



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

VÍAS DE DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
SUPRESORAS DE TUMORES SKI Y SNON
INDEPENDIENTES DE LA VÍA DEL TGF-BETA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

JACQUELINE HERNANDEZ
DAMIAN

Tutor: DRA. MARINA MACÍAS SILVA

MÉXICO, D. F.

2009





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.

Agradecimientos

Al Instituto de Fisiología Celular y a la Facultad de Química por acogerme en esta nueva etapa de mi formación académica.

De manera especial a la Dra. Marina Macías Silva por permitirme trabajar bajo su tutoría y desempeñarme a lo largo de este tiempo en su laboratorio.

A la Biól. Marcela Sosa Garrocho por su asesoría técnica a lo largo de la realización de esta tesis.

Este trabajo fue llevado a cabo gracias a los donativos de DGAPA IN222909 y CONACyT 49493-Q.

A mis padres y hermanos .

Abreviaturas

ALK5	Activin receptor-like kinase 5
ANS	anisomicina
APC	Complejo Promotor de la Anafase
BMP	Proteínas Morfogenéticas del Hueso
Co-Smad	Smad Común
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
CHX	cicloheximida
ECL	Enhanced Quimioluminiscence
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ERK	Cinasa Relacionada a la Señalización Extracelular
HDAC	Desacetilasa de Histonas
I-Smad	Smad Inhibitoria
IP	Inmunoprecipitación
JNK	Cinasa de la Región NH ₂ -Terminal de Jun
MAD	Mothers Against Decapentaplegic
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
MKK	MAPK Kinase
PBS	Solución de Buffer de Fosfatos
PDVF	Difluoruro de Polivinilideno
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomina
PP2A	Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A
Pur	Puromicina
R-Smad	Smad Regulada por Receptor
shRNA	Small-hairpin RNA
Ski	<u>S</u> loan- <u>K</u> ettering <u>I</u> nstitute proto-oncogene
Smurf2	<u>S</u> mad <u>u</u> biquitination- <u>r</u> elated <u>f</u> actor 2
SnoN	<u>S</u> ki- related <u>n</u> ovel gene <u>N</u>
SBE	Elementos de Unión a las Smad
SFB	Suero Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
Tβ	TGF-β
TAK1	TGF-beta-activated kinase 1
TβRI/II	Receptor de TGF-β tipo I/II
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TGIF	<u>T</u> G3- <u>I</u> nteracting <u>F</u> actor
TNTE	<u>T</u> ris- <u>N</u> aCl- <u>T</u> ritón- <u>E</u> DTA
Ub	Ubiquitina

Índice de contenidos:

Introducción.	
<i>Las oncoproteínas Ski y SnoN.</i>	1
<i>Los correpresores transcripcionales Ski y SnoN regulan la señalización del TGF-β.</i>	2
<i>El perfil de expresión de Ski y SnoN.</i>	5
Modelos de estudio de las proteínas supresoras de tumores Ski y SnoN	6
La regulación de la expresión de Ski y SnoN vía el proteosoma	7
Inhibidores de la señalización del TGF-beta	9
ANTECEDENTES	10
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	19
El mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina es dependiente del contexto celular.	19
Participación de las desubiquitininasas en el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina	21
El inhibidor de ALK5 (SB431542) bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina	22
El mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina también responde a cicloheximida y puromicina	24
Caracterización del efecto de puromicina en los niveles de SnoN	26
G418 e higromicina no tienen efecto sobre la estabilidad de SnoN	28
Algunos activadores de estrés celular no modifican los niveles de SnoN	29
Papel de ALK5 en el mecanismo de anisomicina	30
Discusión	34
Conclusiones	39
Perspectivas	40
Bibliografía	41
Apéndice	45

Resumen

Ski y SnoN son dos oncoproteínas que regulan negativamente la señalización del TGF- β , una citocina involucrada en procesos celulares como la migración, la diferenciación, apoptosis y sobrevivencia. El TGF-beta induce una reducción en los niveles de las proteínas Ski y SnoN mediante la degradación vía el proteosoma 26S y la participación de las proteínas Smads.

Nuestro grupo describió recientemente un mecanismo alternativo de degradación de Ski y SnoN inducido por anisomicina, vía el proteosoma pero que no involucra la señalización de las Smads.

Para abordar el mecanismo de anisomicina se utilizó el SB431542 un inhibidor del receptor I del TGF-beta. Inesperadamente el tratamiento con SB431542 bloqueó la degradación de Ski y SnoN por anisomicina, en distintas líneas celulares sensibles al efecto de la anisomicina. También se identificaron a la cicloheximida y puromicina como compuestos capaces de inducir la degradación de Ski y SnoN de manera análoga a anisomicina. Para aclarar el papel de ALK5 en el mecanismo de anisomicina, se utilizó un shRNA para depletar los niveles de ALK5 en células AD293. Los niveles de ALK5 fueron monitoreados por ensayos de RT-PCR. El tratamiento con anisomicina en células que no expresan al receptor ALK5, mostró una resistencia al efecto degradación, sugiriendo receptor ALK5 en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina.

Introducción

Las oncoproteínas Ski y SnoN.

Ski y SnoN pertenecen a la familia de protooncogenes Ski. El miembro fundador de la familia Ski fue descubierto como el producto oncogénico del virus aviar “Sloan-Kettering-Institute” (v-Ski). El oncogen *v-ski* causa la transformación morfológica de fibroblastos de embriones de pollo, y es capaz de inducir la diferenciación miogénica en células embrionarias. El homólogo celular humano *c-ski* y otro producto cercanamente relacionado llamado *snoN*, fueron clonados con base en su homología con la secuencia de *v-ski*.

En humano, existen cuatro isoformas para SnoN: SnoN, SnoN2, Sno1 y SnoA, generadas por procesamiento alternativo, mientras que en ratón solamente se expresan dos isoformas: *SnoN* y *SnoN2*. También han sido identificados los productos homólogos de c-Ski y c-SnoN en el pollo, en *Xenopus* y en el pez cebra.

Ski y SnoN son proteínas nucleares de 728 y 684 aminoácidos respectivamente (Figura 1) Ambas proteínas carecen de algún tipo de actividad catalítica, de tal forma que sus funciones residen prácticamente en las interacciones que llevan a cabo con otras proteínas. La región amino terminal tanto de Ski como de SnoN consiste de 270 aminoácidos aproximadamente, y se encuentra altamente conservada entre los miembros de la familia Ski (100% de identidad), como el caso de *v-Ski* (95% de indentidad) y SnoN (70% de identidad). Se ha reportado que dicha región amino terminal es esencial para que Ski y SnoN lleven a cabo sus funciones en los procesos de diferenciación y transformación. Por otro lado la porción carboxilo terminal, que representa casi la mitad de la molécula, muestra muy poca homología entre los miembros de la familia (Figura 1)(Luo, 2004). Sin embargo, se ha reportado que esta región porción carboxilo terminal de Ski y SnoN, posee una función importante en la homo y heterodimerización entre ambas proteínas y otras proteínas no relacionadas con la familia ski (Liu et al 2001). Ensayos *in vitro* e *in vivo* indican que c-Ski y c-SnoN poseen una predilección hacia la formación de heterodímeros, favoreciendo su unión a secuencias específicas en el DNA (Cohen et al 1999).

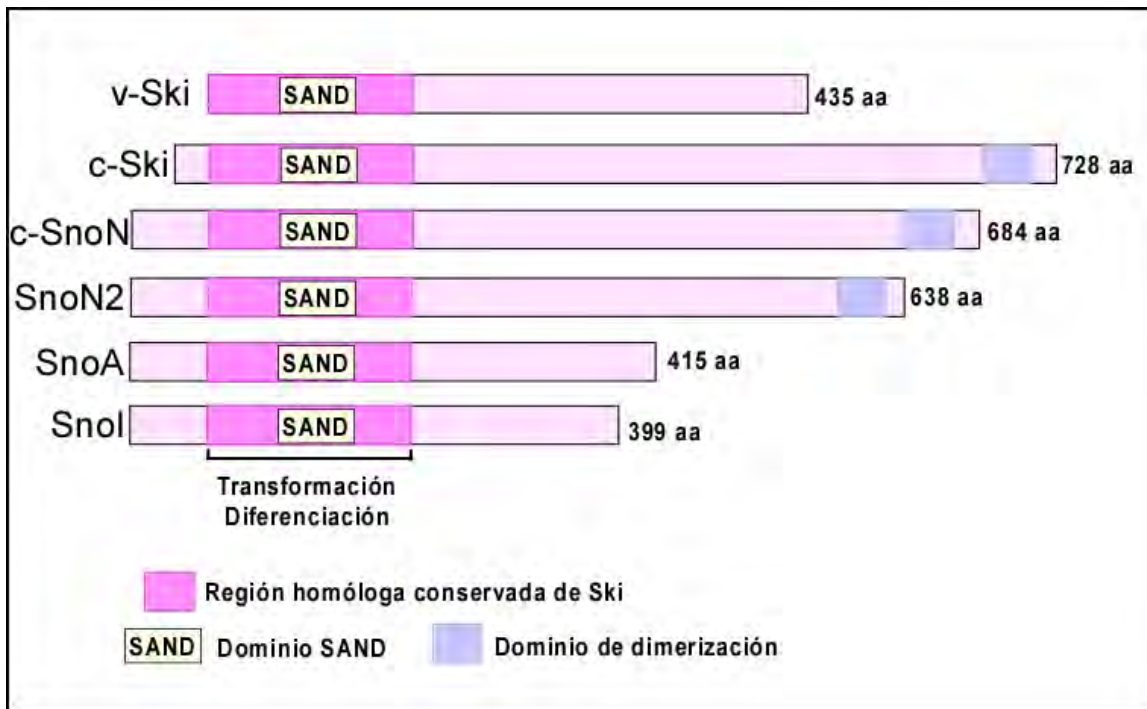


Figura 1. Familia de oncoproteínas ski. El número de residuos de aminoácidos para cada proteína se encuentran indicados a la derecha. La región homóloga conservada de Ski se señala en rosa (incluyendo el dominio SAND). Esta región es suficiente para la actividad de transformación y diferenciación de Ski y SnoN. El dominio de dimerización en la porción carboxilo terminal participa en la homo y heterodimerización entre Ski y SnoN.

Los correpresores transcripcionales Ski y SnoN regulan la señalización del TGF- β .

Estas protooncoproteínas forman parte de la vía de transducción de señales del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) actuando como correpresores nucleares de las proteínas Smads (Sun et al., 1999; Stroschein et al., 1999).

El TGF-beta es una citocina que controla un amplio repertorio de procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La señalización del TGF-beta requiere de dos componentes esenciales: los receptores con una actividad de cinasa para residuos de serina y treonina, y los efectores intracelulares que son las proteínas Smads (Massagué y Gomis., 2006).

Esta citocina se une a los receptores situados en la membrana plasmática formando un complejo entre el receptor tipo I (T β R-I, también conocido como ALK5) y el receptor tipo II (T β R-II). Este sistema fue identificado a través de aproximaciones bioquímicas y genéticas, demostrando que los receptores tipo I y II son cinasas transmembranales para residuos de serina y treonina (Miyazono, 2000) (Figura 2). El genoma humano posee secuencias para siete receptores tipo I (ALKs 1-7) y cinco para los receptores tipo II (ActR-IIA, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-

II y T β R-II), de tal forma que los diferentes miembros de la familia del TGF- β induzcan distintas combinaciones entre los receptores tipo I y II. Una característica esencial que distingue a los receptores tipo I, es el segmento regulatorio de 30 aminoácidos, conocido como “dominio GS”, que se localiza entre la región transmembranal y el dominio de cinasa (Massagué y Gomis, 2006).

Una vez formado el complejo de receptores unidos al ligando, el receptor tipo II fosforila los residuos de serinas y treoninas del dominio GS de ALK5, propagando la señal del TGF-beta al fosforilar a las proteínas R-Smads (*Receptor-regulated Smad*), que en el caso del TGF- β son Smad2 y Smad3. Las R-Smads fosforiladas por ALK5 pueden entonces formar complejos heteroméricos con un mediador común de las Smads, la Smad4 (Co-Smad), y posteriormente traslocarse al núcleo. Una vez ahí es posible la interacción con otros factores de transcripción para unirse a regiones específicas del DNA, y entonces regular la transcripción de diversos genes blanco del TGF-beta.

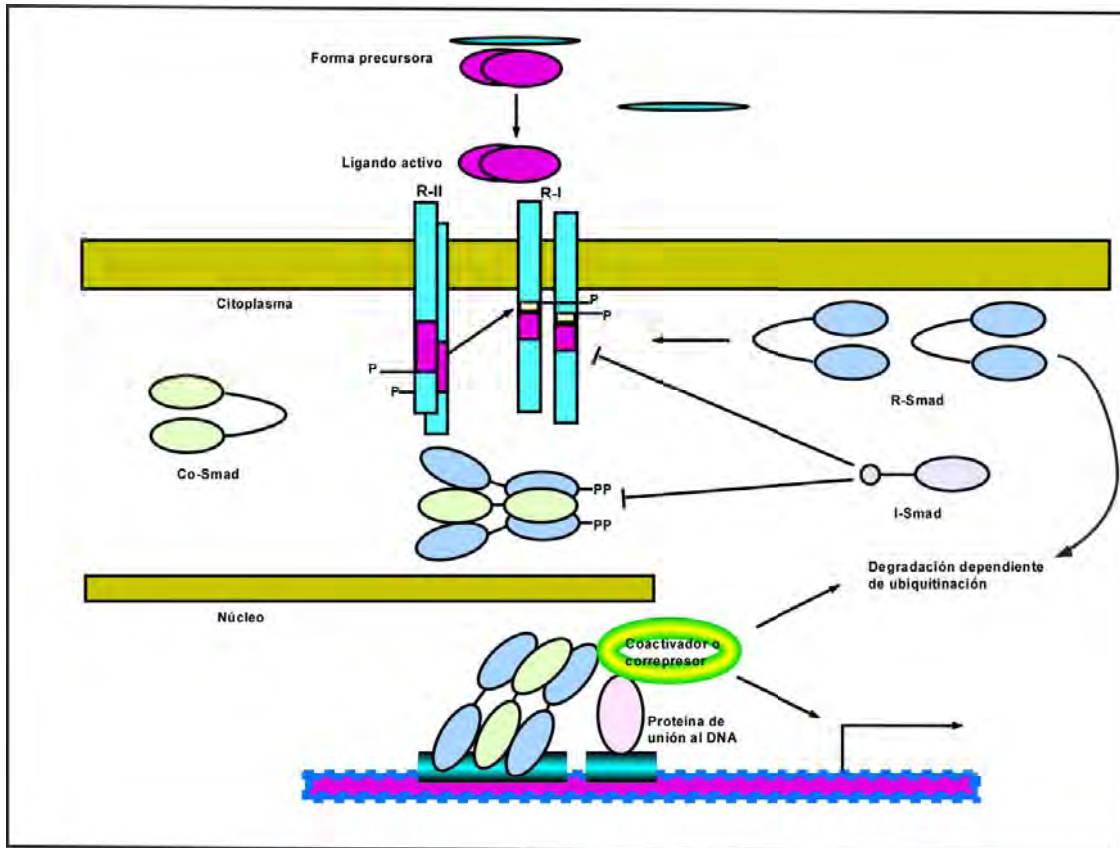


Figura 2. Vía de señalización del TGF-beta vía las proteínas Smads. El TGF-beta a través de sus receptores con actividad de cinasas de serinas y treoninas activa a las proteínas Smads. RII y RI representan al receptor tipo II y tipo I respectivamente.

Ski y SnoN interaccionan con Smad2, Smad3 y Smad4, de tal forma que pueden ser reclutados indirectamente a los elementos de unión a las Smads en el DNA (SBE, Smad Binding Element), a través de la unión con los complejos activos de las Smads. La interacción de Ski y SnoN con los complejos activos de las Smads,

reprime la habilidad de las Smads para inducir la transcripción de algunos genes blanco del TGF-beta (Luo, 2004).

Para el caso de Ski se reportó que Smad2 y Smad3 interactúan a través de su dominio C-terminal MH2 y de una manera dependiente del estímulo del TGF-beta (Akiyoshi et al., 1999). También se reportó que Ski posee dos sitios de unión a las Smads, con diferentes propiedades de unión. Al parecer Ski se incorpora en el complejo de las Smads, interfiriendo con la interacción de Smad3 con el co-activador p300, y reclutando a su vez proteínas pertenecientes a los complejos de HDACs (desacetilasas de histonas) y a correpresores transcripcionales como NCoR/SMRT y mSin3A (Nomura et al., 1999).

Datos de Wu y colaboradores apuntan que Ski posee un dominio (I-loop) o asa de interacción altamente conservada en la familia Ski, que se une con el asa L3 de Smad4. Por otro lado la región que utiliza Smad4 para unirse a las Smads, es precisamente la requerida para la unión con las R-Smads, sugiriendo modelo donde Ski rompe la interacción entre las R-Smads y Smad4. (Figura 3).

Otro mecanismo de acción de SnoN para modular negativamente la señalización del TGF-beta, fue a partir de un estudio de la localización de SnoN en células malignas y normales. Ensayos de inmunofluorescencia demostraron que SnoN tiene una localización citoplasmática en células epiteliales provenientes de tejido mamario humano sano, mientras que en células malignas esta localización es preferencialmente nuclear, sugiriendo un mecanismo alternativo, donde la señalización de las Smads es inhibida a través el secuestro de las R-Smads en el citoplasma, bloqueando la traslocación al núcleo, de una forma dependiente del estímulo con TGF-beta (Krakowski et al., 2005).

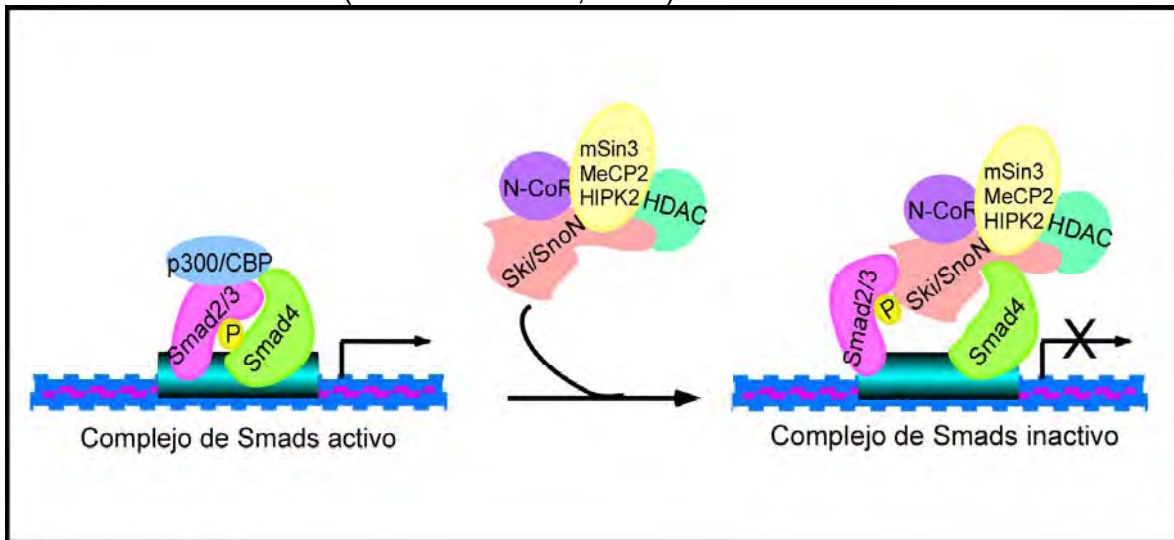


Figura 3. Mecanismo de represión de las proteínas Smad por Ski y SnoN. Ski y probablemente SnoN poseen regiones de unión a las Smad2, Smad3 y Smad4. La interacción de Ski y SnoN con las Smads rompe el complejo activo de las Smads en el núcleo, además de reclutar maquinaria represora de la transcripción. HDAC, complejo de desacetilasas de histonas (Modificado de Luo, 2004).

El perfil de expresión de Ski y SnoN.

Es posible que la actividad oncogénica de Ski y SnoN tenga una relación con niveles altamente elevados de ambas proteínas en distintas líneas celulares, derivadas de cánceres humanos, incluyendo melanoma, cáncer esofágico, cáncer colorectal, cáncer pancreático y leucemia (Tabla 1).

<i>Ski</i>	<i>SnoN</i>
Melanoma	Linfoma
Cáncer esofágico	Melanoma
Cáncer colorectal	Cáncer de mama
Cáncer pancreático	Cáncer de pulmón
Cáncer esofágico	Cáncer esofágico
Leucemia	Fibrosis renal

Tabla 1. Padecimientos humanos donde los niveles de Ski y SnoN se encuentran alterados. En todos los casos, a excepción de la fibrosis renal los niveles de Ski y SnoN están sobrepresados. (Datos tomados de Le Scolan et al 2008 y Zhu et al 2007)

Ski y SnoN son expresados en la mayoría de los tejidos tanto en el estadio embrionario como en el organismo adulto, pero a niveles muy distintos. Bajo condiciones fisiológicas normales una elevación en la expresión de Ski o SnoN ocurre solamente durante ciertos estadios de la embriogénesis y al parecer se encuentra sujeta a un estricto control (He J et al., 2003).

El gen *sno* se localiza en el cromosoma 3q26, un locus oncogénico que frecuentemente se amplifica en cánceres humanos, mientras que el gen *ski* se encuentra en el cromosoma 1p36, un locus potencial para supresores de tumores, frecuentemente sujeto a deleciones en neuroblastomas y melanomas (Le Scolan et al., 2008).

Para el caso particular de Ski, la expresión de la proteína muestra una regulación temporal y espacial a lo largo del desarrollo. Se han detectado bajos niveles del mRNA de Ski en varios tejidos de organismos adultos de distintas especies. Por ejemplo, en el ratón se han detectado bajos niveles de Ski a lo largo de la embriogénesis, aunque se han detectado incrementos del mRNA de Ski en estadios y tejidos específicos. Los cambios más tempranos se encontraron en el tejido neural y en el músculo esquelético. A partir del día embrionario 8.5-9.5 (E8.5-9.5), los niveles del mRNA de Ski se elevan en el tubo neural y en las células migratorias de la cresta neural, posteriormente hay una elevación en la expresión de Ski en el sistema nervioso central y en células granulares del cerebelo. En el músculo esquelético los niveles de Ski muestran un incremento a partir del E12.5 y vuelven al nivel basal en E15.5, permaneciendo muy bajos en el músculo esquelético hasta la etapa adulta. También se ha demostrado la importancia de la expresión de Ski en los procesos de morfogénesis de cara y cerebro (Berk et al., 1997).

Para el caso de Sno, sus cuatro isoformas (SnoN, SnoN2, SnoA y SnoI) son expresadas en varios tejidos humanos, sin embargo la isoforma SnoI tiene un patrón específico de expresión en el músculo esquelético y en tumores de rhabdomioma. También se ha reportado que SnoI se expresa en otros mamíferos como perro, vaca y conejo, pero no así en ratón y pollo. En ratón se expresan dos isoformas del gen *sno*: SnoN y SnoN2, esta última isoforma representa aproximadamente el 80% del mRNA de *sno* en la mayoría de los tejidos, mientras que en el cerebro representa alrededor del 50% (Pearson-White y Crittenden, 1997).

Se ha demostrado que el ciclo celular tiene un efecto sobre la expresión de Ski y SnoN y depende específicamente del tipo celular. En el caso de células mieloides, al parecer estas proteínas muestran una elevación en respuesta a la progresión del ciclo celular, observándose una mayor elevación en la fase G1. (Pearson-White y Crittenden, 1997).

Modelos de estudio de las proteínas supresoras de tumores Ski y SnoN.

Existen estudios *in vivo* en ovocitos de *Xenopus*, en el pez cebra y en el ratón que demuestran que Ski posee un papel esencial en el desarrollo en linajes muscular y neuronal. En *Xenopus* se ha demostrado que Ski puede bloquear la señalización de las BMPs (Bone Morfogenetic Proteins), las cuales llevan a cabo una importante función en el desarrollo de los vertebrados. Se demostró que al inyectar RNA codificante para *c-ski* humano en embriones de *Xenopus*, Ski es capaz de interactuar directamente con los complejos activos de las Smads reguladas por las BMPs, reprimiendo su actividad y llevando a la formación de un segundo eje neural, mientras que en células murinas W-20-17 tenía un efecto de inhibición en la diferenciación a osteoblastos. Como puede apreciarse, Ski es capaz de reprimir la actividad de todas las Smads reguladas por el receptor, y regular así la señalización del TGF- β y de las BMPs durante el desarrollo de los vertebrados (Wang et al., 2000).

En estudios de la función de Ski en ratón, se ha reportado un ratón transgénico que sobrexpresas la forma truncada de *c-ski* (muy parecida a *v-ski*), el cual desarrolla un incremento en la masa muscular en etapas postnatales, debido a una hipertrofia de las fibras musculares (Sutrave et al., 1990). En otro estudio, con un ratón "knockout" para *c-ski*, en donde el gen *c-ski* fue interrumpido, los resultados obtenidos demostraron que Ski tiene un papel importante en la morfogénesis de las estructuras craneofaciales y en desarrollo del sistema nervioso central. El mutante homocigoto (*ski* $-/-$) es letal en etapas perinatales, debido a una exencefalia (un defecto causado por una falla en el cierre del tubo neural craneal durante la neurulación). Este defecto en el tubo neural en embriones *ski* ($-/-$), coincide con una apoptosis excesiva en el neuroepitelio y en el mesénquima craneal. Los mutantes homocigotos para *ski* ($-/-$) también muestran una reducción muy severa en la masa muscular esquelética, así como defectos en la expansión de la población de los precursores miogénicos (Berk et al., 1997).

Al parecer las funciones que lleva a cabo SnoN en la homeostasis y en el desarrollo embrionario no son completamente compartidas con Ski. La generación de un ratón knockout (*sno -/-*) mostró una letalidad a una etapa temprana de la embriogénesis (día 3.5), pues no es posible la formación del blastocisto, mostrando su importancia en la homeostasis y en el desarrollo temprano del organismo. Sin embargo para el caso de los ratones heterocigos para *sno (+/-)*, si se les compara con ratones silvestres (*sno +/+*), los heterocigos desarrollan linfomas espontáneos a bajas frecuencias, además de presentar una hipersensibilidad a carcinógenos químicos y una mayor tasa de crecimiento de tumores. Cabe destacar que los ratones *sno (+/-)* exhiben una baja sensibilidad a la apoptosis o al arresto celular en las células B, células T y en fibroblastos embrionarios inducida por TNF- α o cicloheximida. Estos datos sugieren que SnoN podría estar actuando como un supresor de tumores en algunos tipos celulares. Además estos ratones heterocigos *sno (+/-)* podrían ser utilizados como un modelo para el estudio del papel de SnoN en el crecimiento de tumores (Shinagawa et al., 2000).

Recientemente se publicó un estudio acerca de la función que lleva a cabo SnoN en la tumorigénesis, utilizando un RNAi para abatir la expresión de SnoN en las líneas celulares A549 (carcinoma de pulmón) y MDA-MB-231 (carcinoma de mama), las cuales se caracterizan por expresar altos niveles de SnoN. Estos experimentos demostraron que la reducción en los niveles de SnoN inhibe la capacidad proliferativa de las células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* (mediante la utilización de ratones desnudos), pero promueve la transición epitelio mesénquima (EMT) y la metástasis de tumores, indicando que SnoN posee efectos duales, es decir, posee la capacidad de comportarse como un oncogen o bien como un supresor de tumores (Zhu et al., 2006).

La regulación de la expresión de Ski y SnoN vía el proteosoma.

La expresión de SnoN y de Ski es controlada principalmente por el TGF-beta a nivel de la estabilidad de la proteína, y al menos para SnoN también a un nivel de regulación transcripcional.

El estímulo del TGF-beta induce una rápida degradación de SnoN, mientras que a tiempos largos de tratamiento el TGF- β induce un marcado incremento en la expresión de SnoN, lo cual lleva a una inactivación de la señal del TGF-beta y de los complejos de las Smads, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación negativa para regular la señalización de la citocina (Stroschein et al., 1999).

El mecanismo de degradación de SnoN y Ski es inducido por la señalización del TGF-beta, y por lo tanto es un proceso dependiente de las proteínas Smads, así como de la degradación proteolítica vía el proteosoma 26S.

La degradación proteolítica de las proteínas intracelulares por la vía del proteosoma-ubiquitina es esencial para diversos procesos como la transducción de señales, la progresión del ciclo celular y la endocitosis. La ubiquitinación es una modificación postraducciona que involucra la unión covalente de cadenas de ubiquitina (una proteína altamente conservada constituida por 76 aminoácidos) a una proteína blanco. Por lo cual, el sistema del proteosoma 26S se compone

básicamente de dos procesos: El primero, en donde múltiples moléculas de ubiquitina son unidas covalentemente a la proteína blanco, y el segundo, en donde la proteína poli-ubiquitinada es degradada vía el complejo proteosoma 26S.

La ubiquitinación es mediada por al menos 3 enzimas: 1) La enzima activadora de la ubiquitina (E1); 2) La enzima conjugadora de la ubiquitina (E2); y 3) la ligasa de ubiquitina (E3). Las ligasas de ubiquitina son enzimas primordiales para el reconocimiento específico de las proteínas blanco; se ha reportado que alguna desregulación en estas enzimas se encuentra asociada a padecimientos como el cáncer.

Los componentes de la vía de señalización del TGF-beta son regulados de una manera muy precisa por el sistema del proteosoma 26S. La vía del proteosoma esta también involucrada en la destrucción de las proteínas R-Smads; Smad2 y Smad3 y de los receptores. (Izzi y Attisano, 2004; Shang et al., 2002; Glasgow y Mishra, 2008). Entre las ligasas de ubiquitina tipo E3 que se encuentran asociadas con el mecanismo de degradación de SnoN, se tienen a Smurf2, el complejo APC/Cdh1 y más recientemente Arkadia (Figura 4). Smurf2 es una ligasa de ubiquitina tipo E3 perteneciente a la familia HECT que se caracteriza por poseer dominios WW (también conocidos como WWP) que a su vez reconocen motivos PY. Por medio de estudios de sobreexpresión y de ensayos de pulso y caza, se describió que Smurf2 utiliza como proteína adaptadora a Smad2, uniéndose al motivo PY localizado en la parte media (región linker) mediando la interacción con SnoN, de una manera dependiente del estímulo del TGF-beta (Bonni et al, 2001). El complejo APC/Cdh1 es una ligasa de ubiquitina tipo E3 implicada en la regulación del ciclo celular. El complejo consiste de 11 subunidades en mamíferos, una de las cuales, APC11 es la subunidad que posee la actividad catalítica de ligasa E3. Cdh1 se asocia con APC, activándola de una manera dependiente del sustrato y del ciclo celular (Stroschein et al., 2001). De manera similar, Smad3 media la interacción entre APC/Cdh1 y SnoN para la degradación del correpresor vía el proteosoma 26S. Se identificó recientemente a la proteína *Arkadia* como otra ligasa de ubiquitina involucrada en la degradación de SnoN, mediante la utilización de una biblioteca de RNAi para ligasas de ubiquitina. Esta proteína, que también ubiquitina a Ski para su posterior degradación vía el proteosoma, es otro de los componentes que utiliza el TGF- β , y que necesita de la interacción con Smad2/3 fosforiladas para llevar a la degradación de SnoN y Ski (Levy et al., 2007).

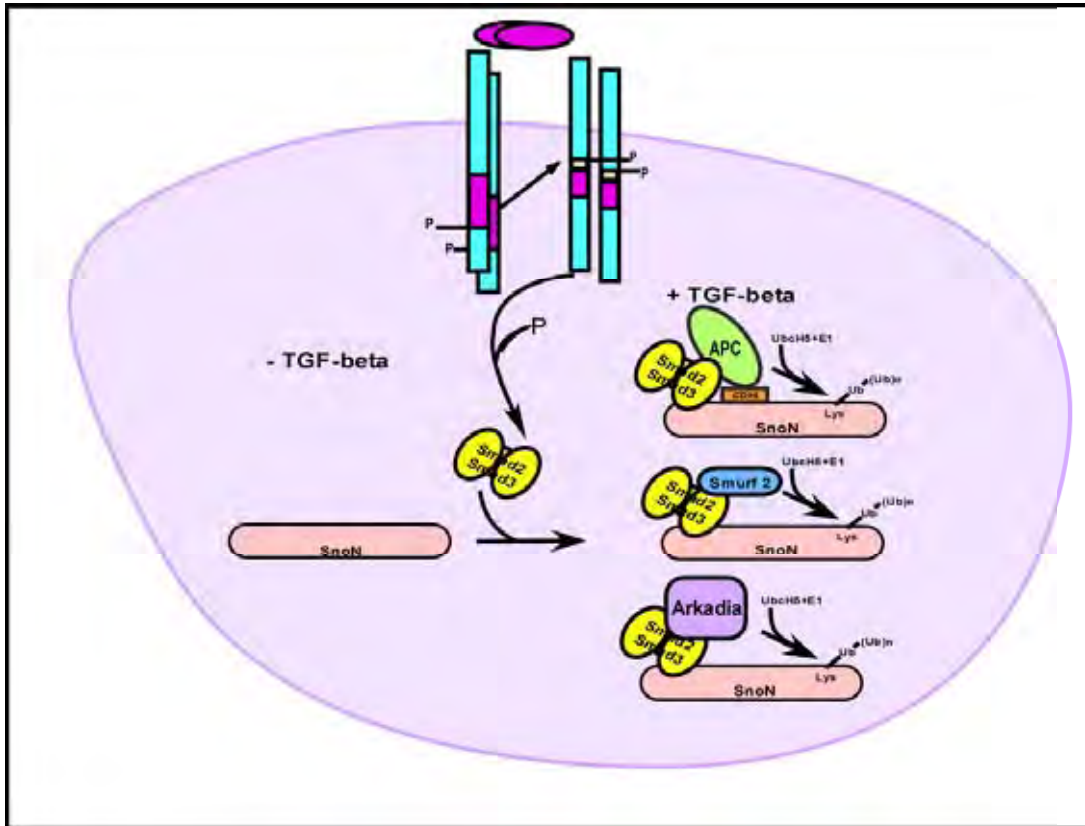


Figura 4. Mecanismo de degradación de SnoN inducido por el TGF-beta mediante la vía del proteosoma. (Modificada de Stroschein et al, 2001).

Inhibidores de la señalización del TGF-beta.

En los últimos años se han desarrollado varios inhibidores de la señalización del TGF-beta, con la finalidad de utilizarlos en la industria farmacéutica, debido a que esta citocina se encuentra implicada en distintas patologías, como son el cáncer, la fibrosis y varios desórdenes del sistema inmune, entre otros. Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización del TGF-beta inicia cuando el receptor ALK5 fosforila a las R-Smads en el motivo SXS de su porción carboxilo terminal, adquiriendo así una conformación distinta y formando complejos con la Co-Smad, que después son translocadas al núcleo para la activación o represión de la expresión de diversos genes.

Algunos de los fármacos utilizados recientemente para padecimientos como el cáncer y la fibrosis son los inhibidores de la vía del TGF-beta, que tienen como objetivo inhibir la actividad de cinasa del receptor ALK5, debido a que la fosforilación de las proteínas Smads es un paso limitante y el desencadenante de las respuestas del TGF-beta (Yingling et al., 2004). Estos inhibidores actúan de manera competitiva en el sitio de unión de ATP, se tratan de moléculas de bajo peso molecular, que poseen en su estructura elementos que impiden la formación de puentes de hidrógeno requeridos para la unión del ATP en el dominio de cinasa del receptor ALK5 (Callahan et al., 2002).

Existen cerca de una docena de inhibidores para ALK5 que se encuentran en distintas etapas para su comercialización y uso en terapias para el cáncer; entre los que pueden citarse a: LY550410, LY580276, SB505124, GSK (2), SB505124, SB431542 y otros patentados por distintas compañías farmacéuticas. Hay distintos parámetros para medir la eficacia de la inhibición de la actividad de cinasa de ALK5, como lo es la medición de la IC_{50} para cada compuesto. En el caso del inhibidor SB505124, se ha demostrado que inhibe la cinasa de ALK5 con una $IC_{50} = 47$ nM, mientras que el SB431542, el compuesto que se utilizó para los experimentos realizados en este trabajo, muestra una IC_{50} de 94 nM (Halder et al., 2005).

El SB431542 es un compuesto que ha demostrado ser un potente agente antitumoral en padecimientos de cáncer humano, pues es capaz de atenuar los efectos de promoción de tumores del TGF-beta en líneas celulares derivadas de cáncer humano como son la transición epitelio mesénquima (EMT), la motilidad celular, la migración y la invasión celular; así como la secreción de factores de crecimiento endoteliales vasculares (Halder et al., 2005).

Aunque el inhibidor SB431542 fue desarrollado inicialmente a partir un grupo de compuestos con características estructurales para inhibir la actividad de la cinasa p38, al parecer este inhibidor no posee un efecto directo sobre los componentes o la señalización de la vía de MAPK como ERK, JNK o p38, o incluso sobre componentes de otras vías activadas por suero (Callahan et al., 2002).

ANTECEDENTES

El estímulo del TGF-beta actúa regulando negativamente los niveles de las oncoproteínas Ski y SnoN, mediada por la vía del proteosoma 26S (Stroschein et al., 1999). La reducción de los niveles proteicos de Ski y SnoN es dependiente de las proteínas R-Smads, así como de las ligasas de ubiquitina del tipo E3, como Smurf2, el complejo promotor de la anafase (APC) y más recientemente por Arkadia (Stroschein et al., 2001; Levy et al., 2007).

Recientemente nuestro grupo de investigación reportó un mecanismo de degradación de los corepresores Ski y SnoN independiente de la vía canónica del TGF-beta y de las proteínas Smads, inducido por un compuesto llamado anisomicina (Vázquez-Macías et al., 2005). Pensando en la posibilidad de encontrar un mecanismo por el cual los correpresores Ski y SnoN pudieran ser regulados mediante la vía de las MAPK, se utilizó el compuesto anisomicina que causa la activación de las vías de las MAPK: p38, SAPK/JNK y ERK1/2. Algunas particularidades de este proceso, que son enlistadas en la siguiente tabla (tabla 2)

Dependiente	Independiente
Tipo celular (A549, HeLa)	Señalización R-Smads
Sistema proteosoma 26S	Activación MAPK (p38, ERK, JNK)
Dosis, tiempo tratamiento	Inhibición síntesis proteínas
Mecanismo reversible	

Tabla 2. Resumen de las características del mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por anisomicina. (Vázquez-Macías et al., 2005)

La anisomicina es un antibiótico aislado de cultivos de *Streptomyces griseus*, que es tóxico para la mayoría de los eucariotes. La principal característica de la anisomicina es su capacidad de inhibir la síntesis de proteínas, bloqueando la actividad de peptidil-transferasa de la subunidad 60S del ribosoma eucariote.

Sin embargo se ha reportado como un potente activador de cinasas, en células de mamífero, especialmente las proteínas cinasas activadas por mitógeno y estrés (MAPK) como JNK/SAPK (c-jun cinasa terminal-NH₂/proteína cinasa activada por estrés), p38 y ERKs. Este compuesto es capaz de inducir la actividad de subtipos de MAPK como p54 (MAP cinasa), un miembro de la familia de proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK), p45 (MAPKAP proteína *activada por MAPK*), p55 (MAPKAP K-2), y la cinasa S6 p70/85 que fosforila la proteína ribosomal S6. Sin embargo, es importante destacar que este mecanismo de señalización en células de mamífero resulta dependiente del contexto celular.

El efecto inductor de anisomicina sobre MAPKs estimula una respuesta de señalización independientemente de su actividad como inhibidor de la síntesis de proteínas; pues las concentraciones requeridas para el efecto inductor son más bajas que las utilizadas para el arresto traduccional. Cabe destacar que no todos los inhibidores traduccionales activan respuestas de señalización. Por ejemplo, la puromicina al parecer muestra efectos insignificantes como inductor en vías de señalización en mamíferos, mientras que la cicloheximida posee efectos intermedios en la inducción, siendo la anisomicina el mayor inductor. Estos estudios claramente disocian el arresto traduccional del efecto inductor en vías de señalización de mamíferos por la anisomicina (Hazzalin et al., 1998), sin embargo se desconoce la razón del fenómeno.

La degradación de los correpresores Ski y SnoN por anisomicina (Figura 6) (Tabla 2), es un proceso que involucra la degradación vía el proteosoma, pero no la activación de las proteínas R-Smads. El hallazgo fue inesperado pues se sabía que la degradación de Ski y SnoN, depende de las proteínas Smad activas, pero la anisomicina mostró ser capaz de inducir la degradación de Ski y SnoN sin involucrar la activación de las proteínas R-Smads, como p-Smad2 y p-Smad3, sugiriendo la participación de otras vías alternas de regulación de los moduladores de la vía del TGF-beta (Vázquez-Macías et al., et al)

Una observación de este reporte fue que esta acción de la anisomicina es dependiente del contexto celular, pues su efecto solamente puede ser observado en ciertas líneas celulares humanas como son las células HeLa y A549, pero no así en la línea celular HepG2 (Figura 5 y tabla 2). A diferencia de lo que ocurre con la degradación de Ski y SnoN inducida por el TGF-beta, en donde los niveles de Ski y SnoN decaen y posteriormente se recuperan, el estímulo con anisomicina mantiene todo el tiempo abajo los niveles de las oncoproteínas Ski y SnoN. Sin embargo, el efecto de anisomicina es reversible, pues al retirar la anisomicina, los niveles de Ski y SnoN se recuperan paulatinamente. El efecto de anisomicina sobre los niveles de Ski y SnoN es dependiente de la dosis del fármaco, obteniéndose un máximo efecto de degradación a una concentración de 10 μ M. (Figura 6)

El tratamiento con MG132 indica que este proceso es dependiente de la actividad del proteosoma 26S, pues la preincubación con este compuesto es capaz de bloquear los efectos de anisomicina sobre los niveles de Ski y SnoN.

El uso de inhibidores específicos para la actividad de las distintas MAPKs demostró que la degradación de los correpresores Ski y SnoN inducida por anisomicina no requería de la actividad de p38, JNK o ERKs.

Además de la anisomicina existen otros inhibidores de la síntesis de proteínas, que han mostrado tener un papel de activación en vías de señalización en células de mamífero, como la cicloheximida y la puromicina.

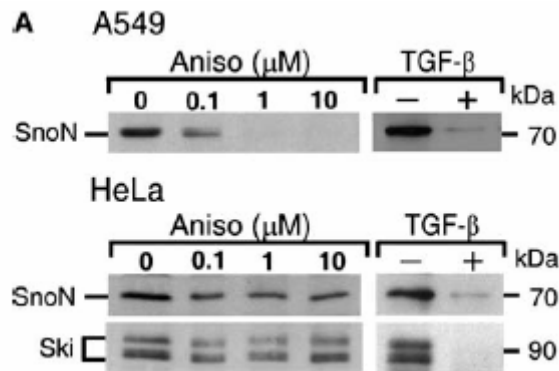


Figura 5. Anisomicina regula negativamente los niveles de Ski y SnoN en células A549 y HeLa. Ensayo de dosis-respuesta en célula sensible a anisomicina. (Tomado de Vázquez-Macías et al 2005)

Mientras que hay otros inhibidores de la síntesis de proteínas que no inducen la activación de componentes celulares como G418 e higromicina (Tabla 3).

Compuesto	Mecanismo de acción	Organismos blanco	Vías que activa en mamíferos
Anisomicina	Bloquea actividad de peptidil transferasa en la subunidad grande del ribosoma.	Eucariotes	MAPK; JNK, ERK y p38
Cicloheximida	Bloquea reacción de traslocación en ribosomas.	Eucariotes	MAPK; JNK, ERK y p38
Puromicina	Causa una liberación prematura de la cadena polipeptídica, al unirse al final de la cadena de aminoácidos.	Procariotes y eucariotes	MAPK
G418	Inhibe la elongación de la cadena polipeptídica.	Procariotes y eucariotes	
Higromicina	Bloquea la traslocación de la cadena polipeptídica, al bloquear el sitio A en el ribosoma.	Procariotes y eucariotes	

Tabla 3. Compuestos utilizados en este trabajo. Se muestra el nombre, el mecanismo de acción, los organismos sobre los cuales actúa y las vías de señalización activan en mamíferos (Si es el caso)

Para abordar este trabajo se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

- Si la degradación de los correpresores Ski y SnoN inducida por anisomicina es independiente de la activación de la vía del TGF-beta y de las proteínas R-Smads fosforiladas, un inhibidor de la cinasa de ALK5 no tendría efecto sobre la degradación de estos dos correpresores inducida por anisomicina.

Objetivo general

Estudiar el mecanismo de degradación de los correpresores SnoN y Ski inducido por anisomicina

Objetivos particulares

1. Estudiar el efecto de anisomicina sobre la proteína SnoN en distintos tipos celulares
2. Analizar el papel de las desubiquitinasas en el efecto de degradación vía el proteosoma de SnoN inducido por anisomicina.
3. Estudiar el efecto del inhibidor de ALK5 (SB431542) sobre el mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por anisomicina.
4. Estudiar el efecto de otros inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida, la puromicina, la higromicina, y G418, en los niveles de proteínas Ski y SnoN.
5. Estudiar el efecto de inductores de estrés celular como la hiperosmolaridad y la inhibición de la actividad de fosfatasa, sobre los niveles de Ski y SnoN.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para los experimentos realizados en el presente trabajo se utilizaron las células A549 provenientes de un carcinoma de pulmón humano como modelo de estudio. Las células se cultivaron en medio Ham's F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) y los antibióticos estreptomycin y penicilina (Ver apéndice para más detalles). La línea celular Mv1Lu y la clona derivada de la misma, las células L17 (Boyd y Massagué 1988), provienen de un epitelio pulmonar de visón, y se cultivaron en medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, en presencia de los antibióticos estreptomycin y penicilina. Tanto los medios como los antibióticos utilizados fueron de la marca GIBCO.

Ligandos.

El TGF-beta que se utilizó fue de la marca PrepoTech, mientras que la anisomicina, la cicloheximida y la puromicina fueron de Sigma, y el ácido Okadaico fue de Tocris. La anisomicina y la cicloheximida se utilizaron en solución con DMSO como vehículo.

Anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales de conejo: anti-SnoN, anti-Ski y anti-Smad2/3 fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, mientras que los anticuerpos anti-p-p38 y anti-p38 totales fueron de Cell Signaling. El anticuerpo anti-p-Smad2 fue de Chemicon/Millipore.

Estimulación celular con TGF-beta y otros ligandos

Para la estimulación celular se retira el medio de cultivo y se hacen dos lavados con medio de ayuno Ham's F12 con 0.2% de FBS y antibióticos. Se ponen 5 ml de medio de ayuno y se dejan toda la noche (o mínimo tres horas). Posteriormente se sustituye el medio de ayuno con medio fresco Ham's F12 al 0.2% de FBS y antibióticos. Transcurrido el tiempo se estimula con el TGF- β u otro ligando a la concentración adecuada y por el tiempo de tratamiento indicado.

Purificación de proteínas por inmunoprecipitación.

Debido a las bajas cantidades que se encuentran de las proteínas Ski, SnoN y Smads en las células A549, se recurrió a la inmunoprecipitación de estas proteínas, mientras que para p-p38 se realizó un inmunoblot de extractos totales.

Después de la estimulación, las células se lavaron con 5 ml de PBS 1X frío. Las células se lisan con 0.4 ml de buffer TNTE 0.5% frío conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Apéndice). Las muestras se mantuvieron en frío durante toda esta parte del experimento. Las células se rasparon y el extracto celular se transfirió a microtubos de 1.5 ml y se incubaron por 15 minutos a 4°C en agitación continua. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos que contenían el anticuerpo específico para la inmunoprecipitación y se incubaron a 4°C toda la noche en agitación continua. Para la inmunoprecipitación se incubaron las muestras con 50 µl de proteína G acoplada a sefarosa (Upstate) en agitación continua a 4 °C por 2 horas. Las muestras se centrifugaron y los pellets se lavaron tres veces con TNTE 0.1% en frío. Posteriormente se resuspendieron los pellets en 25 µl de solución Laemli 2x y se hirvieron en seco por tres minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

SDS PAGE y Western Blot

Las muestras se sometieron a una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE, poliacylamide gel electrophoresis), en geles al 7.5% en el caso de las inmunoprecipitaciones, y al 10% para los extractos totales. Los geles se corrieron a 100 Volts durante tres horas.

Las muestras de proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. El procedimiento se realizó en frío, en una cámara húmeda de BioRad a 100 Volts por una hora. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche libre de grasas en TBST-1X por una hora en agitación continua a temperatura ambiente. Después se incubaron las membranas con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación continua a una temperatura de 4°C. El revelado de las proteínas se hizo por quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano y utilizando como sustrato el reactivo de la marca Amersham, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Inhibición de la expresión de ALK5 con un shRNA específico.

Se adquirió un shRNA de la compañía *Origene* que es específico para el receptor ALK5 de humano. La secuencia de RNA en forma de dúplex u horquilla se compone de una secuencia de 29 nucleótidos y una secuencia complemento reversa de 29 nucleótidos, dirigida específicamente en contra del mRNA de ALK5 humano. (Figura 5)

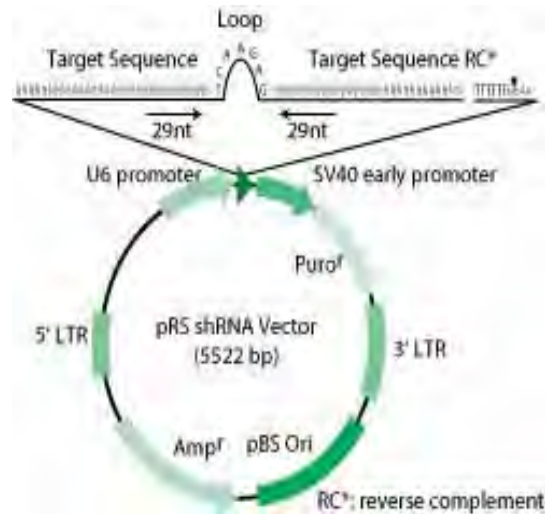


Figura 5. Mapa del vector pRS. Se trata de un plásmido de silenciamiento retroviral, que contiene repeticiones de un retrovirus murino, una secuencia que confiere resistencia a la puromicina y un promotor para codificar gener nucleares (U6), para la expresión de la horquilla de shRNA (*smallhairpin*) insertada. Cada plásmido contiene una secuencia de 29 pares de bases insertada río abajo del promotor U6, seguido de una giro de 7 pares de bases (*loop*) y una secuencia complementaria de 29 pares de bases en reversa. (Información obtenida de Origene)

Esta secuencia de shRNA en dúplex está insertada en un plásmido de silenciamiento retroviral (*pRS* por sus siglas en inglés), pues contiene grandes secuencias repetidas terminales retrovirales murinas (LTR), además de un gen de resistencia a la puromicina, así como el gen promotor de U6 de RNA nuclear. Estos elementos permiten una expresión efectiva de la secuencia dúplex, así como el almacenamiento del RNAi posterior a la introducción y el subsecuente procesamiento en células de mamífero.

Las secuencias dúplex de RNAi de cada uno de los cuatro plásmidos proveídos por la compañía fueron alineadas con bases de datos bioinformáticas del sitio NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), así como del *Protein Data Bank*, para su identificación en la secuencia de aminoácidos dentro de la proteína o bien en la secuencia de nucleótidos del mRNA.

Amplificación y purificación del plásmido conteniendo la secuencia del shRNA específico para ALK5.

Las cantidades provistas del plásmido (shRNA) por la compañía son mínimas (alrededor de 5 µg de plásmido de DNA por vial), por lo que fue necesario amplificar los plásmidos tanto del control como de los que codifican para el shRNA para ALK5, para obtener una cantidad más grande para la realización de los ensayos de transfecciones en células A549.

Para la amplificación del plásmido se requieren células competentes *Escherichia coli* que tengan una tasa de eficiencia mayor a 10^6 CFU/µg de DNA, y que sean deficientes en endonucleasas así como en recombinación (*recA*), para asegurar la estabilidad del inserto.

Por lo que se decidió utilizar la cepa DH5 α , una cepa de *E. coli* ampliamente utilizada en el campo de la biología molecular, pues posee un estado químicamente competente, que le confiere características específicas para el mecanismo de transformación.

Los 5 plásmidos (Control, ALK5/1, ALK5/2, ALK5/3, ALK5/4) fueron transformados en la cepa DH5 α por medio del método de choque de calor, estas bacterias fueron sembradas en medio agar LB en presencia de ampicilina (50 μ g/ml) para su posterior amplificación en medio LB líquido con ampicilina. Los plásmidos fueron purificados en columnas QIAGEN por medio del método Maxi-preparación. Posteriormente fueron resuspendidos en agua desionizada, cuantificados y almacenados a - 20 $^{\circ}$ C y visualizados en un gel de agarosa para comprobar su estado óptimo (Figura 6).

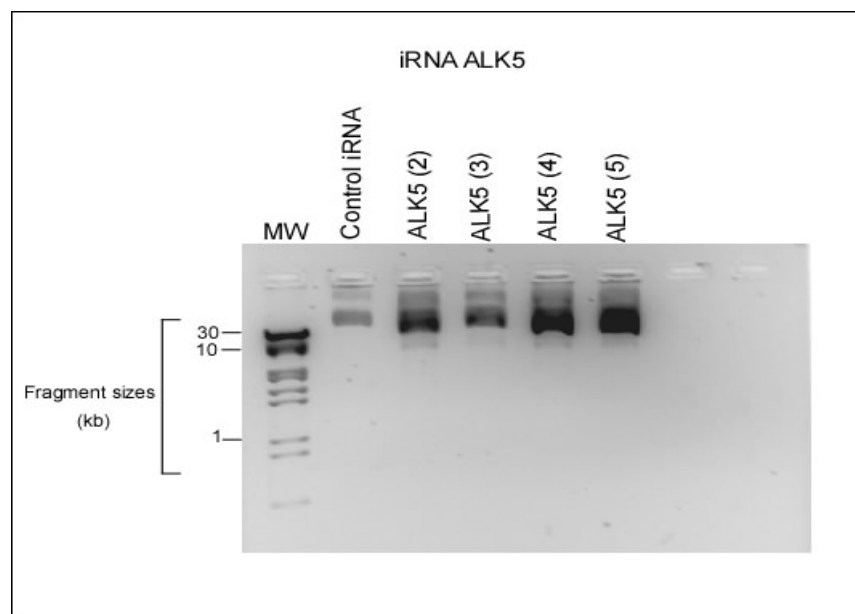


Figura 6. Amplificación y purificación de los plásmidos codificantes para el shRNA de ALK5 humano. Gel de agarosa al 1%, se corrió una muestra diluida de las muestras cuantificadas. El producto esperado es de 55 kb.

Al parecer como lo muestra la figura 6, los plásmidos se encuentran íntegros y no muestran contaminación con RNA. Una vez verificado el producto de DNA esperado, se procedió a hacer un experimento de digestión para comprobar que el producto de DNA usando EcoR1, BamH1, HindIII y Sal1.

RT-PCR

RNA total fue aislado por el método de TRizol (Invitrogen) de células transfectadas establemente con shRNA contra ALK5 y células control (pRS). El RNA total (5 μ g) fue usado para la síntesis de cDNA utilizando hexámeros al azar y una enzima reversotranscriptasa de un virus murino (M-MLV RT) (Invitrogen). PCR para ALK5 fue montado como lo reporta Finsson y colaboradores. El PCR consistió en utilizar

una Taq polimerasa con un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C (30 s), seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 s), alineamiento 55°C (45 s) y extensión 72°C (60 s). Los productos de PCR fueron resueltos en una electroforesis en gel y visualizado con una tinción de bromuro de etidio.

Transfecciones y ensayo de luciferasa

Las células AD293 fueron crecidas en placas de 6 pozos hasta llegar a una confluencia del 50% y transfectadas por el método de lipofectamina (Invitrogene) con los plásmidos que codifican para el shRNA para ALK5 humano en combinaciones.

Las células fueron seleccionadas con medio DMEM con puomicina (1 µg/ml) posteriormente a las 48 horas de transfección. Estas células fueron seleccionadas por dos semanas con este medio. Las células sobrevivientes fueron tripsinizadas y crecidas en el medio selectivo para su análisis posterior.

<i>Control</i>	<i>pRS</i>
C-2	shRNA 2 y shRNA 4
C-3	shRNA 3 y shRNA 5
C-4	shRNA 2 y shRNA 5
C-5	shRNA 3 y shRNA 4

Se hicieron transfecciones transitorias, con el gen reportero 3TP-lux por el método de fosfato de calcio. Para normalizar las mediciones de luciferasa, las células se cotransfectaron con los plásmidos que contenían al gen de la β-galactosidasa bajo el promotor CMV (pCMV- β gal).

Resultados

El mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina es dependiente del contexto celular.

Una característica del mecanismo de acción de anisomicina es su efecto específico en ciertos tipos celulares. En este trabajo se probó el efecto de este inhibidor en otros tipos celulares además de los reportados previamente como la línea celular HeLa (cáncer cérvico uterino humano) y la línea HepG2 (hepatoma humano), siendo esta última un ejemplo del tipo celular en donde la anisomicina no tiene efecto sobre los niveles de SnoN.

De esta forma se estudio la regulación de SnoN en otros tipos celulares hasta ahora no explorados (Figura 7). Las líneas celulares estudiadas en este trabajo fueron las siguientes:

- 1) **AD293.** Línea derivada de riñón humano, con morfología epitelial. Se trata de un tipo celular ampliamente utilizado en el campo de la biología celular en general, porque se caracteriza por ser altamente transfectable. Esta línea surgió a partir de la línea 293, pero que se encuentra modificada y es más adherible en cultivo.
- 2) **Mv1Lu y clona L17.** La línea celular Mv1Lu es derivada de epitelio pulmonar de visón. Es un tipo celular ampliamente utilizado en estudios del TGF-beta por ser altamente responsiva a esta citocina. La clona L17 es de especial interés en este trabajo, pues se caracteriza por ser idéntica a sus progenitoras Mv1Lu, pero con la única diferencia de no expresar el receptor tipo I del TGF- β (Boyd y Massagué, 1989). Los estudios en la clona L17 son de particular importancia para este trabajo, para evaluar el papel de ALK5 en la degradación de SnoN, dados los resultados obtenidos con el inhibidor SB431542 al bloquear la degradación de SnoN mediada por anisomicina, cicloheximida y puromicina.

Además de las líneas nombradas arriba, probamos las células previamente utilizadas como HeLa, HepG2 y A549. Para estos experimentos, las células fueron estimuladas con anisomicina 10 μ M por media hora y la proteína SnoN fue monitoreada por inmunoprecipitación e inmunoblot (Figura 7).

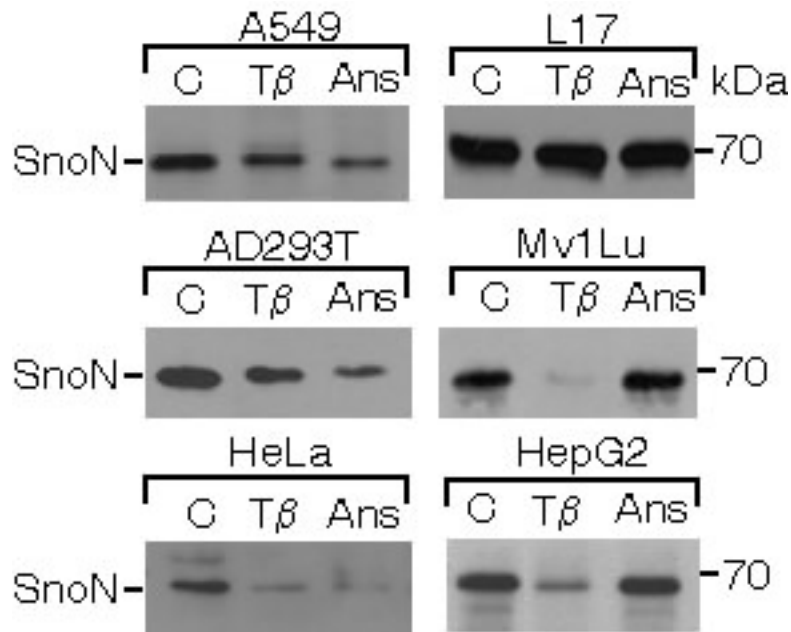


Figura 7. La degradación de SnoN inducida por anisomicina es dependiente del tipo celular. Distintos tipos celulares A549, AD293, HeLa, L17, Mv1Lu y HepG2 fueron estimuladas con TGF- β 0.3 nM (T β) o anisomicina 10 μ M (Ans) por media hora. Los extractos celulares fueron sujetos a una inmunoprecipitación e inmunoblot para la proteína SnoN.

Como había sido previamente reportado, existen tipos celulares que responden a la anisomicina con la degradación de SnoN como las células HeLa y las células A549, las que se caracterizan por expresar altos niveles de Ski y SnoN. Sin embargo las células HepG2 no son sensibles al estímulo con anisomicina. Las células Mv1Lu y la clona L17 no parecen responder con la degradación de SnoN en respuesta a la anisomicina, mostrando nuevamente la especificidad celular en respuesta a anisomicina. Sin embargo, la degradación de SnoN inducida por el TGF-beta fue detectada en las células Mv1Lu, pero no así en las células L17, debido a la ausencia de ALK5 para fosforilar las R-Smads e inducir la degradación del correpresor. Mientras tanto para el caso de las células AD293, los niveles de SnoN disminuyen en respuesta al TGF-beta y a la anisomicina, mostrando ser un tipo celular útil en el estudio de la degradación mediada por anisomicina.

Participación de las desubiquitininas (DUBs) en el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina.

El mecanismo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina es vía el proteosoma 26S. La degradación vía el proteosoma posee distintos niveles de regulación, ya que además de enzimas con actividad de ligasas de ubiquitina, la célula posee enzimas desubiquitininas (DUBs) que rompen uniones entre las moléculas de ubiquitina conjugadas a la proteína que va a ser degradada. Δ 12-PGJ2; un metabolito proveniente de la protanglandina PGJ2 ha demostrado inhibir

la actividad enzimática de UCH-L1 (desubiquitina) y promover la acumulación de proteínas ubiquitinadas, bloqueando su degradación (Zongmin Li., et al 2004).

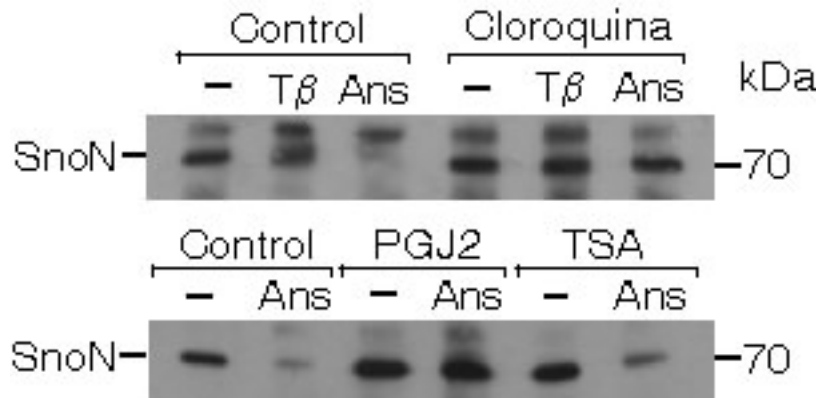


Figura 8. $\Delta 12$ -PGJ2 bloquea la degradación de SnoN mediada por anisomicina. Células AD293 preincubadas con cloroquina 200 μ M y $\Delta 12$ -PGJ2 60 μ M por 4 horas y posteriormente estimuladas con anisomicina (10 μ M) y TGF-beta (0.3 nM) por 45 minutos.

Pensando en que las DUBs pudieran estar involucradas en la inhibición del mecanismo de anisomicina, se planteó la posibilidad de utilizar este inhibidor, la $\Delta 12$ -PGJ2, para estudiar este proceso. Para el experimento se utilizaron células AD293, que fueron preincubadas con el inhibidor del proteosoma cloroquina (200 μ M) o con $\Delta 12$ -PGJ2 (60 μ M) por 4 horas. Posteriormente las células fueron estimuladas con anisomicina (10 μ M) o TGF-beta (0.3 nM) por 45 minutos. (Figura 8)

Como se esperaba la cloroquina fue capaz de bloquear la degradación de SnoN mediada por TGF-beta, así como por anisomicina, al inhibir la actividad del proteosoma 26S; interesantemente, el tratamiento con $\Delta 12$ -PGJ2 bloquea el efecto de anisomicina sobre los niveles de SnoN, lo cual apoya que la anisomicina induce la ubiquitinación de SnoN para causar su degradación.

El inhibidor de ALK5 (SB431542) bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina.

Para estudiar el efecto del inhibidor del receptor ALK5 (SB431542) sobre la degradación de SnoN, las células A549 fueron preincubadas por media hora con el inhibidor SB431542 a una concentración de 10 μ M, sin retirar el medio de preincubación las células fueron estimuladas con TGF-beta 0.3 nM o anisomicina 10 μ M por 30 minutos. A partir de extractos totales de proteína, se realizaron inmunoprecipitaciones de las proteínas SnoN y Smad2/3, posteriormente se realizaron inmunoblots contra SnoN y pSmad2 respectivamente, así como para p-p38 utilizando extractos totales de proteínas (Figura 9).

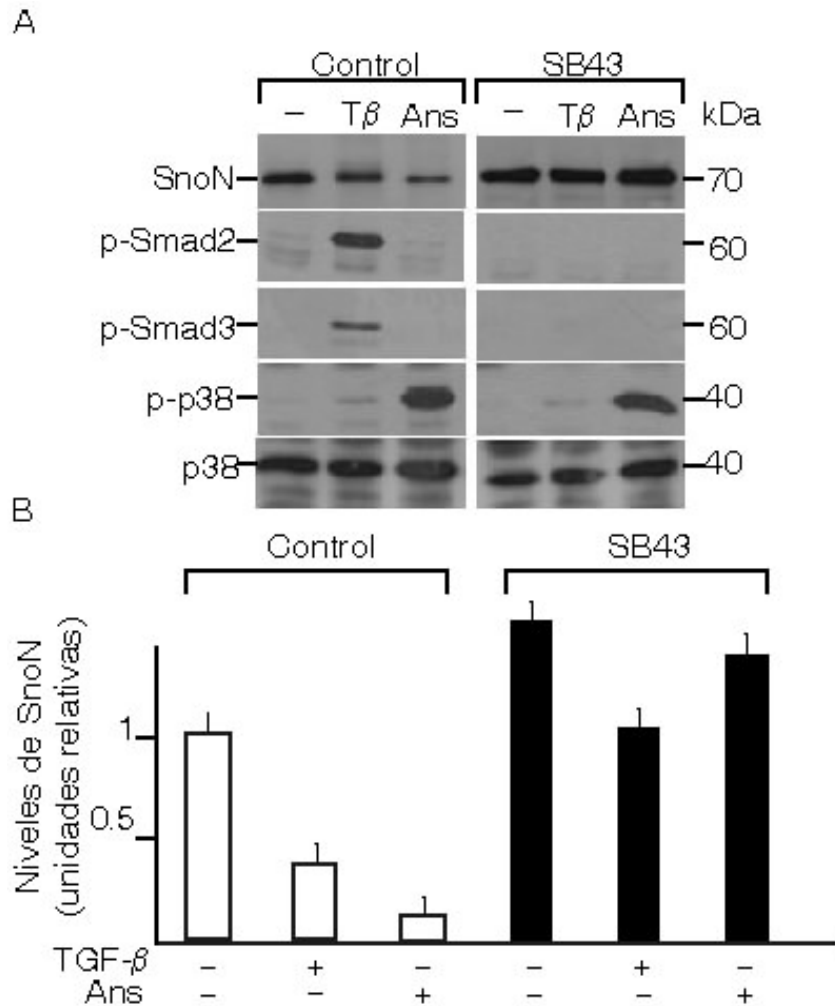


Figura 9. El inhibidor de ALK5 (SB431542) bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina en células A549. Las células A549 fueron ayunadas con medio Ham's F12 con 0.2% de suero fetal bovino por 3 horas. El tratamiento fue por 30 minutos con el inhibidor SB431542 a una concentración de 10 μ M más TGF- β 0.3 nM o anisomicina 10 μ M por media hora, sin retirar el medio de preincubación. Los extractos celulares fueron sujetos a una inmunoprecipitación para SnoN y Smad2/3 y analizados por inmunoblot para SnoN y p-Smad2 respectivamente. Para el caso de p-p38 y p38 se tomaron a partir de una muestra de extractos totales analizados por inmunoblot. La figura muestra un experimento representativo de 8. Las gráficas representan el promedio de análisis densitométricos de 8 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias \pm ES. Para los análisis por densitometría se utilizó el programa EDAS de Kodak.

El tratamiento con anisomicina y TGF-beta inducen la degradación de SnoN en las células A549. Para el caso del TGF-beta, los niveles de proteína remanente son del 30%, mientras que para el caso de anisomicina los niveles llegan hasta un 10%. La fosforilación de Smad2 y Smad3 se observa solamente en las células que fueron estimuladas con TGF-beta, indicando que la vía se encuentra activa. Para el caso de p-p38 observamos que se encuentra presente solamente en respuesta a anisomicina. Mientras que el tratamiento con SB431542 bloquea la degradación de SnoN inducida por anisomicina.

El tratamiento con el SB431542 *per se* acumula los niveles de SnoN por arriba del nivel basal. Como se esperaba, y de acuerdo a la literatura (Stegmüller et al., 2008; Zhu et al., 2007; Maeda et al., 2004), la degradación de SnoN inducida por TGF-beta es bloqueada por el SB431542, inhibiendo la activación de p-Smad2 y p-Smad3 en respuesta al estímulo con TGF-beta, permitiendo que los niveles de SnoN permanezcan intactos como el grupo control. Para el caso de anisomicina, el tratamiento con el SB431542 eleva los niveles del correpresor SnoN más arriba del control, sin embargo el inhibidor no muestra efecto sobre la activación de p-p38 ejercida por anisomicina.

Posteriormente se considero analizar si el SB431542 era capaz de bloquear los efectos de anisomicina, una vez que el efecto de degradación de SnoN haya iniciado, justo como ha sido demostrado para el caso del TGF-beta (Zhu et al., 2005). Para ello las células A549 fueron incubadas con TGF-beta o anisomicina por un periodo de 30 minutos y después se añadió SB431542 (10 µM) por 1 hora. (Figura 10)

El SB431542 mostró bloquear la degradación de SnoN iniciada por el TGF-beta, así como una disminución en la fosforilación de Smad2. Mientras que las células estimuladas con anisomicina, se observó que la degradación de SnoN no puede ser bloqueada por el inhibidor.

Mientras tanto los niveles de fosforilación de p-38 inducidos por anisomicina, no son afectados por la presencia del inhibidor SB431542 antes o después del estímulo con anisomicina.

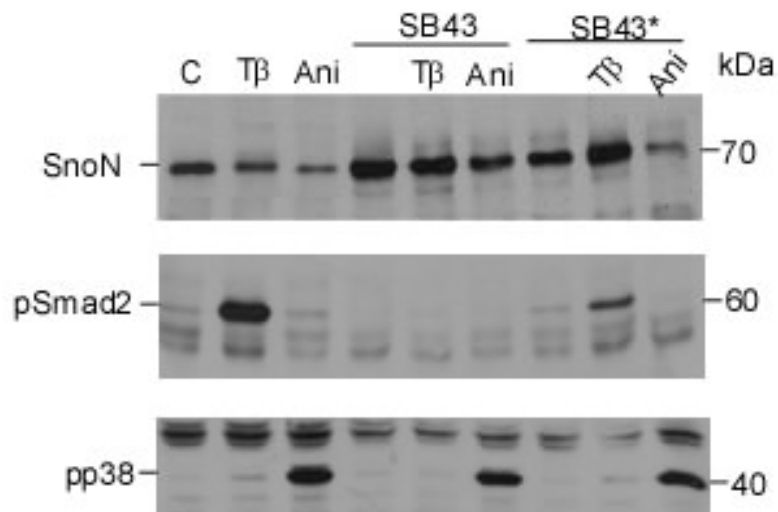


Figura 10. Reversión de la degradación de SnoN mediada por el SB431542. Células A549 tratadas con TGF-beta y anisomicina por 30 minutos (grupo control), células preincubadas con SB431542 10µM por 30 minutos y un grupo tratado con SB431542 10µM por 45 minutos posterior al estímulo (*). Los extractos celulares fueron sujetos a una primera inmunoprecipitación para SnoN y los complejos Smad2/3 y posteriormente analizados por inmunoblot para SnoN y pSmad2 respectivamente. Para el caso de la proteína p-p38, se analizó a partir de una fracción de extractos totales de proteína para inmunoblot.

El mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina, también responde a cicloheximida y puromicina.

Tras estudiar el efecto del SB431542 sobre la degradación de SnoN inducida por anisomicina, se pensó en la posibilidad de que otros compuestos inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida y la puromicina pudieran tener un efecto en los niveles de SnoN. Ambos compuestos han demostrado inducir vías de señalización en células de mamíferos, independientemente de su habilidad para inhibir la síntesis de proteínas (Zinck et al, 1995). Se eligieron la cicloheximida y la puromicina por ser capaces de inducir la activación de MAPKs como JNK, p38 y ERKs, aunque en menor intensidad que la anisomicina, siendo este último el más potente activador (Edwards et al 1992). Cabe destacar que nuestro grupo de trabajo había probado previamente el efecto de la cicloheximida en la línea celular HeLa, sin obtener una reducción en los niveles de SnoN y Ski.

El experimento se realizó en células A549 preincubadas por media hora con o sin SB431542 10 μ M, y posteriormente estimuladas con TGF-beta 0.3 nM, anisomicina 10 μ M, cicloheximida (100 μ g/ml) o puromicina (100 μ g/ml) por media hora sin retirar el medio de preincubación (Figura 11).

Los tratamientos con TGF-beta y anisomicina mostraron disminuir los niveles de SnoN aproximadamente en un 70% y 90% respectivamente, con respecto al control. Mientras que los estímulos con cicloheximida o puromicina inducen una caída en los niveles de la proteína SnoN de alrededor del 70% y 80% respectivamente con respecto al control. Al parecer la anisomicina parece ser el inductor más potente para la degradación de SnoN. También la forma fosforilada de p-38 se eleva notablemente en las células estimuladas con anisomicina, cicloheximida y puromicina. Sin embargo esta activación de p-p38 es diferencial, ya que anisomicina es el activador más fuerte, siguiéndole en proporción cicloheximida, mientras que puromicina induce una activación más discreta. Así SB431542 no tiene un efecto sobre los niveles de la forma fosforilada de p-38 activada por los inhibidores de la síntesis de proteínas.

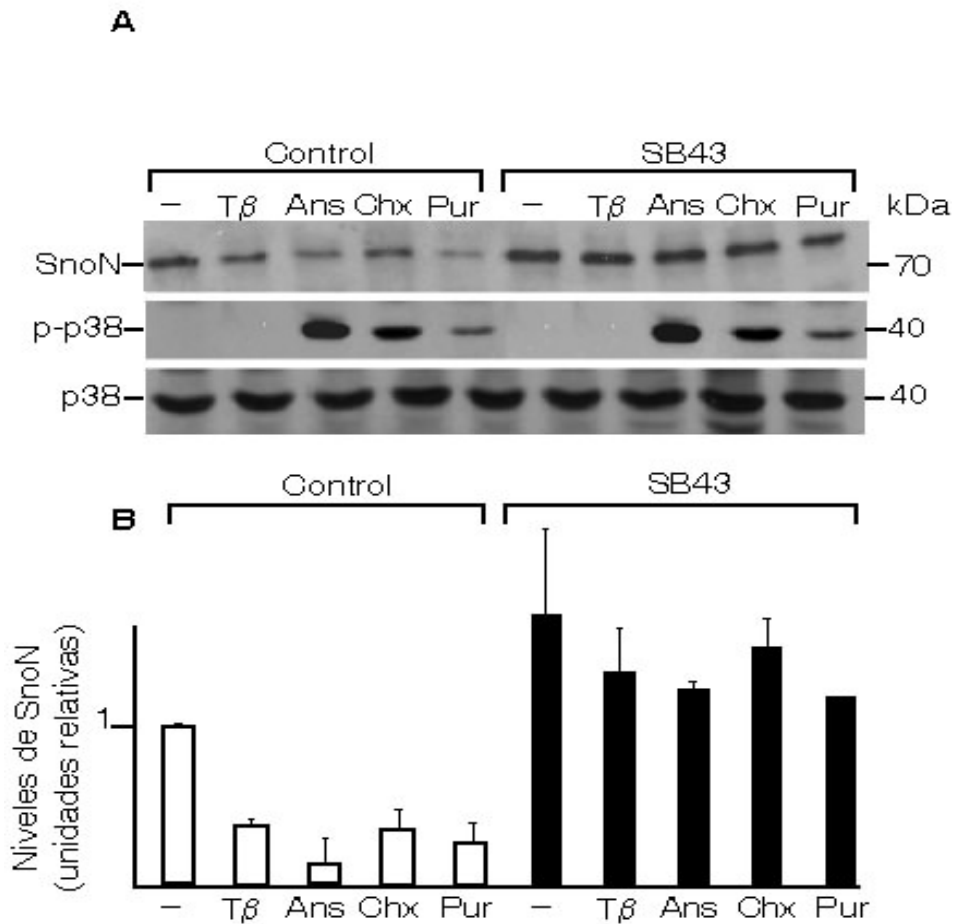


Figura 11. Cicloheximida y puromicina llevan a la degradación de SnoN de forma análoga a la anisomicina. Células A549 tratadas con cicloheximida y puromicina (100μg/ml) en presencia o ausencia del SB431542 10 μM. Los extractos celulares fueron sujetos a una inmunoprecipitación para SnoN y analizada por inmunoblot. Para el análisis de p-p38 y p38 se utilizaron extractos totales celulares. Las gráficas representan el promedio de análisis densitométricos de 4 experimentos independientes. Los valores son expresados como medias ± ES.

Tal como ocurre con la degradación de SnoN inducida por anisomicina, la degradación estimulada por cicloheximida y puromicina es también bloqueada por la acción del SB431542. De esta manera se pone en evidencia que la cicloheximida y la puromicina son compuestos capaces de disminuir los niveles de SnoN, probablemente de una manera similar a como lo hace anisomicina, pues la degradación de SnoN inducida por estos inhibidores de la síntesis de proteínas, también es bloqueada por el inhibidor del receptor tipo I del TGF-β (Figura 11).

Caracterización del efecto de puromicina en los niveles de SnoN.

Habiendo hallado que otros compuestos son capaces de inducir la degradación de SnoN de manera análoga a la anisomicina; se profundizó para analizarlo con lo

recientemente reportado para anisomicina en el laboratorio (Vázquez-Macías et al., 2005).

El experimento consistió en realizar una curva dosis-respuesta, en donde las células A549 son incubadas con distintas concentraciones de puromicina por 1 h y 22 h, para evaluar los niveles de la proteína SnoN en respuesta a diferentes dosis y tiempos de incubación con puromicina (Figura 12). Las células A549 fueron ayunadas por 3 h con medio HAM'S F12 suplementado con 0.2% de FBS. Después fueron tratadas con puromicina con dosis de 0.5, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ a 1 h y 22 h. Los extractos de proteína fueron sujetos a la inmunoprecipitación de la proteína SnoN y se tomaron 30 μl de extractos totales para realizar un western blot contra SnoN y p-p38 respectivamente.

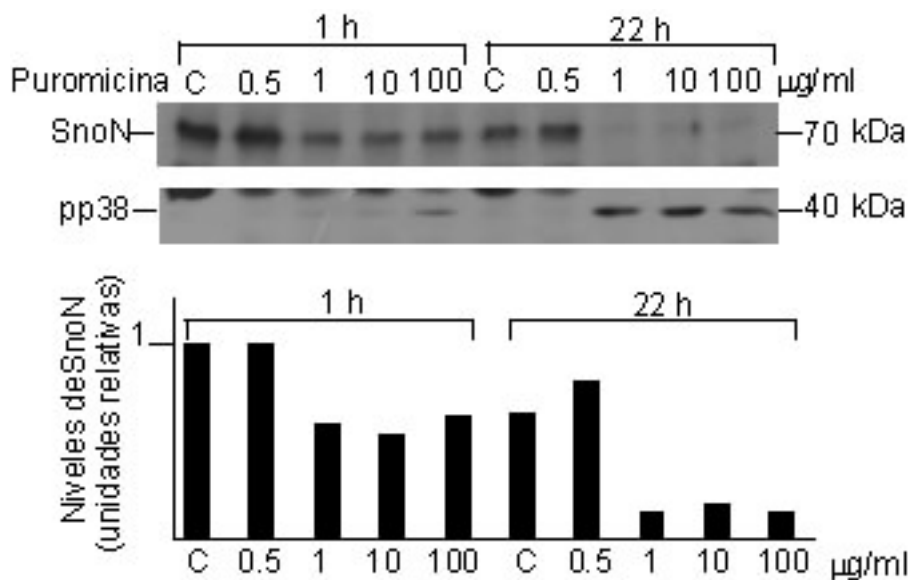


Figura 12. Curva dosis-respuesta con puromicina en células A549. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de puromicina 0.5, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ por 1 hora y 22 horas. La figura muestra un western blot de la inmunoprecipitación de la proteína SnoN, así como otro para la proteína pp38 a partir de 30 μl de extractos totales. La gráfica muestra los datos del experimento de forma cuantitativa por análisis densitométricos.

Las concentraciones mayores a 1 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina fueron capaces de disminuir los niveles de SnoN en el caso de 1 h y 22 h. Por otro lado se observó una degradación casi total en el caso de los tiempos largos, mientras que en las células tratadas por una hora, los niveles disminuyen pero permanece un 60% de la proteína remanente. Mientras que la fosforilación de p38 también varía respecto la dosis y tiempo de tratamiento con la puromicina, pues dosis mayores a 1 $\mu\text{g/ml}$ por 1 h, aumentan discretamente los niveles de p-p38, siendo la dosis más efectiva 100 $\mu\text{g/ml}$. A tiempos largos, el aumento de p-p38 es más evidente y los niveles de fosforilación de p-p38 no varían prácticamente en las dosis mayores a 1 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 12).

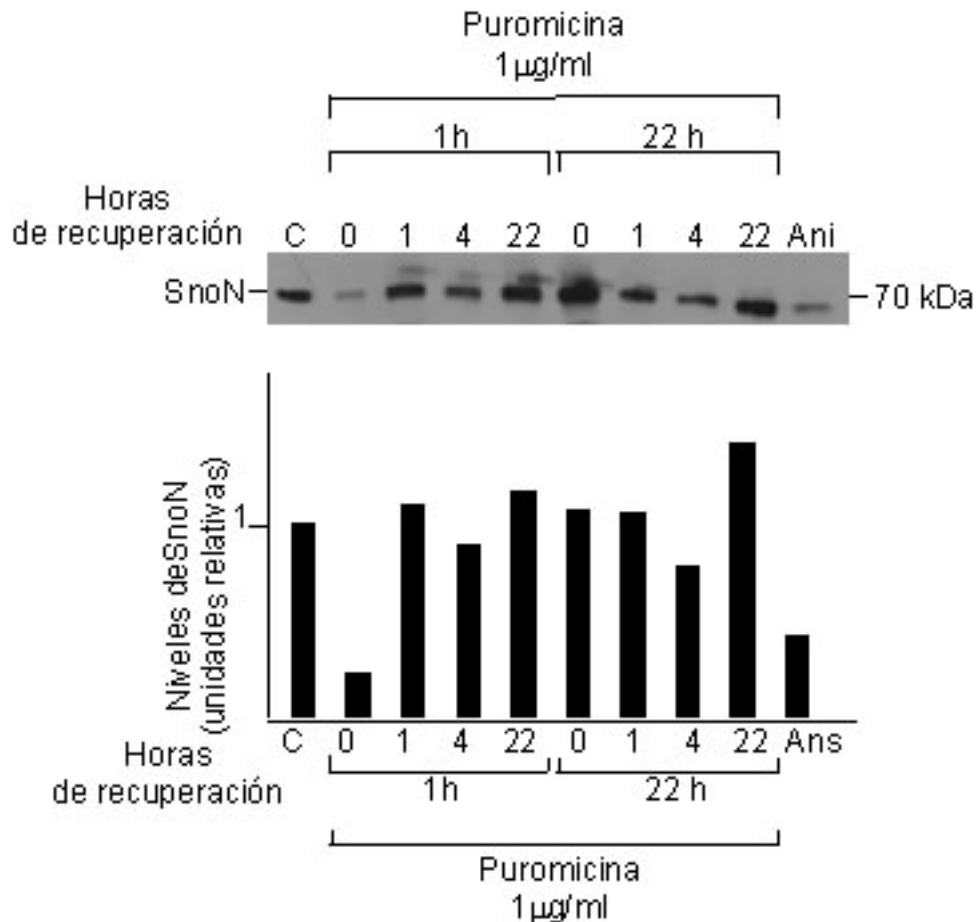


Figura 13. Regulación de los niveles de SnoN por puromicina. Se analizó la recuperación de los niveles de SnoN en células A549 en respuesta al tratamiento con puromicina. Las células A549 sujetas a estimulación continua con puromicina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por tiempos largos y cortos (1 hora y 22 horas). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS e incubadas nuevamente con medio libre de puromicina por los tiempos indicados.

Un planteamiento clave para estudiar el mecanismo de acción de la puromicina, fue explorar la posibilidad de recuperación en los niveles de SnoN a partir de un tratamiento con puromicina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 1 y 22 horas, retirando la puromicina y monitoreando la recuperación de los niveles de SnoN. Para estos experimentos las células A549 fueron estimuladas con puromicina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 1 h y 22 h (Figura 13); posteriormente el medio con la puromicina fue retirado de las células y lavadas con PBS frío, para después ser incubadas con medio sin puromicina por los intervalos de 1, 4 y 22 h. Los datos muestran que SnoN tiene una recuperación paulatina a partir de 1 h posterior a retirar la puromicina, tanto en las células que fueron tratadas por 1 h como por 22 h. A las 4 h hay una aparente caída en la proteína, sin embargo los niveles de SnoN se elevan por arriba del nivel basal, cuando las células son analizadas 22 h después de retirar la puromicina. El tratamiento con anisomicina fue utilizado como control, mostrando que su presencia en el medio mantiene los niveles bajos de SnoN en las células.

G418 e higromicina no tienen efecto sobre la estabilidad de SnoN.

Habiendo probado los efectos de la cicloheximida y la puromicina sobre los niveles de SnoN, y analizado que inducen una regulación negativa sobre sus niveles, se decidió explorar si otros inhibidores de la síntesis de proteínas como el G418 (geneticina) e higromicina, tendrían un efecto la estabilidad de SnoN.

Estos compuestos a diferencia de los otros inhibidores, no son compuestos capaces de inducir la fosforilación de MAPKs.

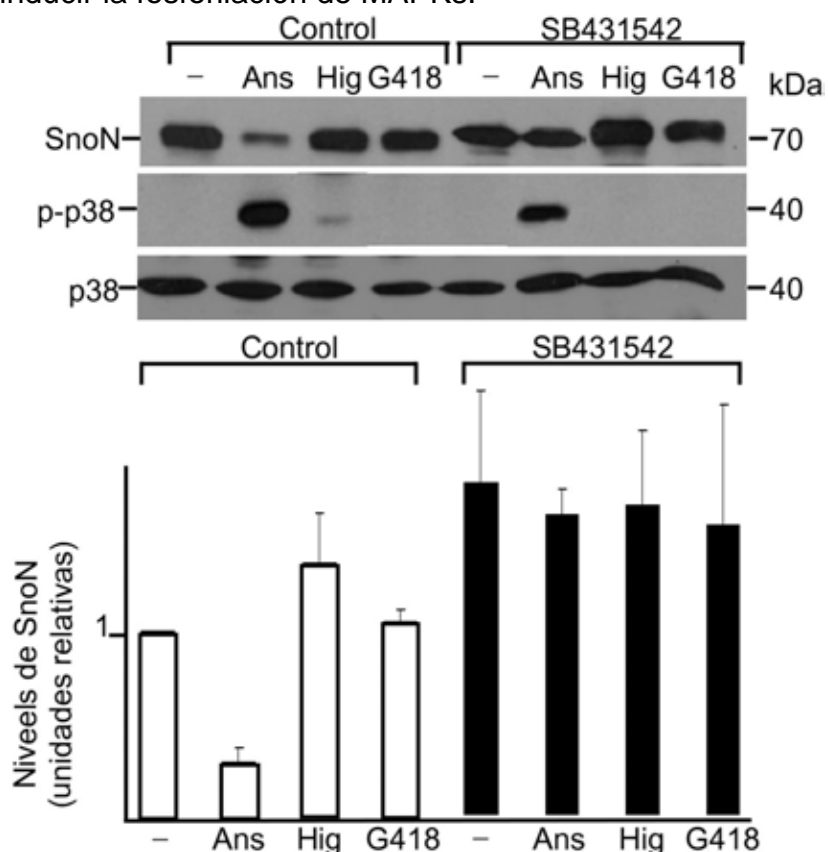


Figura 14. Higromicina y G418 no inducen la degradación de la proteína SnoN en células A549. IP e Inmunoblot de SnoN en células A549 tratadas con Anisomicina, Higromicina y G418 (100 µg/ml). Los extractos celulares fueron sujetos a una inmunoprecipitación para SnoN y analizada por inmunoblot. Para el análisis de p-p38 y p38 se utilizaron extractos totales celulares. Las gráficas representan el análisis cuantitativo de la degradación inducida por Anisomicina, Higromicina y G418. Los valores son expresados como medias \pm ES.

G418 bloquea la síntesis de polipéptidos, al inhibir el paso de la elongación, tanto en procariotes como en eucariotes. La higromicina también es un inhibidor de la síntesis de proteínas tanto en eucariotes como en procariotes, su mecanismo de acción reside en la interferencia en la translocación de los polipéptidos, dando como consecuencia un proceso de traducción de proteínas erróneo. (Chen et al 1995).

Para estos experimentos se utilizaron células A549, que fueron preincubadas en presencia o ausencia del inhibidor SB431542 por media hora y estimuladas

posteriormente con los inhibidores G418 e higromicina (100 µg/ml) por media hora, sin remover el medio de preincubación (Figura 14).

Los experimentos muestran que la higromicina y el G418 no inducen la degradación de SnoN, a diferencia de la anisomicina. Al contrario de lo observado con los inhibidores anteriores, tanto G418 como higromicina no inducen la activación de p-p38.

Algunos activadores de estrés celular no modifican los niveles de SnoN.

La anisomicina es un activador de vías de estrés como p38, una MAPK que responde a distintos estímulos de estrés celular, por ello se consideró evaluar si algunos activadores de vías de estrés como la hiperosmolaridad (Estruch et al., 2000), utilizando altas concentraciones de NaCl y la ácido Okadaico para inhibir proteínas fosfatasa (Cohen et al., 1990).

Células A549 fueron tratadas con NaCl 0.5 Mm o 1 µM de ácido Okadaico por 30 minutos, en presencia o no de SB431542. Los extractos celulares se analizaron por IP/WB. (Figura 15)

El ácido okadaico y la hiperosmolaridad no mostraron efecto sobre los niveles de SnoN, mientras que los niveles de p-p38 se elevaron en presencia de estos dos estímulos. Los datos descartan que el efecto de anisomicina, involucre la activación de una vía de estrés compartida con el ácido okadaico y la hiperosmolaridad.

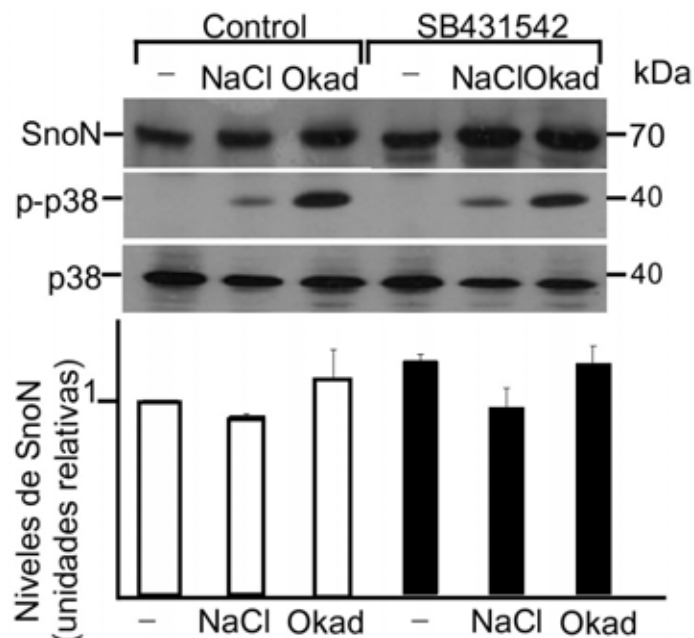


Figura 15. Otros inductores de estrés celular no tienen un efecto sobre los niveles de SnoN. Células A549 tratadas con con NaCl 0.5 Mm o 1 µM de ácido Okadaico por 30 minutos, en presencia o no de SB431542. Los extractos celulares se analizaron por IP/WB.

Papel de ALK5 en el mecanismo de anisomicina.

Al parecer por los estudios realizados con el SB431542 en células A549, el receptor ALK5 podría estar implicado en el mecanismo de degradación del correpressor de SnoN inducido por anisomicina, por ello se decidió utilizar un shRNA dirigido específicamente contra el RNAm de ALK5.

El conjunto de shRNAs adquirido se compone de un vector pRS control, además de cuatro plásmidos que contienen una secuencia de shRNA en dúplex dirigida específicamente contra el RNAm de ALK5 humano (Tabla 3).

shRNA y secuencia	Región correspondiente
ALK5 (2) 5'ACTCCTGGTTAGTACATTCTCAGAGGA TT 3'	mRNA no procesado (UTR 3')
ALK5(3) 5'TACCAGTAAGTGCCACTTCTGTGTCTTT C 3'	mRNA no procesado (UTR 3')
ALK5 (4) 5'ATCTGCCACAACCGCACTGTCATTAC CA 3'	Dominio cinasa (aa 147) Región intracelular
ALK5 (5) 5'TTCTGGCTCAGGTTTACCATTGCTTGTT C 3'	aa 188 (Cercano al dominio GS, del dominio de cinasa)Dominio GS (aa 188) Región intracelular

Tabla 3. Secuencias de los iRNAs adquiridos comercialmente. La columna izquierda muestra la secuencia de nucleótidos de cada uno de los shRNAs, mientras que en la columna derecha se muestra la región correspondiente de la proteína o el RNA mensajero de ALK5 humano obtenida a partir de su alineamiento en bases de datos bioinformáticas (Pubmed, Protein Data Bank).

Como lo muestra la tabla 3, los plásmidos 1 y 2 codifican para una shRNA dentro de la secuencia del mRNA no procesado. Mientras que los plásmidos 3 y 4 codifican para regiones específicas del receptor ALK5 en el dominio de cinasa y el dominio GS de la proteína, respectivamente. El vector en el cual se encuentran insertadas las secuencias dúplex de iRNA para ALK5 poseen un gen de

resistencia a la puromicina (N-acetil transferasa) para la selección de las células en el caso de las transfecciones estables.

El efecto del SB431542 sobre el mecanismo de acción de anisomicina, sugiere la participación de ALK5. Sin embargo los inhibidores son compuestos que pueden tener efectos inespecíficos sobre otras proteínas. Por ello se decidió utilizar un iRNA contra el receptor ALK5 humano.

Las células AD293 se transfectaron establemente shRNAs contra ALK5 (Ver Materiales y Métodos). Los niveles de las proteínas p-Smad2 y SnoN fueron analizados mediante inmunoblot y se hizo un ensayo con genes reporteros para estudiar el efecto del shRNA de ALK5 en las distintas clonas y la clona control (pRS).

Se analizaron las 5 clonas (datos no mostrados), sin embargo la clona C-5 (una combinación de shRNA que se une al mRNA no procesado y un shRNA que se une a una región del mRNA maduro cerca del dominio de cinasa) mostró una resistencia a la degradación por TGF-beta y anisomicina de la proteína SnoN. (Figura 16).

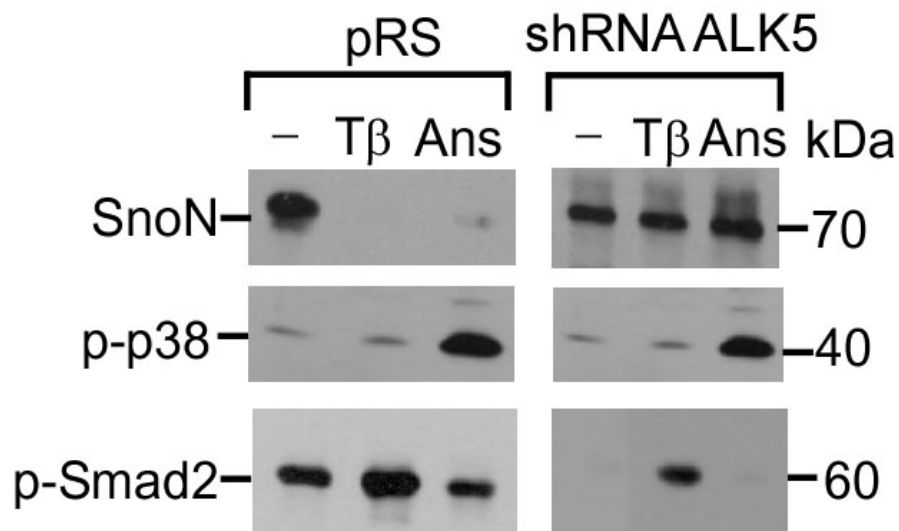


Figura 16. ALK5 participa en el mecanismo de degradación de SnoN mediado por anisomicina. Células AD293 control (pRS) y células que expresan un shRNA contra ALK5 humano. Los extractos celulares fueron analizados mediante inmunoprecipitaciones contra SnoN y S2/3.

Como se observa en la figura la clona que expresa establemente el vector pRS, los niveles de SnoN disminuyen en respuesta al TGF-beta y la anisomicina (0.3 nM y 10 μ M respectivamente) a los 45 minutos de estímulo. Cuando se analiza la clona que expresa el shRNA para ALK5, se observa que los niveles de SnoN permanecen intactos tras el estímulo de TGF-beta y anisomicina en las mismas condiciones que las células control, indicando que la presencia de ALK5 en la célula es necesaria para el efecto de anisomicina.

Al analizar los niveles de pSmad2 muestran que las células control muestran se responsivas al TGF-beta, mientras que el grupo con el shRNA contra ALK5 muestra una respuesta más discreta, probablemente a niveles persistentes de

ALK5. Sin embargo el depletamiento parcial de ALK5 es suficiente para bloquear el efecto de anisomicina.

Para estimar la cantidad de RNA de ALK5, después del tratamiento con el shRNA, se hicieron ensayos de RT-PCR en las dos clonas celulares; mostrando que los niveles de ALK5 disminuyen notablemente en las células que contienen el shRNA contra ALK5. (Figura 17)

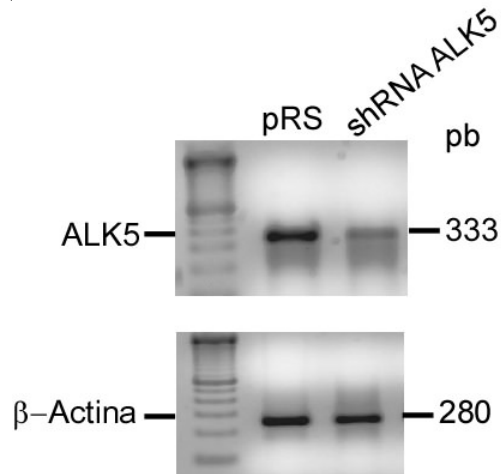


Figura 17. Los niveles de ALK5 disminuyen en respuesta al shRNA en células AD293 transfectadas establemente. Los niveles de ALK5 fueron monitoreados mediante RT-PCR en la clona control (pRS) y la clona shRNA ALK5. Como control se utilizó β -actina.

Con el fin de analizar la sensibilidad de la clona C-5 en respuesta al TGF-beta, se hicieron ensayos de genes reporteros con el gen 3TP-lux, un gen reportero ampliamente utilizado en el campo del TGF-beta que es responsivo a esta citocina.

Los resultados (figura 18) muestran los niveles de inducción en respuesta al TGF-beta en las células control y en la clona portadora del shRNA C-5. En el experimento las células fueron transfectadas con el gen 3TP-lux y posteriormente tratadas con dosis crecientes de TGF-beta (25, 50 y 100 pM) por un periodo de 8 horas. Los resultados muestran que hay una diferencia marcada en respuesta al TGF-beta entre las dos clonas, apreciándose una mayor respuesta en las células control, a diferencia de la clona C-5.

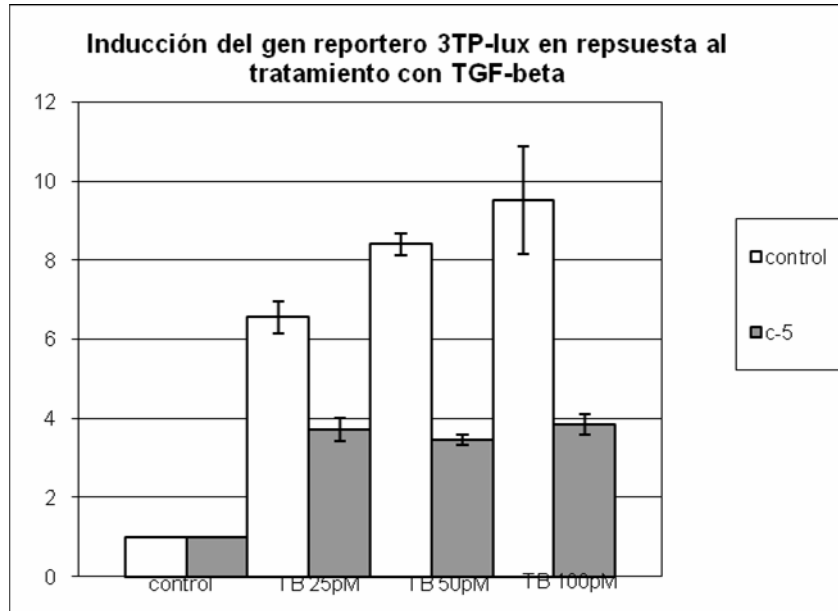


Figura 18. Inducción del gen reportero 3TP-lux en respuesta al TGF-beta en células control y la clona C-5. Las células fueron tratadas por un periodo de 8 horas con las dosis indicadas de TGF-beta.

DISCUSIÓN

El TGF- β lleva a cabo una serie de procesos celulares que son fundamentales para la homeostasis del organismo, como son la sobrevivencia celular, la apoptosis y la secreción de matriz extracelular, entre otros (Siegel y Massagué, 2003).

En el núcleo celular, uno de los mecanismos más importantes para apagar la señal del TGF- β es llevado a cabo por los correpresores de la vía Ski y SnoN. Ski y SnoN pertenecen a la familia de oncoproteínas y supresores de tumores *Ski*, pues se ha reportado que su sobreexpresión es capaz de inducir la transformación oncogénica. Se ha reportado que SnoN se encuentra en niveles muy altos en varias líneas celulares que provienen de algún tipo de carcinoma, por ejemplo de pulmón, piel, riñón, cérvix, estómago y colón, entre otros (Luo, 2004).

Los estudios de los mecanismos de degradación de Ski y SnoN como reguladores de la vía del TGF- β , así como de su papel en procesos como la transformación oncogénica y en la oncogénesis, son primordiales para la comprensión de la homeostasis celular (Miyazono, 2000). Hasta hace poco el TGF- β era la única señal que se conocía para regular los niveles de expresión de Ski y SnoN a través de una degradación dependiente del proteosoma 26S y de la señalización de las Smads. La fosforilación de las proteínas Smads es indispensable para esta degradación, pues tienen una función como proteínas adaptadoras de ligasas de ubiquitina tipo E3, como Smurf2 y APC.

Mientras tanto el mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por anisomicina, representa una alternativa diferente, pues por lo que se tiene reportado en el laboratorio, este proceso es llevado a cabo sin la activación de las proteínas Smads pero vía el proteosoma 26S (Vázquez-Macías et al., 2005).

En este trabajo se abordó el estudio del mecanismo de acción de la anisomicina para inducir la degradación de Ski y SnoN. Un primer acercamiento para el estudio del mecanismo de degradación de los correpresores Ski y SnoN inducido por anisomicina, fue la utilización del inhibidor de la actividad de cinasa del receptor ALK5 (SB431542), como un control para bloquear una posible degradación de SnoN por una señalización endógena del TGF- β .

Los inhibidores son herramientas útiles para el estudio de las vías de transducción de señales involucradas en los procesos fisiológicos, y el SB431542 es un compuesto sintético que se ha demostrado que inhibe específicamente la actividad de cinasa de ALK4, ALK5 y ALK7 pero no de ALK2, ALK3 y ALK6 (Inman et al., 2002). El SB431542 tiene una gran capacidad para bloquear procesos celulares inducidos por el TGF- β como la transcripción, la expresión de genes, la apoptosis, la supresión de crecimiento y atenuar acciones del TGF- β como la motilidad celular, la transición epitelio mesénquima, la migración y la invasión en líneas celulares humanas, indicando su alta especificidad sobre los efectos celulares de esta citocina (Halder et al., 2005). Por estas características y reportes en la literatura, se utilizó el inhibidor SB431542 como un control para bloquear la degradación por parte del TGF- β .

En distintos tipos celulares como la línea A549, se ha demostrado que el TGF- β es capaz de inducir la formación de complejos de Smad2/3 y Smad4, mientras que el tratamiento con el SB431542 bloquea la formación de estos complejos y su traslocación nuclear, de una manera dependiente de la dosis (Halder et al., 2005). También se ha reportado que el SB431542 es capaz de bloquear la degradación de SnoN inducida por el TGF- β y por la ligasa de ubiquitina APC en modelos *in vivo*, como la morfogénesis axonal en el cerebro de mamíferos (Stegmüller et al., 2008). Con estos antecedentes, se puede decir que el efecto del SB431542 es específico sobre la señalización del TGF- β y sobre sus efectos celulares, al inhibir la actividad de cinasa del receptor ALK5.

Como se tenía esperado y de acuerdo a lo citado en la literatura, el SB431542, bloquea la señalización del TGF- β . Los niveles de la proteína p-Smad2 y p-Smad3 fueron mínimos o incluso nulos cuando las células A549 fueron sujetas al tratamiento con el SB431542 y el TGF- β , mostrando así la especificidad del inhibidor para bloquear la actividad de cinasa de ALK5 a cargo de la fosforilación de las R-Smads. Además, como era también esperado, el SB431542 inactiva la vía de degradación de SnoN inducida por el TGF- β , y acumula los niveles de este correpresor comparadas con el control.

Inesperadamente el SB431542 mostró ser capaz de bloquear la degradación de SnoN inducida por anisomicina. Este resultado parece contradictorio, pues como se ha mencionado, la degradación de Ski y SnoN inducida por anisomicina no involucra la activación de las proteínas R-Smads. Por lo que se sabe por la literatura, el SB431542 no ejerce algún efecto sobre la activación de MAPK como ERKs, JNK o p38, y aparentemente sobre otras vías activadas por la presencia del suero fetal bovino (Halder et al., 2005). El tratamiento con el SB431542 tiene un efecto negativo en la fosforilación de la proteína Smad2 en respuesta al estímulo con TGF- β , pero no así sobre los niveles de la proteína p-p38 inducida por anisomicina en células A549.

Cicloheximida y puromicina son otros inhibidores de la síntesis de proteínas, que mostraron tener un efecto de regulación negativa sobre SnoN en las células A549, así como en otros tipos celulares como AD293 (datos no mostrados) tal y como lo hace anisomicina, al ser bloqueada su acción por efecto del SB431542. Estos datos sugieren un mecanismo en común para los tres compuestos (anisomicina, cicloheximida y puromicina) que son capaces de ocasionar un decremento de SnoN. Estos datos resultan muy interesantes, pues en un reporte reciente de nuestro grupo se había probado el efecto de la cicloheximida sobre la regulación de SnoN en células HeLa, sin haber obtenido una regulación negativa de la proteína; haciendo referencia a una especificidad según el tipo celular (Vázquez-Macías et al., 2005).

Al revisar la literatura, se han reportado que los efectos que poseen estos inhibidores de la síntesis de proteínas sobre la activación de vías de señalización en células de mamífero, presentan variaciones según el contexto celular (Edwards y Mahadevan 1992). Por ejemplo la cicloheximida no lleva a cabo la

inducción de MAPK en células de cerebro de ratón (Radulovic et al., 2007). Mientras que puromicina parece no mostrar efectos de activación de MAPK en células como fibroblastos de ratón C3H 10T1/2 (Edwards y Mahadevan 1992). Nosotros, aunado a una regulación negativa de SnoN, mostramos que cicloheximida y puromicina son capaces de inducir la fosforilación de p38 en células A549, pero la anisomicina sigue mostrando ser el mayor inductor de p-p38, mientras que la puromicina tiene un efecto mínimo.

El mecanismo de degradación de SnoN inducido por puromicina fue explorado más a fondo, mostrando una dependencia de la dosis, pues a partir de 1 µg/ml se observa la máxima disminución de los niveles de la proteína. Esta disminución en los niveles de SnoN es acompañada por la activación paulatina de p-p38. El estudio del efecto de la puromicina sobre los niveles de SnoN es importante ya que el plásmido, donde se encuentra insertada la secuencia que codifica para el shRNA contra el receptor ALK5, posee un gen que confiere resistencia a los efectos de la puromicina. Este trabajo muestra una dosis de 1 µg/ml que parece efectiva para seleccionar a las células transfectadas con el shRNA para ALK5, y al mismo tiempo evitar una regulación negativa de los niveles de SnoN por dicho tratamiento.

A diferencia de cicloheximida y puromicina, G418 e higromicina no causaron la degradación de SnoN. Ambos inhibidores de la síntesis de proteínas también mostraron tener un efecto nulo en la fosforilación de p38, como ha sido previamente reportado. Al contrario de lo reportado con los otros inhibidores, se conoce que G418 es un inductor de apoptosis dependiente de caspasas y probablemente influya en la distribución celular de proteínas (Jin et al., 2004), pero no se tiene reportado que pueda llevar a la inducción de MAPK. Estos datos apuntan a que el efecto de anisomicina, cicloheximida y puromicina es exclusivo de estos tres compuestos y no de otros inhibidores de la síntesis de proteínas.

Una diferencia notable entre los mecanismos de degradación de anisomicina y TGF-beta, es el efecto del SB431542 cuando se adiciona posteriormente a cada estímulo. Para el caso del TGF-beta, el inhibidor es capaz de inhibir la señal del TGF-beta, cuando es adicionado después de la citocina, y con ello la degradación del correpressor SnoN. Sin embargo para el caso de anisomicina, el SB431542 no es capaz de bloquear la degradación de SnoN, una vez que la señal de anisomicina ha sido activada. Sin embargo, si el SB431542 es capaz de bloquear la degradación de SnoN inducida por anisomicina y por TGF-β, podría sugerir un elemento en común para ambos mecanismos de degradación de la proteína SnoN; y que en este caso apuntarían a ALK5.

Una disminución significativa de los niveles de ALK5, inducida por el shRNA, muestra que el receptor tipo I del TGF-beta es necesario para el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina. Estos datos preliminares sugieren que ALK5 podría ser regulado por otros estímulos además de la transfosforilación mediada por el TGF-beta y el receptor tipo II. La región regulatoria de dominio de cinasa de ALK5 corresponde a una región rica en glicinas y serinas (región GS)

que es fosforilada por el receptor tipo II del TGF-beta, al formarse el complejo de señalización de esta citocina. (Massagué y Gomis 2006)

Los datos de este trabajo sugieren que anisomicina podría estimular la acción de ALK5 sobre sustratos distintos a las proteínas Smads, que lleven a la degradación de SnoN y Ski. Sin embargo, este efecto de anisomicina sobre ALK5 probablemente no sea directo, y se sugiere la existencia de un receptor o molécula receptora para la anisomicina, o posiblemente una cascada de señalización que involucre proteínas efectoras en los distintos efectos de la anisomicina, como la activación de MAPK y la degradación de SnoN. (Figura 19)

También observamos otros tipos celulares en donde la anisomicina tiene efectos sobre los niveles de SnoN y Ski como A549, AD293 y HeLa; no así otros tipos celulares como HepG2, Mv1Lu y la clona L17. En todos los tipos celulares la expresión de SnoN es muy alta, sin embargo no es un requisito indispensable para que la anisomicina lleve a cabo estos efectos. Sin embargo, la anisomicina sí lleva a cabo la activación de p38 en todos los tipos celulares analizados (Datos no mostrados).

En este trabajo también se analizó la participación de las DUB en el mecanismo de anisomicina, mediante la utilización del inhibidor $\Delta 12$ -PGJ2. Estos resultados muestran que el efecto de anisomicina sobre SnoN puede ser bloqueado al tratar a las células con este derivado de la prostanglandina PGJ2. Se ha reportado que el tratamiento con $\Delta 12$ -PGJ2 es capaz de inducir la acumulación de proteínas ubiquitinadas y evitar su degradación vía el proteosoma 26S. sin involucrar la inhibición del proteosoma (Zonmin Li et al., 2004). Por lo tanto, los datos sugieren que anisomicina induce la ubiquitinación de SnoN para causar su degradación.

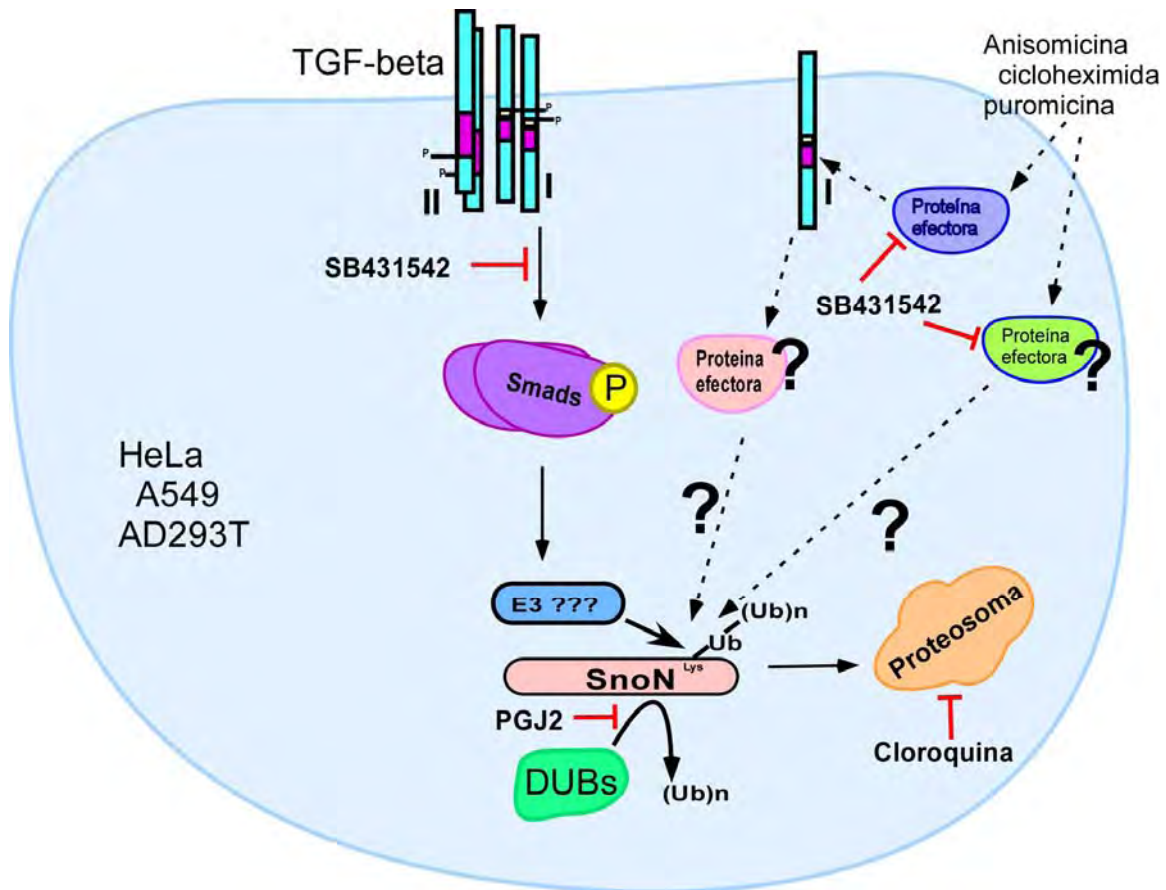


Figura 19. Modelo propuesto para el mecanismo de degradación de SnoN.

Se muestran los tipos celulares que son responsivos a la anisomicina con la regulación negativa del correpresor y los tres inhibidores anisomicina, cicloheximida y puromicina que son también capaces de disminuir los niveles de SnoN, análogamente al mecanismo de anisomicina, pues su efecto también es bloqueado por acción del SB431542.

Conclusiones

Se estudio el mecanismo de acción de anisomicina en diversos tipos celulares y se halló que las células AD293, A549 y HeLa son tipos celulares donde la anisomicina tiene efecto sobre los niveles de SnoN.

La inhibición de las DUB's es capaz de bloquear la degradación de SnoN por anisomicina, por lo que el sistema ubiquitina-proteosoma parece estar implicado.

En este trabajo reportamos que el SB431542 es capaz de bloquear la degradación de SnoN inducida por anisomicina y por otros inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida y la puomicina, en las células A549.

En contraste, otro grupo de inhibidores como la higromicina y el G418 no causaron la degradación de SnoN, así como inductores de otras vías de estrés como la hiperosmolaridad y el ácido okadaico.

Datos preliminares sugieren que ALK5 es una proteína necesaria para el mecanismo de anisomicina.

PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto de otros inhibidores de ALK5 en el mecanismo de degradación de SnoN por anisomicina
- Estudiar el efecto de proteínas que bloqueen la acción de ALK5 (Smad7) en la degradación de SnoN.
- Para confirmar que ALK5 es una proteína necesaria en el mecanismo de anisomicina, hacer el rescate de ALK5 en células que tengan depletado ALK5 y analizar que el mecanismo de anisomicina se restituya.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, Kusanagi K, Nemoto N, Miyazono K, Kawabata M. (1999) *c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads*. J Biol Chem. **274**:35269-77.
2. Berk M, Desai SY, Heyman HC, Colmenares C. (1997) *Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development*. Genes Dev. **16**: 2029-39.
3. Boyd FT, Massague J. (1989) *Transforming growth factor-beta inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor*. J Biol Chem. **264**: 2272-8.
4. Briones-Orta MA, Sosa-Garrocho M, Moreno-Alvarez P, Fonseca-Sanchez MA, Macias-Silva M. (2006) *SnoN co-repressor binds and represses smad7 gene promoter*. Biochem Biophys Res Commun. **341**: 889-94.
5. Jin QH, Zhao B, Zhang XJ. (2004) *Cytochrome c release and endoplasmic reticulum stress are involved in caspase-dependent apoptosis induced by G418*. Cell Mol Life Sci. **61**: 1816-25.
6. Cohen SB, Zheng G, Heyman HC, Stavnezer E. (1999) *Heterodimers of the SnoN and Ski oncoproteins form preferentially over homodimers and are more potent transforming agents*. Nucleic Acids Res. **27**:1006-14
7. Derynck R, Zhang YE. (2003) *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature. **9**, 577-84.
8. Edwards DR, Mahadevan LC. (1992) *Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors*. EMBO J. **11**:2415-24.
9. Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. (2005) *A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers*. Neoplasia. **7**:509-21.
10. Hazzalin CA, Le Panse R, Cano E, Mahadevan LC. (1998) *Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction*. Mol Cell Biol. **18**:1844-54.

11. He J, Tegen SB, Krawitz AR, Martin GS, Luo K. (2003) *The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins.* Biol Chem. **278**:30540-7.
12. Javelaud D, Mauviel A. (2004) *Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles.* Int J Biochem Cell Biol. **36**, 1161-5.
13. Keski-Oja J, Koli K, von Melchner. (2004) *TGF-beta activation by traction?* Trends Cell Biol. **14**, 657-9.
14. Krakowski AR, Laboureau J, Mauviel A, Bissell MJ, 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. **35**:37-42.
15. Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V, Hill CS. (2007) *Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation.* Mol Cell Biol. **27**:6068-83.
16. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. (2001) *Ski/Sno and TGF-beta signaling.* Cytokine Growth Factor Rev. **12**(1):1-8.
17. Lo RS, Wotton D, Massague. (2001) *Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF.* J. EMBO J. **20**:128-36.
18. Lochner A, Genade S, Hattingh S, Marais E, Huisamen B, Moolman JA. (2003) *Comparison between ischaemic and anisomycin-induced preconditioning: role of p38 MAPK.* Cardiovasc Drugs Ther. **17**:217-30.
19. Luo K. (2004) *Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling.* Curr Opin Genet Dev. **14**:65-70.
20. Massague J, Gomis RR. (2006) *The logic of TGF-beta signaling.* FEBS Lett. **22**, 2811-20.
21. Miyazono K. (2000) *Positive and negative regulation of TGF-beta signaling.* J Cell Sci. 2000 113 1101-9.
22. Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong HD, Wadhwa R, Colmenares C, Kohno I, Ishii S. (1999) *Ski is a component of the histone deacetylase complex*

required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. Genes Dev. **13**:412-23.

23. Pearson-White S, Crittenden R. *Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response.* Nucleic Acids Res. 1997 **14**:2930-7
24. Place RF, Noonan EJ, Giardina C. (2005) *HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha.* Biochem Pharmacol. **70**:394-406.
25. Roberts AB. (1999) *TGF-beta signaling from receptors to the nucleus.* Microbes Infect. **1**, 1265-73.
26. Sarker KP, Wilson SM, Bonni S. (2005) *SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor-beta responses.* J Biol Chem. **280**:13037-46.
27. Shi Y, Massague J. (2003) *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.* Cell. **3**, 685-700.
28. Shinagawa T, Dong HD, Xu M, Maekawa T, Ishii S. (2000) *The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice.* EMBO J. **10**:2280-91.
29. Siegel PM, Massague J. (2003) *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer.* Nat Rev Cancer. **3**:807-21.
30. Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA. (1999) *Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling.* Mol Cell. **4**:499-509.
31. Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. (1999) *SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A. **96**: 12442-7.
32. Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, Luo K. (2001) *Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN.* Genes Dev. 2001 **15**:2822-36.
33. Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. (1999) *Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein.* **286**:771-4.

34. Sutrave P, Kelly AM, Hughes SH. (1990) *ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice*. Genes Dev. **9**:1462-72.
35. Vazquez-Macias A, Ruiz-Mendoza AB, Fonseca-Sanchez MA, Briones-Orta MA, Macias-Silva M. (2005) *Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin*. FEBS Lett. **579**:3701-6.
36. Wang W, Mariani FV, Harland RM, Luo K. (2000) *Ski represses bone morphogenic protein signaling in Xenopus and mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. **26**:14394-9.
37. Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K, Shi Y. (2002) *Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling*. Cell. **111**:357-67.
38. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. (2004) *Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov. **12**:1011-22.
39. Zinck R, Cahill MA, Kracht M, Sachsenmaier C, Hipskind RA, Nordheim A. (1995) *Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1*. Mol Cell Biol. **15**:4930-8.
40. Zhu Q, Krakowski AR, Dunham EE, Wang L, Bandyopadhyay A, Berdeaux R, Martin GS, Sun L, Luo K. (2006) *Dual Role of SnoN in mammalian tumorigenesis*. Mol Cell Biol. **27**: 324-39.

Apéndice

Medios de cultivo celular

HAM's F12 complementado al 10% de FBS (línea A549)

DMEM complementado al 10% de FBS (línea AD293)

Para la preparación de un litro de medio proveído por la marca GIBCO, se agrega 1.5 g de bicarbonato de sodio y se ajusta el pH a 7.4 y finalmente se esteriliza por filtración, se agrega lo siguiente:

SFB	45 ml
Penicilina/Estreptomicina (GIBCO)	5 ml
10 000 U/ ml de Penicilina y	
5 000 µg/ml de Estreptomicina	

Reactivos y soluciones para lisis celular

PBS 10X

NaCl	134 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	4.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM

Buffer TNTE 0.5% (100 ml)

10 ml	TN 10 X
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8)
5 ml	Tritón 10%
85 ml	H ₂ O

TN 10 X (100 ml)

50 ml	Tris 1 M
30 ml	NaCl 5 M

20 ml H₂O

Inhibidores de fosfatasas y proteasas (cantidades por cada ml de amortiguador de lisis TNTE 5%)

10 µl Ortovanadato de sodio 100X (H₂O)
10 µl Pirofosfato de sodio 100X (H₂O + HCl 8 mM)
25 µl Fluoruro de sodio 40X (H₂O)
5 µl PMSF(200X) (isopropanol)
2 µl β-glicerofosfato 500X (TE pH 7.4)
2 µl Benzamidina 500X (TE pH 7.4)
2 µl Inhibidor de tripsina (100X) (TE pH 7.4)
2 µl Dihidrocloreuro de antipaina 5 mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl Antipaina (100X) (TE pH 7.4)
2 µl Aprotinina (100X) (TE pH 7.4)
2 µl Pepstatina A (100x) (DMSO)
2 µl Leupeptina (500X) (TE pH 7.4)

Soluciones para ensayos de inmunoprecipitación de proteína e inmunoblot

Buffer TNTE 0.1 % (100 ml)

10 ml TN 10 X
0.2 ml EDTA 0.5 M (pH 8)
1 ml Tritón 10%
89 ml H₂O

Solución de acrilamida/bis-metil-acrilamida (30% / 0.8%)

87.6 g acrilamida
2.4 g bis-metil-acrilamida
Aforar en 300 ml de H₂O desionizada

1.5 M de Tris-HCl pH8.8

18.15 g Tris base

100 ml de H₂O

0.5 M de Tris-HCl pH6.8

6 g Tris base

100 ml de H₂O

Buffer de corrida 10X pH8.3 (1 litro)

Tris base 30.2 g

Glicina 144 g

SDS 10% 100 ml

H₂O aforar a un litro

Buffer TBS 10X pH8.1-8.5

Tris base 30.3 g

Glicina 144.5 g

H₂O aforar a un litro

Buffer TBS-T 0.1% (1 litro)

Buffer TBS 10X 100 ml

Tween 1 ml

H₂O 900 ml