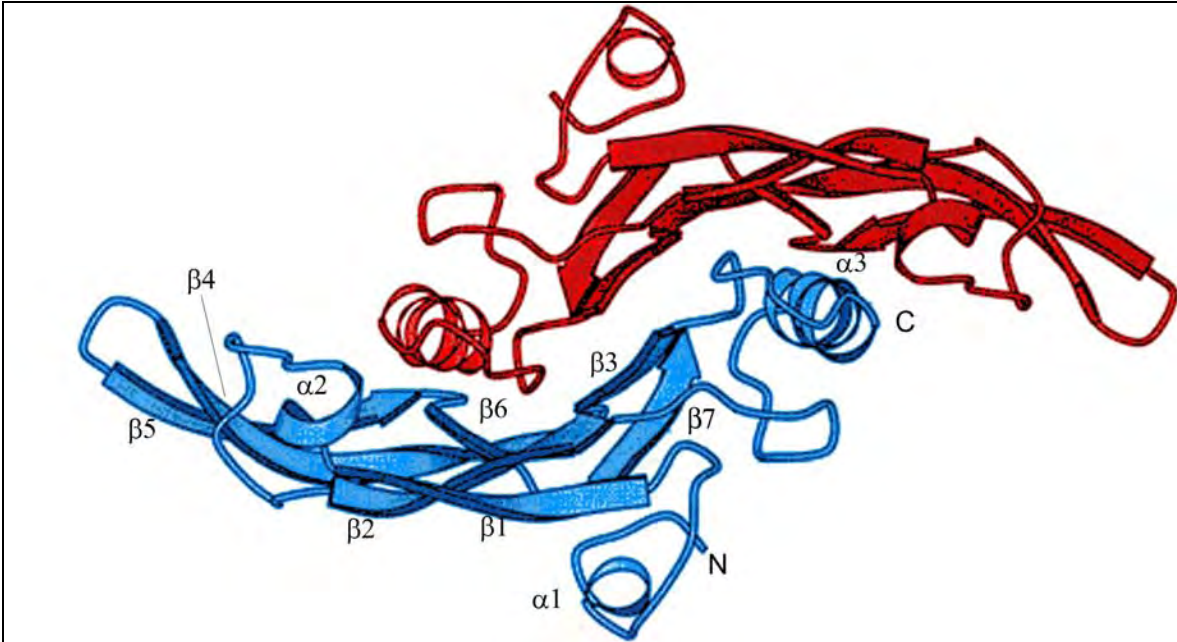


Figura 1. Representación en listones de la estructura tridimensional del TGF-β1, con base en la estructura cristalográfica (Modificado de Hinck *et al.*, 1996).

Aunque en los ensayos en el laboratorio las tres isoformas del TGF-β se pueden usar indistintamente, promoviendo los mismos efectos sobre las células, el TGF-β1 es la isoforma más utilizada en los trabajos. Debido a lo anterior, la mayor parte de la información disponible para este ligando corresponde a la isoforma 1. El gen de TGF-β1 es regulado a nivel transcripcional en respuesta a estrés, a daño celular o por oncoproteínas virales. El promotor carece de caja TATAA, pero presenta diferentes cajas ricas en GC, cerca del sitio de inicio de la transcripción. Se han identificado sitios de unión para los factores de transcripción SP-1 y Zf9/CPBP (Kim et al. 1998). El promotor tiene sitios de unión adicionales para factores como AP-1, de la familia de factores “Kruppel-like”, el factor de crecimiento temprano (Egr-1), un elemento de respuesta a retinoblastoma y secuencias ricas en GC (Kim et al. 1989; Kim et al. 1991; Liu et al. 1996). Además, la actividad transcripcional del gen puede ser incrementada por transactivadores virales, como por ejemplo, los factores Tat, del virus de la inmunodeficiencia

humana o la proteína X del virus de la hepatitis B (Thatikunta et al. 1997). Esta inducción se ha relacionado con el papel regulador de la respuesta inmune que tiene el TGF- β .

En el promotor del TGF- β 2 se localiza una caja TATA, que marca el inicio de la transcripción, un elemento de respuesta a AMPc, CRE/ATF, al que se une el factor de transcripción ATF-1 (Kingsley-Kallesen et al. 1997).

En el promotor del gen del TGF- β 3 se localizan un elemento CRE y una caja TATA, igual que en el promotor de TGF- β 2, pero en medio de estos dos elementos se localiza una caja E y sitios de unión para los factores USF1, así como un elemento de respuesta a estrógenos (Lafyatis et al. 1990; Scholtz et al. 1996; Yang et al. 1996).

El TGF- β 1 presenta transcritos de diferentes tamaños, siendo los principales el de 2.5, 1.9 y 1.4 kb. Las regiones no traducidas del extremo 5' (5' UTRs) son de más de 1 kb, donde pueden interactuar que pueden regular positiva o negativamente el proceso de la traducción. Los transcritos de 2.5 y 1.4 kb son pobremente traducidos, mientras que el de 1.9 kb presenta alta eficiencia de traducción; aunque la importancia fisiológica de estas diferencias en los transcritos no ha sido explorada (Yang et al. 1998).

Las tres isoformas del TGF- β se sintetizan a partir de un precursor de 390-442 aminoácidos. En el extremo amino de este precursor se localiza un péptido señal que sirve para la secreción de la proteína. A continuación se encuentra un segmento largo que forma parte del precursor, y solamente los 112 aminoácidos del extremo carboxilo corresponden a la forma madura y activa del TGF- β . La región carboxilo se libera del extremo amino por un corte proteolítico en un sitio consenso de cuatro aminoácidos básicos, el cual se lleva a cabo por una proteasa denominada furina (Barr 1991).

Una vez liberado el fragmento del extremo amino, el TGF- β maduro se dimeriza, formando un complejo de 25 kDa (Birchenall-Roberts et al. 1990). El fragmento amino no solo es requerido para la secreción y plegamiento del TGF- β , sino que se asocia con el TGF- β maduro, por medio de interacciones no covalentes, para mantenerlo en un estado inactivo o latente, por lo que el fragmento del extremo amino recibe el nombre de proteína asociada a la latencia (LAP) (López et al. 1992). Este mecanismo de producción y secreción del TGF- β es similar para los otros ligandos pertenecientes a la superfamilia del TGF- β .

Los ratones “knockout” de cada isoforma del TGF- β presentan diferentes fenotipos, no obstante, todos ellos son letales. Lo anterior sugiere que cada isoforma cumple una función específica durante el desarrollo embrionario y en cada tejido (Letterio and Roberts 1998). La mitad de los ratones “knockout” para el TGF- β 1 mueren intrauterinamente, mientras que la otra mitad muere dos semanas después del nacimiento por una respuesta inflamatoria exacerbada (Christ et al. 1994). Los ratones presentan diversas alteraciones en el sistema inmune, con infiltración de leucocitos y macrófagos en diferentes órganos como son corazón, pulmón y glándulas salivales, por lo que se pudo concluir que esta isoforma del TGF- β es fundamental para mantener el equilibrio del sistema inmune (Christ et al. 1994). Dos tercios de los ratones “knockout” para el TGF- β 2 mueren antes poco antes o durante el nacimiento. El resto de los ratones son cianóticos y presentan diversas alteraciones cardíacas, craneofaciales, urogenitales y defectos en el desarrollo de las extremidades, columna, ojo y oído interno (Sanford et al. 1997). De forma similar, los ratones “knockout” para el TGF- β 3 mueren horas después de nacer, con alteraciones diferentes a las observadas para las otras dos isoformas, como el retraso en la maduración de los pulmones y defectos en el desarrollo y en el cierre del paladar y mueren poco después del nacimiento debido a insuficiencia respiratoria (Proetzel et al. 1995).

1.1.2. Los receptores del TGF- β

Todos los péptidos de la familia del TGF- β tienen receptores específicos en la membrana plasmática, que poseen una actividad de cinasas de residuos de serina y treonina (Massagué 1998). Los receptores para el TGF- β son dos, el tipo I (T β RI o ALK5) y el tipo II (T β RII). Existen además otros dos receptores para el TGF- β , el β -glucano y la endoglina, denominados correceptores, ya que no son los encargados de la transducción de la señal, pero regulan la accesibilidad del ligando hacia los receptores tipo II (López-Casillas et al. 1991; Esparza-López et al. 2001; Shi and Massagué 2003). El receptor T β RI tiene 500 aminoácidos, es glicosilado y pesa aproximadamente 55 kDa. El T β RII es una proteína de 570 aminoácidos, también se glucosila, y pesa aproximadamente 70 kDa. Ambos receptores son similares entre sí, siendo el dominio con actividad de cinasa la región más conservada (Massagué 1998).

El extremo amino de ambos receptores se localiza en la parte extracelular, contiene solo 150 aminoácidos y el sitio de unión al ligando (Massagué 1998). El extremo carboxilo de los receptores se localiza en la parte intracelular y contiene el dominio de cinasa. Ambas regiones están conectadas por un pequeño dominio transmembranal (Shi and Massagué 2003).

El receptor T β RII tiene una actividad constitutiva de cinasa, que es independiente de la unión al ligando, y puede autofosforilarse en ciertos residuos de serina, lo cual al parecer modula la señalización (Luo and Lodish 1997; Massagué 1998). El TGF- β presenta una alta afinidad por el T β RII, y cuando se unen forman un complejo que puede reclutar al T β RI (Massagué 1998).

El receptor T β RI tiene un dominio específico rico en serinas y glicinas, denominado GS, que se encuentra cerca del dominio de cinasa, y que es fosforilado por el receptor T β RII para activar el dominio de cinasa del receptor

T β RI (Massagué 1998). La fosforilación, le permite al receptor T β RI interaccionar con sus sustratos, las proteínas Smads (Shi and Massagué 2003). El reconocimiento entre el T β RI y las Smads está dado por una región denominada asa L45, localizada dentro del dominio de cinasa (Chen et al. 1998; Shi and Massagué 2003).

1.1.3. Las proteínas Smad

Las proteínas Smads son los únicos sustratos conocidos que son activados por fosforilación directamente por los complejos activos de los receptores para el TGF- β , y que sirven como mediadores directos de éste ligando, al actuar como factores de transcripción que modulan la expresión de los genes encargados de la respuesta celular específica al TGF- β (Massagué et al. 2005).

Las proteínas Smads fueron identificadas en *Drosophila*, en donde se denominaron Mads (mothers against decapentaplegic), ya que incrementaban el fenotipo de moscas mutantes para el ligando decapentaplégico (dpp), proteína homóloga a las BMP. Posteriormente fueron identificadas proteínas homólogas a las Smads en nematodo *C. elegans*, donde fueron nombradas Sma (small body size), por el fenotipo de menor tamaño que presentaban los gusanos con mutaciones en estas proteínas. Con base en estos estudios los genes en vertebrados fueron clonados y se denominaron Smads por la fusión de los nombres Mad y Sma, sus contrapartes en la mosca y el nematodo (Derynck et al. 1996).

a. Clasificación

Hay 8 proteínas Smads identificadas en el humano, pero solo Smad2 y Smad3 sirven como sustratos específicos para los complejos de receptores activos del TGF- β y la activina, mientras que las Smad1, Smad5 y Smad8 son sustratos de los receptores de las BMP. Todas estas Smads se encuentran dentro del grupo denominado R-Smads o Smads reguladas por el receptor (Derynck and

Zhang 1996; Massagué 1998; Massagué et al. 2005). La proteína Smad4 se denomina Smad común o Co-Smad y se asocia a todas las R-Smads fosforiladas. El último grupo de Smads lo constituyen las proteínas Smad6 y Smad7, denominadas Smads inhibitoras o I-Smads (Derynck et al. 1998; Massagué 1998).

b. Correlación estructura-función

Las Smads son proteínas de aproximadamente 500 aminoácidos, cuya estructura contiene 3 regiones principales: 2 dominios globulares, localizados uno en la parte amino y otro en el carboxilo de la proteína, denominados dominios de homología a Mads (MH, de “Mad homology domain”), siendo el MH1 el que se localiza en el amino terminal y el MH2 el del extremo carboxilo (Shi and Massagué 2003). Ambos dominios están conectados por una región no estructurada denominada puente o “linker” (Fig. 2) (Shi and Massagué 2003). El dominio MH1 comprende 130 aminoácidos y está conservado en casi todas las Smads, con excepción de las I-Smads (Massagué 1998). En este dominio se localiza una horquilla- β que participa en la unión al DNA y está conservada en Smad2, Smad3 y Smad4, aunque en Smad2 existe una secuencia de aminoácidos adicional, codificada por el exón 3 e insertada en el dominio MH1, que bloquea la unión de Smad2 al DNA (Massagué et al. 2005).

En la región “linker” se localizan los sitios de interacción con Smurf (“Smad ubiquitination-related factor), una ligasa E3 de ubiquitina que favorece la degradación de diferentes componentes de la vía, por medio de su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. También se localizan en esta región diferentes sitios de fosforilación para diferentes clases de cinasas como las MAPKs (Massagué et al. 2005). El dominio MH2 mide aproximadamente 200 aminoácidos y está altamente conservado en todas las Smads (Massagué 1998). En este dominio se localiza la asa denominada L3, región de interacción con el receptor tipo I activado, y también es en este dominio donde se localiza el motivo SSXS, que es fosforilado por el receptor tipo I (Macias-Silva et al. 1996). Esta

fosforilación produce un cambio conformacional de los dominios MH2 de Smad2 y Smad3 interaccionar con Smad4 (Massagué 1998). El MH2 también tiene regiones de interacción con proteínas de retención nuclear, nucleoporinas y cofactores de la transcripción (Massagué et al. 2005).

Las proteínas I-Smads, Smad6 y Smad7, son las encargadas de regular negativamente la señal de BMP y TGF- β respectivamente. La proteína Smad6 forma complejos con Smad4 y evita que se asocie con Smad1, una proteína que es activada de manera similar a las Smads2/3, pero que pertenece a la vía de las BMP y que tiene como resultado la inhibición de esta señal (Hata et al. 1998). El mecanismo de inhibición de Smad7 es diferente, ya que se une directamente a los complejos activos de los receptores de TGF- β , para competir con las proteínas Smad2/3 por el receptor y evitar que sean fosforiladas (Nakao et al. 1997; Whitman and Raftery 2005). Este mecanismo se detallará más adelante.

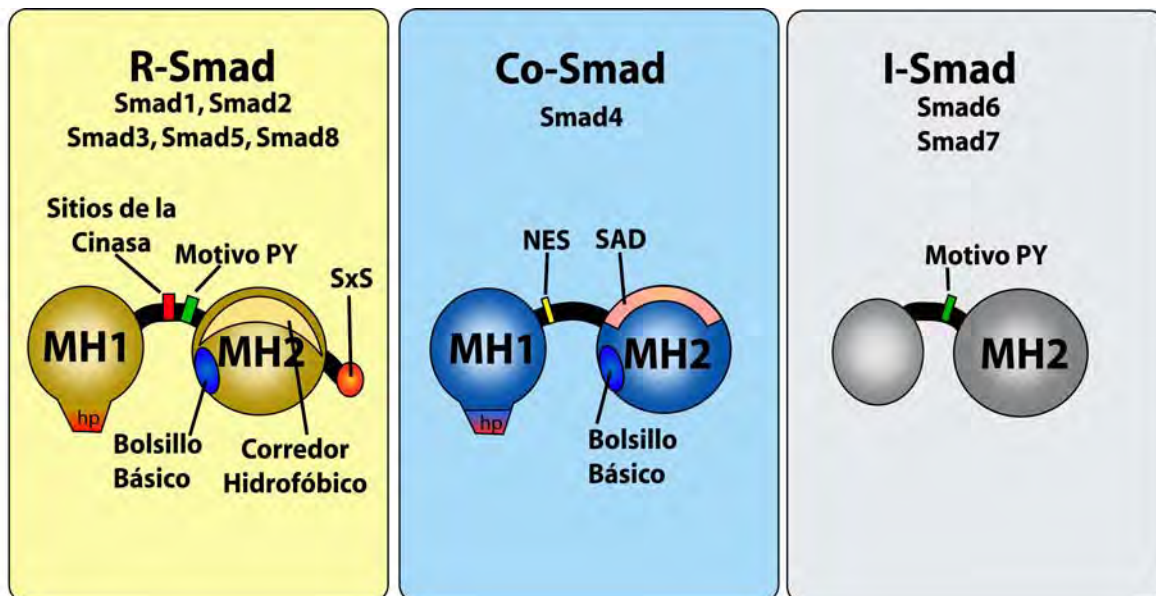


Figura 2. Esquema representativo de las principales estructuras tridimensionales de las proteínas Smads. (Modificado de Massagué, 2005). Se observan los dominios MH1, el "linker" y MH2, y los elementos funcionales que contienen. En el caso del MH1 se observa el dominio de unión a DNA (hp, "hairpin"). En el "linker" se localizan diferentes sitios de fosforilación, el motivo de interacción con Smurf (PY) y en el caso de la Smad4 (Co-Smads) un sitio de localización exportación nuclear (NES, "Nuclear export signal"). En el dominio MH2 se localiza el bolsillo hidrofóbico que permite la interacción entre los R-Smads y el T β RI, y de las R-Smads fosforiladas con Smad, el corredor hidrofóbico que permite la interacción de las Smads con proteínas de retención nuclear, nucleoporinas y factores de transcripción, en el caso de Smad4 se localiza una región que media la interacción con activadores y represores transcripcionales (SAD, "Smad4 activation domain")

1.1.4. Mecanismo de señalización del TGF- β

En la vía de señalización, el receptor T β RII une al TGF- β y forma un recluta al receptor T β RI y forma un complejo en el cual el receptor T β RII fosforila al T β RI. Esta fosforilación hace que el T β RI active su dominio de cinasa y que pueda fosforilar a las proteínas Smad2 y Smad3 (Macias-Silva et al. 1996; Derynck et al. 1998; Massagué 1998). Las proteínas Smad2 y Smad3 fosforiladas se asocian con la proteína Smad4, se translocan al núcleo donde interactúan con factores de transcripción para aumentar o reprimir la expresión de genes (Fig. 3) (Piek et al. 1999).

a. Puntos de control en la señalización del TGF- β

La señal que ejerce el TGF- β en las células tiene distintos puntos de control a diferentes niveles de la vía, tales como la accesibilidad del ligando a los receptores en membrana, los niveles de proteínas Smad2/3, Smad4, así como otros más específicos como la regulación que ejercen las I-Smads en la duración y potencia de la señal. Un punto de control importante es el ejercido por el proteosoma, ya que puede degradar a varios componentes de la vía de señalización del TGF- β , entre los que se encuentran los receptores del TGF- β y los complejos de Smads activados lo cual apaga la señal del TGF- β , o bien mandar a la degradación a proteínas asociadas con las Smads, como los correpresores transcripcionales, y favorecer el mecanismo de señalización (Izzi and Attisano 2004; Kavsak *et al.*, 2000). Esta degradación se lleva a cabo por el mecanismo de ubiquitinación mediado por las ligasas de ubiquitina Smurf2 o APC. Una vez que las proteínas han sido ubiquitinadas son exportadas al citoplasma, en donde son degradadas por el proteosoma (Bonni et al. 2001).

Smad2 y Smad3 pueden interaccionar con las ligasas Smurf2 y APC. En condiciones basales, se ha visto que la proteína Smad2 se asocia con Smurf2, regulando la tasa de recambio de Smad2 (Izzi and Attisano 2004). La interacción entre la Smad2 y Smurf2 se incrementa después del estímulo con TGF- β . Esto

trae como consecuencia una degradación de la proteína Smad2 nuclear, lo que contribuye a la terminación de la señal por TGF- β (Lo and Massagué 1999; Lin et al. 2000), aunque se desconoce si Smad2 necesita ser desfosforilada por proteínas nucleares para que pueda ser ubiquitinada y degradada (Inman et al. 2002).

En este año describió una piruvato deshidrogenada fosfatasa que funcionaba como una fosfatasa específica para Smad1 en células de mamífero (Chen et al. 2006) y meses más tarde y dando respuesta a una serie de discusiones en el campo, se identificó a la proteína PPM1A, la primera fosfatasa específica para Smad2/3 y cuya actividad es capaz de inhibir la señal del TGF- β (Lin et al. 2006). Por otro lado, la proteína Smad3 fosforilada es ubiquitinada por APC y después es degradada por medio del proteosoma (Stroschein et al. 2001). La degradación de las proteínas Smads tiene una cinética lenta, si se compara con factores como Ski y SnoN, cuya degradación es llevada a cabo rápidamente a través de su interacción con Smurf2 y APC, por medio de las Smads que son las proteínas adaptadoras en dicha interacción (Massagué et al. 2005).

Otro mecanismo de control negativo de la vía de señalización del TGF- β , es la interacción de correpresores transcripcionales como Ski, SnoN y TGIF con las proteínas Smad2/3/4 en el núcleo, uniéndose a los promotores de los genes blancos de las Smads y reprimiendo su actividad transcripcional a través del reclutamiento de correpresores como N-CoR/Sin3A, que interaccionan con desacetilasas de histonas (Stroschein et al. 1999b; ten Dijke et al. 2000; Liu et al. 2001). Además de este modo de inhibir la actividad transcripcional de las Smads, se ha sugerido un mecanismo adicional que consistiría en la formación de complejos de SnoN, Ski y Smads, los cuales no serían capaces de unirse a sus secuencias blanco en los promotores de genes regulados por el TGF- β (Luo et al. 1999; Macias-Silva et al. 2002). Recientemente se ha demostrado este mecanismo de represión para SnoN, en el cual estaría involucrado un secuestro directo de las Smads dado por SnoN, formando complejos con ellas, reteniéndolas

en el citoplasma y evitando su translocación al núcleo, e inhibiendo respuestas dependientes de la señal del TGF- β (Krakowski et al. 2005).

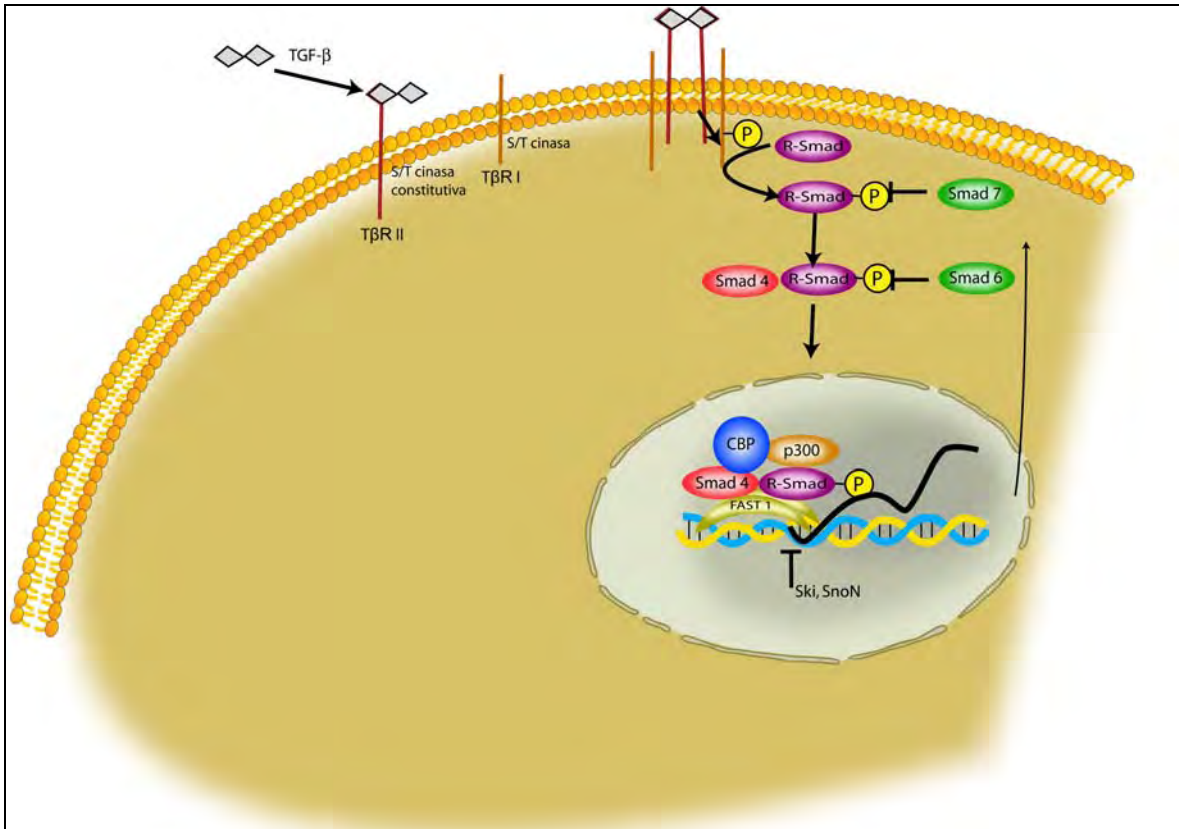


Figura 3. Vía de señalización del TGF- β a través de las proteínas Smads. El receptor tipo II al unirse al TGF- β forma complejos heteroméricos con el receptor tipo I y lo transfosforila. El receptor tipo I activado puede fosforilar a las proteínas R-Smads, que forman complejos con Smad4 para luego translocarse al núcleo, en donde interactuarán con proteínas de unión a DNA y regularán sus genes blanco.

Es importante mencionar que aunque las proteínas Smads son los únicos sustratos conocidos que pueden ser fosforilados directamente por los complejos de receptores del TGF- β activos, y que por lo tanto son considerados los mediadores principales de la señal del TGF- β , existen varios reportes que indican que hay otras vías de transducción que pueden ser activadas por el TGF- β , como las vías de MAPKs y de PI3-K, entre otras (Derynck and Zhang 2003).

1.2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR LAS SMADS

1.2.1. Unión de las Smads al DNA

Las Smad3 y Smad4 son factores de transcripción que tienen la capacidad de unirse al DNA. La horquilla- β , que es el dominio de unión al DNA de las Smads, interacciona en el surco mayor del DNA con la secuencia GTCT a través de puentes de hidrógeno (Shi et al. 1998). Esta secuencia de unión al DNA de las Smads fue deducida por medio de la síntesis de oligonucleótidos con secuencia al azar, y probando estas secuencias en ensayos de transactivación con genes reporteros en células transfectadas con proteínas recombinantes Smad3 y Smad4, lo que permitió la identificación de la secuencia GTCTAGAC como el elemento de unión a las proteínas Smads (SBE, Smad Binding Element) (Zawel et al. 1998).

Las Smads se unen al SBE con una baja afinidad, por lo que se ha considerado que en los promotores de los genes blanco es necesaria la presencia de estos elementos en forma repetitiva para permitir a los oligómeros de Smads unirse cooperativamente al DNA (Massagué et al. 2005). Lo anterior puede observarse en los promotores de diferentes genes que se regulan por TGF- β , donde la secuencia palindrómica GTCT y AGAC que forma al SBE, se repite varias veces, por ejemplo en los promotores de colágena I, c-Jun, IgA y Jun B o del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Dennler et al. 1998; Hua et al. 1998; Hua et al. 1999; Stroschein et al. 1999a; Suh et al. 2003). Estas repeticiones pueden unir a los complejos de Smads y conferir a un gen heterólogo una inducción transcripcional por TGF- β (Jonk et al. 1998; Zhang et al. 1998; Hanai et al. 1999; Hua et al. 1999).

1.2.2. Factores asociados a las Smads

Otro mecanismo por el cual las Smads podrían unirse al DNA es a través de la cooperación con otros factores de transcripción, con sitios de unión aledaños al elemento SBE, que pueden ayudar a estabilizar la interacción de las Smads a una secuencia específica del DNA (Seoane et al. 2004b). Las proteínas Smads pueden interactuar con un gran número de proteínas para modular su actividad transcripcional y tener un efecto sobre la transcripción de sus genes blanco. Como ejemplos específicos de genes que son regulados por las Smads están los genes *mix.2*, *goosecoid* y *xvent*, en donde se muestra que para cada gen se requiere una combinación específica de Smads y cofactores que puede regular negativa o positivamente la transcripción, a través de su interacción con otras proteínas como Fast-1, Fast-2, mixer, milk y OAZ, entre muchos otros factores (ver una lista en la Tabla 1).

Las diferentes combinaciones de Smads, ya sea al formar complejos entre ellas o por su asociación con otros factores de transcripción, resulta en una gran gama de variaciones en la composición de complejos transcripcionales, lo cual hace a las proteínas Smad altamente versátiles. En la actualidad diferentes grupos de trabajo están enfocados a dilucidar los mecanismos transcripcionales que utilizan las Smads para activar o inclusive para reprimir la transcripción de los genes blanco del TGF- β , para generar una respuesta celular específica. Algunos ejemplos incluyen el caso del gen *mix.2* en *Xenopus* en el que se describió la necesidad de un factor adicional para la unión de las Smads al promotor del gen *mix.2*, y en donde se observó que las proteínas Smad2/4 se unían al factor Fast1, de la familia de factores “forkhead”, para interactuar con el promotor y así activar la transcripción del gen (Chen et al. 1997; Liu et al. 1997a; Chen et al. 2002b).

Smad	Proteína Asociada	Efecto de la Asociación	Referencia
Smad2 (MH1)	Sp1	Cooperación en la activación de genes que responden al TGF- β	(Feng et al. 2000)
	YY1	Forma parte del complejo transcripcional de Smad y GATA	(Kurisaki et al. 2003; Lee et al. 2004)
Smad2 (“linker”)	Smurf2	Permite la ubiquitinación de Ski y SnoN por Smurf2	(Bonni et al. 2001)
Smad2 (MH2)	Milk/Mixer	Reclutamiento de Smad2 y Smad4 a los promotores de genes que responden a activinas	(Germain et al. 2000; Randall et al. 2002)
	SARA	La interacción permite la localización de Smad2 en la membrana plasmática	(Tsukazaki et al. 1998)
	Ski	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Akiyoshi et al. 1999; Luo et al. 1999)
	SnoN	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Stroschein et al. 1999b)
	p300/CBP	Incrementa la activación transcripcional de las Smads a través de la acetilación de histonas	(Pouponnot et al. 1998)
Smad3 (MH1)	GATA3	Reclutamiento de Smad3 a los sitios GATA para cooperar en la activación transcripcional	(Blokzijl et al. 2002)
	YY1	Forma parte del complejo transcripcional de Smad y GATA	(Kurisaki et al. 2003; Lee et al. 2004)
Smad3 (MH1-“linker”)	CEBP α , β , δ	Smad3 inhibe la transactivación por CEBP	(Coyle-Rink et al. 2002; Choy and Derynck 2003)
Smad3 “linker”	Smurf2	Permite la ubiquitinación de Ski y SnoN por Smurf2	(Bonni et al. 2001)
Smad3 (MH2)	E2F4/5	Reclutamiento de p107 a Smad3 para la represión de c-myc	(Chen et al. 2002a)
	ATF3	Represión de Id1	(Kang et al. 2003)
	Receptores ácido retinóico (RAR)	Coactivadores para la regulación de genes que responden al TGF- β	(La et al. 2003)
	p300	Incrementa la activación transcripcional de las Smads a través de la acetilación de histonas	(Seoane et al. 2004a)
	Ski	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Akiyoshi et al. 1999) (Luo et al. 1999)
	SnoN	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Stroschein et al. 1999b)
Smad4 (MH1)	YY1	Forma parte del complejo transcripcional de Smad y GATA	(Kurisaki et al. 2003; Lee et al. 2004)
Smad4 (MH2)	Sp1	Cooperación en la activación de genes que responden al TGF- β	(Feng et al. 2000; Pardali et al. 2000)
	Ski	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Akiyoshi et al. 1999) (Luo et al. 1999)
	SnoN	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Stroschein et al. 1999b)
Smad2/Smad3 (MH1)	FoxO	Regulación de p21Cip1	(Seoane et al. 2002)
Smad2/Smad3 (MH2)	FoxH1/Fast	Regulación de los genes con elementos de respuesta a activina	(Chen et al. 1997; Labbe et al. 1998)
	Ski	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Akiyoshi et al. 1999; Luo et al. 1999)
	SnoN	Inhibición de la actividad transcripcional de Smad2	(Stroschein et al. 1999b)
	p300/CBP	Incrementa la activación transcripcional de las Smads a través de la acetilación de histonas	(Pouponnot et al. 1998)
Smad2/Smad3	Menina	Facilita la interacción Smad – DNA	(Kaji et al. 2001)
Smad3/4 (MH1)	TFE3	Cooperación para la transactivación de genes que reponden al TGF- β como PAI-1 o Smad7	(Hua et al. 1999; Hua et al. 2000; Kawata et al. 2002)

Tabla 1. Lista de algunos de los factores y cofactores de transcripción que interaccionan con las proteínas Smads. En algunos casos esta definido el dominio de interacción de las proteínas Smads que media la asociación con otras proteínas.

Uno de los pocos ejemplos que existen de regulación transcripcional específica, a través de las proteínas Smads, se presenta en el gen *gooseoid*. En el promotor de este gen se describió la unión de un complejo transcripcional formado por el factor Fast2/Smad2/4 que conduce a la activación de la transcripción del gen. Sin embargo, si en el complejo se encuentra Smad3 en lugar de Smad2, no habrá una activación de la transcripción sino que el gen permanecerá inactivo (Labbe et al. 1998). En otro ejemplo sobre la interacción de las Smads con otros factores de transcripción se encontró en el promotor del gen *p21ip*, el cual contiene un SBE y río arriba un elemento de unión a forkhead (FHBE), donde pueden interaccionar los factores FoxO1, FoxO3a y FoxO4, para ayudar a reclutar a Smad3 y así inducir la transcripción (Seoane et al. 2004b). La transcripción del gen puede ser regulada negativamente por el factor FoxG1, otro factor de la familia Fox, formando un complejo transcripcionalmente inactivo que puede funcionar en momentos específicos del desarrollo neuroepitelial (Seoane et al. 2004b).

1.2.3 Smad7

La proteína Smad7 utiliza dos mecanismos para inhibir negativamente la señal del TGF- β . Uno es la unión directa a los complejos activos de los receptores del TGF- β , como ya se mencionó anteriormente (Hayashi et al. 1997; Nakao et al. 1997). Pero además, puede ejercer efectos inhibidores, al formar complejos con Smurf2, una ligasa E3 de ubiquitina y unirse al complejo de receptores activos del TGF- β , los cuales son ubiquitinados y enviados a degradación por el proteosoma (Kavsak et al. 2000). En ambos casos el resultado final será una regulación negativa de la vía de señalización del TGF- β .

El gen de Smad7 fue identificado con base en su similitud con las otras Smads, y el papel de la proteína fue dilucidado por medio de experimentos con genes reporteros, en los que se observó que tenía un papel negativo en la señalización del TGF- β (Hayashi et al. 1997; Nakao et al. 1997). Los análisis de los perfiles de expresión de Smad7 revelaron que los niveles de RNAm de este

gen aumentan en las células tratadas con TGF- β , sugiriendo que esta proteína forma parte de un mecanismo de retroalimentación negativa para terminar con las señales de la vía del TGF- β (Nakao et al. 1997), y en el que el promotor del gen es el blanco de las Smads activas (Nagarajan et al. 1999).

El promotor del gen de Smad7 fue clonado y su caracterización permitió definir una región mínima, de aproximadamente 500 pb entre el nucleótido -408 y el +112 bp, que contiene un SBE y que podía inducir la transcripción en construcciones con genes reporteros en células estimuladas con TGF- β (Nagarajan et al. 1999). El SBE del promotor de Smad7 está conformado por la secuencia palindrómica ideal para la unión de las Smads, siendo el primer promotor de vertebrados donde se localizó este elemento y que al parecer puede unir a las Smads sin la participación de ningún otro factor o cofactor transcripcional (Nakao et al. 1997; Afrakhte et al. 1998; Denissova et al. 2000; Denissova and Liu 2004). Sin embargo, existen reportes que señalan que se necesita la cooperación de los factores Sp1 y AP-1 para la transcripción eficiente del gen *smad7* (Brodin et al. 2000; Stopa et al. 2000). Experimentalmente se ha identificado la participación de otros factores transcripcionales en la regulación de *smad7*, como la participación de TFE3, que se une a una E-box adyacente al elemento SBE en el promotor de *smad7*, regulando positivamente la transcripción del gen a través de su interacción con Smad3 (Hua et al. 2000).

El análisis de los factores transcripcionales que pueden unirse al promotor de *smad7* muestra la presencia de los sitios de unión para los factores antes mencionados, aunque un análisis más detallado muestra además que existen sitios potenciales de unión a otros factores transcripcionales cercanos al SBE, que pueden participar en la regulación de la transcripción de este gen, como son NF-InsE2, NF-Inst3, USF, c-myc, y ATF/CREB (Fig. 4).

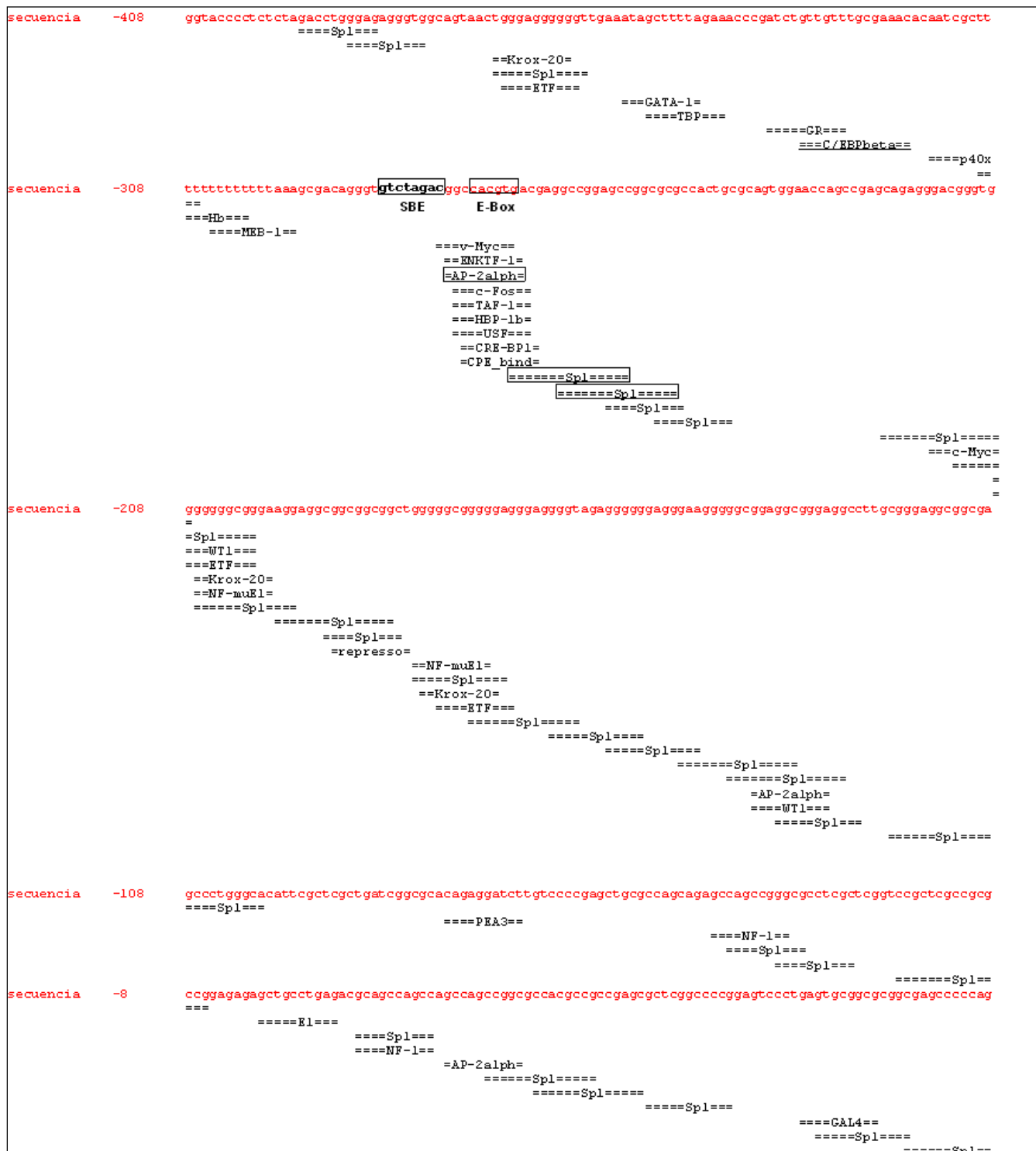


Figura 4. Unión de factores de transcripción al promotor del gen *smad7*. La secuencia de DNA que corresponde al promotor esta en la parte superior y los factores se muestran en la parte inferior, alineados con el sitio de unión al DNA que le corresponde. Este desplegado se generó por medio del programa AliBaba 2.1. Los factores en un recuadro son para lo que se tiene evidencia experimental de su participación en la regulación transcripcional del gen.

La participación de otros factores de transcripción en la regulación de la transcripción de *smad7* se apoya en el hecho de que la transcripción de este gen puede ser inducida por otros estímulos además del TGF- β , como las activinas o las BMP (Afrakhte et al. 1998). Otros factores de crecimiento como el EGF, el IFN γ , así como los ésteres de forbol, también pueden inducir la transcripción de *smad7*, (Nakao et al. 1997; Afrakhte et al. 1998; Denissova et al. 2000; Denissova and Liu 2004).

Se han detectado alteraciones en los niveles normales de Smad7 en diferentes enfermedades, probablemente debido a su importancia en la modulación de la señal del TGF- β (Nakao et al. 2002). Por ejemplo, los niveles de Smad7 que son bajos en células epiteliales normales, sufren una elevación en diferentes tipos de cáncer (Kleeff et al. 1999; Monteleone et al. 2001; Liu et al. 2003; Halder et al. 2005; Kuang et al. 2006) o pueden presentarse mutaciones en Smad7 que están también asociadas con este tipo de padecimientos (Fukushima et al. 1993; Wang et al. 2000).

Otra de las enfermedades en las que Smad7 está involucrada es la enfermedad de Crohn, en la cual hay un exceso en los niveles de Smad7, que resulta en una inhibición en la señal del TGF- β (Monteleone et al. 2001; MacDonald et al. 2005). En otra enfermedad denominada escleroderma, donde hay un desarrollo de lesiones cutáneas, la proteína Smad7 no se expresa eficientemente, por lo que hay una potenciación en la señal del TGF- β , que conduce a alteraciones en las proteínas de matriz extracelular (Dong et al. 2002). En los modelos animales y con estudios en pacientes también ha demostrado la importancia fisiológica de Smad7, ya que una regulación negativa en los niveles de Smad7 por medio de oligonucleótidos antisentido o RNA de interferencia, inhiben la respuesta proinflamatoria (Monteleone et al. 2001) y fibrótica (Nakao et al. 1999; Li et al. 2002; Dooley et al. 2003).

1.3. LAS ONCOPROTEÍNAS Ski Y SnoN

La proteína v-Ski (Ski, Sloan-Kettering Institute) fue identificada en estudios sobre los mecanismos de transformación que utilizaban los retrovirus del grupo Sloan-Kettering de pollo (Li et al. 1986), en donde se observó que esta proteína era responsable de la transformación de fibroblastos de pollo (Li et al. 1986). En células eucariontes fueron identificadas oncoproteínas homólogas a v-Ski. La primera de ellas se denominó, c-Ski, y la que fue identificada posteriormente se nombró Sno (Ski-novel related gene) (Li et al. 1986; Colmenares and Stavnezer 1990).

Ambas proteínas pertenecen a la familia de proto-oncogenes ski/sno. Tanto Ski como Sno tienen un alto grado de similitud en sus secuencias de aminoácidos en la región del extremo amino terminal, siendo ésta la región esencial para mediar la transformación en células normales. En la región del carboxilo solo se conservan algunas secuencias repetidas y el dominio de dimerización, conformado por α -hélices estructuradas en cremalleras de leucina (Heyman and Stavnezer 1994).

Ski y SnoN, como se ha mencionado previamente, son importantes reguladores de la señalización del TGF- β a través de su interacción con las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4. Los modelos por lo cuales modulan negativamente la actividad transcripcional son dos (Fig 5B). En el primero las Smads al unirse a Ski y/o SnoN no podrían llegar a las secuencias blancas en el promotor, por lo que habría un secuestro de las Smads (Stroschein et al. 1999b; ten Dijke et al. 2000; Liu et al. 2001); en el segundo modelo del mecanismo de inhibición, Ski y SnoN se unirían a los complejos activados de las Smads en el DNA, para reclutar a correpresores transcripcionales como las proteínas N-CoR y mSin3, que pueden interaccionar con desacetilasas de histonas (HDAC) e inhibir la transcripción de los genes en cuyos promotores se encuentran situadas estas proteínas (Krakowski et al. 2005). Ambos modelos no son mutuamente excluyentes, por lo que pudiera ser que para la regulación de algunos genes

funcionara alguno de ellos, o que para la regulación de otros genes los dos estuvieran funcionando al mismo tiempo. La asociación de Ski y SnoN con N-CoR/SMRT es a través del amino-terminal, específicamente con un región rica en cisteínas, mientras que el carboxilo-terminal de Ski y SnoN interacciona con mSin3A (Nomura et al. 1999).

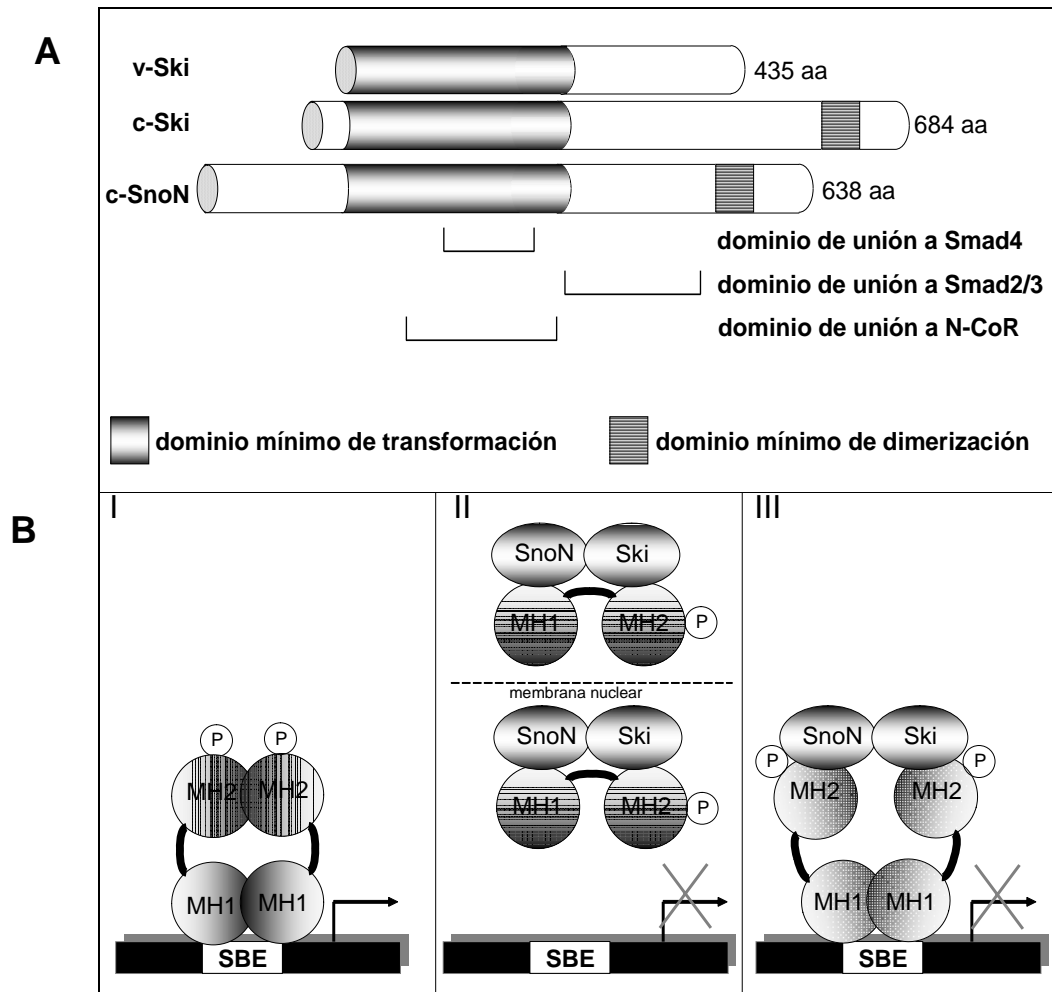


Figura 5. A. Esquema que representa los dominios de las proteínas Ski y Sno. **B.** Modelos de los mecanismos de represión de Ski y SnoN sobre las proteínas Smads. **I.** Las proteínas Smads se unen a los elementos SBE que se localizan en los promotores de genes, induciendo su transcripción. **II.** El efecto transactivatorio de las Smads es inhibido por las proteínas Ski y SnoN, que se asocian a las Smads, ya sea en el citoplasma o en el núcleo, impidiendo que se unan a los elementos SBE y por lo tanto, bloqueando la transcripción de los genes. **III.** Un mecanismo alternativo que utilizan Ski y SnoN para inhibir a las Smads es bloquear el dominio de transactivación de las Smads y el reclutamiento de correpresores que van a inhibir a la transcripción de los genes blancos de las Smads.

La asociación de Ski y SnoN con las proteínas Smads fue descubierta en mutantes de la proteína Smad3, que mimetizaban la fosforilación por el T β RI dependiente de ligando (las serinas de la secuencia SSXS del carboxilo se sustituyeron por aspartato), que tenían la propiedad de transactivar genes reporteros en ausencia de ligando (Liu et al. 1997b). Al estudiar a las proteínas asociadas a esta mutante de Smad3 se identificaron a Ski y a SnoN y se verificó que la Smad3 silvestre también podía interactuar con Ski y SnoN, aunque sólo después del estímulo con TGF- β .

Ski y SnoN son proteínas ubicuas cuya expresión no parece ser regulada, excepto en momentos específicos del desarrollo, como en el caso de Ski que se ha relacionado con la diferenciación de músculo o la diferenciación neuronal (Lyons et al. 1994; Namciu et al. 1995; Pelzer et al. 1996; Pearson-White and Crittenden 1997). Un evento específico donde se ha observado un nivel aumentado de SnoN y Ski es en la regeneración hepática, en donde se le ha relacionado con una resistencia transitoria de las células a los efectos antiproliferativos del TGF- β , permitiendo la proliferación celular (Macias-Silva et al. 2002). De manera similar, se han observado niveles incrementados en la expresión de Ski y SnoN en ciertos tipos de cáncer, donde éstas proteínas Ski y SnoN están mediando efectos de transformación celular (Colmenares and Stavnezer 1990; Boyer et al. 1993).

El TGF- β ejerce un control de los niveles de las proteínas Ski y SnoN y del RNAm de SnoN. Los niveles de las proteínas Ski y SnoN disminuyen drásticamente después del tratamiento con TGF- β , a través del mecanismo de ubiquitinación-proteosoma, que como se mencionó, es el mecanismo a través del cual se degradan otros componentes de la vía del TGF- β (Stroschein et al. 1999b; Sun et al. 1999). En este mecanismo de degradación, las proteínas Smad2/3 fosforiladas pueden interactuar con Ski y SnoN y se encargan de reclutar a las ligasas E3 de ubiquitina Smurf-2 y APC, a través de una interacción directa con ambas (Bonni et al. 2001; Wan et al. 2001). Esta degradación de Ski y SnoN

puede ser necesaria para que las proteínas Smads puedan llegar a sus genes blanco, evitando que interfieran con la señal del TGF- β . A las dos horas posteriores al tratamiento con TGF- β , se observó un aumento en la transcripción del gen *sno*, que es posible que ocurra como un mecanismo para finalizar con la señal de esta citocina y llevar a la célula a un estado basal en el que sea capaz de recibir otro estímulo.

Las proteínas Ski y SnoN tienen otras funciones además de ser correpresores de la señal del TGF- β . Se ha considerado que ambas proteínas pueden tener un papel como oncoproteínas, ya que un aumento en la expresión de las proteínas Ski y SnoN conduce a una transformación de fibroblastos, sin que exista alguna mutación en las proteínas (Colmenares et al. 1991). Además, en diferentes tipos de cáncer como neuroblastomas, melanomas, de mama, de estómago, colón, entre otros, se han detectado niveles de expresión elevados de Ski y SnoN (Nomura et al. 1989; Fumagalli et al. 1993; Reed et al. 2001). Por otra parte, puede ser que Ski y SnoN también pueden ejercer cierto papel como supresores de tumores, ya que ratones heterocigos para Ski y SnoN tienen una mayor susceptibilidad para desarrollar tumores con químicos tumorigénicos (Shinagawa et al. 2000; Shinagawa et al. 2001). Por lo tanto, la participación de estas proteínas en el desarrollo de tumores o cáncer parece ser compleja y se necesitan estudios más detallados para determinar su papel en la regulación de estas enfermedades.

Por otro lado, aunque entre Ski y SnoN hay una alta similitud en estructura y función, existen datos que apuntan a que cada una de ellas tiene un papel específico, por lo que a continuación se presentan datos propios para cada una de estas proteínas.

1.3.1. Ski

La proteína Ski contiene 728 aminoácidos, siendo la parte amino terminal la más conservada entre los miembros de esta familia de oncoproteínas (Liu et al. 2001). Estudios de cristalografía revelan que Ski puede interactuar con el dominio MH2 de la proteína Smad4, mediante un asa denominada “I-loop” en Ski y la región L3 de Smad4 (Wu et al. 2001).

El gen de *ski* es esencial para el desarrollo, ya que los ratones “knockout” para *ski* mueren en la etapa perinatal, con una alta proporción de exencefalia (el cerebro se localiza fuera del cráneo) y fisura craneal debida a fallas en el cierre neural (Berk et al. 1997).

A diferencia de SnoN, la proteína Ski tiene un papel específico en el desarrollo embrionario, ya que participa en el establecimiento de los linajes celulares neuronales y musculares, en diferentes modelos animales (Amaravadi et al. 1997; Kaufman et al. 2000). Esta función de Ski depende de su capacidad de unión a las Smads y de la inducción transcripcional de genes tejido-específicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de *ski* induce la formación del eje neuronal secundario y la expresión de genes neuronales en explantes de ectodermo en *Xenopus*, siendo esencial para este efecto, que esté intacta la región de interacción con las Smads (Amaravadi et al. 1997).

1.3.2. SnoN

El gen de *sno* se aisló basándose en su homología con c-Ski (Boyer et al. 1993), identificándose posteriormente sus ortólogos en ratón, *Xenopus*, pollo y pez cebra (Liu et al. 2001). La proteína Sno está compuesta de 684 aminoácidos y pueden haber diferentes isoformas, originadas a partir de un procesamiento alternativo de su RNAm, las cuales se denominan SnoN, SnoN2, Sno1 y SnoA (Nomura et al. 1989; Pearson-White 1993; Pearson-White and Crittenden 1997).

El ratón “knock-out” para el gen *sno* (-/-) muere en etapas embrionarias tempranas, ya que la proteína es requerida para la formación del blastocisto (Shinagawa et al. 2000). El ratón heterócigo para *Sno* (+/-), de manera inesperada, presenta una alta propensión al desarrollo de tumores inducidos por compuestos carcinogénicos, además de presentar desarrollos espontáneos de linfomas (Shinagawa et al. 2000). Lo anterior ha llevado a proponer que *SnoN* puede tener un papel dual, ya que bajo ciertas condiciones puede actuar como oncogen y en otras funcionar como supresor de tumores. El ratón heterócigo también muestra una elevación en la proliferación de células T y fibroblastos embrionarios, en comparación de las células con los genes intactos, lo cual es un resultado inesperado, ya que en este tipo de ratones se esperaría una potenciación de los efectos del TGF- β y por lo tanto, una disminución en la tasa de proliferación (Shinagawa et al. 2000), como ocurre en un segundo ratón “knock-out” del gen *sno* donde se deletó el exón 1, y que a diferencia del primero no es letal y si presenta una disminución en la tasa de proliferación celular (Pearson-White and McDuffie 2003).

En otros estudios sobre el papel de *SnoN* con RNAi se observó una disminución en los niveles de *SnoN* que conducía a una inhibición en la inducción transcripcional de genes reporteros que responden al TGF- β , así como a una menor inhibición de la proliferación celular causada por esta citocina (Sarker et al. 2005). Este efecto dependía del contexto celular, ya que no se observaba en todos los tipos celulares. Este efecto sólo se observó en células epiteliales de pulmón, Mv1Lu y no en células de HeLa o HaCaT (Sarker et al. 2005). Lo anterior sugiere que *SnoN* es mediador de algunos de los efectos que el TGF- β en una célula normal, y que por lo tanto no es sólo un regulador negativo de esta vía. Por lo tanto, es posible que *SnoN* cumpla funciones que no se han elucidado, sobre todo en células normales donde los niveles de esta proteína no han sido alterados, diferentes al papel celular de *SnoN* que se han observado hasta ahora en células cancerosas o transformadas, por lo que son necesarios más estudios sobre el tema.

1.4. ANTECEDENTES PARTICULARES

Ski y SnoN son capaces de reprimir la actividad transcripcional de las proteínas Smads en experimentos con genes reporteros bajo el control de la región promotora de *smad7*, por lo cual es necesario investigar cuál es la participación de estas proteínas en la represión de este gen. Recientemente se estableció que Ski es necesario para reprimir la actividad transcripcional del gen *smad7* en el estado basal (Denissova and Liu 2004). Este complejo represor, en el que se encuentra Ski, se desensambla del promotor cuando las células son tratadas con TGF- β ; ya que el TGF- β promueve la degradación de Ski y permite la unión de los complejos Smad2/3/4 activados en el elemento SBE y regular positivamente la transcripción del gen (Denissova and Liu 2004). En este mismo reporte se muestra, mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, que en condiciones basales Ski interacciona con Smad4 y ambos se unen al sitio SBE, actuando como un represor transcripcional (Denissova and Liu 2004).

1.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el estudio de los mecanismos que utilizan las Smads para mediar la regulación transcripcional de genes, se necesitan de promotores que sean regulados directamente por estas proteínas. Al ser *smad7* un gen que es inducido por TGF- β y que cuenta en la secuencia de su promotor cuanta con un SBE se pensó en usar a este gen para el estudiar el efecto que tenían Ski y SnoN en la actividad transcripcional de las Smads. Al publicarse el trabajo del grupo de Fang Liu (2004) se estableció corroboró la participación de Ski en la regulación de Smad7, aunque no se observó la participación directa de SnoN. Por el contrario, en este trabajo nosotros observamos que tanto Ski como SnoN se unían al promotor de *smad7* y estudiamos el papel de la proteína SnoN en la regulación del promotor de *smad7*. Para investigar cuál era la participación de SnoN en la represión de este gen, utilizamos como estrategia la regulación negativa de los niveles de SnoN en la célula y ver el efecto que éste tenía en los niveles de transcripción del gen *smad7*. Para lo lograrlo, se utilizó la degradación selectiva de

SnoN y Ski en células A549 causada por anisomicina, siendo éste el único mecanismo hasta el momento reportado en el que se pueden regular negativamente los niveles de esta proteína de forma independiente de TGF- β y que fue reportado por nuestro grupo de trabajo (Vazquez-Macias et al. 2005). Nuestro trabajo sugiere que SnoN también se une a la región promotora de *smad7* a través del elemento SBE, de manera similar a como lo hace Ski, y por lo tanto parece participar en la regulación transcripcional de *smad7* a través de la represión del gen.

1.6. HIPÓTESIS

Los complejos formados por Ski y SnoN son capaces de interaccionar con las Smads y disminuir su actividad transcripcional, reprimiendo así a genes activados por las señales del TGF- β . La proteína Ski se une al elemento SBE del promotor de *smad7*, regulando negativamente la transcripción del gen, por lo tanto, la proteína SnoN también podría unirse al promotor de *smad7* y participar en la represión de este gen.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo General

- Determinar si existe la unión de la proteína SnoN al promotor del gen *smad7* y cual es su papel en la regulación de la expresión de este gen en el contexto de la vía de señalización del TGF- β .

1.7.2. Objetivos particulares

- Determinar si existe la unión de la proteína SnoN al promotor del gen *smad7* en células HepG2 y A549 estimuladas con TGF- β .
- Determinar cual es el efecto de SnoN sobre la expresión del gen de *smad7* en células HepG2 y A549 tratadas con TGF- β .
- Evaluar los niveles de las proteínas SnoN y Ski en células HepG2 y A549 tratadas con TGF- β .

... y sin quererlo me encontré contra su cuerpo, sintiendo su calor, y el perfume acre de unos ungüentos desconocidos. Recordé: "¡Hijos, nada puede el hombre, cuando llega el loco amor!" y comprendí que, ya fuese lo que sentía una celada del enemigo o un don del cielo, nada podía hacer para frenar el impulso que me arrastraba y grité: "¡O, languero!" y: "Causa languoris video nec caveo" Porque además un olor de rosas emanaba de sus labios y era bellos sus pies en las sandalias, y las piernas eran como columnas, y como columnas también sus torneados flancos, dignos del más hábil escultor "¡Oh, amor, hija de las delicias! Un rey ha quedado preso en tu trenza"

El nombre de la rosa
Umberto Eco

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. REACTIVOS

La mayor parte de los reactivos utilizados fueron adquiridos a través de la compañía Sigma-Aldrich, a excepción de aquellos donde se especifique lo contrario. El TGF- β 1 fue obtenido de Pepro Tech. La tricostatina (TSA) fue adquirida de Tocris. Los anticuerpos Smad2/3, SnoN y Ski se compraron de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo anti-fosfo-Smad2 se adquirió de Chemicon. Los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-cabra acoplados a peroxidasa fueron adquiridos de Zymed.

2.2. LÍNEAS CELULARES

Las células A549 (carcinoma de pulmón de humano) se cultivaron con medio F12-Ham's (Gibco BRL). Las células HepG2 (hepatoma de humano) se cultivaron en medio DMEM (Gibco BRL). En todos los casos el medio se complementó con 10% de suero fetal bovino (Miticell, Wisent), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin e incubadas en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C. Para los tratamientos con TGF- β las células se ayunaron una noche previa al experimento en medio con 0.2 % de suero fetal bovino, con lo cual se evita que los factores de crecimiento que éste contiene enmascaren el efecto del TGF- β . La concentración de TGF- β utilizada fue de 300 picomolar (0.3 nM), excepto en los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina donde la concentración utilizada fue de 0.5 nM.

2.3. INMUNOPRECIPITACIONES Y WESTERN BLOT

Los extractos de proteína y Western blots se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado por Macías-Silva *et al.* (2002). Las células fueron lisadas con el buffer TNTE 0.5 % conteniendo una mezcla de diferentes inhibidores de proteasas y

fosfatasa (se detalla en el apéndice). Los extractos de proteína se mezclaron de 15-30 min en agitación a 4 °C, después se centrifugaron por 15 min a 15 000 r.p.m. Los sobrenadantes se guardaron a -70 °C hasta el momento de utilizarse.

Para las inmunoprecipitaciones (IP) se utilizaron 2 mg de proteína de los extractos totales por cada punto experimental, se incubaron con 3 µl del anticuerpo correspondiente durante toda la noche. Al día siguiente se agregaron 60 µl de proteína G-agarosa (Invitrogen) diluída 1:5 con el buffer TNTE 0.1 % (ver Apéndice) y se incubaron durante 3 h. Los complejos con la proteína G-agarosa se lavaron 3 veces centrifugando a 15 000 r.p.m. durante 10 s y agregando el buffer TNTE 0.1% para resuspender a la proteína. Los pellets de proteína G-agarosa fueron solubilizados en 20 µl de solución Laemli y hervidos por 5 min a 100 °C. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 7.5% y fueron transferidos a una membrana de PVDF. La inmunodetección de las proteínas de interés se llevó a cabo por la incubación de las membranas con anticuerpos primarios específicos durante toda una noche, seguida por una incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa, que se detectó empleando el ensayo de quimioluminiscencia (kit ECL de Amersham, Life Sciences). Los experimentos se repitieron 3 veces de forma independiente y en la figura solo se muestra un experimento representativo. Las densitometrías se llevaron a cabo con el equipo Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290.

2.4. ENSAYO DE LUCIFERASA

Para el ensayo de luciferasa, las células A549 y HepG2 fueron transfectadas transitoriamente usando lipofectamina (InVitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Entre los plásmidos empleados está el gen reportero de la luciferasa bajo el control de una región del promotor de *smad7* que contiene al SBE (-408/+112), donado por el Dr. Yan Chen. (Nagarajan *et al.*, 1999). En otros ensayos las células se cotransfectaron con los plásmidos que contenían a

los DNAs completos de Ski y SnoN y con un plásmido que tenía al gen de la β -galactosidasa bajo el promotor CMV (pCMV- β gal) que sirvió para normalizar la actividad de luciferasa.

2.5. RT-PCR

Las células se preincubaron 20 min en presencia de cicloheximida (20 μ g/ml) se trataron con TGF- β a diferentes tiempos. El RNA se aisló por medio del reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor. Para la síntesis del DNAs se usaron 2 μ g de RNA, con hexámeros al azar y la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT (Invitrogen). Se realizaron PCRs con el DNAs como molde y oligonucleótidos específicos para los genes *smad7*, *sno* y *β -actina* (la secuencia se especifica en la Tabla 2), con un ciclo de 30' a 95 °C de desnaturalización, 30' a 55 °C de alineamiento y 30' a 72 °C de elongación. En la PCR se utilizó la Taq polimerasa del PCR Master Mix (Qiagen). Para el gen *smad7* se utilizaron 24 y 28 ciclos de amplificación en células A549 y HepG2, respectivamente. Para β -actina se usaron 16 ciclos y para SnoN se usaron 21 ciclos para ambos tipos celulares. Para todos los casos se determinó que el número de ciclos de amplificación se encontrara dentro del intervalo lineal de la señal. Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% y las bandas correspondientes al producto de interés se cuantificaron por medio de densitometrías con el equipo Kodak EDAS 290.

2.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

2.6.1. Preparación de la cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó con base al método reportado por Weinmann *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Las células se utilizaron a un 70 % de confluencia y con ayuno desde la noche previa al experimento. Las células se trataron con formaldehído al 1% a 37 °C durante 20 min, para entrecruzar a las proteínas con el DNA, la reacción se detuvo incubando las células con glicina 0.2 M, en hielo durante 5 min. Las células se lavaron con

PBS y se recolectaron en esta misma solución. Para la extracción de núcleos, la pastilla de células se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis (buffer 1, consultar apéndice) y se incubó durante 10 min a 4 °C en agitación moderada, luego se centrifugó a 2000 r.p.m. La pastilla obtenida se agitó por 10 min a 4 °C y se resuspendió en 4 ml de buffer 2. La pastilla formada por los núcleos de las células, se resuspendió en 3 ml de buffer 3 y se sonicó 10 veces en hielo, con ciclos de 30 s de sonicación y 1 min de descanso, con una potencia del sonicador Fisher Sonic Dismembrator 300. La cromatina obtenida se preincubó con 30 µl de proteína G-agarosa bloqueada (consultar apéndice), mezclando suavemente durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó a 15, 000 g, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo y guardándolo a -70 °C. Este paso es necesario para eliminar a las proteínas que se podrían unir inespecíficamente a la proteína G-agarosa e incrementar el ruido de fondo o dar un falso positivo en el PCR final.

2.6.2. Inmunoprecipitación de cromatina

La cromatina “limpia” se utilizó para la inmunoprecipitación de las proteínas de interés, se utilizaron 250 µl de cromatina, 250 µl de buffer de precipitación (consultar apéndice) y las siguientes cantidades de anticuerpos: 5 µl de anti-Ski, 5 µl de anti-Smad2/3 y 5 µl de anti-cabra IgG; este último se usó como un control negativo de la inmunoprecipitación. En este punto se tomó 100 µl de cromatina por cada condición experimental en un tubo que se nombró “input”, que sirvió para verificar que se partió de la misma cantidad de cromatina. Esta mezcla se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave y constante, al día siguiente se agregaron 20 µl de proteína G-agarosa y se incubaron los tubos a 4 °C durante 3 h en agitación suave y constante. Las muestras posteriormente se centrifugaron a 15 000 r.p.m. por 10 s, se desechó el sobrenadante y se agregó el buffer de lavado (ver apéndice), lavando las perlas 7 veces en total. La pastilla de proteína G-agarosa se resuspendió en 100 µl de TE, se agregó 1 µl de RNasa, 5 µl de SDS 10 % y 1 µl de proteinasa K a 20 mg/ml. La misma cantidad de RNasa, SDS y proteinasa K se agregó a los tubos “input” de cada condición experimental. Todas

las muestras se pusieron a incubar a 55 °C por 3 h, después se cambió la temperatura a 65 °C y se incubó toda la noche.

2.6.3. Recuperación del DNA

Posteriormente los tubos se centrifugan 5 s a 15 000 r.p.m. y el sobrenadante se recupera en un tubo nuevo, se añadió 1 vol de fenol-cloroformo-isoamilico y se agitó vigorosamente por 10 s en el vortex y los tubos se centrifugaron a 15 000 r.p.m. a temperatura ambiente por 5 min. La fase acuosa (capa superior) se pasó a un tubo nuevo y se repitió el mismo proceso, pero agregando 1 vol. de cloroformo. Para las muestras denominadas "inputs", donde la concentración de proteínas es mayor, se realizó una extracción con cloroformo adicional. Al final la capa acuosa se recuperó y se puso a precipitar con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -70°C por al menos 30 min. La pastilla de DNA se resuspendió en 20 µl de H₂O y se guardó a -20 °C, hasta que se utilizó.

2.6.4. PCR

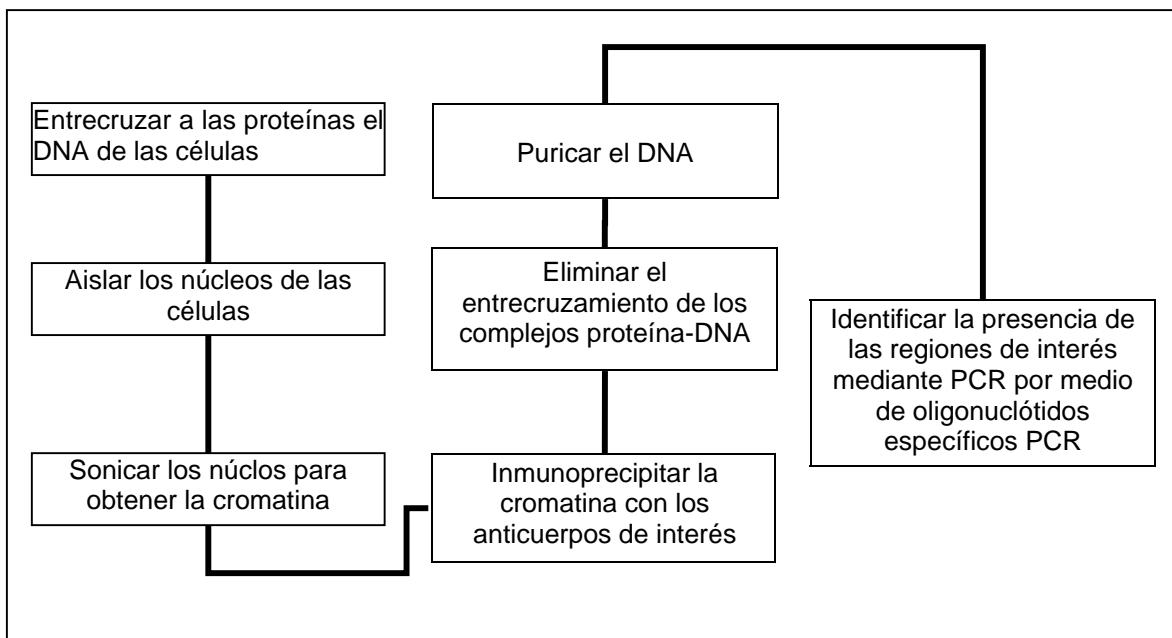
El SBE del promotor de Smad7 se localiza en el nucleótido -210, por lo que se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan esta región y que sirvieran como cebadores para la PCR, basándose en lo reportado por Denissova y Liu (2004). Esta secuencia se presenta en la Tabla 2; en donde también se muestran los oligonucleótidos que flanquean una región río arriba (upstream) y otra río abajo (downstream) del SBE, y que sirvieron de control negativo en la detección del elemento SBE por PCR. El programa de amplificación fue el siguiente: 1) 5 min a 95 °C, 2) 1 min a 95 °C 3) 1 min a 65 °C 4) 1 min a 72 °C 5) 5 min a 72 °C, con 25 ciclos de amplificación del paso 2 al 4.

Las muestras se corrieron en un gel nativo de acrilamida al 6 %, el cual se tiñó con bromuro de etidio al finalizar la corrida. Al gel se le tomó una fotografía bajo luz ultravioleta, y cada banda, correspondiente al producto de interés, se cuantificó por medio de densitometría con el equipo Kodak EDAS 290.

Blanco	Secuencia del cebador 5'-3'	Posición	Tamaño (bp)
Smad7			
sense	gcc ctc tct gga tat ctt ct	nt 843—862	319
antisense	gct gca taa act cgt ggt ca	nt 1162—1143	
SnoN			
sense	ctt ctg ctg tat ccc agt cta	nt 1950-1970	308
antisense	tca caa gaa gcg gag atg aag c	nt 2258-2237	
β-actina			
sense	ggg tca gaa gga ttc cta tg	nt 222—241	237
antisense	ggt ctc aaa cat gat ctg gg	nt 459—440	
Promotor S7			
sense	cct ctg ctc ggc tgg ttccac tgc	nt -142— -165	132
antisense	tag aaa ccc gat ctg ttg ttt gcg	nt -274— -251	
Upstream			
	tag aaa ccg gag ccc gga gct gag ag	nt -778— -753	140
	att tat acc gga ctg gac cga ggc	nt -638— -661	
Downstream			
	aaa gac cag aga ctc ccc taa acc	nt 584—607	131
	gct cct ctt cct ctc ctt ttc	nt 715—692	

Tabla 2. Se muestran los diferentes pares de oligonucleótidos empleados en las PCRs. En la primera columna se muestra el blanco, en la segunda columna la secuencia, en la tercera columna su posición en la secuencia de interés y en la última columna el tamaño del producto.

Un resumen de la estrategia experimental empleada para la ChIP se observan en el siguiente diagrama de flujo (Esquema 1).



Esquema 1. Resumen de los pasos principales que se realizan durante la técnica del ChIP.

Luego dio el paso final: lo buscó donde no estaba, lo volvió a buscar sin ilusiones y lo encontró inerte.

-Esta muerto –dijo él.

Le ocurría a menudo, de modo que había aprendido a vivir con aquel fantasma: cada vez había tenido que aprender otra vez, como si fuera la primera. Tomó la mano de ella y se la puso en el pecho: Fermina Daza sintió casi a flor de piel el viejo corazón incansable latiendo con fuerza, la prisa y el desorden adolescente. Él dijo: “Demasiado amor es tan malo para esto como la falta de amor”

El amor en los tiempos del cólera.

Gabriel García Márquez

3. RESULTADOS

3.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO DE Smad7 Y SnoN

El primer paso en este estudio fue caracterizar la respuesta de las células A549 y HepG2 a TGF- β , y determinar si la expresión de Smad7 es inducida por esta citocina, como se ha observado en otros trabajos (Nakao et al. 1997; Afrakhte et al. 1998; Denissova et al. 2000; Denissova and Liu 2004). Las células fueron incubadas con 0.3 nM de TGF- β por diferentes tiempos. El RNA total obtenido se utilizó en los experimentos de RT-PCR, para determinar los niveles de expresión de los RNA mensajeros de Smad7, de SnoN y de β -actina, siendo este último usado como control de carga del RNA. Los experimentos se llevaron a cabo con las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos.

Los resultados mostraron que el TGF- β incrementa la expresión del RNAm de Smad7 y de SnoN en ambos tipos celulares, de manera dependiente del tiempo de incubación. El nivel más alto de inducción para Smad7 (4 a 8 veces sobre el control) se observa a las 2 h posteriores al tratamiento con TGF- β en las células A549 (Fig. 6 A). Para SnoN se observó un aumento en los niveles de RNAm (3-4 veces sobre el control) desde 1 h hasta 3 h posteriores al tratamiento con TGF- β en las células A549 (Fig. 6 A). En el caso de las células HepG2, el nivel más alto de RNAm de Smad7 se observó a las 2 h, de forma similar a la que se observó en las células A549 (Fig. 6 B). Sin embargo, en el caso de SnoN el pico de inducción del RNAm se observa a 1 h de tratamiento con TGF- β , y un descenso en sus niveles en los tiempos más prolongados de incubación (Fig. 6 B).

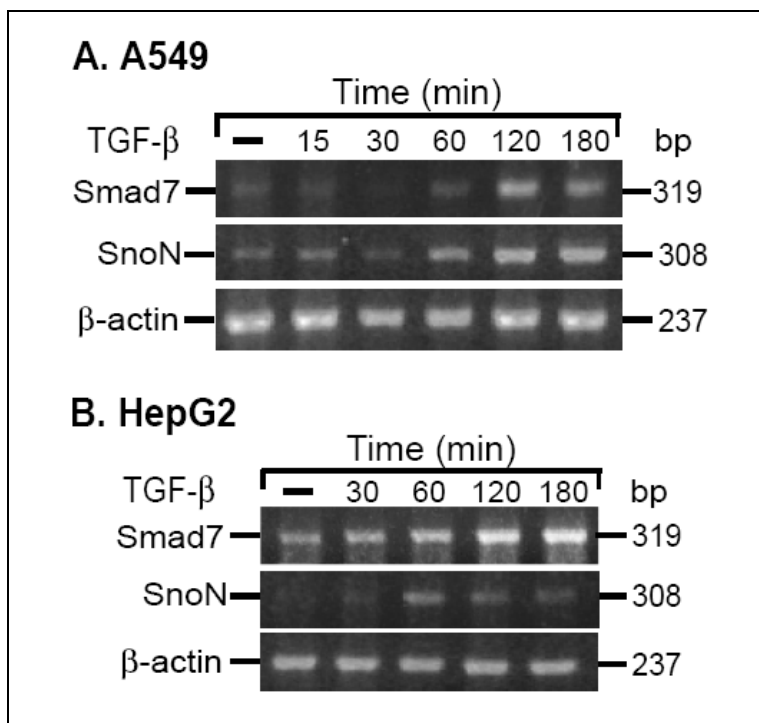


Figura 6. El TGF- β incrementa los niveles de RNAm de Smad7 y SnoN, tanto en células A549 (A) como HepG2 (B). Las células fueron pretratadas 20 min con cicloheximida 20 μ g/ml e incubadas en presencia o en ausencia de 0.3 nM de TGF- β a los tiempos indicados.

3.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS Ski Y SnoN EN RESPUESTA AL TGF- β

En las células A549 y HepG2, tratadas con 0.3 nM de TGF- β por diferentes tiempos, se observó una rápida degradación de la proteína SnoN, y una recuperación de los niveles de proteína 1 h posterior al estímulo. Cabe señalar que para el caso de las células A549, los niveles de proteína de SnoN superaron los niveles basales y se mantuvieron elevados hasta 3 h posteriores al tratamiento con TGF- β (Fig. 7A). En las células HepG2, hay una recuperación de los niveles de SnoN, aunque no se alcanzan los niveles basales a las 3 h posteriores a la incubación con TGF- β (Fig. 7B).

En las células A549 no se detectó a la proteína Ski por inmunoblot (datos no mostrados). Por el contrario, en las células HepG2 la proteína Ski es fácilmente detectable por esta técnica y su concentración es regulada negativamente por el

TGF- β de forma similar a SnoN. Sin embargo, en estas células no se observó una recuperación de los niveles de la proteína Ski, alcanzando la degradación total de la proteína a las 2 h de incubación.

La activación de la vía de señalización del TGF- β en estas células, se monitoreó midiendo los niveles de fosforilación de Smad2, observándose una rápida inducción de la fosforilación de esta proteína desde los 15 min de incubación con TGF- β , que se mantiene hasta las 2 h de tratamiento, y que posteriormente comienza a disminuir (Fig. 7 A y C).

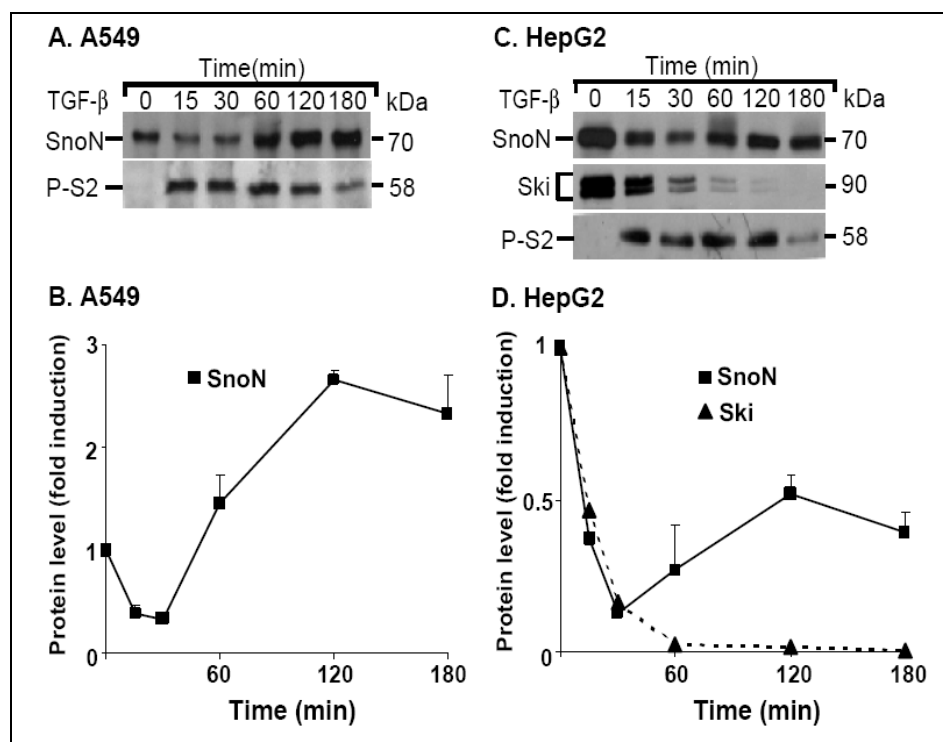


Figura 7. El TGF- β modula la expresión de los niveles de la proteína SnoN en células A549 y HepG2. Las células A549 (A) y HepG2 (C) fueron incubadas con 0.3 nM de TGF- β a los tiempos indicados. Los extractos totales fueron sometidos a IP con los anticuerpos indicados, cuya detección se hizo por un ensayo tipo Western-blot. Los niveles de fosforilación de Smad2 (P-S2) se detectaron para monitorear la activación de la vía del TGF- β . Densitometría de las proteínas SnoN en células A549 (B) y SnoN y Ski en células HepG2 (D), en ambos casos los resultados son los valores promedio de 3 experimentos independientes, \pm el error estándar.

3.3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE *Smad7* POR Ski Y SnoN

Para establecer el papel que tiene SnoN en la regulación de la transcripción de *smad7*, las células A549 y HepG2 se co-transfectaron con los DNAC de las proteínas Ski y SnoN, con el gen reportero de la luciferasa, que es controlado por el promotor de *smad7*. Los resultados mostraron que el promotor del gen *smad7* respondió al TGF- β , ya que indujo un aumento en la actividad de luciferasa de 2 o 3 veces con respecto al control, en ambos tipos celulares. Esta inducción se perdió cuando las células son cotransfectadas con los DNAC de SnoN o de Ski (Fig. 8 A y B).

Para continuar con el análisis del papel que tiene SnoN en la regulación de *smad7*, usamos a la anisomicina, un antibiótico que causa la degradación de las proteínas SnoN y Ski vía el proteosoma (Vazquez-Macias et al. 2005). En este trabajo la empleamos como una herramienta para estudiar los efectos del TGF- β en un contexto celular donde los niveles de Ski y SnoN sean bajos por haber sido tratadas con anisomicina. Las células fueron incubadas por 30 min en ausencia o presencia de 0.3 nM de TGF- β o de 10 μ M de anisomicina. Los resultados muestran que anisomicina, de forma similar al a como lo hace el TGF- β , es capaz disminuir el nivel proteico de SnoN (Fig. 8 C).

El trabajo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina que es un antecedente para este presente proyecto, fue también un trabajo de nuestro grupo, en el cual tuve la oportunidad de colaborar y cuyos resultados se plasman en una publicación adicional en la que participó como coautor (se anexa el artículo en el apéndice). Este artículo se muestra que la anisomicina enciende un mecanismo para inducir la degradación de Ski y SnoN independiente de la activación de las Smads, de las MAPK y de la inhibición de la síntesis de proteínas, y que es un mecanismo que depende de la actividad del proteosoma (Vazquez-Macias et al. 2005). También se estableció que compuestos similares a

la anisomicina como la cicloheximida, (otro inhibidor de la síntesis de proteínas y activa a las MAPK) y otros estímulos que conducen a la activación MAPK, no tienen efectos similares sobre los niveles de Ski y SnoN.

Al estudiar el efecto que una disminución en los niveles de SnoN tiene sobre los niveles transcripcionales del gen *smad7*, se cuantificó el RNAm de este gen por medio de RT-PCR en células A549 incubadas con 10 μ M de anisomicina. En células incubadas con TGF- β , se muestra un aumento en el nivel del mensajero con respecto al control (Fig. 8D, columnas 1 y 2). Las células que fueron preincubadas 30 min con anisomicina muestran un aumento en el nivel del mensajero con respecto al control, aunque este nivel se incrementa aún más en aquellas células que son pretratadas con anisomicina y posteriormente son tratadas con TGF- β (Fig. 8D, columnas 3 y 4). El tratamiento con tricostatina (TSA), el inhibidor de desacetilasas de histonas, que es el mecanismo de represión que pueden utilizar Ski y SnoN para inhibir la transcripción de sus genes blanco, muestra que aquellas células que fueron pretratadas con este compuesto también tienen niveles aumentados del mensajero del gen *smad7* y que aumenta al ser las células tratadas con TGF- β (Fig. 8D, columnas 5 y 6).

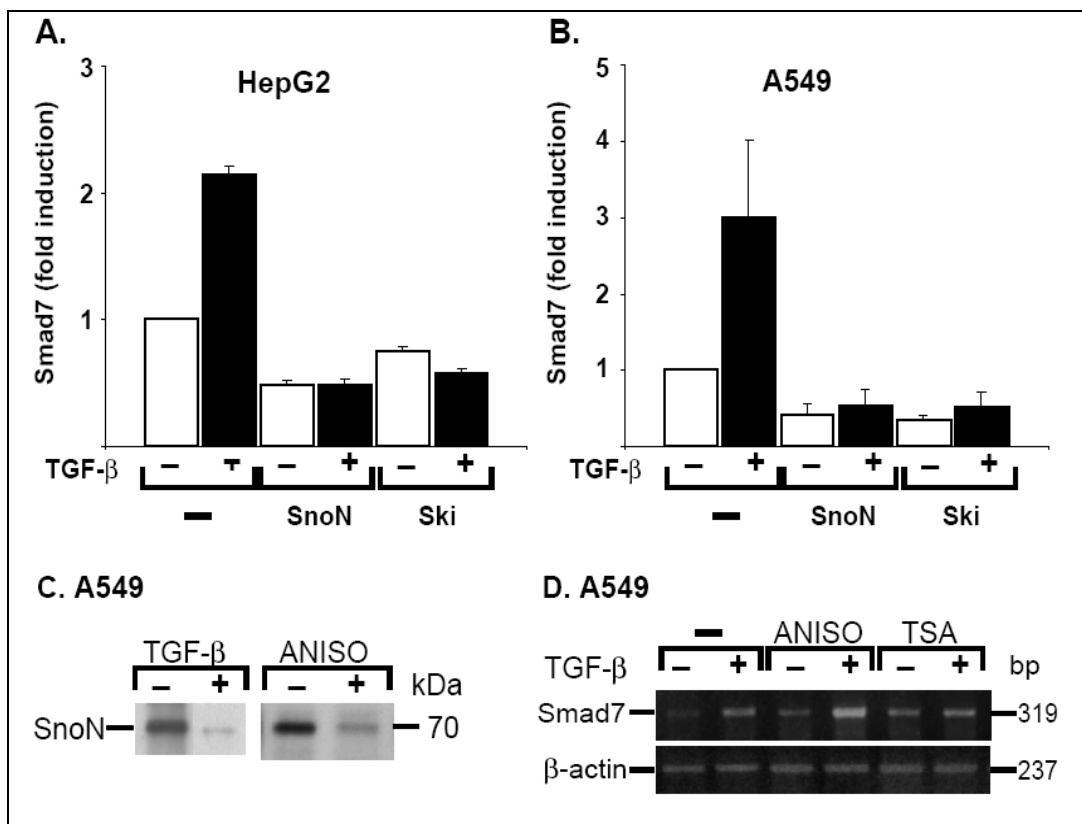


Figura 8. El promotor de *smad7* es regulado positivamente por TGF-β, y es inhibido por las proteínas SnoN y Ski. El gen reportero de luciferasa bajo el promotor de *smad7* fue transfectedo transitoriamente en células A549 (A) y HepG2 (B) solo o con los DNAc para SnoN o Ski, además las células fueron incubadas 0.3 nM de TGF-β en donde se indica (barras negras). Western-blot de la proteína SnoN, en donde se observa que en las células a549 incubadas con 10 μM de anisomicina hay una degradación de SnoN de manera específica y similar a lo que ocurre en células tratadas con TGF-β (C). RT-PCR para detectar los niveles de mensajero de Smad7; se observa que en células A549 incubadas con 10 μM anisomicina es capaz de desreprimir a *smad7* y contribuir a una mayor inducción en los niveles del mensajero para las células pretratadas con anisomicina y estimuladas con TGF-β. Este mecanismo de desrepresión también ocurre cuando las células se incubaron con 1 μM tricostatina (TSA), un inhibidor de desacetilasas de histonas (D).

3.4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Para detectar que SnoN se unía al promotor de *smad7*. Estos ensayos se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células HepG2 y A549 incubadas con o sin 0.5 nM de TGF-β por diferentes tiempos, y en presencia o ausencia de 10 μM de anisomicina. Se buscó en el DNA inmunoprecipitado a la región que flanquea al elemento SBE localizado en el promotor de *smad7* en la posición -210. En las células HepG2, los resultados mostraron que Ski y SnoN se unen de manera basal al promotor. A los 45 min posteriores al tratamiento con

TGF- β la proteína SnoN disminuye sus niveles y Ski no se detecta en la región del promotor del gen *smad7*, sin embargo durante este lapso fue posible detectar a las proteínas Smad2/3 en esta región (Fig 9A). Sin embargo, a las 2 h posteriores al tratamiento con TGF- β , SnoN y Ski se vuelven a posicionar en el promotor de Smad7 (Fig. 9 A).

En las células A549, donde SnoN se expresa bien pero la proteína Ski no pudo ser detectada, observamos que SnoN se posiciona en el promotor de Smad7 de forma similar a lo que ocurre en células HepG2. En este caso, cuando las células fueron incubadas con anisomicina, se observó que este estímulo es capaz de remover a la proteína SnoN del promotor. Sin embargo, también se pudo observar que en las células que son pretratadas con anisomicina e incubadas posteriormente con TGF- β , el posicionamiento de las Smad2/3 en el promotor de *smad7* se sigue observando (Fig. 9 B).

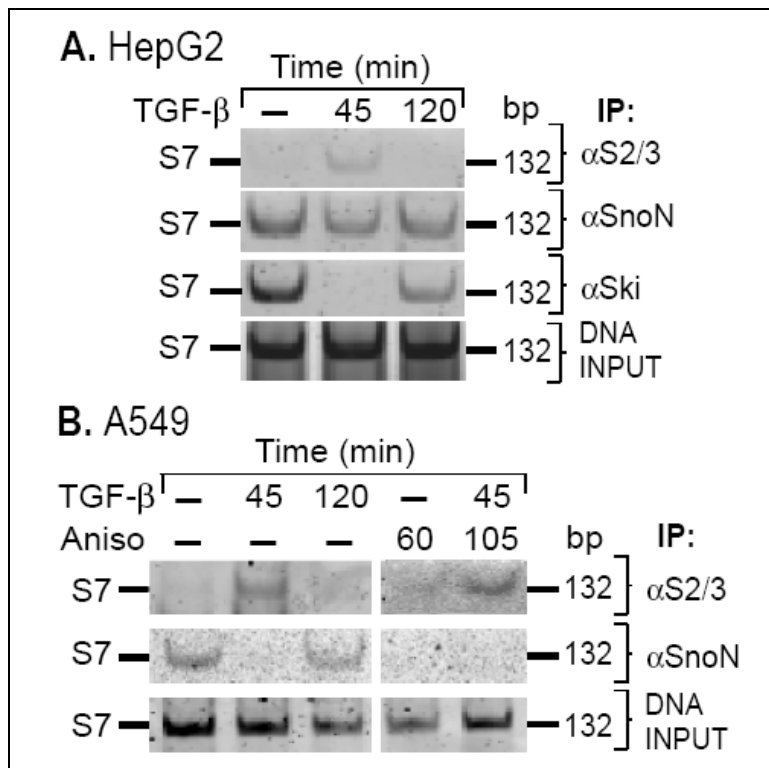


Figura 9. La proteína SnoN se une al promotor de *smad7* en células en estado basal. Los experimentos de inmunoprecipitación (ChIP) de cromatina para Smad2/3 (α S2/3), SnoN (α SnoN) y Ski (α Ski) en células HepG2 (A), tratadas con 0.5 nM de TGF- β a los tiempos indicados. Ensayos de ChIP para las proteínas α S2/3 y α SnoN en células A549 (B) pretratadas con 10 μ M de anisomicina y posteriormente fueron tratadas con 0.5 nM de TGF- β , en ambos casos a los tiempos indicados.

Según el Diccionario de autoridades la llama es “ la parte más sutil del fuego, que se eleva y levanta a lo alto en figura piramidal”. El fuego original y primordial, la sexualidad, levanta la llama roja del erotismo y ésta, a su vez, sostiene y alza otra llama, azul y trémula: la del amor. Erotismo y amor: la llama doble de la vida.

La llama doble
Octavio Paz

4. DISCUSIÓN

4.1. EL TGF- β INDUCE UN AUMENTO EN EL RNAm DE *Smad7* Y *SnoN* EN CÉLULAS A549 Y HEPG2

Los resultados obtenidos sobre la expresión del RNAm muestran que los genes *smad7* y *sno* son regulados positivamente por el TGF- β , tanto en las células A549 como en las HepG2 (Fig. 6A y B, primera columna). Estos resultados de inducción de los RNAm de *smad7* y *sno* por TGF- β concuerdan con lo reportado previamente en células HepG2 (Denissova and Liu 2004), y lo que se había observado en otras líneas celulares, donde el tratamiento con TGF- β induce un aumento en los niveles de los RNAm de *smad7* (Hayashi et al. 1997; Nakao et al. 1997) y *sno* (Stroschein et al. 1999b). Nosotros también habíamos reportado la inducción por TGF- β , del RNAm de *smad7* en células HeLa (Vazquez-Macias et al. 2005).

Los RNAm de *smad7* y *sno* aumentan de forma simultánea 2 h posteriores al tratamiento con TGF- β (Fig. 6A y B, segunda columna), lo cual permitiría que los niveles de las proteínas SnoN y Smad7 aumentaran después de este lapso. Antes de este aumento, es probable que los complejos de Smad activos hayan regulado positivamente la transcripción de diferentes genes, algunos de los cuales son de respuesta temprana, ya que aumentan rápidamente dentro de los primeros minutos después del estímulo con TGF- β los niveles de RNAm. Otros genes responden más lentamente a la señal, aumentando sus niveles transcripcionales hasta algunas horas posteriores al tratamiento con TGF- β , aunque también son regulados directamente por las Smads y no requieren de la síntesis de otras proteínas o la activación de vías adicionales de señalización para su inducción, como en el caso de los genes *smad7* y *sno*. Lo anterior se apoya en que las células fueron pretratadas con CHX, inhibidor de la síntesis de proteínas, por lo que no se necesita la síntesis *de novo* de factores transcripcionales o proteínas adicionales para la inducción transcripcional de estos genes.

4.2. EL TGF- β REGULA LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS SnoN Y Ski

Una vez que encontramos un modelo celular adecuado, en el que se observaba una inducción en los niveles de los RNAm de *smad7* y *sno* en respuesta a TGF- β , se decidió estudiar la regulación de los niveles de la proteína SnoN en células tratadas con TGF- β , ya que en este trabajo nos interesaba estudiar la regulación transcripcional de *smad7* por la proteína SnoN.

Los resultados mostraron que el TGF- β regula los niveles de la proteína SnoN de una manera bifásica en células A549 y HepG2 (Fig. 7 A y B). A tiempos cortos de incubación con TGF- β (30 min), hay una disminución drástica en los niveles de la proteína SnoN, pero a tiempos largos de incubación (1 h o más) hay un aumento de los niveles de esta proteína. En las células A549, los niveles finales de SnoN superan los niveles basales, a diferencia de lo que sucede en las células HepG2, donde solo se recupera alrededor del 50% de los niveles iniciales de la proteína. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores, que muestran que el TGF- β causa una degradación rápida de la proteína SnoN, que es transitoria y dependiente de la activación de las Smads, ya que éstas sirven como proteínas adaptadoras para mediar la ubiquitinación de SnoN por Smurf2 y APC (Stroschein et al. 1999b; Sun et al. 1999). Los niveles de SnoN se recuperan a un tiempo de incubación prolongado con TGF- β , por un mecanismo que también es dependiente de la activación de las Smad, ya que participan en la inducción de la transcripción del gen *sno* (Zhu et al. 2005).

En estos tipos celulares también estudiamos la regulación de los niveles de la proteína Ski, que es una proteína estrechamente relacionada a SnoN y que reprime la transcripción de *smad7* (Denissova and Liu 2004). En las células A549 no se pudo detectar a esta proteína por inmunoblot, por lo que probablemente se exprese a niveles muy bajos y no puede ser detectada en estas condiciones. Una inmunoprecipitación en células con un marcaje metabólico de todas las proteínas con ^{35}S sería de utilidad para determinar si la proteína Ski esta presente o

ausente, ya que es un métodos más sensible para determinar la presencia de proteínas que se expresan a niveles bajos.

En las células HepG2, los niveles de Ski son regulados negativamente por TGF- β , pero interesantemente no se observa la recuperación en la expresión de esta proteína, como se observó para SnoN (Fig 7 B). En tratamientos de TGF- β hasta de 5 h, tampoco se observó una recuperación en los niveles de la proteína Ski (datos no mostrados). Probablemente esto se deba a una cinética diferente de degradación entre Ski y SnoN. Además, es probable que al nivel de transcripción, la regulación de los genes *ski* y *sno* sea diferente. Para *ski* puede ser que se necesiten factores de transcripción adicionales a las Smads que necesiten ser sintetizados *de novo*; en cambio la transcripción de *sno* se sabe que es dependiente de las Smads y quizás de factores que posiblemente ya estén presentes en la célula (Zhu et al. 2005).

Otro punto importante a considerar son las diferencias de concentración de las proteínas Ski y SnoN que pueden existir entre el citoplasma y el núcleo. Como se mencionó en la introducción, hasta hace poco se creía que tanto Ski como SnoN eran proteínas nucleares, pero recientemente se ha reportado que la localización de SnoN es citoplásmica en células normales y nuclear en células cancerosas o diferenciadas, como probablemente ocurra en las líneas utilizadas en este trabajo (Krakowski et al. 2005). Por lo anterior, pudiera darse el caso que los niveles de Ski y SnoN tuvieran una concentración relativa mayor en núcleo que en citoplasma o viceversa, siendo esta concentración una diferencia importante al momento de la modulación de la señal del TGF- β para regular la transcripción de genes, ya que se ha visto que SnoN citoplásmico es más efectivo en inhibir a los complejos activos de Smads, al ser resistente a la degradación por el proteosoma. En este caso sería necesario realizar experimentos con extractos nucleares y citoplásmicos de proteína, para determinar la abundancia de Ski y SnoN tanto en citoplasma como en el núcleo. En este trabajo los experimentos se realizaron con

extractos totales de proteína, por lo que no se puede determinar la abundancia relativa de Ski o SnoN en núcleo o citoplasma.

Las diferencias en la recuperación de los niveles basales de las proteínas Ski y SnoN en células A549 y HepG2, parecen indicar que en cada tipo celular la repuesta de los genes dependiente de TGF- β ocurre de forma diferente, lo cual estaría relacionado con la respuesta diferencial que tiene cada célula a la señal del TGF- β . Por ejemplo, la degradación citoplásmica de Ski y SnoN por TGF- β permitiría a las proteínas Smads llegar a sus genes blancos, e inducir la transcripción del gen *smad7*, pero la terminación de la señal dependería de la recuperación de los niveles de SnoN que regulan negativamente a las Smads y actúan como represores transcripcionales en el promotor de *smad7*.

4.3. EL PROMOTOR DE Smad7 ES REGULADO POSITIVAMENTE POR EL TGF- β Y NEGATIVAMENTE POR SnoN

Denissova y Liu (2004) mostraron que el gen *smad7* es regulado negativamente por la unión de las proteínas Ski y Smad4 a su promotor. En células HepG2 y A549 la inducción transcripcional por TGF- β del gen reportero luciferasa bajo el control del promotor de *smad7*, detectada a través de la actividad de la luciferasa, se inhibe por la coexpresión de las proteínas Ski y SnoN (Fig. 8 A y B). Esto demuestra que la proteína SnoN también participa en la regulación transcripcional de *smad7*. El efecto inhibitorio de Ski y SnoN en la vía de señalización del TGF- β también se ha observado en experimentos donde expresión ectópica de Ski y SnoN es capaz de inhibir el efecto transactivatorio de las Smads sobre genes reporteros que responden al TGF- β (Akiyoshi et al. 1999; Luo et al. 1999; Stroschein et al. 1999b). De forma similar, se observa un aumento en los niveles de SnoN y Ski se observa en la regeneración hepática, como un probable mecanismo para inhibir el efecto antiproliferativo que tiene el TGF- β en células hepáticas (Macias-Silva et al. 2002).

En las células HepG2, que expresan tanto a Ski como a SnoN, parece ser que ambas proteínas participan en la regulación de *smad7*. Sin embargo, en las células A549 el efecto regulador se debería principalmente por SnoN, ya que en Ski si se expresa lo hace a niveles muy bajos.

Para evaluar el papel de SnoN en la regulación transcripcional de *smad7*, las células A549 se trataron con anisomicina, que se sabe disminuye los niveles celulares de SnoN en el tipo celular en que esta proteína es la que esta presente mayoritariamente (Fig. 8 C). La anisomicina al degradar a Ski y a SnoN va tener un efecto positivo sobre los genes que están siendo regulados negativamente por estos correpresores, como puede observarse en las células tratadas con anisomicina y que muestran un aumento en los niveles de RNAm de *Smad7* (Fig. 8 D). El TGF- β también induce un mayor aumento en los niveles del RNAm de *smad7*, lo cual puede deberse a la participación de los complejos activos de Smads para estimular la transcripción del gen, por otro lado el efecto de anisomicina es menor, ya que está solo esta liberando al gen *smad7* del efector represor de Ski (Fig. 8 D). Cuando las células son incubadas con anisomicina y TGF- β , se sinergiza el efecto de ambos, obteniéndose la mayor inducción de *smad7* (Fig. 8 D). Lo anterior también sugiere que la anisomicina puede ser empleada para hacer observaciones sobre los efectos de TGF- β en un contexto celular sin las proteínas Ski y SnoN.

Para verificar que la anisomicina estaba contribuyendo a desreprimir al gen de *smad7*, a través de un mecanismo dependiente de SnoN, las células se trataron con un inhibidor de HDACs, la tricostatina. Este compuesto mostró resultados similares a los obtenidos con anisomicina, liberando al gen de *smad7* de una represión y aumentando los niveles basales del RNAm, pero además estos niveles aumentaron aún más al ser tratadas las células simultáneamente con tricostatina y TGF- β (Fig. 8 D).

El reclutamiento de HDACs, es uno de los mecanismos que utilizan Ski y SnoN para bloquear la transcripción de genes (Nomura et al. 1999). Por lo tanto, estos resultados indican que la anisomicina es útil para eliminar el efecto represor que tiene SnoN en la regulación de *smad7*, al aumentar la degradación de SnoN. Además, la anisomicina induce una regulación positiva en los niveles de *smad7*, independientemente de sus otros efectos como son inhibir la síntesis de proteínas o activar a las MAPK, ya que en los experimentos de RT-PCR las células fueron pretratadas con cicloheximida, aunque ésta no tiene ningún efecto sobre los niveles basales de *smad7* (Fig. 8D).

4.4. LA PROTEÍNA SnoN SE UNE AL PROMOTOR DE Smad7 PARA CONTROLAR LA DURACIÓN DE LA SEÑAL DEL TGF- β

El gen *smad7*, como se mencionó anteriormente, en estado basal se encuentra reprimido por la proteína Ski, siendo después esta degradada y sustituida por las proteínas Smad2/3 fosforiladas cuando las células son tratadas con TGF- β (Denissova and Liu 2004). Resultados similares se obtuvieron para Ski y los complejos activados de las Smads en células HepG2 (Fig. 9 A). En A549 no se realizaron los experimentos de CHIP para Ski, ya que no se pudo detectar la proteína en extractos totales (Fig 9 B).

En las células HepG2 y A549, la proteína SnoN también se encuentra de forma basal unida al promotor del gen de *smad7*, lo cual indicaría una inhibición transcripcional mediada por esta proteína (Fig. 9 A y B). Cuando las células son tratadas con TGF- β , las Smads se posicionan en el promotor de *smad7*, y SnoN se separa de esta región, ya que es degradado; ambos eventos tienen como consecuencia la activación transcripcional de *smad7*. La proteína SnoN se vuelve a situar en esta región a las 2 h posteriores al tratamiento con TGF- β , de forma similar a lo observado para Ski en HepG2 (Fig. 9A). El que SnoN y Ski se vuelvan a posicionar en el promotor de *smad7*, puede correlacionarse con la terminación de la señal del TGF- β y por consiguiente de la transcripción de *smad7*. Asimismo,

la proteína Smad7 aumenta después del tratamiento con TGF- β , y se asocia con sus receptores, todo esto conlleva a terminar la señal de TGF- β y preparar a la célula para poder responder nuevamente ante la señal de esta citocina.

La degradación de Ski y SnoN inducida por anisomicina correlaciona con el hecho de que estas proteínas ya no puedan ser detectadas en el promotor de *smad7*. Además en células incubadas con anisomicina y tratadas con TGF- β , se observa el posicionamiento de los complejos Smad2/3 en el promotor, por lo que el tratamiento con anisomicina no interfiere con la activación de los complejos de Smads. Lo anterior concuerda con lo observado en la Fig. 8 D, donde los efectos de TGF- β y anisomicina se sinergizan e incrementan la transcripción del gen *smad7*, por la degradación de SnoN y por el posicionamiento de Smad2/3 en el promotor, lo que permite la activación transcripcional completa de *smad7*.

Los resultados de inmunoprecipitación de cromatina entre los dos tipos celulares analizados, uno de los cuales expresa a Ski y SnoN (HepG2) y otro en los que sólo se pudo detectar SnoN (A549), se podría concluir que la interacción de estas proteínas con el promotor del gen *smad7* va a depender de su concentración en la célula. Ski y SnoN no pueden unirse directamente al DNA y necesitan de un factor de transcripción como las proteínas Smads3/4 que tenga la capacidad de unión a DNA para ejercer sus efectos represores en la transcripción de genes en células en condiciones basales. Como se mencionó anteriormente, el trabajo del grupo de Liu (2004) mostró que la unión de Ski al promotor de *smad7* es a través de Smad4, posiblemente sea este mismo factor el que medie la unión de SnoN al promotor, pero esto necesita verificarse experimentalmente. Otro posible mecanismo de unión de SnoN al promotor puede ser a través de la interacción con Ski, ya que ambas proteínas tienen capacidad de formar heterodímeros (Cohen et al. 1998; Cohen et al. 1999). Si la interacción de SnoN es independiente de Ski, en aquellos tipos celulares en Ski y SnoN estén presentes, habría una competencia para unirse al promotor, posiblemente tratando de interaccionar con Smad4, o en el caso de SnoN asociándose con algún otro

factor que medie su unión al DNA. También podría ser que ambos factores cooperaran para unirse al al DNA, formando heterodímeros e interaccionando con Smad4. Para las células en las que una proteína se encuentre presente y la otra tenga una expresión baja o nula, la unión al promotor posiblemente sería a través de Smad4 y la formación de homodímeros.

Finalmente, *smad7* es un gen que necesita ser altamente regulado, debido a la capacidad que tiene de modular la señalización del TGF- β . Una regulación deficiente de los niveles de esta proteína se ha relacionado con diferentes patologías (Nakao et al. 2002), ya sea por una sobreexpresión y por lo tanto hay una inhibición de la vía del TGF- β , o una expresión deficiente donde la vía del TGF- β se potencia. Sería interesante hacer estudios para ver si en estos padecimientos existe una conexión entre los problemas de regulación de la expresión de *smad7* y alteraciones entre los niveles de SnoN o Ski.

There is no safe investment. To love at all is to be vulnerable. Love anything, and your heart will certainly be wrung and possibly broken. If you want to make sure of keeping it intact, you must give your heart to no one, not even to an animal. Wrap it carefully round with hobbies and little luxuries; avoid all entanglements; lock it up safe in the casket or coffin of your selfishness. But in that casket—safe, dark, motionless, airless—it will change. It will not be broken; it will become unbreakable, impenetrable, irredeemable. The alternative to tragedy, or at least the risk of tragedy, is damnation. The only place outside Heaven where you can be safe from all the dangers and perturbations of love is Hell.

I believe that the most lawless and inordinate loves are less contrary to God's will than a self-invited and self-protected and self-protective loveless...

The Four Loves
C.S. Lewis

5. CONCLUSIONES

Este trabajo muestra por primera vez que la proteína SnoN se une a la región promotora de *smad7* para reprimir transcripcionalmente a este gen en condiciones basales (Fig. 10, 1). Ante el estímulo del TGF- β SnoN se degrada, lo que permite que los complejos transcripcionales de Smad2/3 se unan al promotor y estimulen la transcripción del gen (Fig. 10, 2). Posteriormente, cuando la señal de la vía del TGF- β ha estimulado sus genes blanco, la señal se detiene posiblemente por el aumento que hubo de la proteína Smad7, pero la transcripción de los genes blancos también se reprime por la recuperación en los niveles de SnoN, que en este caso se vuelve a colocar en el promotor del gen *smad7*, lo que permite a la célula recuperar el estado inicial y que sea capaz de responder a otro estímulo de TGF- β (Fig. 10, 3)

¡Error! Vínculo no válido.

Figura 10. Modelo que muestra el estado del promotor del gen *smad7* antes, durante y después de la señal del TGF- β .

Los resultados también muestran que para la regulación de la vía del TGF- β se necesita de un conjunto de genes que responden a esta señal, pero que tienen diferente sensibilidad ya que algunos son activados rápidamente y otros de forma paulatina. Además se requiere además de un conjunto de factores transcripcionales que están disponibles dependiendo del tipo celular, del estado de diferenciación celular, entre otros factores.

Este estudio también apunta a que el gen de *smad7* es un modelo útil para ilustrar la red de interacciones a nivel molecular que hay entre todos los componentes de la vía del TGF- β , aunque las proteínas Smads siguen siendo los controles maestros de la vía. Las proteínas Smad2/3 y Smad4 son las encargadas de activar la transcripción de los genes blanco del TGF- β y de servir como mediadores en la degradación a las proteínas que en ese momento no son necesarias para transducir la señal y que, por el contrario, pueden interferir con la misma, como es el caso de las proteínas SnoN y Ski. Los complejos Smad2/3

también son importantes para activar la transcripción y la traducción de proteínas que van a terminar con la señal del TGF- β como Smad7, así como también en restaurar los niveles de las proteínas que como SnoN fueron degradadas durante la activación de la vía.

La intrincada regulación de la vía no es sorprendente, ya que como se mencionó al principio de este trabajo, la vía de señalización del TGF- β regula diversos aspectos en la biología de la célula, por lo que deben de existir mecanismos como los descritos anteriormente para una modulación espacio-temporal fina de la señal.

6. PERSPECTIVAS

Tomando como antecedente los resultados obtenidos en este trabajo se pueden hacer estudios posteriores, enfocados a profundizar en el mecanismo de regulación que está empleando la célula para regular los niveles de la proteína Smad7 y en esta forma generar un modelo más robusto.

- *Determinar el mecanismo de unión de SnoN al promotor de smad7.* Con este punto se estudiaría si SnoN se une al SBE del gen Smad7 es capaz de unirse a través de Smad4 como se ha sugerido para la proteína Ski, o si SnoN se une al SBE a través de formar un dímero con Ski, que a su vez interacciona con Smad4, para formar un complejo represor tripartita. Esto se podría realizar empleando geles de retardo, usando como sonda la región SBE, extractos nucleares y anticuerpos contra Ski SnoN. Los extractos debería ser de células como A549, donde solo SnoN es detectable, y células donde SnoN y Ski estén presentes.
- *Estudiar el papel de Ski y SnoN en la regulación de Smad7.* En este estudio asumimos que en células A549, SnoN es la proteína que estaría siendo encargada de la regulación transcripcional de Smad7, debido a que es la proteína que se detecta. Sería interesante hacer estudios en células donde ambas proteína se expresen de forma similar y hacer experimentos empleando RNAi para cada una de ellas, estudiando el efecto que la disminución selectiva de cada una de ellas tendría en los niveles transcripcionales de Smad7. Estos resultados serían importantes ya que como se mostró en el presente trabajo, una desventaja de la anisomicina sería que lleva a la degradación simultánea de Ski y SnoN.

- *Determinar en otros genes responsivos a TGF- β el papel regulador de SnoN.* En este caso se *podrían* estudiar algunos de los genes que se sabe son regulados positivamente por TGF- β , como candidatos potenciales a que sean regulados negativamente por SnoN. En este caso se podría hacer una búsqueda simultánea de genes que sean activados por anisomicina, ya que podría ser que en este caso el mecanismo de activación transcripcional no estuviera relacionado con la activación de MAPK u alguna vía de señalización, sino que fuera un efecto, similar a lo que se observa en este trabajo, causado por la desrepresión de los genes que son inhibidos por Ski y SnoN y que son activados al ser degradadas ambas proteínas. En caso de no contar con estos datos en bases de datos, se podrían realizar experimentos de microarreglos para medir los niveles transcripcionales de diferentes genes en células incubadas con anisomicina y simultáneamente con inhibidores de MAPK.

7. APÉNDICE

Inmunoprecipitaciones de proteína y Western blots

Buffer TNTE 0.1

		Concentración Final
10 ml	TN 10 X	50 mM
200 µl	EDTA 0.5 M (pH 8)	1 mM
1 ml	Tritón 10%	0.1 %
89 ml	H ₂ O	

Buffer TNTE 0.5%

		Concentración Final
10 ml	TN 10 X	50 mM
200 µl	EDTA 0.5 M (pH 8)	1 mM
5 ml	Tritón 10%	0.5 %
85 ml	H ₂ O	

TN 10 X

		Concentración Final
50 ml	Tris 1 M	0.5 M
30 ml	NaCl 5 M	1.5 M
20 ml	H ₂ O	

Mezcla de inhibidores de fosfatasas y proteasas

Para 1 ml	Solución Stock (<i>disolvente</i>)	Concentración Final
10 µl	Ortovanadato de sodio 100 mM (H ₂ O)	1 mM
10 µl	Pirofosfato de sodio 100 mM (H ₂ O + HCl 8 mM)	1 mM
25 µl	Fluoruro de sodio 1 M (H ₂ O)	25 mM
5 µl	PMSF 1 M (isopropanol)	0.1 mM
2 µl	β-glicerofosfato 0.5 M (TE pH 7.4)	1 mM
2 µl	Benzamidina (TE pH 7.4) 50 mg/ml	100 µg/ml
2 µl	Inhibidor de tripsina (TE pH 7.4) 50 mg/ml	100 µg/ml
2 µl	Dihidrocloreuro de antipaina (TE pH 7.4) 5 mg/ml	10 µg/ml
2 µl	Aprotinina 5 mg/ml (DMSO)	10 µg/ml
2 µl	Pestatina A 5 mg/ml (DMSO)	10 µg/ml
2 µl	Leupeptina 5 mg/ml (TE)	10 µg/ml

Inmunoprecipitación de cromatina

Solución de Formaldehído 11%

		Concentración Final
1.5 ml	37 % Formaldehyde (Merk/EM)	11%
100 µl	5 M NaCl	0.1 M
10 µl	0.5 M EDTA (pH 8)	1 mM
10 µl	0.25 M EGTA (pH 8)	0.5 mM
250 µl	1 M Hepes (pH 8)	50 mM
3.1 µl	H ₂ O	

Extracción de núcleos

Buffer de Lisis (Buffer 1)

para preparar 100 ml

		Concentración Final
5 ml	1 M Hepes-KOH pH 7.5 (o 7.4)	50 mM
2.8 ml	5 M NaCl	140 mM
0.2 ml	0.5 M EDTA	1 mM
10 ml	glicerol	10 %
5 ml	10 % NP-40	0.5 %
0.25 ml	Triton X-100	0.25 %

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Buffer 2

para preparar 100 ml

		Concentración Final
4 ml	5 M NaCl	200 mM
0.2 ml	0.5 M EDTA (pH 8)	1 mM
0.1 ml	0.5 M EGTA (pH 8)	0.5 mM
0.5 ml	2 M Tris-HCl (pH 8)	10 mM

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Buffer 3

para preparar 100 ml

		Concentración Final
0.2 ml	0.5 M EDTA (pH 8)	1 mM
0.1 ml	0.5 M EGTA (pH 8)	0.5 mM
0.5 ml	2 M Tris-HCl (pH 8)	10 mM

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Mezcla de inhibidores de proteasa

Añadir a las concentraciones finales que se señalan.

Aprotinina 0.1 µg/ml (preparar solución stock a 5 mg/ml en H₂O, guardar a -20 °C)

leupeptina 0.1 µg/ml (preparar solución stock a 5 mg/ml en H₂O, guardar a -20 °C)

Glicina 2.5 M

Para preparar 2 ml

375 mg en H₂O

Bloqueo de la proteína G-agarosa

Se bloquean 500 µl de proteína G-agarosa con 30 µl de DNA de esperma de salmón a 10 mg/ml (Promega) y 15 µl de albumina sérica bovina a 20 mg/ml, mezclando durante toda la noche. Al siguiente día la proteína G-agarosa se lava centrifugando a 3000 r.p.m. por 2 min, desechando el sobrenadante y repitiendo este proceso 2 veces más. Al final la proteína G-agarosa bloqueada se resuspendió en TE 1:1 (vol/vol), se guardo a 4 °C hasta el momento de utilizarse.

Buffer de inmunoprecipitación*Para cada inmunoprecipitación*195 μ l TE50 μ l tritón X-1005 μ l deoxicolato de sodio (prepararlo fresco)

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

Concentración Final

1%

0.1 %

Buffer de lavado (RIPA)

Concentración Final

50 mM Hepes pH 7.6

1 mM de EDTA

0.7% deoxicolato de sodio

0.5 M cloruro de litio

Añadir los inhibidores de proteasas al momento de utilizar

8. BIBLIOGRAFÍA

- Afrakhte, M., Moren, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermarck, B., Heldin, C.H., Heldin, N.E., and ten Dijke, P. 1998. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun* **249**(2): 505-511.
- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., and Kawabata, M. 1999. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem* **274**(49): 35269-35277.
- Amaravadi, L.S., Neff, A.W., Sleeman, J.P., and Smith, R.C. 1997. Autonomous neural axis formation by ectopic expression of the protooncogene c-ski. *Dev Biol* **192**(2): 392-404.
- Anzano, M.A., Roberts, A.B., Meyers, C.A., Komoriya, A., Lamb, L.C., Smith, J.M., and Sporn, M.B. 1982. Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Res* **42**(11): 4776-4778.
- Barr, P.J. 1991. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* **66**(1): 1-3.
- Berk, M., Desai, S.Y., Heyman, H.C., and Colmenares, C. 1997. Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev* **11**(16): 2029-2039.
- Birchenall-Roberts, M.C., Ruscetti, F.W., Kasper, J., Lee, H.D., Friedman, R., Geiser, A., Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Kim, S.J. 1990. Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* **10**(9): 4978-4983.
- Blokzijl, A., ten Dijke, P., and Ibanez, C.F. 2002. Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Curr Biol* **12**(1): 35-45.
- Bonni, S., Wang, H.R., Causing, C.G., Kavsak, P., Stroschein, S.L., Luo, K., and Wrana, J.L. 2001. TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* **3**(6): 587-595.
- Boyer, P.L., Colmenares, C., Stavnezer, E., and Hughes, S.H. 1993. Sequence and biological activity of chicken snoN cDNA clones. *Oncogene* **8**(2): 457-466.
- Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C.H., and Heuchel, R. 2000. Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem* **275**(37): 29023-29030.
- Cohen, S.B., Nicol, R., and Stavnezer, E. 1998. A domain necessary for the transforming activity of SnoN is required for specific DNA binding, transcriptional repression and interaction with TAF(II)110. *Oncogene* **17**(19): 2505-2513.

- Cohen, S.B., Zheng, G., Heyman, H.C., and Stavnezer, E. 1999. Heterodimers of the SnoN and Ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agents. *Nucleic Acids Res* **27**(4): 1006-1014.
- Colmenares, C. and Stavnezer, E. 1990. Structure and activities of the ski oncogene. *Semin Cancer Biol* **1**(6): 383-387.
- Colmenares, C., Sutrave, P., Hughes, S.H., and Stavnezer, E. 1991. Activation of the c-ski oncogene by overexpression. *J Virol* **65**(9): 4929-4935.
- Coyle-Rink, J., Sweet, T., Abraham, S., Sawaya, B., Batuman, O., Khalili, K., and Amini, S. 2002. Interaction between TGFbeta signaling proteins and C/EBP controls basal and Tat-mediated transcription of HIV-1 LTR in astrocytes. *Virology* **299**(2): 240-247.
- Chen, C.R., Kang, Y., Siegel, P.M., and Massagué, J. 2002a. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* **110**(1): 19-32.
- Chen, F., Ogawa, K., Liu, X., Stringfield, T.M., and Chen, Y. 2002b. Repression of Smad2 and Smad3 transactivating activity by association with a novel splice variant of CCAAT-binding factor C subunit. *Biochem J* **364**(Pt 2): 571-577.
- Chen, H.B., Shen, J., Ip, Y.T., and Xu, L. 2006. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev* **20**(6): 648-653.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G., and Whitman, M. 1997. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* **389**(6646): 85-89.
- Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., and Massagué, J. 1998. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**(14): 2144-2152.
- Choy, L. and Derynck, R. 2003. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* **278**(11): 9609-9619. Epub 2003 Jan 9609.
- Christ, M., McCartney-Francis, N.L., Kulkarni, A.B., Ward, J.M., Mizel, D.E., Mackall, C.L., Gress, R.E., Hines, K.L., Tian, H., Karlsson, S., and et al. 1994. Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* **153**(5): 1936-1946.
- Daopin, S., Li, M., and Davies, D.R. 1993. Crystal structure of TGF-beta 2 refined at 1.8 Å resolution. *Proteins* **17**(2): 176-192.
- de Martin, R., Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Gaugitsch, H., Wrann, M., Schlusener, H., Seifert, J.M., Bodmer, S., Fontana, A., and Hofer, E. 1987. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *Embo J* **6**(12): 3673-3677.
- Denissova, N.G. and Liu, F. 2004. Repression of endogenous Smad7 by Ski. *J Biol Chem* **279**(27): 28143-28148. Epub 22004 May 28145.
- Denissova, N.G., Pouponnot, C., Long, J., He, D., and Liu, F. 2000. Transforming growth factor beta -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6397-6402.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J.M. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements

- in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* **17**(11): 3091-3100.
- Derynck, R., Gelbart, W.M., Harland, R.M., Heldin, C.H., Kern, S.E., Massagué, J., Melton, D.A., Mlodzik, M., Padgett, R.W., Roberts, A.B., Smith, J., Thomsen, G.H., Vogelstein, B., and Wang, X.F. 1996. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* **87**(2): 173.
- Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Goeddel, D.V. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**(6030): 701-705.
- Derynck, R. and Zhang, Y. 1996. Intracellular signalling: the mad way to do it. *Curr Biol* **6**(10): 1226-1229.
- Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X.H. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* **95**(6): 737-740.
- Derynck, R. and Zhang, Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**(6958): 577-584.
- Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W., Li, Z., Alvarez, R.J., ten Dijke, P., White, B., Wigley, F.M., and Goldschmidt-Clermont, P.J. 2002. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3908-3913.
- Dooley, S., Hamzavi, J., Breitkopf, K., Wiercinska, E., Said, H.M., Lorenzen, J., Ten Dijke, P., and Gressner, A.M. 2003. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* **125**(1): 178-191.
- Esparza-López, J., Montiel, J.L., Vilchis-Landeros, M.M., Okadome, T., Miyazono, K., and López-Casillas, F. 2001. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* **276**(18): 14588-14596.
- Feng, X.H., Lin, X., and Derynck, R. 2000. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* **19**(19): 5178-5193.
- Fukushima, D., Butzow, R., Hildebrand, A., and Ruoslahti, E. 1993. Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *J Biol Chem* **268**(30): 22710-22715.
- Fumagalli, S., Doneda, L., Nomura, N., and Larizza, L. 1993. Expression of the c-ski proto-oncogene in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* **3**(1): 23-27.
- Germain, S., Howell, M., Esslemont, G.M., and Hill, C.S. 2000. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev* **14**(4): 435-451.
- Halder, S.K., Beauchamp, R.D., and Datta, P.K. 2005. Smad7 induces tumorigenicity by blocking TGF-beta-induced growth inhibition and apoptosis. *Exp Cell Res* **307**(1): 231-246. Epub 2005 Apr 2005.

- Hanai, J., Chen, L.F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W.Y., Guo, W.H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M.J., Stavnezer, J., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ito, Y. 1999. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J Biol Chem* **274**(44): 31577-31582.
- Hata, A., Shi, Y., and Massagué, J. 1998. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* **4**(6): 257-262.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., and Falb, D. 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**(7): 1165-1173.
- Heyman, H.C. and Stavnezer, E. 1994. A carboxyl-terminal region of the ski oncoprotein mediates homodimerization as well as heterodimerization with the related protein SnoN. *J Biol Chem* **269**(43): 26996-27003.
- Hinck, A.P., Archer, S.J., Qian, S.W., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Lucas, R., Zhang, B.L., Wenker, J., and Torchia, D.A. 1996. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* **35**(26): 8517-8534.
- Hua, X., Liu, X., Ansari, D.O., and Lodish, H.F. 1998. Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev* **12**(19): 3084-3095.
- Hua, X., Miller, Z.A., Benchabane, H., Wrana, J.L., and Lodish, H.F. 2000. Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in transforming growth factor-beta-induced transcription of the Smad7 gene. *J Biol Chem* **275**(43): 33205-33208.
- Hua, X., Miller, Z.A., Wu, G., Shi, Y., and Lodish, H.F. 1999. Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13130-13135.
- Inman, G.J., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. 2002. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* **10**(2): 283-294.
- Izzi, L. and Attisano, L. 2004. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* **23**(11): 2071-2078.
- Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C.H., ten Dijke, P., and Kruijer, W. 1998. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* **273**(33): 21145-21152.
- Kaji, H., Canaff, L., Lebrun, J.J., Goltzman, D., and Hendy, G.N. 2001. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3837-3842. Epub 2001 Mar 3813.

- Kang, Y., Chen, C.R., and Massagué, J. 2003. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* **11**(4): 915-926.
- Kaufman, C.D., Martinez-Rodriguez, G., and Hackett, P.B., Jr. 2000. Ectopic expression of c-ski disrupts gastrulation and neural patterning in zebrafish. *Mech Dev* **95**(1-2): 147-162.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* **6**(6): 1365-1375.
- Kawata, Y., Suzuki, H., Higaki, Y., Denisenko, O., Schullery, D., Abrass, C., and Bomsztyk, K. 2002. bcn-1 Element-dependent activation of the laminin gamma 1 chain gene by the cooperative action of transcription factor E3 (TFE3) and Smad proteins. *J Biol Chem* **277**(13): 11375-11384. Epub 12002 Jan 11318.
- Kim, S.J., Glick, A., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. 1989. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Biol Chem* **264**(1): 402-408.
- Kim, S.J., Kehrl, J.H., Burton, J., Tendler, C.L., Jeang, K.T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K.Y., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. 1990. Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. *J Exp Med* **172**(1): 121-129.
- Kim, S.J., Lee, H.D., Robbins, P.D., Busam, K., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. 1991. Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(8): 3052-3056.
- Kim, Y., Ratziu, V., Choi, S.G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S.J., and Friedman, S.L. 1998. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* **273**(50): 33750-33758.
- Kingsley-Kallesen, M., Johnson, L., Scholtz, B., Kelly, D., and Rizzino, A. 1997. Transcriptional regulation of the TGF-beta 2 gene in choriocarcinoma cells and breast carcinoma cells: differential utilization of Cis-regulatory elements. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **33**(4): 294-301.
- Kleeff, J., Ishiwata, T., Maruyama, H., Friess, H., Truong, P., Buchler, M.W., Falb, D., and Korc, M. 1999. The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* **18**(39): 5363-5372.
- Krakowski, A.R., Laboureau, J., Mauviel, A., Bissell, M.J., and Luo, K. 2005. Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF-beta signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12437-12442. Epub 12005 Aug 12418.
- Kuang, C., Xiao, Y., Liu, X., Stringfield, T.M., Zhang, S., Wang, Z., and Chen, Y. 2006. In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 leads to

- pre-malignant ductal lesions in the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1858-1863.
- Kurisaki, K., Kurisaki, A., Valcourt, U., Terentiev, A.A., Pardali, K., Ten Dijke, P., Heldin, C.H., Ericsson, J., and Moustakas, A. 2003. Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* **23**(13): 4494-4510.
- La, P., Morgan, T.A., Sykes, S.M., Mao, H., Schnepf, R.W., Petersen, C.D., and Hua, X. 2003. Fusion proteins of retinoid receptors antagonize TGF-beta-induced growth inhibition of lung epithelial cells. *Oncogene* **22**(2): 198-210.
- Labbe, E., Silvestri, C., Hoodless, P.A., Wrana, J.L., and Attisano, L. 1998. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* **2**(1): 109-120.
- Lafyatis, R., Lechleider, R., Kim, S.J., Jakowlew, S., Roberts, A.B., and Sporn, M.B. 1990. Structural and functional characterization of the transforming growth factor beta 3 promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced transcription. *J Biol Chem* **265**(31): 19128-19136.
- Leask, A. and Abraham, D.J. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J* **18**(7): 816-827.
- Lee, K.H., Evans, S., Ruan, T.Y., and Lassar, A.B. 2004. SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer. *Development* **131**(19): 4709-4723.
- Letterio, J.J. and Roberts, A.B. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* **16**: 137-161.
- Li, J.H., Zhu, H.J., Huang, X.R., Lai, K.N., Johnson, R.J., and Lan, H.Y. 2002. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* **13**(6): 1464-1472.
- Li, Y., Turck, C.M., Teumer, J.K., and Stavnezer, E. 1986. Unique sequence, ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J Virol* **57**(3): 1065-1072.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y.Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicardi, F.C., Shi, Y., Chen, Y.G., Meng, A., and Feng, X.H. 2006. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**(5): 915-928.
- Lin, X., Liang, M., and Feng, X.H. 2000. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **275**(47): 36818-36822.
- Liu, C., Adamson, E., and Mercola, D. 1996. Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11831-11836.
- Liu, F., Pouponnot, C., and Massagué, J. 1997a. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* **11**(23): 3157-3167.
- Liu, X., Lee, J., Cooley, M., Bhogte, E., Hartley, S., and Glick, A. 2003. Smad7 but not Smad6 cooperates with oncogenic ras to cause malignant conversion in

- a mouse model for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **63**(22): 7760-7768.
- Liu, X., Sun, Y., Constantinescu, S.N., Karam, E., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. 1997b. Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10669-10674.
- Liu, X., Sun, Y., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. 2001. Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(1): 1-8.
- Lo, R.S. and Massagué, J. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* **1**(8): 472-478.
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J.L., Lane, W.S., and Massagué, J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* **67**(4): 785-795.
- López, A.R., Cook, J., Deininger, P.L., and Derynck, R. 1992. Dominant negative mutants of transforming growth factor-beta 1 inhibit the secretion of different transforming growth factor-beta isoforms. *Mol Cell Biol* **12**(4): 1674-1679.
- Luo, K. and Lodish, H.F. 1997. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *Embo J* **16**(8): 1970-1981.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., and Zhou, Q. 1999. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev* **13**(17): 2196-2206.
- Lyons, G.E., Micales, B.K., Herr, M.J., Horrigan, S.K., Namciu, S., Shardy, D., and Stavnezer, E. 1994. Protooncogene c-ski is expressed in both proliferating and postmitotic neuronal populations. *Dev Dyn* **201**(4): 354-365.
- MacDonald, T.T., DiSabatino, A., and Gordon, J.N. 2005. Immunopathogenesis of Crohn's disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **29**(4 Suppl): S118-124; discussion S124-115, S184-118.
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P.A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J.L. 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* **87**(7): 1215-1224.
- Macias-Silva, M., Li, W., Leu, J.I., Crissey, M.A., and Taub, R. 2002. Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem* **277**(32): 28483-28490. Epub 22002 May 28421.
- Massagué, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 597-641.
- . 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**(23): 2783-2810.
- Monteleone, G., Kumberova, A., Croft, N.M., McKenzie, C., Steer, H.W., and MacDonald, T.T. 2001. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **108**(4): 601-609.

- Nagarajan, R.P., Zhang, J., Li, W., and Chen, Y. 1999. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem* **274**(47): 33412-33418.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., and ten Dijke, P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**(6651): 631-635.
- Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., Miyazono, K., and Iwamoto, I. 1999. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* **104**(1): 5-11.
- Nakao, A., Okumura, K., and Ogawa, H. 2002. Smad7: a new key player in TGF-beta-associated disease. *Trends Mol Med* **8**(8): 361-363.
- Namciu, S., Lyons, G.E., Micales, B.K., Heyman, H.C., Colmenares, C., and Stavnezer, E. 1995. Enhanced expression of mouse c-ski accompanies terminal skeletal muscle differentiation in vivo and in vitro. *Dev Dyn* **204**(3): 291-300.
- Nomura, N., Sasamoto, S., Ishii, S., Date, T., Matsui, M., and Ishizaki, R. 1989. Isolation of human cDNA clones of ski and the ski-related gene, sno. *Nucleic Acids Res* **17**(14): 5489-5500.
- Nomura, T., Khan, M.M., Kaul, S.C., Dong, H.D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I., and Ishii, S. 1999. Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev* **13**(4): 412-423.
- Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. 2000. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **275**(38): 29244-29256.
- Pearson-White, S. 1993. Sno1, a novel alternatively spliced isoform of the ski protooncogene homolog, sno. *Nucleic Acids Res* **21**(19): 4632-4638.
- Pearson-White, S. and Crittenden, R. 1997. Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucleic Acids Res* **25**(14): 2930-2937.
- Pearson-White, S. and McDuffie, M. 2003. Defective T-cell activation is associated with augmented transforming growth factor Beta sensitivity in mice with mutations in the Sno gene. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5446-5459.
- Pelzer, T., Lyons, G.E., Kim, S., and Moreadith, R.W. 1996. Cloning and characterization of the murine homolog of the sno proto-oncogene reveals a novel splice variant. *Dev Dyn* **205**(2): 114-125.
- Piek, E., Heldin, C.H., and Ten Dijke, P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* **13**(15): 2105-2124.
- Pouponnot, C., Jayaraman, L., and Massagué, J. 1998. Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem* **273**(36): 22865-22868.
- Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W., and Doetschman, T. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* **11**(4): 409-414.

- Randall, R.A., Germain, S., Inman, G.J., Bates, P.A., and Hill, C.S. 2002. Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *Embo J* **21**(1-2): 145-156.
- Reed, J.A., Bales, E., Xu, W., Okan, N.A., Bandyopadhyay, D., and Medrano, E.E. 2001. Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* **61**(22): 8074-8078.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Meyers, C.A., Wideman, J., Blacher, R., Pan, Y.C., Stein, S., Lehrman, S.R., Smith, J.M., Lamb, L.C., and et al. 1983. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* **22**(25): 5692-5698.
- Roberts, A.B., Flanders, K.C., Heine, U.I., Jakowlew, S., Kondaiah, P., Kim, S.J., and Sporn, M.B. 1990. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **327**(1239): 145-154.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**(13): 2659-2670.
- Sarker, K.P., Wilson, S.M., and Bonni, S. 2005. SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor-beta responses. *J Biol Chem* **280**(13): 13037-13046. Epub 12005 Jan 13027.
- Scholtz, B., Kingsley-Kallesen, M., and Rizzino, A. 1996. Transcription of the transforming growth factor-beta2 gene is dependent on an E-box located between an essential cAMP response element/activating transcription factor motif and the TATA box of the gene. *J Biol Chem* **271**(50): 32375-32380.
- Seoane, J., Le, H.V., and Massagué, J. 2002. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419**(6908): 729-734.
- Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massagué, J. 2004a. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**(2): 211-223.
- . 2004b. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**(2): 211-223.
- Shi, Y. and Massagué, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**(6): 685-700.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J., and Pavletich, N.P. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**(5): 585-594.
- Shinagawa, T., Dong, H.D., Xu, M., Maekawa, T., and Ishii, S. 2000. The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *Embo J* **19**(10): 2280-2291.
- Shinagawa, T., Nomura, T., Colmenares, C., Ohira, M., Nakagawara, A., and Ishii, S. 2001. Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice. *Oncogene* **20**(56): 8100-8108.
- Siegel, P.M. and Massagué, J. 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**(11): 807-821.

- Stopa, M., Anhof, D., Terstegen, L., Gatsios, P., Gressner, A.M., and Dooley, S. 2000. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem* **275**(38): 29308-29317.
- Stroschein, S.L., Bonni, S., Wrana, J.L., and Luo, K. 2001. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* **15**(21): 2822-2836.
- Stroschein, S.L., Wang, W., and Luo, K. 1999a. Cooperative binding of Smad proteins to two adjacent DNA elements in the plasminogen activator inhibitor-1 promoter mediates transforming growth factor beta-induced smad-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* **274**(14): 9431-9441.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., and Luo, K. 1999b. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**(5440): 771-774.
- Suh, N., Roberts, A.B., Birkey Reffey, S., Miyazono, K., Itoh, S., ten Dijke, P., Heiss, E.H., Place, A.E., Risingsong, R., Williams, C.R., Honda, T., Gribble, G.W., and Sporn, M.B. 2003. Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res* **63**(6): 1371-1376.
- Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. 1999. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12442-12447.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., and Heldin, C.H. 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* **25**(2): 64-70.
- Thatikunta, P., Sawaya, B.E., Denisova, L., Cole, C., Yusibova, G., Johnson, E.M., Khalili, K., and Amini, S. 1997. Identification of a cellular protein that binds to Tat-responsive element of TGF beta-1 promoter in glial cells. *J Cell Biochem* **67**(4): 466-477.
- 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 TGFbeta receptor. *Cell* **95**(6): 779-791.
- Vazquez-Macias, A., Ruiz-Mendoza, A.B., Fonseca-Sanchez, M.A., Briones-Orta, M.A., and Macias-Silva, M. 2005. Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS Lett* **579**(17): 3701-3706.
- Wan, Y., Liu, X., and Kirschner, M.W. 2001. The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* **8**(5): 1027-1039.
- Wang, D., Kanuma, T., Mizumuma, H., Ibuki, Y., and Takenoshita, S. 2000. Mutation analysis of the Smad6 and Smad7 gene in human ovarian cancers. *Int J Oncol* **17**(6): 1087-1091.
- Weinmann, A.S., Yan, P.S., Oberley, M.J., Huang, T.H., and Farnham, P.J. 2002. Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* **16**(2): 235-244.

- Whitman, M. and Raftery, L. 2005. TGFbeta signaling at the summit. *Development* **132**(19): 4205-4210.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., Massagué, J., and Shi, Y. 2001. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* **8**(6): 1277-1289.
- Yang, N.N., Venugopalan, M., Hardikar, S., and Glasebrook, A. 1996. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17beta-estradiol and raloxifene. *Science* **273**(5279): 1222-1225.
- Yang, Y., Mummy, M., Romeo, D., and Wakefield, L.M. 1998. Identification of the start sites for the 1.9- and 1.4-kb rat transforming growth factor-beta1 transcripts and their effect on translational efficiency. *Gene* **219**(1-2): 81-89.
- Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Kern, S.E. 1998. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* **1**(4): 611-617.
- Zhang, Y., Feng, X.H., and Derynck, R. 1998. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**(6696): 909-913.
- Zhu, Q., Pearson-White, S., and Luo, K. 2005. Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor beta-induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol* **25**(24): 10731-10744.

SnoN co-repressor binds and represses *smad7* gene promoter

Marco A. Briones-Orta, Marcela Sosa-Garrocho, Paola Moreno-Alvarez,
Miguel A. Fonseca-Sánchez, Marina Macías-Silva *

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

Received 10 January 2006
Available online 23 January 2006

Abstract

SnoN and Ski oncoproteins are co-repressors for Smad proteins and repress TGF- β -responsive gene expression. The *smad7* gene is a TGF- β target induced by Smad signaling, and its promoter contains the Smad-binding element (SBE) required for a positive regulation by the TGF- β /Smad pathway. SnoN and Ski co-repressors also bind SBE but regulate negatively *smad7* gene. Ski along with Smad4 binds and represses the *smad7* promoter, whereas the repression mechanism by SnoN is not clear. Ski and SnoN overexpression inhibits *smad7* reporter expression induced through TGF- β signaling. Using chromatin immunoprecipitation assays, we found that SnoN binds *smad7* promoter at the basal condition, whereas after a short TGF- β treatment for 15–30 min SnoN is downregulated and no longer bound *smad7* promoter. Interestingly, after a prolonged TGF- β treatment SnoN is upregulated and returns to its position on the *smad7* promoter, functioning probably as a negative feedback control. Thus, SnoN also seems to regulate negatively the TGF- β -responsive *smad7* gene by binding and repressing its promoter in a similar way to Ski.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Smads; TGF- β ; Ski; SnoN; Smad7

TGF- β controls diverse cellular processes such as proliferation, differentiation, and apoptosis. TGF- β receptor complexes activate Smad2 and Smad3 proteins by phosphorylation. Activated R-Smads form complexes with Smad4 and are translocated into the nucleus, then Smads associate with other factors to regulate transcription of their target genes [1–3]. Smad7 protein is an inhibitory Smad that antagonizes TGF- β signaling as a negative feedback loop. *Smad7* mRNA and protein levels are upregulated after TGF- β treatment, thus Smad7 protein can bind to TGF- β type I receptor and block R-Smad phosphorylation [4,5]. *Smad7* promoter contains the sequence identified as SBE, a consensus-binding site for Smads, which is required for *smad7* gene induction by TGF- β [6–10]. Intriguingly, Ski and SnoN (Ski-related novel gene) transcriptional co-repressors also bind to SBE but indirectly through interaction with Smad proteins [11–18].

Ski and SnoN are two closely related members of the Ski family of nuclear oncoproteins that were identified on the basis of homology with v-Ski, the transforming protein of the Sloan-Kettering virus [14]. Ski and SnoN are able to form both homo- and heterodimers, and interact directly with the R-Smad/Smad4 complexes to repress their transactivation abilities and negatively regulate TGF- β signaling; this results, for instance, in the inability of TGF- β to inhibit cell proliferation [11,13,14,16,18–20]. Because TGF- β inhibits the growth of many cell types, overexpression of SnoN and Ski proteins may render some cells resistant to TGF- β -induced growth arrest, and indeed high levels of Ski and SnoN proteins have been observed in some types of cancer cells [12,14]. In liver regeneration, a model of cell proliferation distinct from cancer, we have observed that SnoN and Ski proteins are transiently upregulated, mainly during the major phase of cell proliferation. We suggested that Ski and SnoN inhibit Smad activity in such phase allowing hepatic cell proliferation, despite the presence of antiproliferative TGF- β signals in the process of liver regeneration [21].

* Corresponding author. Fax: +52 55 56 22 5611.
E-mail address: mmacias@ifc.unam.mx (M. Macías-Silva).

SnoN and Ski proteins are degraded upon TGF- β treatment, and recently we showed that they are also degraded by anisomycin in a TGF- β -independent manner [15,22–24]. On the other hand, SnoN mRNA and protein are induced after a long TGF- β treatment, and in such setting SnoN may function turning off the TGF- β signals as a negative feedback mechanism [22,23,26,28]. Ski and SnoN proteins have been proposed as nuclear co-repressors for Smad proteins to maintain TGF- β -responsive genes in a repressed state. In contrast, recently it was reported that Ski and SnoN could be also localized in the cytosol in normal cells and block TGF- β signals but by sequestering Smad proteins [25]. It is possible that both mechanisms function but they depend on the cell context.

Noticeably Smad7 and SnoN proteins are important modulators of TGF- β signaling, both functioning as a negative feedback control. Smad7 inhibits R-Smad activation by binding the TGF- β type I receptor, whereas SnoN blocks TGF- β signals by binding Smads and repressing TGF- β target genes [29,30]. Interestingly, SnoN and Ski repress the TGF- β -responsive *smad7* gene. Recently, it was reported that Ski inhibits *smad7* gene expression by binding and repressing *smad7* promoter, although it was not clarified if SnoN could also regulate *smad7* as Ski does [27]. In this study, we show that SnoN is also recruited to the *smad7* promoter and inhibits the expression of *smad7* gene as it has been shown for Ski [27]. Our studies provide evidence that SnoN is also a co-repressor of Smads to bind and repress the expression of TGF- β -responsive *smad7* promoter.

Materials and methods

Cell lines and reagents. A549 cells (human lung carcinoma) were maintained in F12-Ham's medium, whereas HepG2 cells (human hepatoma) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) plus antibiotics and were kept under a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. TGF- β 1 was obtained from Prepro Tech. Anisomycin and cycloheximide were obtained from Sigma. Trichostatin (TSA) was from Tocris. Smad2/3 (N-20), SnoN (H-317), and Ski (H-239) polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, and phospho-Smad2 polyclonal antibody was from Chemicon. Secondary anti-rabbit or anti-goat horseradish peroxidase-linked antibodies were from Zymed.

Immunoprecipitations and Western blots. Cells were lysed with TNTE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 5 mM EDTA containing 0.5% Triton X-100 plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors) as described before [23,28]. Proteins were immunoprecipitated (IP), separated by SDS-PAGE, and then transferred to PVDF membranes. Immunoblotting was carried out with specific antibodies followed by detection with enhanced chemiluminescence assay (ECL kit from Amersham Life Sciences). Densitometry was carried out with the Kodak electrophoresis documentation and analysis system (EDAS 290).

Luciferase assays. For TGF- β -inducible luciferase assays, A549 and HepG2 cells were transiently transfected with the reporter plasmid containing a fragment of the *smad7* promoter (–408/+112 bp luciferase construct), pCMV- β gal, and with or without full-length wild-type Ski or SnoN cDNAs. The *smad7* reporter gene was a gift of Dr. Yan Chen [9]. Cells were seeded at 60% confluence in 12-well plates and transfected overnight with 0.5–1 μ g DNA per well using lipofectamine method as described previously [28]. To induce the luciferase reporter, cells were

Table 1
Oligonucleotides used for PCR

Target	Primer sequence 5'–3'	Position	Size (bp)
<i>hSmad7</i>			
Sense	gcc ctc tet gga tat ctt ct	nt 843 to 862	319
Antisense	gct gca taa act cgt ggt ca	nt 1162 to 1143	
<i>hSnoN</i>			
Sense	ctt ctg ctg tat ccc agt cta	nt 1950 to 1970	308
Antisense	tca caa gaa gcg gag atg aag c	nt 2258 to 2237	
<i>β-Actin</i>			
Sense	ggg tca gaa gga ttc cta tg	nt 222 to 241	237
Antisense	ggt ctc aaa cat gat ctg gg	nt 459 to 440	
<i>S7 promoter</i>			
Sense	cct ctg ctc ggc tgg ttccac tgc	nt –142 to –165	132
Antisense	tag aaa ccc gat ctg ttg ttt gcg	nt –274 to –251	

treated overnight with 0.2 nM TGF- β , lysed, and luciferase activity (Promega) was measured in a Berthold LB 9501 luminometer. To determine transfection efficiency, β -galactosidase activity was assayed as described [28]. The luciferase assay results were normalized for β -galactosidase activity.

RT-PCR. Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) from cells preincubated for 20 min in the presence of cycloheximide (20 μ g/ml) and then treated with or without TGF- β for the indicated times. Total RNA (2 μ g) was used for cDNA synthesis using random hexamers and M-MLV RT (Invitrogen). PCRs for Smad7 were for 24 cycles in A549 cells and for 28 cycles in HepG2 cells, and for β -actin and for SnoN were for 16 and 21 cycles, respectively, using a *Taq* PCR master mix kit (Qiagen). PCR profiles for each primer pair were initially standardized over a series of cycle numbers to assure that all experimental reactions were performed within the linear range. Oligonucleotide primer sequences employed are shown in Table 1. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels. Densitometry was carried out with the Kodak EDAS 290.

Chromatin immunoprecipitation. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were carried out as described previously [23,27] with the following modifications: Cells were treated with 1% formaldehyde at 37 °C in the presence of 5% CO₂ for 20 min and then sonicated on ice ten times each for 30 s with a Fisher Sonic Dismembrator 300. The desired amount of protein-crosslinked DNA extract was precleared in batches. The following antibodies were used for this assay: 5 μ l of anti-SnoN antibody, 5 μ l of anti-Ski antibody, 5 μ l of anti-Smad2/3 antibody, and 5 μ l of goat IgG as a negative control. The Smad7 SBE is localized at –210; oligonucleotide sequences spanning such region and used for PCR are shown in Table 1. PCRs for Smad7 promoter were for 26 cycles and the products were analyzed by electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. Densitometry was carried out with the Kodak EDAS 290.

Results

TGF- β -induced Smad7 and SnoN mRNA expression

Smad7 and SnoN mRNA levels after TGF- β treatment were analyzed by RT-PCR. A549 and HepG2 cells were pretreated with 20 μ g/ml cycloheximide (CHX) for 20 min and then incubated in the absence or presence of 0.3 nM TGF- β at different time points. Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed for Smad7, SnoN, and β -actin (Figs. 1A and B). β -Actin was used as a control of RNA loading. Data showed that TGF- β induced an increase of Smad7 and SnoN

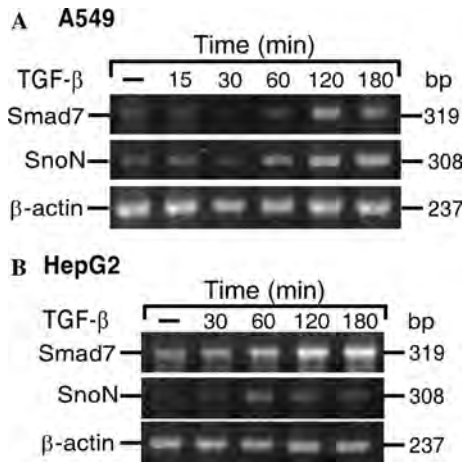


Fig. 1. TGF-β induces an increase of Smad7 and SnoN mRNA levels in A549 and HepG2 cells. A549 (A) and HepG2 (B) cells were pretreated 20 min with 20 μg/μl cycloheximide and then incubated in the absence or presence of 0.3 nM TGF-β1 at different time points. Total RNA was isolated and RT-PCR performed for Smad7, SnoN, and β-actin with specific primers. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels.

mRNA levels in a time-dependent manner in both cell types. The highest induction of Smad7 (4- to 8-fold over control) and SnoN (3- to 4-fold over control) mRNA levels was observed from 1 to 3 h after treatment. It is known that *smad7* and *sno* genes are both positively regulated by TGF-β signals, but the induction of their expression leads to an increase of Smad7 and SnoN proteins, which function as potent inhibitors of TGF-β signals.

TGF-β regulates SnoN protein levels in a time-dependent manner

TGF-β causes a rapid and transient SnoN protein degradation; however, SnoN is also upregulated by TGF-β after prolonged incubation (1 h or longer) involving Smad activation [17,29]. We evaluated SnoN and Ski protein expression after TGF-β treatment; A549 and HepG2 cells were treated with or without 0.3 nM TGF-β for different time points. In A549 cells, we observed that a short incubation for 15–30 min with TGF-β caused ~70% SnoN protein degradation, whereas a longer treatment from 1 to 3 h caused an upregulation of SnoN protein levels (2- to 3-fold over basal) (Figs. 2A and B). Interestingly, A549 cells did not seem to express Ski protein, or at least we could not detect it by IP/Western (data not shown), whereas Smad4 protein levels were very low and hard to detect in both A549 and HepG2 cells (data not shown), which made difficult studying Smad4 association with SnoN and Ski in those cells. In HepG2 cells, TGF-β caused ~80–90% SnoN and Ski protein degradation after 15–30 min of treatment, whereas a longer TGF-β treatment from 1 to 3 h caused an upregulation only of SnoN protein, but without recovering the basal levels (Figs. 2C and D). TGF-β also caused more than 90% Ski protein degradation after TGF-β treatment in HepG2 cells, and there was not any recovery of Ski protein basal levels (Figs. 2C and D). Quantitative analysis of SnoN and Ski protein levels regulated by TGF-β is shown in Figs. 2B and D, and values are expressed as means ± SE of three different experiments. In addition, we assessed the levels of phospho-Smad2 protein,

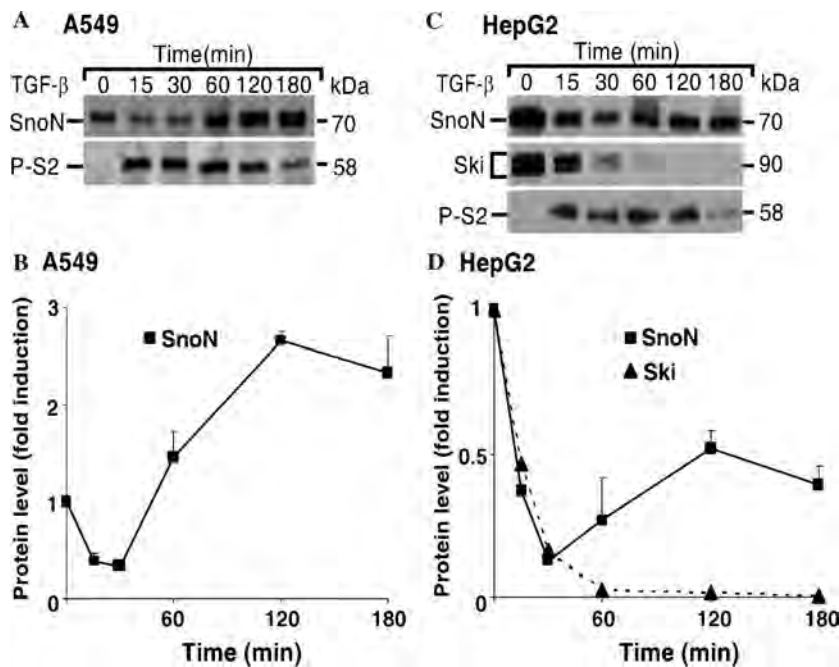


Fig. 2. TGF-β modulates SnoN protein levels in A549 and HepG2 cells. A549 (A) and HepG2 (C) cells were incubated with 0.3 nM TGF-β1 at indicated time points. Whole cell protein extracts were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-SnoN, anti-Ski or anti-Smad2/3 specific antibodies followed by immunoblotting. Phospho-Smad2 protein levels (P-S2) were also detected with specific anti-phosphoSmad2 antibodies. Time course analyses data from A549 cells (B) and from HepG2 cells (D) are shown for SnoN (■) and Ski (▲). Values are expressed as means ± SE of three separate experiments.

which was used as a parameter of TGF- β /Smad pathway activation. Data showed that TGF- β -induced Smad2 phosphorylation during the first 2 h of treatment in A549 and HepG2 cells, and then the phospho-Smad2 levels decreased (Figs. 2A and C). Thus, SnoN protein is early downregulated to facilitate TGF- β signals and then later upregulated possibly as a negative feedback control of TGF- β signals.

Smad7 promoter is induced by TGF- β and negatively regulated by SnoN

Ski is a co-repressor of Smad4 that represses *smad7* expression, a TGF- β -responsive gene [27]. However, it was not clear if SnoN also represses *smad7* gene expression by binding its promoter as Ski does. To identify if Ski and SnoN inhibit the *smad7* expression in HepG2 and A549 cells, we overexpressed Ski and SnoN by transfecting their full-length cDNAs along with the *smad7* reporter gene construct containing SBE (-418/+52). As shown in Figs. 3 A and B, TGF- β -induced *smad7* promoter expression (2- to 3-fold over control) in HepG2 and A549 cells, whereas overexpression of Ski or SnoN inhibited completely the induction of the *smad7* promoter by TGF- β . In Fig. 3C, A549 cells were incubated for 30 min in the absence or presence of 0.3 nM TGF- β or 10 μ M anisomycin (ANISO), and SnoN protein levels were evaluated by IP/Western. Data showed that SnoN is degraded after TGF- β or anisomycin treatment as was shown previously [23]. Anisomycin treatment is a useful tool to downregulate endogenous

SnoN protein levels by degradation, through a TGF- β /Smad-independent mechanism [23], whereas trichostatin (TSA) treatment inhibits histone desacetylase (HDAC) activity. Thus, in order to evaluate if SnoN downregulation and HDAC inactivation are able to derepress *smad7* gene, Smad7 mRNA levels were analyzed in A549 cells incubated for 2 h in the absence or presence of 0.3 nM TGF- β , 10 μ M anisomycin (ANISO) or 1 μ M TSA. Data showed that anisomycin and TSA increased basal levels as well as TGF- β effect on Smad7 mRNA levels. Data suggest that SnoN downregulation by anisomycin or HDAC inhibition by TSA relieved the expression of Smad7 mRNA levels at basal setting probably by derepressing the gene and also facilitated the TGF- β effect on *smad7* gene induction.

SnoN binds smad7 promoter and also controls TGF- β signaling as a negative feedback loop

Ski and SnoN accomplish their actions on TGF- β signaling through transcriptional repression. Endogenous Ski protein inhibits basal *smad7* gene expression by maintaining its promoter in a repressed state in the absence of TGF- β , through binding to the SBE in combination with Smad4. Here, we analyzed whether endogenous SnoN co-repressor may also regulate *smad7* promoter by binding its promoter. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using A549 and HepG2 cells treated at different time points with 0.5 nM TGF- β , 10 μ M anisomycin or with TGF- β plus anisomycin. TGF- β and

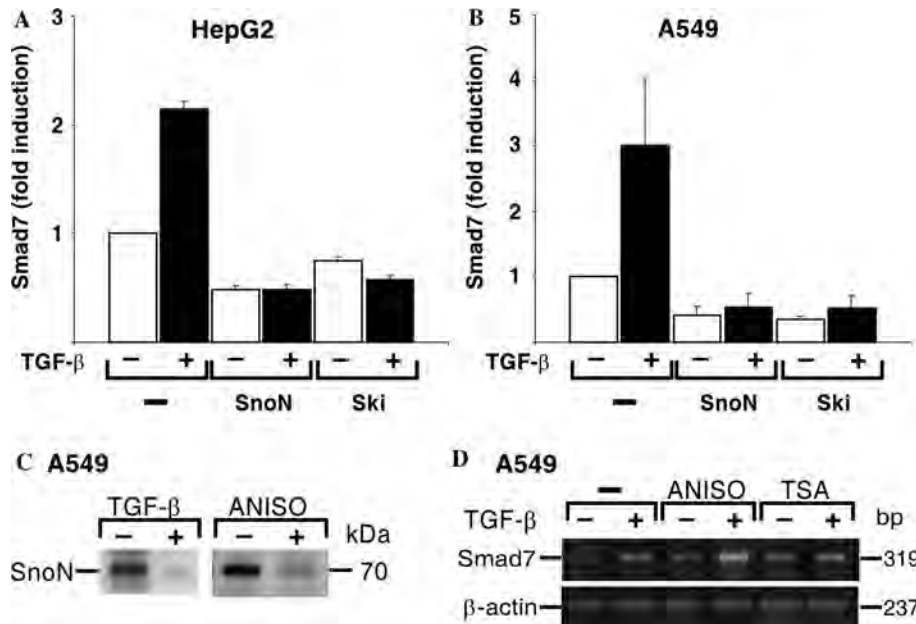


Fig. 3. SnoN and Ski repress *smad7* gene expression induced by TGF- β . *Smad7* reporter gene was transiently transfected without or along with full-length SnoN or Ski cDNAs into HepG2 (A) and A549 (B) cells, then cells were incubated overnight in the absence or presence of 0.2 nM TGF- β . Cells were lysed and samples were analyzed for luciferase activity. Values are expressed as means \pm SE of three separate experiments. A549 cells (C) were incubated with or without 0.3 nM TGF- β or 10 μ M anisomycin (ANISO). Whole cell protein extracts were immunoprecipitated with specific SnoN antibodies and then analyzed by immunoblotting. A549 cells (D) were also preincubated for 30 min in the absence (-) or presence of 10 μ M anisomycin (ANISO) or 1 μ M TSA and then incubated for 2 h with or without 0.3 nM TGF- β . Total RNA was isolated and RT-PCR was performed with specific primers for Smad7 and β -actin.

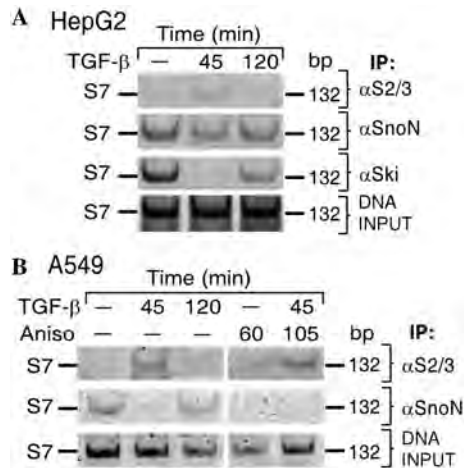


Fig. 4. SnoN binds to the endogenous *smad7* gene promoter. HepG2 (A) cells were treated for 45 or 120 min in the absence or presence of 0.5 nM TGF- β , whereas A549 (B) cells were treated without or with 0.5 nM TGF- β for 45 or 120 min, or with 10 μ M anisomycin for 60 min, or with anisomycin plus TGF- β for 105 min (but TGF- β was added in the last 45 min of anisomycin treatment), and then ChIP assays were carried out. Anti-Smad2/3, anti-SnoN or anti-Ski antibodies were used for immunoprecipitations, and PCRs were done with primers spanning the SBE, which amplified a product of 132 bp from *smad7* promoter.

anisomycin cause Ski and SnoN degradation by different pathways, and only TGF- β caused SnoN protein upregulation after a longer treatment, usually for more than 1 h. ChIP assays were carried out with anti-Smad2/3, anti-SnoN, and anti-Ski specific antibodies, and then DNA complexed with immunoprecipitated proteins was amplified by PCR with specific primers for *smad7* promoter. Data indicated that when Ski and SnoN are degraded by TGF- β or anisomycin treatment, they are no longer binding *smad7* promoter, instead only Smad2/3 activated binds *smad7* promoter after TGF- β treatment. On the other hand, the presence of SnoN and Ski proteins associated to the *smad7* promoter was observed in control cells, but when TGF- β , anisomycin or the combination of both were added to cells, there was a decrease of SnoN and Ski proteins binding to the *smad7* promoter (~80% decrease compared to control value), probably due to the degradation of SnoN and Ski proteins (Figs. 4A and B). Interestingly, a longer TGF- β treatment for more than 1 h upregulates SnoN protein levels, and under these circumstances we observed that SnoN protein returns to locate on *smad7* promoter, which may function as a negative feedback control.

Discussion

Ski and SnoN oncoproteins are important modulators of TGF- β signaling, and the overexpression of these proteins causes that cells become resistant to growth inhibition induced by TGF- β . Ski and SnoN interact with Smads and block their abilities to activate TGF- β -responsive genes. Ski and SnoN compete with p300/CBP coactivators for

binding Smads and recruit transcriptional co-repressors to promoters of TGF- β target genes. *Smad7* gene expression is regulated positively by TGF- β /Smad signaling, whereas Ski and SnoN co-repressors regulate negatively *smad7* expression. Recently, it was reported that *smad7* gene expression is repressed by endogenous Ski protein; Ski forms a complex with Smad4 at basal conditions and represses *smad7* gene expression by binding its promoter. However, SnoN protein binding to the *smad7* promoter was not detected in the ChIP assays. Thus, it was not clarified if SnoN was also able to bind and repress directly the *smad7* promoter [27].

In order to know whether endogenous SnoN protein binds to the *smad7* promoter as Ski does, we performed ChIP assays with anti-SnoN antibodies using A549 and HepG2 cells. We also performed ChIP experiments with antibodies against Smad2/3, since activated Smads are recruited to TGF- β -responsive promoters. We observed that SnoN is bound to the *smad7* promoter at the basal condition similarly as Ski does. In contrast, upon TGF- β treatment, SnoN and Ski are no longer associated to the *smad7* promoter, instead activated Smad2 and Smad3 are bound to the *smad7* promoter. This probably occurred because SnoN and Ski proteins are degraded a few minutes after TGF- β treatment. On the other hand, after a longer TGF- β treatment for 2 or 3 h, SnoN protein levels are increased and return to locate on Smad7 promoter as well as Ski, which coincide with a decreased of activation of Smad2/3 by TGF- β . These data suggest that SnoN may function as a negative feedback control regulating *smad7* gene expression. To further confirm that endogenous SnoN binds the *smad7* promoter in the basal setting, A549 cells were also treated with anisomycin, which targets SnoN protein for degradation in these cells. Under these conditions, we observed that the binding of endogenous SnoN to the *smad7* promoter decreased when SnoN protein was downregulated by anisomycin independently of the presence of TGF- β , whereas anisomycin treatment does not affect Smad activation and binding to *smad7* promoter induced by TGF- β . Therefore, downregulation of SnoN and Ski by TGF- β or anisomycin as well as HDAC inhibition by TSA increase Smad7 mRNA basal expression and also facilitated Smad7 mRNA induction by TGF- β .

Smad7 is a gene target of the Ski and SnoN co-repressors, which seem to be involved in maintaining the *smad7* promoter in a repressed state in the absence of TGF- β signaling. Smad7 protein binds the TGF- β type I receptor and hence inhibits the phosphorylation of Smad2 and Smad3, thus the regulation of Smad7 level turns out to be critical for an appropriate control of TGF- β activity, since deregulated Smad7 levels can contribute probably to unsuitable TGF- β /Smad function. Furthermore, the low levels of Smad7 protein maintained by the repressive action of SnoN and Ski may probably facilitate propagation of the TGF- β signals.

Acknowledgments

We thank the facilities of the Unidad de Biología Molecular of the Instituto de Fisiología Celular, and Paul Gaytan and Santiago Becerra for synthesis of oligonucleotides. This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA/UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References

- [1] Y. Shi, J. Massagué, Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* 113 (2003) 685–700.
- [2] L. Attisano, J.L. Wrana, Signal transduction by the TGF- β superfamily, *Science* 296 (2002) 1646–1647.
- [3] P. ten Dijke, K. Miyazono, C.-H. Heldin, Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF β signaling, *Trends Biol. Sci.* 25 (2000) 64–70.
- [4] H. Hayashi, S. Abdollah, Y. Qiu, J. Cai, Y.Y. Xu, B.W. Grinnell, M.A. Richardson, J.N. Topper, M.A. Gimbrone Jr., J.W. Wrana, D. Falb, The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling, *Cell* 89 (1997) 1165–1173.
- [5] A. Nakao, M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J.L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N.E. Heldin, C.-H. Heldin, P. ten Dijke, Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF β signaling, *Nature* 389 (1997) 631–635.
- [6] G. Brodin, A. Ahgren, P. ten Dijke, C.H. Heldin, R. Heuchel, Efficient TGF- β induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29023–29030.
- [7] N.G. Denissova, C. Pouponnot, J. Long, D. He, F. Liu, Transforming growth factor β -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 6397–6402.
- [8] M. Stopa, D. Anhof, L. Terstegen, P. Gatsios, A.M. Gressner, S. Dooley, Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor β (TGF- β)-induced activation of Smad7. The TGF- β response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29308–29317.
- [9] R.P. Nagarajan, J. Zhang, W. Li, Y. Chen, Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33412–33418.
- [10] G. von Gersdorff, K. Susztak, F. Rezvani, M. Bitzer, D. Liang, E.P. Bottinger, Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor β , *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 11320–11326.
- [11] S.B. Cohen, G. Zheng, H.C. Heyman, E. Stavnezer, Heterodimers of the SnoN and Ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agents, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 1006–1014.
- [12] J. He, S.B. Tegen, A.R. Krawitz, G.S. Martin, K. Luo, The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 30540–30547.
- [13] K. Luo, S.L. Stroschein, W. Wang, D. Chen, E. Martens, S. Zhou, Q. Zhou, The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling, *Genes Dev.* 13 (1999) 2196–2206.
- [14] K. Luo, Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14 (2004) 65–70.
- [15] Y. Sun, X. Liu, E. Ng-Eaton, H. Lodish, R.A. Weinberg, SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to Transforming Growth Factor β signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 12442–12447.
- [16] S. Akiyoshi, H. Inoue, J. Hanai, K. Kusanagi, N. Nemoto, K. Miyazono, M. Kawabata, c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with Smads, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 35269–35277.
- [17] S.L. Stroschein, W. Wang, S. Zhou, Q. Zhou, K. Luo, Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein, *Science* 286 (1999) 771–774.
- [18] X. Liu, Y. Sun, R.A. Weinberg, H.F. Lodish, Ski/Sno and TGF- β signaling, *Cytokine Growth Factor Rev.* 12 (2001) 1–8.
- [19] Y. Sun, X. Liu, W.N. Eaton, W.S. Lane, H.F. Lodish, R.A. Weinberg, Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF- β signaling, *Mol. Cell* 4 (1999) 499–509.
- [20] H. Suzuki, K. Yagi, M. Kondo, M. Kato, K. Miyazono, K. Miyazawa, c-Ski inhibits the TGF- β signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements, *Oncogene* 23 (2004) 5068–5076.
- [21] M. Macías-Silva, W. Li, J.L. Leu, M.A. Crissey, R. Taub, Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- β signals during liver regeneration, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28483–28490.
- [22] S.L. Stroschein, S. Bonni, J.L. Wrana, K. Luo, Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN, *Genes Dev.* 15 (2001) 2822–2836.
- [23] A. Vázquez-Macías, A.B. Ruíz-Mendoza, M.A. Fonseca-Sánchez, M. Briones-Orta, M. Macías-Silva, Downregulation of Ski and SnoN by anisomycin, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3701–3706.
- [24] L. Izzi, L. Attisano, Regulation of the TGF- β signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation, *Oncogene* 23 (2004) 2071–2078.
- [25] A.R. Krakowski, J. Laboureau, A. Mauviel, M.J. Bissell, K. Luo, Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- β signaling by sequestration of the Smad proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 12437–12442.
- [26] N. Mimura, K. Ichikawa, A. Asano, T. Nagase, S. Ishii, A transient increase of snoN transcript by growth arrest upon serum deprivation and cell-to-cell contact, *FEBS Lett.* 397 (1996) 253–259.
- [27] N.G. Denissova, F. Liu, Repression of endogenous Smad7 by Ski, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 28143–28148.
- [28] M. Macías-Silva, S. Abdollah, P.A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano, J.L. Wrana, MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling, *Cell* 87 (1996) 1215–1224.
- [29] Q. Zhu, S. Pearson-White, K. Luo, Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor β -induced oncogenic transformation of fibroblast cells, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 10731–10743.
- [30] K.P. Sarker, S.M. Wilson, S. Bonni, SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor- β responses, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13037–13046.

Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin

Aleida Vázquez-Macías^{a,b}, Ana B. Ruíz-Mendoza^a, Miguel A. Fonseca-Sánchez^a,
Marco A. Briones-Orta^a, Marina Macías-Silva^{a,*}

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

^b Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav-IPN, México, D.F. 07360, Mexico

Received 23 February 2005; revised 7 May 2005; accepted 23 May 2005

Available online 13 June 2005

Edited by Francesc Posas

Abstract Proteasome pathway regulates TGF- β signaling; degradation of activated Smad2/3 and receptors turns TGF- β signal off, while degradation of negative modulators such as Ski and SnoN maintains the signal. We have found that anisomycin is able to downregulate Ski and SnoN via proteasome as TGF- β does, but through a mechanism independent of Smad activation. The mechanism used by anisomycin to downregulate Ski and SnoN is also independent of MAPK activation and protein synthesis inhibition. TGF- β signal was the only pathway described causing Ski and SnoN degradation, thus this new effect of anisomycin on endogenous Ski and SnoN proteins suggests alternative processes to downregulate these negative modulators of TGF- β signaling.

© 2005 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: TGF- β ; Smad; Anisomycin; Ski; SnoN; MAPK

1. Introduction

Transforming growth factor- β (TGF- β) signaling is initiated by ligand binding to Ser/Thr kinase receptor complexes. This induces the activation of R-Smads, which form heteromeric complexes with Smad4 and translocate to the nucleus where they associate with other transcriptional factors to bind DNA and regulate the expression of different genes. One of the mechanisms to downregulate TGF- β signaling involves the interaction of transcriptional co-repressors with Smads such as TGIF, Ski and SnoN [1–3]. Co-repressors interact directly with the R-Smad/Smad4 complexes to repress their transactivation abilities and negatively regulate TGF- β signaling. This results in the inability of TGF- β to inhibit cell proliferation [4,5].

TGF- β /Smad pathway is also controlled by the ubiquitin–proteasome system. Proteasome is involved in destruction of TGF- β receptors and Smads whose degradation turns off TGF- β signaling [6]. Ski and SnoN co-repressors of TGF- β signaling are also degraded via the ubiquitin–proteasome pathway, involving Smurf2 E3 ubiquitin ligase or anaphase–pro-

moting complex (APC) [7,8]. Considering the importance of the proteasome-mediated degradation of TGF- β signaling transducers and co-repressors, it is relevant to investigate whether other signaling pathways can also participate in this process and modulate TGF- β actions.

TGIF protein stability is regulated positively through MAPK-dependent phosphorylation [9], which suggests that a similar mechanism of regulation might also occur for other co-repressors such as Ski and SnoN. Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, activates MAPK signaling pathways, such as p38 MAPK and SAPK/JNK as well as ERK1/2 [10–12], thus, we considered the possibility that anisomycin could be useful for elucidating if MAP kinases may regulate SnoN and Ski. Surprisingly, we found that anisomycin causes a rapid degradation of Ski and SnoN proteins via proteasome but through a mechanism independent of MAPK activation, protein synthesis inhibition and Smad activation. This effect is also cell type specific, since anisomycin only causes degradation of these proteins in HeLa and A549 but not in HepG2 cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and reagents

A549 cells (human lung carcinoma) were maintained in F12-Ham's medium, whereas HeLa (human cervix adenocarcinoma) and HepG2 cells (human hepatoma) were maintained in DMEM, both supplemented with 10% fetal bovine serum plus antibiotics. MG132 was obtained from Calbiochem. TGF- β 1 was from Pepro Tech. Anisomycin and cycloheximide (CHX) were from Sigma. MAPK inhibitors: SB202190, U0126 and SP600125 were from Tocris. Smad2/3, SnoN and Ski antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, and phospho-Smad2 antibody was from Chemicon. Phospho-Erk1/Erk2, phospho-JNK1/JNK2 and phospho-p38 MAPK antibodies were from Cell Signaling.

2.2. Immunoprecipitations and Western blots

Cells were lysed with TNTE buffer (50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing 0.5% Triton X-100 plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors), then immunoprecipitations and western blots were carried out as described previously [13]. Whole cell lysates (50 μ g of protein per lane) were used for western blots, whereas we used \sim 2 mg of protein for each immunoprecipitation. ERK1/2 were used as control for protein loading and immunoblots were included only in some figures for clarity. Data showed are representative from 3 or more independent experiments. Densitometry was carried out with the Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS 290).

2.3. RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). Total RNA (2 μ g) treated with DNase I was used for cDNA synthesis using random hexamers and SuperScriptTM RT (Invitrogen). PCRs for Smad7

*Corresponding author. Fax: +52 55 56 22 5611.

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

Abbreviations: TGF- β , transforming growth factor- β ; IP, immunoprecipitation; Aniso, anisomycin; CHX, cycloheximide; Ok ac., okadaic acid; ChIP, chromatin immunoprecipitation

were for 50 cycles and for GAPDH for 35 cycles using a *Taq* PCR master mix kit (Qiagen). Oligonucleotide primer sequences employed for *Smad7* were: forward primer 5' CTCGGTGCTCAAGAACTGAAG 3' and reverse primer 5' GACAGTCTGCAGTTGTGGTTTGGAG 3'. PCR profiles for each primer pair were initially standardized over a series of cycle numbers to assure that all experimental reactions were performed within the linear range.

2.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Chromatin immunoprecipitation was carried out as described previously [14]. The antibodies used were: 5 μ l of anti-Ski, 5 μ l of anti-Smad2/3 and 5 μ l of goat IgG as a negative control. The *Smad7* SBE (*Smad* Binding Element) is localized at -210. The primer 5' TAGAAACCCGATCTGTTGTTGCG 3' (*smad7* promoter sequence -274 to -251) and the primer 5' CCTCTGCTCGGCTGGTTCCACTGC 3' (*smad7* promoter sequence -142 to -165) were used to amplify the fragment of the *smad7* promoter. The downstream pair of primers 5' CTCGGTGCTCAAGAACTGAAG 3' (*smad7* +586 to +607) and 5'GACAGTCTGCAGTTGTGGTTTGGAG 3' (*smad7* +950 to +971) served as negative controls.

3. Results and discussion

3.1. Anisomycin downregulates Ski and SnoN

TGIF, Ski and SnoN co-repressors regulate negatively TGF- β signaling at the transcriptional level, through binding the active Smad complexes and recruiting HDAC complexes [3]. Recently, it was reported that activation of the ERK signaling pathway causes phosphorylation and stabilization of TGIF protein [9]. In our study, we wanted to evaluate if MAPKs also played a role in the regulation of Ski and SnoN co-repressors using anisomycin, a strong activator of MAPK pathways. Unexpectedly, anisomycin caused SnoN degradation in A549 cells and degradation of Ski and SnoN in HeLa but not in HepG2 cells. In contrast, TGF- β caused degradation of Ski and SnoN in all cell lines, except Ski in A549 cells where Ski seems not to be expressed. Anisomycin effect was dose-depen-

dent and a 10 μ M concentration caused a decrease between 60% and 90% in Ski and SnoN protein levels in HeLa and A549 cells (Fig. 1A). The time-course analysis showed a rapid downregulation of Ski and SnoN, which was evident after 15 min of treatment with 10 μ M anisomycin and continued 1 h after treatment in HeLa and A549 cells (Fig. 1B). Intriguingly, anisomycin did not cause Ski and SnoN degradation in HepG2 cells but TGF- β clearly did it (Fig. 1C). Data suggest that anisomycin effect on Ski and SnoN was cell type specific.

3.2. Anisomycin causes Ski and SnoN degradation via proteasome

Thus far, TGF- β signal is the only pathway described causing Ski and SnoN degradation via proteasome [15]. Here, we showed that anisomycin also causes Ski and SnoN degradation via proteasome as TGF- β does. HeLa cells were preincubated 2 h with or without 50 μ M MG132, a specific proteasomal inhibitor, and then cells were incubated with or without 1 μ M anisomycin or 0.3 nM TGF- β for 30 min. TGF- β and anisomycin induced a decrease of SnoN and Ski proteins levels in the absence of proteasome inhibitor, whereas treatment with MG132 increased SnoN and Ski basal levels as expected. A combination of anisomycin or TGF- β with MG132 reduced more than 90% SnoN and Ski degradation in HeLa cells (Fig. 2A and B). Similar results for SnoN were obtained in A549 cells (Fig. 2C and D). Data indicated that anisomycin reduces Ski and SnoN levels using the proteasome pathway as previously shown for TGF- β [7].

3.3. Anisomycin downregulates Ski and SnoN via a mechanism independent of Smad activation

It is known that TGF- β causes a rapid and transient SnoN degradation, however SnoN is also upregulated by TGF- β after prolonged incubation (1 h or longer) involving Smad activation [17]. We observed in A549 cells that a short incubation

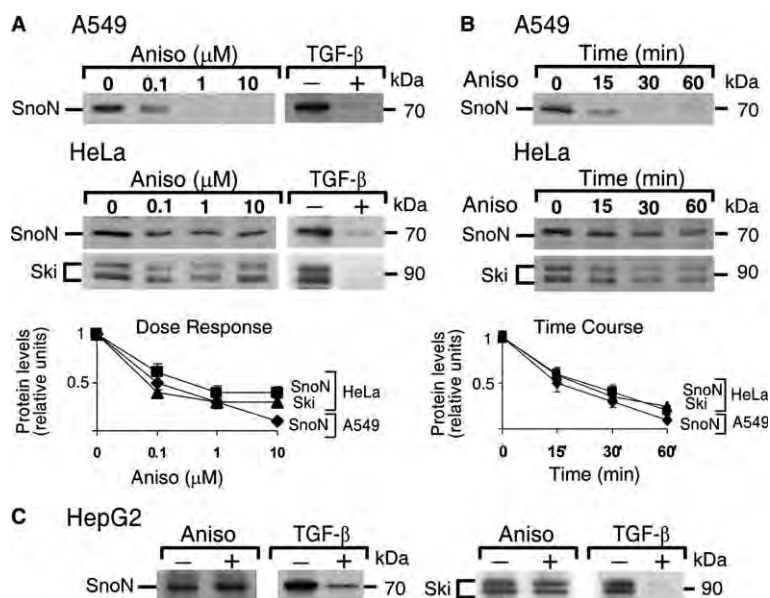


Fig. 1. Anisomycin downregulates Ski and SnoN in HeLa and A549 cells but not in HepG2 cells. (A) A549 and HeLa cells were incubated for 1 h alone or with different concentrations of anisomycin or with 0.3 nM TGF- β 1 for 30 min. (B) A549 and HeLa cells were incubated with 10 μ M anisomycin at different time points. (C) HepG2 cells were incubated for 1 h with 10 μ M anisomycin or 0.3 nM TGF- β 1. Proteins were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Ski or anti-SnoN antibodies followed by immunoblotting. Dose-response and time-course analyses are shown in the lower panels of (A) and (B). Values are expressed as means \pm S.E. of three separate experiments.

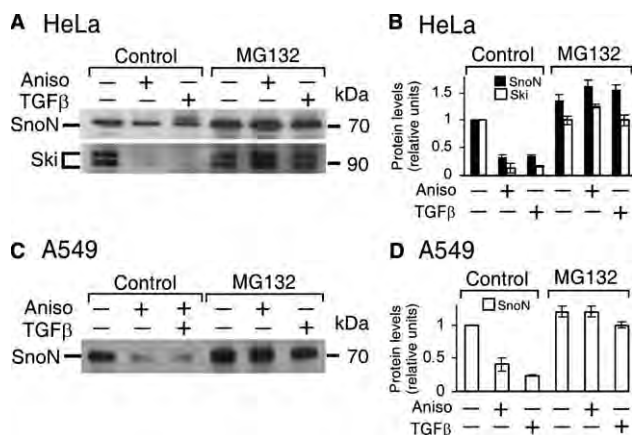


Fig. 2. Anisomycin causes Ski and SnoN degradation via proteasome. (A) HeLa cells were pretreated 2 h without (control) or with 50 μ M MG132 and then were incubated for 30 min with or without 1 μ M anisomycin or 0.3 nM TGF- β 1. (B) Analysis of the effect of anisomycin on Ski and SnoN protein levels in HeLa cells. (C) A549 cells were pretreated 2 h without (control) or with 50 μ M MG132 and then were incubated for 10 min with or without 10 μ M anisomycin. (D) Analysis of the effect of anisomycin on SnoN protein levels in A549 cells. Proteins were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-SnoN or anti-Ski antibodies followed by immunoblotting. Values are expressed as means \pm S.E. of three separate experiments.

with TGF- β caused SnoN degradation, whereas a long treatment for more than 1 h caused an upregulation of SnoN protein levels (Fig. 3A). In order to assess if downregulation of SnoN by anisomycin implicated an activation of TGF- β /Smad pathway, A549 cells were treated 2 or 3 h with or without 10 μ M anisomycin or 0.3 nM TGF- β or were treated for 2 or

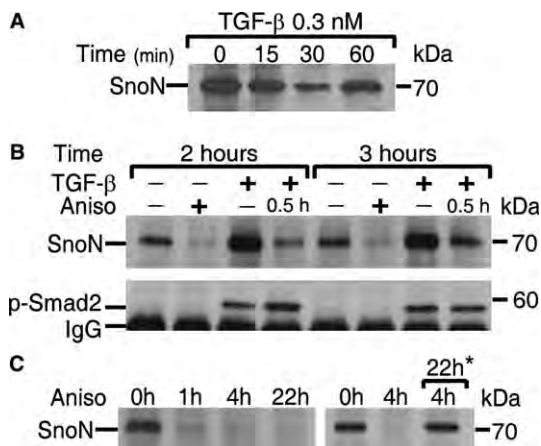


Fig. 3. Anisomycin causes Ski and SnoN downregulation independent of Smad activation in A549 cells. (A) Cells were treated in the absence or presence of 0.3 nM TGF- β 1 for different time points. (B) Cells were treated 2 or 3 h in the absence or presence of 10 μ M anisomycin or 0.3 nM TGF- β 1 or were treated for 2 or 3 h with TGF- β 1 plus anisomycin but anisomycin was added in the last 0.5 h of TGF- β 1 treatment. (C) A549 cells were treated with 10 μ M anisomycin for 1, 4 or 22 h (left panel) or cells were pretreated with 10 μ M anisomycin for 4 h, but in the last lane cells were washed twice with media to remove anisomycin and then cultured in medium with 0.2% FBS to complete 22 h* of incubation (right panel). Proteins were subjected to immunoprecipitation with specific anti-SnoN and anti-Smad2/3 antibodies followed by immunoblotting using anti-SnoN or anti-phospho-Smad2 antibodies.

3 h with TGF- β plus anisomycin but anisomycin was added in the last 0.5 h of TGF- β treatment (Fig. 3B). We assessed the levels of phospho-Smad2 as a parameter of TGF- β /Smad pathway activation. Data showed that anisomycin did not induce Smad2 phosphorylation but caused SnoN degradation even when TGF- β was inducing an upregulation of SnoN and probably when the mechanism used by TGF- β to downregulate SnoN was no longer working. Similar results were obtained when cells were first pretreated 10 min with 10 μ M anisomycin and then were incubated with 0.3 nM TGF- β for 2 or 3 h (data not shown). Data showed anisomycin did not interfere with the Smad activation by TGF- β , however the SnoN levels were not increased by this cytokine once anisomycin induced downregulation of SnoN. It is possible that anisomycin does not affect Smad-dependent transcriptional activation of *sno* gene but clearly downregulates SnoN protein levels. The mechanism used by TGF- β to downregulate Ski and SnoN involves activation of Smads and the participation of ubiquitin ligases such as Smurf2, whereas anisomycin seems to use a different process independent of Smad activation. However, if anisomycin cause that Ski and SnoN interact with an ubiquitin ligase remains to be determined.

The effects of anisomycin on SnoN degradation during prolonged exposure were assessed in Fig. 3C. A549 cells were treated with 10 μ M anisomycin for 1, 4 or 22 h and data showed the levels of SnoN protein were low all the time (Fig. 3C, left panel). However, when cells were treated for 4 h with 10 μ M anisomycin but anisomycin was then removed and cells were incubated until 22 h, we observed SnoN degradation at 4 h and then a recovery of SnoN protein levels at 22 h (Fig. 3C, right panel). The data clearly showed that the effect of anisomycin on SnoN degradation was reverted when this stimulus was removed.

3.4. Anisomycin downregulates Ski and SnoN via a mechanism independent of MAPK-activation and protein synthesis inhibition

Anisomycin is an inhibitor of protein synthesis and also strongly activates MAP kinase pathways, such as ERKs, p38 and JNKs. Thus, we explored the effects of anisomycin, cycloheximide (CHX, another protein synthesis inhibitor), and some activators of stress pathways such as hyperosmolarity (0.5 M NaCl) and okadaic acid (a protein phosphatase inhibitor) on Ski and SnoN protein levels. HeLa cells were treated 1 h with or without 10 μ M anisomycin, 0.3 nM TGF- β , 20 μ M CHX, 0.5 M NaCl or 10 μ M okadaic acid (Ok ac.). In all treatments except with TGF- β we observed MAPK activation (p38, JNKs and ERKs). Notably, CHX, NaCl and okadaic acid were not able to cause Ski and SnoN degradation (Fig. 4A). Analysis of A549 cells treated with anisomycin also showed the presence of activated p38, JNK1/2 and ERK1/2 as well as SnoN degradation. We also observed an upregulation of SnoN after 2 h treatment with TGF- β (Fig. 4B). In order to support that anisomycin uses a mechanism independent of MAPK to cause Ski and SnoN degradation, we also used specific inhibitors of p38 (SB202190), JNKs (SP600125) and ERKs (U0126). HeLa cells were pretreated 30 min with or without 10 μ M of each MAPK inhibitor and then treated 30 min with or without 10 μ M anisomycin. SnoN and Ski were immunoprecipitated and analyzed by immunoblotting. We observed that anisomycin still caused degradation of Ski and SnoN in the presence of MAPK inhibitors in HeLa cells and

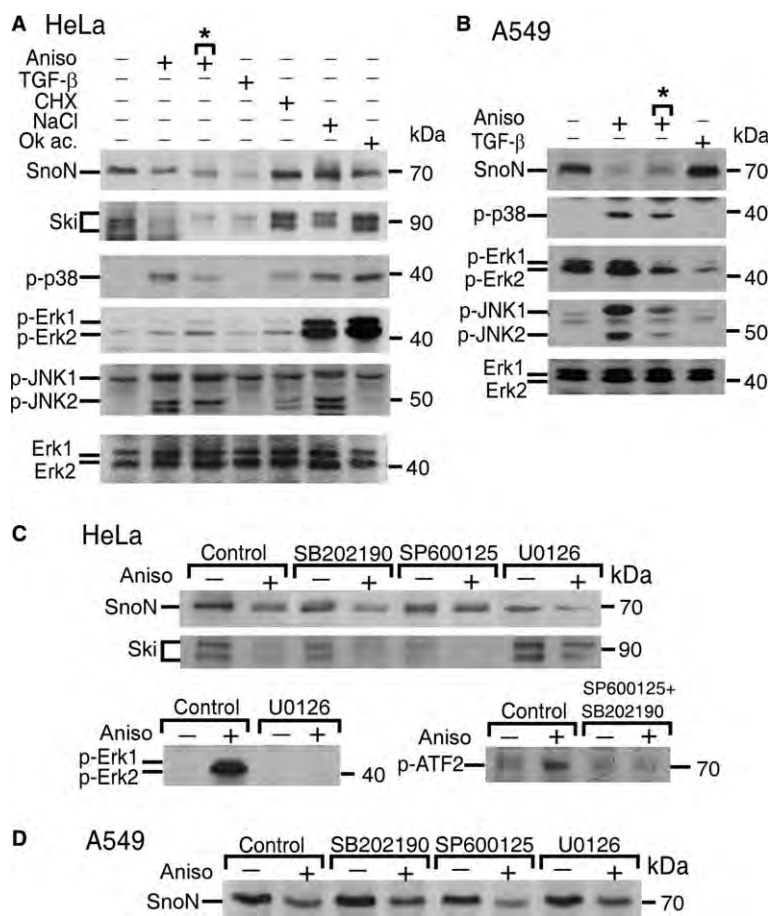


Fig. 4. Anisomycin downregulates Ski and SnoN through a MAPK-independent mechanism. (A) HeLa cells were incubated for 1 h with or without 10 μ M anisomycin alone (Aniso), 10 μ M anisomycin but previously pretreated with 0.2 μ M anisomycin for 3 h (line marked with *), 0.3 nM TGF- β 1, 20 μ M CHX, 0.5 M NaCl or 1 μ M okadaic acid (Ok ac.). (B) A549 cells were incubated for 1 h with or without 10 μ M anisomycin alone (Aniso), 10 μ M anisomycin but previously pretreated with 0.2 μ M anisomycin for 3 h (line marked with *), or 0.3 nM TGF- β 1 for 2 h. (C) HeLa cells or (D) A549 cells were pretreated 30 min with or without MAPK inhibitors: 10 μ M SB202190, 10 μ M SP600125 or 10 μ M U0126, and then cells were incubated for 30 min with 10 μ M anisomycin. Proteins were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Ski or anti-SnoN antibodies followed by immunoblotting. Total protein extracts (50 μ g) were separated in SDS-PAGE and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1 and p-ERK2), p38 (p-p38), JNK (p-JNK1 and p-JNK2) and ATF2 (p-ATF2) proteins were detected by immunoblotting. ERK1/2 served as loading control.

similar results were obtained for SnoN degradation in A549 cells (Fig. 4C and D). MAPK inhibitors were very efficient and blocked more than 90% of MAPK activation, seen as ERK1/2 and ATF2 phosphorylation (lower panels in Fig. 4C). ATF2 is a substrate for JNK and p38 kinases. Therefore, data showed that activation of MAP kinases or inhibition of protein synthesis do not play any significant role in the anisomycin-induced downregulation of Ski and SnoN, since they cannot mimic anisomycin effect on Ski and SnoN. Furthermore, anisomycin activates MAPKs and inhibit protein synthesis but it does not cause Ski and SnoN degradation in HepG2 cells.

Recently, it was reported that anisomycin pretreatment desensitizes its effects on MAPK activation [16]. We carried out similar experiments in order to evaluate if we could also desensitize anisomycin effects on Ski and SnoN degradation. HeLa cells were pretreated for 3 h with 0.2 μ M anisomycin and then treated 1 h with 10 μ M anisomycin. We observed that MAPKs activation was decreased but that the effect on SnoN degradation remained (Fig. 4A and B, lane indicated with *). Data correlated with the results previously reported showing

that anisomycin desensitizes its own effects on MAPK activation [16], however regarding the case of SnoN degradation, we could not observe a desensitization of anisomycin effect, which suggests that anisomycin uses different mechanisms in each case.

3.5. Downregulation of Ski and SnoN by anisomycin modulates Smad7 expression

Ski and SnoN exert their actions on TGF- β signaling through transcriptional repression, thus we analyzed if anisomycin was able to modulate TGF- β signaling, as a consequence of Ski and SnoN degradation. Recently, it was reported that endogenous Ski inhibits Smad7 expression maintaining its promoter in a repressed state in the absence of TGF- β through binding to the SBE in conjunction with Smad4 [14]. Thus far, Smad7 is the only gene reported as a Ski target. We analyzed whether downregulation of Ski co-repressor by anisomycin may facilitate the recruitment of Smads to the *smad7* promoter and Smad7 induction by TGF- β . We performed ChIP assays using HeLa cells treated for 1 h with 0.5 nM TGF- β , 10 μ M anisomycin or with

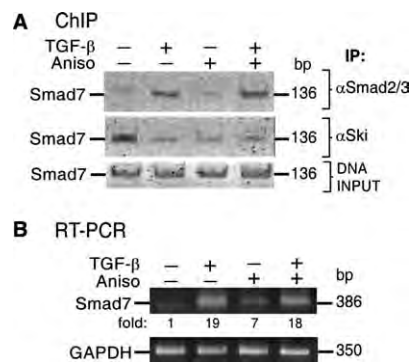


Fig. 5. Anisomycin causes Ski and SnoN downregulation and modulates Smad7 expression in HeLa cells. (A) Cells were treated for 1 h with 0.5 nM TGF- β 1, 10 μ M anisomycin or TGF- β 1 plus anisomycin and ChIP assays were carried out. Anti-Smad2/3 or anti-Ski antibodies were used for immunoprecipitations and PCRs were done with primers spanning the SBE element that amplified a product of 136 bp from *smad7* promoter. (B) Cells were pretreated 20 min with 20 μ M CHX and then incubated 2 h with or without 0.3 nM TGF- β 1, 10 μ M anisomycin or TGF- β 1 plus anisomycin. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed for Smad7 and GAPDH.

TGF- β plus anisomycin. ChIP was carried out with anti-Smad2/3 and anti-Ski specific antibodies and then DNA complexed with immunoprecipitated proteins was amplified by PCR with specific primers for Smad7 promoter. We observed that in the absence of TGF- β there was no binding of Smad2/3 complexes to the *smad7* promoter region that was amplified by PCR, but when cells were treated with TGF- β or TGF- β plus anisomycin the binding of Smad2/3 complexes were present on the promoter (~3-fold increase over control). On the other hand, the presence of Ski associated to the *smad7* promoter was observed in control cells, but when TGF- β , anisomycin or the combination of both were applied to cells there was a decrease of Ski binding to the *smad7* promoter (80% decrease compared to control value), probably due to the degradation of Ski (Fig. 5A). Negative controls were done with oligonucleotides spanning a region in *smad7* promoter downstream of SBE or using an unrelated antibody for the immunoprecipitation and in both cases no amplification of *smad7* promoter fragment was obtained (data not shown).

In order to assess if an increment in Smad7 mRNA expression could occur after anisomycin treatment and as a consequence of Ski degradation, we performed RT-PCR analysis. HeLa cells were pretreated with CHX for 20 min and then incubated 2 h in the absence or presence of 0.3 nM TGF- β , 10 μ M anisomycin or TGF- β plus anisomycin. Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed for Smad7. We observed that TGF- β induced Smad7 mRNA expression (19-fold over control); anisomycin also induced an increase of Smad7 mRNA expression (7-fold over control) as well as TGF- β plus anisomycin (18-fold over control) (Fig. 5B). These experiments were carried out in the presence of CHX, which did not cause Smad7 induction (see control). Data suggest that anisomycin induced an increase of Smad7 mRNA expression probably by Ski degradation and derepressing *smad7* gene as TGF- β does. This also suggests that one important event in the anisomycin-induced Ski and SnoN downregulation could be to facilitate TGF- β signaling.

4. Concluding remarks

Our study reports a novel action of anisomycin since causes downregulation of TGF- β signaling co-repressors Ski and SnoN mediated by the proteasome pathway, but through a mechanism that does not involve MAPK activation, protein synthesis inhibition or Smad activation. This effect of anisomycin on Ski and SnoN proteins suggest that exist alternative processes to downregulate these negative modulators of TGF- β signaling independent of Smad activation.

Acknowledgment: We thank Dr. J.A. García-Sáinz for HepG2 cells and helpful discussions. A549 and HeLa cells were a gift from Dr. A. Pardo and D. González, respectively. This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico/UNAM (IN218501 and IN230504) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36676-N).

References

- [1] ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C.-H. (2000) Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF β signaling. *Trends Biol. Sci.* 25, 64–70.
- [2] Wotton, D., Lo, R., Lee, S. and Massagué, J. (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97, 29–39.
- [3] Liu, X., Sun, Y., Weinberg, R.A. and Lodish, H.F. (2001) Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine and Growth factor Rev.* 12, 1–8.
- [4] Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. and Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF beta signaling. *Genes Dev.* 13, 2196–2206.
- [5] Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K. and Kawabata, M. (1999) c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with Smads. *J. Biol. Chem.* 274, 35269–35277.
- [6] Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H. and Wrana, J.L. (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation. *Mol. Cell* 6, 1365–1375.
- [7] Bonni, S., Wang, H.R., Causing, C.G., Kavsak, P., Stroschein, S.L., Luo, K. and Wrana, J.L. (2001) TGF- β induces assembly of a Smad2–Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat. Cell Biol.* 6, 587–595.
- [8] Stroschein, S.L., Bonni, S., Wrana, J.L. and Luo, K. (2001) Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev.* 15, 2822–2836.
- [9] Lo, R.S., Wotton, D. and Massagué, J. (2001) Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional corepressor TGIF. *EMBO J.* 20, 128–136.
- [10] Ogawa, T., Hayashi, T., Kyoizumi, S., Kusunoki, Y., Nakachi, K., MacPhee, D.G., Trosko, J.E., Kataoka, K. and Yorioka, N. (2004) Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via p38 MAP-kinase pathway. *J. Cell Sci.* 117, 2087–2096.
- [11] Dhawan, P., Bell, A., Kumar, A., Golden, C. and Mehta, K.D. (1999) Critical role of p42/44^{MAPK} activation in anisomycin and hepatocyte growth factor-induced LDL receptor expression: activation of Raf-1/MEK-1/p42/p44^{MAPK} cascade alone is sufficient to induce LDL receptor expression. *J. Lipid Res.* 40, 1911–1919.
- [12] Cano, E., Hazzalin, C.A. and Mahadevan, L.C. (1994) Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-Fos and c-Jun. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7352–7362.
- [13] Macías-Silva, M., Li, W., Leu, J.I., Crissey, M.A. and Taub, R. (2002) Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- β signals during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 277, 28483–28490.

- [14] Denissova, N.G. and Liu, F. (2004) Repression of endogenous Smad7 by Ski. *J. Biol. Chem.* 279, 28143–28148.
- [15] Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H. and Weinberg, R.A. (1999) SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 12442–12447.
- [16] Hazzalin, C.A., Le Panse, R., Cano, E. and Mahadevan, L.C. (1998) Anisomycin selectively desensitizes signaling components involved in stress kinase activation and Fos and Jun induction. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1844–1854.
- [17] Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. and Luo, K. (1999) Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286, 771–774.