



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS SKI Y SNON POR EL
ANTIBIÓTICO PUROMICINA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B.T. Karla Ameyali Gómez Ceja

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana Castro Obregón (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta (Facultad de Medicina, UNAM)

Ciudad de México. Abril, 2023



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.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la Tutoría de la Dra. Marina Macías Silva en el Instituto de Fisiología Celular. Este trabajo recibió el apoyo financiero del proyecto No. IN208118 de PAPIIT de la DGAPA, UNAM.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Erika P. Rendón Huerta y Dra. Susana Castro Obregón, por sus comentarios sobre mi trabajo.

A los miembros de mi Jurado de examen: Dr. Jesús Adolfo García Sainz, Dr. Víctor Bustamante Santillán, Dra. Paula Licona Limón, Dr. Fernando López Casillas y Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo, por la revisión de mi tesis y los comentarios sobre mi trabajo.

Al CONACyT por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría en el Programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

A la Biol. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del laboratorio, por su apoyo en el conocimiento de las técnicas básicas de bioquímica, biología celular y molecular.

A los miembros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortíz Benavides, por su apoyo con el mantenimiento del equipo del laboratorio.

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

A los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su apoyo técnico y servicios prestados: Dra. Ruth Rincón Heredia, Dr. Abraham Rosas Arellano, Med. Cir, Rodolfo Paredes Díaz.

A los miembros de la Unidad Bioterio del IFC, UNAM, por su apoyo técnico y servicios prestados: M.V.Z. Claudia V. Rivera, Cerecedo M.V.Z. Héctor Malangón Rivero y M. en IBB. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo proporcionado para el VII Congreso de Transducción de Señales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Marina Macías Silva por permitirme formar parte de su laboratorio, su apoyo y valiosas enseñanzas.

A la Biól. Marcela Sosa Garrocho por toda su ayuda y comprensión.

A Anabel Martínez Báez por su apoyo en la realización de experimentos y recolección bibliográfica.

A mis compañeros de laboratorio, Diana, David, Isa, Paula y Yuli por su apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio, gracias por su amistad y paciencia.

A los amigos que el posgrado y la investigación me dejaron, Galia, Fernando, Naray, Cintia, Nohemí y Alfredo.

A mis amigos Claudia, Alonso, Fernanda y Armando.

A mis padres Magos y Charlie, gracias por todo su apoyo, comprensión y cariño.

“Estamos hechos de una extraña mezcla de ácidos nucleicos y recuerdos, de sueños y proteínas, de células y palabras”.

- François Jacob

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
ABSTRACT	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
La superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β)	6
Vía canónica del TGF-β y su regulación	7
Las proteínas Ski y SnoN	10
Importancia biológica de Ski y SnoN	12
Modificaciones postraduccionales	14
El Sistema ubiquitina-proteosoma	15
Ligasas de ubiquitina tipo E3	16
Regulación de Ski y SnoN por el sistema UPS	17
El antibiótico puromicina	18
ANTECEDENTES	20
Regulación de los correpresores Ski y SnoN por los antibióticos anisomicina y puromicina	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL:	23
OBJETIVOS PARTICULARES:	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	28
La puromicina tiene diferentes efectos en las células	28
Las células AD293 (UB-Pr) y A543 (Pr) son un buen modelo de resistencia a puromicina	34
La N-acetil-puromicina induce la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma ..	36
La N-acetil-puromicina se puede incorporar de manera covalente a las proteínas	37
La incorporación de la N-acetil-puromicina a las proteínas es independiente del proceso de traducción	40
La puromicina y la N-acetil-puromicina inducen cambios en el patrón de ubiquitinación	41

Identificación de proteínas andamio como candidatas a participar en la degradación de Ski y SnoN inducida por la puromicina	42
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	58
PERSPECTIVAS.....	59
REFERENCIAS	60
ANEXO.....	66

ABREVIATURAS

ALK5:	<i>Activin-Like Kinase-5</i> (Receptor Tipo I del TGF- β)
ANS:	Anisomicina
BMP:	Proteína morfogenética de hueso
CHX:	Cicloheximida
DHD:	Dominio homólogo a <i>Dachshund</i>
GDF:	Factores de crecimiento y diferenciación
IP:	Inmunoprecipitación
MAPK:	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
μ g:	Microgramos
μ M:	Micromolar
MVP:	<i>Major Vault Protein</i>
NFI:	Nuclear Factor I
PTMs:	Modificaciones postraduccionales
PURO:	Puromicina
PML:	<i>Promyelocytic Leukaemia protein</i>
Pr:	Puromycin resistance
R-Smad:	Proteína Smad activada por receptor
RAR:	Receptor para ácido retinoico
SBE:	Elemento de unión a Smad
SUMO:	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
T β RI:	Receptor para TGF- β tipo 1
T β RII:	Receptor para TGF- β tipo 2
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante beta
UB:	Ubiquitina
VDR:	Receptor para vitamina D
WB:	<i>Western Blot</i>
WT:	<i>Wild type</i>

ABSTRACT

Transforming growth factor-beta (TGF- β) is a multifunctional cytokine involved in several cellular processes, such as: differentiation, proliferation, migration and apoptosis. TGF- β performs its functions by binding to type I and II transmembrane receptors with serine and threonine residue kinase activity, which promote downstream signaling through transcriptional factors called Smad.

Ski and SnoN are proteins that belong to the Ski family, are located mainly in the nucleus, and are key co-repressors of Smad. Alterations in their signaling can lead to various pathologies such as fibrosis and cancer. The protein stability of Ski and SnoN is mainly regulated by the TGF- β signaling pathway, since this cytokine causes a decrease in the protein levels of Ski and SnoN by promoting their polyubiquitination and degradation via the proteasome. It has been observed that in addition to signaling via TGF- β /Smad, the antibiotics anisomycin (ANS) and puromycin (PURO) are capable of negatively regulating the Ski and SnoN proteins, promoting their degradation via the proteasome.

PURO is a structural analogue of aminoacyl-tRNA and inhibits protein synthesis in both prokaryotic and eukaryotic cells and activates different signaling pathways, such as MAPKs (ERKs, JNKs, p38). In this regard, it has been observed that the acetylated form of PURO (N-acetyl-puromycin), which lacks its ribotoxic effects, surprisingly retains the ability to decrease the levels of Ski and SnoN proteins.

Based on the above, in this project it was found that N-acetyl-puromycin is capable of binding to proteins, in addition, it increases the level of ubiquitinated proteins. A mechanism is proposed by which it could negatively regulate Ski and SnoN proteins.

RESUMEN

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citocina multifuncional involucrada en diversos procesos celulares, tales como: la diferenciación, la proliferación, la migración y la apoptosis. El TGF- β realiza sus funciones mediante su unión a receptores transmembranales tipo I y II con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina, los cuales promueven la señalización río abajo, a través de los factores transcripcionales llamados Smad.

Ski y SnoN son proteínas que pertenecen a la familia Ski, se encuentran localizadas principalmente en el núcleo y son correpresores claves de las Smad. Alteraciones en su señalización pueden conducir a diversas patologías como la fibrosis y el cáncer. La estabilidad proteica de Ski y SnoN es principalmente regulada por la vía señalización del TGF- β , ya que esta citocina causa una disminución de los niveles proteicos de Ski y SnoN al promoverse su poliubiquitinación y degradación vía el proteosoma. Se ha observado que además de la señalización vía el TGF- β /Smad, los antibióticos anisomicina (ANS) y puromicina (PURO) son capaces de regular negativamente a las proteínas Ski y SnoN, promoviendo su degradación vía el proteosoma.

PURO es un análogo estructural del aminoacil-tRNA e inhibe la síntesis de proteínas tanto en células procariontas como en eucariotas y activa diferentes vías de señalización, como las MAPK (ERKs, JNKs, p38). A este respecto, se ha observado que la forma acetilada de PURO (N-acetil-puromicina) que carece de sus efectos ribotóxicos, sorpresivamente conserva la capacidad de disminuir los niveles de las proteínas Ski y SnoN.

Con base en lo anterior, en este proyecto se encontró que la N-acetil-puromicina es capaz de unirse a proteínas, además, aumenta el nivel de proteínas ubiquitinadas. Se propone un mecanismo por el cual pudiera regular de manera negativa a las proteínas Ski y SnoN.

INTRODUCCIÓN

La superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β)

La superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), comprende un gran grupo de factores de crecimiento, conformado por los TGF- β s, las activinas, las inhibinas, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), el ligando Nodal, la miostatina, los factores de crecimiento y de diferenciación (GDFs) y la hormona anti-Mülleriana (AMH). Estas citocinas y factores de diferenciación son capaces de regular diversos procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis (Hernández-Damián et al., 2013; Tecalco-Cruz et al., 2018).

En mamíferos se conocen 33 polipéptidos que pertenecen a la familia del TGF- β , entre ellos se encuentran las tres isoformas del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales son proteínas diméricas de 25-30 kDa que son sintetizadas y secretadas como precursores largos y en general son almacenadas en forma latente en la matriz extracelular; después de un estímulo específico, como el daño a algún tejido o en la inflamación, los precursores pueden ser procesados *in situ* por diversos mecanismos para convertirse en ligandos activos (Morika et al., 2016; Vázquez-Victorio et al., 2017). Los ligandos de esta familia se unen a receptores transmembranales con actividad de cinasas de serina y treonina (Vázquez-Victorio et al., 2017). Su sistema de señalización es muy similar para todos los miembros de la superfamilia, dado que todos requieren de los receptores transmembranales y de las proteínas Smads, efectores principales de las vías (Hernández-Damián et al., 2013).

Los TGF- β s juegan un papel pleiotrópico y crítico en el desarrollo embrionario y en organismos adultos. Además, pueden contribuir a la progresión de enfermedades como la fibrosis y el cáncer (Chanda et al., 2018). Las 3 isoformas del TGF- β comparten los mismos receptores y señalizan de manera similar, pero sus niveles de expresión son diferentes dependiendo del tejido, así mismo tienen

funciones diferentes de acuerdo con el fenotipo observado en ratones *knockout* (KO). El KO para la isoforma TGF- β 1 mostró una letalidad embrionaria y alrededor del 25% de los ratones murieron en el periodo perinatal debido a autoinmunidad; mientras que los ratones KO para las isoformas TGF- β 2 y TGF- β 3 mostraron letalidad embrionaria con defectos severos en el desarrollo (Akhurst & Hata, 2012; Vázquez-Victorio et al., 2017).

Entre las principales acciones biológicas del TGF- β se encuentra la inhibición de la proliferación celular en células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas y células del sistema inmune. Sin embargo, la acción del TGF- β depende del contexto celular, de la interacción con otras vías de señalización, de la presencia de alguna enfermedad y de la variación genética entre individuos (Akhurst & Hata, 2012).

Vía canónica del TGF- β y su regulación

La señalización del TGF- β (Figura 1) es iniciada por la unión del ligando a los receptores tipo II (T β RII) con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina, los cuales reclutan y transfosforilan a los receptores tipo I (T β RI/ALK5), con actividad de cinasa, en múltiples residuos de serina y treonina, dentro de un dominio rico en glicina-serina (GS). El receptor T β RI/ALK5 activo induce la activación de las proteínas Smad fosforilándolas. Las proteínas SMAD deben su nombre a las proteínas MAD (*mother against decapaplegic*) y SMA (*small body size*) descubiertas en *Drosophila* y *C. elegans*, respectivamente. La identificación posterior de sus homólogos en vertebrados llevó a simplificar el nombre juntando el nombre de ambas proteínas (SMA + MAD = SMAD). Las proteínas SMAD se pueden clasificar en 3 diferentes subclases, basadas en su estructura y función: Smads reguladas por receptor (R-Smads); Smad común (Co-Smad) y Smads inhibitorias (I-Smad) (Massagué, 1998; Miyazono, 2000; Vázquez-Victorio et al., 2017).

Tras la fosforilación de las R-Smad (Smad2 y Smad3) por el receptor T β RI (ALK5), estas forman complejos heterotriméricos con la Co-Smad (Smad4) y se translocan al núcleo, en donde se asocian con otros factores de transcripción para

unirse al DNA y regular la expresión de sus genes blanco, junto con otros factores transcripcionales y correguladores (Miyazono, 2000; Vázquez-Macías et al., 2005).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas Smad

Clases de Smad	
R-Smads	Smad 2 y 3 (específicos de TGFβ/activina)
	Smad 1, 5 y 8 (específicos de BMPs)
Co-Smad	Smad 4
I-Smads	Smad 6 (regula BMPs) Smad 7 (regula TGFβ y BMPs)

Las proteínas Smad tienen dominios N-terminal y C-terminal altamente conservados, conocidos como dominios MH1 (*Mad-homology 1*) y MH2 (*Mad-homology 2*), respectivamente, y una región *linker* variable entre estos dominios (Massagué, 1998). A través del dominio MH1, las R-Smad (a excepción de la Smad2, la cual tiene un inserto de 30 residuos de aminoácidos) y Smad4 se unen al DNA, las I-Smad únicamente tienen segmentos cortos del dominio MH1. Además, este dominio contiene una secuencia de localización nuclear NLS (del inglés, *Nuclear Localization Signal*). En condiciones basales, el dominio MH1 inhibe la actividad transcripcional del dominio MH2 por interacción entre estos dos dominios (Chaikuad & Bullock, 2016; Massagué, 1998; Vázquez-Victorio et al., 2017). El dominio MH2 contiene 3 elementos estructurales principales: uno al final en forma de lámina β-plegada, en el centro una triple hélice y al final en su cola C-terminal se encuentra el motivo Ser-X-Ser o SXS presente únicamente en las R-Smads, el cual es fosforilado por el receptor tipo I activado (Macias-Silva, 2010; Chaikuad & Bullock, 2016).

La señal del TGF-β regula la transcripción de más de 500 genes, los cuales tienen uno o más elementos de unión a las Smad conocidos como SBEs (del inglés *Smad-Binding Elements*) en su región promotora. La señalización del TGF-β está regulada tanto de manera positiva como negativa de manera estricta a través de múltiples mecanismos. Las señales del TGF-β pueden controlar la expresión de sus

propios reguladores, generando un asa de retroalimentación negativa, la cual involucra la asociación de correpresores transcripcionales con las Smads, como TGIF, Ski y SnoN. Los correpresores se asocian directamente con los complejos R-Smad/Smad4, para reprimir su transactivación y regular negativamente la vía del TGF- β (Chanda et al., 2018; Miyazono, 2000; Vázquez-Macías et al., 2005).

El TGF- β también puede inducir la expresión de las proteínas Smad inhibitorias como Smad7, la cual bloquea el acceso de Smad2 y Smad3 al dominio de cinasa de los receptores tipo I. Además, Smad7 es capaz de reclutar a fosfatasa y a ligasas de ubiquitina E3 al receptor tipo I activado, para regular la magnitud y duración de la vía de señalización (Vázquez-Victorio et al., 2017).

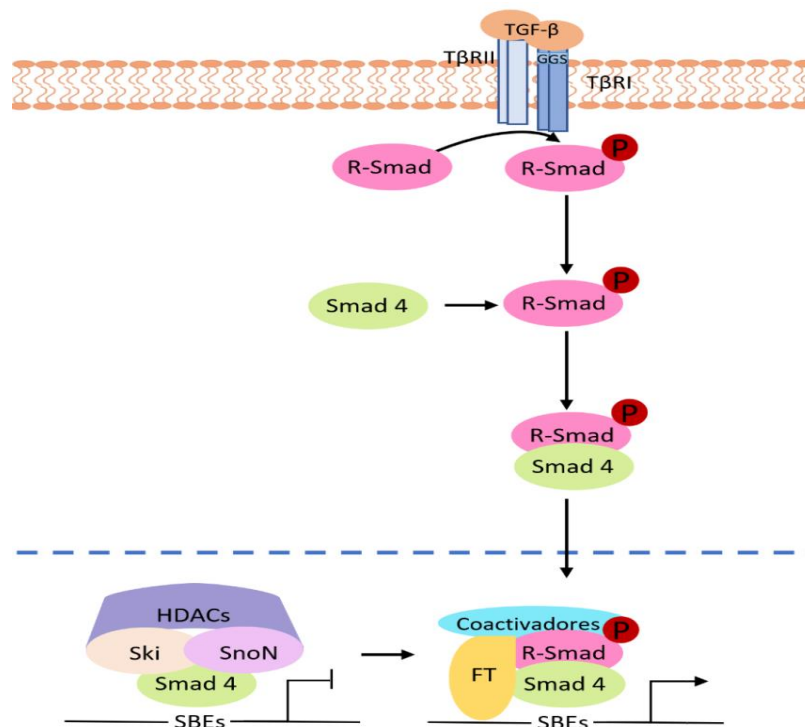


Figura 1. Señalización canónica del TGF- β . La señal comienza cuando el TGF- β se une al T β RII, el cual recluta y transfosforila al T β RI en su dominio GS activando su motivo de cinasa y promoviendo así la fosforilación de las R-Smads, estas se asocian a la Smad4 y se translocan al núcleo donde regulan la expresión de genes blanco interactuando con otros factores transcripcionales (FT) y coactivadores en regiones de unión a Smads (SBEs). A manera de regular negativamente la vía del TGF- β , en condiciones basales en los sitios SBEs se encuentran los correpresores Ski y SnoN, interactuando de manera indirecta con DNA a través de Smad4, reclutando deacetilasas de histonas (HDACs) y otros correpresores, impidiendo la transcripción de genes.

Las proteínas Ski y SnoN

Las proteínas Ski y SnoN son cofactores transcripcionales que pertenecen a la familia Ski, se encuentran localizadas principalmente en el núcleo y pueden inducir la transformación de las células cuando se sobre-expresan, por lo que son consideradas proto-oncoproteínas (Tecalco-Cruz et al., 2018; Vázquez-Victorio et al., 2017). Ambas proteínas tienen efectos biológicos importantes durante la embriogénesis y en la homeostasis de organismos adultos, controlando estos efectos mediante su participación en la vía del TGF- β (Vázquez-Victorio et al., 2017). Esta tarea la llevan a cabo al interrumpir la interacción de las Smads con co-activadores transcripcionales, al interaccionar directamente con las proteínas R-Smad y con Smad4, impidiendo al complejo de proteínas Smad activar la transcripción de genes blanco del TGF- β (Deheuninck & Luo, 2009). Ski y SnoN funcionan como correpresores transcripcionales al formar un complejo inhibitorio con las proteínas Smad, uniéndose al DNA de forma indirecta a la secuencia SBE consenso 5'-GTCTAGAC-3' y reclutando deacetilasas de histonas (HDACs) y correpresores adicionales para inhibir la expresión de genes (Figura 1) (de Boeck & ten Dijke, 2012; Tecalco-Cruz et al., 2018).

El análisis de la estructura cristalográfica de Smad4, mostró que Ski y p-Smad2 compiten por la unión de Smad4 en la misma región, sugiriendo que la unión de Ski a Smad4 se da por desplazamiento de Smad2/3 fosforilado, irrumpiendo los complejos heteroméricos (Deheuninck & Luo, 2009).

El nombre de Ski proviene del lugar donde fue descubierto, el *Sloan Kettering Institute*. El gen que codifica para Ski fue descrito por primera vez al ser identificada la forma viral *v-Ski* insertada en el genoma del retrovirus *Sloan-Kettering*; posteriormente, se encontró la presencia de un proto-oncogen en pollos, denominado *c-Ski* (gen celular), el cual era homólogo a *v-Ski* (Vázquez-Victorio et al., 2017). El gen humano *ski* se encuentra localizado en el cromosoma 1p36.3 (Deheuninck & Luo, 2009), pero su regulación no ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, se conocen algunos factores capaces de inducir la expresión de *ski*, como SRF (factor de respuesta a suero), PPAR δ (receptor de peroxisoma-

proliferador-activado δ) y RA (receptor de ácido retinoico) (Vázquez-Victorio et al., 2017).

La proteína humana c-Ski tiene 728 aminoácidos (Figura 2), la región N-terminal de Ski es altamente conservada entre diferentes especies y entre todos los miembros de la familia Ski. Esta región contiene dos dominios altamente conservados: el dominio Ski-DHD (dominio homólogo a *Dachshund*) y el dominio tipo-SAND. Ski-DHD comprende una región de 91-192 residuos y no puede unirse al DNA; sin embargo, tiene la capacidad de ser un dominio de unión a las R-Smads y a algunos factores transcripcionales como Skip y NCoR. El dominio SAND, cuyo nombre deriva de las proteínas: Sp100, AIRE1, NucP41/75 y DEAF-1, comprende los residuos 219-312 y tiene un motivo *I-loop*, responsable de su asociación con Smad4 (Vázquez-Victorio et al., 2017).

Por otro lado, el gen *sno* (*Ski novel gene*) se localiza en el cromosoma 3q26.2 y codifica para la proteína SnoN de 684 aminoácidos; sin embargo, se han reportado diferentes isoformas por *splicing* alterativo. SnoN2, que presenta una delección de 46 aminoácidos en el exón 3; Sno1, que está compuesto por los primeros 399 residuos de SnoN; y SnoA, que tiene un extremo C-terminal más corto que SnoN (Deheuninck & Luo, 2009). Todas las isoformas se expresan ubicuamente, a excepción de Sno1, la cual se expresa mayoritariamente en el músculo esquelético. Las 4 isoformas se han identificado tanto en *Drosophila* como en humanos, mientras que en el ratón únicamente se expresan las isoformas SnoN y SnoN2 (Tecalco-Cruz et al., 2018).

SnoN, al pertenecer a la familia de proteínas Ski, de igual manera presenta un dominio DHD en su región N-terminal y un dominio tipo-SAND, pero se diferencia por tener en su región C-terminal un dominio variable empleado para la homodimerización y también para heterodimerizar con Ski (Vázquez-Victorio et al., 2017). Cabe mencionar que Ski y SnoN comparten una homología de alrededor del 50% de aminoácidos (36% de identidad) (Deheuninck & Luo, 2009).

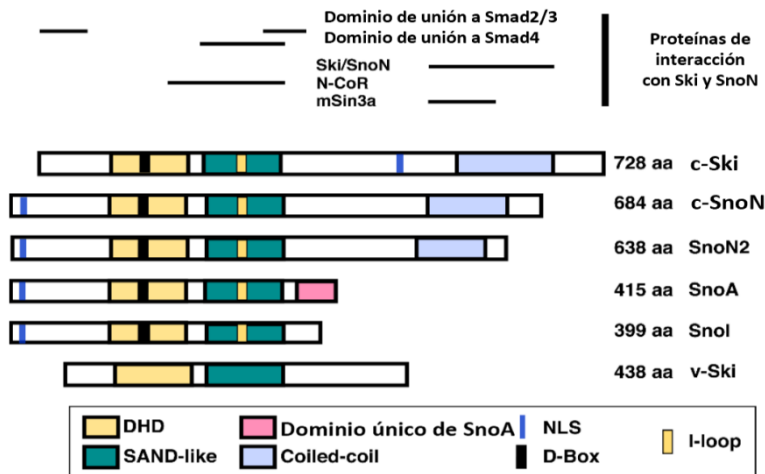


Figura 2. Isoformas y dominios estructurales de Ski y SnoN. Para Ski se conocen la forma viral (v-Ski) y celular (c-Ski), mientras que para SnoN se conocen 4 isoformas por procesamiento alternativo de mRNA, ambas proteínas poseen dominios DHD y tipo SAND. Imagen modificada de Vázquez-Victorio et al., 2017.

Importancia biológica de Ski y SnoN

En particular, Ski actúa como un potente inhibidor de factores transcripcionales como Smads y Gli3. También regula negativamente las vías de BMP, Hippo, Hedgehog, vitamina D y ácido retinoico. Por ejemplo, Ski reprime la expresión de algunos genes blanco de BMP, mediante su unión directa con el correpresor HIPK2 (homodominio de interacción de la proteína cinasa 2) en mioblastos de ratón. Se ha observado que Ski también funciona como un coactivador, al asociarse con la familia de factores de transcripción NF1 (*factor nuclear 1*). Ski favorece la señal de β -catenina promoviendo la expresión de los genes *Mitf* y *Nr-CAM* en melanoma. También se ha visto que favorece la expresión de *miogenina* y la miogénesis por la formación de un complejo con factores de transcripción específicos como MyoD, Six1 y Eya3 (Tecalco-Cruz et al., 2018).

Ski juega un papel importante en el desarrollo embrionario; en ratones la deficiencia de Ski resulta ser letal para el embrión, como consecuencia de alteraciones en el cierre del tubo neural, anomalías en estructuras craneofaciales, malformaciones en el ojo y disminución de la masa muscular (Tecalco-Cruz et al., 2018), Ski también es importante en tejidos adultos, ya que regula los linajes neurales y musculares. En ratones, la pérdida de *ski* lleva a una

reducción de la masa muscular, mientras que su sobreexpresión causa hipertrofia muscular (Deheuninck & Luo, 2009).

La desregulación de Ski está asociada a enfermedades como fibrosis o cáncer. En la fibrosis, Ski parece ser regulado en los tejidos dérmicos, su sobreexpresión favorece la reparación de heridas en ratas con heridas dérmicas, e inhibe la formación de cicatrices en el modelo de cicatriz hipertrófica de orejas de conejo (Li et al., 2011). Por otro lado, en cáncer el rol de Ski depende del contexto celular, en algunas situaciones su sobreexpresión favorece la formación del tumor, pero en otros, su reducción también promueve la carcinogénesis. De igual forma, Ski tiene implicaciones en enfermedades genéticas, como es el caso del síndrome humano *Shprintzen-Goldberg*, en donde se han observado deleciones *in-frame* en el gen *ski*, encontrándose mutaciones restringidas al exón 1, dentro del dominio de unión a R-Smad de Ski. En consecuencia, estas mutaciones en *ski* causan anomalías craneofaciales, cardiovasculares, neuromusculares y esqueléticas (Carmignac et al., 2012; Tecalco-Cruz et al., 2018; Vázquez-Victorio et al., 2017).

Por su parte, SnoN impacta en otras vías de señalización además de la vía del TGF- β , por ejemplo, actúa como coactivador para ER (receptor de estrógeno), también puede estabilizar diferentes componentes como p53, TAZ y STAT5. Además, SnoN se ha asociado con elementos de la vía Hippo para inducir la transformación y promover la transición epitelio-mesénquima en células de cáncer de mama (Vázquez-Victorio et al., 2017). Se ha evaluado el papel de SnoN en el desarrollo embrionario mediante la generación de mutaciones en su gen; en ratones carentes del gen de *sno*, se observó en un primer ratón letalidad embrionaria, mientras que en un segundo ratón su desarrollo fue viable, pero presentó alteraciones en la función de las células T. En cuanto a la neurogénesis, se ha observado que SnoN es un promotor del crecimiento axonal (Deheuninck & Luo, 2009; Tecalco-Cruz et al., 2018).

Al igual que Ski, SnoN se encuentra asociado al desarrollo de fibrosis y cáncer. En el caso de la fibrosis, la sobreexpresión de SnoN inhibe la actividad profibrótica del TGF- β . En ratas con nefropatía diabética, al ser tratadas con el

inhibidor del proteosoma, MG132, se incrementan los niveles de SnoN, disminuyendo el daño al riñón. En cuanto al cáncer, se han encontrado altos niveles de SnoN en diferentes tipos de cáncer como: linfoma, cáncer de mama, melanoma, carcinoma colorrectal, carcinoma de células escamosas de esófago y tumores de estroma gastrointestinal. Sin embargo, en muestras de cáncer colorrectal, el 39% de los casos presentan bajos niveles de SnoN y 33% muestran niveles altos, por lo que los altos niveles de expresión de SnoN no siempre favorecen la carcinogénesis, ya que depende del tipo de cáncer y de su etapa (Deheuninck & Luo, 2009; Vázquez-Victorio et al., 2017).

Cabe resaltar que a pesar de la alta homología entre Ski y SnoN, sus actividades no son funcionalmente redundantes, cada una de estas proteínas presentan funciones específicas.

Modificaciones postraduccionales

Las células responden a diversas señales mediante cambios en sus moléculas, en donde las proteínas forman parte importante. Las proteínas son reguladas por modificaciones químicas reversibles conocidas como modificaciones postraduccionales (PTMs), las cuales ayudan a regular su estabilidad, su asociación con otras biomoléculas y su localización subcelular, teniendo importantes consecuencias funcionales para la respuesta a diversos estímulos. Entre las múltiples PTMs se encuentran: la fosforilación, la glicosilación y la ubiquitinación en residuos específicos de aminoácidos (Chanda et al., 2018). La ubiquitinación es una modificación por conjugación de la ubiquitina (UB), una pequeña proteína de 8.5 kDa, que se conjuga a residuos de lisina (Lys o K) en sus proteínas blanco, mediante un residuo de glicina (Gly76) de su extremo C-terminal (de Boeck & ten Dijke, 2012).

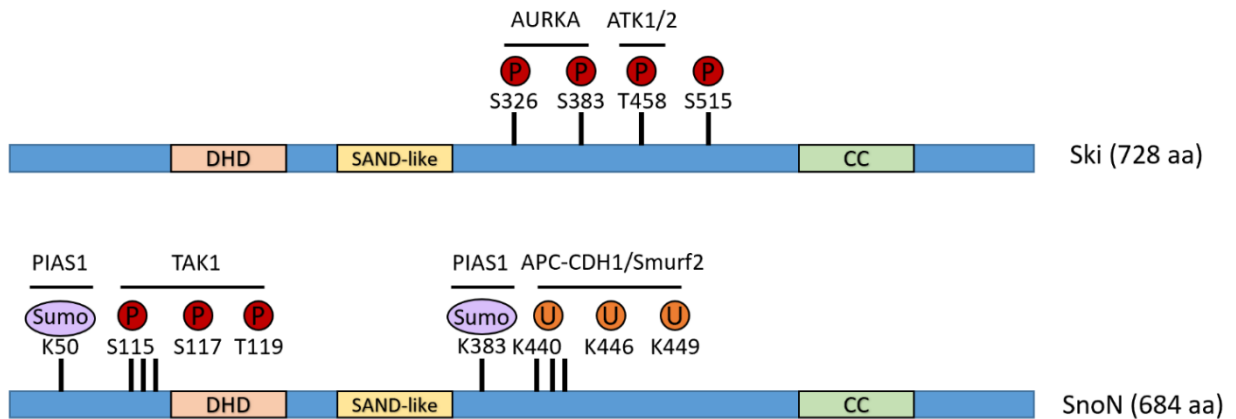


Figura 3. Modificaciones postraduccionales encontradas en las proteínas Ski y SnoN. Se observan las enzimas y sus respectivas modificaciones en los aminoácidos blanco que se han encontrado.

El Sistema ubiquitina-proteosoma

El sistema de ubiquitina-proteosoma (UPS, del inglés *Ubiquitin-Proteasome System*) se encarga de la degradación regulada de las proteínas intracelulares que se encuentran dañadas, mal plegadas o anormales; además, el UPS regula la concentración de proteínas cuyos niveles varían con el tiempo y con cambios en el estado de la célula, como el ciclo celular o la respuesta al estrés. La proteólisis también sirve para activar o modular circuitos específicos. Por ejemplo, los activadores y represores en eucariontes son proteínas de vida media corta que son degradadas vía el UPS, a velocidades moduladas espacio-temporalmente bajo una fina regulación fisiológica (Schwartz & Ciechanover, 2009; Varshavsky, 2012).

El proceso de degradación de proteínas vía el UPS ocurre en dos pasos: la unión covalente de cadenas de poliubiquitina a la proteína blanco y la degradación de la proteína marcada por el complejo proteosoma 26S. La conjugación de la molécula de ubiquitina, un polipéptido altamente conservado de 76 residuos de aminoácidos, a la proteína blanco, ocurre en tres pasos. Primero, la enzima activadora de ubiquitina, E1, activa el carbonilo terminal de un residuo de glicina de la ubiquitina a un tiol éster de alta energía con un residuo de cisteína interno de la E1. Una de varias enzimas E2 (proteínas portadoras de ubiquitina) transfiere la

ubiquitina activada, a través de un intermediario E2~ubiquitina tiol éster, a un sustrato que se une específicamente a un miembro de la familia de ligasas de ubiquitina tipo E3. Las ligasas E3 catalizan el último paso en el proceso de conjugación, que es la unión covalente de la ubiquitina al sustrato. En la mayoría de los casos, se transfiere la ubiquitina al ϵ -NH₂ de un residuo de lisina de la proteína blanco. En reacciones sucesivas, se sintetiza una cadena de poliubiquitina por transferencia progresiva de ubiquitinas activadas a un residuo de lisina de la ubiquitina previamente conjugada. La cadena de poliubiquitinas sirve como un marcador de reconocimiento para el proteosoma 26S (Schwartz & Ciechanover, 2009).

Ligasas de ubiquitina tipo E3

Como se mencionó previamente, las ligasas de ubiquitina E3 son los componentes finales en la cascada de ubiquitinación. Estas presentan especificidad tanto de sustrato como de cadena, por lo que una ligasa E3 puede promover la degradación de sus sustratos por cadenas de UB, mientras otra ligasa E3 mediante la ubiquitinación puede regular la localización celular de su sustrato (de Boeck & ten Dijke, 2012). Otras funciones de la ubiquitinación pueden ser para señalar, para la reparación del DNA y para la regulación de las histonas (Bauer, J. et. al., 2016). El proteoma humano codifica para más de 600 diferentes ligasas E3, estas pueden dividirse en 3 clases: RING (*Really Intereseting New Gene*), con alrededor de 600 miembros; HECT (*Homologous to E6AP C-Terminus*), con cerca de 28 miembros y las E3s RBR (*RING between RING*) con 14 miembros (Weber et al., 2019).

Las ligasas E3 RING actúan como proteínas andamio o *scaffold*, ya que median la ubiquitinación al acercar la E2 a la proteína sustrato. Por otro lado, las ligasas E3 HECT y RBR catalizan la ubiquitinación del sustrato en dos pasos, al aceptar la forma activada de UB de E2 y transfiriéndola a la lisina blanco del sustrato. En las HECT se encuentran diferentes familias, siendo la NEDD4 la mejor caracterizada con nueve miembros: ITCH, SMURF1, SMURF2, WWP1, WWP2, NEDD4, NEDD4-2, HECW1 y HECW2 (Weber et al., 2019).

Podemos encontrar Smurfs regulando la vía del TGF- β , cuando la vía esta activa, Smad7 recluta a Smurf2, formando un complejo que es exportado del núcleo al citoplasma. Smad7 dirige a Smurf2 a los receptores del TGF- β para marcarlos con ubiquitina e inducir su degradación. Las proteínas Smurfs también actúan regulando los niveles de Smads. Smurf1 ubiquitina a Smad1 y Smad5, mientras que Smurf2 marca a Smad1 y Smad2 para su degradación (de Boeck & ten Dijke, 2012).

En cuanto a las ligasas E3 tipo RING se tienen ampliamente estudiadas a SCF (Skp1-Cullin-F-box) y APC (Metzger, M., et. al., 2014). Dentro de las ligasas E3 RING se encuentra también Arkadia, la cual se ha demostrado que regula la vía del TGF- β al tener como proteínas blanco a Ski, SnoN y Smad7 (Nagano et al., 2007).

Regulación de Ski y SnoN por el sistema UPS

Bajo condiciones basales el complejo SnoN/Ski/Smad4 se une y reprime al promotor de genes blanco del TGF- β . Tras la activación de la señalización del TGF- β , las R-Smads fosforiladas se translocan al núcleo, en donde reclutan a las ligasas de UB para inducir la poliubiquitinación de Ski y SnoN para promover su degradación vía el sistema UPS (de Boeck & ten Dijke, 2012; Tecalco-Cruz et al., 2018).

Se han identificado tres principales ligasas de ubiquitina E3 que se asocian con SnoN: APC (*anaphase-promoting complex*), Smurf2 (*Smad-ubiquination-related factor 2*) y Arkadia (Figura 4). La ligasa Smurf2 interacciona con Smad2 formando un complejo que recluta a SnoN. En el caso de APC, se une a Smad2 y Smad3 para promover la poliubiquitinación de SnoN. En cuanto a Arkadia, ha sido identificada como un regulador positivo de la señalización del TGF- β . Arkadia se asocia con Ski y SnoN y cataliza su poliubiquitinación de manera dependiente del reclutamiento del complejo Smad2/Smad3 activado. En el caso de SnoN, sus lisinas K440, K446, y K449 son blanco de ubiquitinación (Figura 3), mientras que para Ski estos residuos

no se encuentran conservados y hasta el momento no han sido identificadas las posibles lisinas blanco de poliubiquitinación en Ski (Tecalco-Cruz et al., 2018).

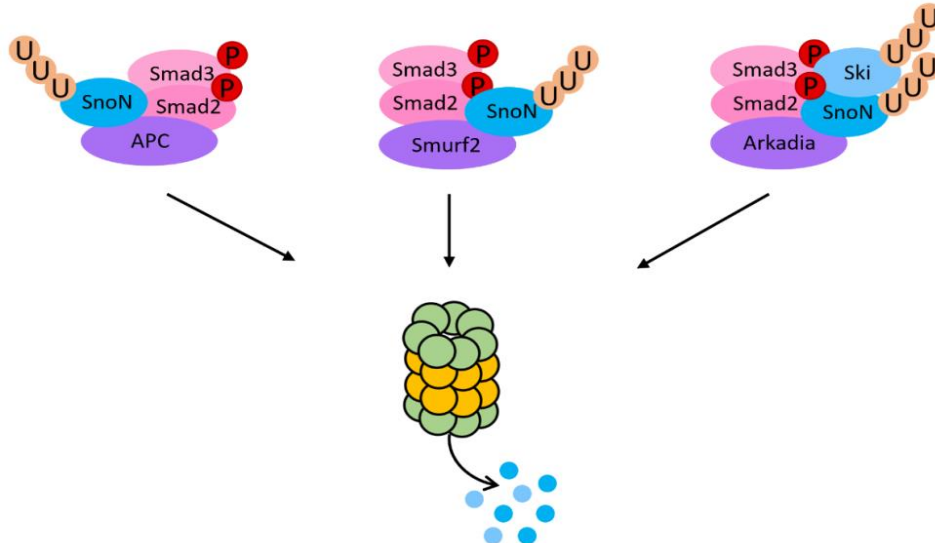


Figura 4. Modulación de las proteínas SnoN y Ski por el sistema UPS. El TGF- β induce la degradación de Ski y SnoN mediante el sistema UPS, las R-Smads fosforiladas actúan como adaptadores de las ligasas de ubiquitina; como Arkadia que interactúa con Ski y SnoN, APC y Smurf2 con SnoN.

De manera interesante, cabe destacar que la regulación de SnoN por TGF- β es bifásica, es decir que causa su degradación de manera rápida y transitoria, para posteriormente incrementar sus niveles, estableciendo un asa de retroalimentación negativa en la señalización del TGF- β (Tecalco-Cruz et al., 2018).

El antibiótico puromicina

El antibiótico PURO es un aminonucleósido derivado de la bacteria *Streptomyces alboniger* y es un análogo estructural del aminoacil-tRNA que inhibe la síntesis de proteínas, tanto en células procariontas como eucariotas. PURO se une al sitio A del ribosoma y funciona como aceptor en la reacción catalizada por la peptidil-transferasa. Sin embargo, al no interactuar con el codón, su derivado aminoacilo no se puede unir al nucleósido mediante un enlace éster, por lo que no

puede servir como péptido dador, dando así lugar a la terminación prematura de la traducción y conduce a la liberación del complejo peptidil-puromicina (Devlin, 2000).

Otro antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas es anisomicina (ANS), el cual es una pirrolidina aislada de *Streptomyces griseolus*, que tiene actividad como antiprotozoario y antifúngico. ANS inhibe la traducción al unirse a la subunidad 60S del ribosoma de células eucariotas, por lo tanto, inhibe la formación del enlace peptídico, previene la elongación y causa la estabilización del polirribosoma al suprimir la reacción de la peptidil-transferasa. El sitio de unión de ANS se encuentra en el rRNA 28S (dominio V), el cual es parte del centro de la peptidil-transferasa (Macías-Silva et al., 2010).

Ambos antibióticos, ANS y PURO, causan estrés ribotóxico, así como la activación de las MAPKs. En el caso de ANS, se ha observado un comportamiento como agonista en la activación de MAPK. Además, ANS activa a otras vías de señalización como las que involucraría: PI3K, AKT, IRS, NFκB, ROS, S6 p70/p85S6K, Ee2F cinasa, PPARγ, HSF1, y HDAC1 (Hernández-Damián et al., 2013); también se ha estudiado su efecto pro-apoptótico y pro-anoikis (un tipo de muerte celular similar a la apoptosis, pero inducida por la ausencia de anclaje a la matriz extracelular). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales estos antibióticos ejercen sus efectos independientes del estrés ribotóxico. Con base en la evidencia reportada se puede suponer que PURO tiene efectos similares a los de la anisomicina. La super-inducción de genes tempranos como *c-fos* y *c-jun* es otro de los efectos de la ANS y PURO. La super-inducción de genes es un fenómeno caracterizado por un aumento prolongado en la expresión de genes tempranos que usualmente son inducidos transitoriamente (Vázquez-Macías et al., 2005; Macías-Silva et al., 2010).

ANTECEDENTES

Regulación de los correpresores Ski y SnoN por los antibióticos anisomicina y puromicina

Las modificaciones postraduccionales controlan la función y la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN. A la fecha, la vía canónica del TGF- β es la principal ruta de regulación de los niveles proteicos de Ski y SnoN, al promover su poliubiquitinación y su posterior degradación vía el proteosoma.

De manera interesante, los antibióticos ANS y PURO han mostrado tener un efecto de regulación sobre Ski y SnoN, similar al TGF- β . Se demostró, que ANS ejerce una regulación negativa de Ski y SnoN en las líneas celulares HeLa (células epiteliales humanas de adenocarcinoma de cérvix) y A549 (células epiteliales humanas de carcinoma de pulmón), pero no en HepG2 (células epiteliales humanas de carcinoma hepatocelular), sugiriéndose que esta regulación es dependiente del contexto celular. Además, al emplear un inhibidor del proteosoma, los niveles de ambas proteínas no se ven afectados en presencia de ANS, por lo que la forma en la cual ANS regula negativamente a las proteínas Ski y SnoN es por medio del UPS (Vázquez-Macías et al., 2005).

En las células A549 y A7 (células humanas de melanoma), se evaluó el efecto de ambos antibióticos: ANS y PURO, observándose una disminución en los niveles de SnoN en las células A549 y de ambos Ski y SnoN en las células A7. Para prevenir el efecto ribotóxico y comprobar que el efecto de los antibióticos no está dado por sus acciones sobre el ribosoma, se transfectaron a las células AD293 con un plásmido que incluye un gen que confiere resistencia a PURO, el cual codifica para una N-acetil transferasa de puromicina, dando lugar a la N-acetil-puromicina, la cual no es capaz de unirse al ribosoma. De manera interesante, la N-acetil-puromicina fue capaz de causar la regulación negativa de Ski y SnoN, independientemente de la activación de MAPK. También es importante mencionar que al bloquear al receptor T β RI, se inhibe la degradación de SnoN inducida por ANS. A este respecto, se propone que se requiere de las Smads fosforiladas para inducir la degradación

de SnoN en respuesta a ANS. De igual manera, el hecho de que solo en contextos celulares específicos se observa el efecto de los antibióticos se puede suponer que podría deberse a la existencia de elementos adicionales, no identificados en esos contextos, que formen parte de los complejos de destrucción SnoN/Smads/Ligasa de ubiquitina (Figura 5) (Hernández-Damián et al., 2013).

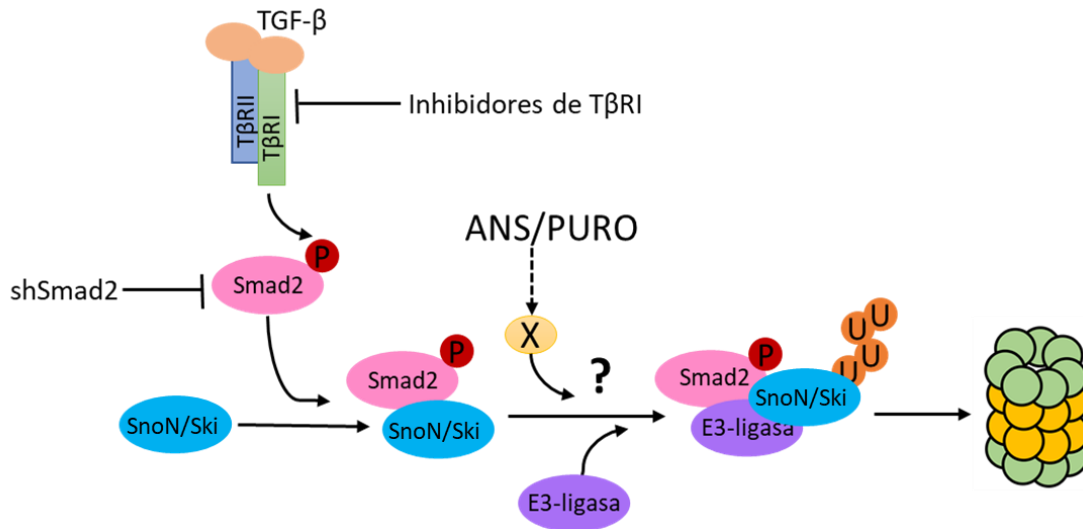


Figura 5. Modulación de la proteína SnoN por los antibióticos anisomicina (ANS) y puromicina (PURO). En un estado basal, P-Smad puede formar complejos con SnoN y Ski, los antibióticos promueven el reclutamiento de ligasas y otros elementos (proteína X), aún no identificados para promover la ubiquitinación y degradación de SnoN y Ski vía proteosoma (Hernández-Damián, J. 2013.)

La proteína Ski no está tan estudiada como SnoN y se suele suponer que Ski y SnoN son regulados por mecanismos similares, por lo que en el planteamiento de este proyecto se asumió que el mecanismo molecular por el cual ocurre la degradación de SnoN en respuesta a los antibióticos podría ocurrir de manera similar o igual para Ski. Por lo tanto, se propuso investigar el mecanismo de acción de PURO para regular los niveles de las proteínas Ski y SnoN, y determinar si pueden estar participando los mismos componentes para ambas proteínas.

JUSTIFICACIÓN

Ski y SnoN son proteínas con una alta relevancia biológica al regular diversos procesos fisiológicos importantes en la homeostasis y participar como correpresores en la vía del TGF- β . Alteraciones en sus niveles basales de expresión da lugar al desarrollo de enfermedades como el cáncer o la fibrosis. El estudio de su degradación mediante otros estímulos, como el ejercido por el antibiótico PURO, pero empleando como herramienta al análogo N-acetil-puromicina, ayudará a una mayor comprensión de las funciones de ambas proteínas, sin el efecto ribotóxico que presenta PURO.

Cabe mencionar que se desconoce el mecanismo por el cual PURO induce la ubiquitinación y degradación de las proteínas Ski y SnoN por el proteosoma, así como si tiene otros efectos celulares, por lo que es importante caracterizarlos.

HIPÓTESIS

La N-acetil-puromicina conserva la capacidad que tiene el antibiótico puromicina de unirse de forma covalente a múltiples proteínas y de inducir la ubiquitinación de diversas proteínas, ayudando a la unión de proteínas que favorecen la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el mecanismo por el cual el antibiótico PURO, empleando su análogo N-acetil-puromicina, induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de las proteínas Ski y SnoN.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Investigación bibliográfica sobre los diversos efectos de PURO en las células, así como identificar sus efectos relacionados con la degradación de proteínas.
2. Evaluar el efecto de la N-acetil-puromicina sobre los niveles de Ski y SnoN en las células AD293 (UB-Pr) y A549(Pr).
3. Determinar si la N-acetil-puromicina se une de forma covalente a las proteínas totales de células epiteliales.
4. Evaluar si la N-acetil-puromicina modifica el patrón de ubiquitinación de las proteínas totales de células epiteliales.
5. Investigación bibliográfica y análisis *in silico* sobre las interacciones de Ski y SnoN con otras proteínas, así como identificar a los factores implicados en la degradación de proteínas vía el proteosoma.
6. Proponer una estrategia experimental para determinar el mecanismo por el cual la N-acetil-puromicina causa la degradación de las proteínas Ski y SnoN vía el proteosoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

El TGF- β recombinante humano fue adquirido de PeproTech (Cranbury, NJ USA). Los antibióticos anisomicina (ANS), cicloheximida (CHX) y puromicina (PURO) fueron adquiridos de Sigma (St Louis, MO). El inhibidor del proteosoma MG132 se obtuvo de Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Los medios de cultivo DMEM, Hams F12 y la solución de penicilina/estreptomicina fueron obtenidos de la casa Comercial Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA). La Proteína G acoplada a Agarosa fue adquirida de Millipore (Burlington, MA). El Suero Fetal Bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) se adquirió de Biowest (Riverside, MO). Los anticuerpos primarios: anti-puromicina monoclonal fueron de Kerfast (Boston, MA), mientras que el anti-SnoN policlonal (H-317), el anti-Ski policlonal (G8) y el anti-ubiquitina fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas). Los anticuerpos secundarios de cabra: anti-conejo y anti-ratón fueron adquiridos de Invitrogen (Carlsbad, CA). El kit de Quimioluminiscencia utilizado se adquirió de Millipore (Burlington, MA).

Cultivos celulares

Los experimentos fueron llevados a cabo en las líneas celulares: AD293 WT (células epiteliales de riñón embrionario humano, derivadas de la línea celular HEK293), AD293-UB-Pr que sobre-expresan a la ubiquitina y presentan resistencia a PURO y en las células A549-Pr, de igual manera, resistentes a PURO. Las células con resistencia al antibiótico fueron generadas al ser previamente transfectadas de manera estable con Lipofectamina 2000, empleando el plásmido pRS, que confiere la resistencia a PURO, al expresar al gen PAC.

Las células AD293 WT y UB-Pr se mantuvieron en medio DMEM bajo en glucosa, suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, con 10% de FBS. La línea celular A549 se mantuvo en medio HAM'S F12, suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina) y FBS al 10%. En condiciones de 37°C y 5% de CO₂ Los

procedimientos experimentales, se llevaron a cabo en medio de ayuno, DMEM o HAM'S con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina), sin FBS, bajo las condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

Viabilidad celular

Las células AD293-UB-Pr y AD293 WT fueron sembradas en cajas de seis pozos a partir de cultivos en cajas de 100mm con un 80% de confluencia, realizando una dilución 1:6, luego a las 24 h se les tomaron fotos en un microscopio Leica de campo claro; posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de puromicina (PURO): 1 µg/ml y 10µg/ml por 24 h, después, se tomaron fotografías para observar los cambios en la viabilidad celular.

Las células A549-Pr se sembraron en una placa de 12 pozos (50,000 células/pozo) y 24h después se tomaron fotos en el microscopio de campo claro; posteriormente, se pusieron diferentes concentraciones de PURO: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml y 5 µg/ml por 48 h, luego se tomaron fotografías en el microscopio de campo claro y se tiñeron las células con cristal violeta para observar su viabilidad celular.

Tratamientos celulares

Se cultivaron las células en cajas Petri de 100 mm de diámetro, a las 24 h se ayunaron por 2 h con medio de ayuno; posteriormente, se cambió el medio por medio de ayuno con los pretratamientos y tratamientos correspondientes: cicloheximida (CHX) 20 µg/ml, MG132 25 µM, puromicina (PURO) 10 µg/ml, anisomicina (ANS) 10 µM y TGF-β 0.3 nM.

Tinción con cristal violeta

La tinción con cristal violeta se basa en teñir a las células adheridas, el colorante interacciona con componentes de carga negativa como las proteínas y el DNA. Cuando hay muerte celular, las células pierden su adherencia, al lavar las células, únicamente quedan adheridas las células vivas, siendo estas las que se tiñen.

Posterior al tratamiento de las células, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4%, incubándolas por 20 min con agitación a temperatura ambiente; posteriormente, se retiró el paraformaldehído y se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. A continuación, se añadió una solución de cristal violeta al 1% por 20 min con agitación a temperatura ambiente, después se retiró el colorante y se lavaron los pozos con agua destilada, se dejó secar la placa a temperatura ambiente y se tomaron fotos.

Inmunoprecipitación de proteínas

Las células se sembraron en cajas Petri de 100 mm de diámetro, al alcanzar una confluencia del 80% fueron estimuladas. Posteriormente se lavaron con PBS y se lisaron con buffer TNTE 0.5% (con inhibidores de proteasas y fosfatasas (ver anexo), manteniéndolas en frío. Se rasparon las células y fueron transferidas a microtubos de 1.5 ml, que se incubaron a 4°C en agitación por 15 min, para lisar las células. Después los extractos celulares se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios y fueron incubados, con anticuerpos específicos para la proteína a evaluar, toda la noche a 4°C en agitación. Después, los sobrenadantes fueron incubados con perlas de proteína G acoplada a sefarosa por 2 h a 4°C y en agitación. Se centrifugaron las muestras y se realizaron 3 lavados con TNTE 0.1% en frío, centrifugando entre cada lavado por 10 seg a 13,000 rpm; finalmente, se resuspendieron los pellets con 25 µl de Laemmli 2x, se hirvieron a 100°C por 5 min y se almacenaron a -20°C.

Electroforesis de proteínas y Western Blots

Tanto los extractos de proteínas inmunoprecipitadas como los totales, se sometieron a una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 7.5% (SDS-PAGE, del inglés *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), se transfirieron a una membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF) en cámara semiseca por 1 hr a 240 mA; posteriormente, la membrana fue incubada con leche descremada al 5% en TBST por 1 h a temperatura ambiente, después la membrana se lavó con TBST y se incubó con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C y en agitación,

para reconocer a la proteína de interés. Para retirar el exceso de anticuerpo, se realizaron 3 lavados con TBST en agitación por 10 min y posteriormente se incubó con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano por 1 h en agitación. Al finalizar la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST y se procedió a su detección empleando un Kit de quimioluminiscencia.

Redes de interacción proteína-proteína

Se realizó una red de interacción proteína-proteína entre Ski o SnoN con Smad2 y Arkadia empleando el programa de *Cytoscape* (RRID:SCR_003032) versión 3.7.2, el cual es una plataforma de *software* de código abierto para visualizar redes de interacción complejas e integrarlas. Se usa en conjunto con grandes bases de datos de interacciones proteína-proteína, proteína-DNA e interacciones genéticas. En este caso, se importaron datos de la plataforma Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) (RRID:SCR_007393) (<https://thebiogrid.org/>), esta es una base de datos de acceso abierto que comprende interacciones genéticas y de proteínas. El contenido que se encuentra en BioGRID es obtenido a partir de evidencia experimental documentada en artículos científicos. En el análisis se añadieron las bases de datos de las proteínas de interés y se fusionaron sus redes, se borraron las proteínas que no eran de humano y las repetidas, permitiendo así observar con que proteínas en común se han reportado que interaccionan con Ski y SnoN.

RESULTADOS

La puromicina tiene efectos adicionales a la inhibición de la síntesis de proteínas

Con el fin de conocer los múltiples efectos que tiene el antibiótico PURO que van más allá de sus efectos ribotóxicos, se realizó una revisión bibliográfica de los efectos que se han observado de PURO sobre la célula. Se elaboró una tabla que incluye los efectos del antibiótico, la concentración empleada, así como el tiempo de tratamiento y el modelo biológico de estudio. Se encontraron diversos efectos al emplear PURO o los análogos de este antibiótico, entre los que destaca el uso de PAN (aminonucleósido de puromicina). Este análogo es ampliamente usado para causar daño a podocitos y evaluar sus efectos, por lo que la mayoría de los efectos biológicos reportados del antibiótico han sido por el uso de PAN.

Entre los efectos que tiene PURO, se conocen principalmente la inhibición de la traducción, la ubiquitinación de múltiples proteínas y la activación de las MAPK cinasas. Sin embargo, presenta un mayor número de efectos en la célula como son la inducción de diversos genes, la acumulación de SUMO, el incremento o la disminución de algunas proteínas específicas, la activación de las caspasas 3, 9 y 12, la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en el citoesqueleto como la disminución de los niveles de F-actina. Muchos de estos efectos de PURO se presentan cuando la célula entra en estrés, llevándola a apoptosis.

Tabla 2. Efectos biológicos de puromicina en la célula.

Efectos biológicos de puromicina	Concentración	Modelo	Ref.
Regulación de la expresión de genes			
Incremento de <i>ANGPTL3</i> (<i>Angiopoietin-like 3</i>)	10 ng/ml PAN Tiempo: 12-24 h	Células MPC5	Jia R, et al., 2010.
Incremento de <i>ABCC1</i>	0.2 µM PURO Tiempo: 72 h	Células LS180	Theile, Staffen, & Weiss, 2010
Incremento de <i>Bax</i>	50 µg/ml PAN Tiempo: 48 h	Podocitos de ratón H-2Kb-tsA58	Sun et al., 2009
Incremento de <i>Am</i> (<i>adrenomedullin</i>)	100 µg/ml PAN Tiempo: 24 h	Podocitos de ratón	Oba S, et al., 2008
Incremento de <i>cwp1</i> , <i>cwp2</i> , o <i>gmyb2</i>	27 µg/ml PURO Tiempo: 1 h	Trofozoitos de <i>G. lamblia</i> WB	Su LH, et a., 2007
Disminución de <i>zo-1</i>	50 µg/ml PAN Tiempo: 24-48 h	Podocitos de rata y ratón	Ha T.S. et al, 2016
Disminución de nucleolina	0.5µg/ml PURO Tiempo 24h	Células HCT116	Jung et al., 2019
Activación de MAPK			
p38	10 µg/ml PURO Tiempo: 30 min	Células A549 y A7	Hernández-Damián et al., 2013
ERK	45 ug/ml PURO Tiempo: 2-60 min (podocitos) Tiempo: 2-15 días (ratas)	Podocitos de ratón Glomérulos de rata Wistar-Kyoto	Liu S, et al., 2010
p38	50 ug/ml PAN Tiempo: 6 h	Podocitos de ratón inmortalizados	Koshikawa et al., 2005
Regulación de otras vías de señalización			
Incremento de Notch and Hes-1	50-150 ug/ml PAN Tiempo: 24 h	Células NRK52E	Ding et al., 2011
Disminución de Numb	150 ug/ml Tiempo: 6-24 h	Células NRK52E	Ding et al., 2011
Disminución de p53	150 ug/ml Tiempo: 6-24 h	Células NRK52	Ding et al., 2011
Incremento de ANGPTL3.	10 ng/ml PAN	Células MPC5	Jia et al., 2010

	Tiempo: 12-24 h		
Disminución de mRNA de perlecan y agrina	10 ng/ml PAN Tiempo: 12-24 h	Células MPC5	Jia et al., 2010
Incremento de CHOP	35 μ M Tiempo: 30 min	Macrófagos J774A.1 y mioblastos C2C12	Croons V, et al., 2008
Incremento de las subunidades de integrina α 3 y β 1	5.0 μ g/ml PAN Tiempo: 48 h	Células 56/10 A1	Krishnamurti et al., 2001
Incremento de podocalixina	5 μ g/ml PAN Tiempo: 48 h	Células 56/10 A1	Krishnamurti et al., 2001
Disminución de NCX	0.3 mM Tiempo: 24 h	Podocitos de ratón	Fischer et al., 2002
Regulación de los niveles de proteínas			
Incremento de Bax	50 μ g/ml PAN Tiempo: 48 h	Podocitos de ratón H-2Kb-tsA58	Sun et al., 2009
Incremento de Nox4 en fracciones mitocondriales	50 μ g/ml PAN Tiempo: 6-24 h (podocitos) 10 mg/100 g PAN Time: 6-24 h (ratas)	Podocitos de ratón Glomérulo de rata Sprague–Dawley	Yu L, et al., 2014
Disminución de SnoN	10 μ g/ml Tiempo: 30 min	Células A549 y A7	Hernández-Damián J, et al., 2013
Disminución de Ski	10 μ g/ml Tiempo: 30 min	Células A7 y AD293	Hernández-Damián J, et al., 2013
Disminución de BMP7	10mg/100g PAN 3-21 días	Podocitos de ratas Sprague-Dawley	Xiao, H. et al, 2009
Incremento de TGF β 1	10mg/100g PAN 3-21 días	Podocitos de ratas Sprague-Dawley	Xiao, H. et al, 2009
Reducción de roGFP (redox-sensitive GFP molecules)	1 mM Time: 200-1000 seg	Células HT1080 roGFP1-iL–KDEL	Van Lith M, et al 2011
Disminución del receptor IGF-I	2 μ M Time: 24 h	Fibroblastos de piel de humano	Wrześniok et al., 2005
Disminución de Hemoglobina	1.0 x 10 ⁻³ M Time: 30 min	Reticulocitos humanos	Krasnow SH, et al., 1981
Reducción de [Ca ²⁺] _i	0.3 mM Time: 24 h	Podocitos de ratón	Fischer KG, et al., 2002

Disminución de ZO-1	50 µg/ml PAN Time: 24-48 h	Podocitos de rata y ratón	Ha T.S. et al., 2016
Incremento de p53 y p21	0.5µg/ml PURO Tiempo: 24h	Células HCT116	Jung J. et al, 2019
Disminución de c-Myc	0.5µg/ml PURO Tiempo: 24h	Células HCT116	Jung J. et al, 2019
Disminución de F-actina	45 µg/ml Tiempo: 48 h	Podocitos de ratón	Liu S et al., 2010
Incremento de transgelin	50µg/ml PAN Tiempo: 48h	Células MPC5	Jiang, L. et al., 2020
Incremento de ATF6α	50µg/ml PAN Tiempo: 24h	Podocitos	Min, S. et al., 2018
Apoptosis			
Incremento de podocitos apoptóticos	45-75 µg/ml PAN Tiempo: 48 h	Podocitos de ratón	Liu et al., 2010
Incremento de apoptosis en podocitos p21+/+	30 µg/ml PAN Tiempo: 48 h	Cultivo primario de podocitos de ratón	Wada et al., 2005
Incremento de caspasas 9 y 3	50 µg/ml PAN Tiempo: 12-48 h	Podocitos de ratón inmovilizados	Yu et al., 2014
Disminución de CoxI, CoxII y CoxIV	50 µg/ml PAN Tiempo: 6-24 h	Podocitos de ratón inmovilizados Glomérulo de ratas Sprague–Dawley	Yu et al., 2014
Producción excesiva de ROS	50 µg/ml PAN Tiempo: 6-24 h	Podocitos de ratón inmovilizados	Yu et al., 2014
Incremento de citocromo C	50 µg/ml PAN Tiempo: 6-24 h	Podocitos de ratón inmovilizados	Yu et al., 2014
Incremento decaspase-3	50-150 µg/ml PAN Tiempo: 24 h	Células NRK52E	Ding et al., 2011
Disminución de Bcl-2	50 µg/ml PAN Tiempo: 48 h	Podocitos de ratón H-2Kb-tsA58	Sun et al., 2009
Incremento de podocitos apoptóticos	50 µg/ml PAN Tiempo: 48 h	Podocitos de ratón H-2Kb-tsA58	Sun et al., 2009
Corte de procaspasa-3 y fragmentación de DNA	20 µM PURO Tiempo: 16 h	Macrófagos J774A.1 y mioblastos C2C12	Croons et al., 2008
Corte y activación de caspasa- 12	35 µM PURO	Mioblastos C2C12	Croons et al., 2008
Incremento de podocitos apoptóticos	100 µg/ml PAN Tiempo: 36 h	Podocitos de ratón	Oba et al., 2008

Incremento de Bax y disminución de Bcl-xL Bcl-2	100 µg/ml PAN Tiempo: 24 h	Podocitos inmortalizados de ratón	Kanjanabuch et al., 2007
Activación de caspase-3	100 µg/ml PAN Tiempo: 24 h	Podocitos inmortalizados de ratón	Kanjanabuch et al., 2007
Altos niveles de apoptosis	0.5 ug/ml PURO Tiempo: 24-96 h	Células MCF7	Söderlund et al., 2004
Promoción de apoptosis	5–100 ug/ml PAN Tiempo: 6-48 h	Células epiteliales de glomérulo de rata	Sanwal et al., 2001
Interaction with mitochondrial cytochrome P-450	5 X 10 ⁻⁴ M PURO Time: 6 h	Adrenocortical mitochondrial preparations from beef	Lehoux & Forest, 1975
Incremento de caspasa-12	50 µg/ml PAN Tiempo 24h	Podocitos	Min et al., 2018
Otros efectos diversos			
Disminución de pERK1 y pERK2	2 uM PURO Tiempo: 24 h	Fibroblastos de piel de humano	Wrześniok et al., 2005
Disminución de p-Smad3 citoplásmico e incremento de p- Smad3 nuclear	50 µg/ml PAN Tiempo 6-24 h (podocitos) 10 mg/100 g Tiempo 6-24 h (ratas)	Podocitos de ratón Glomérulo de rata Sprague–Dawley	Yu et al., 2014
Translocación nuclear de NF- κB.	60 µg/ml PAN Tiempo: 6 h	Podocitos transgénicos inmortalizados de humano	Srivastava et al., 2013
Pérdida de la fibra de estrés de F-actina	6-90 µg/ml PAN Tiempo: 24 h	Podocitos transgénicos inmortalizados de humano	Srivastava et al., 2013
Desaparición de filamentos de α-actinina-4 y traslocación al perinúcleo	30 µg/mL PURO Tiempo: 48 h	Podocitos inmortalizados de ratón	Sun et al., 2012
Distribución de α-tubulina alrededor del núcleo	30 µg/mL PURO Tiempo: 48 h	Podocitos inmortalizados de ratón	Sun et al., 2012
Inhibición de la translocación nuclear de GR	10 µg/ml PURO Tiempo: 30 min	Timocitos	Dezitter et al., 2011

Acumulación de proteínas poliubiquitinadas	35 μ M PURO	Células madre mesenquimales de aorta de ratón	Croons et al., 2008
Incremento de la producción de ROS	100 μ g/ml PAN	Podocitos de ratón	Oba et al., 2008
Reorganización de actina	50 μ g/ml PAN Tiempo: 6 h	Podocitos inmortalizados de ratón	Koshikawa et al., 2005
Disminución de síntesis de colágeno	2.5-10 μ M PURO	Fibroblastos de piel de humano	Wrześniok et al., 2005
Rearreglos de los filamentos de actina	100 μ g/ml PAN Tiempo: 24 h	Podocitos MPC	Rico et al., 2005
Traslocación de WTIP y ZO-1 de las uniones celulares al núcleo	100 μ g/ml PAN Tiempo: 24 h	Podocitos MPC	Rico et al., 2005
Inhibición de la división celular	0.15-0.60 μ g/ml Tiempo: 1 h	Células WT	Nakamura, 1994
Inhibición del transporte de metilglucosa	0.5 mM PURO Tiempo: 1 m	Adipocitos de rata	Kubo & Foley, 1985
Inhibición de la síntesis de proteínas de membrana	1.0×10^{-3} M PURO Time: 30 min	Reticulocitos humanos	Krasnow et al., 1981
Bloqueo en el transporte de AIB (α -amino isobutyric acid)	23 μ g/ml PURO	Células parenquimales de hígado de rata	Pariza et al., 1976
Inhibición de la transformación de 3H-corticosterona a 3H-aldoesterona	5×10^{-4} M PURO	Preparaciones mitocondriales adrenocorticales de res	Lehoux & Forest, 1975
Incremento de lisis hipoosmótica	$2-10 \times 10^{-3}$ M PURO Tiempo: 24 h	Eritrocitos de conejo y humano	Burka et al., 1975
Incremento en la rigidez de la membrana celular	5×10^{-3} M PURO Tiempo: 2 h	Eritrocitos de conejo y humano	Burka et al., 1975
Incremento en la permeabilidad de la membrana celular	10^{-3} M PURO Tiempo: 4 h	Eritrocitos de conejo y humano	Burka et al., 1975
Traslocación nuclear de IQGAP	5 μ g/ml of PAN Tiempo: 90 min	Podocitos humanos	Rigothier C. et al 2016
Liberación de calcio del retículo endoplásmico	200 nM Tiempo: 30 min	MIN6B1 cells	Cassel R, et al, 2016

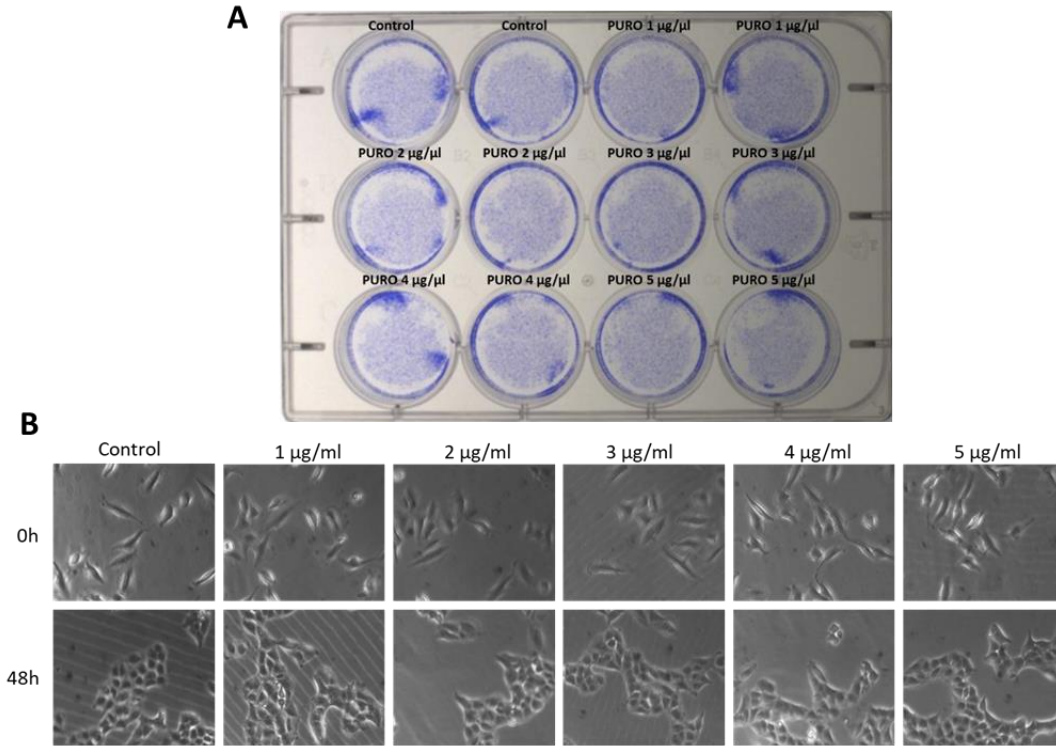
Acumulación de SUMO-1/2/3 con ubiquitina en núcleo (Co-tratamiento con MG132)	10 mM PURO Tiempo: 4 h	Células HeLa	Matsumoto & Saitoh, 2016
Incremento de estrés oxidativo	50 µg/mL PAN Tiempo: 24-48 h	Podocitos de rata y ratón	Ha T. S. et al, 2016
Relocalización de ZO-1	50 µg/mL PAN Tiempo: 24-48 h	Podocitos de rata y ratón	Ha T.S. et al 2016
Incremento de C3 del complemento	50 µg/mL PAN Tiempo: 24 h	Podocitos de ratón	Li T. S., et al 2016

Las células AD293 (UB-Pr) y A543 (Pr) son un buen modelo de resistencia a puromicina

Con el fin de conocer los cambios que causa PURO en algunas proteínas, como Ski y SnoN, pero sin activación de MAPKs y sin sus efectos pro-apoptóticos, se planteó el uso de líneas celulares con resistencia a PURO, como A549-Pr y AD293-UB-Pr, las cuales contaban con la transfección estable del plásmido pRS, el cual contiene al gen *pac*. Este gen codifica para la enzima N-Acetil transferasa que cataliza la acetilación de PURO, dando lugar a su análogo N-acetil-puromicina. Lo primero fue comprobar que nuestro modelo de estudio fuera funcional, por lo que se evaluó la viabilidad de dichas líneas celulares al tratamiento con PURO. Las células A549-Pr fueron tratadas con diferentes concentraciones de PURO: 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml por 48 h. Después de este tiempo se realizó una tinción de las células con cristal violeta y se observaron al microscopio, el resultado muestra que las células tuvieron una proliferación normal en presencia de PURO, al igual que las células control que no tenían antibiótico (Figura 6, panel A y B).

En el caso de la línea celular AD293, se realizó una comparación entre las AD293-UB-Pr (resistentes a PURO) y las WT (no resistentes a PURO). Se evaluaron dos concentraciones diferentes 1µg/ml y 10µg/ml por 24h. Se observó que las células AD293UB-Pr continuaron con su proliferación, mientras que las células WT presentaron muerte celular con ambas concentraciones del antibiótico (Figura 6, panel C).

A549 Pr



AD293 UB-Pr

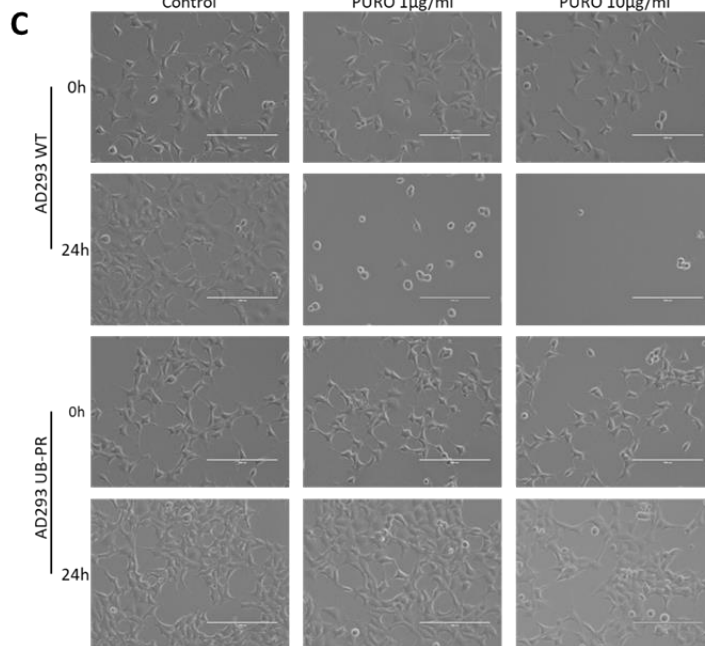


Figura 6. Las células A549 Pr y AD293 UB-Pr son resistentes a puromicina. A) Células A549 Pr control y tratadas con PURO 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml por 48h, fueron teñidas con cristal violeta. B) Imágenes de campo claro tomadas con objetivo de 20x de células A549 Pr, control y tratadas con PURO 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml, tomadas a las 0h (sin tratamiento) y 48h (posterior al tratamiento). C) Imágenes de campo claro tomadas con objetivo 20X de células AD293-UB-PR y AD293 WT control y tratadas con PURO 1 y 10 µg/ml, tomadas a las 0h (sin tratamiento) y 24h (posterior al tratamiento).

Por lo tanto, tanto las células A549-Pr y AD293-UB-Pr mostraron ser resistentes a PURO y funcionar como un buen modelo para evaluar los efectos de su análogo, la N-acetil-puromicina. Por consiguiente, se evaluó el efecto de la N-acetil-puromicina sobre los niveles de las proteínas Ski y SnoN.

La N-acetil-puromicina induce la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma

Las células AD293-UB-Pr fueron estimuladas por 1 h con PURO 10 µg/ml o con TGF-β 0.3 nM, para evaluar su efecto sobre los niveles proteicos de Ski y SnoN. Para observar si la disminución de los niveles de estas proteínas es a causa de su degradación vía el proteosoma, algunas células fueron pretratadas por 1h con el inhibidor del proteosoma MG132 25 µM. Se realizaron inmunoprecipitaciones (IPs) de las proteínas SnoN y Ski, posteriormente se analizaron sus niveles por WB, como se puede observar en la figura 7, paneles A y B.

En el caso de las células A549-Pr se realizaron los mismos tratamientos, administrando PURO 10 µg/ml o TGF-β 0.3 nM, por tiempos de 30 min; además, se añadió un tratamiento por 30 min con ANS 10 µM, así como los pre-tratamientos por 1 h con MG132. Se realizó la IP únicamente de SnoN, ya que Ski parece no expresarse en esta línea celular porque el gen se encuentra reprimido por metilación (Xie et al., 2017), y se evaluaron sus niveles por WB como se observa en la figura 7, panel C.

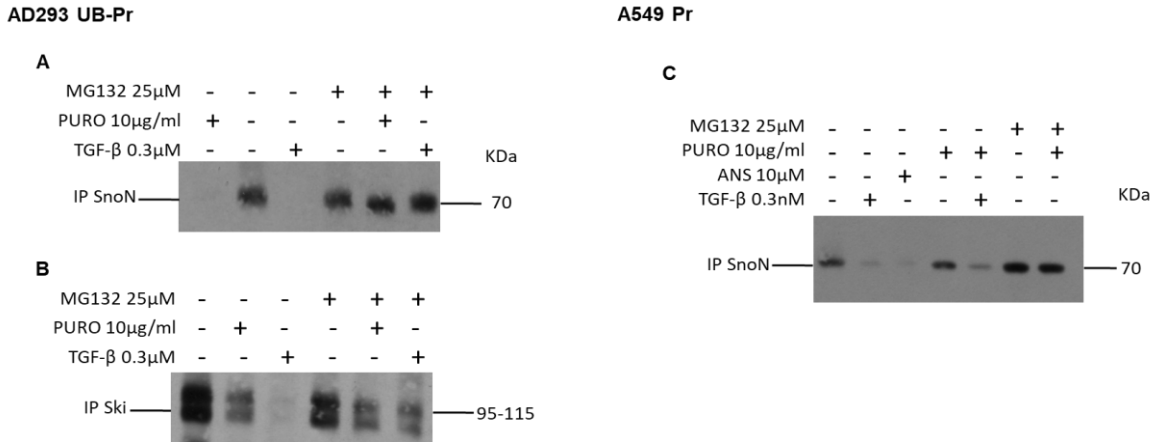


Figura 7. La N-acetil puromicina induce la degradación de Ski y SnoN vía proteosoma. A) Las células AD293-UB-Pr fueron tratadas con PURO 10 μg/ml durante 1h; TGF-β 0.3nM por 1h; o pretratadas con MG132 25μM por 1h y se realizó IP contra SnoN, B) IP contra Ski. C) Las células A549-Pr fueron estimuladas con PURO 10 μg/ml por 30min; TGF-β 0.3nM por 30min; ANS 10μM por 30 min; o pretratadas con MG132 25μM por 1h antes del tratamiento. Se realizó IP contra SnoN. Los IP se analizaron por WB.

Como podemos observar en la figura 7, PURO, TGF-β y ANS inducen la degradación de las proteínas Ski y SnoN, mientras que con los pretratamientos con MG132 se inhibe esta degradación. Al ser células con resistencia a PURO y generar N-acetil-puromicina, este análogo es quien está induciendo la degradación de las proteínas analizadas vía el proteosoma, comprobando lo previamente reportado por Hernández-Damián y colaboradores en el 2013 (Hernández-Damián et al., 2013), donde observaron que tanto N-acetil-puromicina de células AD293 resistentes, como análogos sintetizados de ANS (deacetil-anisomisina) y PURO (N-acetil-puromicina) en células A7, promovieron la degradación de SnoN. Por lo tanto, los datos muestran que la N-acetil-puromicina es capaz de inducir la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma.

La N-acetil-puromicina se puede incorporar de manera covalente a las proteínas

La generación de la N-acetil-puromicina se da al acetilar el grupo amino de PURO, por lo que al usar a las células resistentes a PURO se espera que el análogo ya no inhiba la traducción, ni tampoco se incorpore a las cadenas peptídicas

formadas en el proceso de síntesis proteica. Por lo tanto, diseñamos un experimento para determinar que no hubiera una unión de la N-acetil-puromicina a las proteínas totales de la célula.

Lo primero fue comparar el patrón de unión de PURO a las proteínas, entre las células AD293-UB-Pr y las AD293-WT, para lo cual fueron tratadas por 2 h con PURO 10µg/ml. Posteriormente se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas totales extraídas, evaluando diferentes concentraciones de proteína en el gel (25, 50 y 100 µg), después se evaluó la unión de PURO a las proteínas por WB, empleando un anticuerpo anti-puromicina. De manera interesante, se observó la unión de PURO a las proteínas en ambas líneas celulares (Figura 8, panel A), cuando solo se esperaba observar la unión del antibiótico a las proteínas de las células WT.

Se decidió comprobar si esta unión del antibiótico con proteínas también ocurría en las células A549-Pr, por lo que se realizaron tratamientos por 30 min con TGF-β 0.3 nM, ANS 10 µM o PURO 10 µg/ml (Figura 8, panel B), así como co-tratamientos por 30 min con PURO 10 µg/ml y TGF-β 0.3 nM, y un pre-tratamiento de 2 h con MG132 25 µM antes de añadir PURO 10 µg/ml por 30 min (Figura 8, panel C). Para observar si había cambios en la unión de PURO a las proteínas al inhibir el proteosoma, se evaluaron los efectos por WB empleando un anticuerpo anti-puromicina.

En ambos experimentos con las células A549-Pr, se observó una unión del antibiótico PURO a las proteínas de las células que fueron tratadas con PURO, solo o con otras moléculas; por lo tanto, la N-acetil-puromicina parece incorporarse de manera covalente a diversas proteínas, aunque desconocemos el mecanismo.

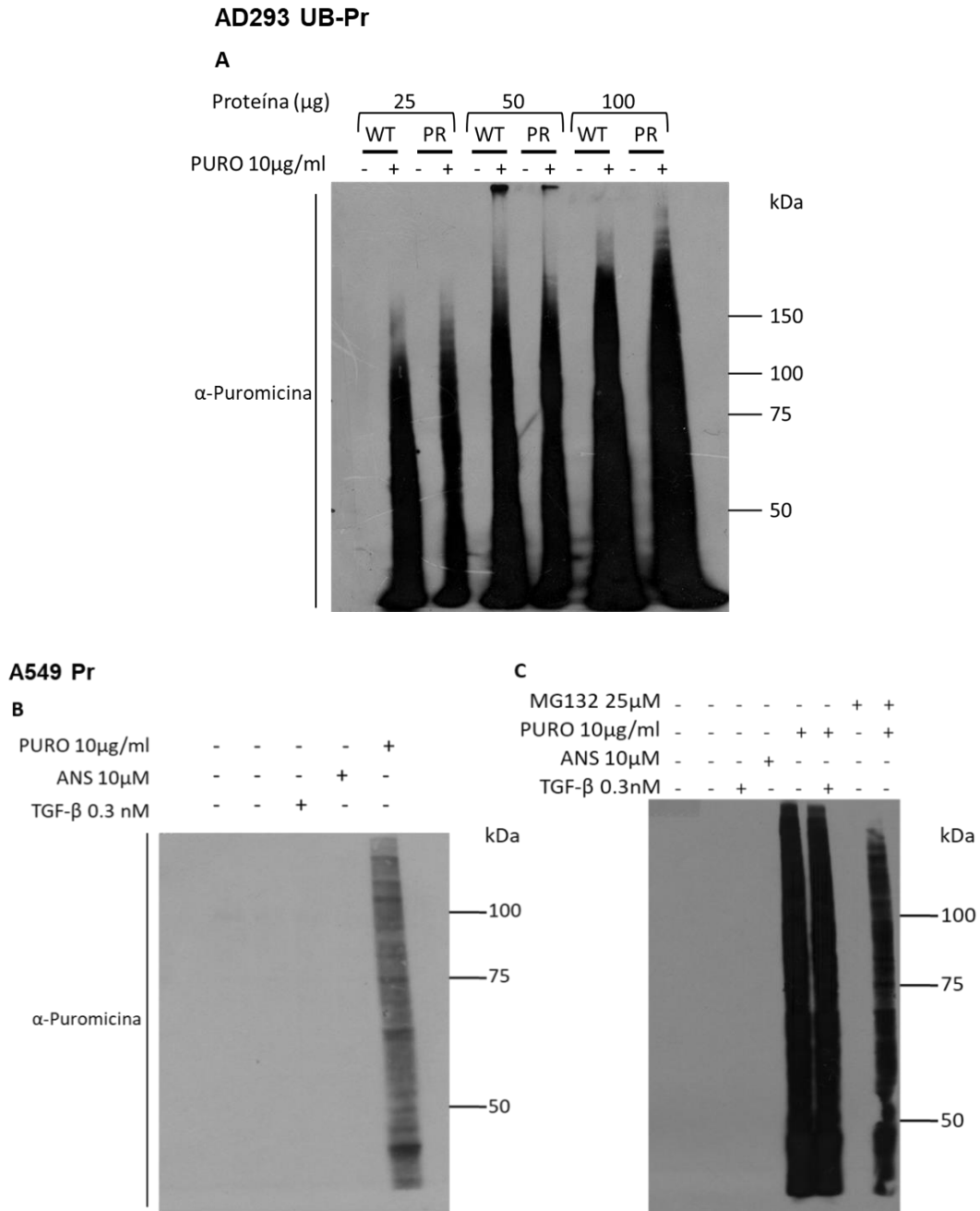


Figura 8. N-acetil-puromicina se incorpora de manera covalente a las proteínas. A) células AD293-UB-Pr y AD293 WT; se estimularon por 2h con PURO 10μg/ml, se evaluó la incorporación de PURO a las proteínas con anti-puromicina mediante un WB. B) Células A549-Pr; fueron estimuladas por 30 min con TGF-β 0.3 nM, ANS 10 μM o PURO 10 μg/ml. C) Células A549-Pr; fueron estimuladas con TGF-β 0.3 nM, ANS 10 uM, PURO10 ug/ml o TGF-β 0.3 nM + PURO 10 μg/ml e incubadas por 30 min, o bien, MG132 25 μM ó MG132 25 μM + PURO 10 μg/ml e incubadas por 2.5 hrs.

La incorporación de la N-acetil-puromicina a las proteínas es independiente del proceso de traducción

Con base en los resultados previamente obtenidos, nos preguntamos si la unión de PURO a las proteínas es dependiente del proceso de síntesis de las proteínas; por lo tanto, se decidió evaluar la unión del antibiótico a las proteínas en las células AD293-UB-Pr y WT, inhibiendo la traducción con un pre-tratamiento con otro antibiótico, la cicloheximida (CHX). Las células fueron pretratadas con 20 µg/ml de CHX por 30min y posteriormente tratadas por 2 h con 10 µg/ml de PURO, luego se evaluaron a las proteínas totales comparando dos concentraciones diferentes de proteína (50 y 100 µg) mediante WB y usando el anticuerpo anti-puromicina. Como se observa en la figura 9, el antibiótico se sigue uniendo a las proteínas, tanto de las células AD293 WT como de las AD293UB-Pr pre-tratadas con CHX, aunque en una mucho menor proporción si se compara con las células sin pre-tratamiento con CHX. El patrón de unión de la N-acetil-puromicina parece ser solo ligeramente menor al de PURO en las células tratadas con CHX. Este patrón se puede observar más claramente al emplear 100 µg de proteína. Estos resultados nos hacen pensar que la N-acetil-puromicina se puede incorporar a las proteínas de manera independiente al proceso de traducción y que además parece unirse a algunas proteínas de alto recambio. Sin embargo, también podría ser que la CHX no inhibió por completo la síntesis de proteínas, por lo que será importante realizar la repetición del experimento empleando CHX por diferentes tiempos para ayudarnos a comprobarlo.

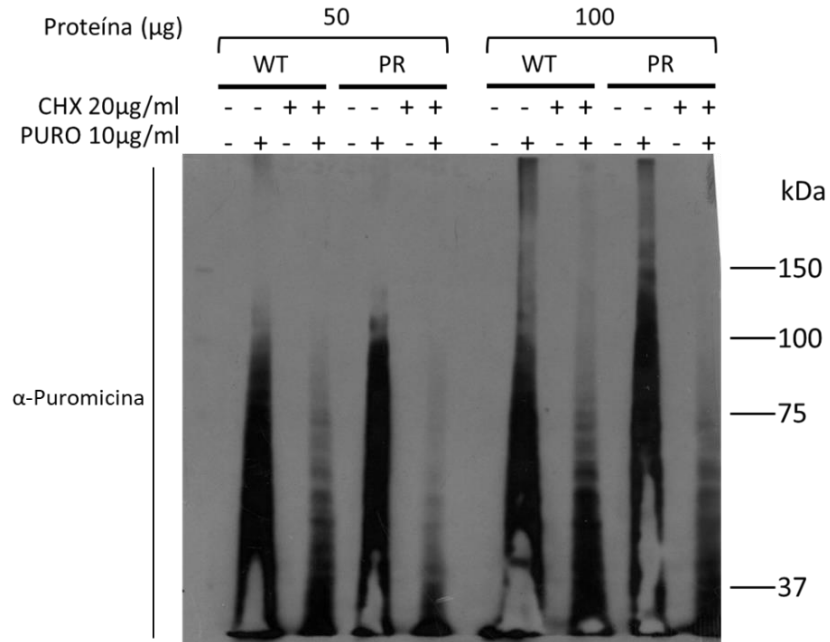


Figura 9. N-acetil-puromicina se incorpora de manera independiente a la traducción. Células AD293 WT y AD293-UB-Pr, fueron pretratadas con cicloheximida (CHX) 20μg/ml por 30 min, posteriormente fueron tratadas con PURO 10 μg/ml por 2h y se evaluó el patrón de unión de PURO por WB y anticuerpo anti-puromicina.

La puromicina y la N-acetil-puromicina inducen cambios en el patrón de ubiquitinación

La ubiquitinación de proteínas es importante para regular su estabilidad, por lo que algún estímulo puede inducir esta modificación postraduccional, incluido el tratamiento con PURO, que se ha reportado que promueve la ubiquitinación de algunas proteínas. Por lo tanto, se evaluó el patrón de ubiquitinación de las proteínas totales en las células AD293 WT y AD293-UB-Pr tras un estímulo de 2 h con PURO 10μg/ml, para posteriormente realizar una electroforesis y un WB de las proteínas totales usando un anticuerpo anti-ubiquitina. Los datos muestran que en todas las concentraciones de proteína empleadas, se observa una mayor detección de ubiquitina en las células AD293 WT tratadas con PURO, en comparación con el control. Aunque las proteínas de las células AD293 UB-Pr tratadas con PURO también mostraron un mayor marcaje de ubiquitina en comparación con aquellas sin tratamiento, la intensidad de la marca de ubiquitina se observa con menor intensidad en comparación con las WT, lo cual se puede apreciar mejor con 25 y 50 μg de proteína (Figura 10).

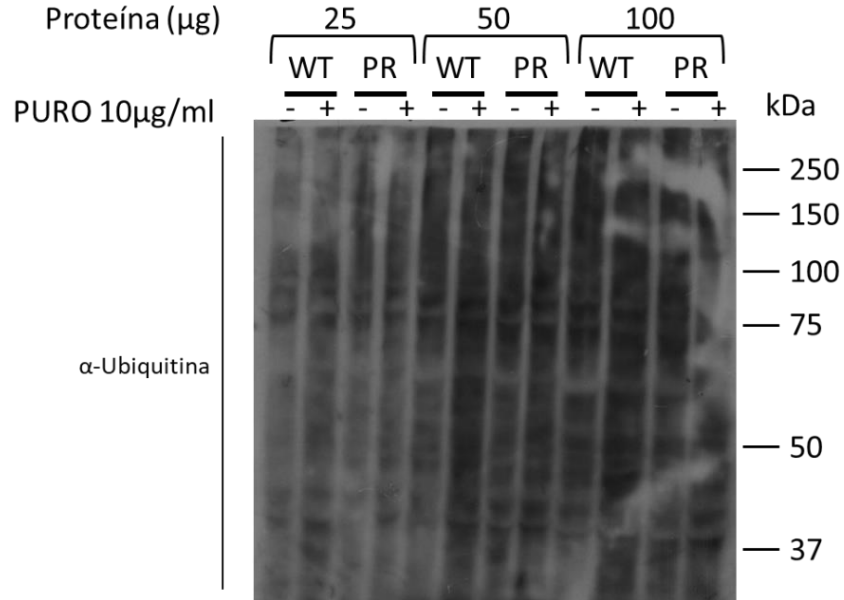


Figura 10. La puromicina modifica el patrón de ubiquitinación de las proteínas. Se estimuló por 2h con PURO 10µg/ml a las líneas celular AD293-UB-PR y AD293 WT, se obtuvo un extracto de proteínas totales y se evaluó el patrón de ubiquitinación con anti-ubiquitina en un WB.

Por lo tanto, los resultados indican que PURO y N-acetil-puromicina son capaces de inducir cambios en el patrón de ubiquitinación de diversas proteínas, al incrementar su marcaje con ubiquitina.

Identificación de proteínas andamio como candidatas a participar en la degradación de Ski y SnoN inducida por la puromicina

Como se mencionó previamente, para que la PURO pueda inducir la degradación de Ski y SnoN, se propone que PURO ayuda a promover la formación de un complejo de destrucción conformado por Ski o SnoN con Smad2 fosforilado y una ligasa E3 de ubiquitina. Como reportaron previamente Hernández-Damián y colaboradores en el 2013 (Hernández-Damián et al., 2013), la degradación de Ski y SnoN solo ocurre en ciertas líneas celulares como HeLa, AD293 y A549, mientras que en otras como las HepG2 no se presenta, por lo que creemos que dichas líneas celulares tienen un contexto celular en el que cuentan con una proteína “X” (no

identificada) con la que PURO pudiera asociarse o bien inducir su expresión, y así modular la formación del complejo de destrucción en las células sensibles al efecto particular de PURO y ANS. Para ayudar a responder esta pregunta, primero se realizó una red de interacción proteína-proteína entre Ski, Smad2 y Arkadia, así como entre SnoN, Smad2 y Arkadia, para poder visualizar que proteínas, de las que se tiene información de que pueden asociarse a nuestras proteínas de interés, pudieran tener el papel de la proteína "X". Entre las proteínas identificadas se eligió a Arkadia, por ser la ligasa de ubiquitina E3 que se ha reportado que participa en la degradación tanto de Ski como de SnoN.

Para estas redes de interacción proteína-proteína, se empleó el programa *Cytoscape* y la información reportada de interacciones de proteínas se obtuvo de *BioGRID*. Se añadieron los datos de las proteínas de interés Ski, Smad2 y Arkadia o SnoN, Smad2 y Arkadia, se fusionaron sus redes, eliminando aquellas proteínas que no eran de humano, así como aquellas repetidas. Así se obtuvieron las redes que se observan en los diagramas 1 y 2.

El diagrama 1 corresponde a la red de interacción proteína-proteína entre Ski/Smad2/Arkadia, en esta red se observa en el centro de color morado a aquellas proteínas que se asocian con las 3 del complejo (Ski, Smad2 y Arkadia), en amarillo se tienen a las proteínas que se asocian con Ski y Smad2, en naranja a aquellas que unen a Smad2 y Arkadia, y en rosa a las que se asocian entre Ski y Arkadia. Alrededor de Ski, Smad2 y Arkadia se encuentran proteínas que se asocian con estas de manera individual, respectivamente. Para una mejor visualización se elaboró una tabla de las proteínas que se asocian con las 3 proteínas o con 2 del complejo (Ski/SnoN, Smad2 y Arkadia) y se describe su función (Tabla 3).

En el diagrama 2 podemos ver la red de interacción proteína-proteína entre SnoN/Smad2/Arkadia, en el centro de color amarillo se encuentran aquellas proteínas que se asocian con las 3 proteínas (SnoN, Smad2 y Arkadia), de color azul se tiene a las proteínas que se asocian con SnoN y Arkadia, de color morado aquellas que se asocian con Arkadia y Smad2, y de color rosa a las que se asocian con SnoN y Smad2. Alrededor de las proteínas SnoN/Smad2/Arkadia se encuentran

aquellas que se unen de manera individual con cada una de las 3 proteínas del complejo. De igual manera se elaboró una tabla con las proteínas asociadas y la función de dichas proteínas (Tabla 4).

Dentro de las proteínas que llamaron nuestra atención se encuentra la proteína de la leucemia promielocítica (PLM), la cual se asocia con Ski, SnoN, Smad2 y Arkadia, y que se ha reportado que actúa como proteína andamio en diferentes procesos celulares. Así como la proteína de bóveda principal (MVP o VAULT1), la cual puede unir tanto a Ski, a SnoN y a Arkadia, además esta reportada como una proteína andamio que regula la transducción de señales y está involucrada en el transporte de proteínas núcleo-citoplasma. Por lo que ambas proteínas PML y MVP, pudieran ser potenciales candidatos que pudieran estar ayudando a promover la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma, inducida por el antibiótico PURO.

Diagrama 1. Red de interacción proteína-proteína entre Ski/Smad2/Arkadia

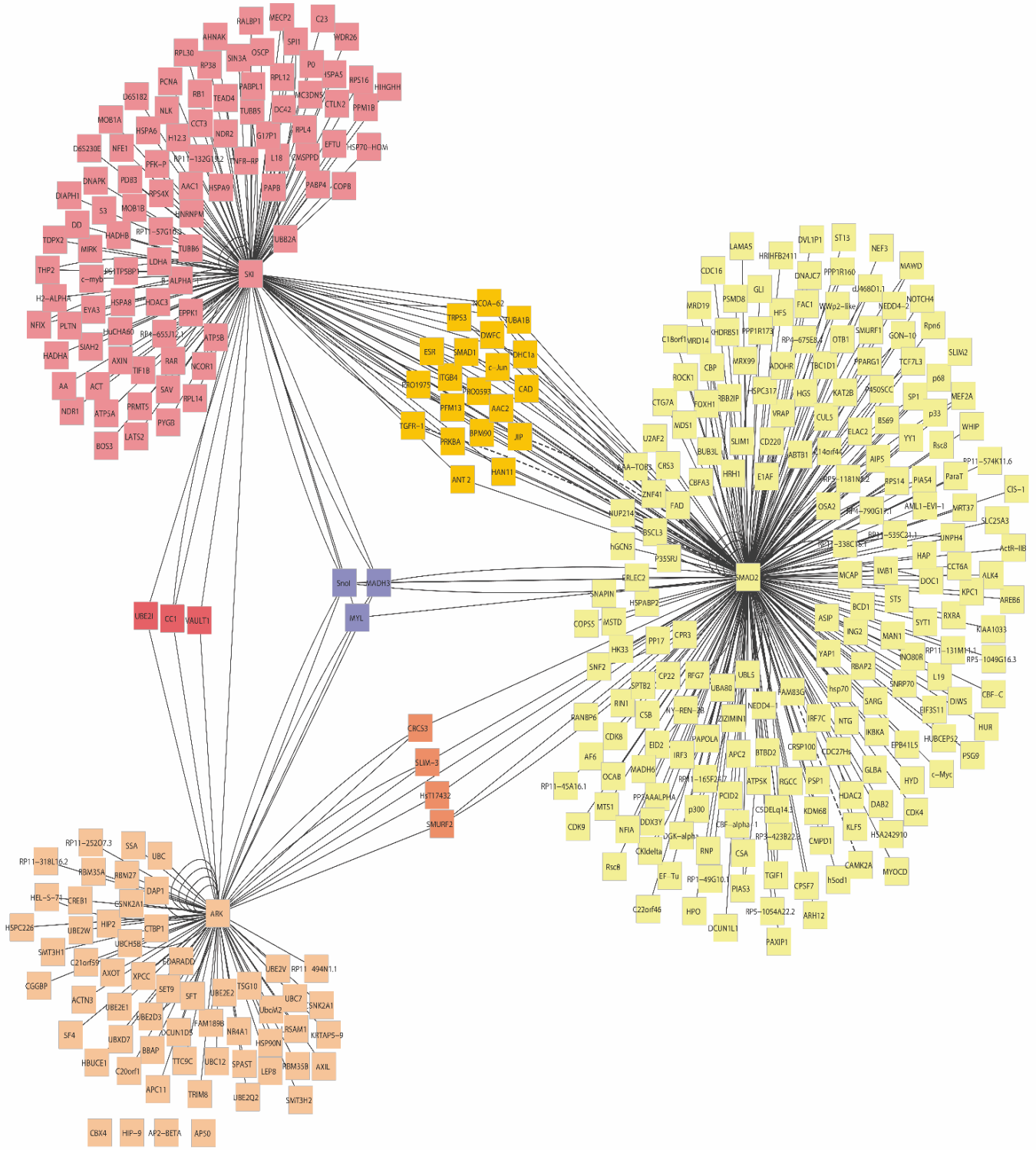


Tabla 3. Proteínas que interactúan en común con Ski, Smad2 y/o Arkadia

Interacción	Proteínas en común	Función
Ski/Smad2/ Arkadia	SnoN	Correpresor de la vía del TGF- β
	MADH3 (Smad3)	Transductor intracelular y promotor transcripcional en la vía del TGF- β
	MYL (PLM)	Andamio de cuerpos nucleares PML en diferentes procesos celulares
Ski/Arkadia	UBE2I	Enzima de conjugación E2 de ubiquitina
	MVP (VAULT1)	Andamio de proteínas de transducción de señales, transporte núcleo-citoplasma
	CC1	Regulación de la formación del autofagosoma
Arkadia/ Smad2	Smurf2	Ligasa E3 de ubiquitina
	Smad6 (HsT17432)	Regulación negativa de la vía del TGF- β y BMPs
	FHL2 (SLIM-3)	Transmisor molecular que une varias vías de señalización
	Smad7 (CRCS3)	Antagonista del receptor tipo I de la vía del TGF- β
Ski/Smad2	Smad1	Transductor intracelular y promotor transcripcional en la vía del BMPs
	TGFR-1	Receptor que transduce la vía del TGF- β
	RANBP9 (BPM90)	Proteína andamio o adaptadora que interactúa con receptores transmembranales/ regulación del rearrreglo del citoesqueleto
	DCAF7 (HAN11)	Facilita la unión de proteínas para la formación de complejos/ involucrada en el desarrollo craneofacial
	SLC25A5 (ANT2, AAC2)	Translocasa de ATP/ADP
	HIPK2 (PRO0593)	Cinasa de serina/treonina involucrada en la regulación de la transcripción
	TUBA1B	α -tubulina de los microtúbulos
	TP53 (TRP53)	Promueve el arresto del ciclo celular o la apoptosis
	AKT1 (PRKBA)	Cinasa de serina/treonina que regula la vía de señalización de Akt
	SQOR (PRO1975)	Enzima mitocondrial que cataliza la oxidación de sulfuro de hidrógeno
	DYNC1H1 (DHC1a)	Dineína para el transporte de vesículas y organelos a través de microtúbulos
	CAD	Proteína de fusión capaz de catalizar 4 reacciones en la síntesis de pirimidina
	ITGB4	Receptor de laminina importante en la estructura de hemidesmosomas
	Smad4 (JIP)	Coactivador y mediador de la vía del TGF- β
	SMAD5 (DWFC)	Modulador transcripcional de la vía de BMPs
	SNW1 (NCOA-62)	Componente del espliceosoma
	PFM13	Regulador transcripcional/ reprime la vía del TGF- β
	c-Jun	Factor transcripcional
	ESR	Receptor nuclear de estrógenos

Diagrama 2. Red de interacción proteína-proteína entre SnoN/Smad2/Arkadia

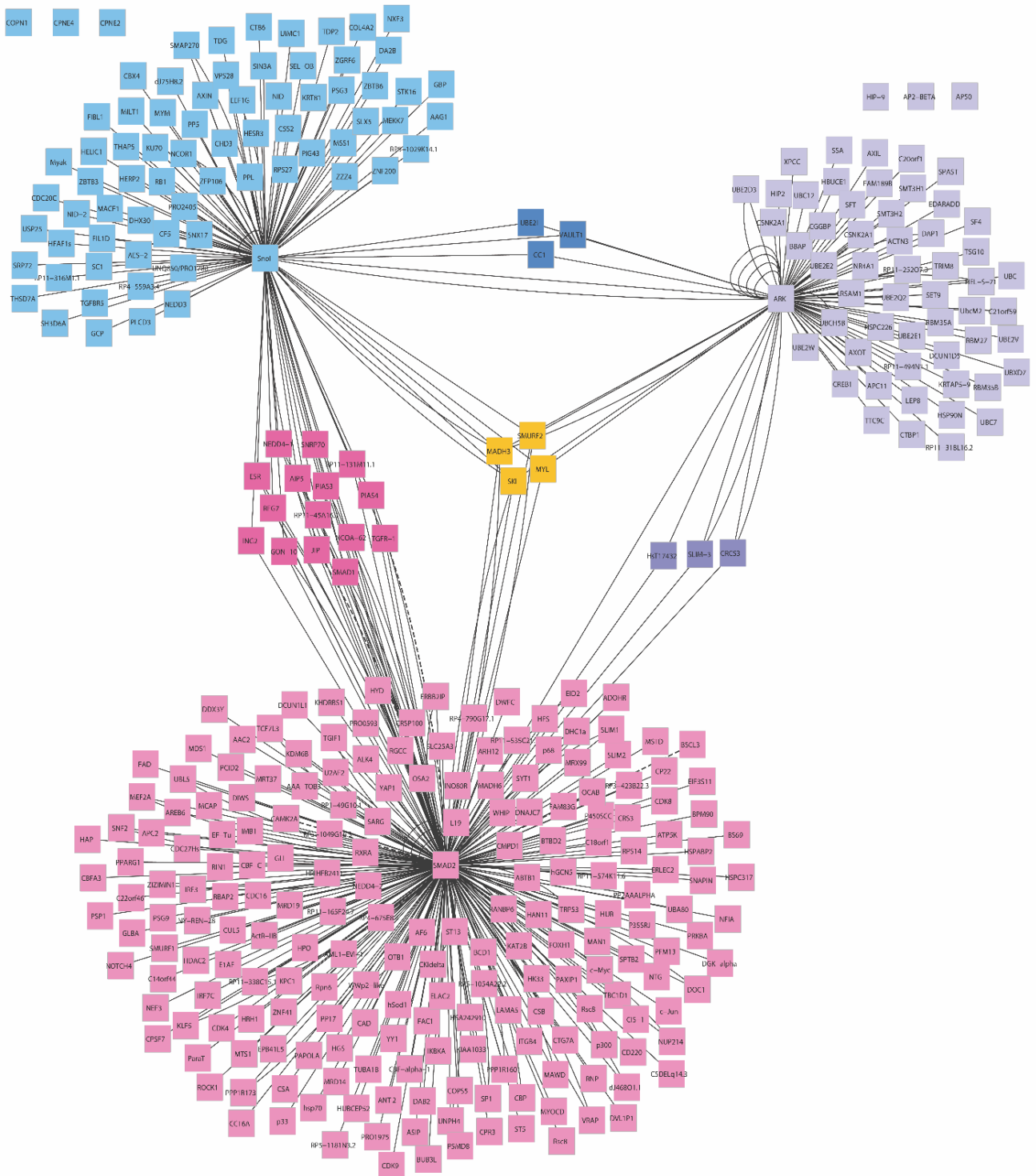


Tabla 4. Proteínas que interactúan en común con SnoN, Smad2 y/o Arkadia

Interacción	Proteínas en común	Función
SnoN/Smad2/ Arkadia	Ski	Correpresor de la vía del TGF- β , diferenciación de músculo esquelético
	Smad3 (MADH3)	Transductor intracelular y promotor transcripcional en la vía del TGF- β
	PML (MYL)	Andamio de cuerpos nucleares PML en diferentes procesos celulares
	Smurf2	Ligasa E3 de ubiquitina
SnoN/Arkadia	UBE2I	Enzima de conjugación E2 de ubiquitina
	MVP (VAULT1)	Andamio de proteínas de transducción de señales, transporte núcleo-citoplasma
	CC1	Regulación de la formación del autofagosoma
Arkadia/ Smad2	Smad6 (HsT17432)	Regulación negativa de la vía del TGF- β y BMPs
	FHL2 (SLIM-3)	Transmisor molecular que une varias vías de señalización
	Smad7 (CRCS3)	Antagonista del receptor tipo I de la vía del TGF- β
SnoN/Smad2	Smad1	Transductor intracelular y promotor transcripcional en la vía del BMPs
	TGFR-1	Receptor que transduce la vía del TGF- β
	SNW1 (NCOA-62)	Componente del espliceosoma y regulador transcripcional en la vía del TGF- β
	Smad4 (JIP)	Coactivador y mediador de la vía del TGF- β
	HDAC1 (GON-10)	Deacetilasa de histonas en residuos de lisina
	ING2	Activación de p53/TP53 y componente del complejo correpresor mSin3A-like
	TRIM33 (RFG7)	Ligasa E3 de ubiquitina, marca a Smad4 para su degradación
	PAPPA (RP11-45A16.1)	Metaloproteasa que corta IGFBP-4 e IGFBP-5
	PIAS3	SUMO E3 ligasainhibidora de STAT3
	PIAS4	SUMO E3 ligasa regula la vía STAT, p53/TP53, Wnt y señalización de hormonas esteroideas
	ESR	Receptor nuclear de estrógenos
	WWP1 (AIP5)	Ligasa E3 de ubiquitina, marca a RNF11, TGFBR1, Smad2, 6 y 7
	TRIM62 (RP11-131M11.1)	Ligasa E3 de ubiquitina en la inmunidad contra hongos
	SNRP70	Componente del espliceosoma para el reconocimiento de pre-mRNA 5'
	NEDD4-1	Ligasa E3 de ubiquitina

Con base en lo obtenido en la red de proteínas y con el fin de elucidar el mecanismo por el cual N-acetil-puromicina promueve la degradación de las proteínas Ski y SnoN vía el proteosoma, proponemos como hipótesis que el antibiótico PURO induce una asociación entre Ski o SnoN con las proteínas Smad2, Arkadia y PML, formando un complejo de degradación. Para esto, planteamos como estrategia experimental la realización de un ensayo de inmunofluorescencia (IF) para poder observar si existe colocalización entre las diferentes proteínas tras ser tratadas las células AD293-Pr con PURO. Para comprobar esto, será necesario llevar a cabo una IP de Ski y SnoN, y observar mediante WB si PURO promueve la interacción entre Smad2, Arkadia y PML, adicionalmente proponemos evaluar la presencia de PURO unida a las proteínas inmunoprecipitadas (Figura 11). Ambos experimentos ayudarían a conocer si se llevan a cabo las interacciones propuestas.

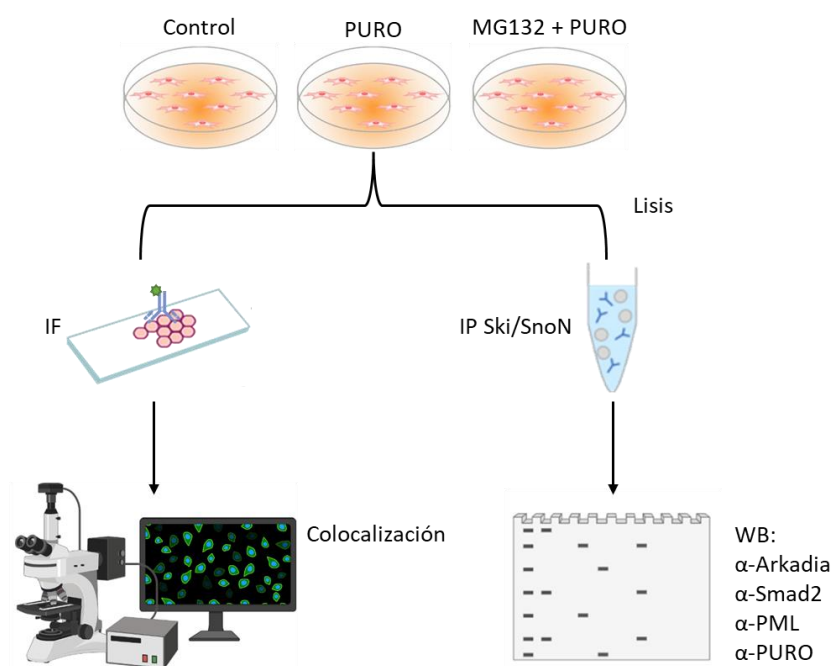


Figura 11. Propuesta metodológica para elucidar el mecanismo de acción de PURO en la degradación de Ski y SnoN. Se plantea el uso de la línea celular AD293-Pr y realizar tratamiento con PURO con y sin MG132 para comparar y prevenir la degradación proteosomal. Posteriormente realizar la tinción con anticuerpos específicos contra Ski, Arkadia, Smad2 y PML para inmunofluorescencia y observar si existe colocalización mediante microscopía confocal. A manera de comprobación, con la misma línea celular y los mismos tratamientos se plantea realizar un IP de Ski y SnoN y realizar un WB contra Arkadia, Smad2, PML y PURO.

DISCUSIÓN

La homeostasis de los niveles proteicos de los correguladores transcripcionales Ski y SnoN es muy importante, ya que ambas proteínas regulan diferentes procesos biológicos como el desarrollo embrionario o el mantenimiento de los tejidos, pero cuando sus niveles se ven alterados se pueden presentar patologías como el cáncer y la fibrosis (Tecalco-Cruz et al., 2018).

La degradación de proteínas juega un papel relevante en la homeostasis de sus niveles, este es un proceso altamente regulado por diferentes señales celulares. Ski y SnoN funcionan como correpresores de la vía del TGF- β y son degradados vía el proteosoma, cuando la vía está activa para permitir la transcripción de sus genes blanco. A este respecto, se ha encontrado que se puede inducir su degradación mediante otras señales, como es el tratamiento con antibióticos como ANS y PURO.

Cabe mencionar que, en el caso de PURO, además de inhibir la traducción, también promueve la activación de diversas señales como son la activación de MAPKs, la poliubiquitinación de proteínas, la activación de caspasas, cambios en la localización de algunas proteínas, cambios en el citoesqueleto, incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras (Figura 12). Muchos de estos efectos conllevan al estrés y apoptosis, como se ha observado en varias células que presentaron muerte celular al ser expuestas a este antibiótico.

Llama la atención que en la vía del TGF- β , PURO además de provocar la disminución de los niveles de las proteínas Ski y SnoN, induce cambios en la fosforilación de Smad3, así como un incremento en la síntesis de TGF- β 1, por lo que sería interesante elucidar el mecanismo por el cual este antibiótico induce estos efectos (Hernández-Damián J, et al., 2013; Xiao, H. et al, 2009).

Con el fin de estudiar el mecanismo de regulación de la estabilidad de Ski y SnoN por PURO, se planteó que el uso de un análogo que no produce estrés

ribotóxico como una buena opción para evaluar los efectos de PURO sobre la degradación de Ski y SnoN.

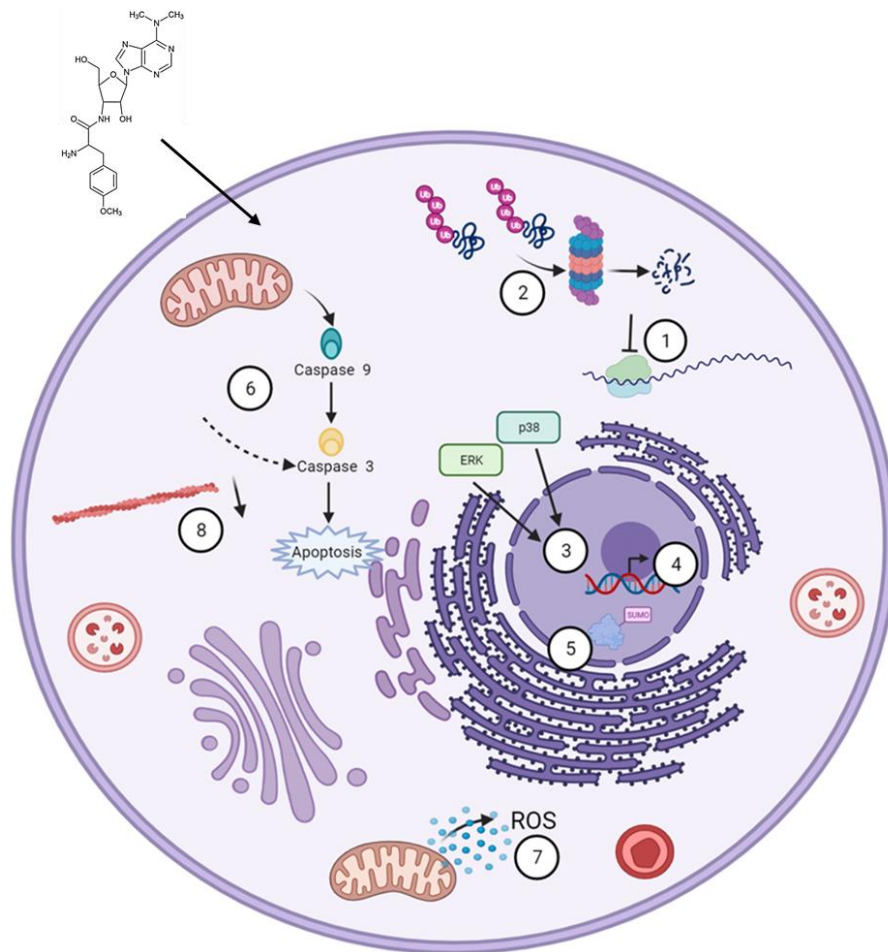


Figura 12. Representación de los diferentes efectos de la puomicina en la célula. 1. Inhibición de la traducción de proteínas; 2. Ubiquitinación de proteínas y su degradación vía proteosoma; 3. Activación de MAPK; 4. Activación de diversos genes; 5. Acumulación de SUMO; 6. Activación de caspas; 7. Producción excesiva de ROS; 8. Cambios en el citoesqueleto, disminución de la F-actina (imagen elaborada en BioRender).

En este trabajo se usaron células resistentes a PURO, las cuales contienen un plásmido con el gen *pac* que codifica para una acetil-transferasa específica para PURO. La acetilación de PURO por la enzima tiene lugar en el grupo amino primario del antibiótico (Vara et al., 1985). Este grupo amino es empleado para formar un enlace tipo peptídico con la cadena nascente de la proteína en el ribosoma, dando lugar a la interrupción de la traducción y a la liberación de péptidos asociados a

puromicina (Nathans, 1964). Por lo tanto, al ser acetilado, ya no tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas ni de unirse a las proteínas.

Además, como pudimos observar, las células A549 Pr y AD293 UB-Pr sobrevivieron a los efectos tóxicos de PURO y mostraron resistencia al antibiótico al continuar con una proliferación celular normal, en comparación con el control, demostrando ser un buen modelo para evaluar el efecto de PURO sobre las proteínas, al producir al análogo N-acetil-puromicina.

Por otro lado, previamente en el grupo de trabajo se observó que la N-acetil-puromicina no activa MAPKs al no fosforilarse p-38, la cual es una cinasa que regula apoptosis (Hernández-Damián et al., 2013). En este proyecto, investigamos si la N-acetil-puromicina producida por las células induce la degradación vía el proteosoma de las proteínas Ski y SnoN. Los datos muestran que efectivamente el análogo de PURO induce la degradación de Ski y SnoN en las células AD293-UB-Pr y únicamente de SnoN en las A549-Pr, ya que no se pudo evaluar a Ski en estas células porque en ciertas líneas celulares de carcinoma pulmonar el gen de Ski se encuentra metilado y no se expresa (Xie et al., 2017).

Una vez que comprobamos que nuestro modelo de células resistentes funciona, nos preguntamos si la N-acetil-puromicina pudiera asociarse de alguna forma con las proteínas, a pesar de ya no contar con el grupo amino libre, por lo que se decidió evaluar si existía una interacción covalente de la N-acetil-puromicina con las proteínas mediante WB y el uso de un anticuerpo específico anti-puromicina. Los datos muestran la unión del antibiótico a múltiples proteínas totales de ambas líneas celulares, por lo que pareciera que la N-acetil-puromicina puede unirse de manera covalente a diversas proteínas, ya que, de no existir esta unión, PURO no se podría detectar en el WB, al ser una molécula pequeña, esta migraría fuera del gel de poliacrilamida siendo indetectable por el anticuerpo.

A partir de lo observado surgió la duda de si esta unión de la N-acetil-puromicina a las proteínas es dependiente del proceso de traducción, por lo que las células AD293-UB-Pr fueron pretratadas con el antibiótico CHX, el cual en su mecanismo de acción inhibe la traducción al unirse al sitio E del ribosoma.

Posteriormente, se trataron a las células con PURO, y observamos que sigue habiendo una cierta unión del antibiótico a las proteínas en presencia de CHX, por lo que aparentemente esta unión de la N-acetil-puromicina es parcialmente independiente de la síntesis de proteínas. Sin embargo, pareciera que una menor proporción del antibiótico se unió, al comparar con las que no fueron pretratadas con CHX. Por lo tanto, una explicación podría ser que hubiera un remanente de PURO que no alcanzó a acetilarse por la enzima N-acetil transferasa o bien que la PURO se asocia de manera directa a varias proteínas con vida media corta o de alto recambio. Sin embargo, el mecanismo molecular implicado se desconoce.

Nathans, D. en 1964, reportó que en células *E. coli* resistentes a PURO, tras un tratamiento de 1.5 h con el antibiótico a una concentración de 80 μM se observa una incorporación del 13% de PURO marcada con H^3 a las proteínas. El porcentaje es bajo; sin embargo, esto indica que no toda la PURO pudo ser acetilada en ese lapso. No obstante, la concentración del antibiótico que nosotros empleamos fue de 21 μM (10 $\mu\text{g/ml}$), siendo menor que la empleada por Nathans, D., reduciendo la probabilidad de saturación enzimática. Aun así, para comprobar si realmente la unión que vimos corresponde a la N-acetil-puromicina y no a algún remanente de PURO tendríamos que realizar cursos temporales con PURO y observar si a mayor tiempo de tratamiento hay una menor unión de PURO, también mediante pretratamientos de diferentes inhibidores de la traducción como los antibióticos CHX, higromicina y G428 para analizar si hay unión de PURO a las proteínas.

La ubiquitinación es una modificación postraduccional importante al regular la estabilidad de las proteínas; se ha reportado, que al tratar a células HeLa con PURO y con el inhibidor del proteosoma MG132, se forman concentraciones de proteínas ubiquitinadas, tanto en el citoplasma como en el núcleo (Matsumoto & Saitoh, 2016). A este respecto, decidimos evaluar por WB el patrón de ubiquitinación de proteínas en las células AD293-UB-Pr al tratarlas con PURO y compararlas con las de las células AD293 WT. Tanto PURO como la N-acetil-puromicina incrementaron el marcaje de ubiquitina en las proteínas, aunque la intensidad de la marca de ubiquitina es menor en las células AD293-UB-Pr que en las células WT,

lo cual puede deberse a que la PURO induce un mayor marcaje de ubiquitina en las proteínas al inducir su degradación, como respuesta a la interrupción de la traducción y a la generación de péptidos de PURO, mientras que la N-acetilpuromicina no inhibe la traducción de proteínas. Sin embargo, es necesario evaluar el patrón de ubiquitinación inhibiendo al proteosoma, por aquellas proteínas que pudieron degradarse rápidamente tras ser ubiquitinadas,

Para que PURO pueda inducir el marcaje por ubiquitina para la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma, suponemos que pudiera haber una proteína "X" (no identificada) específica del tipo celular, que promoviera la formación de un complejo de destrucción conformado por Smad2, Arkadia y Ski o SnoN, por lo que se analizaron las interacciones proteína-proteína que se tienen reportadas para estas 4 proteínas. En la red de interacciones observamos que la proteína MVP puede asociarse con las proteínas de interés, por lo que podría estar involucrada en la formación del complejo de destrucción. La proteína MVP o VAULT1 puede asociarse tanto con Ski, SnoN y la ligasa E3 Arkadia. MVP es el principal componente de partículas de ribonucleoproteínas y parece estar implicada en diferentes procesos celulares, como diferenciación, inmunidad innata, infecciones virales, supervivencia celular y señalización. MVP o VAULT1 se localiza principalmente en el citoplasma, pero un 5% se puede encontrar en el núcleo. Se ha observado que puede asociarse con la ligasa E3 de ubiquitina COP1, para la degradación de c-Jun (Sung & Sang, 2009), por lo que su unión con Arkadia pudiera promover la degradación de Ski y SnoN.

Una segunda proteína que nos llamó la atención es PML. Esta se encuentra principalmente en el núcleo, formando concentraciones proteicas conocidas como cuerpos nucleares (NBs, del inglés *nuclear bodies*). Los PML-NBs se han visto implicados en diferentes procesos celulares, como supresores de tumores, en la reparación del DNA, en la respuesta antiviral, la apoptosis, la respuesta inflamatoria, la degradación vía proteosoma, la regulación de genes, entre otros. Además, los NBs tienen conexiones con la ubiquitinación; por ejemplo, PML está involucrada en la ubiquitinación de proteínas mal plegadas que llevan a enfermedades

neurodegenerativas (Hsu & Kao, 2018; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2018). De manera interesante, al tratar a células HeLa con el análogo de PURO, O-propargil-puromicina, se ha observado una colocalización entre los péptidos de O-propargil-puromicina con PML, ubiquitina y SUMO, al inhibir al proteosoma (Uozumi et al., 2016), habría que evaluar si la N-acetil-puromicina puede inducir también esta colocalización.

También se ha reportado una interacción directa de PML con SnoN y Ski teniendo papeles diferentes de acuerdo con el contexto celular. En el caso de SnoN, se observó que, como parte de su mecanismo antitumoral, en niveles altos SnoN se une y colocaliza con PML en cuerpos nucleares, esto lleva a la estabilización de p53 induciendo senescencia (Pan, D., et. al., 2009). La interacción de Ski y PML se ha observado al actuar en conjunto en la represión de genes a cargo de las proteínas Mad (Khan, M., et. al., 2001), siendo así posible que pudiera participar como proteína andamio en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por PURO.

Este trabajo muestra que el uso de células resistentes a PURO pueden ser un buen modelo para evaluar los efectos de la N-acetil-puromicina, entre ellos la degradación de Ski y SnoN; sin embargo, aún queda por elucidar el mecanismo por el cual la N-acetil-puromicina puede inducir su degradación vía el proteosoma. Así mismo, queda por resolver si la N-acetil-puromicina puede unirse de manera covalente a proteínas de manera independiente a la traducción.

Además, algunas proteínas andamio como PML o MVP podrían estar involucrados en el mecanismo para promover la ubiquitinación y degradación de Ski y SnoN, por lo que se requiere evaluar si PURO induce la formación del complejo de degradación Smad2/Arkadia/Ski o SnoN y si implica la participación de PML o MVP. Sin embargo, no descartamos que alguna otra proteína que no se haya reportado pudiera estar involucrada.

Considerando lo observado en nuestra red de interacción de proteínas respecto a que PML puede asociarse con Ski, SnoN, Smad2 y Arkadia, y que se ha observado una colocalización de PML con un análogo de PURO, proponemos el

siguiente modelo de estudio (Figura 13). En un contexto en donde se tiene a Smad2 fosforilado de manera basal, al tratar con PURO a células que expresan al gen *pac*, la N-acetil transferasa dará lugar a N-acetil-puromicina, la cual podría unirse a PML y promover el acercamiento o interacción directa entre Smad2, SnoN/Ski y la ligasa Arkadia, dando lugar a un complejo de destrucción encargado de ubiquitinar a SnoN y a Ski para su degradación vía el proteosoma. Para investigar si esto realmente ocurre, proponemos el uso de ensayos de inmunofluorescencia para observar la colocalización en nuestras proteínas de interés. Esta técnica nos permitiría conocer la localización de las proteínas en la célula al marcarlas con anticuerpos acoplados a componentes fluorescentes con diferente espectro de excitación; así, si dos o más proteínas se encuentran juntas podremos observar que se superponen las señales de fluorescencia. Para comprobar si estas proteínas interactúan proponemos una IP de Ski y SnoN, y mediante WB observar si las proteínas propuestas co-inmunoprecipitan indicando que están asociadas para dar probablemente lugar al complejo de destrucción. Al haber observado que la N-acetil puromicina podría unirse de manera independiente a las proteínas, mediante WB también se plantea evaluar su presencia en las proteínas co-inmunoprecipitadas.

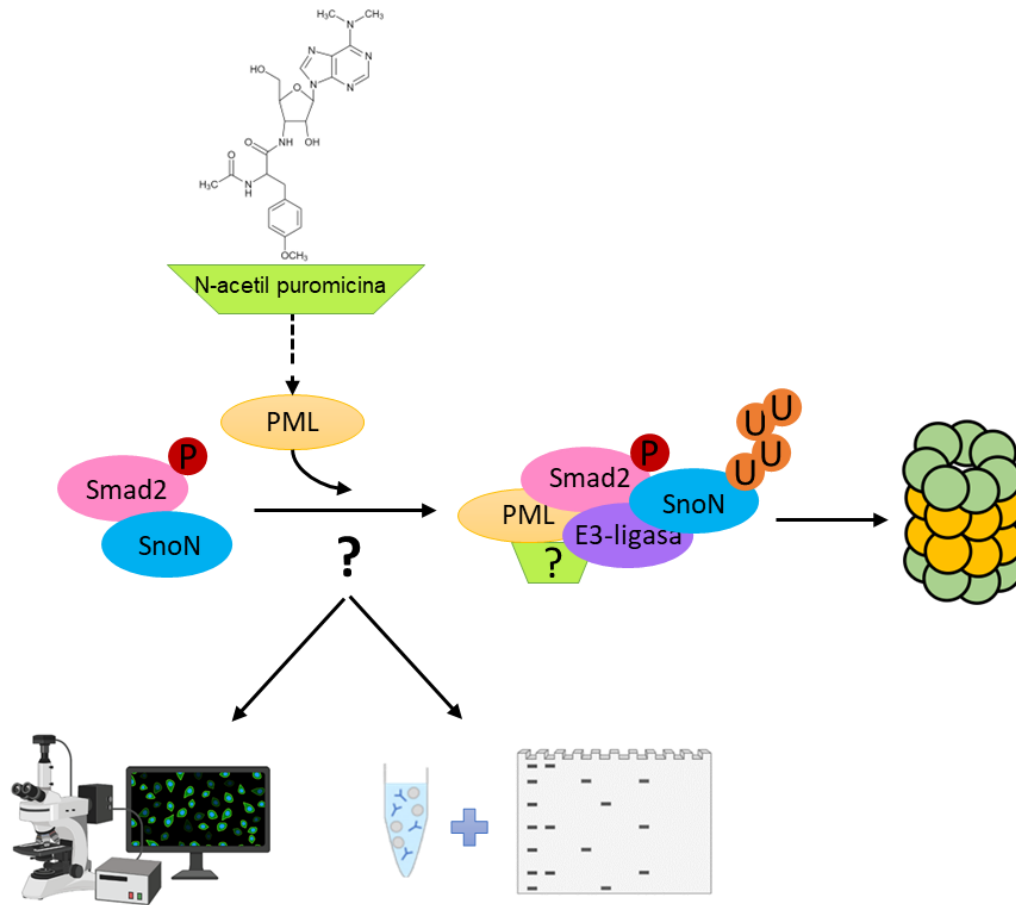


Figura 13. Modelo propuesto del mecanismo de acción de PURO y como estudiarlo. Se requiere de Smad2 fosforilado de manera basal, tras el tratamiento con PURO, las células con resistencia acetilan la PURO dando lugar a N-acetil puromicina, esta podría ser capaz de interactuar o unirse con PML y promover el acercamiento entre Smad2, SnoN/Ski, y la ligasa Arkadia, dando lugar a un complejo de degradación en el que pudiera estar PML presente y también la N-acetil PURO, para así marcar con ubiquitina a SnoN/Ski y degradarse vía proteosoma. Para comprobar esto, se plantea el uso de dos técnicas, colocalización por inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos concluir que:

- PURO regula diferentes procesos celulares además de la inhibición de la síntesis de proteínas que promueven el estrés celular. Lo cual sugiere que el uso de un análogo puede ayudar al estudio de los mecanismos que tiene el antibiótico, como la ubiquitinación y degradación de Ski y SnoN.
- El modelo de resistencia a PURO de las células AD293 UB-Pr y A549-Pr, puede ser utilizado para el análisis sobre el efecto de la degradación vía proteosoma, al no presentarse muerte celular al tratamiento con el antibiótico a diferentes dosis.
- La N-acetil-puromicina induce la degradación de Ski y SnoN vía el proteosoma.
- La N-acetil-puromicina puede unirse covalentemente con las proteínas de una manera independiente a la traducción.
- PURO y N-acetil-puromicina cambian el patrón de ubiquitinación de las proteínas.
- Las proteínas PML o MVP son candidatos que podrían participar en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN inducido por PURO.
- La N-acetil-puromicina puede ser una herramienta útil para el estudio de los niveles de las proteínas Ski y SnoN.

PERSPECTIVAS

- Corroborar que la unión covalente de N-acetil-puromicina sea independiente de la traducción mediante cursos temporales con PURO y CHX.
- Evaluar cambios en la ubiquitinación de Ski y SnoN por PURO.
- Evaluar si PURO es capaz de asociarse directamente con Ski, SnoN, Smad2 o Ligasa E3 (Arkadia/ Smurf2).
- Evaluar si PURO promueve la formación del complejo de destrucción Ski o SnoN/Smad2/Ligasa E3 con ensayos de colocalización por inmunofluorescencia, así como mediante ensayos de co-IP y WB.
- Evaluar si PML o VMP se encuentran en el complejo de destrucción mediante inmunofluorescencia, co-IP y WB.

REFERENCIAS

- Akhurst, R. J., & Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 790–811. <https://doi.org/10.1038/nrd3810>
- Bauer, J., Bakke, O., & Morth, J. P. (2017). Overview of the membrane-associated RING-CH (MARCH) E3 ligase family. *New biotechnology*, 38, 7-15.
- Burka, E. R., Ballas, S. K., & Sabesin, S. M. (1975). Toxic effect of puromycin on erythrocyte membranes which is unrelated to inhibition of protein synthesis. *Blood*, 45(1), 21–27. <https://doi.org/10.1182/blood.v45.1.21.21>
- Carmignac, V., Thevenon, J., Adès, L., Callewaert, B., Julia, S., Thauvin-Robinet, C., Gueneau, L., Courcet, J. B., Lopez, E., Holman, K., Renard, M., Plauchu, H., Plessis, G., De Backer, J., Child, A., Arno, G., Duplomb, L., Callier, P., Aral, B., ... Faivre, L. (2012). In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant shprintzen-goldberg syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 91(5), 950–957. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.002>
- Cassel R., Ducreux S., Alam M.R., Dingreville F., Berlé C., Burda-Jacob K., Chauvin M.A., Chikh K., Païta L., Al-Mawla L., Crola Da Silva C., Rieusset J., Thivolet C., Van Coppenolle F., Madec A.M. (2016). Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. *Plos One*; 11(2): 1-17.
- Chaikuad, A., & Bullock, A. N. (2016). Structural basis of intracellular TGF- β signaling: Receptors and smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022111>
- Chanda, A., Sarkar, A., & Bonni, S. (2018). The SUMO system and TGF β signaling interplay in regulation of epithelial-mesenchymal transition: Implications for cancer progression. *Cancers*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cancers10080264>
- Croons, V., Martinet, W., Herman, A. G., & De Meyer, G. R. Y. (2008). Differential effect of the protein synthesis inhibitors puromycin and cycloheximide on vascular smooth muscle cell viability. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(3), 824–832. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132944>
- De Boeck, M., & Ten Dijke, P. (2012). Key role for ubiquitin protein modification in TGF β signal transduction. In *Uppsala Journal of Medical Sciences* (Vol. 117, Issue 2, pp. 153–165). <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.654858>
- Deheuninck, J., & Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. *Cell Research*, 19(1), 47–57. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.324>
- Devlin, T. M. (2000). *Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas* (Tercera ed. Vol. 2). Barcelona: REVERTE.
- Dezitter, X., Masselot, B., Tardivel, M., Mereau-Richard, C., Formstecher, P., & Idziorek, T. (2011). Macromolecular synthesis inhibitors perturb glucocorticoid receptor trafficking. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 126(3–5), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.04.008>
- Ding, X., Zhu, F., Li, T., Zhou, Q., Hou, F. F., & Nie, J. (2011). Numb protects renal proximal tubular cells from puromycin aminonucleoside-induced apoptosis through

- inhibiting Notch signaling pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 7(3), 269–278. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.269>
- Fischer, K. G., Jonas, N., Poschenrieder, F., Cohen, C., Kretzler, M., Greiber, S., & Pavenstädt, H. (2002). Characterization of a Na⁺-Ca²⁺ exchanger in podocytes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(10), 1742–1750. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.10.1742>
- Ha, T. S., Park, H. Y., Seong, S. Bin, & Ahn, H. Y. (2016). Puromycin aminonucleoside increases podocyte permeability by modulating ZO-1 in an oxidative stress-dependent manner. *Experimental Cell Research*, 340(1), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.12.001>
- Hernández-Damián, J., Tecalco-Cruz, A. C., Ríos-López, D. G., Vázquez-Victorio, G., Vázquez-Macías, A., Caligaris, C., Sosa-Garrocho, M., Flores-Pérez, B., Romero-Avila, M., & Macías-Silva, M. (2013). Downregulation of SnoN oncoprotein induced by antibiotics anisomycin and puromycin positively regulates transforming growth factor- β signals. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(11), 5049–5058. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.006>
- Hsu, K. S., & Kao, H. Y. (2018). PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. In *Cell and Bioscience* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0204-8>
- Jia, R., Hong, X., Li, S., Haichun, Y., & Chuanming, H. (2010). Expression of angiopoietin-Like 3 associated with puromycin-induced podocyte damage. *Nephron - Experimental Nephrology*, 115(3). <https://doi.org/10.1159/000313829>
- Jiang, L., Cui, H., Ding, J., Yang, A., & Zhang, Y. (2020). Puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury is ameliorated by the Smad3 inhibitor SIS3. *FEBS Open Bio*, 10(8), 1601–1611. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12916>
- Jung, J. H., Lee, H., Kim, J. H., Sim, D. Y., Ahn, H., Kim, B., Chang, S., & Kim, S. H. (2019). P53-dependent apoptotic effect of puromycin via binding of ribosomal protein I5 and I11 to mdm2 and its combination effect with rita or doxorubicin. *Cancers*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cancers11040582>
- Kanjanabuch, T., Ma, L. J., Chen, J., Pozzi, A., Guan, Y., Mundel, P., & Fogo, A. B. (2007). PPAR- γ agonist protects podocytes from injury. *Kidney International*, 71(12), 1232–1239. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002248>
- Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P., & Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RAR α in Mad-mediated transcriptional repression. *Molecular cell*, 7(6), 1233–1243. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00257-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00257-x)
- Koshikawa, M., Mukoyama, M., Mori, K., Suganami, T., Sawai, K., Yoshioka, T., Nagae, T., Yokoi, H., Kawachi, H., Shimizu, F., Sugawara, A., & Nakao, K. (2005). Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(9), 2690–2701. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004121084>
- Krasnow, S. H., Burka, E. R., & Ballas, S. K. (1981). Effect of puromycin, cycloheximide and concanavalin a on in vitro synthesis of human reticulocyte membrane proteins. *International Journal of Biochemistry*, 13(6), 707–711. <https://doi.org/10.1016/0020->

711X(81)90039-2

- Krishnamurti, U., Zhou, B., Fan, W. W., Tsilibary, E., Wayner, E., Kim, Y., Kashtan, C. E., & Michael, A. (2001). Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(4), 758–766. <https://doi.org/10.1681/asn.v124758>
- Kubo, K., & Foley, J. E. (1985). Effect of puromycin on sugar transport in isolated rat adipocytes. *Biochemical and Biophysical Acta*, 187–189.
- Lallemant-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2018). PML nuclear bodies: from architecture to function. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 52, pp. 154–161). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011>
- Lehoux, J. G., & Forest, J. C. (1975). Cytochrome P-450 and 18-oxygenase system from beef adrenocortical mitochondria — inhibitory effect of puromycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 65(1), 392–398. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(75\)80106-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(75)80106-9)
- Liu, S., Ding, J., Fan, Q., & Zhang, H. (2010). The activation of extracellular signal-regulated kinase is responsible for podocyte injury. *Molecular Biology Reports*, 37(5), 2477–2484. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9761-6>
- Macías-Silva, M., Vázquez-Victorio, G., & Hernández-Damián, J. (2010). Anisomycin is a Multifunctional Drug: More than Just a Tool to Inhibit Protein Synthesis. *Current Chemical Biology*, 4(2), 124–132. <https://doi.org/10.2174/2212796811004020124>
- Massagué, J. (1998). TGF- β signal transduction. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 67, Issue 1, pp. 753–791). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>
- Matsumoto, H., & Saitoh, H. (2016). Puromycin induces SUMO and ubiquitin redistribution upon proteasome inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(3), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.025>
- Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E., & Weissman, A. M. (2014). RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(1), 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.026>
- Min, S. Y., Ha, D. S., & Ha, T. S. (2018). Puromycin aminonucleoside triggers apoptosis in podocytes by inducing endoplasmic reticulum stress. *Kidney Research and Clinical Practice*, 37(3), 210–221. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.2018.37.3.210>
- Miyazono, K. (2000). Positive and negative regulation of TGF- β signaling. In *Journal of Cell Science* (Vol. 113, Issue 7, pp. 1101–1109). <https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1101>
- Morika, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>
- Nagano, Y., Mavrakis, K. J., Kian, L. L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, H., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., Episkopou, V., Miyazono, K., & Miyazawa, K. (2007). Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor- β signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20492–20501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701294200>

- Nakamura, J. (1994). Ethanol-induced reduction of the amount of stimulatory GTP-binding regulatory protein, Gs, in wild-type S49 murine lymphoma cells: Effect of cycloheximide and puromycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1209(1), 111–116. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90145-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90145-7)
- Nathans, D. (1964). PUROMYCIN INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS: INCORPORATION OF PUROMYCIN INTO PEPTIDE CHAINS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51(1963), 585–592.
- Oba, S., Hino, M., & Fujita, T. (2008). Adrenomedullin protects against oxidative stress-induced podocyte injury as an endogenous antioxidant. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(2), 510–517. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm600>
- Pan, D., Zhu, Q., & Luo, K. (2009). SnoN functions as a tumour suppressor by inducing premature senescence. *The EMBO journal*, 28(22), 3500–3513. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.250>
- Pariza, M. W., Butcher, F. R., Kletzien, R. F., Becker, J. E., & Potter, V. R. (1976). Induction and decay of glucagon induced amino acid transport in primary cultures of adult rat liver cells: paradoxical effects of cycloheximide and puromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(12), 4511–4515. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.12.4511>
- Rico, M., Mukherjee, A., Konieczkowski, M., Bruggeman, L. A., Miller, R. T., Khan, S., Schelling, J. R., & Sedor, J. R. (2005). WT1-interacting protein and ZO-1 translocate into podocyte nuclei after puromycin aminonucleoside treatment. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 289(2 58-2), 431–441. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00389.2004>
- Rigothier, C., Saleem, M. A., Bourget, C., Mathieson, P. W., Combe, C., & Welsh, G. I. (2016). Nuclear translocation of IQGAP1 protein upon exposure to puromycin aminonucleoside in cultured human podocytes: ERK pathway involvement. *Cellular Signalling*, 28(10), 1470–1478. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.06.017>
- Sanwal, V., Pandya, M., Bhaskaran, M., Franki, N., Reddy, K., Ding, G., Kapasi, A., Valderrama, E., & Singhal, P. C. (2001). Puromycin aminonucleoside induces glomerular epithelial cell apoptosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 70(1), 54–64. <https://doi.org/10.1006/exmp.2000.2345>
- Schwartz, A. L., & Ciechanover, A. (2009). Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: Implications for human pathobiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 73–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340>
- Söderlund, G., Haarhaus, M., Chisalita, S., & Arnqvist, H. J. (2004). Inhibition of puromycin-induced apoptosis in breast cancer cells by IGF-I occurs simultaneously with increased protein synthesis. *Neoplasma*, 51(1), 1–11.
- Srivastava, T., Sharma, M., Yew, K. H., Sharma, R., Duncan, R. S., Saleem, M. A., McCarthy, E. T., Kats, A., Cudmore, P. A., Alon, U. S., & Harrison, C. J. (2013). LPS and PAN-induced podocyte injury in an in vitro model of minimal change disease: Changes in TLR profile. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 7(1), 49–60. <https://doi.org/10.1007/s12079-012-0184-0>
- Su, L. H., Lee, G. A., Huang, Y. C., Chen, Y. H., & Sun, C. H. (2007). Neomycin and

- puromycin affect gene expression in *Giardia lamblia* stable transfection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 124–135.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.015>
- Sun, X., Chu, Y., Zhang, C., Du, X., He, F., Chen, S., Gao, P., Liu, J., Zhu, Z., & Meng, X. (2012). Effect of TRPC6 knockdown on puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 32(3), 340–345. <https://doi.org/10.1007/s11596-012-0059-x>
- Sun, X., Fang, Z., Zhu, Z., Yang, X., He, F., & Zhang, C. (2009). Effect of down-regulation of TRPC6 on the puromycin aminonucleoside-induced apoptosis of mouse podocytes. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 29(4), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s11596-009-0405-9>
- Sung, J. R., & Sang, C. P. (2009). Targeting major vault protein in senescence-associated apoptosis resistance. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 13, Issue 4, pp. 479–484). <https://doi.org/10.1517/14728220902832705>
- Tecalco-Cruz, A. C., Ríos-López, D. G., Vázquez-Victorio, G., Rosales-Alvarez, R. E., & Macías-Silva, M. (2018). Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0015-8>
- Theile, D., Staffen, B., & Weiss, J. (2010). ATP-binding cassette transporters as pitfalls in selection of transgenic cells. *Analytical Biochemistry*, 399(2), 246–250.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.014>
- Uozumi, N., Matsumoto, H., & Saitoh, H. (2016). Detection of O-propargyl-puromycin with SUMO and ubiquitin by click chemistry at PML-nuclear bodies during abortive proteasome activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(2), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.155>
- van Lith, M., Tiwari, S., Padiani, J., Milligan, G., & Bulleid, N. J. (2011). Real-time monitoring of redox changes in the mammalian endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 124(14), 2349–2356. <https://doi.org/10.1242/jcs.085530>
- Vara, J., Perez-Gonzalez, J. A., & Jimenez, A. (1985). Biosynthesis of Puromycin by *Streptomyces alboniger*. Characterization of Puromycin N-Acetyltransferase†. *Biochemistry*, 24(27), 8074–8081. <https://doi.org/10.1021/bi00348a036>
- Varshavsky, A. (2012). The ubiquitin system, an Immense Realm. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 167–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051910-094049>
- Vázquez-Macías, A., Ruíz-Mendoza, A. B., Fonseca-Sánchez, M. A., Briones-Orta, M. A., & Macías-Silva, M. (2005). Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS Letters*, 579(17), 3701–3706.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.057>
- Vázquez-Victorio, G., Rosales-Alvarez, R. E., Ríos-López, D. G., Tecalco-Cruz, A. C., & Macías-Silva, M. (2017). TGF-beta signaling pathway regulation by transcriptional cofactors Ski and SnoN in health and disease. In *Advances in Health and Disease*. Nova Science Publishers.
- Wada, T., Pippen, J. W., Terada, Y., & Shankland, S. J. (2005). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is required for TGF- β 1-induced podocyte apoptosis. *Kidney*

International, 68(4), 1618–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00574.x>

Weber, J., Polo, S., & Maspero, E. (2019). HECT E3 ligases: A tale with multiple facets. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10, Issue APR, pp. 1–8).

<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00370>

Wrześniok, D., Surazyński, A., Karna, E., Buszman, E., & Pałka, J. (2005). Melanin counter act puromycin-induced inhibition of collagen and DNA biosynthesis in human skin fibroblasts. *Life Sciences*, 77(5), 528–538.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.070>

Xiao, H. Q., Shi, W., Liu, S. X., Zhang, B., Xu, L. X., Liang, X. L., & Liang, Y. Z. (2009). Podocyte injury is suppressed by 1,25-dihydroxyvitamin d 3 via modulation of transforming growth factor- β 1/bone morphogenetic protein-7 signalling in puromycin aminonucleoside nephropathy rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(7), 682–689. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05133.x>

Xie, M., Wu, X., Zhang, J., Zhang, J., & Li, X. (2017). Ski regulates Smads and TAZ signaling to suppress lung cancer progression. *Molecular Carcinogenesis*, 56(10), 2178–2189. <https://doi.org/10.1002/mc.22661>

Yu, L., Liu, Y., Wu, Y., Liu, Q., Feng, J., Gu, X., Xiong, Y., Fan, Q., & Ye, J. (2014). Smad3/Nox4-mediated mitochondrial dysfunction plays a crucial role in puromycin aminonucleoside-induced podocyte damage. *Cellular Signalling*, 26(12), 2979–2991. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.030>

ANEXO

Reactivos y soluciones

TNTE 0.5%:

Tris 50mM (pH7.4)
NaCl 150mM
Triton (0.5%)
EDTA 1mM

TNTE 0.1%:

TN (10X) 10ml
EDTA 0.5M 0.2ml
Triton 10% 5ml
ddH₂O 85ml

TN (10X):

Tris 0.5M
NaCl 1.5M
ddH₂O

Inhibidores de Fosfatasas:

NaF (40X) 1M en H₂O 25µl/ml de buffer
NaPPi (100X) 100mM en H₂O+ 10µl/ml de buffer
80µl de HCl 1M/10ml de sol.
NaVO₄ (100X) 100mM en H₂O 10µl/ml de buffer

Inhibidores de Proteasas:

PMSF (200X) en isopropanol 5µl/ml de buffer
Trypsin inhibitor (100X) 10µl/ml de buffer
10mg/ml en TE (pH 7.4)
Pepstatina A (100X) 10µl/ml de buffer
1mg/ml en DMSO
Leupetin (500X) 5mg/ml en TE 2µl/ml de buffer
Benzamidine (500X) 2µl/ml de buffer
50mg/ml en TE
Beta-Glicerofosfato (500X) en TE 2µl/ml de buffer

TE:

10mM Tris pH 7.4
1mM EDTA
ddH₂O

Proteína G-agarosa (1:5):

2mL de proteína G-agarosa de GIBCO y llevarlo a 10ml con TNTE 0.1%. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces. Lavar la resina 3 veces, centrifugando a 1000 r.p.m. por 20 seg., descartando el sobrenadante cada vez. Para finalizar resuspender en 1:5 con TNTE 0.1%.