



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES QUE MODULAN LA
FUNCIÓN Y ESTABILIDAD DE LA ONCOPROTEÍNA SKI

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Méd. Cir. Eugenio Del Valle Espinosa

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Adolfo García Sainz (Instituto de Fisiología Celular)

Dra. Guadalupe Reyes Cruz (Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas)

MÉXICO, D. F. diciembre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

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

ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES QUE MODULAN LA FUNCIÓN Y ESTABILIDAD DE LA ONCOPROTEÍNA SKI

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225N del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

- Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular)
- Dr. Jesús Adolfo García Sainz (Instituto de Fisiología Celular)
- Dra. Guadalupe Reyes Cruz (CINVESTAV)

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

- PRESIDENTA Dra. Claudia González Espinosa
- SECRETARIA Dra. María Elena Ibarra Rubio
- VOCAL Dr. Roberto Coria Ortega
- VOCAL Dra. Xóchitl Pérez Martínez
- VOCAL Dra. Martha Robles Flores

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Marina Macías Silva, por darme la oportunidad de integrarme a su laboratorio y la confianza para poder desenvolverme en él, siendo una guía fundamental para la sistematización y aplicación del conocimiento. Su desempeño como tutora fue inigualable, dejando grabadas muchas enseñanzas en mí a lo largo de estos años, las cuales seguiré conservando por el resto de mi vida.

A la Biól. Marcela Sosa Garrocho, con quien siempre pude contar para resolver los problemas que surgieron durante el desarrollo del proyecto y quien siempre se encuentra al pendiente de que el laboratorio pueda funcionar de manera adecuada.

Al LIBB. Genaro Vázquez Victorio, por el apoyo académico y técnico que incondicionalmente me compartió para siempre seguir adelante con el proyecto. Además, por su admirable apego a la docencia, logrando generar discusiones académicas interesantes en un ambiente de completa camaradería.

A la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Ruiz, la Biól. Cassandre Caligaris Benoit, la M en C Jacqueline Hernández Damián y la M en C. Nelly Raquel González Arenas por proveerme con gran parte del material biológico necesario para el desarrollo de los proyectos relacionados con este proyecto, y su continua asesoría con diversas técnicas experimentales que emplee durante el desarrollo de este proyecto, así como en proyectos alternos.

Al laboratorio del Dr. Fernando López Casillas, en especial al Médico Cirujano Valentín Mendoza por la asistencia técnica y el préstamo de reactivos para el proyecto.

Al laboratorio del Dr. Jesús Adolfo García Sainz, con atención a la Dra. María Teresa Romero Ávila y a la Dra. Rocío Alcántara Hernández por la ayuda para la realización de diversos experimentos con las líneas celulares, así como en los marcajes metabólicos radioactivos.

A la Unidad de Biología Molecular por su apoyo para la síntesis de los oligonucleótidos y la instrucción en el uso de distintos aparatos.

A la Unidad de Microscopía, en especial al Dr. Fernando García Hernández y al Biól. Gabriel Orozco Hoyuela quienes fueron importantes para la enseñanza del uso de la microscopía confocal y la asistencia en inmunotinciones empleadas en proyectos alternos.

A la Unidad de Cómputo por la desgastante labor de mantener siempre en óptimas condiciones la comunicación a través de las redes, por las cuales podemos obtener el material bibliográfico.

Al Bioterio del Instituto de Fisiología Celular por proveer a los animales en excelente estado para la realización de experimentos paralelos a este proyecto.

Al Taller del Instituto de Fisiología Celular por ser un apoyo esencial para mantener el buen funcionamiento de las instalaciones del laboratorio 225N.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres y hermanos, porque siempre han creído en mí y aún en los momentos difíciles me siguen apuntalando para alcanzar las estrellas.

A mi tía Carito, porque siempre ha estado interesada en lo que hago y jamás ha dejado de darme ninguna palabra de aliento.

A mis amigos de la infancia Carlos, Cyn, Lili y Vicky; porque siempre los llevo en la mente y aunque han sido ya más de 20 años de conocernos, seguimos creciendo juntos. Lejos y aún así los siento muy cerca.

A mis colegas médicos y amigos de una década: Anaid, Ari, Daniel, Gaby y Gris que nunca han dudado de mí y en quienes deposito también toda mi confianza. Ha sido un placer formarme con ustedes y compartir tantas experiencias día a día. Gracias por escucharme berrear, reír, chillar, por aguantar mis indecisiones académicas y todo, absolutamente todo. Que venga otra década más. Serán siempre mis médicos de cabecera.

A quienes pude conocer muy a fondo en esta historia, Diego, Gris y Martha. Que los años pasen y sigamos como hermanos, ayer en el pasillo, hoy en las pirámides, mañana en cualquier lugar del mundo pero sea donde sea, cantando y riendo como lo sabemos hacer. Que nunca dejemos de organizar algo “relax”...o bueno, “como quieran” jeje...

A mis compañeros y amigos de todos los días en el laboratorio: Auris, Cassita, Dianita, Genaro, Jackie, Nelly, Manuel y Marcelita. Con esta familia el tiempo pasó volando, no pude haber estado en mejor lugar este par de años. Compartimos tantos gustos, aficiones y hobbies tan diversos; no sé cómo acabamos todos juntos pero ha sido una experiencia suprema. Me quedo con algo de cada uno de ustedes, jamás pierdan su esencia! This San Luis Potosí 2013 was legen...(wait for it)... DARY!. Los quiero chavos.

我的猫！我爱你。没有你，我知道我会的。

Índice

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
1 INTRODUCCION.....	11
1.1 El TGF- β	11
1.1.1 Características generales del TGF- β	11
1.1.2 Vía canónica de señalización mediada por el TGF- β	12
1.1.3 Regulación de la vía canónica de señalización del TGF- β	14
1.2 La proteína Ski.....	14
1.2.1 Características estructurales de la proteína Ski.....	15
1.2.2 Ski en desarrollo embrionario.....	17
1.2.3 Ski y señalización intracelular.....	18
1.2.4 Ski y enfermedades neoplásicas.....	19
1.2.5 Ski, metabolismo y ciclo celular.....	20
1.3 Modificaciones postraduccionales.....	22
1.3.1 Ubiquitinación.....	22
1.3.2 Fosforilación.....	23
1.3.3 Sumoilación.....	24
1.3.4 Otras modificaciones postraduccionales.....	24
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
2.1 Antecedentes.....	26
2.2 Hipótesis.....	28
2.3 Objetivos.....	28
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Predicción de modificaciones postraduccionales.....	29
3.2 Cultivos celulares y reactivos.....	29
3.3 Anticuerpos.....	30
3.4 Plásmidos y transfecciones transitorias.....	31
3.5 Inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB).....	31
3.6 Detección de fosforilación.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Análisis in silico del gen de Ski.....	33
4.1.1 La proteína Ski está codificada por 2 mRNA que generan la misma proteína.....	33
4.1.2 Existen secuencias marcadoras de expresión (ESTs) que empalman con la secuencia de Ski.....	35
4.1.3 Clonación del gen de Ski para averiguar si el “splicing” alternativo funciona como generador de las isoformas de distinto peso molecular de la proteína.....	38
4.2 Análisis in silico de la presencia de modificaciones postraduccionales en la proteína Ski.....	43
4.2.1 La mayoría de los sitios potenciales de ubiquitinación se encuentran en la mitad carboxilo de la proteína.....	43
4.2.2 Secuencias consenso para sumoilación en Ski.....	45
4.2.3 Predicciones de sitios de fosforilación en Ski para 3 grupos de cinasas.....	47
4.2.4 Predicción de otras modificaciones postraduccionales.....	51
4.3 Demostración experimental de la presencia de modificaciones postraduccionales en Ski.....	52
4.3.1 La proteína Ski endógena no está monoubiquitinada.....	52
4.3.2 La degradación de Ski inducida por TGF- β no es mediada por el lisosoma.....	54
4.3.3 La sobreexpresión transitoria de la proteína Ski y ubiquitina permiten observar	

poliubiquitinación.....	55
4.3.4 La inhibición del proteosoma permite conservar una isoforma de bajo peso molecular.....	57
4.3.5 El empleo de un reductor de cisteína confiere estabilidad a la proteína Ski.....	58
4.3.6 La sobreexpresión de la proteína Ski permite observar fosforilación en condiciones basales y con el estímulo de TGF- β y anisomicina.....	59
4.3.7 La proteína Ski endógena es potencialmente una fosfoproteína.....	61
4.3.8 La estabilidad basal de Ski está regulada por la cinasa GSK3.....	65
5 DISCUSIÓN.....	68
5.1 Las isoformas de Ski podrían ser generadas por modificaciones postranscripcionales del mRNA o por cortes proteolíticos.....	68
5.2 La ubiquitinación y fosforilación no explican las isoformas de Ski.....	69
6 CONCLUSIONES.....	72
7 PERSPECTIVAS.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
APÉNDICE A.....	84
APÉNDICE B.....	85

Índice de figuras

Figura 1: Estructura secundaria del TGF- β . A.	11
Figura 2: Vía canónica de señalización por TGF- β	13
Figura 3: Ski y Sno son proteínas homólogas.	16
Figura 4: Ski cumple funciones fisiológicas importantes.	21
Figura 5: El gen de Ski tiene 7 exones en el humano.....	34
Figura 6: ESTs predicen la existencia de nuevos exones en el gen de Ski.....	37
Figura 7: Predicciones de “splicing” alternativo.....	38
Figura 8: Figura 7. Sobreexpresión de Ski.....	38
Figura 9: Clonación de Ski.....	41
Figura 10: Sitios potenciales de ubiquitinación de la proteína Ski de humano.....	44
Figura 11: Sitios potenciales de sumoilación.....	45
Figura 12: Ski tiene dos regiones ricas en residuos potenciales de fosforilación.....	48
Figura 13: Sitios potenciales de fosforilación por MAPK.....	49
Figura 14: Ski posee una secuencia putativa de fosforilación por GSK3.....	50
Figura 15: No es posible detectar monoubiquitinación en la proteína Ski endógena.....	53
Figura 16: La inhibición de la función lisosomal no impide la degradación de Ski mediada por TGF- β	55
Figura 17: La sobreexpresión de Ski y ubiquitina permite identificar la poliubiquitinación.....	55
Figura 18: La inhibición del proteosoma permite conservar un fragmento de aproximadamente 60 kDa.	58
Figura 19: La NEM genera un cambio en la movilidad de las bandas de Ski.....	59
Figura 20: Detección de fosforilación de la proteína Ski sobreexpresada.....	61
Figura 21: El marcaje metabólico con ^{32}P no permite distinguir si Ski es una fosfoproteína.....	63
Figura 22: Ski se encuentra marca con la molécula PhosTag de forma basal.....	64
Figura 23: GSK3 regula la estabilidad de Ski.....	66
Figura 24: GSK3 incrementa su asociación con Ski tras el estímulo de TGF- β	67

Índice de tablas

Tabla 1: Líneas celulares empleadas durante el proyecto.	30
Tabla 2: Sitios conservados de sumoilación en humano y ratón.....	46

ABREVIATURAS

GDF: Factores de crecimiento y diferenciación
BMP: Proteína morfogenética de hueso
DHD: Dominio homólogo a Dachshund
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium, GIBCO®
DUB: Enzima desubiquitinante
EST: Secuencias marcadoras de expresión
IP: Inmunoprecipitación
LAP: Proteína asociada a latencia
MAPK: Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MEC: Matriz extracelular
MIS: Sustancia inhibidora Mülleriana
NFI: Nuclear Factor I
NEM: N-Etilmaleimida
R-Smad: Proteína Smad activada por receptor
RAR: Receptor para ácido retinoico
RPM: Revoluciones por minuto
SBE: Elemento de unión a Smad
SKV: Sloan Kettering Virus
SUMO: Small ubiquitin-like modifier
TβRI: Receptor para TGF-β tipo 1
TβRII: Receptor para TGF-β tipo 2
TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta
VDR: Receptor para vitamina D
WB: Western Blot

RESUMEN

La familia de la citocina Factor de Crecimiento transformante β (TGF- β por sus siglas en inglés) se encuentra involucrada en diversos procesos celulares. Mucho se ha investigado respecto a la vía canónica de señalización mediada por esta citocina y se sabe que su regulación ocurre a distintos niveles. La oncoproteína Ski, el homólogo del componente transformante del virus Sloan-Kettering, es uno de los reguladores negativos de esta vía. Hasta el momento se han descrito varios mecanismos por los cuales Ski lleva a cabo esta función. Algunas teorías proponen que la interacción con las proteínas Smad a nivel citoplasmático bloquea la translocación nuclear de los complejos hacia los elementos de respuesta a TGF- β . Por otra parte, se ha demostrado que Ski recluta a otros co-represores y a desacetilasas de histona hacia los promotores de genes blanco de la vía y a su vez compete con co-activadores transcripcionales. Además, se ha visto que la proteína interactúa con uno de los receptores de superficie impidiendo la activación de las proteínas Smads. (Ferrand et al. 2010; Bonnon & Atanasoski, 2012)

Aunque algunos sitios de fosforilación se han descrito recientemente en la secuencia de aminoácidos de la proteína Ski, se sabe muy poco respecto a otras modificaciones postraduccionales que pudiera sufrir la proteína y menos sobre la función que estas modificaciones puedan ejercer sobre la proteína. Por otra parte, al identificar a la proteína mediante las técnicas de inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB), los anticuerpos identifican varias bandas por encima del peso molecular esperado para Ski (80 kDa). Aún no se ha reportado ninguna explicación respecto al origen de las variaciones de los pesos moleculares de esta proteína; sin embargo, la mayoría de los autores no apoyan al “splicing” alternativo como un mecanismo para generar estas isoformas.

Por lo anterior, nosotros pensamos que la presencia de modificaciones postraduccionales en la proteína Ski son las causantes de estos incrementos en su peso molecular.

En el presente trabajo encontramos que algunas modificaciones postraduccionales como la poliubiquitinación y la fosforilación se relacionan con cambios importantes en la estabilidad de la proteína Ski; sin embargo, no pudimos encontrar aquella que explicara alguna de las isoformas de alto peso molecular que presenta la proteína de forma basal en distintas líneas celulares.

1 INTRODUCCION

1.1 El TGF- β

1.1.1 Características generales del TGF- β .

El TGF- β es una proteína perteneciente a la superfamilia de citocinas que lleva el mismo nombre, las cuales se encuentra relacionada con diversos procesos celulares. La superfamilia del TGF- β se divide en 2 subfamilias: la familia TGF- β /activina/nodal y la familia BMP/GDF/MIS. Esta clasificación está basada en el mecanismo de acción de las citocinas y toma en cuenta las secuencias conservadas entre ellas. Los miembros de la superfamilia del TGF- β se caracterizan por tener similitud estructural y presentar entre un 40% y un 60% de homología entre sus secuencias de aminoácidos cuando se comparan citocinas de subfamilias distintas (Massagué et al. 1994; Shi & Massagué 2003).

A través de la caracterización cristalográfica del TGF- β 2 y gracias a estudios de resonancia magnética nuclear del TGF- β 1, se conoce la conformación estructural de esta proteína (Hinck et al. 1996). Un rasgo característico es la presencia de nueve residuos de cisteína conservados en su dominio activo, región conocida como nudo de cisteínas, unidos entre ellos mediante enlaces disulfuro. Ocho de estos residuos forman cuatro puentes disulfuro que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína; el noveno residuo sirve para estabilizar la interacción entre los dos monómeros junto con interacciones hidrofóbicas (Daopin et al. 1992). Además, la citocina posee 4 láminas β antiparalelas y

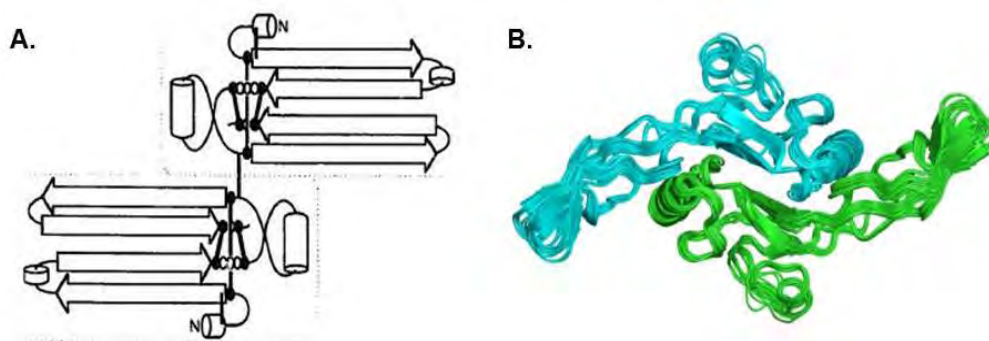


Figura 1: Estructura secundaria del TGF- β . A. El TGF- β posee 4 láminas β antiparalelas (rectángulos con flecha) y una α -hélice en la base (cilindro). El nudo de cisteínas se observa como puntos negros con puentes disulfuro marcados con líneas rectas. La unión del homodímero se hace por un enlace disulfuro cercano al nudo de cisteínas. Tomado de Massagué et al 1994. B. Estructura tridimensional obtenida por estudios de resonancia magnética nuclear. Obtenido de PDBe, acceso 1kla.

una α -hélice. La estructura cuaternaria del dímero del TGF- β se ha descrito por diversos autores como dos manos unidas por la base de la palma en sentido contrario, con los dedos apuntando hacia las caras externas (**Figura 1**).

Los miembros de la familia del TGF- β se encuentran en el espacio extracelular en forma de homodímeros, unidos mediante un puente disulfuro y a través de interacciones hidrofóbicas. El TGF- β es sintetizado como una citocina inactiva dimérica asociada a otra proteína en su extremo amino terminal de 249 residuos conocida como péptido asociado a latencia (LAP). Durante el proceso de secreción, la proteína LAP es escindida por la acción de la endoproteasa furina generándose la forma activa del dímero. También el TGF- β puede ser secretado unido a LAP y almacenado en la matriz extracelular, donde mediante el estímulo adecuado puede activarse mediante proteasas que liberan al dímero listo para actuar sobre sus células blanco (Massagué et al. 1994).

El TGF- β se encuentra implicado en distintos procesos celulares como son la regulación de la proliferación y la homeostasis celular, la reparación de heridas, la producción de matriz extracelular, la apoptosis y la modulación de la respuesta inmune. Los miembros de esta familia de citocinas tienen también funciones muy importantes en el desarrollo embrionario (Shi & Massagué 2003; Lan 2011; Wakefield & Hill 2013).

1.1.2 Vía canónica de señalización mediada por el TGF- β .

Las citocinas de la superfamilia del TGF- β señalizan de manera intracelular a través de componentes específicos. Existen una gran variedad de receptores con dominios extracelulares e intracelulares para los miembros de la familia del TGF- β , los cuales pueden organizarse en distintas combinaciones para transducir señales diversas, lo que genera una gran cantidad de respuestas celulares. En el caso del TGF- β , existe una vía canónica de señalización la cual ha sido ampliamente estudiada. Dos receptores de superficie para el TGF- β : receptor para TGF- β tipo I (T β RI) y receptor para TGF β tipo II (T β RII), se encuentran presentes en la membrana celular sin estar asociados. Un dímero de TGF- β es capaz de unirse a dos moléculas de T β RII. Esta unión puede ser facilitada por el co-receptor betaglicano. Una vez que ocurre la interacción entre el T β RII y la citocina, se favorece el reclutamiento de dos receptores T β RI, formándose un complejo heterotetramérico. El T β RII posee actividad constitutiva de cinasa de residuos de serina y treonina. Al encontrarse el T β RII en complejo con el T β RI se lleva a cabo la fosforilación de este último en un dominio rico en glicinas y serinas

(dominio GS). Lo anterior activa al receptor $T\beta RI$, el cual ahora puede fosforilar residuos de serina y treonina (Wrana et al. 1994).

El $T\beta RI$ activado es el encargado de fosforilar a las proteínas R-Smad (Smad2 y Smad3) en un motivo conocido como SSXS, localizado en el extremo carboxilo terminal (Macías-Silva et al. 1996). Lo anterior activa a las R-Smads, y se forman hetero-oligómeros con la proteína Smad4. Estos complejos son translocados al núcleo y funcionan como factores transcripcionales uniéndose a secuencias específicas del DNA que se conocen como secuencias de unión a Smads (SBEs). De esta forma y con la asociación de otros coactivadores o co-represores de la transcripción se lleva a cabo la regulación positiva o negativa de los genes blancos de esta vía de señalización (**Figura 2**).

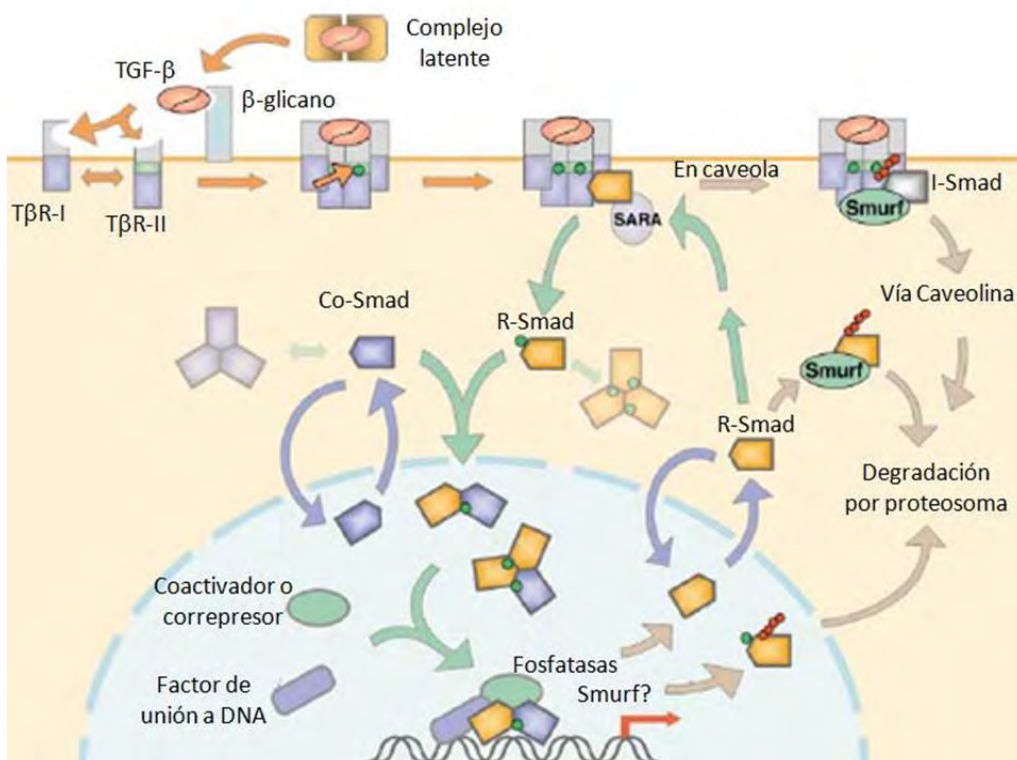


Figura 2: Vía canónica de señalización por TGF-β. La señalización inicia con la unión del TGF-β al receptor tipo II ayudado del betaglicano. Se promueve la unión con el receptor tipo I y se activa la cascada de fosforilación que activa a las proteínas R-Smads las cuales se unen con Co-Smad y se translocan a núcleo. Con ayuda de co-activadores y correpresores, regulan genes blancos uniéndose a la secuencias SBE. Existe un recambio de R-Smads activas e inactivas mediada por fosfatasas y también degradación inducida probablemente por la ligasa de ubiquitina Smurf y el proteosoma. La proteína SARA mantiene proteínas R-Smad cercanas a la membrana listas para ser activadas. Otra proteína, I-Smad o Smad 7, es un regulador negativo de la vía que induce ubiquitinación del $T\beta RII$ por Smurf y su degradación por el proteosoma. Modificado de Shi & Massagué 2003.

Dentro de sus múltiples funciones, el TGF- β ejerce una acción importante en el ciclo celular, manteniendo a la célula en la fase G1 impidiendo su avance hacia la fase S. Esto se logra incrementando la transcripción de genes supresores de tumores como p15INK4B y p21Cip1, que frenan la progresión del ciclo celular. Además, esta citocina suprime la expresión de proto-oncogenes como c-myc, N-Ras, Ski y SnoN, implicados en proliferación celular (Liu et al. 2001).

1.1.3 Regulación de la vía canónica de señalización del TGF- β

La regulación de la vía de señalización iniciada por el TGF- β ocurre a distintos niveles. En el medio extracelular existe una regulación de la disponibilidad de citocinas activas a través de proteínas atrapa-ligandos, las cuales impiden su interacción con los receptores de superficie celular. Para el caso específico del TGF- β , algunas de estas moléculas son las proteínas decorina y la α 2-macroglobulina. Para miembros de otras subfamilias, también existen moléculas que secuestran las formas activas, como la proteína Noguina (Noggin) que disminuye la disponibilidad de la citocina BMP7 (Shi & Massagué 2003).

En el medio intracelular, otra forma de regulación de la señal consiste en modular la actividad de cinasa del receptor T β RI. En este caso, la unión de la proteína FKBP12 al dominio GS del receptor impide la fosforilación y activación del mismo. Por lo anterior, la fosforilación de las R-Smads no puede llevarse a cabo (Shi & Massagué 2003).

A nivel nuclear, se ha observado que fosfatasas como PPM1A, PDP y SCP1, 2 y 3 pueden frenar la acción de las proteínas R-Smad activas. Incluso, se puede promover la interacción de estos factores transcripcionales con ligasas de ubiquitina E3, lo cual promueve una poliubiquitinación y degradación vía el proteosoma de estos transductores de la señal del TGF- β a nivel citoplasmático (Meulmeester & Ten Dijke 2011).

1.2 La proteína Ski

La vía de señalización del TGF- β también se modula por la interacción de intermediarios de la vía con proteínas reguladoras. Las proteínas Ski y SnoN son ejemplos de este tipo de proteínas. Ambas se consideran reguladores negativos de la vía del TGF- β funcionando como co-reguladores transcripcionales. Mucha investigación se ha hecho respecto a la proteína SnoN, pero es menor la

información que se ha obtenido sobre la proteína Ski. Aunque estructuralmente presentan muchas semejanzas, el conocimiento obtenido sobre SnoN no ha podido ser aplicado directamente en Ski (Bonnon & Atanasoski 2012).

1.2.1 Características estructurales de la proteína Ski

Inicialmente, un fragmento de la proteína Ski (v-Ski) fue descubierto como el componente transformante del retrovirus de aves llamado Sloan Kettering Virus (SKV) (Stavnezer et al. 1986). Mediante análisis de restricción de la secuencia genómica del componente viral y la generación de sondas de hibridación, se encontró que existía una proteína homóloga en el genoma de células de aves “no transformadas”. De esta manera se encontró que el componente transformante de la proteína Ski se incorporaba al genoma viral mediante eventos de recombinación, los cuales eliminaban grandes regiones de los extremos 5' y 3' del gen original. Estudios posteriores demostraron que Ski es una proteína altamente conservada en diversas especies de animales incluyendo mamíferos, anfibios y reptiles (Li et al. 1986; Stavnezer et al. 1986; Stavnezer et al. 1989).

Ski es una proteína nuclear que en el humano cuenta con 728 aminoácidos, y cuyo locus se encuentra en la región p36.3 del cromosoma 1. La secuencia de la proteína, junto con el análisis de bibliotecas de cDNA, permitió identificar una proteína homóloga, SnoN, la cual además posee diferentes isoformas generadas por “splicing” alternativo (Nomura et al. 1989).

La proteína Ski contiene en su extremo amino terminal dos dominios conservados con otras proteínas como Fussel 18, Fussel 15, Dach, Corl y Sno, conformando la superfamilia de proteínas SKI (Deheuninck & Luo 2009). El primer dominio se llama dominio homólogo a Dachhund (DHD), nombre que corresponde a una proteína cuya estructura cristalográfica es similar a esta región de la proteína Ski y la cual es un sitio que permite la interacción con otras proteínas como las co-reguladoras N-CoR, mSin3A, HIPK2 y MeCP2. El segundo dominio es una secuencia de alrededor de 270 aminoácidos llamado SAND (acrónimo generado por ser un dominio encontrado en las proteínas Sp100, Aire1, NucP41/75 y DEAF1, implicado en la unión de estas proteínas a DNA). Este dominio posee una estructura donde 4 residuos mantienen en posición a un átomo de zinc (módulo de unión a zinc tipo Cys2His2), y con esta región la proteína puede interaccionar con Smad4. En su dominio carboxílico, Ski posee 5 repeticiones una detrás de otra de 25 aminoácidos cada una, organizados en α -hélices y un motivo de cierre de leucinas. Es a través de esta región donde se puede llevar a cabo la

homodimerización de Ski así como la heterodimerización con su homólogo SnoN, e igualmente sirve como sitio de interacción con otras proteínas con funciones diversas (Luo 2004) (**Figura 3**).

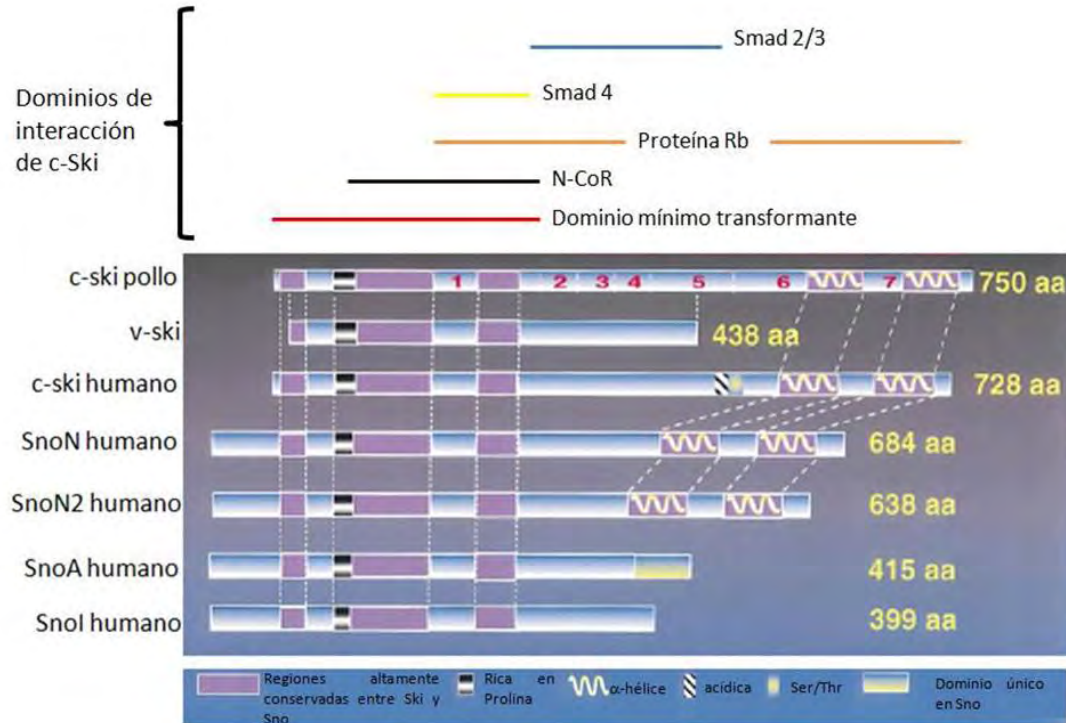


Figura 3: Ski y Sno son proteínas homólogas. Se muestran los dominios conservados entre las proteínas Ski y Sno. Las regiones ricas en prolina están marcadas en negro y las α -hélices con líneas curvas. La región rica en serinas y treoninas de Ski humano se encuentra cercana a una región ácida. La cantidad de residuos para cada una de las proteínas se muestra a la derecha. En la parte superior se marcan algunos sitios de interacción con otras proteínas. Modificada de Liu *et al* 2001.

Para el gen de Ski en aves se han podido identificar tres cDNA provenientes de una biblioteca de cDNA de pared embrionaria de pollo de 10 días de gestación (Sutrave & Hughes 1989). El análisis de estas secuencias permitió encontrar que 7 exones en el genoma del pollo dan origen a la versión más larga de este cDNA, pero que las otras dos secuencias se originaban por un “splicing” alternativo de los exones 2 y 6 que forman parte de la región codificante para el gen en esta especie. Eso sugirió la posibilidad de que se expresen 3 proteínas Ski con distinto tamaño. Cuando se analizaron los RNA

mensajeros presentes in vivo usando un ensayo de protección de nucleasas, solo se pudo confirmar la presencia de los mensajeros completos y del que carece del exón 6; sin embargo, la proteína homóloga SnoN sí posee 4 isoformas generadas por “splicing” alternativo, que se conocen como SnoN, SnoN2, SnoA, y SnoI, y cuya expresión varía de acuerdo a la especie.

1.2.2 Ski en desarrollo embrionario

La proteína Ski se encuentra implicada en diversos procesos del desarrollo embrionario. Además de poseer actividad transformante, se relacionó la expresión de la proteína Ski con el proceso de diferenciación celular hacia el linaje muscular en células germinales de codorniz (Colmenares & Stavnezer 1989); experimentos posteriores mostraron que Ski juega un papel importante en la diferenciación terminal del tejido muscular, pero que la presencia de otros factores resultan importantes también para la determinación inicial de este linaje, pues se expresan antes de la aparición del mRNA de Ski (Namciu et al. 1995).

Estudios más recientes han relacionado la expresión de esta proteína con malformaciones congénitas. Se ha reportado que en un modelo murino, el “knock-out” de Ski resulta en un fenotipo con defectos del cierre de la línea media del rostro (Colmenares et al. 2002). En humanos, existe un síndrome generado por la delección de un fragmento del cromosoma 1 asociado a malformaciones de la línea media del rostro, involucrando alteraciones en el tejido óseo, cartilaginoso y muscular. Lo anterior motivó al grupo de la Dra. C. Colmenares a mapear la localización del gen de Ski, encontrándolo en la región 1p36.3. Esto sugiere que las alteraciones en la expresión de Ski bajo un contexto genético adecuado puede ser el origen de este síndrome. Además, en otros fondos genéticos, la ausencia de Ski determina la presencia de defectos del cierre del tubo neural. Existen patologías como el síndrome de Shprintzen-Goldberg que involucra alteraciones congénitas en el desarrollo del tejido conectivo, y en las cuales se ha observado un aumento en la señalización mediada por TGF- β . Una vez que fueron realizados estudios en fibroblastos de pacientes con este padecimiento, se pudieron encontrar diversas mutaciones que afectan el sitio de interacción de Ski con Smad2/3 así como el dominio DHD, lo que podría explicar la patogenia de estas alteraciones del desarrollo embrionario (Doyle et al. 2012; Carmignac et al. 2012).

El papel de Ski en el desarrollo del sistema nervioso también se ha estudiado recientemente. El papel de la citocina TGF- β en células de Schwann consiste en estimular la proliferación celular; sin

embargo, Ski parece mediar un efecto antagónico, frenando la multiplicación celular e impidiendo la re-entrada al ciclo celular. Pero el papel de Ski va aún más allá, pues parece que su expresión es necesaria para que se lleve a cabo la expresión de genes relacionados con la síntesis de mielina y por lo tanto tiene relación con el desarrollo del sistema nervioso periférico, así como en la regeneración neuronal (Atanasoski et al. 2004).

1.2.3 *Ski y señalización intracelular*

Como se mencionó anteriormente, Ski se describió inicialmente como una proteína de localización nuclear. A través del análisis de la estructura primaria de Ski se encontró que tenía el potencial de unirse a la secuencia consenso GTCTAGAC del DNA; sin embargo, en ensayos *in vitro* de unión a DNA se encontró que se requería de la presencia de extractos nucleares para interactuar con el ácido nucleico (Nagase et al. 1990). En un estudio posterior, se identificó la interacción de Ski con la proteína Smad4, y se comprobó que es a través de esta última mediante la cual Ski podía interactuar indirectamente con el DNA (Nicol & Stavnezer 1998). La relación de Ski con Smad4 reveló su función como un regulador negativo en la vía de señalización del TGF- β , funcionando en la correpresión transcripcional de algunos de los genes blanco de la vía; pero además, Ski posee otros mecanismos de regulación negativa sobre esta misma vía de señalización. Uno de ellos es la interacción de Ski con las proteínas Smad2/3 activadas cuando éstas se encuentran posicionadas sobre los SBEs de sus genes blanco, impidiendo la transcripción de genes mediante el reclutamiento de otros co-represores como N-CoR y mSin3a que forman un complejo con desacetilasas de histona (HDACs). Otro mecanismo es compitiendo con la asociación de co-activadores transcripcionales como p300 y CBP los cuales funcionan relajando la cromatina a través de su actividad de acetilasas de histonas (Bonnon & Atanasoski 2012).

Sin embargo, las acciones reguladoras de la proteína Ski no solamente se llevan a cabo en el núcleo celular. Reportes previos ya mostraban la presencia de esta proteína en el citoplasma de células transformadas. Esto ocurría en líneas celulares que se encuentran sobreexpresando de forma endógena a Ski; sin embargo, datos de nuestro laboratorio han demostrado la presencia de esta proteína en el citoplasma de células no transformadas como la línea celular C9 de hepatocitos, donde además hemos descrito que su estabilidad es dependiente de la dinámica del citoesqueleto (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación). La co-localización de Ski y las Smads en el compartimento

citoplásmico sugiere que la primera pueda secuestrar a las segundas, impidiendo la señalización intracelular canónica activada por la citocina TGF- β en el modelo de células neoplásicas, aunque su significado en células normales se encuentra en estudio. Lo que ha sido demostrado es que Ski puede interactuar con otras proteínas citoplásmicas como C184M, complejo que es capaz de secuestrar a la proteína Smad2 activada e impedir la translocación nuclear, lo que regula de forma negativa a la vía (Kokura et al. 2003). Finalmente, otro mecanismo de inhibición descrito para esta vía de señalización involucra una interacción directa entre Ski y el receptor T β RI, lo cual genera la formación de complejos R-Smad/Co-Smad que no son funcionales y no pueden translocarse al núcleo, acumulándose en el citoplasma (Ferrand et al. 2010).

Por otra parte, es importante mencionar que en muchas líneas celulares, la estimulación inducida por la citocina TGF- β lleva a la degradación de las proteínas Ski y SnoN a tiempos cortos. En este mecanismo se ha visto involucrada la ligasa de ubiquitina Arkadia, la cual finalmente favorece la señalización mediada por el TGF- β (Nagano et al. 2007).

Las funciones de Ski en la señalización celular no se limitan a la vía del TGF- β . Sus acciones represoras también se han relacionado con vías como la mediada por receptores de ácido retinoico (RAR) y receptores de vitamina D (VDR). Además, de manera contrastante, Ski resulta ser activador en otras vías, ya que parece funcionar como un co-activador para la expresión del gen NFI o de la proteína four-and-a-half LIM domain protein 2 (Bonnon & Atanasoski 2012).

1.2.4 Ski y enfermedades neoplásicas

La elevada expresión de Ski y SnoN en distintas patologías de tipo neoplásico, como carcinoma de células escamosas del esófago, cáncer de mama (con receptor a estrógeno positivo), cáncer de pulmón, esófago, cabeza y cuello, cérvix, así como en ovario y próstata, ha motivado el interés para llevar a cabo estudios profundos sobre la función de estas proteínas. Además, el bloqueo de la expresión SnoN mediante un siRNA específico inhibe el crecimiento de algunas de estas neoplasias, pero aumenta su potencial metastásico, revelando el papel crucial de estas oncoproteínas en proliferación y migración celular (Deheuninck & Luo 2009).

Gran parte de la investigación del papel de Ski en neoplasias se ha realizado en melanoma. Estudios realizados en líneas celulares de esta patología, revelaron una interacción entre Ski y la vía de Wnt/ β -catenina. La unión de Ski con la proteína FHL2 (una proteína con función co-activadora o co-

represora de la vía de señalización de Wnt dependiente del contexto celular) promueve una activación de la vía, así como la expresión de genes involucrados en señales de crecimiento, movilidad e invasividad, que regulan la progresión del melanoma (Chen et al. 2003). Además, se ha demostrado que la regulación negativa de la expresión de Ski se relaciona con una disminución de la proliferación de líneas celulares de esta patología, así como en el tamaño de los tumores que producen (Levati et al. 2011).

También en otro tipo de neoplasias se ha descrito la importancia de regular de forma negativa la expresión de Ski, en este caso mediado por el miRNA29a. Este miRNA se encuentra ausente en algunos pacientes con leucemia mieloide aguda del fenotipo -7/del7q. Cuando se expresa en altas cantidades la proteína Ski por falta de regulación negativa por parte del miRNA29a, la proteína interrumpe el proceso de diferenciación normal de las células mieloides inducida por el ácido retinoico, lo que culmina en alteraciones que llevan al cáncer (Teichler et al. 2011).

En un estudio reciente se ha encontrado que otro mecanismo por el cual la proteína Ski promueve la proliferación de células tumorales podría ser la inducción de la degradación del supresor tumoral p53 mediante una interacción directa entre Ski y la ligasa de sumo Ubc9. Esta interacción lleva a la sumoilación y estabilización de MDM2, una ligasa de ubiquitina E3, la cual marca directamente a la proteína p53 para su degradación vía el proteosoma (Ding et al. 2012).

1.2.5 *Ski, metabolismo y ciclo celular.*

Además de su papel como co-activador o co-represor de distintas vías de señalización, el papel de Ski en el metabolismo es un nuevo campo de investigación. Desde los años 50's fue descrito el efecto Warburg en las líneas celulares derivadas de cáncer, el cual proponía a la glucólisis como la principal fuente de ATP debido a un daño mitocondrial; sin embargo, recientemente se ha reportado que existe un gran número de tumores en los que a pesar de tener un incremento en la actividad glucolítica, es la fosforilación oxidativa la principal fuente de energía (Rodríguez-Enríquez et al. 2011). En modelos *in vitro* de células transformadas se ha encontrado que el metabolismo aerobio podría jugar un papel sumamente importante en el proceso de proliferación celular, para lo que se requiere un incremento en la cantidad de mitocondrias así como en la actividad de las mismas. Además, se logra obtener aún mayor cantidad de energía aumentando el catabolismo de ácidos grasos, y esto puede ser mediado por el receptor de proliferación activado por peroxisoma (PPAR γ). En este caso, parece ser que la proteína

Ski funciona promoviendo la actividad de este receptor/factor de transcripción. De forma complementaria se ha observado que también Ski parece ser un gen blanco del PPAR γ en fibroblastos celulares. Esto podría dar una explicación más a la alta expresión de esta proteína en distintos tipos de tumores, así como en procesos de reparación de heridas (Ye et al. 2011; Li et al. 2012).

También se ha encontrado que la proteína Ski está implicada directamente en la regulación del ciclo celular. En un estudio realizado por el grupo del Dr. Michael Hayman, se reportó la importancia de la fosforilación de la proteína Ski mediada por el complejo cdc2/ciclina B como estabilizadora de la proteína durante el proceso de mitosis. Además, se le encontró localizada directamente en los

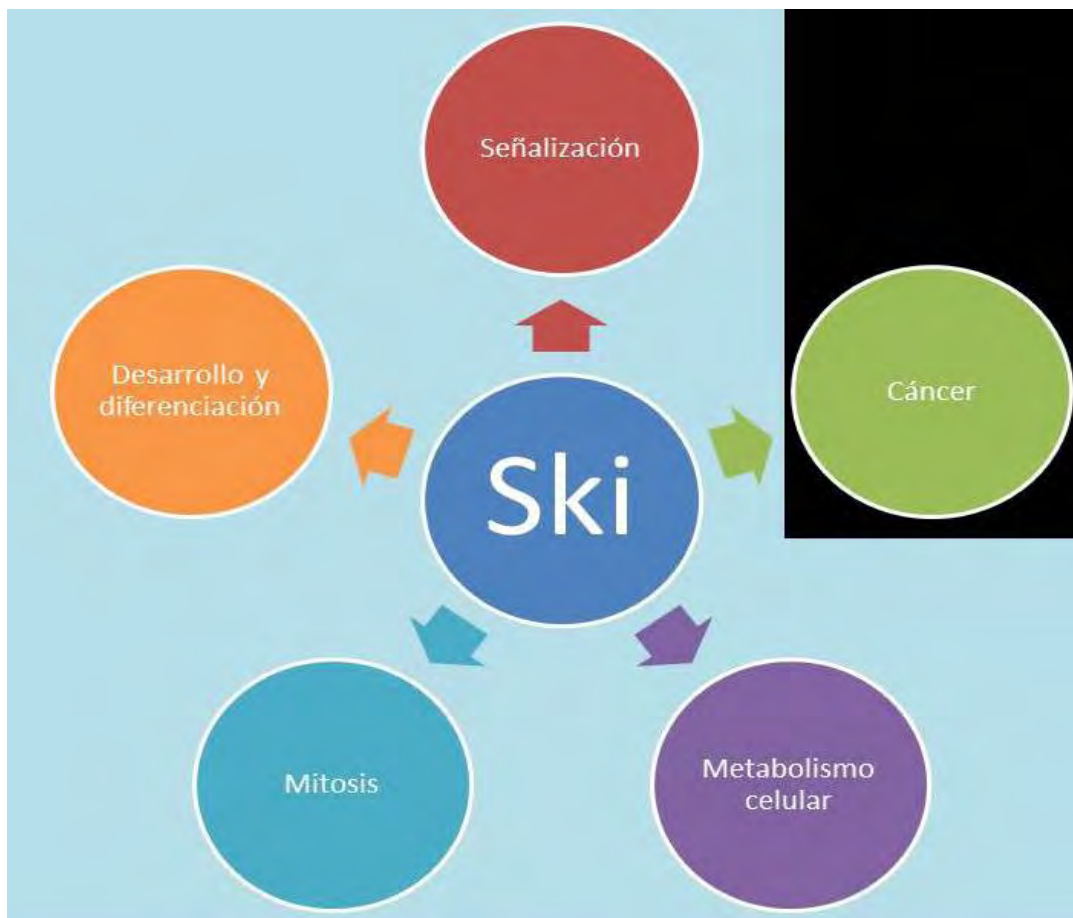


Figura 4: Ski cumple funciones fisiológicas importantes. La proteína Ski juega un papel importante regulando procesos del desarrollo embrionario y diferenciación celular, e incluso está relacionada con la progresión normal de la mitosis. Así mismo, es un regulador negativo de vías de señalización como son la del TGF- β o las mediadas por receptores nucleares; sin embargo, en procesos neoplásicos se observa una alteración en la regulación de los niveles proteicos de Ski, por lo que se le relaciona con la patogénesis de estas enfermedades.

centrosomas así como en el huso acromático mediante ensayos de inmunofluorescencia, lo que sugiere una función central durante la división celular (Marcelain & Hayman 2005). Siguiendo esta misma línea, el mismo grupo ha demostrado que en células embrionarias de ratón en proliferación con un fenotipo Ski *-/-*, se observan fenómenos de inestabilidad cromosómica, con la presencia de rezago y formación de puentes cromosómicos durante la anafase de la mitosis, traducándose esto en aneuploidía; sin embargo, cuando se recupera la expresión de esta proteína, aumenta la muerte celular de la población con alteraciones cromosómicas (Marcelain et al. 2012).

1.3 Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas son la adición de grupos químicos o péptidos mediante enlaces covalentes generados a través de reacciones químicas que ocurren en la proteína original después de su traducción en los ribosomas. Estas modificaciones le confieren cambios a las propiedades originales de las proteínas como son en su actividad, localización, recambio o en la interacción con otras proteínas a través de cambios en su estructura tridimensional (Liu & Li 2011). Existe una gran variedad de modificaciones posibles, como la adición de proteínas pequeñas (ubiquitinación y sumoilación), fosforilaciones, acetilaciones y palmitoilaciones, entre otras.

1.3.1 Ubiquitinación

La ubiquitina es un péptido de 76 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 8 kDa. Este péptido es capaz de unirse de manera covalente a residuos de lisina. El enlace se realiza entre el ácido carboxílico de una glicina terminal del péptido con la amina ϵ de la lisina a modificar. Este tipo de modificaciones se llevan a cabo mediante la presencia de enzimas que favorecen la generación de los enlaces covalentes. Estas enzimas se clasifican en 3 grupos dependiendo de su función: E1 (activadoras de la ubiquitina), E2 (enzimas conjugadoras) y E3 (ligasas de ubiquitina). En conjunto, estas enzimas forman el sistema de ubiquitinación, y es mediante la especificidad de las enzimas tipo E2 y E3 que se lleva a cabo la selección precisa de las proteínas sustrato en las que se llevará a cabo la modificación (Haglund & Dikic 2005).

Clásicamente se ha descrito que la adición de moléculas de ubiquitina a residuos de lisina en las proteínas, es una marca para su degradación vía el proteosoma; sin embargo, la sola presencia de una molécula de ubiquitina no parece ser suficiente para el marcaje de degradación. Se requiere de la poliubiquitinación, en donde péptidos de ubiquitina se unen sucesivamente entre ellos a través de sus lisinas 46. Ahora se sabe que cadenas de ubiquitina unidas a proteínas mediante enlaces a través de las lisinas 63 del péptido se relacionan con reparación del daño al DNA, señalización intracelular y tráfico intracelular o biogénesis ribosomal. Incluso, ubiquitinaciones con uniones entre la lisina 46 parecen estar relacionadas con procesos no degradativos (Ikeda & Dikic 2008).

El proceso de ubiquitinación como mediador de degradación de las proteínas reguladoras Ski y SnoN ha sido estudiado. Para el caso de la proteína SnoN, las lisinas involucradas en unión a ubiquitina ya se han caracterizado (lisinas 440, 446 y 449) (Stroschein et al. 2001); sin embargo, cuando se realiza un análisis comparativo entre las secuencias de aminoácidos de SnoN y Ski, los residuos 440 y 446 no se encuentran conservados. En el caso de Ski, se desconoce el sitio exacto donde se pueda llevar a cabo la poliubiquitinación.

1.3.2 Fosforilación

La fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales más importantes y más versátiles de la biología celular. Generalmente, se encuentra como una mediadora de transducción de señales intracelulares, donde la fosforilación del grupo hidroxilo de residuos de serina, treonina o tirosina modifica a las proteínas regulando su actividad intracelular. La importancia de esta modificación radica en la generación de sitios de acoplamiento que permite la interacción entre dos proteínas. Así mismo, existen repercusiones en la estabilidad de los péptidos debido a fosforilación (Deribe et al. 2010).

La unión de grupos fosfato a las proteínas se encuentra regulada por la actividad de las proteínas cinasas que son las encargadas de unir los grupos fosfatos derivados de la molécula de ATP. De manera antagónica, las proteínas fosfatasas que se encargan de remover estos grupos ya unidos a las proteínas. Una gran cantidad de las enzimas celulares son cinasas o fosfatasas. Esto refleja la importancia de la presencia de estas actividades enzimáticas en la célula.

En el caso de la proteína Ski, se han descrito hasta el momento dos sitios de fosforilación. El primero de ellos fue la treonina 458, en donde la vía de señalización PI3K/Akt, activada por diversos factores de crecimiento, es la responsable de llevar a cabo esta modificación. Esto lleva a la

degradación de la proteína y permite la activación del gen de Smad7, otro regulador negativo de la vía del TGF- β (Band et al. 2009). El segundo sitio es la serina 515. En este caso, aún no se ha dilucidado ni la cinasa implicada, ni el efecto que tiene esta fosforilación sobre la proteína (Nagata et al. 2010).

Otros reportes se han encargado de mostrar la interacción de Ski con diversas cinasas. Como hemos mencionado, un estudio previo demostró la co-localización de Ski en los centrosomas celulares durante el proceso de mitosis. Además, un grupo demostró que durante este proceso, la proteína Ski co-inmunoprecipita con la cinasa Aurora A (Mosquera et al. 2011). Esta información nos ayuda a entender la importancia de Ski en la división celular, lo cual queda claro al observar las aberraciones que ocurren cuando se inhibe la expresión de Ski durante este proceso.

1.3.3 Sumoilación

La sumoilación es otra modificación postraduccional, la cual es la incorporación de proteínas pequeñas modificadoras similares a ubiquitina (SUMO), las cuales se unen a través de su extremo carboxilo con el grupo amino ϵ de residuos de lisina, de igual manera que lo hace la ubiquitina.

La vía de sumoilación es muy similar a la de ubiquitinación; sin embargo, a diferencia de esta última, existe solo una enzima E2 (Ubc9) y pocas ligasas de sumo E3. Lo anterior hace surgir la pregunta sobre cómo se confiere la especificidad de las enzimas por cierto sustrato. Actualmente se conocen secuencias consenso para la unión de SUMO a proteínas siendo la principal la secuencia ψ KX(D/E) en donde ψ representa un aminoácido altamente hidrofóbico. La sumoilación también parece ser un mecanismo que regula interacciones proteína-proteína, localización intracelular y cambios en las actividades de las proteínas intracelulares (Gareau & Lima 2010).

1.3.4 Otras modificaciones postraduccionales

La lista de modificaciones postraduccionales que regulan las funciones proteicas es muy amplia. Recientemente, se han descrito más modificaciones mediadas por la unión covalente de moléculas pequeñas parecidas a la ubiquitina, dentro de las que destacan, además del grupo sumo ya mencionado, NEDD8, ATG8, ATG12, ISG15, Urm1, Ufm1 y FAT10. Todas estas moléculas requieren de un proceso similar a la ubiquitinación o sumoilación para incorporarse a sus proteínas blanco; sin embargo, las consecuencias de este proceso es variable (Zuo et al. 2013).

Además, otras modificaciones implican la unión de ácidos grasos directamente sobre la cadena proteica como es el caso de la palmitoilación. En esta modificación, se une una cadena de ácido palmítico a residuos de cisteína (aunque en raras ocasiones se hace en residuos de serina o treonina) a través de una palmitoil-tiol-transferasa. Esto genera un cambio en la hidrofobicidad de las moléculas de manera que pueden asociarse a membranas celulares o a otros compartimentos hidrofóbicos (Aicart-Ramos et al. 2011). De igual forma, la glicosilación puede conferir a la molécula nuevas propiedades a las proteínas, modificando su tránsito intracelular y localizándolas en diversos compartimentos.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Antecedentes

Cuando se identifica a la proteína Ski mediante la técnica de WB en distintos tipos celulares, se observan varias bandas de peso molecular que oscilan entre los 80 y 115 kDa. Esto llevó a sugerir la presencia de distintas isoformas de la proteína generadas por “splicing” alternativo. Aunque estudios previos han demostrado la presencia de por lo menos dos mRNAs para esta proteína en diversas especies animales, se ha encontrado que el “splicing” alternativo no ocurre dentro de la región codificante de su mensajero, de forma que en ambos mRNA esta región permanece intacta y codifican para la misma proteína de aproximadamente 80 kDa (Li et al. 1986; Lyons et al. 1994).

Además, en diversos ensayos que se han realizado en el laboratorio así como en diversas publicaciones, se observa que el comportamiento de las bandas que se encuentran por arriba de los 80 kDa no siempre es igual a lo que le sucede a la forma de 80 kDa. En nuestro laboratorio hemos observado que inhibiendo el tráfico intracelular y modificando el citoesqueleto se puede lograr enriquecer de forma diferencial las distintas isoformas (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación).

Finalmente, al usar anticuerpos monoclonales diseñados contra el componente transformante de la proteína Ski (v-ski, el cual empalma con los residuos 28 al 441 con un 44% de identidad) o el extremo carboxilo terminal (residuos 400-728) se pueden identificar todas las isoformas de la proteína Ski que oscilan entre los 80 y 115 kDa.

Con todo lo anterior, se sugiere la posibilidad de que sean modificaciones postraduccionales las que den origen a estas variaciones en los pesos moleculares que se observan para Ski. Aunque se han identificado ya algunos sitios de fosforilación para esta oncoproteína (Nagata et al. 2010), poco se sabe sobre la función de esta y otras modificaciones como la ubiquitinación (monoubiquitinación o multiubiquitinación) o sumoilación.

Al ser Ski un cofactor transcripcional involucrado en diversas vías de señalización, así como por estar relacionada con diversos procesos celulares fisiológicos y patológicos, resulta importante conocer aquellas modificaciones postraduccionales que podrían regular su estabilidad.

Además, la búsqueda de modificaciones postraduccionales puede ayudar a comprender mejor las

funciones de esta proteína en distintos contextos celulares. Incluso, este tipo de proyectos nos pueden ayudar a encontrar nuevos blancos terapéuticos para patologías donde se busca regular la estabilidad de Ski.

2.2 Hipótesis

Las variaciones observadas en el peso molecular de la proteína Ski endógena son debidas a modificaciones postraduccionales que tienen repercusión en su estabilidad.

2.3 Objetivos

Objetivo general:

Identificar las modificaciones postraduccionales en la oncoproteína Ski, y relacionar la presencia de éstas con la la estabilidad de la proteína.

Objetivos específicos:

1. Realizar el análisis *in silico* del gen de Ski, mapeando intrones y exones para buscar sitios potenciales de “splicing” alternativo.
2. Clonar el gen de Ski y probar de forma experimental la presencia de “splicing” alternativo.
3. Identificar sitios potenciales de ubiquitinación, fosforilación y sumoilación en la oncoproteína Ski de humano y de ratón mediante programas de predicción *in silico*.
4. Probar la presencia de modificaciones postraduccionales en la oncoproteína Ski de humano y ratón de manera experimental.
5. Relacionar las modificaciones postraduccionales encontradas con su repercusión en la estabilidad de la oncoproteína Ski.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Predicción de modificaciones postraduccionales

Se emplearon plataformas de predicción disponibles como “freeware” en Internet, creadas por “The Cuckoo Workgroup” para realizar la predicción *in silico* de los sitios potenciales de modificación.

Para la detección de sitios de ubiquitinación se usó la plataforma BDM-PUB 1.0, la cual emplea un método de discriminación bayesiano para detectar residuos de lisina con el potencial de ser ubiquitinados. Este programa emplea una base de datos de por lo menos 279 determinaciones experimentales de sitios de ubiquitinación en 162 proteínas distintas (Li, et al., 2013 submitted) Para fines comparativos, se usó una segunda plataforma, el programa UbPred el cual emplea una combinación de árboles predictivos con base en 266 experimentos no redundantes donde se determinaron sitios de ubiquitinación para distintas proteínas (Radivojac et al. 2010).

Para predicción de sitios de fosforilación se emplearon dos programas. El primero de ellos es el programa NetPhos 2.0, el cual realiza predicciones de sitios potenciales de fosforilación usando un método de redes neurales (Blom et al. 1999). El segundo es el programa “Group-based prediction system 2.1”. Este programa emplea valores falsos positivos para establecer el umbral de predicción. Este programa ha sido validado mediante análisis de predicción de sitios de fosforilación en proteínas de mamífero (Xue et al. 2008).

Para la predicción de sitios potenciales de sumoilación, se usó el programa SUMOsp 2.0. Este programa se creó analizando secuencias sumoiladas de un alto número de proteínas y estableciendo un algoritmo de predicción basados en la secuencia consenso donde ocurre esta modificación, y algunas variantes (Ren et al. 2009).

3.2 Cultivos celulares y reactivos

Se emplearon las línea celular AD293 (células epiteliales de riñón embrionario humano, las cuales son derivadas de la línea celular HEK293, modificadas para incrementar su adherencia a la caja de cultivo), así como la línea A7 (melanoma de humano con una transfección del gen de filamina-1), C9 (hepatocitos no transformados de rata) y la línea celular C9 (hepatocitos inmortalizados de rata) (Tabla 1). Se mantuvieron en incubadoras a 37°C, con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y en

Nombre de la línea celular	Tipo de línea celular	Características	Localización de Ski
AD293	Inmortalizada, no transformada	Línea humana derivada de las HEK293, con adherencia aumentada.	Predominantemente nuclear
C9	Inmortalizada, no transformada	Línea de hepatocitos de rata.	Nuclear y citoplásmico
A7	Inmortalizada, transformada	Línea de melanoma humano con filamina-1.	No caracterizado

Tabla 1: Líneas celulares empleadas durante el proyecto. Se menciona el tipo de línea celular y las características de cada una. Además, se menciona la localización intracelular de Ski de acuerdo a datos de nuestro laboratorio.

medio de cultivo DMEM (Gibco) o DMEM sin fosfatos (Sigma) según se indique + 10% de Suero Fetal Bovino + Penicilina (100U/ml)/Estreptomicina (100 µg/ml), con recambio de medio cada tercer día.

Los reactivos empleados fueron TGFβ1 (PreproTech), N-etilmaleimida (Sigma), MG132 (Tocris), Anisomicina (Sigma) y PhosTag (Wako).

3.3 Anticuerpos

Para los inmunoensayos se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de conejo α-Ski (H329), anticuerpo monoclonal de ratón α-Ski (G8), anticuerpo policlonal de conejo α-SnoN (H317), anticuerpo monoclonal de ratón α-ubiquitin (P4D1) y anticuerpo policlonal de conejo α-HA (Y-11) todos de Santa Cruz Biotech, así como los anticuerpos monoclonal de ratón α-Flag (F1804 M2) de Sigma y monoclonal de ratón α-HA (12CA5) de Roche.

3.4 Plásmidos y transfecciones transitorias

Para las transfecciones transitorias se usaron plásmidos que contienen la versión completa de Ski o fragmentos de distinto tamaño donados por el Dr. Azzadine Atfi (Ski completo, residuos 1-490, 491-728, 338-728), los cuales se expresan como proteína marcadas con el epítotope Flag en su extremo amino.

Las transfecciones se realizaron usando el reactivo Lipofectamine 2000® (Invitrogen) mediante el siguiente protocolo: se sembraron las células a una confluencia del 60% en cajas de 10 cm de diámetro. Se prepararon 500 µl de medio Opti-MEM (Gibco) con 10 µl de Lipofectamine 2000® y otros 500 µl de Opti-MEM con 4 µg de DNA total (plásmido a transfectar + DNA de carga) agitando e incubando 10 min a temperatura ambiente (T.A.). Posteriormente se mezclaron los tubos y se incubaron 25 min a T.A. El preparado se transfirió a la caja de cultivo celular en 3 ml de DMEM fresco y se incubó por 3 h. Transcurrido ese tiempo se agregaron 4 ml de DMEM fresco y se incubó toda la noche bajo las mismas condiciones. De acuerdo al crecimiento de las células, los análisis se realizaron a las 48 o 72 h posttransfección.

3.5 Inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB).

Se realizó la técnica como se ha descrito previamente (Macías-Silva et al. 1998) Los extractos celulares totales se obtuvieron raspando las cajas de cultivo con la solución de lisis RIPA fría complementada con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados se incubaron por 30 min a 4°C en agitación y se centrifugaron a 13,200 rpm por 5 min a la misma temperatura. Se realizó la cuantificación de proteínas en los sobrenadantes por el método de Bradford. Para la IP, se incubaron los extractos celulares con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C en agitación. Se añadieron 70 µl de proteína G-sefarosa (diluida 1:5) a 4°C y se incubó por otras 2 h. Las perlas se recolectaron por centrifugación a 13,200 rpm durante 10 seg a T.A. Se realizaron 3 lavados de las perlas de sefarosa con la solución de lisis empleada y se adicionaron 30 µl de buffer de carga Laemmli 2X. Las muestras se hirvieron 5 min a 100°C y se cargaron en gel.

Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6-7.5% según se indique. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF con buffer de transferencia. Las membranas de PVDF se bloquearon con TBST + leche en polvo al 5% por 1 h a T.A. Las incubaciones con anticuerpos primarios se hicieron toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados de la membrana con

TBST y se incubaron con anticuerpo secundario unido a HRP (de las siglas en inglés para peroxidasa de rábano) por 1 h a T.A. Las membranas se lavaron 3 veces con TBST y los revelados se hicieron usando un kit de quimioluminiscencia de Millipore o de Pierce.

3.6 Detección de fosforilación

Para la detección de la fosforilación de Ski se usó marcaje metabólico con [³²P]Pi (PerkinElmer Life Sciences) como se ha descrito previamente (Macías-Silva et al. 1998). Brevemente, las células se cultivaron en cajas de 6 pozos, se lavaron con medio libre en fosfatos en 2 ocasiones y se incubaron en este medio por 2 h. Se retiró el medio y se colocó 1 ml por pozo de medio sin fosfato con 100 µCi/ml [³²P]Pi por 3 h a 37°C. Los estímulos se proporcionaron en la etapa final de la incubación y se realizaron los IPs.

Se empleó el reactivo *PhosTag*TM (Wako) para detección de proteínas fosforiladas. Esta molécula es un alcóxido con un núcleo coordinado con un catión divalente (Mn²⁺, Zn²⁺) el cual puede interaccionar con un grupo fosfato unido a una proteína, generando un cambio en la movilidad de las bandas de la proteína blanco en geles de poli(acrilamida). Brevemente, se prepararon geles de acrilamida al 6% agregando MnCl₂ a una concentración final de 0.1 mM y el reactivo *PhosTag* a 20 µM, empleando el resto de los buffers para la preparación de los geles de forma normal.

4 RESULTADOS

4.1 Análisis *in silico* del gen de Ski

4.1.1 *La proteína Ski está codificada por 2 mRNA que generan la misma proteína.*

Para analizar la información existente hasta el momento sobre el gen de Ski, se realizó una búsqueda directa en la base de datos GenBank usando el número de acceso NG_013084.1 que corresponde a la secuencia de genómica del locus de Ski en el humano. De esta forma, podemos corroborar que en el humano, el locus del gen se encuentra ubicado en el cromosoma 1 región p36.3. La longitud completa del gen que contiene la secuencia de Ski es de 81,519 pares de bases. La ubicación precisa a nivel nucleotídico dentro del cromosoma 1 es entre las bases 2,160,134 y 2,241,652 en la cadena positiva del DNA.

Una vez obtenida esta información, se buscaron los mensajeros descritos hasta el momento que codifican para esta proteína. De esta forma, queríamos descartar la existencia de isoformas de Ski generadas por “splicing” alternativo. Al usar la misma base de datos GenBank, encontramos que existen 2 RNA mensajeros reportados para la proteína Ski en el humano. El primero de ellos es un mRNA de 5,707 pb con número de acceso NM_003036.3. El segundo tiene 3,511 pb con número de acceso X15218.1. Cuando realizamos el alineamiento global de ambas secuencias empleando la herramienta de EMBOSS Needle Pairwise sequence alignment encontramos que ambas se alinean con una identidad del 100% desde el primer par de bases hasta la 3,511. La diferencia radica en que el mRNA más largo tiene 2,196 pb extra en su extremo 3'. Cuando comparamos la región codificante de ambos mRNA, vemos que el alineamiento tiene una identidad del 100%, por lo que la diferencia en pares de bases ocurre en la región no traducida 3' (3' UTR).

Ambos mensajeros están transcritos a partir de 7 exones del gen de Ski, donde la variación observada en el extremo 3' UTR es debida a una variante en el tamaño del exón 7. Gracias a este análisis, generamos la **figura 5** donde podemos analizar la localización de los exones e intrones del gen sobre el DNA genómico. Así mismo, se muestran regiones del genoma que presentan marcas de acetilación en la histona 3 lisina 27, las cuales suelen ser sitios de alta regulación transcripcional.

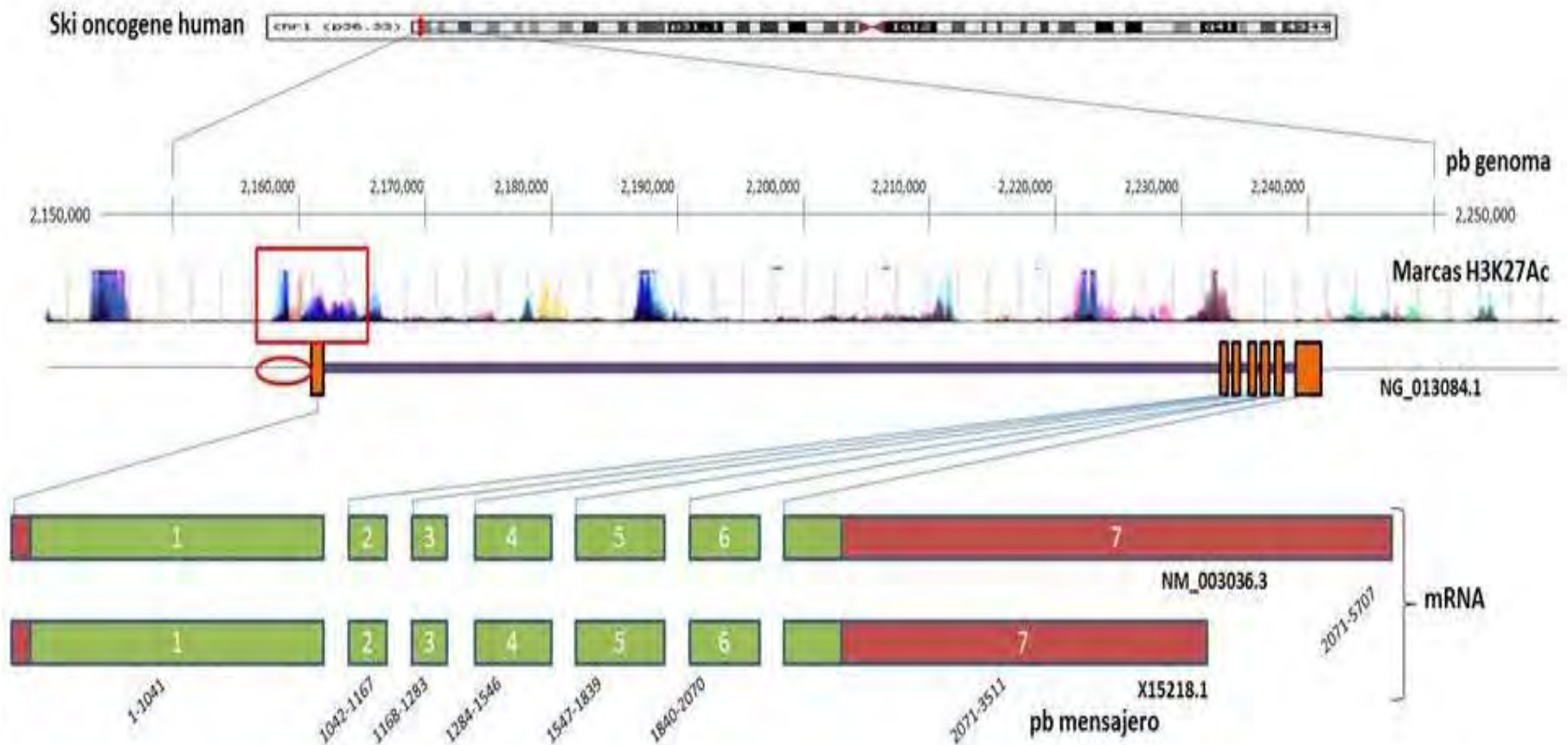


Figura 5: El gen de Ski tiene 7 exones en el humano. El gen de Ski se encuentra ubicado en el cromosoma 1 región p36.3, y la secuencia del DNA genómico de este locus es accesible en el GenBank con la clave NG_013084.1. Hasta el momento se conocen 2 mensajeros (Números de acceso NM_003036.3 y X15218.1) cuya longitud varía por el tamaño del exón 7 que codifica una región del 3' UTR (en rojo regiones UTR, en verde regiones codificantes). Se muestran las marcas de acetilación en la lisina 27 de histona 3 como reguladoras de expresión. En rojo se enmarca zonas que podrían estar relacionadas con el promotor de Ski.

4.1.2 *Existen secuencias marcadoras de expresión (ESTs) que empalman con la secuencia de Ski*

También revisamos la información contenida en la base de datos UCSC Genome Browser revisando el genoma del humano, para buscar la información contenida con respecto a los mRNA de Ski. Cuando revisamos las secuencias de mRNA de Ski que aparecen en esta base de datos, encontramos que corresponden a las previamente mencionadas indicando nuevamente que hasta este momento no se ha demostrado la presencia de mensajeros generados por “splicing” alternativo.

También decidimos buscar la información referente a los ESTs. Estos marcadores de expresión son secuencias pequeñas de entre 200 a 800 pb, provenientes del extremo 5’ o 3’ de librerías de cDNA. El empleo de estas secuencias fue, en sus inicios, para descubrir nuevos genes humanos, pero actualmente sirve para muchas más funciones relacionadas con la transcriptómica como la complementación de datos existentes respecto al genoma e incluso detectar mensajeros generados por “splicing” alternativo (Nagaraj et al. 2007). El objetivo de esta búsqueda fue encontrar la expresión de regiones que se creían no traducidas dentro de la secuencia genómica de Ski.

A través del UCSC Genome Browser, buscamos las secuencias EST que empalmaran con el gen de Ski, y que además fueran secuencias que tuvieran “splicing” dentro de ellas de forma que una parte se alineara con alguno de los exones de Ski ya descritos. Con esta estrategia encontramos un gran número de secuencias que empalman con los exones de Ski; sin embargo, llaman la atención tres ESTs. Las primeras dos (números de acceso AA044862 y AA013281) provienen de la librería de cDNA LIBEST_000302 Soares retina N2b4HR la cual se generó con la retina de un varón de 55 años de edad. Es importante mencionar que estas secuencias son de alta calidad y la base de datos generada ya no contiene artefactos que pudieran sesgar el análisis (Meyer et al. 2013). Ambos ESTs empalman en su extremo 3’ perfectamente con las secuencias del exón 2; sin embargo, en su extremo 5’ parece que las secuencias sufrieron un “splicing” que genera una marca de expresión de una región que para el gen de Ski estaba descrita como un primer gran intrón. El porcentaje de identidad entre la secuencia AA044862 y el gen de Ski es de 98.6%, mientras que la secuencia AA013281 empalma en un 99.3%, aunque es más pequeña que la primera. Lo anterior sugiere que existen mensajeros maduros que contienen secuencias descritas como intrones del gen de Ski que sí se están expresando.

La tercera secuencia EST de importancia corresponde a un marcador de expresión obtenido de la librería LIBEST_021096 Human cultured dermal papilla cell cDNA library(B) proveniente de una línea celular de papila dérmica. El número de acceso es ES307618, y en este caso el alineamiento de la

secuencia con el gen de Ski permite ver que su extremo 3' lo hace con el exón número 2 como en las secuencias anteriores. De igual manera, esta secuencia parece tener un “splicing” dentro de ella, de tal forma que el extremo 5' empalma con una región del gen de Ski, río arriba de la zona donde ocurría el empalme con los otros dos ESTs mencionados previamente. Nuevamente, esto sugiere la existencia de mensajeros que expresan intrones del gen de Ski en su versión madura.

Estos datos llaman la atención, pues hasta el momento no han sido descritos mRNA's para el gen de Ski que tengan las secuencias que de acuerdo a los ESTs revisados podrían estar expresadas y que corresponden a zonas del intrón 1 de este locus genético (**Figura 6**)

También se realizó una predicción de “splicing” alternativo generada por el Instituto de Bioinformática Suizo (Swiss Institute of Bioinformatics) (**Figura 7**). Las gráficas son generadas de acuerdo a un protocolo ideado por Christian Iseli y cols. en el Instituto Ludwig para investigaciones en cáncer y el propio Instituto Suizo de Bioinformática. Las predicciones se realizan alineando las secuencias de RNA y ESTs contenidas en las bases de datos RefSeq y GenBank/EMBL del NCBI con la secuencia del DNA genómico de la región donde se encuentra el gen de interés, y separando los empalmes por los intrones conocidos. De acuerdo a la predicción obtenida, se muestra que podrían existir mensajeros más pequeños que el conocido originalmente para Ski, donde estas nuevas secuencias descritas por los ESTs y empalmadas en el intrón 1 del gen de Ski podrían suplir al exón 1 como inicio de la transcripción. A pesar de esto, de forma experimental aún no se ha demostrado la presencia de mensajeros más pequeños a los ya descritos. Con este análisis concluimos que pueden existir versiones más cortas del mensajero de Ski clásicamente descrito, cuyos niveles de expresión podrían ser muy bajos o ser tejido específicos.

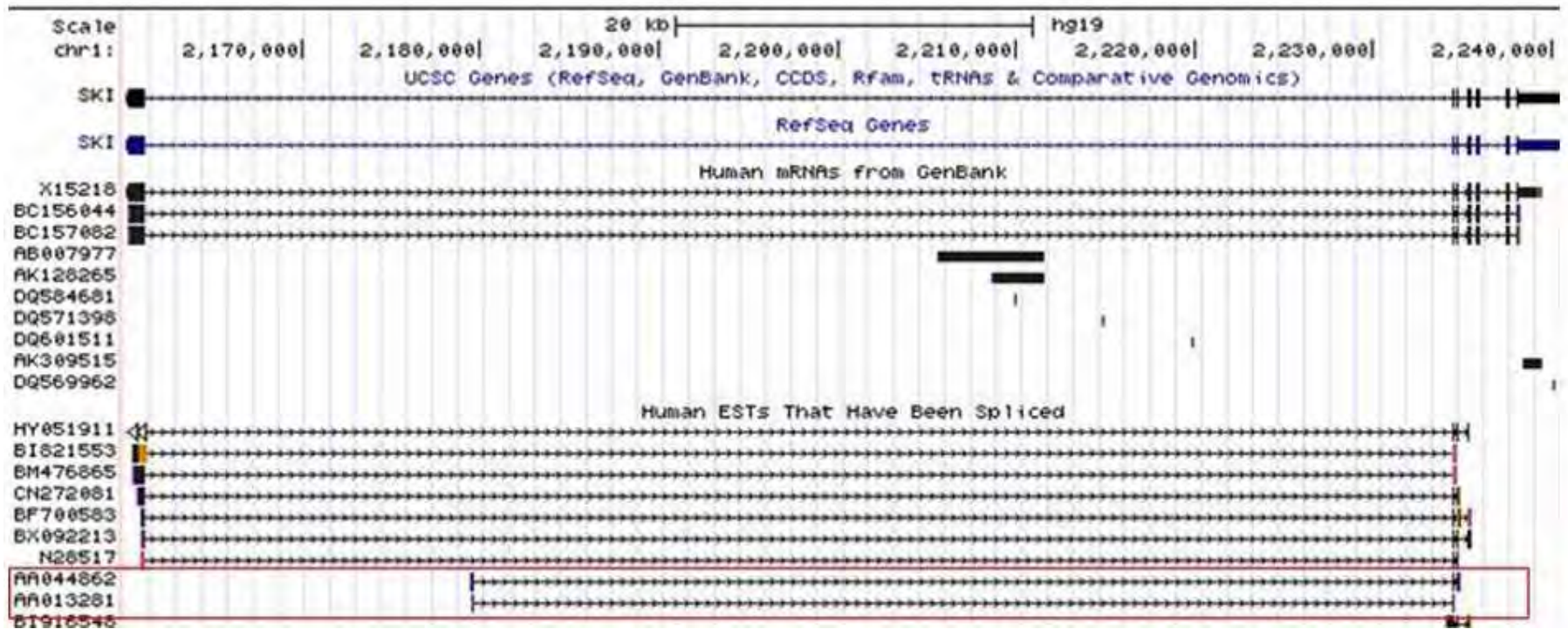


Figura 6: ESTs predicen la existencia de nuevos exones en el gen de Ski. El alineamiento de ESTs (contenidas en la base de datos dbEST) que cuentan con sitios de corte y empalme y cuyas secuencias tienen homología con el DNA genómico de humano en el locus de Ski muestra la expresión de una pequeña región contenida dentro del primer intrón de Ski que pudiera representar nuevas versiones de los mensajeros hasta ahora reportados (marcadas en recuadro rojo). En la parte superior se muestra la localización precisa a nivel de nucleótido en el cromosoma 1. Del lado izquierdo están las claves de acceso para las secuencias representadas. UCSC Genes: Genes reportados en la UCSC Gene database. RefSeq Genes: Genes reportados en el NCBI Reference sequence database. Human mRNAs from GenBank: Mensajeros de la región guardados en el GenBank. Human ESTs That have been spliced: Secuencias EST de la base de datos dbEST que tienen secuencias de “splicing” internas y alinean con los mensajeros conocidos.

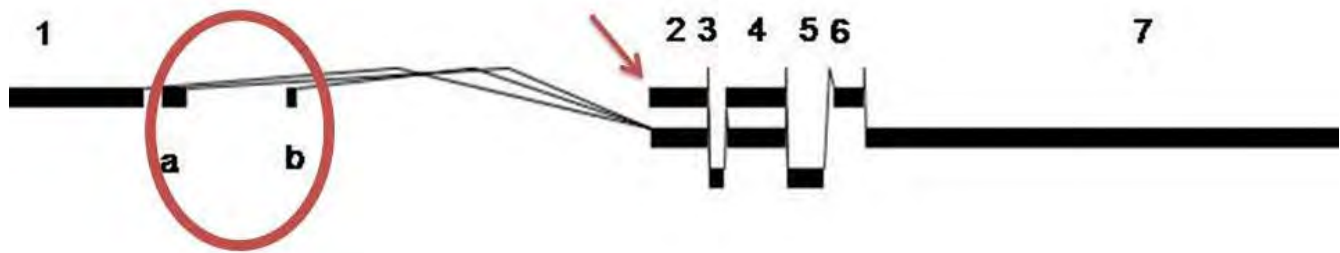


Figura 7: Predicciones de “splicing” alternativo. Gráfica de probables mensajeros resultado de “splicing” alternativo. Cada recuadro negro representa un exón. Las líneas representan intrones. Los números del 1 al 7 identifican los exones hasta el momento reportados para generar el mensajero de Ski. Las letras a y b representan exones sugeridos por las secuencias ESTs que empalman con el gen de Ski (marcados con círculo rojo). También predice un inicio de la traducción el cual carece del exón 1 (flecha roja). Generado por Swiss Institute of Bioinformatics y Ludwig Institute for Cancer Research con información de UCSC Genome Browser.

4.1.3 Clonación del gen de Ski para averiguar si el “splicing” alternativo funciona como generador de las isoformas de distinto peso molecular de la proteína.

En nuestro laboratorio contamos con vectores de expresión que contienen la secuencia de Ski de humano y de ratón, los cuales empleamos para la sobreexpresión de la proteína en diversas líneas celulares. No obstante, dentro de sus características resalta que hasta el momento ningún grupo ha podido generar un vector que sobreexpresara todas las formas de Ski que se observan en los western blots (**Figura 8**). Además, como podemos observar en la **figura 7**, al emplear la citocina TGF- β para inducir la degradación de Ski no podemos observar este efecto. Los vectores de expresión que usamos colocan un epítipo en el extremo amino terminal de la proteína. Esto nos llevó a considerar que eso pudiera

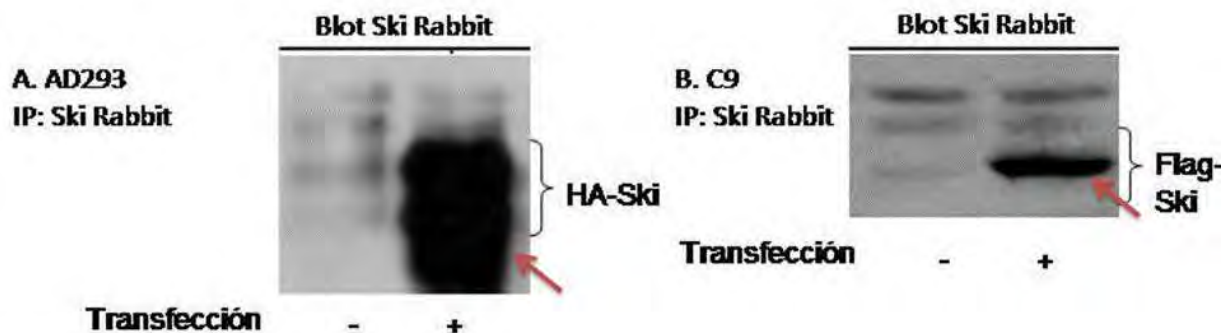


Figura 8: Sobreexpresión de Ski. A. IP de Ski en células AD293 de humano sin (-) y con (+) transfección del cDNA de Ski de ratón marcado con HA. B. IP de Ski en células C9 de rata sin (-) y con (+) transfección del cDNA de humano marcado con Flag. Se marca con flecha roja la sobreexpresión de Ski en el IP. IP: Inmunoprecipitación. Ski Rabbit: Anticuerpo policlonal contra Ski hecho en conejo que reconoce la porción carboxílica de la proteína.

interferir en algún procesamiento postraduccional de Ski que genere las formas de más alto peso molecular. Por lo anterior, decidimos clonar a la proteína, para obtener el cDNA completo de Ski de acuerdo a lo reportado en las bases de datos de secuencias nucleotídicas y además quitar los *tags* del extremo amino de la proteína.

Se realizó el diseño de 2 oligonucleótidos *forward* y 2 *reverse* para la secuencia codificante de Ski de ratón obtenida del GenBank con clave NM_011385.2. Se eligieron 2 plásmidos (pcDNA6 y pEGFP-N1) para realizar la clonación, los cuales agregan un epítipo en el extremo carboxílico de la secuencia. En el apéndice A se muestran las características de los oligonucleótidos diseñados y empleados para las distintas reacciones especificando la enzima empleada para cada reacción. En la **figura 9** se muestra un esquema de localización de los distintos *primers* en la secuencia de Ski.

El primer paso consistió en probar el funcionamiento de los oligos internos para Ski (B +C) usando como templado un cDNA que obtuvimos de la línea celular C2C12 (mioblastos de ratón) mediante la técnica de RT-PCR. En una segunda reacción, usamos como templado un plásmido que contiene la secuencia completa de Ski de ratón donado por el Dr. Harvey Lodish. Como se observa en los carriles carriles 1 y 2 de la **figura 8** panel a, en ambos casos observamos un amplificado de alrededor de 500 pb, lo cual corresponde con lo esperado (~532 pb); sin embargo, en el carril 2 observamos una banda con un tamaño por arriba del esperado, la cual presenta una gran intensidad. Lo anterior nos demostró que ambos oligonucleótidos funcionaron con ambos templados para amplificar el fragmento esperado; sin embargo, la presencia de una banda de un tamaño mayor al usar como templado el plásmido que contenía a la proteína Ski clonada nos llama la atención. Podría sugerir la presencia de una variación en la secuencia de la proteína Ski clonada que contenga nucleótidos insertados en la zona que amplifican nuestros oligos, o pudiera deberse a una contaminación de la reacción.

Luego continuamos a probar los *primers forward* con sitio de restricción BamHI y BglII usando como primer *reverse* el oligo interno Ski2 para amplificar un fragmento de alrededor de 1.6 Kb (A ó A' + C). En la prueba para el oligo con BamHI se empleó el plásmido completo como templado y una enzima Taq polimerasa donada por el Dr. Jorge Ramírez del IFC, mientras que para BglII se empleó el inserto que corresponde al cDNA de Ski de ratón purificado del plásmido con el que contábamos previamente mediante el kit de Axyprep y usando como enzima a la Red Taq. En ambos casos observamos la amplificación del fragmento esperado (**Figura 9, panel b y c**); sin embargo, para clonar

la región carboxílica de la secuencia de Ski no se obtuvieron resultados positivos empleando los oligos diseñados.

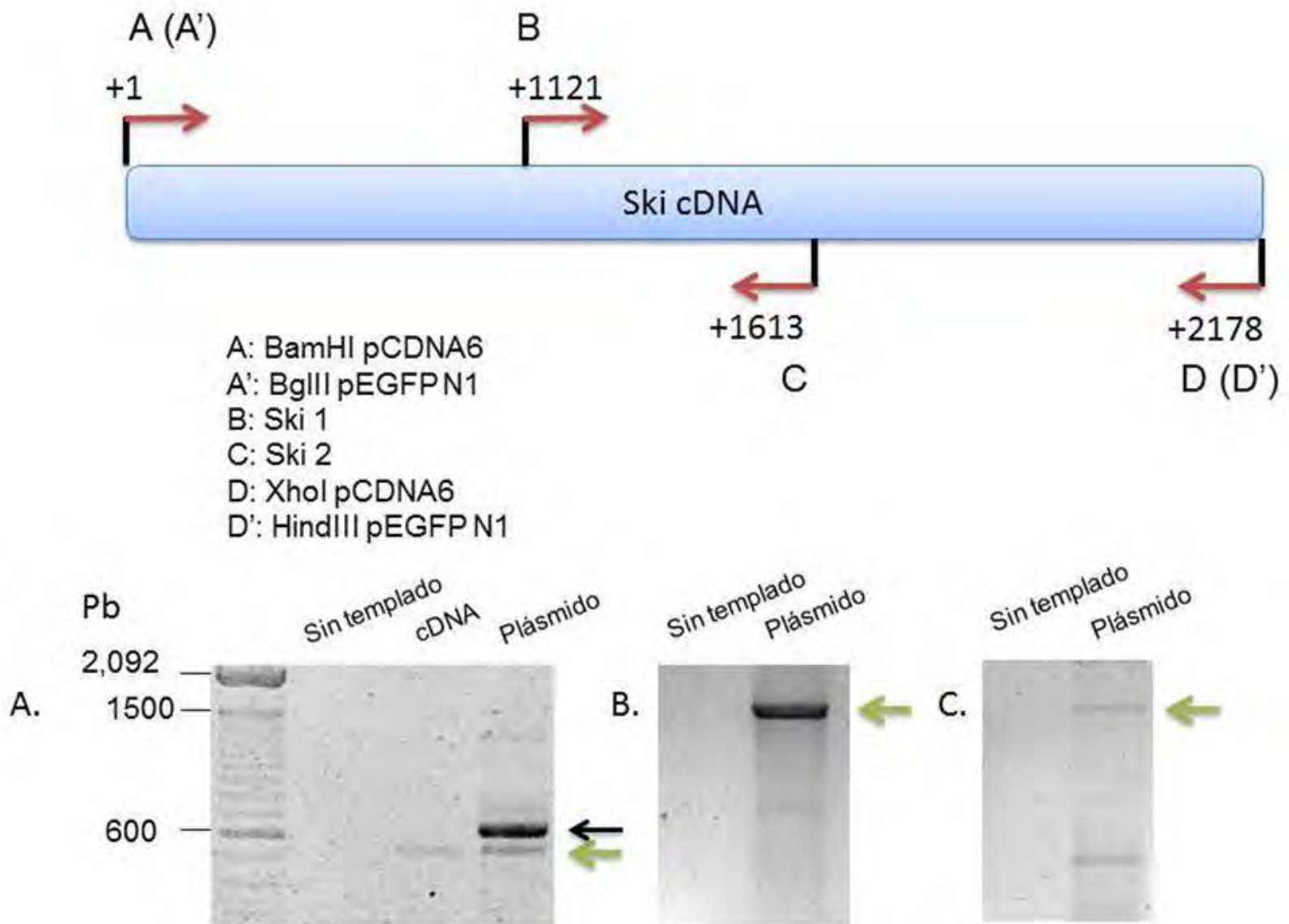


Figura 9: Clonación de Ski. En la parte superior se muestra un esquema de localización de los *primers* diseñados para la clonación de Ski y la nomenclatura para cada uno de ellos mencionando el sitio de restricción que poseen. a. Amplificación de un fragmento de 532 pb usando los oligos B y C. b. Amplificación del extremo amino de la secuencia de Ski empleando los oligos A y C. c. Amplificación del extremo amino de la secuencia de Ski empleando los oligos A' y C. Para la secuencia completa de los plásmidos, revisar el Apéndice A.

Llama la atención que, como hemos mencionado previamente, la sobreexpresión de Ski usando la construcción clonada de ratón genera un enriquecimiento en 2 de las ~3 bandas de la proteína Ski endógena, en comparación con la construcción clonada de humano que solo sobreexpresa 1 de esas bandas, la de menor peso molecular. Para dilucidar en qué parte de la secuencia podrían estar las mayores diferencias que explicarían este patrón de expresión, realizamos el alineamiento de ambas secuencias en su región codificante. Como era de esperarse, las mayores variaciones entre ambas secuencias ocurren en la mitad carboxílica de la proteína, que es la región menos conservada entre las distintas especies. En cambio, en la mitad amino es donde se encuentran las secuencias DHD y SAND que están altamente conservadas entre los miembros de la superfamilia Ski, e incluso entre distintas especies.

Aunque no logramos clonar a la proteína, podemos concluir que el extremo 5' del mensajero de Ski resulta más fácil de amplificar, lo cual se corresponde con la presencia en esa región de dominios conservados entre diversas especies; sin embargo, no sabemos qué características del extremo 3' del mRNA de Ski la hagan más difícil de amplificar. Una posibilidad es que la diferencia entre las Tm's de los oligos que diseñamos para esta región sea crítica para no permitir la amplificación completa del gen. Hemos considerado algunas alternativas para resolver este problema. Una de ellas consiste en generar nuevos oligos para amplificar el mensajero, los cuales también incluyan las regiones 5' y 3' UTR, los cuales tengan una Tm más parecida. La región 5' UTR nos resulta de interés, pues los vectores de expresión con los que contamos en el laboratorio poseen un *tag* en la región amino de la proteína, y podemos suponer que esa bandera genere un impedimento alostérico en la proteína expresada impidiendo su procesamiento normal en esa zona. Además, no sabemos aún hasta qué punto la regulación en las regiones UTR pudieran ser importantes para la síntesis correcta de Ski, y por lo tanto esenciales para la sobreexpresión del patrón completo de nuestra proteína de interés. Incluso hemos considerado estrategias como la amplificación por partes del mensajero y su posterior ligación, o purificar mensajeros con poli (A) para usar secuencias complementarias en esa región como primer *reverse* y permitir obtener el mensajero completo.

4.2 Análisis *in silico* de la presencia de modificaciones postraduccionales en la proteína Ski.

4.2.1 La mayoría de los sitios potenciales de ubiquitinación se encuentran en la mitad carboxilo de la proteína.

Obtuvimos del portal Uniprot Database (<http://www.uniprot.org/>) la secuencia de aminoácidos de la proteína Ski para tres especies de mamíferos: humano, ratón y caballo (números de acceso P12755, Q60698, y Q9TUG2 respectivamente). También se buscó la secuencia para la misma proteína en dos especies filogenéticamente menos cercanas, rana y pollo (números de acceso Q02225 y P49140).

Con la secuencia de aminoácidos, realizamos una búsqueda de los residuos que pudieran ser ubiquitinados usando un análisis *in silico*, empleando el programa BDM-PUB 1.0 disponible en Internet (Li et al, 2013 submitted). Tomando un punto de corte balanceado predefinido por el software, encontramos 36 lisinas como sitios potenciales de ubiquitinación en el caso de Ski humano con resultados similares para la secuencia de la proteína en las otras 4 especies analizadas.

Con la finalidad de seleccionar aquellas lisinas que tuvieran mayor probabilidad de ser ubiquitinadas, realizamos un segundo análisis usando el programa UbPred (Radivojac et al. 2010). El programa muestra los resultados clasificando a las lisinas como de baja, mediana o alta probabilidad de ser ubiquitinadas. En este caso, tomamos en cuenta solo las lisinas marcadas como de mediana y alta probabilidad de ser ubiquitinadas. Posteriormente realizamos un análisis comparativo. Consideramos como los residuos más importantes aquellos que coincidieron entre ambos programas, agregando aquellos que el programa UbPred marcó como de alta probabilidad de ser ubiquitinados. Mediante esta aproximación, 18 lisinas en la secuencia de la proteína Ski de humano fueron seleccionadas como los sitios más probables de ubiquitinación (**Figura 10**).

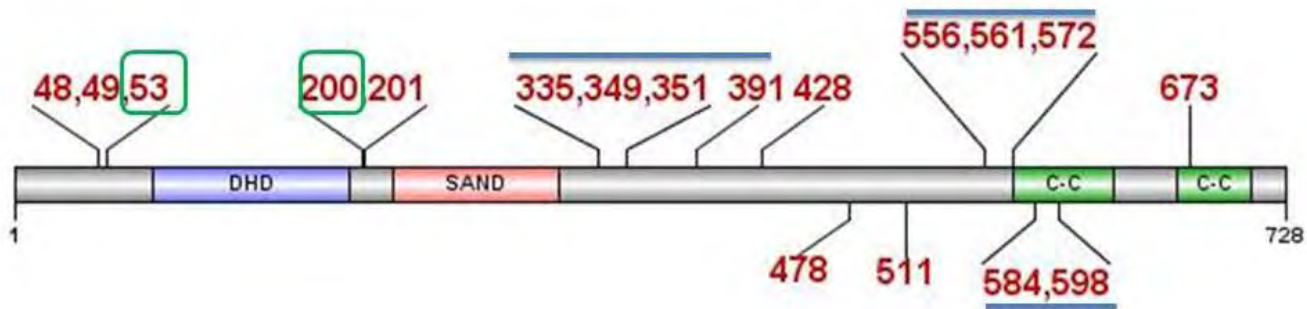


Figura 10: Sitios potenciales de ubiquitinación de la proteína Ski de humano. Se muestran los sitios potenciales de ubiquitinación que obtuvieron un score alto por arriba del umbral seleccionado, marcando el número de la lisina en la estructura primaria de Ski y resaltando en verde las dos lisinas que tienen el score más alto sobre el umbral. Con azul se marcan las lisinas que se encuentran cercanas entre ellas y las hace sitios más probables de ubiquitinación. DHD: Dominio Dachhund; SAND: Dominio SAND; C-C: Coiled-coiled region.

Para analizar los residuos potencialmente ubiquitinables entre las 5 especies analizadas (humano, ratón, caballo, rana y pollo), realizamos un alineamiento de las secuencias de aminoácidos, encontrando una gran conservación entre las lisinas que muestran alta probabilidad de tener esta modificación. Como podemos observar en la **figura 9**, hay zonas de la proteína donde se encuentran residuos de lisina muy cercanos entre ellos que pueden ser ubiquitinados. Esto los hace sitios atractivos de estudio, pues las ubiquitinaciones ocurren en lugares con varios residuos de lisina próximos. Analizando la ubicación de los residuos modificables, ninguno de ellos está dentro de los dominios SAND o DHD de Ski. Esto es importante, pues es en esa zona donde la proteína interacciona con las proteínas Smads de la vía del TGF- β , así como con algunos co-represores transcripcionales.

En un análisis más detallado, observamos que 4 lisinas (K572, 584, 598 y 673) con potencial de ser ubiquitinadas se encuentran dentro del dominio coiled-coil carboxilo terminal y están conservados entre dos especies de mamíferos (ratón y humano) y *Xenopus* sp. Estos sitios se encuentran en la región de interacción de Ski con los remodeladores de la cromatina MeCP2 y HIPK2 así como con el supresor de tumores p53 y con la proteína C184M. Vale la pena mencionar que es también en el extremo carboxilo donde Ski puede formar homodímeros o heterodímeros con su proteína homóloga SnoN por lo que modificaciones en estos residuos podrían funcionar impidiendo la generación de estos complejos (Heyman & Stavnezer 1994). Otras 5 lisinas con potencial de ubiquitinación (K335, 349, 351, 391 y 428) están ubicadas en el sitio mapeado para la interacción de Ski con las proteínas Smad2 y Smad3, así como en el sitio reportado de interacción de Ski con receptor T β RI (Ferrand et al. 2010).

Es importante mencionar que estos análisis no nos permiten diferenciar entre sitios probables de poli-, mono- o multiubiquitinación, recordando que cada una de estas modificaciones ejerce distintas funciones sobre la proteína marcada. Con este análisis, podemos decir que Ski posee sitios potenciales de ubiquitinación distribuidos en toda su estructura primaria, pero con lisinas muy próximas entre ellas ubicadas de la mitad hacia el extremo carboxilo de la proteína.

4.2.2 Secuencias consenso para sumoilación en Ski

La sumoilación es una modificación para la cual se tiene identificada una secuencia consenso en donde se ubica la lisina blanco que reconocen las distintas ligasas E3 de SUMO: $\psi KX(D/E)$. Por lo anterior, analizamos la secuencia de Ski buscando sitios consenso de sumoilación. También realizamos la búsqueda con la ayuda del programa SUMOsp2.0 (Ren et al. 2009) . De esta manera, encontramos que existen por lo menos 3 sitios hacia el extremo carboxilo de la proteína que son potencialmente sumoilables, los cuales se encuentran conservados en las tres especies de mamífero que investigamos (**Figura 11**).

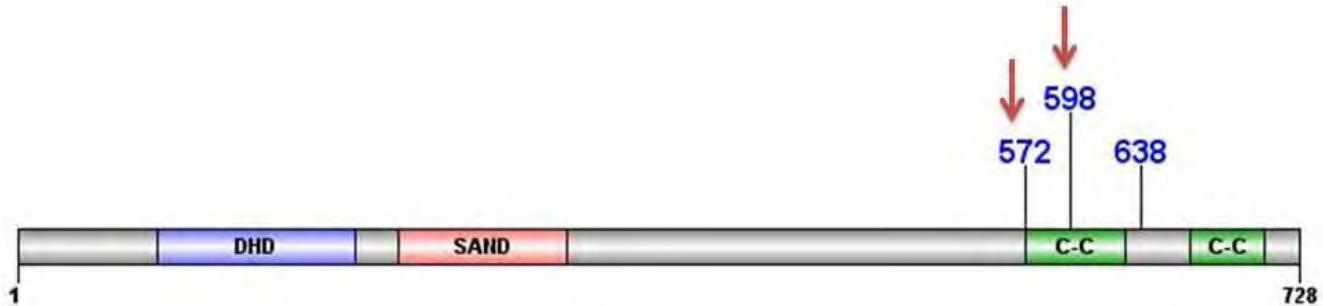


Figura 11: Sitios potenciales de sumoilación. Se muestran los tres sitios potenciales de sumoilación localizados hacia el extremo carboxílico de la proteína. Las secuencias donde se encuentran las lisinas marcadas corresponden a la consenso $\Psi kx(d/e)$. Se marcan las lisinas que también son sitios potenciales de ubiquitinación (flechas rojas). DHD: Domino Dachshund; SAND: Dominio SAND; C-C: Coiled-coiled region

Se sabe que la ubiquitinación, sumoilación y acetilación son modificaciones que pueden ocurrir en la misma lisina y que además son competitivas entre ellas, regulando de forma diferencial la función o estabilidad de una misma proteína (Gareau & Lima, 2010). Lo anterior nos llevó a comparar la información obtenida de sumoilación con la de ubiquitinación, encontrando que las lisinas 572 y 598 de

humano tienen la probabilidad de sufrir ambas modificaciones. Además, es importante resaltar que estas modificaciones están localizadas hacia el extremo carboxilo de la proteína y que, nuevamente, no están localizadas dentro de los dominios DHD y SAND pero sí en los sitios donde hay interacción con los remodeladores de la cromatina HIPK2 y MeCP2 así como la proteína C184M, como ocurre con los sitios potenciales de ubiquitinación. También es importante mencionar que las tres lisinas de la proteína Ski de humano potencialmente sumoilables se encuentran conservadas en *M. musculus* y *Xenopus sp.* (Tabla 2).

Sitios consenso de sumoilación precedidos para la oncoproteína Ski	
Especie	Sitio consenso (# lisina)
Humano	RVK ₅₇₂ QEE
Humano	VAK ₅₉₈ KEK
Humano	RLK ₆₃₈ REL
Ratón	MRVK ₅₆₉ QEE
Ratón	RVAK ₅₉₅ KEK
Ratón	VRLK ₆₃₅ REL

Tabla 2: Sitios conservados de sumoilación en humano y ratón. Existen 3 lisinas con potencial de ser ubiquitinadas en humano, que además resultan ser residuos conservados con el ratón.

Además de la secuencia consenso de sumoilación, se han descrito nuevas extensiones y variaciones de ésta, las cuales se han relacionado con un incremento en la probabilidad de que esta modificación ocurra. Una de ellas es dependiente de fosforilación de residuos cercanos a la secuencia consenso (ψ KXEXXSP) y el otro es caracterizado por la presencia de residuos ácidos cercanos al sitio de sumoilación (ψ KXEXX(E/D)4). Aparentemente las cargas negativas ubicadas hacia la parte carboxilo de la lisina sumoilable son críticas para que se lleve a cabo esta modificación (Gareau & Lima 2010). Recientemente, en el receptor a estrógenos β se ha descrito una nueva secuencia de sumoilación que requiere de una fosforilación previa de residuos de serina cercanos a la lisina

principal, la cual es llevada a cabo por la cinasa GSK3 (IKNSPSSLNSP) (Picard et al. 2012); sin embargo, al realizar el análisis de la secuencia de Ski en búsqueda de estas ampliaciones de la secuencia consenso buscando las secuencias previamente mencionadas, no encontramos la presencia de alguna de ellas en ninguna de las cinco especies analizadas.

Realizando un análisis de la secuencia aminoacídica de Ski, y usando un predictor de interacciones proteína-proteína llamado Human Protein Protein Interaction Predictor (PIP's, <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-pips/>) se encontró una interacción con la ligasa de Sumo E3 PIAS2. Todo este análisis de sumoilación, junto con los datos de ubiquitinación, nos permiten sugerir que ambas modificaciones postraduccionales pueden jugar un papel importante en la regulación diferencial de funciones de la proteína Ski.

4.2.3 Predicciones de sitios de fosforilación en Ski para 3 grupos de cinasas.

Para detectar sitios de fosforilación, primero realizamos un análisis sobre toda la secuencia de la proteína para identificar las serinas, treoninas y tirosinas con alto potencial de ser fosforiladas, usando el programa NetPhos 2.0. De esta manera, encontramos que hay dos regiones de la proteína con varios residuos capaces de ser fosforilados. La primera de ellas está entre los aminoácidos 300 y 400. La segunda es alrededor del aminoácido 500 y corresponde con el sitio rico en serinas y treoninas de Ski **(Figura 12)**.

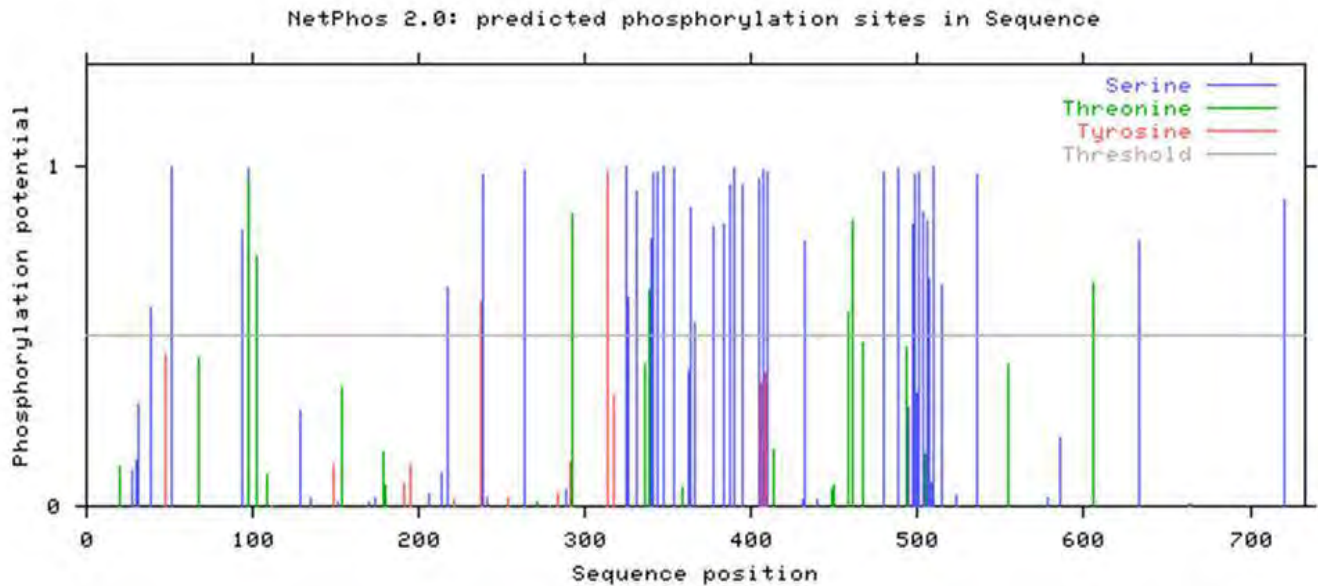


Figura 12: Ski tiene dos regiones ricas en residuos potenciales de fosforilación. A través del programa NetPhos 2.0, se encuentran dos regiones ricas en serinas potencialmente fosforilables: una entre los aminoácidos 320 a 420 y otra alrededor del residuo 500. Solamente una tirosina es detectada como sitio potencial de fosforilación.

Posteriormente, optamos por ser más selectivos, buscando sitios potenciales de fosforilación mediados por cinasas específicas. Para cumplir este objetivo, el análisis *in silico* se realizó tomando en cuenta tres grandes familias de cinasas con ayuda del programa GPS 2.1. (Xue et al. 2008). Previamente se ha descrito la relación existente entre la vía de MAPK's con la regulación de la vía del TGF- β . Ya ha sido demostrado como la fosforilación de las proteínas R-Smads en sus dominios MH1 y linker regulan de forma diferencial sus funciones (Derynck & Zhang 2003). Esto nos hace suponer que estas cinasas también podrían estar modulando la función de otros componentes de la vía como Ski. Por lo anterior, analizamos la secuencia de Ski buscando sitios potenciales de fosforilación mediados por las cinasas JNK, p38 y ERK que son los actores finales de la vía de señalización de las MAPK, encontrando un gran número de serinas y treoninas con alta probabilidad de ser fosforiladas. Se encuentran involucradas distintas zonas donde Ski interacciona con proteínas, incluyendo a las Smad2/3, el receptor T β RI y el factor de transcripción AP-1 (específicamente con su subunidad c-Jun). La proteína Ski en su región rica en serinas y treoninas, contiene 3 residuos que son las serinas 501 y 506, así como la treonina 505 los cuales son blancos potenciales de estas cinasas. De igual manera resalta la presencia de la serina 515 como sitio potencial de fosforilación por MAPK, pues como se mencionó anteriormente, este es un residuo cuya modificación postraducciona ha sido demostrada de

forma experimental (Nagata et al. 2010). Estos residuos también se encuentran conservados en *Mus musculus* y *Xenopus sp.* (**Figura 13**)

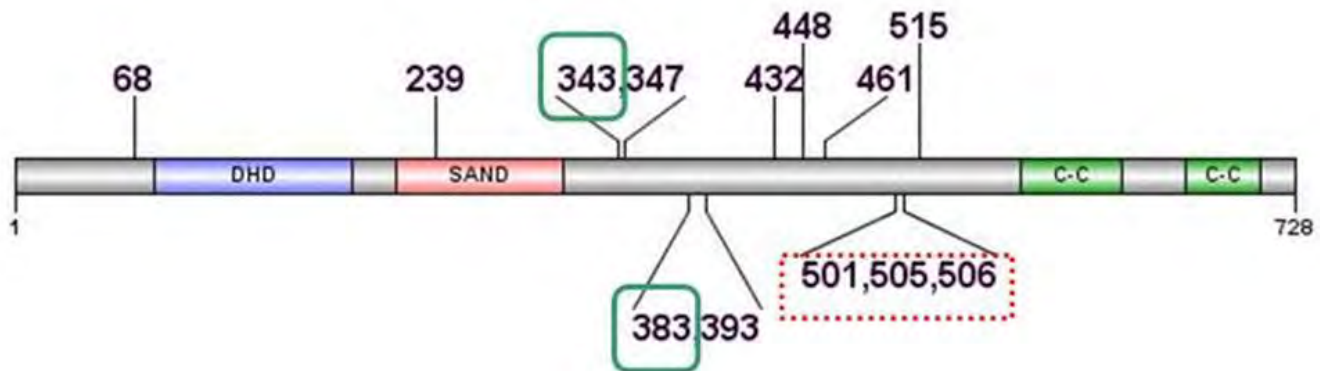


Figura 13: Sitios potenciales de fosforilación por MAPK. Se muestra de forma esquemática la localización de los sitios potenciales de fosforilación mediado por las MAPK JNK, p38 y Erk. En recuadro verde se marcan las serinas que rebasan el umbral de predicción con los valores más altos. En recuadro rojo se marcan la serinas 501 y 506 así como la treonina 505 que está en una región rica en serinas y treoninas DHD: Dominio Dachshund; SAND: Dominio SAND; C-C: Coiled-coiled region.

Por otra parte, existen varios reportes que han relacionado a GSK3 también con la fosforilación de las proteínas Smads en la región linker, regulando la función y estabilidad de ellas (Fuentealba et al. 2007). Por esta razón, se realizó el análisis bioinformático buscando los sitios probables de fosforilación mediados por esta cinasa. Como es de esperarse, varias serinas y treoninas que pueden ser fosforiladas se comparten con los sitios predichos para la cascada de las MAPK en las zonas de unión a las Smads activadas por receptor, o al mismo T β RI, aunque en este caso es importante mencionar a la treonina 68, localizada en el extremo amino de la proteína Ski sobre una región rica en prolinas la cual aparece como un sitio potencial de fosforilación. Por otra parte, un reporte reciente ha demostrado la importancia de GSK3 como reguladora de la estabilidad de un gran número de proteínas (Taelman et al. 2010). En este artículo se propone que GSK3 regula de forma constitutiva la expresión de un gran número de proteínas a través de un mecanismo que involucra la fosforilación en un motivo putativo definido por residuos de serinas o treoninas separados por 3 aminoácidos. Además, los autores mencionan que se requiere de una fosforilación inicial mediada por una MAPK en residuos de serinas o treoninas río abajo de la secuencia putativa de fosforilación por GSK3. En el caso de Ski, la treonina 505 aparece como un sitio potencial de fosforilación por todas las MAPK, y río arriba contiene una secuencia de fosforilación por GSK3, por lo que podemos establecer una relación entre la fosforilación

dependiente de GSK3 y la estabilidad de Ski (**Figura 14**).

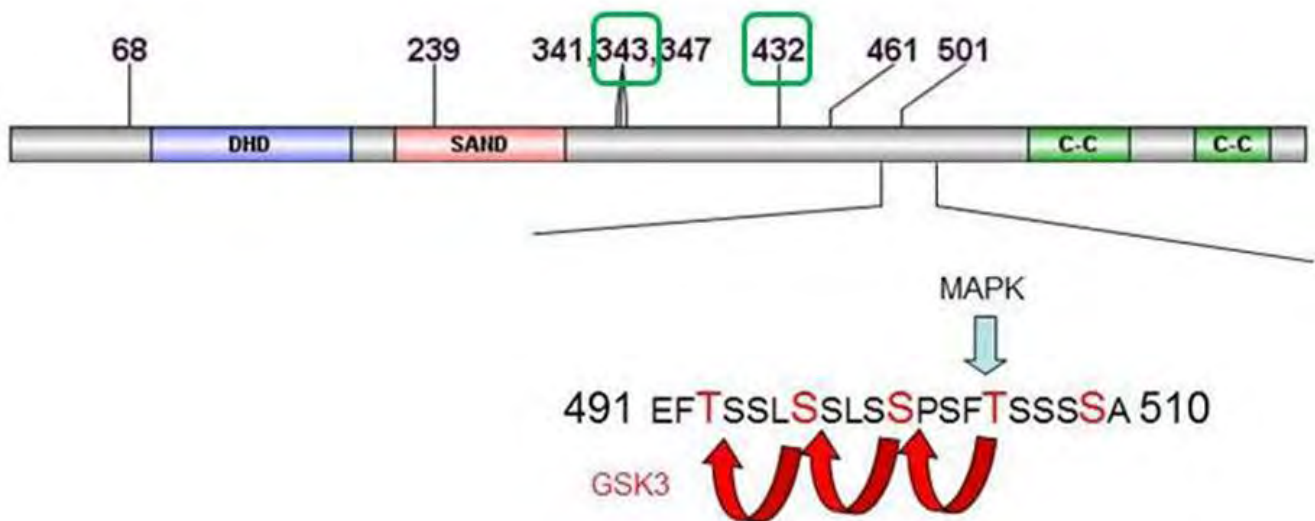


Figura 14: Ski posee una secuencia putativa de fosforilación por GSK3. Se muestran en la parte superior los sitios potenciales de fosforilación mediado por la cinasa GSK3, enmarcados en verde las 2 serinas que superan por mucho el umbral establecido para la detección. En la parte inferior se muestra una ampliación de la región de los residuos 491 al 510 donde se señala la treonina 505 como sitio potencial de fosforilación por MAPK y la secuencia putativa de fosforilación río arriba (S/T)XXX(S/T)XXX(S/T)XXX.

Previamente se ha demostrado que la estimulación de algunas líneas celulares por la citocina TGF- β induce una disminución en los niveles de las proteínas Ski y SnoN, a través de la degradación mediada por el proteosoma. Esto requiere de las proteínas R-Smads activadas. Kajino y colaboradores caracterizaron tres sitios de fosforilación mediados por la cinasa activada por TGF- β (TAK1) en la proteína SnoN (serina 115, serina 117 y treonina 119), demostrando que esta modificación es un paso previo a la degradación de la proteína (Kajino et al. 2007). Aunque al alinear la proteína Ski con su homólogo SnoN no encontramos conservación de estos residuos fosforilables, el programa GPS 2.1 nos arroja 2 serinas con alta probabilidad de ser fosforilables por la TAK1, las serinas 241 y 362. La primera de ellas es una serina que no aparece en las predicciones con las otras cinasas, y resulta interesante que se encuentra sobre uno de los sitios mapeados de interacción con la proteína Smad4, la Smad común que permite la interacción indirecta de Ski con el DNA, agregando que es un residuo conservado entre diversas especies. Por otra parte, la serina 362 también es única por no sobrelapar con ningún sitio de fosforilación de las cinasas previamente mencionadas, aunque sí está localizada sobre una zona de interacción importante de Ski con las Smads activadas por receptor, el T β RI y el factor de

transcripción AP-1.

Tras realizar este análisis, nos motiva a buscar la regulación de Ski mediada por estas cinasas. Este tipo de modificaciones podría funcionar generando sitios de acoplamiento en la proteína Ski que repercutan en su estabilidad. Para cumplir este objetivo, es indispensable demostrar la interacción entre Ski con las cinasas mencionadas, bajo el contexto celular adecuado y después buscar la modificación.

4.2.4 *Predicción de otras modificaciones postraduccionales*

Realizamos el análisis predictivo para otras dos modificaciones que también podrían generar variación en el peso original de la proteína Ski. Por una parte, buscamos los sitios potenciales de palmitoilación. Esta es una modificación postraducciona que une ácidos grasos (principalmente palmitato) modificando el peso molecular en alrededor de 238 Da. La unión se lleva a cabo en residuos de cisteína mediado por una S-palmitoiltransferasa que genera un enlace tioéster. Esta modificación postraducciona regula la interacción de proteínas con membrana, tráfico intracelular, estabilidad y microlocalización membranar. Actualmente, en el laboratorio contamos con datos que ubican a la proteína Ski dentro de la fracción insoluble celular, específicamente en endosomas ricos en balsas lipídicas (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación).

Usando el programa de predicción CSS-Palm 2.0 (Ren et al. 2008) encontramos dos cisteínas que aparecen como sitios potenciales de palmitoilación, la C10 y la C449. Por otra parte, hay que mencionar que la C10 consiste en un residuo presente únicamente en humano, mientras que la C449 está únicamente conservada entre humano y *Mus musculus* pero no en las especies más lejanas. Esto es de interés para nuestro laboratorio, pues podemos proponer una modificación de este tipo como la encargada de ubicar a Ski dentro de la fracción insoluble de la célula, como lo hemos observado en nuestro laboratorio.

Por otra parte, la glicosilación es una modificación postraducciona en la que se unen carbohidratos a las proteínas. Las uniones se llevan a cabo a través de la reacción de grupos hidroxilo, y dependiendo el enlace se pueden clasificar en N-glicosilaciones (enlace tipo amida con asparagina), O-glicosilaciones (enlaces glucosídicos con serinas y treoninas) y C-glicosilaciones (unión de manosa mediante enlaces carbono-carbono con el carbono 2 del triptófano); sin embargo, cuando la secuencia de aminoácidos carece de un péptido señal, la posibilidad de que se lleve a cabo este tipo de modificación en la proteína es casi nula, ya que es necesaria para la interacción con la maquinaria del

retículo endoplásmico encargada de generar los enlaces. El interés de la glicosilación surge por la influencia que tiene sobre el plegamiento, el tránsito intracelular y la secreción de proteínas (Moremen et al. 2012).

El análisis de Ski no muestra una secuencia de péptido señal; sin embargo, analizando toda la cadena proteica cuenta con por lo menos 2 sitios potenciales de N-glicosilación (N269 y N364), y varias serinas y treoninas para O-glicosilación (T68, T336, T339, S340, S341, S343, T448, T458 y T505), de acuerdo a los programas en línea NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 3.1. Para la C-glicosilación no se encontraron resultados positivos.

4.3 Demostración experimental de la presencia de modificaciones postraduccionales en Ski.

4.3.1 La proteína Ski endógena no está monoubiquitinada

Cuando se analiza a la proteína Ski en lisados totales de distintas líneas celulares, o incluso mediante inmunoprecipitación, observamos inmunoreactividad con los anticuerpos mostrando 3 bandas con pesos moleculares que varían entre los 80 y 120 kDa. Datos de nuestro laboratorio sugieren que la proteína Ski sufre procesos de relocalización entre diversos compartimentos como consecuencia de diversos estímulos, especialmente aquellos que modifican la dinámica del citoesqueleto (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación). Además, diversos reportes han comenzado a dilucidar el significado de un código de ubiquitina que regula diversas actividades no proteolíticas (Komander & Rape 2012). Dentro de estas, la monoubiquitinación es una forma en que las proteínas son marcadas para su redireccionamiento a compartimentos celulares específicos (Haglund & Dikic 2005). Con esta información, y después de haber realizado el análisis bioinformático, decidimos buscar si alguna de las bandas observadas en los blots de la proteína Ski endógena se encontraba ubiquitinada de forma basal. Para esto, usamos como sistema a la línea celular inmortalizada AD293 (línea celular derivada de las HEK293, con adherencia aumentada) que sobreexpresa de forma estable al péptido ubiquitina marcada con el epítipo HA (HA-Ubiquitina). De esta forma, observamos que al realizar IP de Ski y blot contra HA, no encontramos señal en el área de los pesos moleculares esperados para las diversas bandas de Ski. Para probar la eficiencia del IP de Ski, se desnudó ligeramente la membrana y luego se realizó un blot contra Ski observando las 3 bandas características que de forma regular vemos en esta línea celular. Sin embargo, encontramos que la cantidad de proteína Ski que inmunoprecipitamos fue poca (**Figura 15, panel a**). Para corroborar que la línea celular con la que

trabajamos estaba sobreexpresando la HA-Ubiquitina, detectamos el epítipo HA en lisados de proteínas totales de células AD293 normales (WT) o de aquellas que sobreexpresaban de forma estable la ubiquitina (HA-Ubiquitina). De esta forma, observamos que la señal detectada con el anticuerpo anti-HA en el blot es más intensa en las células que sobreexpresaban la ubiquitina en comparación con las que no lo hacían (**Figura 15, panel b**).

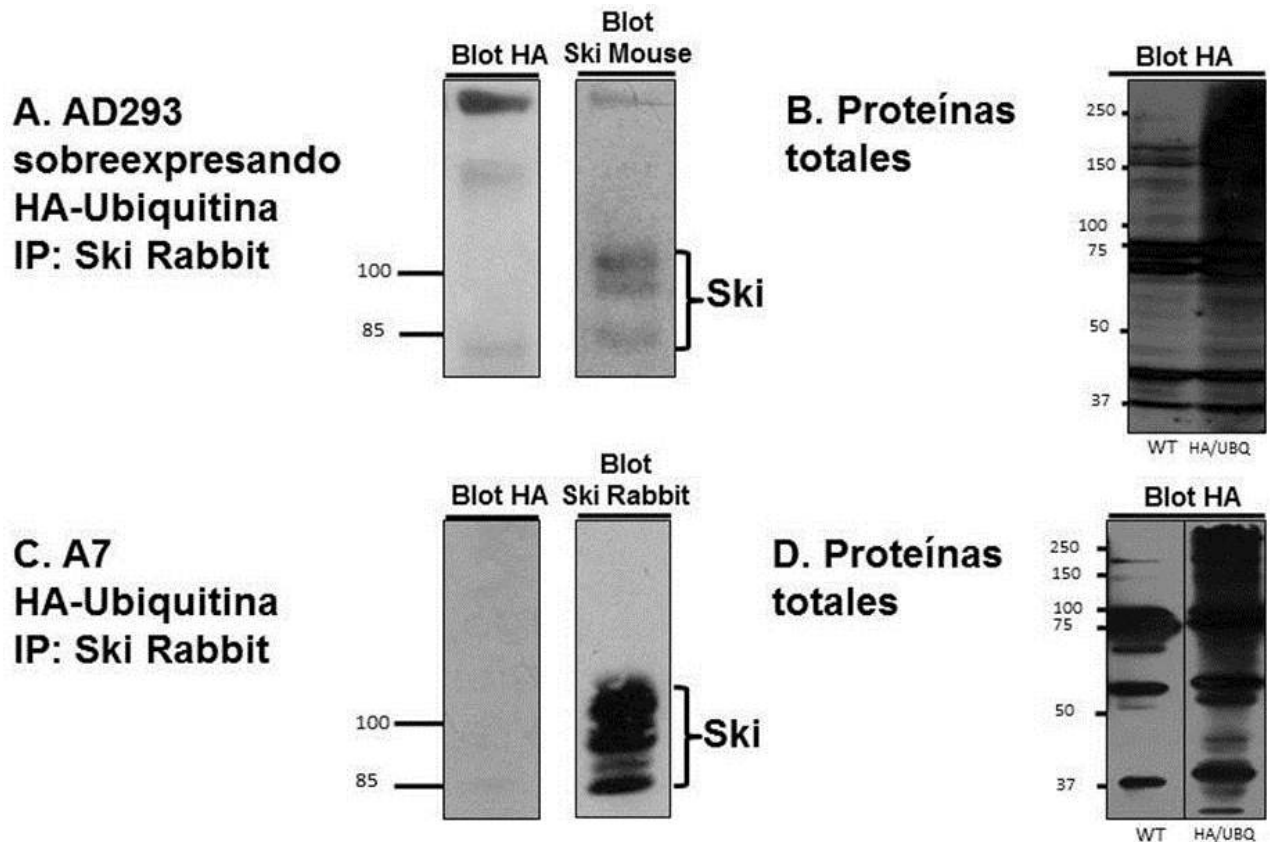


Figura 15: No es posible detectar monoubiquitinación en la proteína Ski endógena. A. Inmunoprecipitación de Ski con anticuerpo Rabbit en células AD293 que sobreexpresan de forma estable HA-Ubiquitina. Se muestra el Blot contra HA y el Blot contra Ski usando anticuerpo Mouse después de desnudar la membrana. B. Proteínas totales de células AD293 normales (WT) o que sobreexpresan HA-ubiquitina (HA/UBQ) y blot contra HA. C. Inmunoprecipitación de Ski con anticuerpo Rabbit en células de melanoma A7 que sobreexpresan de forma estable HA-Ubiquitina. Se muestra el Blot contra HA y el Blot contra Ski usando anticuerpo Rabbit después de desnudar la membrana. D. Proteínas totales de células de melanoma A7 normales (WT) o que sobreexpresan HA-ubiquitina (HA/UBQ) y blot contra HA.

Para corroborar que la cantidad de proteína no fuera una limitante para la detección de señal de monoubiquitinación, repetimos el experimento en la línea celular de melanoma A7. La finalidad de

ocupar esta línea celular, es que de forma basal expresa altos niveles de la proteína Ski. Además, se contaba con una variante de esta línea celular que, de forma similar a las empleadas en el experimento anterior, sobreexpresaba de forma estable la ubiquitina marcada con el epítotope HA. Por último, el protocolo para la lisis celular se modificó, hirviendo los extractos celulares totales por 5 min justo después de su obtención con la finalidad de inactivar rápidamente las DUBs que pudieran desestabilizar las uniones proteína-ubiquitina. Con este protocolo realizamos la inmunoprecipitación de la proteína Ski y blot contra HA, obteniendo el panel C de la **figura 15** que nuevamente nos demuestra la ausencia de señal en la zona de pesos moleculares donde se ubica la proteína Ski. Al desnudar la membrana y realizar el blot contra Ski, vemos que efectivamente esta línea celular tiene una alta expresión endógena de esta proteína. De igual forma, se muestran los controles entre la línea celular A7 control y la que sobreexpresa HA-ubiquitina, corroborando la funcionalidad del sistema estudiado (**Figura 15, panel D**).

Con estos experimentos, demostramos que la monoubiquitinación no es una modificación postraducciona que explique, en condiciones basales, alguna de las bandas de distinto peso molecular que se observan en el WB para analizar a Ski.

4.3.2 La degradación de Ski inducida por TGF- β no es mediada por el lisosoma.

Diversas publicaciones previas han mencionado la importancia del sistema ubiquitina-proteosoma para la degradación de Ski mediada por TGF- β (Macdonald et al. 2004; Vázquez-Macías et al. 2005; Nagano et al. 2007); sin embargo, datos de nuestro laboratorio nos han permitido ubicar a la proteína Ski dentro de endosomas ricos en balsas lipídicas (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación), los cuales de acuerdo a la literatura son compartimentos intracelulares donde las proteínas se pueden encontrar antes de ser exportadas por exosomas o degradadas por vía lisosomal (Deribe et al. 2010). Decidimos buscar si el mecanismo de degradación de Ski involucra algún “componente” lisosomal y para eso empleamos un inhibidor de la acidificación lisosomal, importante para mantener su función (cloruro de amonio), así como un inhibidor de enzimas lisosomales (leupeptina). En ambos casos se empleó una condición basal y un estímulo de 30 min con TGF- β en la línea celular C9 (**Figura 16**). Como se puede observar, el inhibir la acidificación intraluminal de los lisosomas, así como la inhibición directa de las enzimas lisosomales no inhibió la degradación de Ski mediada por TGF- β . De esta manera, concluimos que el mecanismo de degradación

de Ski es mediado enteramente por el proteosoma.

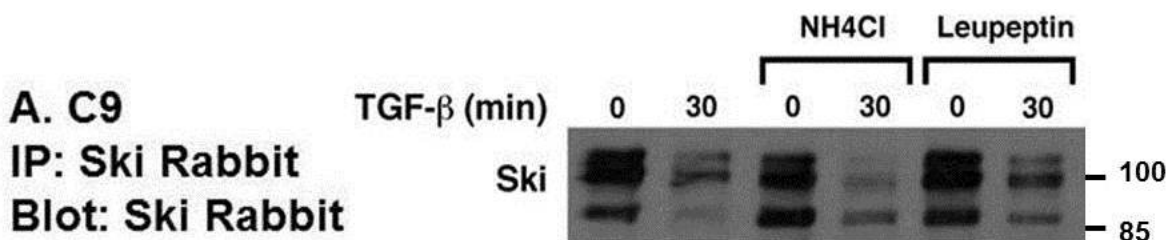


Figura 16: La inhibición de la función lisosomal no impide la degradación de Ski mediada por TGF-β. A. Inmunoprecipitación de Ski con anticuerpo Rabbit en células C9 en condiciones basales y tras estímulo por TGF-β 0.3 nM por 30 minutos. Se muestra el Blot contra Ski usando anticuerpo Rabbit. NH4Cl: Cloruro de amonio 20 mM por 2 horas. Leupeptina 250 mM por 2 horas.

4.3.3 *La sobreexpresión transitoria de la proteína Ski y ubiquitina permiten observar poliubiquitinación.*

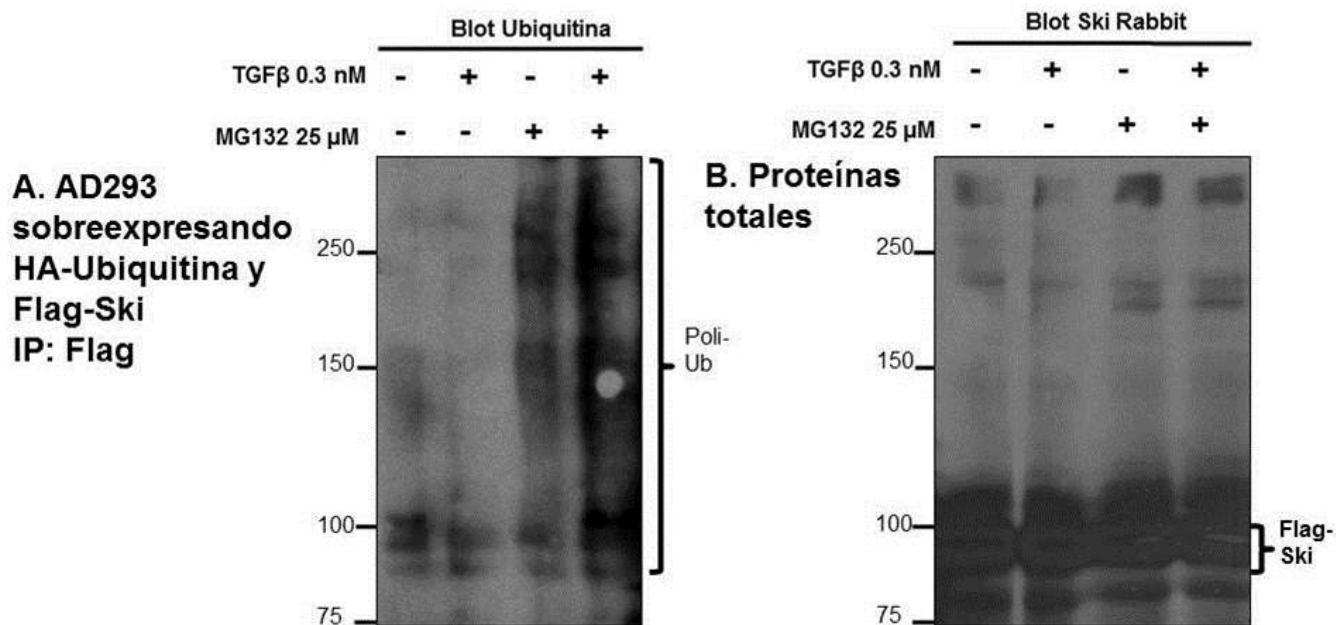


Figura 17: La sobreexpresión de Ski y ubiquitina permite identificar la poliubiquitinación. A. IP de Flag y Blot contra ubiquitina en células AD293 48 de postransfección con Flag-Ski y HA-ubiquitina. Las células se dividieron en 4 grupos con tratamientos diferentes. Se marca la poliubiquitinación visible en el blot. B. Blot contra Ski Rabbit en lisados de proteínas totales de las mismas células AD293 del panel A para confirmar la sobreexpresión de la proteína Flag-Ski. TGFβ, tratamiento por 1 hora. MG132, preincubación por 2 horas.

Estudios previos han resaltado la importancia de la ligasa de ubiquitina E3 Arkadia en el mecanismo de degradación de Ski mediado por TGF- β (Nagano et al. 2007). Se considera que la activación de esta ligasa es requerida para permitir la señalización a través de la vía del TGF β . Aunque en estos estudios el mecanismo se demostró con la sobreexpresión de Arkadia, ubiquitina y Ski (Band et al. 2009) decidimos buscar la poliubiquitinación sobreexpresando únicamente la HA-ubiquitina y la proteína Ski, pero estimulando a las células con la citocina TGF- β para demostrar que la degradación es mediada completamente por el proteosoma. Por lo anterior, se realizaron transfecciones transitorias usando el vector que contiene a la proteína Ski de humano completa marcada con el epítoto Flag. Además, transfectamos también al vector que contiene a la ubiquitina marcada con epítoto HA, con la finalidad de realizar una sobreexpresión de ambas proteínas. Como se observa en la **figura 17** panel A, cuando empleamos un anticuerpo contra ubiquitina al realizar el blot, encontramos señal al sobreexpresar Flag-Ski y ubiquitina (carril 1); sin embargo, cuando sólo se realiza la sobreexpresión transitoria de ubiquitina sin Flag-Ski, no observamos la presencia de esta señal (datos no mostrados). También observamos que al estimular las células con la citocina TGF- β , el patrón de bandas detectado con el anticuerpo anti-ubiquitina varía poco (carril 2). De manera paralela, se realizó este mismo experimento preincubando con el inhibidor del proteosoma MG132 durante 2 h, lo cual permitió conservar las formas poliubiquitinadas de la proteína Ski (carriles 3 y 4). También cabe llamar la atención en el incremento de la señal de poliubiquitinación que se presenta al estimular a las células con TGF- β (carril 4) lo cual coincide con lo reportado previamente en la literatura, donde la activación de las R-Smads por la vía canónica del TGF- β induce la activación de ligasas de ubiquitina E3 responsables de la degradación de la proteína Ski, que en este caso se acumula por encontrarse inhibido el proteosoma (Levy et al. 2007).

Por otra parte, realizamos una detección en los extractos de proteínas totales, de la sobreexpresión de la proteína Ski para demostrar que sí hubiéramos sobreexpresado a la proteína Flag-Ski humana (**Figura 17, panel B**). Como se puede observar en este blot contra Ski, se encuentra enriquecida una única banda que se corresponde con aquella de menor peso molecular de la proteína, como previamente habíamos mencionado.

Es importante realizar una comparación cuidadosa de cada uno de los carriles de esta figura. En la condición sin estímulo, pareciera que la señal mostrada por el anticuerpo contra ubiquitina se correspondiera con exactamente las 3 isoformas de Ski que observamos de manera basal (carril 1). Al comparar con el segundo carril (estímulo con TGF- β) vemos solo las 2 bandas de menor peso

molecular de Ski marcadas con ubiquitina; sin embargo, cuando preincubamos con el inhibidor del proteosoma y usamos el estímulo con la citocina, parece observarse una acumulación de la banda de ~100 kDa (carril 4). Esto nos podría indicar que la banda de mayor peso molecular pudiera ser una forma mono o multiubiquitinada, cuyo marcaje precede a la degradación vía el proteosoma, y que es acumulable al inhibir este proceso. Si esto fuera así, la estabilidad de esta isoforma sería tan baja que únicamente podemos observarla cuando sobreexpresamos a la ubiquitina, a la proteína Ski y a la vez inhibimos el proteosoma.

Con estos resultados podemos concluir que las formas poliubiquitinadas de Ski son detectables cuando mantenemos la estabilidad de ellas inhibiendo al proteosoma. Esto indica que en esta línea celular, la poliubiquitinación de Ski está ligada solamente a la degradación.

4.3.4 La inhibición del proteosoma permite conservar una isoforma de bajo peso molecular

Durante la realización de los experimentos en la búsqueda de formas ubiquitinadas de la proteína Ski, nos llamó la atención la presencia de una banda de ~60 kDa (**Figura 18**). Este fragmento lo logramos detectar al realizar inmunoprecipitación y blot de Ski con un anticuerpo que reconoce el extremo carboxilo terminal de la proteína (α -Ski policlonal de conejo H329, residuos 400 al 728); sin embargo, solo lo pudimos detectar cuando inhibimos la función del proteosoma empleando el compuesto MG132 e induciendo la degradación de Ski con la citocina TGF- β . Incluso, este fragmento también es detectable cuando únicamente empleamos MG132 sin ningún otro estímulo (datos no mostrados). Lo anterior, nos hace sugerir dos cosas: la primera es que ese fragmento representa un producto de proteólisis el cual es muy inestable, y solamente se conserva cuando no se puede llevar a cabo su degradación vía el proteosoma. La otra opción es que represente un mensajero de menor tamaño expresado.

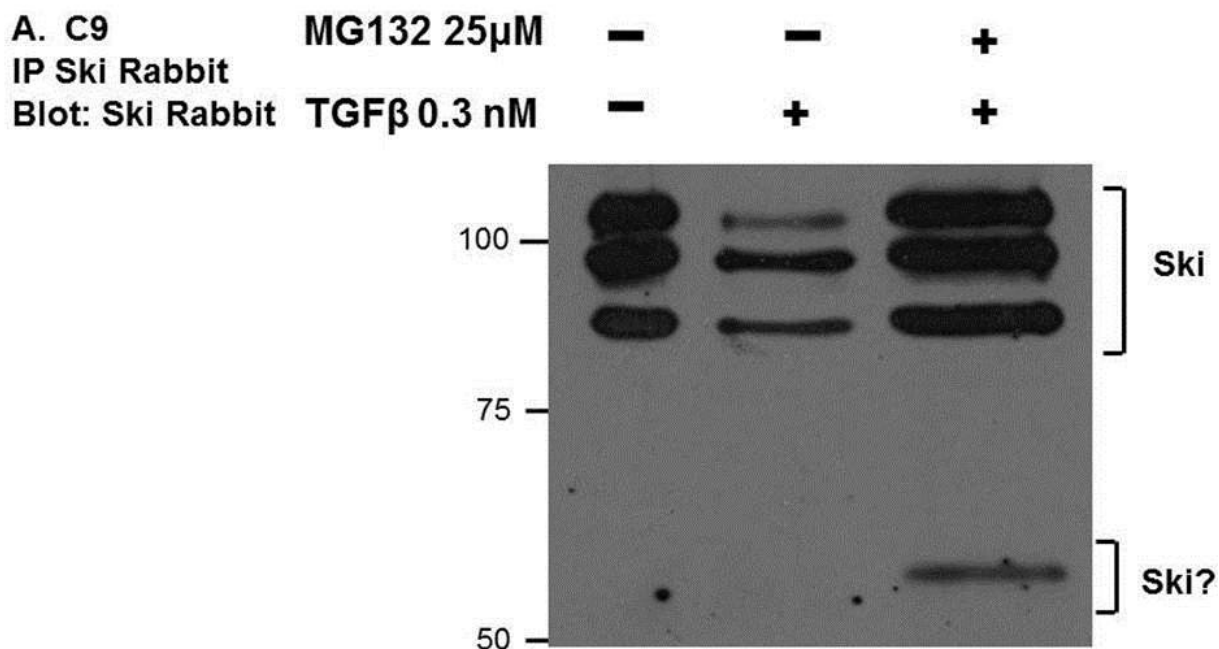


Figura 18: La inhibición del proteosoma permite conservar un fragmento de aproximadamente 60 kDa. A. IP y Blot contra Ski en células C9 en condiciones basales, así como tras un estímulo de TGF- β 0.3 nM por 1 hora (carriles 2 y 3). En el último carril se muestra un grupo de células C9 que fueron preincubadas con MG132 por 4 horas previas al estímulo con TGF- β . Ski? (Fragmento de 60 kDa).

4.3.5 El empleo de un reductor de cisteína confiere estabilidad a la proteína Ski

La sumoilación es una modificación postraduccional para la cual se han descrito diversas funciones en los últimos años. Actualmente sabemos que la sumoilación participa en procesos de relocalización y tráfico de proteínas, pero también en otros como la estabilidad y degradación. Conociendo estos antecedentes, y habiendo realizado el análisis bioinformático, decidimos buscar la presencia de sumoilación en Ski en la línea celular AD293. Realizamos un análisis de los cambios en la movilidad de las bandas de la proteína Ski usando condiciones basales o estimulando con TGF- β . También realizamos el experimento agregando un agente alquilante de las cisteínas que funciona inhibiendo la acción de diversas enzimas, entre ellas las sentrin-proteasas que desestabilizan las uniones entre el péptido sumo y las proteínas, y cuyo nombre es N-etilmaleimida (NEM) (**Figura 19**).

Con este experimento, encontramos que el empleo de la NEM tiene 2 efectos sobre la proteína. En primer lugar, se observa un cambio en la movilidad de las bandas de bajo peso molecular (~80 kDa) con y sin el estímulo con TGF- β . En segundo lugar, observamos la aparición de una cuarta banda localizada justo por arriba de la banda más pequeña, la cual es aún más distinguible al estimular con

TGF- β (Figura 19, carriles 3 y 4). Estos resultados sugieren que la inhibición de la función de algunas enzimas permite la conservación de formas de Ski poco estables, lo cual se observa como un cambio en la movilidad de las bandas de menor peso molecular (80-100 kDa); sin embargo, es importante verificar mediante el empleo de anticuerpos específicos contra sumo-1 ó sumo-2/3 que alguna de las bandas inmunorreaccione, lo cual nos sugeriría fuertemente que alguna de ellas estuviera sumoilada.

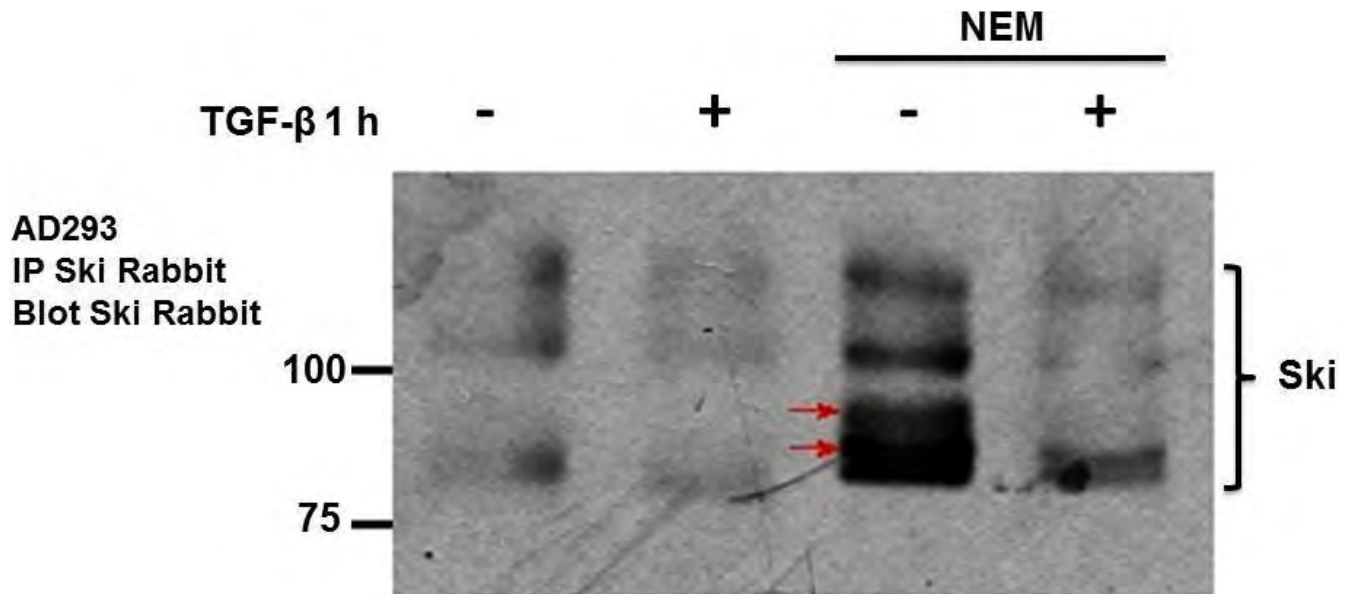


Figura 19: La NEM genera un cambio en la movilidad de las bandas de Ski. Inmunoprecipitación de Ski y Blot contra Ski en células AD293 que sobreexpresan HA-Ubiquitina. Las células se dividieron en 4 grupos, tratados de acuerdo a los datos de la figura. En condiciones basales y al emplear NEM aparecen 2 bandas que no se ven en el control (flechas rojas). NEM: N-etilmaleimida 30 mM en buffer de lisis, T β : 1 hora de estímulo.

4.3.6 La sobreexpresión de la proteína Ski permite observar fosforilación en condiciones basales y con el estímulo de TGF- β y anisomicina.

Tras el análisis bioinformático y de acuerdo a diversos datos de la literatura que relacionan a Ski con algunas cinasas, nos dispusimos a detectar la fosforilación de la proteína Ski usando la línea celular AD293, la cual resulta fácil de transfectar y además no es una línea celular transformada. Realizando técnica de marcaje metabólico con fosfato radioactivo ($[^{32}\text{P}]\text{Pi}$), buscamos la fosforilación de Ski. Se sobreexpresó a la proteína Ski completa, así como un fragmento de la proteína que contiene los residuos del 338 al 728. Ambas construcciones están marcadas con el epítipo flag.

De esta forma, encontramos que ocurre un marcaje con fósforo radioactivo de la construcción completa de Ski y también del fragmento de menor tamaño en condiciones basales (Figura 20, panel

derecho). Además, se emplearon dos estímulos: la anisomicina, un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteína y potente activador de MAPKs, pero que además hemos empleado en nuestro laboratorio por su efecto degradador sobre la proteína Ski (Vázquez-Macías et al. 2005; Hernández-Damián et al. 2013); y el TGF- β , el cual ya hemos mencionado que induce la degradación de la proteína Ski a tiempos cortos por un mecanismo de poliubiquitinación y acción del proteosoma. Mediante este experimento, se encontró que la anisomicina cambia la movilidad de las bandas generadas por el fragmento 338-728 (**Figura 20, panel izquierdo**), con un enriquecimiento de la banda más pesada que aparece al transfectar esta construcción, y que además se corresponde con cambios en el marcaje con el fósforo radioactivo (**Figura 20, panel derecho**); sin embargo, al empleo del TGF β no observamos cambios en la movilidad de las bandas. Además, corroboramos que el estímulo con TGF β no modifica la estabilidad de las proteínas sobreexpresadas como habíamos mencionado previamente.

Estos datos coinciden con la publicación de Nagata et al, 2010, donde observan una fosforilación basal de una banda de peso molecular más alto al del Ski endógeno, y localizan el sitio de fosforilación en el extremo carboxilo. En nuestro caso, podemos observar que esta fosforilación se hace más evidente al estimular las células con anisomicina por lo que podríamos sugerir una relación entre el efecto de este antibiótico y los datos observados por este grupo japonés.

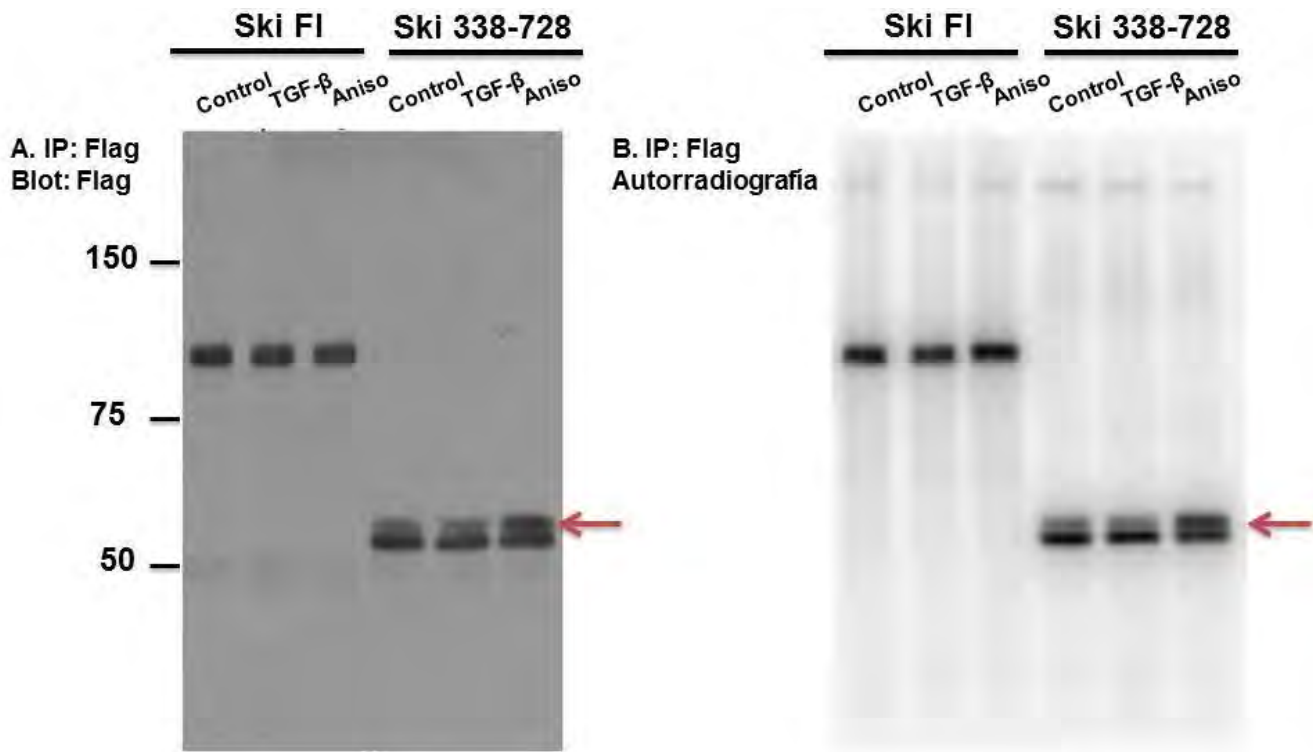


Figura 20: Detección de fosforilación de la proteína Ski sobreexpresada. Células AD293 transfectadas con Ski completo (FL) o el fragmento de residuos 338 al 728 (338-728) ambos marcados con el epítoto Flag. Se dividieron en 3 grupos: grupo control (C), incubadas 1 hora con TGF- β 0.3 nm (TGF- β) e incubadas 1 hora con anisomicina 10 μ m (Aniso) antes de la lisis. Se les realizó a todas marcaje metabólico con [32 P]Pi. En la imagen de la izquierda se muestra IP de Flag e IB contra Flag para detectar a Ski FL y Ski 338-728. En el segundo se muestra detección de [32 P]Pi por autorradiografía.

4.3.7 La proteína Ski endógena es potencialmente una fosfoproteína.

Estudios masivos realizados para buscar proteínas fosforiladas dentro del proteoma celular han permitido proponer que la proteína Ski tenga dos residuos de fosfoserina de manera basal que son la serina 432 y la 480 (Mayya et al. 2009). Por este motivo, decidimos realizar ensayo de marcaje metabólico con [32 P]Pi en las células AD293 (datos no mostrados), buscando la fosforilación de la proteína endógena. Como no pudimos observar alguna marca definida sobre la zona de los pesos moleculares de Ski, y sabiendo que la cantidad de proteína que podemos inmunoprecipitar de esta línea celular pudiera haber sido limitante para el experimento, se optó por realizarlo con la línea celular A7. El objetivo de usar esta línea celular proveniente de melanoma es que anteriormente hemos visto que expresa altas cantidades de Ski, por lo que podrían ayudar a resolver el problema de la cantidad, aunque en un contexto celular diferente. Al realizar la autorradiografía del experimento, no encontramos marca radioactiva en la zona de los pesos moleculares de Ski en condiciones basales

(Figura 21 panel A, carril control), pero al emplear el estímulo con TGF- β para buscar cambios en la movilidad de las bandas encontramos la aparición de marca en la zona de los pesos moleculares donde se ubica la proteína Ski (**Figura 21, Panel A, carril TGF- β**). De manera adicional y con la finalidad de buscar el mecanismo de acción que sigue la anisomicina para la degradación de Ski, también empleamos este fármaco en el experimento; sin embargo, no observamos cambios en el patrón con respecto al basal para Ski, aunque sí vemos una asociación de Ski con alguna proteína que se encuentra fosforilada con pesos moleculares alrededor de los 50 kDa lo que nos hace suponer que se trate de las proteínas Smad 2 y 3 (**Figura 21, Panel A, carril Anisomicina**). Todas estas condiciones se repitieron empleando el inhibidor del proteosoma MG132 buscando la acumulación de alguna isoforma fosforilada de Ski que fuera muy inestable por ser degradada vía el proteosoma (panel A, carriles 4-6). En este caso, no observamos marca radioactiva en la región entre los 80 y 120 kDa. Lo que si pudimos observar fue nuevamente la asociación de la proteína Ski con lo que podrían ser las proteínas Smads fosforiladas, pues encontramos señal radioactiva a la altura del peso molecular de estas proteínas.

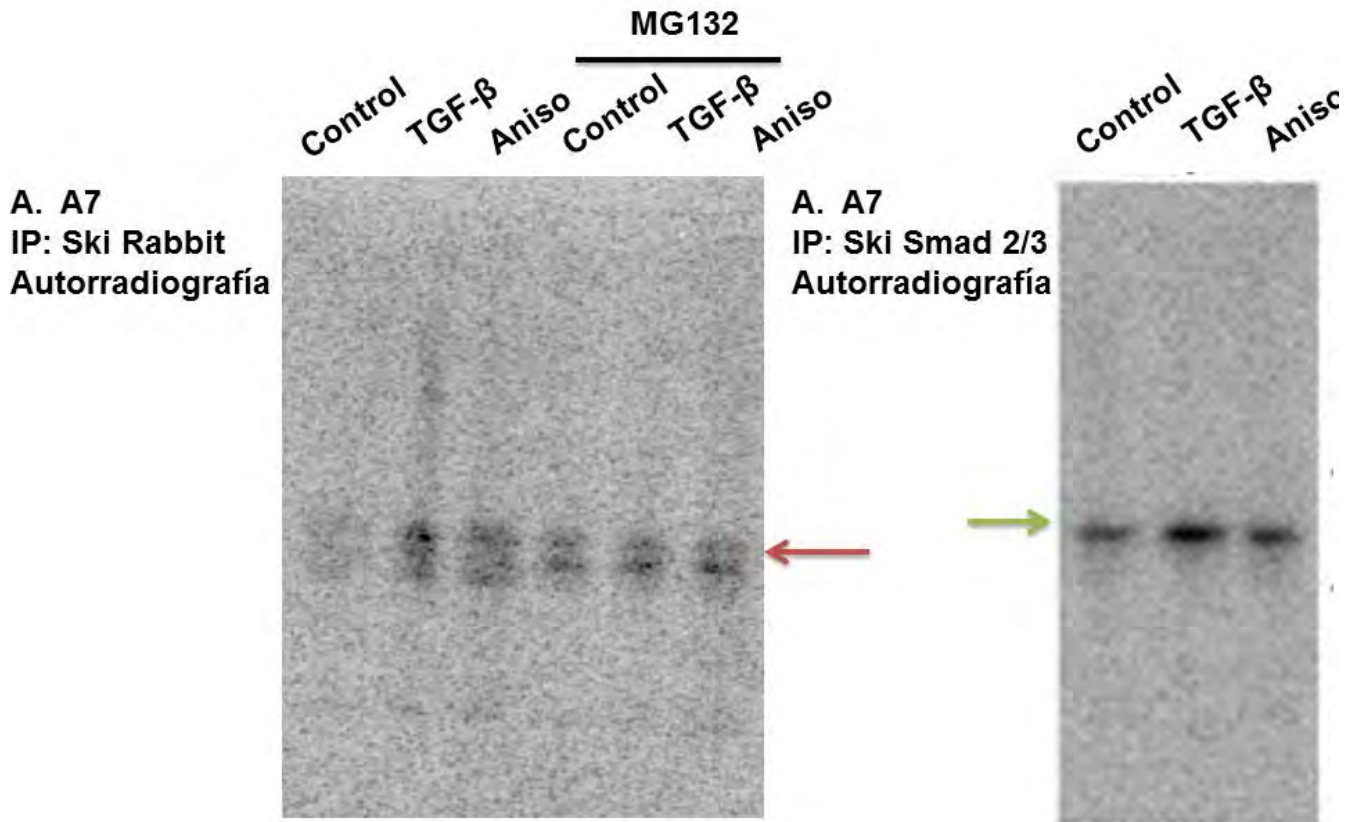


Figura 21: El marcaje metabólico con ^{32}P no permite distinguir si Ski es una fosfoproteína. Autorradiografía de células A7 WT marcadas con ^{32}P por 2 horas y realizando IP de Ski y Smad 2/3. TGF- β 0.3nm 30 min, Anisomicina 10 μM por 30 min, MG132 preincubación con 25 mM 2 h. Proteínas de 50 kDa asociadas a Ski (flecha roja y verde).

Al haberse realizado el marcaje radioactivo, realizamos un 2° IP contra las proteínas Smad2/3. Fue posible detectar fosforilación de ambas proteína Smads encontrando que la fosforilación de las células estimuladas con TGF- β (**Figura 21, panel B, carril TGF- β**) es mayor que el basal, como ha sido descrito previamente. De manera interesante, al estímulo con anisomicina también encontramos un incremento en la marca radioactiva de las R-Smads con respecto al control.

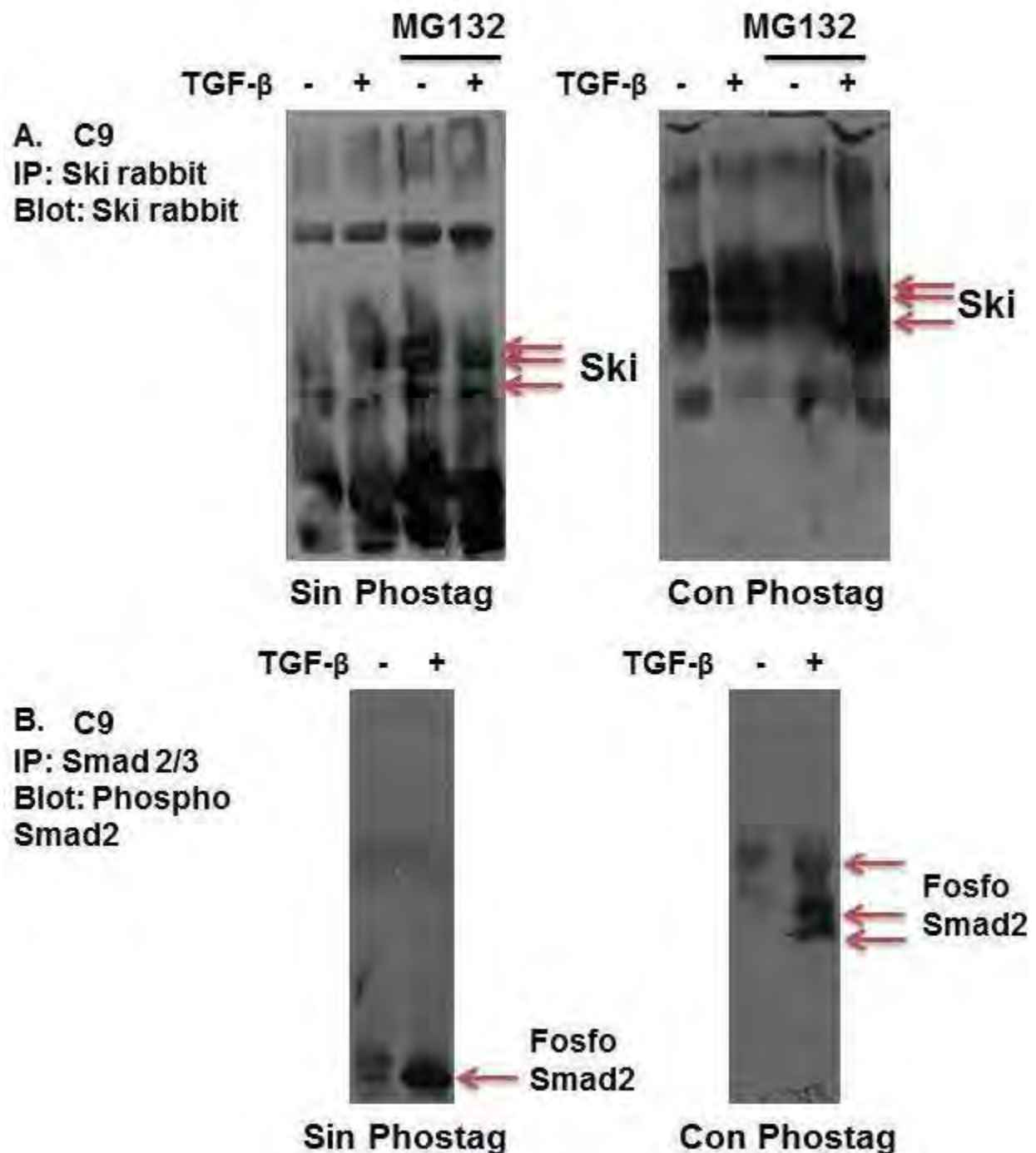


Figura 22: Ski se encuentra marca con la molécula PhosTag de forma basal. A. Inmunoprecipitación de Ski y Blot contra Ski en células C9 divididas en 4 grupos y tratadas de forma correspondiente, mostrando un gel sin PhosTag (izquierdo) y uno con PhosTag (Derecho). B Inmunoprecipitación de Smad 2/3 y Blot contra Phospho Smad2 en células C9 divididas en 4 grupos y tratadas de forma correspondiente, mostrando un gel sin PhosTag (izquierdo) y uno con PhosTag (Derecho). Estímulo con TGFβ 1 hora, preincubación con MG132 2 horas.

Con lo anterior, decidimos que este experimento no era suficiente para detectar si Ski tuviera fosforilaciones basales, donde problemas como una cantidad inapropiada de marca radioactiva o errores en la inmunoprecipitación pudieran haber jugado un papel importante. Por otro lado, llama la atención la fosforilación de las proteínas Smads observada tras el estímulo con anisomicina y su asociación con Ski. Esto podría relacionarse con la activación de la vía de las MAPKs, de forma que estas últimas fueran capaces de fosforilar a las Smads en distintas regiones y sería necesario realizar un diseño experimental específico para detectar el sitio exacto de fosforilación. En una aproximación alterna, realizamos un gel desnaturalizante complementado con la molécula *PhosTag*, la cual al coordinarse con un catión divalente, se puede unir a grupos fosfato presentes en la proteína y retardar su movilidad a través de los geles de poliacrilamida. Esto lo realizamos pensando que este ensayo pudiera ser más sencillo y sensible para detectar la fosforilación de Ski. Para probar la eficacia del compuesto *PhosTag*, empleamos como control, a la proteína Smad2 fosforilada tras el estímulo con TGF β . Si comparamos los geles sin y con el *PhosTag*, veremos que el estímulo con la citocina lleva a un retraso en la migración de la Smad2 fosforilada en su extremo carboxilo (**Figura 22, panel B**). Continuamos realizando el experimento inmunoprecipitando a Ski usando diversas condiciones y como podemos ver, todas las isoformas retrasan su movilidad electroforética, (**Figura 22, panel A**). Con este experimento, apoyamos la idea de que Ski es una fosfoproteína desde su síntesis, pero no parece ser que esta modificación postraduccional explique de forma precisa alguna de las isoformas de la proteína que observamos en los blots.

4.3.8 *La estabilidad basal de Ski está regulada por la cinasa GSK3*

Anteriormente mencionamos que el grupo de E. De Robertis en el año 2010 sugirió que la cinasa GSK3 parece ser una reguladora importante de los niveles basales de expresión de un gran número de proteínas, mediado por un mecanismo de fosforilación que podría disminuir la estabilidad de ellas y llevarlas a la degradación. Basado en esta información, y habiendo encontrado que Ski contiene una secuencia putativa de fosforilación mediada por GSK3 en su región rica en serinas y treoninas, realizamos un experimento incubando células en condiciones controles y otro grupo con el inhibidor inespecífico de GSK3, LiCl (**Figura 23**). De esta forma pudimos observar que el empleo de este fármaco parece estabilizar las cantidades basales de la proteína Ski (Carril 1 vs. Carril 4); sin embargo, cuando incubamos estas células a distintos tiempos con la citocina TGF- β , la degradación de la proteína

no se inhibe en ningún momento.

C9

IP: Ski Rabbit

Blot: Ski Rabbit

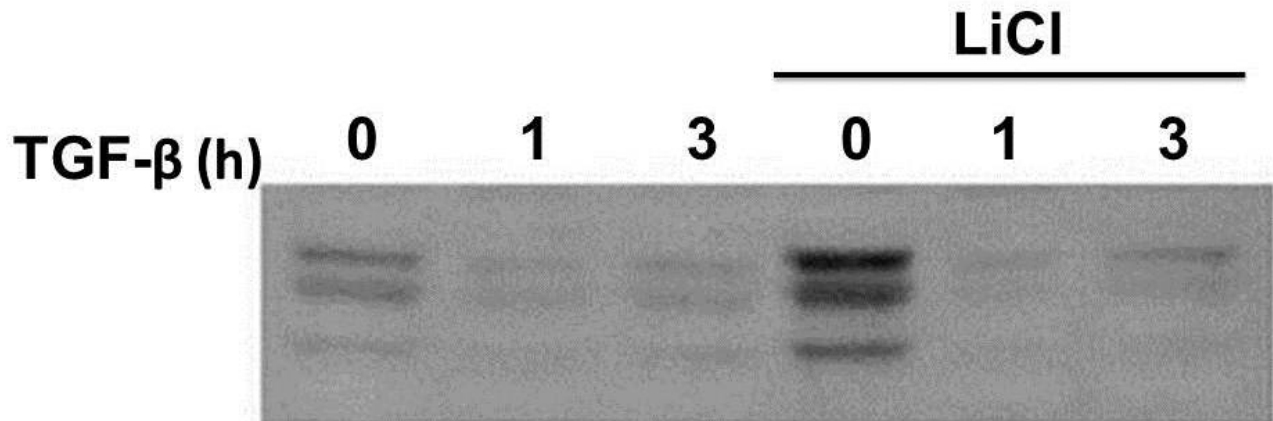


Figura 23: GSK3 regula la estabilidad de Ski. A. Inmunoprecipitación y Blot contra Ski en células C9, mostrando una curva de tiempo de estímulo con TGF-β 0.3 nM. Además, otro grupo fue preincubado con el inhibidor inespecífico de GSK3 LiCl 10 mM por 12 horas, realizándose también una curva de tiempo de estímulo con TGFβ 1 hora.

Por otro lado, decidimos buscar la interacción de Ski con GSK3 a través de una coimmunoprecipitación (**Figura 24**). Al realizar IP de Ski y un blot contra GSK3, encontramos una asociación entre ambas proteínas. Además de este resultado, encontramos que al inducir la degradación de Ski con TGF-β, a pesar de inmunoprecipitar bajas cantidades de la proteína como era de esperarse, la asociación con GSK3 se incrementa. Con estos resultados podemos concluir que GSK3 parece mediar la estabilidad de Ski de forma basal, e incluso estar relacionada en la degradación de esta proteína mediada por TGF-β.

C9

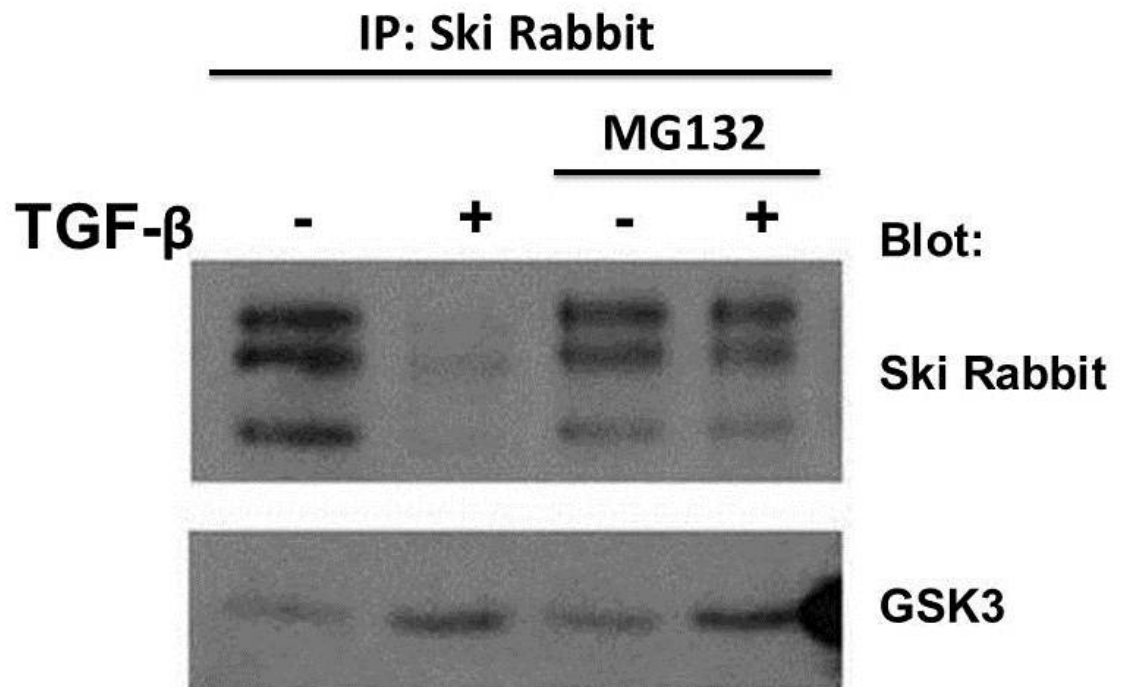


Figura 24: GSK3 incrementa su asociación con Ski tras el estímulo de TGF- β . B. Panel superior: Inmunoprecipitación y Blot contra Ski en células C9, en condiciones basales y con estímulo por TGF- β 0.3 nM 1 hora. Además, otro grupo fue preincubado con el inhibidor del proteosoma MG132 25 μ M por 4 horas. Panel inferior: Coinmunoprecipitación de GSK3 tras la inmunoprecipitación de Ski.

5 DISCUSIÓN

Durante la realización de este trabajo, buscamos resolver dos grandes preguntas con respecto a las distintas isoformas de la proteína Ski. La primera de ellas fue tratar de encontrar si el “splicing” alternativo explicaba las distintas isoformas de Ski, las cuales presentan pesos moleculares diferentes al calculado para la proteína de 728 aminoácidos en el humano (~80 kDa). Por otro lado, buscamos modificaciones postraduccionales que se relacionaran con cambios en la estabilidad de la proteína, en vista de la poca información que hasta este momento tenemos al respecto.

5.1 Las isoformas de Ski podrían ser generadas por modificaciones postranscripcionales del mRNA o por cortes proteolíticos.

Hasta el momento se encuentran descritos dos mRNA's en diversas líneas celulares de humano y ratón, que codifican para la proteína Ski; sin embargo, la presencia de marcadores de expresión que alinean con intrones y exones del gen de Ski nos hace cuestionarnos sobre la posibilidad de “splicing” alternativo en el mensajero de este gen. Un motivo por el cual pudiera no haberse hasta el momento encontrado otros mRNA, pudiera deberse a una baja expresión o estabilidad de los mismos. Además, es posible que este tipo de mensajeros solo sean detectables bajo condiciones que incrementen su expresión. También podría ser que la presencia de distintos mRNA de Ski sea tejido específico, pues debemos recordar que estas ESTs fueron encontradas en tejido retiniano y de papila dérmica únicamente.

Lo anterior tiene relación con nuestros experimentos que demuestran la presencia de una isoforma de Ski de bajo peso molecular que es detectable únicamente cuando realizamos inhibición del proteosoma y usamos un anticuerpo dirigido hacia la región carboxílica de la proteína. Podría entonces ser que esta proteína de ~60 kDa que es identificada por el anticuerpo contra Ski que reconoce el extremo carboxílico represente el producto de alguno de estos mensajeros de menor tamaño. Sin embargo, también existe la posibilidad de que esa proteína de bajo peso molecular represente un fragmento producto de una proteólisis. Si este fuera el caso, ese fragmento tendría una vida media muy corta antes de ser degradado vía el proteosoma, pues solamente con la inhibición de este último podemos detectarlo. Existen ejemplos donde a través de estos mecanismos proteolíticos se obtienen productos con funciones distintas. Uno de ellos está involucrado con la vía del TGF- β , pues recientemente se ha descrito que tras una poliubiquitinación mediada por la ligasa de ubiquitina TRAF6

y la proteína TACE activada por la PKC ζ , el T β RI sufre un corte que libera la región carboxílica del receptor, el cual es capaz de migrar al núcleo y asociarse con reguladores transcripcionales como p300 para activar genes involucrados en la invasión celular y metástasis (Mu et al. 2011). Por lo anterior, caracterizar la función que tiene ese fragmento más pequeño de la proteína es relevante para seguir definiendo los papeles fisiológicos y patológicos que juega Ski en distintos procesos celulares.

La dificultad en la clonación del gen de Ski supone un reto experimental. Hasta el momento ha sido más fácil clonar la región 5' de la secuencia nucleotídica del mensajero Ski, pero existen dificultades para clonar la región 3'. Proponemos que la generación de un nuevo primer dirigido contra la región 5' UTR del mensajero y otro primer *reverse* que abarque al 3' UTR pudiera ayudarnos a resolver este problema. Existen estudios que han demostrado la importancia de este último UTR en la estabilidad del mensajero por ser una zona sujeta a regulación por otros factores como son los miRNAs (Levati et al. 2011); sin embargo creemos que también la región 5' UTR debe ser importante para la generación de todas las formas que vemos cuando identificamos la proteína endógena.

5.2 La ubiquitinación y fosforilación no explican las isoformas de Ski.

El análisis *in silico* de las modificaciones postraduccionales nos permite observar que la proteína Ski puede ser blanco potencial para un gran número de ellas. Además, es importante resaltar que la mayoría de los residuos que encontramos con potencial de ser modificados se encuentran ubicados en la mitad carboxílica de la proteína, y muchos de estos residuos se encuentran conservados entre distintas especies filogenéticamente alejadas, lo que aumenta las probabilidades de que sean los sitios donde se pueda regular las funciones de esta proteína.

En el caso de la sumoilación, encontramos 3 secuencias consenso ubicadas en el último tercio de la secuencia de la proteína; sin embargo, los datos obtenidos con el empleo del agente alquilante de cisteínas NEM no nos permite confirmar la presencia de esta modificación; falta seguir analizando esta modificación empleando anticuerpos específicos contra sumo para corroborar la presencia de estos péptidos en asociación con Ski.

Por otra parte, llama la atención que por lo menos 2 de los 3 sitios identificados como de potencial sumoilación, se superponen con sitios de potencial ubiquitinación, lo que concuerda con la información que se tiene respecto a estas modificaciones pues se ha visto que parecen funcionar de manera competitiva, llevando a las proteínas por caminos distintos: la estabilización y la movilización

intracelular o la degradación (Gareau & Lima 2010). Además, los análisis predictivos de interacciones proteína-proteína nos sugieren que Ski tiene motivos que pueden ser reconocidos por dominios de la ligasa de sumo E3 PIAS2 lo que sugiere aún más la existencia de esta modificación y hace atractivo continuar su estudio, sobretodo identificando los estímulos que llevan a que se presente este cambio sobre la proteína Ski y las consecuencias que tiene sobre ella. En este momento nos encontramos realizando ensayos con sobreexpresión de HA-Sumo1, pero tal parece que para tener una sobreexpresión estable del péptido que sea efectiva para modificar proteínas, requeriremos también de sobreexpresar a la ligasa de sumo E3 PIAS2.

En el caso de la monoubiquitinación o multiubiquitinación, no podemos considerarlas como explicativas para las isoformas presentes en la proteína Ski endógena. Los ensayos de sobreexpresión de ubiquitina, cambios en el protocolo para conservación de proteínas ubiquitinadas y el empleo de líneas celulares que de forma basal expresan altos niveles de Ski han sido las estrategias que hasta el momento nos han permitido concluir que esta modificación no ocurre de manera basal sobre la proteína Ski y no explica ninguna de sus isoformas. No obstante, pudimos confirmar que la poliubiquitinación es esencial para la degradación de Ski, y que el mecanismo es mediado totalmente por el sistema ubiquitina-proteosoma sin intervención de mecanismos lisosomales. Estos resultados tienen relación con otros datos de nuestro laboratorio que buscan dilucidar el destino de la proteína Ski acumulada en endosomas ricos en balsas lipídicas tras el estímulo con TGF- β (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación).

Los ensayos de fosforilación realizados hasta el momento, junto con la información contenida sobre Ski en diversas bases de datos, nos hacen suponer fuertemente que Ski sea una fosfoproteína desde su síntesis; sin embargo, no creemos que una fosforilación sea suficiente para dar explicación a alguna de las isoformas de alto peso molecular que observamos para Ski, pues la variación entre los pesos moleculares de ellas no se corresponde con lo que una fosforilación pueda cambiar la movilidad de una banda. El ensayo con el compuesto *PhosTag* parece ser hasta ahora el dato más importante que tenemos para decir que Ski sea una fosfoproteína. Además de esto, otro dato importante ha sido nuestro hallazgo en el cambio de la movilidad de las bandas generadas por la transfección del fragmento carboxílico de Ski en una línea celular no transformada tras el estímulo con anisomicina. Recientemente en nuestro laboratorio se ha publicado cómo la anisomicina es un fármaco que lleva a la degradación de las proteínas Ski y SnoN vía el proteosoma requiriendo de componentes de la vía del TGF- β . Pero lo que resulta intrigante es que el mecanismo por el cual se induce esta degradación aún

tiene componentes que falta por caracterizar; sin embargo, esta fosforilación que encontramos en el extremo carboxilo favorecida por el estímulo con anisomicina merece ser estudiada, y buscar su relación tratando de concretar el mecanismo de acción de este antibiótico sobre el efecto degradativo de Ski (Hernández-Damián et al. 2013).

Es muy importante mencionar que aún existe una gran cantidad de modificaciones que vale la pena buscar en nuestra proteína. Por las características en la migración de las bandas, una glicosilación podría ser una de las modificaciones que generan los cambios en el peso molecular. Incluso, esta posibilidad ha sido manejada desde publicaciones como la de Nagase en 1990, quienes al generar anticuerpos policlonales contra proteína Ski recombinante, identificaron con ellos una banda de 100 kDa en líneas celulares humanas, que rebasa por 20 kDa el peso esperado para la proteína Ski endógena (Nagase et al. 1990). Realizar experimentos empleando la técnica de SDS-PAGE con tinción basada en el ácido periódico de Schiff puede ser una primera estrategia de cribado, que complementado con otras técnicas como la detección en blots a través de lectinas marcadas o con anticuerpos específicos podrían ayudarnos a descartar esta modificación. También la palmitoilación podría ser otra modificación que explique los cambios en el peso molecular de Ski. Esto podría relacionarse con los datos de nuestro laboratorio que son compatibles con un tráfico intracelular de Ski hacia endosomas ricos en balsas lipídicas (Vázquez-Victorio & Macías-Silva, manuscrito en preparación) por lo que la realización de marcajes con palmitato tritiado o el uso de técnicas químicas como la remoción de la modificación postraduccional por el compuesto hidroxilamina pueden ser empleados para este estudio.

Por último, debemos de decir que, aunque no fue posible encontrar una explicación para las isoformas de alto peso molecular, si pudimos encontrar una forma de regulación de la estabilidad de Ski. Una fosforilación mediada por GSK3 parece ser importante para mantener los niveles basales de Ski dentro de cierto rango, que en las células no transformadas suelen ser bajos. Pero observamos que la inhibición de la actividad de GSK3 parece incrementar la estabilidad de la proteína. Además, fuimos capaces de detectar un incremento en la interacción de Ski con GSK3 tras el estímulo por TGF- β . Todo esto permite hacernos pensar que la fosforilación mediada por esta cinasa es importante para la estabilidad de Ski de forma basal e incluso para su degradación mediada por la activación de la vía de TGF- β . Buscar cuál es el mecanismo que media la estabilidad deja abierta la posibilidad de todo un nuevo proyecto al respecto.

6 CONCLUSIONES

Con el presente trabajo tenemos algunas conclusiones. Primero, debemos mencionar que con las técnicas experimentales empleadas no fuimos capaces de comprobar nuestra hipótesis inicial, ya que ninguna de las isoformas de Ski con peso molecular por arriba de los 80 kDa pudieron ser explicadas por ubiquitinación, fosforilación o sumoilación tanto en líneas celulares inmortalizadas (AD293 y C9) o en líneas celulares transformadas (A7); sin embargo, sí pudimos observar variaciones en la estabilidad de la proteína Ski con diversos estímulos.

Encontramos que la poliubiquitinación en la línea celular AD293 es una modificación que lleva a la degradación de la proteína vía el proteosoma, sin ninguna participación de componentes lisosomales. Para la fosforilación, tenemos datos que nos sugieren que Ski es una proteína que se encuentra fosforilada de manera basal gracias a los resultados obtenidos con el reactivo *PhosTag* en la línea celular C9. Además, en esta misma línea pudimos observar una interacción de Ski con GSK3, de forma que esta cinasa parece regular la estabilidad basal de la proteína Ski. Finalmente, para la sumoilación tenemos datos bioinformáticos que nos hacen pensar en la existencia de esta modificación; sin embargo, necesitamos seguir buscando el contexto celular adecuado y usando los reactivos indicados para ser más concluyentes en este punto.

Por otra parte, podemos decir que abrimos las posibilidades a encontrar nuevos mensajeros que codifiquen a proteínas homólogas a Ski con distinto peso molecular; sin embargo, aún falta establecer una estrategia experimental adecuada que permita identificar a esos mRNA. También, falta encontrar las condiciones adecuadas para clonar a la proteína Ski, lo cual es fundamental para analizar los sitios específicos de modificación postraduccional.

Se resumen los resultados del proyecto en los siguientes puntos:

1. Aunque han sido descritos 2 mensajeros de distinto peso molecular, cuyas diferencias varían únicamente en la región 3' UTR, se abre la posibilidad a la existencia de mensajeros de distinto tamaño que pueden codificar para proteínas Ski con diversos pesos moleculares.
2. La proteína Ski podría sufrir una proteólisis intracelular con la generación de un fragmento más pequeño de alrededor de 60 kDa.

3. La proteína Ski cuenta con diversos sitios potenciales de ser modificados postraduccionalmente, con la mayoría de ellos localizados hacia su mitad carboxílica.
4. Existen sitios de potencial ubiquitinación que se sobrelapan con secuencias consenso de sumoilación.
5. El mecanismo de degradación de Ski mediado por TGF- β involucra al sistema ubiquitina-proteosoma y no a los lisosomas.
6. Con las técnicas empleadas en este trabajo la monoubiquitinación, fosforilación y sumoilación no explican las isoformas de alto peso molecular de la proteína Ski.
7. La interacción de Ski con GSK3 resulta importante para regular la estabilidad de la primera en condiciones basales y bajo el estímulo con TGF- β .

7 PERSPECTIVAS

1. La clonación completa de la proteína Ski, incluyendo sus regiones 5' y 3' UTR resulta de capital importancia buscando crear un vector de expresión cuyo producto proteico se comporte como la proteína endógena. Esto puede ayudar a confirmar o descartar fenómenos de “splicing” alternativo en el mensajero de Ski.

2. Aunque análisis masivos describen a Ski como una posible fosfoproteína, aún no se han realizado estudios concluyentes que afirmen esta hipótesis, por lo que el empleo de compuestos como la fosfatasa alcalina o el *PhosTag* nos pueden ayudar a encontrar respuesta.

3. Aun cuando las 3 modificaciones estudiadas en el presente trabajo no explican las isoformas de alto peso molecular de la proteína Ski, la presencia de ellas bajo diversas condiciones celulares aún tienen que ser estudiadas.

4. El hallazgo de cambios en la movilidad de Ski por estímulo con el antibiótico anisomicina podría ayudar a concretar el mecanismo que emplea este fármaco en la degradación de Ski.

5. La interacción de GSK3 como reguladora de la estabilidad de Ski abre las puertas a una investigación sobre el mecanismo empleado para ello y la relación que podría existir en procesos patológicos como el cáncer, donde las líneas celulares poseen altos niveles de expresión basal de esta proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- Aicart-Ramos, C., Valero, R.A. & Rodriguez-Crespo, I., 2011. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(12), pp.2981–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21819967> [Accessed March 6, 2013].
- Atanasoski, S. et al., 2004. The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron*, 43(4), pp.499–511. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15312649>.
- Band, A.M., Björklund, M. & Laiho, M., 2009. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates transforming growth factor-beta signaling by destabilizing ski and inducing Smad7. *The Journal of biological chemistry*, 284(51), pp.35441–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2790973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2013].
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*, 294(5), pp.1351–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600390> [Accessed November 17, 2013].
- Bonnon, C. & Atanasoski, S., 2012. c-Ski in health and disease. *Cell and tissue research*, 347(1), pp.51–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647564> [Accessed March 16, 2013].
- Carmignac, V. et al., 2012. In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant Shprintzen-Goldberg syndrome. *American journal of human genetics*, 91(5), pp.950–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103230> [Accessed April 11, 2013].
- Chen, D. et al., 2003. SKI Activates Wnt / β -Catenin Signaling in Human Melanoma. *Cancer research*, 63(20), pp.6626–6634.
- Colmenares, C. et al., 2002. Loss of the SKI proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain-dependent defects in Ski-/- mice. *Nature genetics*, 30(1), pp.106–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731796> [Accessed April 21, 2013].
- Colmenares, C. & Stavnezer, E., 1989. The ski oncogene induces muscle differentiation in quail embryo cells. *Cell*, 59(2), pp.293–303. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553267>.

- Daopin, S. et al., 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5068), pp.369–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1631557> [Accessed November 17, 2013].
- Deheuninck, J. & Luo, K., 2009. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell research*, 19(1), pp.47–57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3103856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 17, 2013].
- Deribe, Y.L., Pawson, T. & Dikic, I., 2010. Post-translational modifications in signal integration. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), pp.666–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495563> [Accessed March 7, 2013].
- Derynck, R. & Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β , 4.
- Ding, B., Sun, Y. & Huang, J., 2012. Overexpression of SKI oncoprotein leads to p53 degradation through regulation of MDM2 protein sumoylation. *The Journal of biological chemistry*, 287(18), pp.14621–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411991> [Accessed March 3, 2013].
- Doyle, A.J. et al., 2012. Mutations in the TGF- β repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nature genetics*, 44(11), pp.1249–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023332> [Accessed March 26, 2013].
- Ferrand, N., Atfi, A. & Prunier, C., 2010. The oncoprotein c-ski functions as a direct antagonist of the transforming growth factor- β type I receptor. *Cancer research*, 70(21), pp.8457–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959473> [Accessed March 21, 2013].
- Fuentealba, L.C. et al., 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*, 131(5), pp.980–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2200633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 8, 2013].
- Gareau, J.R. & Lima, C.D., 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(12), pp.861–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079294&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 3, 2013].

- Haglund, K. & Dikic, I., 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal*, 24(19), pp.3353–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1276169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 28, 2013].
- Hernández-Damián, J. et al., 2013. Downregulation of SnoN oncoprotein induced by antibiotics anisomycin and puromycin positively regulates transforming growth factor- β signals. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(11), pp.5049–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872350> [Accessed November 8, 2013].
- Heyman, H.C. & Stavnezer, E., 1994. A carboxyl-terminal region of the ski oncoprotein mediates homodimerization as well as heterodimerization with the related protein SnoN. *The Journal of biological chemistry*, 269(43), pp.26996–7003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929440>.
- Hinck, A.P. et al., 1996. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry*, 35(26), pp.8517–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8679613> [Accessed November 17, 2013].
- Ikeda, F. & Dikic, I., 2008. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” review series. *EMBO reports*, 9(6), pp.536–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2427391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2013].
- Kajino, T. et al., 2007. TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *The Journal of biological chemistry*, 282(13), pp.9475–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2175395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2013].
- Kokura, K. et al., 2003. The Ski-binding protein C184M negatively regulates tumor growth factor-beta signaling by sequestering the Smad proteins in the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry*, 278(22), pp.20133–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646588> [Accessed April 21, 2013].
- Komander, D. & Rape, M., 2012. The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry*, 81, pp.203–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524316> [Accessed November 8, 2013].

- Lan, H.Y., 2011. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *International journal of biological sciences*, 7(7), pp.1056–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3174390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Levati, L. et al., 2011. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. *Pigment cell & melanoma research*, 24(3), pp.538–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466664> [Accessed April 11, 2013].
- Levy, L. et al., 2007. Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Molecular and cellular biology*, 27(17), pp.6068–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1952153&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 11, 2013].
- Li, J. et al., 2012. Upregulation of ski in fibroblast is implicated in the peroxisome proliferator-activated receptor δ -mediated wound healing. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 30(4), pp.1059–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052247> [Accessed August 18, 2013].
- Li, Y. et al., 1986. Unique sequence, ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *Journal of virology*, 57(3), pp.1065–1072. Available at: <http://jvi.asm.org/content/57/3/1065.short> [Accessed April 21, 2013].
- Liu, C. & Li, H., 2011. In Silico Prediction of Post-translational Modifications. In B. Yu & M. Hinchcliffe, eds. *In silico Tools for Gene Discovery*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 325–340. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-61779-176-5> [Accessed February 27, 2013].
- Liu, X. et al., 2001. Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(1), pp.1–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610100000319>.
- Luo, K., 2004. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Current opinion in genetics & development*, 14(1), pp.65–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15108807> [Accessed April 21, 2013].
- Lyons, G.E. et al., 1994. Protooncogene c-ski is expressed in both proliferating and postmitotic

- neuronal populations. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 201(4), pp.354–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7894074>.
- Macdonald, M. et al., 2004. Control of cell cycle-dependent degradation of c-Ski proto-oncoprotein by Cdc34. *Oncogene*, 23(33), pp.5643–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122324> [Accessed April 21, 2013].
- Macías-Silva, M. et al., 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 87(7), pp.1215–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980228> [Accessed November 17, 2013].
- Macías-Silva, M. et al., 1998. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *The Journal of biological chemistry*, 273(40), pp.25628–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748228>.
- Marcelain, K. et al., 2012. Chromosomal instability in mouse embryonic fibroblasts null for the transcriptional co-repressor Ski. *Journal of cellular physiology*, 227(1), pp.278–87. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3138863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2013].
- Marcelain, K. & Hayman, M.J., 2005. The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene*, 24(27), pp.4321–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806149> [Accessed April 21, 2013].
- Massagué, J., Attisano, L. & Wrana, J.L., 1994. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends in cell biology*, 4(5), pp.172–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731645>.
- Mayya, V. et al., 2009. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Science signaling*, 2(84), pp.1–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690332> [Accessed February 28, 2013].
- Meulmeester, E. & Ten Dijke, P., 2011. The dynamic roles of TGF-β in cancer. *The Journal of pathology*, 223(2), pp.205–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957627> [Accessed March 8, 2013].
- Meyer, L.R. et al., 2013. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013. *Nucleic*

acids research, 41(Database issue), pp.D64–9. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/41/D1/D64.abstract> [Accessed November 15, 2013].

Moremen, K.W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V, 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(7), pp.448–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722607> [Accessed March 1, 2013].

Mosquera, J. et al., 2011. Identification of Ski as a target for Aurora A kinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 409(3), pp.539–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3132191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 9, 2013].

Mu, Y. et al., 2011. TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. *Nature communications*, 2(may), p.330. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3113296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 8, 2013].

Nagano, Y. et al., 2007. Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*, 282(28), pp.20492–501. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510063> [Accessed April 21, 2013].

Nagaraj, S.H., Gasser, R.B. & Ranganathan, S., 2007. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Briefings in bioinformatics*, 8(1), pp.6–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772268> [Accessed February 28, 2013].

Nagase, T. et al., 1990. Requirement of protein co-factor for the DNA-binding function of the human ski proto-oncogene product. *Nucleic acids research*, 18(2), pp.337–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=330272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Nagata, M. et al., 2010. Identification of a phosphorylation site in c-Ski as serine 515. *Journal of biochemistry*, 148(4), pp.423–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624875> [Accessed April 21, 2013].

Namciu, S. et al., 1995. Enhanced expression of mouse c-ski accompanies terminal skeletal muscle differentiation in vivo and in vitro. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 204(3), pp.291–300. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573720>.

- Nicol, R. & Stavnezer, E., 1998. Transcriptional repression by v-Ski and c-Ski mediated by a specific DNA binding site. *The Journal of biological chemistry*, 273(6), pp.3588–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452486>.
- Nomura, N. et al., 1989. Isolation of human cDNA clones of ski and the ski-related gene, sno. *Nucleic acids research*, 17(14), pp.5489–5500.
- Picard, N. et al., 2012. Identification of estrogen receptor β as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3 β . *Molecular and cellular biology*, 32(14), pp.2709–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3416183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 6, 2013].
- Radivojac, P. et al., 2010. Identification, Analysis and Prediction of Protein Ubiquitination Sites. *Proteins*, 78(2), pp.365–380.
- Ren, J. et al., 2008. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein engineering, design & selection: PEDS*, 21(11), pp.639–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2569006&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 25, 2013].
- Ren, J. et al., 2009. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics*, 9(12), pp.3409–3412. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19504496> [Accessed March 12, 2013].
- Rodríguez-Enríquez, S. et al., 2011. Oxidative phosphorylation as a target to arrest malignant neoplasias. *Current medicinal chemistry*, 18(21), pp.3156–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671858>.
- Shi, Y. & Massagué, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), pp.685–700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600>.
- Stavnezer, E. et al., 1986. Transforming Sloan-Kettering viruses generated from the cloned v-ski oncogene by in vitro and in vivo recombinations. *Journal of virology*, 57(3), pp.1073–1083.
- Stavnezer, E., Brodeur, D. & Brennan, L.A., 1989. The v-ski oncogene encodes a truncated set of c-ski

coding exons with limited sequence and structural relatedness to v-myc. *Molecular and cellular biology*, 9(9), pp.4038–4045.

Stroschein, S.L. et al., 2001. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes & development*, 15(21), pp.2822–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=312804&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2013].

Sutrave, P. & Hughes, S., 1989. Isolation and characterization of three distinct cDNAs for the chicken c-ski gene. *Molecular and cellular biology*, 9(9), pp.4046–4051. Available at: <http://mcb.asm.org/content/9/9/4046.short> [Accessed April 21, 2013].

Taelman, V.F. et al., 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 143(7), pp.1136–48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3022472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 25, 2013].

Teichler, S. et al., 2011. MicroRNA29a regulates the expression of the nuclear oncogene Ski. *Blood*, 118(7), pp.1899–902. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21685371> [Accessed March 28, 2013].

Vázquez-Macías, A. et al., 2005. Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS letters*, 579(17), pp.3701–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967445> [Accessed March 16, 2013].

Wakefield, L.M. & Hill, C.S., 2013. Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 13(5), pp.328–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612460> [Accessed May 23, 2013].

Wrana, J.L. et al., 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370(6488), pp.341–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8047140> [Accessed November 17, 2013].

Xue, Y. et al., 2008. GPS 2.0: Prediction of Kinase-Specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Molecular & cellular proteomics : MCP*.

Ye, F. et al., 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mediates a Ski oncogene-induced shift from glycolysis to oxidative energy metabolism. *The Journal of biological*

chemistry, 286(46), pp.40013–24. Available at:
[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?
artid=3220574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3220574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract) [Accessed March 16, 2013].

Zuo, W. et al., 2013. c-Cbl-Mediated Neddylation Antagonizes Ubiquitination and Degradation of the TGF- β Type II Receptor. *Molecular cell*, 49(3), pp.499–510. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290524> [Accessed March 7, 2013].

Apéndice B

Diseño de oligonucleótidos. Se muestran las características de los *primers* diseñados para la amplificación de Ski, así como los amplificadores obtenidos con las distintas reacciones. La posición indica el inicio del primer en la secuencia de aminoácidos de Ski. El producto muestra el tamaño en pares de bases que se espera como resultado de la reacción. JR: Taq polimerasa aislada por el Dr. Jorge Ramírez del Instituto de Fisiología Celular. Red: RED Taq Ready mix PCR Reaction Mix ®. Las reacciones para la amplificación del extremo carboxilo no han funcionado.

Blanco de amplificación	Oligo	Secuencia	Posición	Tm	Producto	Sitio de restricción	Enzima empleada
Fragmento interno de Ski	Forward (B)	5'-CACCTCGCCAGCGCCTTTC-3'	1121	61°	511	Ninguno	JR
	Reverse (C)	5'-CTTGCCGAGGTGCTCCAAC-3'	1613	61°		Ninguno	
Fragmento amino de Ski	Forward (A)	5'-GATAGGATCCGCACCATGGAAGCTGCAGC-3'	1	65.7	1,632	BamHI	JR
	Reverse (C)	5'-CTTGCCGAGGTGCTCCAAC-3'	1613	61		Ninguno	
Fragmento amino de Ski	Forward (A')	5'-GATAAGATCTACCATGGAAGCTGCAGCGGCCGG-3'	1	69.2	1,632	BglII	JR
	Reverse (C)	5'-CTTGCCGAGGTGCTCCAAC-3'	1613	61		Ninguno	
Fragmento carboxilo de Ski	Forward (B)	5'-CACCTCGCCAGCGCCTTTC-3'	1121	61°	1,057	XhoI	Red
	Reverse (D)	5'-GATACTCGAGGGGACCCAGCTCAGCGTTGC-3'	2,178	68.4		Ninguno	
Fragmento carboxilo de Ski	Forward (B)	5'-CACCTCGCCAGCGCCTTTC-3'	1121	61°	1,057	HindIII	Red

Apéndice B

Lista de soluciones empleadas en los experimentos

Buffer de corrida para geles de poliacrilamida 1X

25 mM Tris Base
192 mM Glicina
SDS

Buffer de transferencia 1X

25 mM Tris base
192 mM Glicina
20% Metanol absoluto

RIPA (modificado para ver interacciones)

50 mM Tris HCl pH 7.4
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0.5% Deoxicolato de sodio
1% Nonidet P40

TBS 10X

200 mM Tris base
1.37 M NaCl
38 mM HCL 1N
Ajustar pH a 7.6

TBS-T

TBS 10X
1% Tween20