



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS**

Facultad de Medicina

Análisis de las vías de transducción que intervienen  
en la regulación de la proteína proapoptótica  
Smac/DIABLO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2007



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.

## **RECONOCIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado. Número de becario: 130560.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP), por el apoyo otorgado mediante una beca complementaria.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Vilma Maldonado Lagunas, Dr. Jorge Meléndez Zajgla y Dr. Rogelio Hernández Pando, por las valiosas contribuciones durante el desarrollo del proyecto y por las revisiones del manuscrito final.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado: Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade, Dra. Vilma Maldonado Lagunas, Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, Dra. Martha Robles Flores, Dra. Sara Huerta Yépez, Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo y Dra. Marina Macías Silva, por sus valiosos comentarios y observaciones que enriquecieron sustancialmente este documento.

Agradezco de manera especial a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas y al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por haberme dado la oportunidad de ingresar a su laboratorio, por haberme guiado durante toda mi estancia, por compartir sus conocimientos y por haberme dado la libertad de explorar.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por todo su apoyo durante mi formación y por su trato siempre amable y respetuoso.

A mis compañeros del laboratorio: Rubén, Gisela, Floria, Magali, Juan Carlos, Alondra, Franz, Luz e Ingrid. Me llevo lo mejor de cada uno de ustedes.

A todos mis conocidos y al personal del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) quienes de una u otra forma hicieron más agradable mi estancia.

A todos mis profesores quienes contribuyeron de manera sustancial a mi formación profesional y quienes me mostraron que aman verdaderamente su trabajo.

A todos mis compañeros de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología de la UNAM: Jérica, Lázaro, Cecilia, Carolina, Yolanda, Julieta, Aída, Xóchitl, Joel, Anita, Sandra, Salvador, Nahú, Jonnatan, Bety, Maribel, Óscar, Omar, Luis oso, Luis chiquito, Martosita, Jesús, Ireliá, Ernestina, Marcela, Karina, Adriana, Helxine y Mauleón porque aprendí mucho de ustedes y porque siempre fueron amables y afectuosos. También al Dr. Fernando Cervantes por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por la confianza depositada en mí.

A todas y cada una de las personas que desinteresadamente me han ayudado a cumplir esta meta.

## DEDICATORIAS

Dedico esta pequeña obra a mi amado hijo Leonardo quien es para mí un motivo de superación constante, una razón de ser y de vivir, y una luz que me acompaña en todo momento en la mente y en el corazón.

A mi amada esposa Patty porque siempre me ha brindado su apoyo incondicional y por sus virtudes invaluable. Este es un logro compartido.

A mis papás que a pesar de la distancia siempre me acompañan y me expresan su infinito amor. Gracias por su ejemplo.

A mis hermanos Jesús y René por su apoyo y su gran amor.

A mis suegros y a mis cuñados, por su ayuda brindada en todo momento y por su gran amor por Leo.

A mi amigo Rubén, por todos los momentos compartidos, por el intercambio de ideas y pensamientos, por esos momentos de relajación y de manifestación del espíritu.

A mis amigos Jesi, Lázaro y Ceci, por formar un gran equipo y compartir no sólo el trabajo sino también nuestros pensamientos.

A Dios, porque siempre está conmigo y me da fuerzas para levantarme y continuar. Porque en los peores momentos me ha brindado una solución.

## ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIAS.....	3
ÍNDICE.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Caspasas.....	11
Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs) .....	12
Smac/DIABLO y sus isoformas.....	12
Mecanismo de inhibición de las IAPs por Smac/DIABLO.....	15
Mecanismos no transcripcionales de regulación de Smac/DIABLO.....	16
Mecanismos transcripcionales de regulación de Smac/DIABLO.....	17
Smac/DIABLO y el cáncer.....	19
El AMP cíclico y la apoptosis.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	32
Clonación, secuenciación y caracterización del promotor del gen Smac/DIABLO.....	32
Regulación de Smac/DIABLO por cAMP.....	36
JNK no regula la expresión de Smac/DIABLO.....	40
Vía de MAPK.....	42
La apoptosis inducida por el cAMP es mediada por Smac/DIABLO.....	44
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS A FUTURO.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	64
Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation.....	64
Smac/DIABLO y su papel en la regulación de la apoptosis.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

8-Br-cAMP – 8-bromo-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
8-Cl-cAMP – 8-cloro-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
8-CPT-cAMP – 8-(4-clorofeniltio)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
AIF – Apoptosis inducing factor (Factor inductor de apoptosis)  
Apaf-1 – Apoptosis protease activating factor-1 (Factor 1 activador de proteasas en la apoptosis)  
Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 (Proteína antiapoptótica descubierta en linfomas de células B)  
BIR – Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat (Repetido de IAP en baculovirus)  
cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
CED-3 – Cell death defective (Proteasa apoptótica de *Caenorhabditis elegans*)  
CRE – Elemento de respuesta al cAMP  
CREB – Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP  
DIABLO – Direct IAP-binding protein with low pI (Proteína proapoptótica homóloga a Smac en humano)  
DISC – Death inducing signaling complex (Complejo de señalización inductor de muerte celular)  
DMEM – Medio de Eagle modificado de Dulbecco  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid  
EST – Expressed sequence tag  
ExoIII – Exonucleasa III  
GAPDH – Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa  
IAPs – Proteínas inhibidoras de apoptosis  
IBMX – Isobutilmetilxantina  
ICAD – Inhibitor of caspase-activated DNase (Proteína inhibidora de la DNasa activada por caspasas)  
IFN- $\gamma$  - Interferón gamma  
JNK – c-Jun NH2-terminal kinase (Cinasa del N-terminal de c-Jun)  
MAPK - Mitogen-activated protein kinase (Proteína cinasa activada por mitógenos)  
MEK – MAPK/ERK kinase (Cinasa de MAPK/ERK)  
MTS – Mitochondria targeting sequence (Señal de localización mitocondrial)  
p $\beta$ GAL – Plásmido de la beta-galactosidasa  
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa  
PKA – Proteína cinasa A  
pSEAP – Plásmido de la fosfatasa alcalina secretada  
RNAm – Ácido ribonucleico mensajero  
RNAsa - Ribonucleasa  
RT-PCR – Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa  
SAPK – Stress-activated protein kinase (Proteína cinasa activada por estrés)  
SFB – Suero fetal bovino  
SIDA – Síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
Smac – Second mitochondria-derived activator of caspases (Proteína homóloga a DIABLO)  
TE – Buffer Tris/EDTA  
TESS – Transcription element search software  
TNF – Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)

Tris – (Hydroxymethyl)aminomethane

TRAIL – Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Ligando inductor de muerte relacionado a TNF)



## RESUMEN

Smac/DIABLO es una proteína mitocondrial que participa en el proceso de muerte celular apoptótica, secuestrando a diversos miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Esta acción permite la activación de caspasas, el corte de sustratos celulares clave y la muerte celular. La liberación de la mitocondria se considera el paso regulatorio principal en la actividad de Smac/DIABLO. Sin embargo, el hecho de que al menos una isoforma, Smac/DIABLO beta, no resida en este organelo, implica que la regulación transcripcional podría también ser importante. El cAMP es un segundo mensajero bien conocido con efectos apoptóticos importantes. Para determinar si el cAMP podría estar implicado en la regulación del gen Smac/DIABLO, en este estudio se analizaron 2903 pares de bases río arriba de la secuencia codificante y se caracterizó el promotor mínimo, el cual contiene un sitio consenso CRE. Se encontró que la vía cAMP/PKA/CREB regula de manera importante la transcripción de Smac/DIABLO, puesto que la exposición al análogo del cAMP, el 8-CPT-cAMP, al activador de la adenilato ciclasa, forskolina, al inhibidor de fosfodiesterasa, isobutilmetilxantina, o el bloqueo de la activación de la PKA con H-89, reguló la actividad del promotor, lo cual se demostró por medio de ensayos de gen reportero y de RT-PCR. Adicionalmente, los resultados de mutagénesis sitio-dirigida revelaron que el sitio CRE es biológicamente funcional y se requiere para la actividad de promotor inducida por el cAMP, en células HeLa. Como apoyo a estos resultados, una versión dominante negativa del factor responsivo a PKA, KCREB, redujo la expresión basal de Smac/DIABLO, y el promotor ya no fue responsivo al cAMP. La reducción de la expresión de Smac/DIABLO, a través de la utilización de oligonucleótidos antisentido, bloqueó el efecto apoptótico del cAMP en células de cáncer de cérvix. Estos resultados muestran que el cAMP es un modulador importante del umbral apoptótico en células de cáncer a través de la regulación de la expresión de Smac/DIABLO.

## **ABSTRACT**

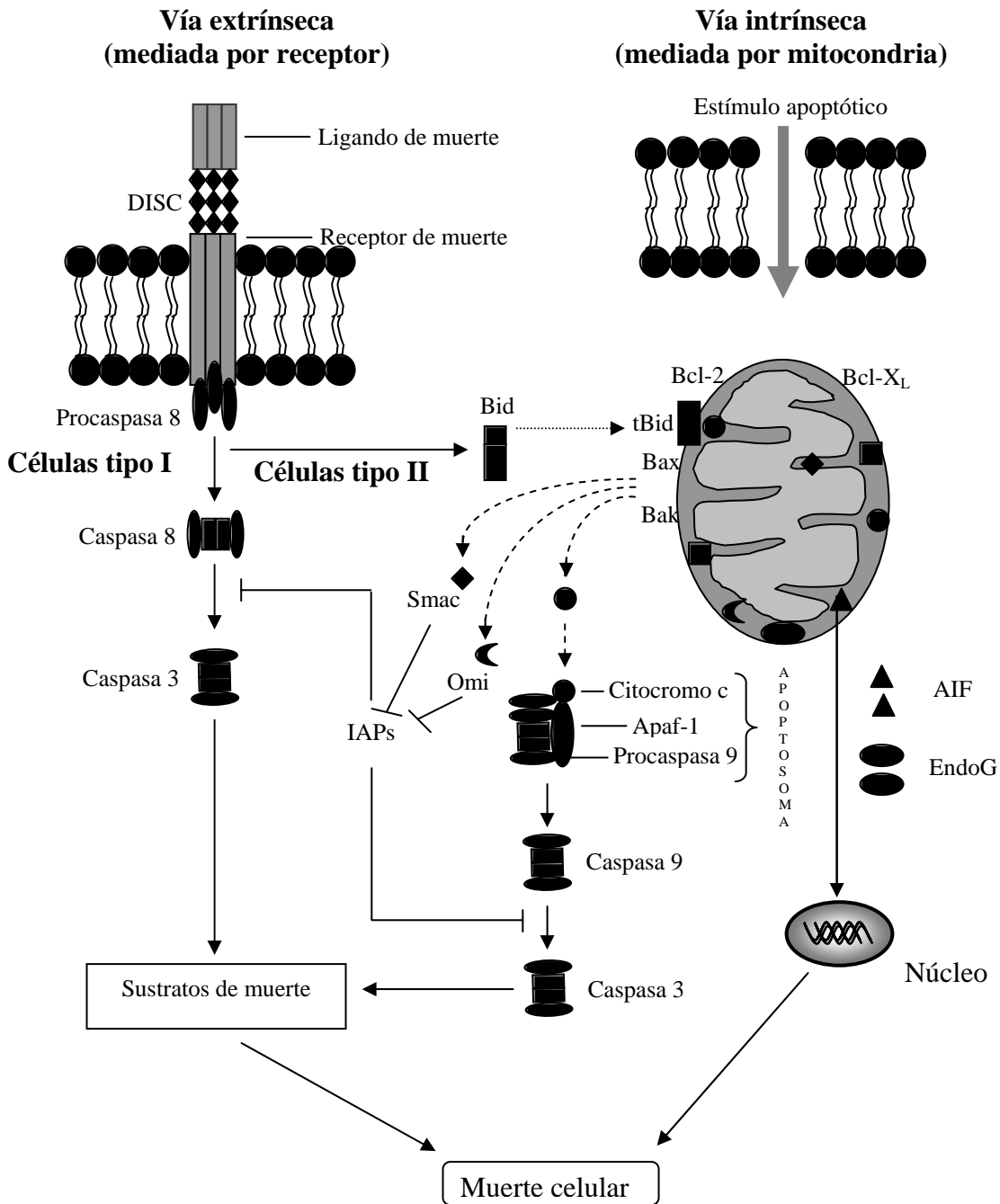
Smac/DIABLO is a mitochondrial protein that participates in apoptotic cell death by means of sequestering several members of the inhibitor of apoptosis protein family. This action allows caspase activation, cleavage of key cellular substrates and death. Release from mitochondria is considered the main regulatory step of Smac/DIABLO activity. Nevertheless, the fact that at least one isoform, Smac-beta, does not reside in this organelle implies that transcriptional regulation could also be important. cAMP is a well known second messenger with important apoptotic effects. To analyze if cAMP could be involved in Smac/DIABLO gene regulation, we analyzed 2903 base pairs upstream of the coding sequence and characterized the minimal promoter, which contains a consensus CRE site. We found that cAMP/PKA/CREB pathway is indeed an important regulator of Smac/DIABLO transcription, since exposure to the cAMP analog 8-CPT-cAMP, the adenylyl cyclase activator forskolin, the inhibitor of phosphodiesterase isobutylmethylxanthine or by hindering PKA activation with H89, regulated the promoter activity, as shown by gene reporter and RT-PCR assays. Additionally, the results of site-directed mutagenesis revealed that the consensus CRE site was biologically functional and required for cAMP-induced promoter activity in human HeLa cells. Supporting these results, a negative dominant version of the protein kinase A responsive factor, KCREB, reduced basal Smac/DIABLO expression and rendered the promoter unresponsive to cAMP. Reducing Smac expression using an antisense approach blocked the apoptosis effects of cAMP in cervical cancer cells. These results show that cAMP is an important modulator of the apoptotic threshold in cancer cells by means of regulating Smac/DIABLO expression.

## INTRODUCCIÓN

La apoptosis juega un papel central en el desarrollo y homeostasis de todos los organismos multicelulares (Jacobson *et al*, 1997). Se presenta en procesos tan diversos como la embriogénesis, el recambio normal en tejidos adultos y en la atrofia de órganos. Este proceso es también fundamental para la regulación y operación de procesos fisiopatológicos como la respuesta inmune, la inflamación y la eliminación de células que presentan alteraciones genéticas. En los humanos, la apoptosis excesiva o insuficiente puede tener severas consecuencias patológicas. La supresión de la maquinaria apoptótica causa enfermedades autoinmunes y es un sello característico en el cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Por otra parte, la apoptosis en exceso contribuye al desarrollo de enfermedades neurológicas y al SIDA (Yuan y Yankner, 2000).

En la apoptosis ocurren cambios coordinados en el núcleo, el citoplasma y la superficie celular (Arends y Wyllie, 1991). Después de un estímulo letal, el tiempo de inicio de la apoptosis es variable, pero una vez activada los cambios observados son rápidos, con duración de minutos. Las células pierden contacto con sus vecinas y adquieren una forma redondeada. Posteriormente se presenta una pérdida de volumen, debida a la salida de agua y de iones, con la consecuente compactación de los organelos y el aumento en la densidad celular. El núcleo se condensa y la cromatina se concentra en la membrana nuclear. A continuación en la superficie celular se forman protuberancias, el núcleo se rompe en varios fragmentos que conservan la membrana íntegra y la célula se fragmenta en múltiples cuerpos apoptóticos, los cuales contienen a los organelos intactos. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas o por macrófagos, sin generar una reacción inflamatoria en el organismo (Evan *et al*, 1992).

La muerte celular apoptótica es iniciada tanto por la vía extrínseca (mediada por receptor), como por la vía intrínseca (mediada por mitocondria). Estas vías inducen finalmente actividades



**Figura 1. Vías de muerte celular.** En la vía extrínseca (mediada por receptor) la unión de un ligando a su receptor de muerte es seguida por la formación del DISC (complejo de señalización inducible por muerte), lo que resulta en la activación de la procaspasa 8. En las células de Tipo I la caspasa 8 activa a la procaspasa 3, la cual corta a proteínas blanco, conduciendo a apoptosis. En las células de Tipo II, la caspasa 8 corta a Bid, el cual induce la translocación, oligomerización e inserción de Bax y/o Bak en la membrana externa mitocondrial. Esto es seguido por la liberación de varias proteínas del espacio intermembranar mitocondrial, incluyendo a Smac/DIABLO, Omi y citocromo c. Este último forma un complejo citosólico (apoptosoma) con Apaf-1 y la procaspasa 9. Esto resulta en la activación de la procaspasa 9, la cual activa a la procaspasa 3. En la vía intrínseca (mediada por mitocondria), las señales de muerte inciden directa o indirectamente en la mitocondria, resultando en la formación del apoptosoma. Esta vía de muerte celular es controlada por proteínas de la familia de Bcl-2. La vía intrínseca puede funcionar a través de mecanismos independientes de caspasas, implicando la liberación de la mitocondria y la translocación al núcleo de AIF y endonucleasa G.

proteolítica y/o nucleolítica asociadas a la muerte celular. La actividad proteolítica de las caspasas proporciona las bases bioquímicas para el fenotipo apoptótico (Fig. 1).

### **Caspasas**

La participación crítica de la proteasa de cisteína CED-3 en la apoptosis fue descubierta por primera vez en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* hace catorce años (Yuan *et al*, 1993). Desde entonces, las evidencias acumuladas han demostrado que la apoptosis es un proceso conservado en la evolución, el cual es ejecutado por una familia de proteasas de cisteína, las cuales cortan después de un residuo de ácido aspártico contenido en sus sustratos. En mamíferos se han identificado catorce caspasas, de las cuales al menos ocho participan en la regulación del proceso apoptótico (Earnshaw *et al*, 1999). Las caspasas implicadas en la apoptosis se dividen generalmente en dos categorías: las caspasas iniciadoras, que incluyen a la caspasa-2, -8, -9 y -10, y las caspasas efectoras, que incluyen a la caspasa-3, -6 y -7. Una caspasa iniciadora se caracteriza por tener un prodominio N-terminal extendido (>90 aminoácidos) importante para su activación, mientras que una caspasa efectora contiene de 20-30 residuos en la secuencia del prodominio. Todas las caspasas se producen en las células como zimógenos catalíticamente inactivos y deben experimentar activación proteolítica durante la apoptosis. La activación de una caspasa efectora es realizada por una caspasa iniciadora a través de corte en un residuo específico interno de ácido aspártico que separa a la subunidad grande de la pequeña. En cambio, las caspasas iniciadoras son autoactivadas (Earnshaw *et al*, 1999). Una vez activadas, las caspasas efectoras son responsables del corte proteolítico de un amplio espectro de blancos celulares, lo que conduce finalmente a la muerte celular. Los sustratos celulares conocidos incluyen componentes estructurales (como actina y la lámina nuclear), proteínas regulatorias (como la DNA-PK), inhibidores de desoxirribonucleasa (como ICAD) y otras proteínas proapoptóticas y caspasas.

### **Proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs)**

La actividad de las caspasas está sujeta a la inhibición por los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) (Deveraux y Reed, 1999). Las IAPs fueron originalmente identificadas en baculovirus por su capacidad de suprimir la apoptosis en células infectadas del hospedero. Se ha sugerido que la acción de estas moléculas ocurre por medio de una interacción directa con las caspasas. En mamíferos se han identificado ocho distintas IAPs, siendo las más estudiadas la XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivina y ML-IAP/Livin. La unidad funcional en las IAPs es el repetido IAP baculoviral (BIR), el cual contiene ~80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen 3 dominios BIR cada una, exhibiendo cada dominio funciones diferentes. En estas IAPs el dominio BIR3 inhibe potentemente la actividad de la caspasa-9 procesada, mientras que la región de unión entre los dominios BIR1 y BIR2 inhibe selectivamente a las caspasas 3 y -7 (Shi, 2001).

### **Smac/DIABLO y sus isoformas**

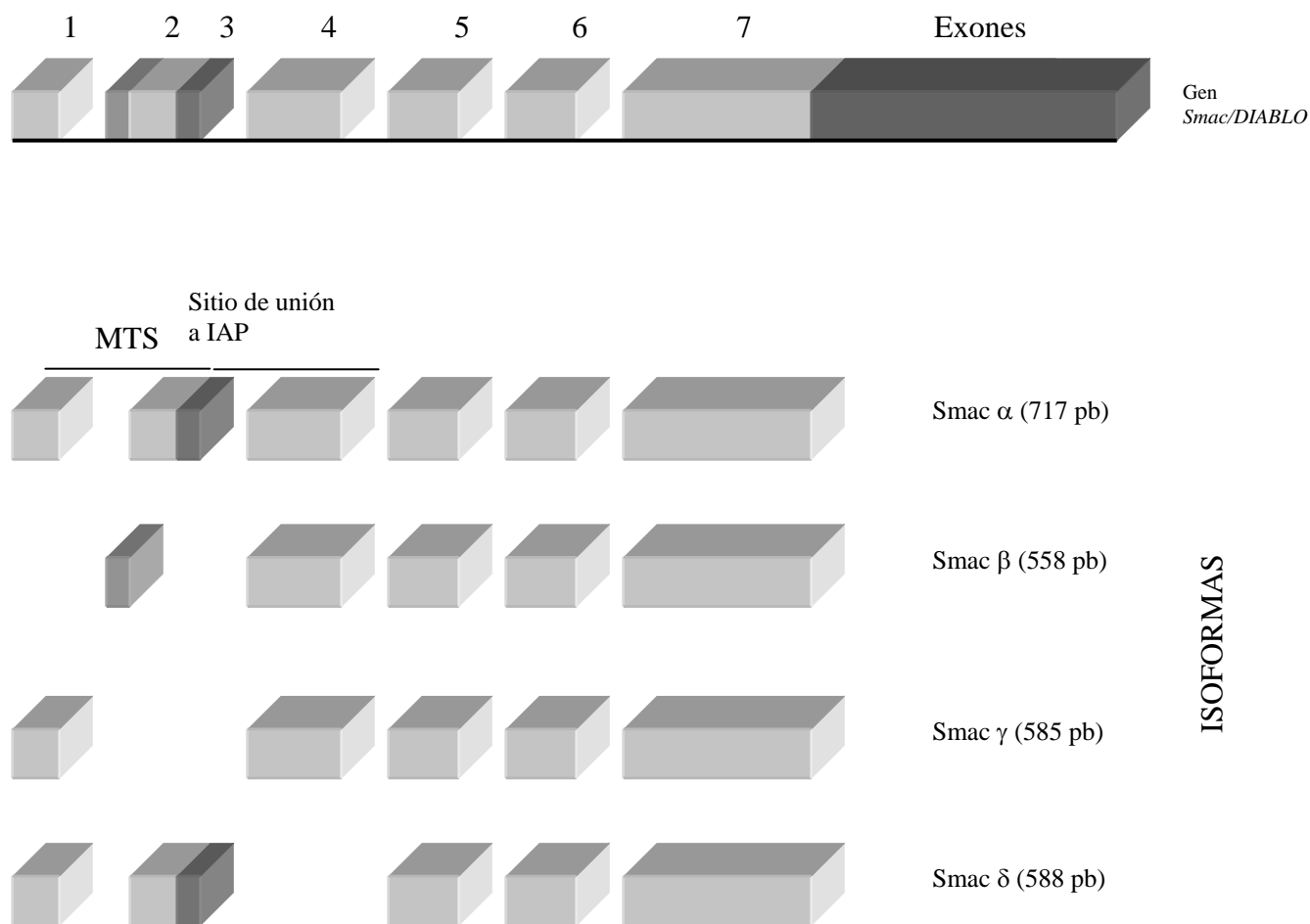
Con el fin de permitir la ejecución de la apoptosis, la inhibición de las caspasas mediada por las IAPs es removida por la proteína proapoptótica Smac/DIABLO. Esta proteína fue descubierta paralelamente por dos grupos de investigación. Por una parte, Du y cols. (2000) aislaron una fracción a partir de extractos de membrana mitocondrial de células HeLa, relacionada con la activación de caspasa 3. De esta fracción purificaron una proteína de aproximadamente 25 kDa que denominaron Smac (second mitochondria-derived activator of caspase). Por otro lado, Verhagen y cols. (2000), mediante ensayos de coimmunoprecipitación con XIAP-Flag (la proteína XIAP marcada con una etiqueta para captura), transfectada en células 293T, aislaron una proteína de 23 kDa con un punto isoelectrico (pI) de aproximadamente 5.3 que se unía a la XIAP. La secuencia peptídica de esta proteína fue usada para hacer una búsqueda en la base de datos de

ESTs (Expressed Sequences Tag) de DNA y se encontró un alineamiento idéntico con secuencias de humano y de ratón. La clona de cDNA-EST de ratón elegida codificaba para una proteína de 26.8 kDa, la cual fue nombrada DIABLO (direct IAP binding protein with low pI).

La proteína Smac/DIABLO se expresa de manera diferencial en diversos tejidos de humano adulto. Presenta una expresión elevada en testículo, corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario y una baja expresión en cerebro, pulmón, timo y leucocitos (Du *et al*, 2000). DIABLO presenta un patrón similar de expresión en tejidos de ratón adulto (Verhagen *et al*, 2000).

El RNA mensajero de Smac/DIABLO codifica para una proteína de 239 aminoácidos. La región amino terminal (55 aminoácidos) representa una típica señal anfipática de localización mitocondrial (MTS), la cual es cortada una vez que Smac/DIABLO se importa a la mitocondria. En condiciones normales Smac/DIABLO reside en el espacio intermembranal. Después de un estímulo apoptótico, Smac/DIABLO se libera de la mitocondria al citosol, en donde se une a varias IAPs, antagonizando su función. Se sabe que Smac/DIABLO puede interactuar con XIAP, c-IAP1, cIAP2, survivina y la IAP baculoviral OpIAP. Sólo la proteína Smac/DIABLO madura tiene la capacidad de promover la activación de caspasas, mientras que el precursor con la señal de localización intacta no posee tal capacidad. Smac/DIABLO por lo tanto requiere de un proceso de maduración dentro de la mitocondria antes de presentar su actividad apoptótica (Du *et al*, 2000).

El gen *Smac/DIABLO* se localiza en el humano en el cromosoma 12q y está compuesto de siete exones. Al día de hoy se han reportado cuatro isoformas de Smac/DIABLO, generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero, a las cuales se les ha denominado  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (esta última también llamada Smac3; Fig. 2). Smac/DIABLO  $\alpha$  y  $\delta$  son mitocondriales mientras que Smac/DIABLO  $\beta$  y  $\gamma$  son citosólicas debido a que no presentan una MTS. Se ha encontrado que



**Figura 2. Estructura del gen *Smac/DIABLO* y las diferentes isoformas generadas por procesamiento alternativo del mensajero.** El gen *Smac/DIABLO* presenta siete exones. El exón 2 es un exón críptico que permite la generación de la isoforma β. La MTS (señal de localización mitocondrial) es codificada por los exones 1 y 3. *Smac/DIABLO* α y δ son mitocondriales (presentan una MTS intacta), mientras que *Smac/DIABLO* β y γ son citosólicas (no tienen MTS).

*Smac/DIABLO* β, generada por un procesamiento alternativo que integra un exón críptico, se expresa en todas las líneas celulares probadas incluyendo: HeLa, Jurkat, 293, THP1, MCF-7, A431 y 697, aunque en una cantidad menor que *Smac/DIABLO* α (Srinivasula *et al*, 2000; Roberts *et al*, 2001). Por su parte *Smac/DIABLO* δ (*Smac3*), es generada por el procesamiento alternativo del exón 4. Esta isoforma particular posee una MTS, por lo cual se dirige a la mitocondria una vez sintetizada. Su expresión, al igual que *Smac/DIABLO* α, es ubicua pero diferencial, en tejidos de humano adulto. De igual forma se expresa en las líneas celulares: MCF-



7, HeLa, 293T, Jurkat y HEK293 (Fu *et al*, 2003). La isoforma  $\gamma$  es la menos estudiada y se desconoce casi todo de ella.

### **Mecanismo de inhibición de las IAPs por Smac/DIABLO**

Smac/DIABLO  $\alpha$  madura se comporta como un dímero en solución y utiliza su región N-terminal para interactuar con las IAPs e inhibir su función. Smac/DIABLO  $\alpha$  se une a los dominios BIR2 y BIR3 de la XIAP, pero no al BIR1. La unión a cada BIR es mutuamente excluyente. Se ha demostrado que las mutantes monoméricas de Smac/DIABLO  $\alpha$  interactúan fuertemente con el BIR3, pero no forman un complejo estable con el BIR2. Estas mutantes tienen menor capacidad para promover la activación de la procaspasa 3 (Chai *et al*, 2000). Smac/DIABLO  $\alpha$  se une al BIR3 de la XIAP a través de sus primeros cuatro residuos N-terminales (AVPI). La sustitución de cualquiera de estos residuos elimina la capacidad de unión, probablemente debido a una pérdida de interacciones hidrofóbicas (Liu *et al*, 2000). Smac/DIABLO  $\beta$ , por otro lado, interactúa con los dominios BIR1 y BIR2 de la XIAP, pero no con el BIR3. Smac/DIABLO  $\beta$  promueve principalmente la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7, aunque en todos los casos presenta una actividad promotora de caspasas menor que Smac/DIABLO  $\alpha$ . Esta diferencia puede explicarse en parte porque los primeros residuos N-terminales de Smac/DIABLO  $\beta$  (MKSDFY) son diferentes a los de Smac/DIABLO  $\alpha$  (AVPI), siendo estos últimos indispensables para la unión al BIR3 de la XIAP (Srinivasula *et al*, 2000). Más aun, Roberts y cols. (2001) demostraron que Smac/DIABLO  $\beta$  no es capaz de interactuar con XIAP, c-IAP1 ni c-IAP2 *in vivo*. Ellos proponen que ~20 aminoácidos del N-terminal de Smac/DIABLO  $\beta$  son procesados intracelularmente. Sorprendentemente, esta forma de la proteína es capaz de potenciar la apoptosis inducida por diversos estímulos al mismo nivel que Smac/DIABLO  $\alpha$ . Como Smac/DIABLO  $\beta$  no posee los aminoácidos necesarios para la

interacción con las IAPs, se postula que el (los) dominio (s) para la función proapoptótica reside (n) en el fragmento C-terminal y que la unión de Smac/DIABLO  $\alpha$  a la XIAP es únicamente una función secundaria. Finalmente, Smac/DIABLO  $\delta$  madura interactúa con los dominios BIR2 y BIR3 de la XIAP a través del tetrapéptido N-terminal AVPI, promoviendo la activación de la caspasa 3 (Fu *et al*, 2003).

### **Mecanismos no transcripcionales de regulación de Smac/DIABLO**

Smac/DIABLO está sujeta a regulación a distintos niveles. El mecanismo de regulación más evidente para Smac/DIABLO  $\alpha$  y  $\delta$  es la translocación desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol durante la apoptosis. Este evento es regulado por miembros de la familia de Bcl-2 y al parecer es necesaria la activación de la vía de JNK (quinasas del N-terminal de c-Jun), al menos durante la apoptosis inducida por el 2-metoxiestradiol (2ME2) en células de mieloma múltiple (Chauhan *et al*, 2003). Una vez en el citosol, las mismas proteínas IAPs regulan la concentración y la actividad de Smac/DIABLO  $\alpha$ . Por una parte, se ha demostrado que XIAP, c-IAP1 y cIAP2 tienen actividad de ligasa de la proteína ubiquitina (E3), a través de su dominio RING, sobre la proteína Smac/DIABLO  $\alpha$ . Se requiere, tanto de la asociación de las IAPs con Smac/DIABLO, como de la presencia del dominio RING para la ubiquitinación. Esta actividad promueve la rápida degradación de Smac/DIABLO  $\alpha$  liberada de la mitocondria y proporciona un mecanismo por el cual las IAPs inhiben la muerte celular, dirigiendo a moléculas proapoptóticas a la degradación mediada por el proteosoma (MacFarlane *et al*, 2002; Hu y Yang, 2003). Sin embargo, la proteína Smac/DIABLO  $\delta$  también tiene la capacidad de promover la autoubiquitinación de la proteína XIAP. Esta actividad, la cual no presenta Smac/DIABLO  $\alpha$ , requiere la asociación de Smac/DIABLO  $\delta$  con la XIAP y el dominio RING intacto de esta

última, aunque aun se desconoce el mecanismo por el cual Smac/DIABLO  $\delta$  acelera la autodestrucción de la XIAP (Fu *et al*, 2003).

Por otro lado, los diversos miembros de la familia de las IAPs pueden cooperar entre ellos para inhibir la apoptosis. Se sabe, por ejemplo, que XIAP, pero no Survivina puede unirse a caspasa 9. Sin embargo, XIAP y Survivina sí pueden unirse a Smac/DIABLO. Existe al menos un estudio en el cual se muestra que XIAP se une a la caspasa 9, mientras que Survivina se une a Smac/DIABLO y de esta forma evita que Smac/DIABLO inhiba a XIAP. En este modelo la apoptosis se inhibe ya que la Survivina mantiene secuestrada a Smac/DIABLO, en tanto que XIAP inhibe la función de la caspasa 9 (Song *et al*, 2003). Aparentemente Smac/DIABLO  $\beta$  es regulada intracelularmente por proteólisis. La pérdida de sus 20 aminoácidos N-terminales, crea una proteína incapaz de interactuar con las IAPs, conservando sin embargo su actividad promotora de apoptosis. Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual esta isoforma induce apoptosis, sin la necesidad de interactuar con las IAPs (Roberts *et al*, 2001).

### **Mecanismos transcripcionales de regulación de Smac/DIABLO**

El gen *Smac/DIABLO* es regulado también a nivel transcripcional. Aunque hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares que modulan su expresión en condiciones basales, existen varios reportes que documentan la activación transcripcional de este gen bajo condiciones de inducción de apoptosis, con estímulos diversos. El tratamiento de una línea de células B inmaduras, derivadas de ratón: WEHI 279, y de células normales pre-B de ratón, dependientes de IL-7, con 10 U/ml de IFN- $\gamma$ , indujo un aumento en los niveles de expresión endógenos del RNA mensajero de Smac/DIABLO. Este incremento sensibilizó a estas estirpes celulares a experimentar apoptosis. La inhibición de la expresión de Smac/DIABLO con un oligonucleótido antisentido, disminuyó la activación de la muerte celular, lo que sugiere un papel directo de

Smac/DIABLO en la promoción de la apoptosis inducida por el IFN- $\gamma$  en células de ratón (Yoshikawa *et al*, 2001). Por otro lado, el tratamiento de fibroblastos de origen humano GM701, con 40  $\mu$ M del compuesto cíclico, el ácido hidroxámico BMD188, indujo un incremento en la expresión del RNA mensajero de Smac/DIABLO, citocromo c, la subunidad II de la citocromo c oxidasa, Bim, Bak y Bcl-2. Además, se observó un aumento en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere una participación directa de la mitocondria en este escenario de apoptosis (Chandra *et al*, 2002). En otro estudio, se trataron ratones Balb/c con 250 mg/kg de ácido fólico para inducir falla renal aguda. Las células de riñón de los ratones tratados, experimentaron apoptosis y se observó un incremento en la expresión del RNA mensajero y de la proteína de Smac/DIABLO. Para confirmar estos resultados, los autores trataron células MCT, las cuales son células tubulares proximales provenientes de la corteza renal de ratones SJL, con 30 ng/ml de TNF. El TNF indujo apoptosis y se volvió a observar el incremento en la expresión de Smac/DIABLO (Justo *et al*, 2003). En estos tres casos no se menciona a través de qué mecanismos moleculares esos estímulos apoptogénicos indujeron el incremento en la expresión de Smac/DIABLO. Existe un último reporte en el cual se hace una aproximación a los eventos moleculares que conducen a la activación transcripcional de Smac/DIABLO, en condiciones de apoptosis. En este estudio se utilizaron células humanas no pequeñas de carcinoma de pulmón, H1299, las cuales no expresan p53. Estas células fueron manipuladas para que pudieran expresar constitutivamente al factor de transcripción E2F1. El tratamiento de estas células con 4-hidroxitamoxifen, causa que E2F1 se transloque al núcleo y active genes blanco para E2F1. Al mismo tiempo, la activación inducida de E2F1 causa apoptosis en estas células. Los autores encontraron que durante la inducción de apoptosis por E2F1, se presentó un incremento en la expresión del RNA mensajero y la proteína

de Smac/DIABLO. Adicionalmente, se observó que el factor de transcripción E2F1 fue capaz de unirse al promotor del gen Smac/DIABLO y transactivarlo. La inhibición de la expresión de Smac/DIABLO con RNA de interferencia, causó una disminución en el número de células que experimentaron apoptosis, lo que sugirió un papel directo de Smac/DIABLO en la promoción de la apoptosis inducida por E2F1 (Xie *et al*, 2006).

### **Smac/DIABLO y el cáncer**

Aunque hasta el momento no se ha explorado de manera extensa, se han encontrado diferencias en la expresión de Smac/DIABLO en células de cáncer, con respecto a los tejidos sanos. Se ha reportado que tumores renales (Yan *et al*, 2004; Mizutani *et al*, 2005), pulmonares (Sekimura *et al*, 2004), de cérvix (Espinosa *et al*, 2004; Arellano-Llamas *et al*, 2006), carcinomas y sarcomas (Yoo *et al*, 2003), tienen una expresión desregulada de esta molécula. En los casos de los tumores renales y pulmonares, se encontró una correlación inversa entre el nivel de expresión de Smac/DIABLO y el desarrollo de la enfermedad. La expresión del RNA mensajero y de la proteína de Smac/DIABLO fue mayor en las primeras etapas de la enfermedad y el nivel de expresión disminuyó en etapas más avanzadas. Estos descubrimientos apuntan hacia una posible relevancia clínica ya que servirían como un parámetro pronóstico para estas neoplasias (Sekimura *et al*, 2004; Mizutani *et al*, 2005).

Estos resultados muestran que Smac/DIABLO es dinámicamente regulado en la progresión del cáncer. No obstante, se desconocen por completo los mecanismos moleculares a través de los cuales se desregula la expresión de Smac/DIABLO.

### **El AMP cíclico y la apoptosis**

El AMP cíclico (cAMP) es un segundo mensajero bien conocido que regula varios procesos fisiológicos celulares, tales como el crecimiento y la proliferación celular, la apoptosis, el

metabolismo, la inducción de genes y la función de los canales iónicos. Estas funciones biológicas del cAMP parecen ser específicas de tipo celular (Ahn *et al*, 2005).

La inducción de la expresión génica por el cAMP está mediada por la unión de un dímero de la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) a una secuencia conservada, el elemento de respuesta a cAMP (CRE), TGACGTCA, presente en el promotor de muchos genes responsivos a cAMP. La acumulación del cAMP en respuesta a la activación de los receptores acoplados a proteínas G, de unión a nucleótidos de guanina, induce la mayoría de respuestas celulares a través de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA). En el estado basal, la PKA reside en el citoplasma como un heterotetrámero inactivo, formado por subunidades regulatorias (R) y catalíticas (C) pareadas. La inducción del cAMP libera a las subunidades C, las cuales difunden pasivamente hacia el núcleo e inducen la expresión de genes celulares, a través de la fosforilación de la proteína CREB en el residuo de serina 133. La fosforilación de CREB en este residuo permite el reclutamiento del coactivador transcripcional CBP (proteína de unión a CREB) y de su paróloga p300. Estos coactivadores contribuyen al aumento de la transcripción mediada por CREB, gracias a su actividad de acetil transferasas de histonas y a su capacidad de “puenteo” con la RNA polimerasa II vía la RNA helicasa A (Mayr y Montminy, 2001; Johannessen *et al*, 2004).

Además de regular el crecimiento y la proliferación celular, el cAMP y varios de sus análogos tienen la capacidad de inducir apoptosis en diversos tipos celulares. El análogo del cAMP, el 8-Br-cAMP indujo apoptosis en células primarias de la granulosa, obtenidas de folículos preovulatorios de rata (Aharoni *et al*, 1995). El 8-Cl-cAMP indujo apoptosis en una amplia gama de líneas celulares de cáncer, a través de la modulación de las isoenzimas de la PKA (Kim *et al*, 2001). El tratamiento de células precursoras B humanas CD10<sup>+</sup> con 8-CPT-cAMP indujo apoptosis a través de la activación de la PKA y la regulación negativa de la expresión de la

proteína Mcl-1 (Myklebust *et al*, 1999). El 8-Cl-cAMP indujo inhibición del crecimiento y apoptosis en células HL-60, a través de la activación de las vías de la PKC y de p38 MAPK (Ahn *et al*, 2005). El 8-Cl-cAMP indujo apoptosis en células humanas de neuroblastoma, SH-SY5Y, a través de la regulación negativa de Bcl-2 y la regulación positiva de Bad (Kim *et al*, 2000). El 8-CPT-cAMP incrementó la fosforilación de CREB, activó a la caspasa 3 e indujo apoptosis en células de linfoma T, S49 y en células CEM humanas, de leucemia aguda de células T. También hubo una regulación positiva del RNA mensajero de Bim (Zhang e Insel, 2004).

A pesar de contar con estos y otros hallazgos, los mecanismos a través de los cuales el cAMP y sus análogos inducen apoptosis, siguen siendo poco conocidos.

## JUSTIFICACIÓN

Smac/DIABLO es una proteína mitocondrial que participa en la apoptosis, secuestrando y neutralizando a diversos miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Esta acción permite la activación de caspasas, el corte de sustratos celulares clave y la muerte. La liberación de la mitocondria se considera como el paso de regulación principal en la actividad de Smac/DIABLO. No obstante, el hecho de que al menos una isoforma, Smac/DIABLO  $\beta$ , no resida en este organelo, implica que la regulación transcripcional podría también ser importante. Por otra parte, aunque hasta el momento no se ha explorado de manera extensa, se han encontrado diferencias en la expresión de Smac/DIABLO en células de cáncer, con respecto a los tejidos sanos. Se ha reportado que tumores renales (Yan *et al*, 2004; Mizutani *et al*, 2005), pulmonares (Sekimura *et al*, 2004), de cérvix (Espinosa *et al*, 2004; Arellano-Llamas *et al*, 2006), carcinomas y sarcomas (Yoo *et al*, 2003), tienen una expresión desregulada de esta molécula. Estos resultados muestran que Smac/DIABLO es dinámicamente regulado en la progresión del cáncer.

Debido a que se desconocen casi por completo los mecanismos moleculares que controlan la expresión de Smac/DIABLO en condiciones basales y durante la inducción de apoptosis, es importante realizar estudios que permitan reconocer estos mecanismos de regulación, no sólo en células sanas sino también en células alteradas, como las células cancerosas, para intentar comprender también las vías que llevan a la desregulación de la expresión de esta molécula proapoptótica.



## **HIPÓTESIS**

La hipótesis general de este trabajo es que si una o varias vías de transducción están participando en la regulación de la expresión de Smac/DIABLO, ya sea en condiciones basales o de inducción de apoptosis, entonces la activación o la inhibición de una o varias de estas vías, afectará la expresión del gen. Debido a los escasos antecedentes que existen para este trabajo, entonces se enuncian hipótesis particulares para cada vía estudiada, quedando de la siguiente forma:

1.- Si la vía de transducción del cAMP participa en la regulación del gen *Smac/DIABLO*, entonces la actividad de su promotor será modulada al utilizar agonistas o inhibidores de dicha vía.

2.- Si la vía de transducción de JNK/SAPK participa en la regulación del gen *Smac/DIABLO*, entonces la actividad de su promotor será modulada al utilizar agonistas o inhibidores de dicha vía.

3.- Si la vía de transducción de MAPK participa en la regulación del gen *Smac/DIABLO*, entonces la actividad de su promotor será modulada al utilizar agonistas o inhibidores de dicha vía.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Clonar y caracterizar el promotor del gen *Smac/DIABLO* y determinar qué vías de transducción están implicadas en su regulación, en células de cáncer.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Clonar el promotor del gen *Smac/DIABLO*.
- ✓ Caracterizar el promotor mínimo requerido para la activación de la transcripción del gen *Smac/DIABLO*.
- ✓ Analizar si la vía de transducción del cAMP participa en la regulación del promotor del gen *Smac/DIABLO*.
- ✓ Analizar si la vía de transducción de JNK/SAPK participa en la regulación del promotor del gen *Smac/DIABLO*.
- ✓ Analizar si la vía de transducción de MAPK participa en la regulación del promotor del gen *Smac/DIABLO*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

*Cultivo celular.* Las células HeLa adquiridas del ATCC (American Type Culture Collection) se mantuvieron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB; v/v), a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen (Maryland, USA). El 8-(4-clorofeniltio)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (8-CPT-cAMP), el H89, la forskolina y la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

*Viabilidad celular y efectos citotóxicos.* Se sembraron células HeLa en placas de cultivo de 24 pozos y se expusieron al cAMP por 24 horas. Entonces, se fijaron en etanol al 70% a -20°C, se lavaron con PBS 1X (1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl) y se tiñeron con cristal violeta (1% en agua). Posteriormente, se solubilizó la tinción con ácido acético 33% y se determinó la absorbancia en un lector de ELISA, a 570 nm. Los análisis se realizaron al menos por triplicado en cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de *t* con corrección de Bonferroni.

*Ensayo de fragmentación nuclear.* Se sembraron células HeLa en placas de cultivo de 24 pozos y se expusieron al cAMP por 24 horas. Entonces, se fijaron en etanol al 70% y se incubaron en buffer de RNasa durante 1 hora a 55°C. Posteriormente se les agregó 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se esperó 15 minutos, para lavar inmediatamente con PBS 1X, 5 veces. Se tomó una gota de cada muestra y se colocó en una laminilla para observar al microscopio de fluorescencia a 40X.

*Transfección celular.* Los ensayos de transfección celular tuvieron la siguiente secuencia: el primer día se sembraron 1X10<sup>6</sup> células HeLa en botellas de 25 cm<sup>2</sup>. El segundo día se sembraron 2X10<sup>5</sup> células por pozo en placas de 12 pozos, a partir del primer cultivo. El tercer día se realizó

la transfección con lipofectamina (Invitrogen, Maryland, USA), por 24 horas, transfectando 0.5 µg del plásmido reportero, más 0.1 µg del plásmido que contiene al gen de la β-galactosidasa bajo el control de un promotor constitutivo de citomegalovirus (pβGAL). El plásmido promotor de Smac/DIABLO-reportero SEAP se construyó clonando los productos de PCR en el vector pSEAP2-Basic (Clontech, CA, USA), el cual utiliza una forma secretada de la fosfatasa alcalina placentaria humana, como una molécula reportera que monitorea la actividad del promotor.

*Ensayo de fosfatasa alcalina.* Las células transfectadas se mantuvieron en medio DMEM con 10% de SFB por 24 horas. Concluido el período post-transfección se recolectaron los sobrenadantes, se centrifugaron, y se guardaron 100 µl de cada muestra a -20°C. Para el ensayo de actividad de gen reportero, se diluyeron e incubaron 15 µl de cada muestra a 68°C por 30 minutos. Se agregó el substrato CSPD 1.25 mM y se realizó la detección quimioluminiscente a diferentes tiempos utilizando placas radiográficas. La detección de la actividad de SEAP se realizó utilizando un kit comercial (Clontech, CA, USA).

*Ensayo de β-galactosidasa.* 24 horas después de la transfección, las células fueron despegadas de los pozos de cultivo, centrifugadas, resuspendidas en buffer de lisis (0.1 M Tris-Cl pH 7.8, 0.5% (v/v) Tritón X-100) y almacenadas a -70°C. Para ensayar cada muestra se agregaron los siguientes componentes: 3 µl de una solución de Mg<sup>2+</sup> 100X (0.1 M MgCl<sub>2</sub>; 4.5 M β-mercaptoetanol), 66 µl del substrato ONPG 1X (4 mg de ONPG en fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.5), 30 µl de extracto celular, 201 µl de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 (41 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 M; 9 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 M; 50 ml de H<sub>2</sub>O). Las mezclas de reacción se incubaron por 30 minutos a 37°C y se detuvieron agregando 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro a 420 nm (Sambrook y Russell, 2001).

Los resultados de la actividad de SEAP fueron normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

*Aislamiento de ADN de alto peso molecular a partir de leucocitos.* Se centrifugaron 20 ml de sangre periférica fresca de humano a 1500 rpm en un gradiente de Ficoll (Invitrogen, Maryland, USA). La capa color beige se transfirió a otro tubo y se volvió a centrifugar. Los leucocitos se resuspendieron en 15 ml de buffer de extracción (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 0.1 M EDTA, pH 8.0; 20  $\mu$ g/ml de RNAsa pancreática; 0.5 % SDS) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se agregó proteinasa K (100  $\mu$ g/ml) y se incubó la suspensión celular en baño maría a 50°C por 3 horas. Se extrajo el ADN con fenol equilibrado (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), por 3 veces. La fase acuosa se transfirió a un tubo de centrífuga y se agregaron 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M mas 2 volúmenes de etanol. El ADN precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70 %, se disolvió en 100  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA pH 8.0) y se cuantificó por espectrofotometría (Sambrook y Russell, 2001).

*Inhibición de las vías de transducción.*

Líneas celulares dominantes negativas. La línea celular HeLaSEK-AL se generó transfectando células HeLa con un plásmido pcDNA 3 que contiene una versión mutada de MEKK4 (SEK) fusionado con un epitope de hemaglutinina. El plásmido SEK-AL fue amablemente proporcionado por el Dr. Brent Zanke. Para establecer una línea celular estable, después de la transfección, las células fueron seleccionadas utilizando 800  $\mu$ M de geneticina (G418) por cuatro semanas. Se utilizó un “pool” de cinco clonas para los experimentos posteriores. La expresión del transgen se determinó por western blot, utilizando un anticuerpo contra la hemaglutinina (3F10, Roche, Indiana, USA). Para comparación también se creó una línea celular control, transfectando células HeLa con pcDNA 3 (Invitrogen, MD, USA) y seleccionando con G418 por cuatro

semanas. Se utilizó el mismo enfoque para producir una línea de células HeLa que expresa la versión dominante negativa de CREB, HeLaKCREB. KCREB es incapaz de unirse al DNA debido a que tiene una mutación en el sitio de unión del factor de transcripción (Walton *et al*, 1992). Este plásmido fue amablemente proporcionado por el Dr. R. H. Goodman.

Inhibidores farmacológicos. Se utilizó el inhibidor farmacológico SB203580 específico para la vía de p38 MAPK a una concentración final de 2  $\mu$ M. Para la vía de MAPK se utilizaron los inhibidores U0126 y PD98059 a una concentración de 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M respectivamente. El inhibidor SP600125 –específico de la vía de SAPK- se utilizó a una concentración de 25  $\mu$ M. También se utilizó el inhibidor de la PKA, H-89, a una concentración de 10  $\mu$ M.

*Expresión de Smac/DIABLO.* La estimación de los niveles de RNA mensajero (RNAm) de Smac/DIABLO se realizó mediante ensayos semicuantitativos de RT-PCR. Se aisló el RNA total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, MD, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó utilizando el sistema RT-PCR termoscript (Invitrogen, MD, USA). Diez microgramos de RNA total pre-tratado con DNAsa I, se incubaron a 50°C por 1 hora con hexámeros al azar, dNTPs y transcriptasa reversa. El RNA templado se digirió con RNAsa H. Para verificar que se utilizara una cantidad equivalente de cDNA entre las muestras, se amplificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un pequeño fragmento del gen de expresión basal GAPDH, utilizando Advantage Taq polymerase (Clontech, CA, USA). Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa 1% por medio de electroforesis horizontal. Para obtener la amplificación en la fase log (logarítmica), se construyó una curva utilizando datos de análisis densitométrico derivados de amplicones producidos, tras incrementar el número de ciclos en las reacciones de PCR. Los datos de expresión de Smac/DIABLO se

normalizaron utilizando los datos de GAPDH. El análisis densitométrico se realizó utilizando el software Image J. (Wayne Rasband, NIH. <http://rsb.nih.gov/ij/>).

Para inhibir la expresión de Smac/DIABLO  $\alpha$ , se amplificó por RT-PCR el marco de lectura completo (ORF), a partir de células HeLa y se clonó en una orientación antisentido en pcDNA3.1 (Invitrogen, Maryland, USA). Esta construcción se transfectó, como se describe previamente. Como control se utilizó pcDNA3.1 vacío.

*Iniciadores utilizados.* GAPDH: sentido 5'CCCCTTCATTGACCTCAACT3', antisentido

5'TTGTCATGGATGACCTTGGC3'; Smac/DIABLO  $\alpha$ : sentido

5'GCGCGGATCCATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCT3', antisentido

5'AGCTCTCTAGACTCAGGCCCTCAATCCTCACGC3'; Smac/DIABLO  $\beta$ : sentido

5'TGTTACCGCGGGGCGGTCGTGCCTTATGAAATCTG3', antisentido

5'GTGTGTCTAGACCCTCAATCCTCACGCAGGTAGG3'; Smac/DIABLO total: sentido

5'AGCTGGAAACCACTTGGATG3'; antisentido 5'CAGCTTGGTTTCTGCTTTCC3';

promotor de Smac/DIABLO: (1398 pb) sentido

5'CCGCTCTCGAGGGAACGCCTGTGCGCAGCTCCCTG3', (3 Kb) sentido

5'CAGGCTCGAGGTTGCTCAAACCTCCTGGCCTCAAGAG3' antisentido 1

5'AGCCAACTCTTCAGAGCCGCCAT3', antisentido 2

5'GAGCCGAATTCGTGCAGCGCGCGGACGCCAGACGC3'

Para la caracterización del promotor de Smac/DIABLO, se amplificaron por medio de PCR anidado dos fragmentos (de 2903 pb y de 1398 pb), de la región flanqueante 5' no traducida del gen. La reacción de PCR se realizó en presencia de 5% de DMSO para potenciar la amplificación de la región rica en GC del promotor de Smac/DIABLO. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambas direcciones utilizando un secuenciador de ADN ABI PRISM y se

compararon con la clona RP11-512M8 del cromosoma 12 (No. de acceso del Genbank AC048338).

Para realizar la predicción del promotor de *Smac/DIABLO* se utilizó el software Promoter Inspector (Genomatix, Germany). La predicción de los sitios potenciales de unión a factores de transcripción se realizó utilizando el programa TESS (Transcription Element Search Software) (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) (Schug y Overton, 1997). La predicción del sitio de inicio de la transcripción se realizó utilizando los programas Promoter 2.0 predictor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) (Knudsen, 1999) y Eponine (<http://servlet.sanger.ac.uk%3A8080/eponine/>) (Down y Hubbard, 2002).

*Generación de las deleciones del promotor de Smac/DIABLO utilizando ExoIII/S1.* 5 µg del plásmido pSEAP2-Basic conteniendo al promotor de *Smac/DIABLO* (1398 pb) fue linearizado con XhoI y KpnI. Enseguida se digirió el promotor con ExoIII de 5' a 3' a 25°C. Cada minuto se sacó una alícuota y cada una de ellas (25 en total) fue posteriormente digerida con nucleasa S1. Se agregó solución de paro y las muestras se incubaron 10 minutos a 70°C para inactivar a la nucleasa S1. Las muestras fueron religadas con T4 DNA ligasa y posteriormente se hizo la transformación de bacterias con cada deleción generada y la amplificación de cada construcción. Todos los reactivos se obtuvieron de Invitrogen, MD, USA y todas las deleciones se verificaron por secuenciación.

*Mutagénesis sitio-dirigida.* La mutagénesis sitio-dirigida del sitio CRE (cAMP-Responsive Element) se realizó utilizando un método basado en PCR, como lo describieron Fisher y Pei (1997). De manera breve, el plásmido reportero se amplificó con los primers: GCTCACGAAGCTGCAGTCCGGCGTGTG y CACACGCCGGAAGTGCTGCACTTCGTGAGC utilizando la polimerasa Advantage



(Clontech, CA, USA) con 16 ciclos de dos pasos. El ADN parental se degradó utilizando DpnI y se transformaron *E. coli* DH5  $\alpha$  competentes, con 1  $\mu$ l de la reacción. Las colonias se analizaron por restricción y secuenciación.

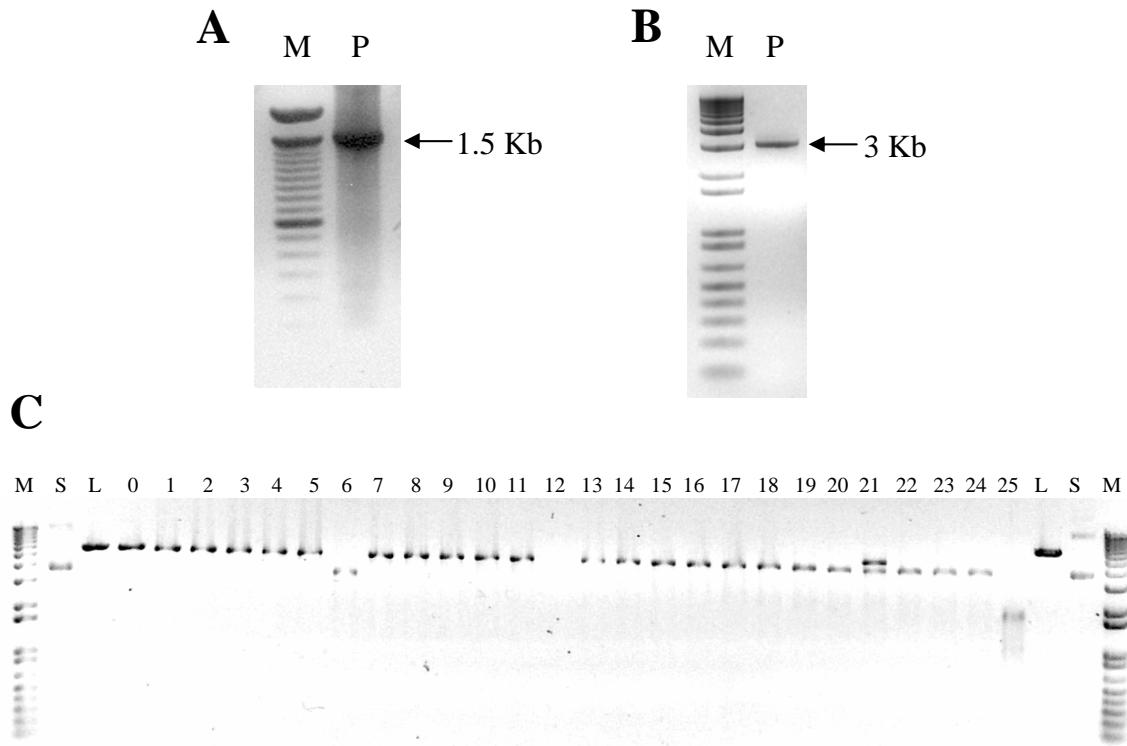
## RESULTADOS

### *Clonación, secuenciación y caracterización del promotor del gen Smac/DIABLO*

Considerando la similitud entre la secuencia de Smac/DIABLO (No. de acceso del GenBank AF262240) y la clona RP11-512M8 del cromosoma 12 (No. de acceso del Genbank AC048338), el gen DIABLO humano ha sido mapeado al cromosoma 12, región 12q24.31 (Antonarakis, 2000).

El gen *Smac/DIABLO* codifica para al menos cuatro isoformas, generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero. Hasta el momento se desconocen casi por completo los mecanismos de regulación de este gen a nivel transcripcional. Por ello, en este trabajo se realizó la clonación y caracterización funcional del promotor del gen *Smac/DIABLO* y se analizaron las posibles vías de transducción que regulan su expresión. Utilizando la información derivada del contig NT\_009755 del cromosoma 12, obtenida del GenBank, se amplificaron por PCR dos fragmentos de diferente tamaño de la región 5' del gen (Fig. 3a y b). Ambos fragmentos fueron completamente secuenciados y se encontró concordancia con el contig reportado del GenBank (NC\_000012, posición 121214228 a 121217228), con la excepción de un segmento ausente de 169 pb en la posición -387 a -218 (Fig. 4). Para verificar esta discrepancia, se secuenciaron otras dos clonas obtenidas de la reacción de PCR y se confirmó la diferencia. Adicionalmente, se realizó un análisis con enzimas de restricción, lo cual volvió a confirmar la falta de este segmento (resultado no mostrado). El análisis *in silico* (Knudsen, 1999) definió el promotor en -254 pb del ATG inicial y un elemento consenso putativo de inicio de la transcripción en -37 pb (Fig 4a). En acuerdo con esto, un alineamiento de la región 5' no codificante de Smac/DIABLO de cuatro especies de mamífero, mostró un elevado grado de similitud en esta región (Fig. 4b).

Para realizar una caracterización inicial del promotor, se clonaron ambos fragmentos en pSEAP2-basic, un vector que permite la inserción de secuencias promotoras en la región 5' del gen de la

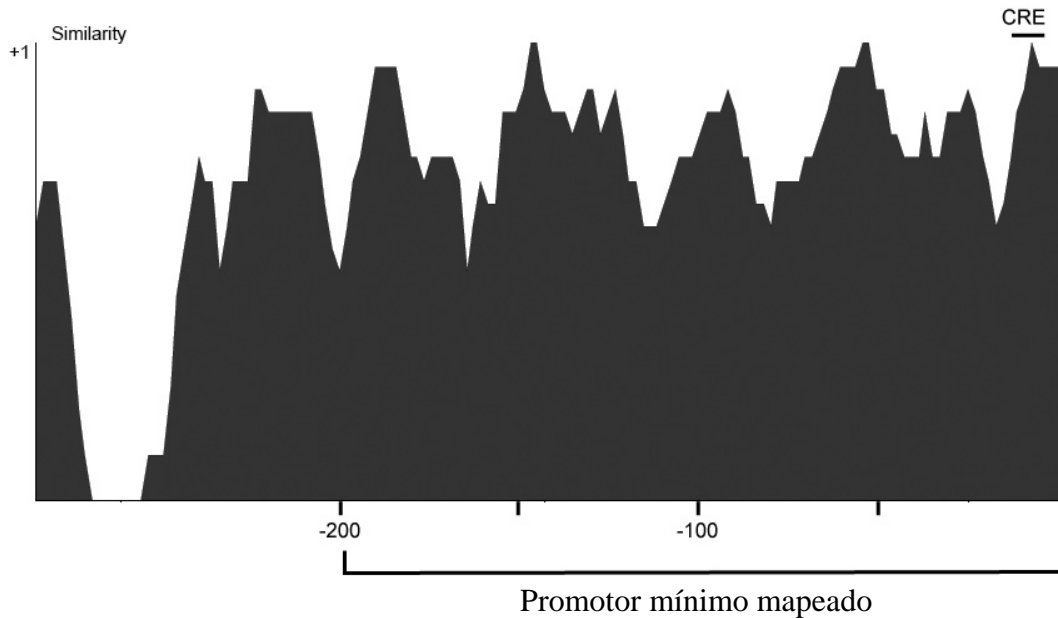


**Figura 3. Generación de las diferentes construcciones de la región 5' del gen Smac/DIABLO para la caracterización de su promotor.** Los fragmentos de 1.5 Kb (A) y de 3 Kb (B) fueron amplificados por PCR, como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas indican los fragmentos amplificados. El fragmento de 1.5 Kb fue utilizado para generar una serie de deleciones (C), utilizando el sistema Exonucleasa III/Nucleasa S1, como se describe en Materiales y Métodos. M=Marcador de peso molecular de 1 Kb; S=Plásmido no digerido; L=Plásmido linearizado; 0-25=Deleciones generadas.

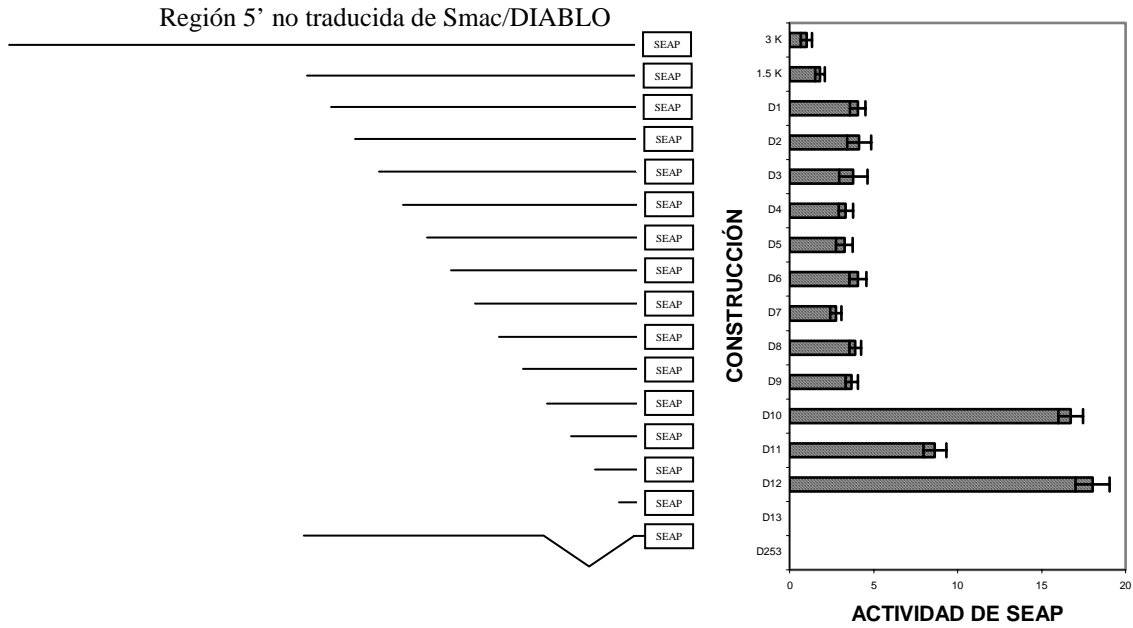
fosfatasa alcalina secretada (SEAP, por sus siglas en inglés), y se midió la actividad de promotor de ambos fragmentos. En la figura 5 se muestra que se presentó una actividad transcripcional similar en los fragmentos de 3 Kb y 1.5 Kb, en células HeLa, aunque la mayor actividad se observa en el fragmento de 1.5 Kb. Un análisis del promotor putativo mostró sitios consenso para factores de transcripción como Sp1, Elk, c-Rel, Myb y un AP1/CREB proximal. Para mapear el promotor mínimo, se generaron 13 deleciones utilizando el fragmento de 1398 pb, usando la exonucleasa III y la nucleasa S1 (D1-D13) (Fig. 3c). Estas construcciones se clonaron y se midió su actividad de promotor. Las primeras nueve deleciones (D1-D9) mostraron un ligero incremento en la actividad sobre los fragmentos de 1.5 y 3 Kb (Fig. 5). Las deleciones D10 a

**A**

CCGCCTctcgagGGAACGCCTGTGCGCAGCTCCCTGAGAGCTCGGGGACCACGCGGAGGTTGTAATTGGTCT  
 CTAGACCACACCTAGTTGTTGAGTGCCGCTGCTTAAAAATCTCAGTTCTGCCGAGATCGCAGAATACACA  
 CAAGTACCTTTGGGCACCAGAGCAGACAGAACCAGCGGAGCTTCAGGGTGAAGATTCTGGAAACTTT  
 GCCAAGTAAGTGAGGTGGGAGAGAAAGGAAGCCAGTGCCTGACACTGTGGGGAGTGGCTGGGCAAAGC  
 AGCATTGGAGGTGTTGTAGGGTTCCTACTGTCTGATGAGCTGGTGTGGGGTTCTTACTGTCTGATGTGCTC  
 TCTGGTGAAGTTAGCAGGGCTGGGGCAGATGCACAGAGCACGGTGGCGGGGGTGGAGCCAGGATCGGA  
 TTGATGCCACCCACCACCTGGCACCTGCAGTCCCAGCTGGCCAGAAGGCAAGCATGCTGGAGCCACA  
 AAGCAAAGATCCTCCAGCTCTGCTGCTGGCAAGCCTTGGGGCCAGGGGACTCACAGAAGAGCAGGTTTG  
 GGCCTGTGCCTTCTCCTGCCCAAATGGGTCTCTCTCCCCTTCCCCTTCCAGCCAGGGCCGAGCTGGGGC  
 TGCAGCTTGAGTGACGGGAAAAGAAAGGTTTACTCCACCAGCGCATTAGCGGCACTCACAGCATTAAAA  
 ATGCAGGAGGTGGTGGGAGGAGCGGGCCAGGGAGGAAAATCATGCAGCTGCGGGGCGCGGGGAAGAG  
 CCGGGCTTCTGCCTCCTCAGCCCGGATCAGAGCCGAAGAACGAGGGCAGTTTGGGTTGAGAAGGATTCTC  
 CAGTGTAACCGAGAAGCGAGCGTCCAGGAGGCTGTTGGGGAGGTCGGCACTGTGGGCTTCTGGCCATC  
 GTTTGTGTTTCGAGGGCCAGGACCTCGTGTGTTCCCGTCCGCCCTCTGGGACGGCGCCAGCCCGGCAG  
 GCCGCCGACCGTCTGGGGCTCCCGCGCAGCGGATGCCGGCCTCGTCCACCGTCCACGTGCTGCAGCTG  
 CTGCGGGAGCTGCTCGCTTCGTGCTCCTCAGCTACACGGTGTTCATCGGGGCGCTGCTGCTGGCCGGC  
**TGGACCACTTACTTCTGGTGCTGAAGTGACAGaattcTCGCCGCGCCCGGCCCCGCCCTCCCGCCCGG**  
**CCCGCTCCCGCCCGGCCCGCCCTCCCTAACTCACCAGGAAATCCCTTCAAGCCCTGGCCCGAACTGAGTCC**  
**CCGCCACCCGCGCAGCGTCACGGCGCCCGACTCAGCTCCCGCCCGGACCCACCTCCGCGCCCTCAGGCCCTG**  
**CATATGCCCCGCCCCGCGCGGAAGTTCCGGCGGTTGGTTGCCTTGCGCGGCCGTTACAGCCTTTGCC**  
**CTAAGCCTCGCCCCCTTTCCCCTGCCTGCCCAATCCCGACTGCTTCCTTGGGTGGGGGCGTGGCT**  
**ATGGGGCGAGGCGTCTCAGGTGGAGGCCGTGCCCGCTCCCGGCTCACGAAGCTGCGTCACTTC**  
 CGGCGTGTGCGTCTGGCGTCCGCGCGCTGCACgaattcGGCTC

**B**

**Figura 4. Región 5' no codificante del gen Smac/DIABLO.** (A) La región 5' no traducida de Smac/DIABLO fue amplificada por PCR utilizando la información derivada de los datos genómicos publicados en el GenBank. Se muestran 1519 pb. La región ausente está representada por los nucleótidos tachados. La región del promotor mínimo está marcada en negritas. La flecha indica el sitio putativo de inicio de la transcripción. Los nucleótidos que están en minúsculas y subrayados indican los sitios de restricción utilizados para la clonación de los fragmentos amplificados por PCR. ctcgag=XhoI; gaattc=EcoRI. (B) Esquema de similitud de la región 5' no codificante de Smac/DIABLO de cuatro especies de mamíferos. La gráfica se generó utilizando el software VectorNTI ver. 10.3 con datos de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Canis familiaris*.



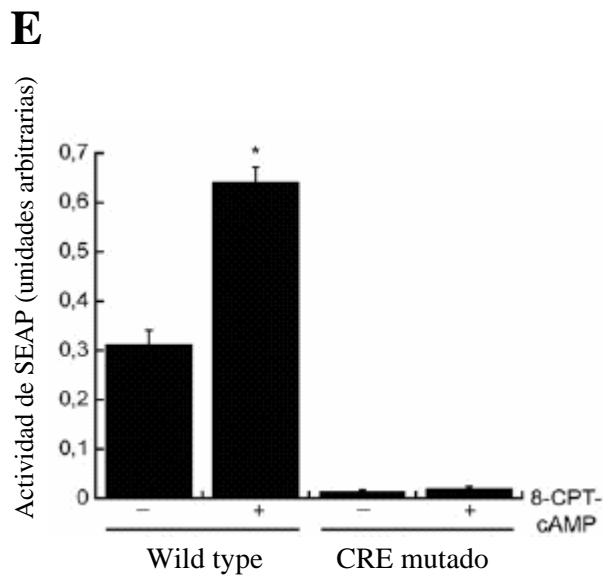
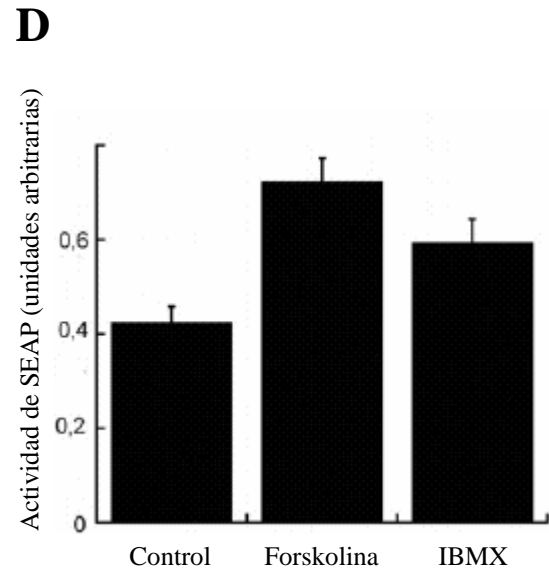
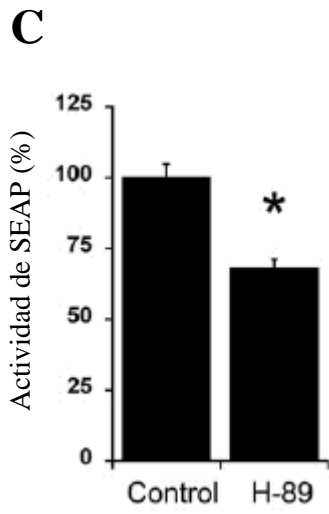
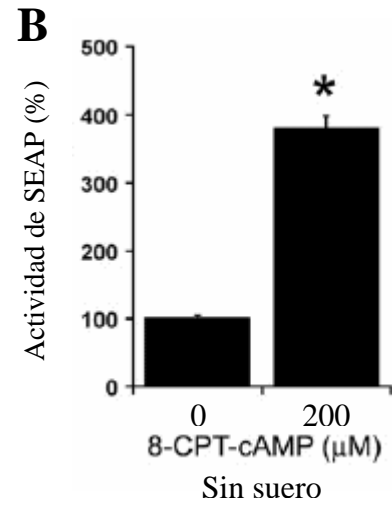
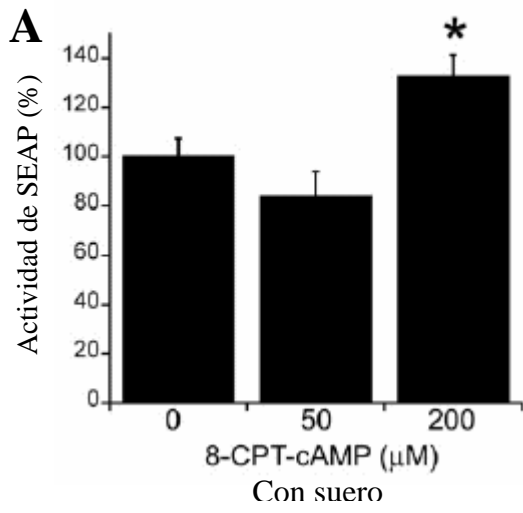
**Figura 5. Actividad transcripcional de la región 5' no codificante del gen Smac/DIABLO.** Actividad transcripcional de las construcciones generadas por PCR y de las deleciones del promotor de Smac/DIABLO en células HeLa. A la izquierda se muestra una representación esquemática de las diferentes deleciones del promotor de Smac/DIABLO. A la derecha se muestra la actividad transcripcional de las construcciones correspondientes. La eficiencia de la transfección se controló cotransfectando el plásmido p $\beta$ GAL. Los resultados se presentan como valores relativos de la actividad de promotor. La actividad de la construcción de 3Kb (-2903 pb) tiene un valor de 1. Las barras de error indican la desviación estándar.

D12, las cuales corresponden a -376 a -193 pb (D10=376 pb; D11=288 pb; D12=193 pb) presentaron mayor actividad que el resto de las construcciones. La deleción D13, la cual solamente contiene los primeros 38 nucleótidos de la región 5' no codificante de Smac/DIABLO, no presentó actividad de promotor. Para confirmar la caracterización del promotor mínimo, se realizó una deleción interna adicional, eliminando por PCR un segmento que corresponde a las 253 pb 5' adyacentes al primer exón. Esta construcción (D253) no fue capaz de activar la transcripción del gen reportero. Estos resultados mapearon al promotor mínimo a las primeras 196 pb 5' adyacentes al primer exón de Smac/DIABLO, consistente con el análisis *in silico* (Fig. 4a).

### *Regulación de Smac/DIABLO por cAMP*

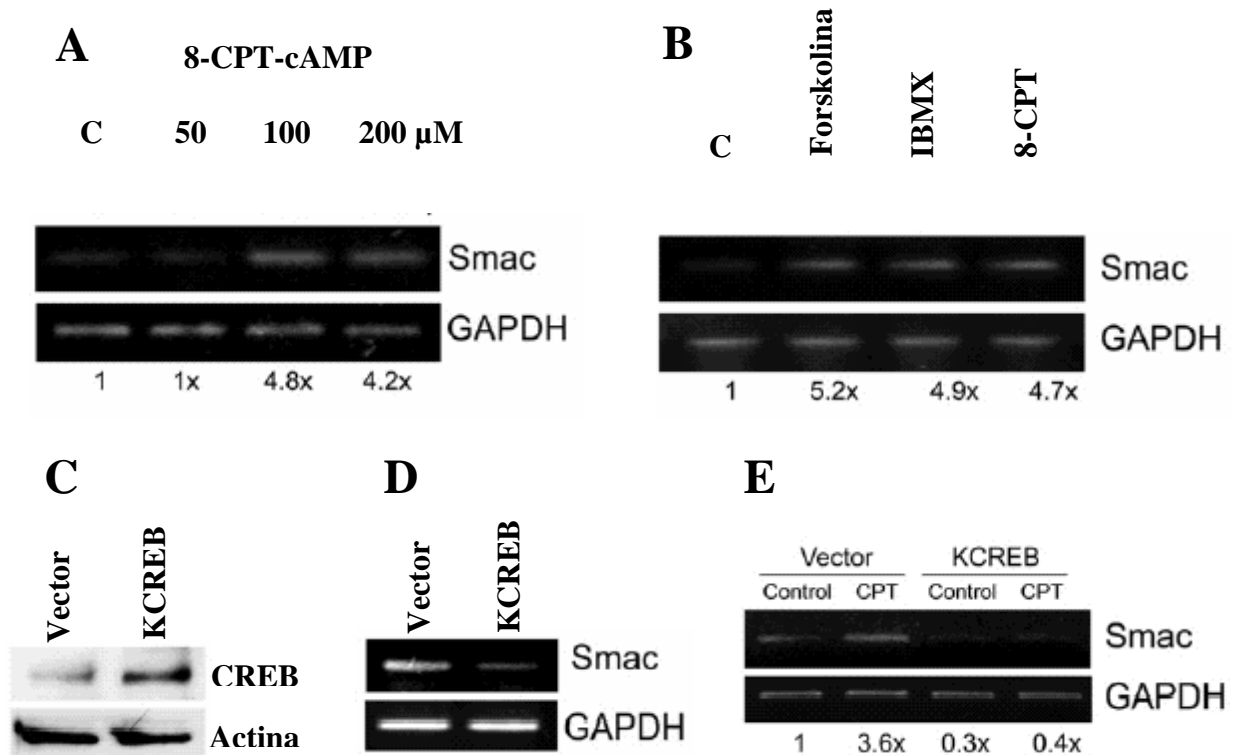
Como se mencionó previamente, el análisis *in silico* del promotor mínimo, utilizando el programa TESS (Schug y Overton, 1997), reveló varias secuencias consenso putativas para factores de transcripción (Fig. 6a). Al realizar un alineamiento de los promotores putativos de cuatro especies de mamíferos, se observó un elevado grado de conservación en las secuencias proporcionadas por TESS (Fig. 6b). Entre éstas, el sitio CRE (elemento de respuesta a AMP cíclico) (GCTGCGTCACT), ubicado en la posición -46 a -35 fue de particular interés como un posible elemento funcional, puesto que al realizar un alineamiento de la región 5' no codificante de varias especies de mamíferos, se observó que este sitio estaba conservado (Fig. 6c). Es importante notar que el núcleo de la secuencia CRE (CGTCA), esencial para la unión del factor de transcripción, fue idéntico en todas las secuencias. Para establecer si este sitio CRE pudiera ser funcional, se transfectaron células HeLa con la D12 y se expusieron a un análogo del cAMP permeable a las células (8-CPT-cAMP), el cual se sabe que activa a la PKA y regula varios genes a través de sitios CRE. Como se observa en la Fig. 7a, la exposición al 8-CPT-cAMP incrementó la actividad de promotor de Smac/DIABLO en 25%. Este efecto fue sustancialmente mayor (cuatro veces sobre la actividad basal) cuando las células fueron cultivadas en medio sin suero, previo a la adición del análogo (Fig. 7b). Para apoyar estos resultados, se expusieron células HeLa a un inhibidor selectivo de la PKA, el H-89. Este compuesto es un miembro del grupo isoquinolinasulfoamida, de inhibidores competitivos de proteínas cinasas, que inhiben selectivamente a la PKA *in vivo* (Hidaka *et al*, 1984; Lee y Chuong, 1997). La exposición de las células HeLa al inhibidor, redujo la actividad de reportero un 40% (Fig. 7c). Similarmente, la exposición de estas células al activador de la adenilato ciclasa, la forskolina, o al inhibidor de la fosfodiesterasa, la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Fig. 7d), también incrementó la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO. Para corroborar estos







**Figura 7. Efecto del cAMP sobre la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO.** Las células HeLa fueron transfectadas con un plásmido que contiene el gen para la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) bajo el control del promotor mínimo de Smac/DIABLO. Las células fueron expuestas al análogo del cAMP 8-CPT-cAMP (A) en la presencia o (B) ausencia de suero, o (C) en la presencia de una concentración 10  $\mu$ M del inhibidor de la PKA H-89. (D) Las células fueron expuestas a una concentración 100  $\mu$ M de forskolina o a una concentración 200  $\mu$ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). (E) Actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO Wild type o mutado, expuesto al vehículo (control) o al análogo del cAMP, 8-CPT-cAMP. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. \* $p$ <0.05. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de  $t$  con corrección de Bonferroni.



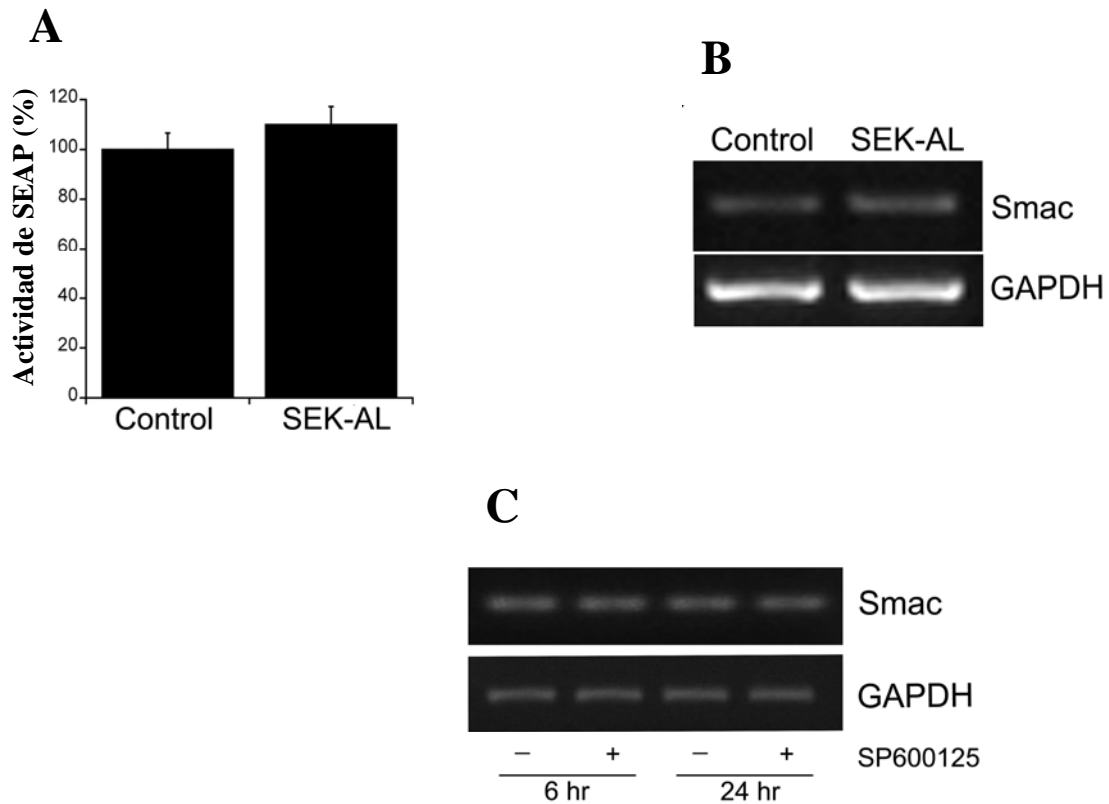
**Figura 8. Efecto del cAMP sobre la expresión de Smac/DIABLO.** (A) Las células HeLa fueron expuestas a las concentraciones de 50, 100 o 200  $\mu$ M del análogo del cAMP permeable a las células, 8-CPT-cAMP y se midió la expresión del mRNA de Smac/DIABLO por medio de ensayos de RT-PCR semicuantitativo. Como control de carga se amplificó el gen de expresión basal GAPDH. La expresión de Smac/DIABLO se incrementó en las células expuestas a las concentraciones de 100 y 200  $\mu$ M del 8-CPT-cAMP en 4.8 ( $\pm$ 0.9) y 4.2 ( $\pm$ 0.7) veces el control, respectivamente. (B) Las células HeLa fueron expuestas a una concentración 100  $\mu$ M de forskolina, 200  $\mu$ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) o 100  $\mu$ M de 8-CPT-cAMP y se analizó la expresión del mRNA de Smac/DIABLO por medio de ensayos de RT-PCR semicuantitativo. Como control de carga se amplificó el gen GAPDH. La expresión de Smac/DIABLO se incrementó en las células expuestas a la forskolina, IBMX o el 8-CPT-cAMP en 5.2 ( $\pm$ 0.6), 4.9 ( $\pm$ 0.8) o 4.7 ( $\pm$ 0.8) veces el control, respectivamente. (C) Análisis de la expresión de CREB en la línea celular HeLaKCREB o en la línea celular parental transfectada con un vector vacío, para demostrar la sobreexpresión del transgen. (D) Análisis de la expresión de Smac/DIABLO usando RT-PCR semicuantitativo, en la línea celular HeLaKCREB o en la línea celular parental control, transfectada con un vector vacío. (E) La línea celular HeLaKCREB o la línea celular parental control transfectada con un vector vacío, fueron expuestas a una concentración 50  $\mu$ M del análogo de cAMP, 8-CPT-cAMP. Después de 24 horas, se analizó la expresión de Smac/DIABLO, usando RT-PCR semicuantitativo. La expresión de Smac/DIABLO se incrementó únicamente en las células transfectadas con el vector vacío en 3.6 ( $\pm$ 0.4) veces. La expresión de Smac/DIABLO se redujo a 0.3x en las células HeLaKCREB. Los experimentos se realizaron por triplicado como se indica en Materiales y Métodos.

resultados, se generó un vector promotor-reportero en el cual se mutó el núcleo del sitio CRE del promotor de Smac/DIABLO. La figura 7e muestra que se redujo la actividad de este promotor mutado, después de la adición del análogo del cAMP, al compararlo con la versión no mutada. Estos resultados definen claramente el sitio de unión para CREB, localizado en la posición -46/-35, como esencial para conferir responsividad al cAMP.

Para establecer si la regulación transcripcional por el cAMP iba acompañada con un incremento en el RNAm de Smac/DIABLO, se realizó un análisis por RT-PCR en células HeLa expuestas al 8-CPT-cAMP, forskolina e IBMX. Como se esperaba, todos los compuestos indujeron un incremento en el mRNA de Smac total (Fig 8b). Finalmente, para verificar que CREB era requerido para la transcripción basal de Smac/DIABLO y para la regulación inducida por cAMP, se bloqueó la vía de señalización de CREB, utilizando una versión dominante negativa de este factor (KCREB) (Walton *et al*, 1992). El bloqueo de la actividad de CREB redujo los niveles de Smac/DIABLO un 85% (Fig. 8d) e hizo a las células insensibles al efecto del análogo del cAMP (Fig. 8e). Estos resultados sugieren fuertemente que la expresión de Smac/DIABLO en células HeLa, es regulada por la vía del cAMP a través de la proteína de unión a CRE.

#### *JNK no regula la expresión de Smac/DIABLO*

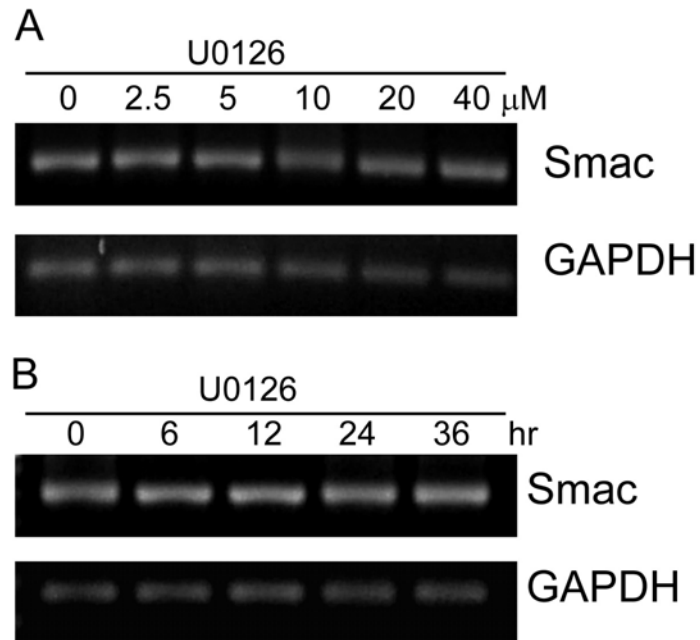
Los resultados anteriores mostraron que la regulación positiva de Smac/DIABLO por el cAMP se vio fuertemente potenciada después de la deprivación de suero. Existen estudios que muestran que la deprivación de suero induce apoptosis en células cancerosas a través de la activación de JNK (Huang *et al*, 2000). La muerte inducida por este estímulo fue suprimida por la expresión de una versión dominante negativa de la cinasa que en la vía se encuentra por arriba de JNK, MEKK4 (también conocida como SEK). Adicionalmente, se ha mostrado que JNK es capaz de inducir apoptosis activando al factor de transcripción AP-1 (Putchá *et al*, 2003). Puesto que el



**Figura 9. Efecto de la inhibición de JNK sobre la expresión de Smac/DIABLO.** Las células HeLa se transfectaron con un plásmido que contiene la versión dominante negativa de la cinasa río arriba SEK. Se creó una línea celular estable (HeLaSEK-AL) al seleccionar las células transfectadas con G418 por 4 semanas. De manera similar se creó una línea celular control transfectando un vector vacío (pcDNA 3). (A) Se transfectaron células HeLaSEK-AL o células control con el plásmido reportero conteniendo el promotor mínimo de Smac/DIABLO, y se midió la actividad de SEAP. (B) Se realizaron los ensayos de RT-PCR para Smac/DIABLO en las células HeLaSEK-AL y en las células control. (C) Se realizaron los ensayos de RT-PCR para Smac/DIABLO en células HeLa expuestas a una concentración 25  $\mu$ M del inhibidor de JNK, SP600125, por 6 o 24 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado como se indica en Materiales y Métodos. \* $p < 0.05$  utilizando la prueba de  $t$  con corrección de Bonferroni.

sitio CRE encontrado en el promotor mínimo es un motivo compuesto que también contiene un sitio consenso AP-1(TGCGTCA), JNK era un candidato lógico para el efecto del suero. Por esta razón, se creó una línea de células HeLa que expresa de manera estable una versión negativa de la cinasa río arriba de JNK, SEK-AL (Zanke *et al*, 1996). Esta línea mutante vuelve insensible la vía de JNK a las señales extracelulares. Como se observa en la figura 9, no se modificó la actividad de promotor ni la expresión de Smac/DIABLO, en esta línea celular. Apoyando estos resultados, se encontró que no se modificó la expresión de Smac/DIABLO después de la

exposición de células HeLa al inhibidor de JNK permeable a las células, el SP600125. Estos resultados excluyen a JNK como la vía responsable para la regulación transcripcional de Smac/DIABLO mediada por el suero.

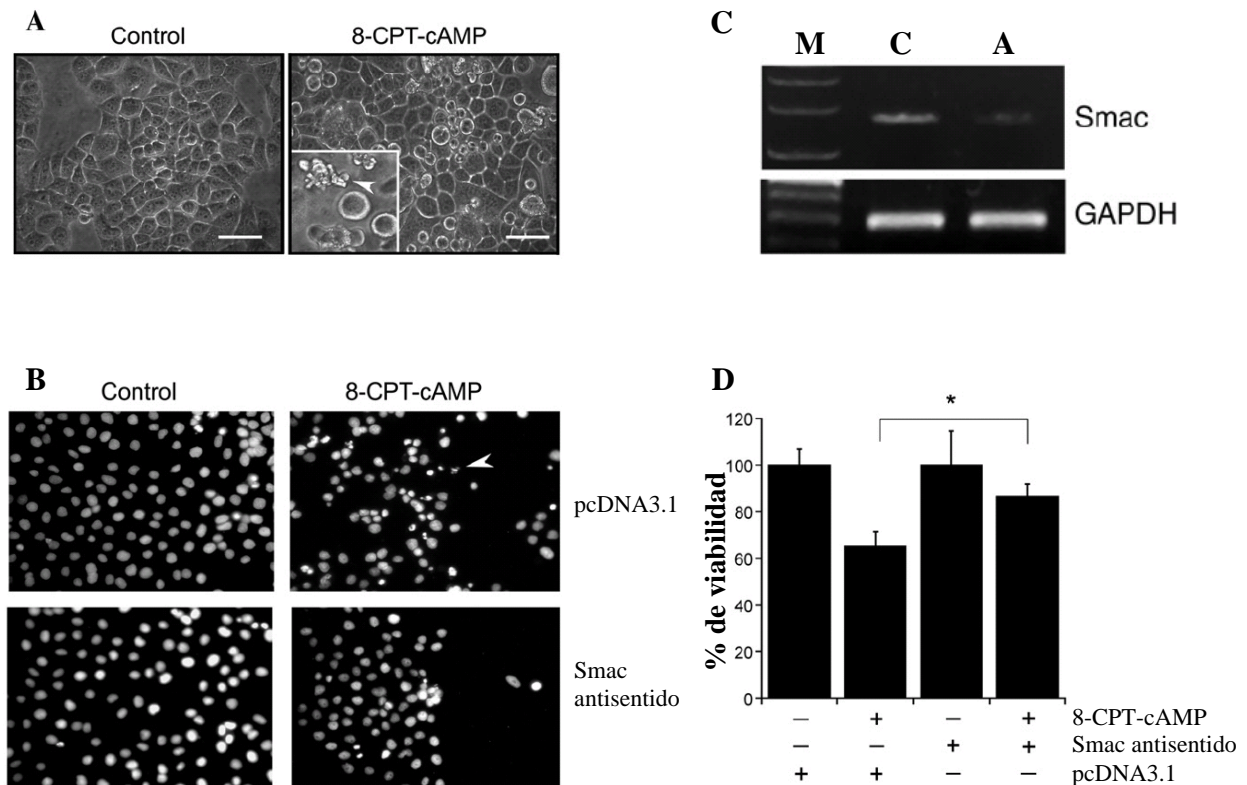


**Figura 10. Efecto de la inhibición de MEK sobre la expresión de Smac/DIABLO.** Se realizaron ensayos de RT-PCR para medir la expresión de Smac/DIABLO en células HeLa expuestas a (A) Diferentes concentraciones del inhibidor de MEK 1 y 2, U0126, o (B) una concentración 10 μM por los tiempos indicados. Se utilizó al GAPDH como control de carga. Los experimentos se realizaron por triplicado como se indica en Materiales y Métodos.

#### Vía de MAPK

Otro de los sitios potenciales de regulación que presenta el promotor del gen *Smac/DIABLO*, es el sitio Elk-1 (TCACTTCCGGCGTGTGCG), ubicado en la posición -39 a -22. Elk-1 es activado a través de la vía clásica de las MAPKs. Aunado a esto, se sabe que la activación de cinasas de la vía de MAPK como MEK y ERK, puede conducir a la fosforilación de la proteína CREB (Johannessen *et al*, 2004). Para determinar la posible participación de esta vía en la regulación del promotor de *Smac/DIABLO*, se realizaron experimentos en los cuales se trataron células HeLa por diferentes períodos de tiempo y con varias concentraciones de U0126, un inhibidor específico

de MEK. La inhibición de esta vía no produjo cambios notables en la expresión de Smac/DIABLO en estas células (Fig. 10), lo que sugiere que la vía de MAPK tampoco participa en la regulación del promotor del gen *Smac/DIABLO*.



**Figura 11. Efecto de la regulación negativa de Smac/DIABLO sobre la apoptosis inducida por cAMP.** (A) Células HeLa expuestas al vehículo (panel izquierdo) o al 8-CPT-cAMP (panel derecho) y visualizadas utilizando microscopía de contraste de fases a un aumento de 10X. Barra: 30  $\mu$ m. Recuadro: aumento 40X. La flecha señala a una célula que está experimentando condensación de la membrana y formación de cuerpos apoptóticos. (B) Células HeLa expuestas al vehículo (panel izquierdo) o al 8-CPT-cAMP (panel derecho), y visualización de los núcleos celulares utilizando tinción con bromuro de etidio, como se describe en Materiales y Métodos. Los núcleos están condensados y fragmentados. (C) Las células HeLa fueron transfectadas con un plásmido que contiene un cDNA de longitud completa de Smac/DIABLO en orientación antisentido, o con un vector vacío, y se midieron los niveles de expresión por ensayos de RT-PCR. M=Marcador de 100 pb; C=Vector vacío; A=Smac/DIABLO antisentido. (D) Células HeLa transfectadas con un vector que contiene una versión antisentido de Smac/DIABLO, o con un vector vacío, se expusieron al 8-CPT-cAMP y se realizaron ensayos de viabilidad como se describe en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron por quintuplicado. \* $p < 0.05$ , prueba de  $t$  con corrección de Bonferroni.

### *La apoptosis inducida por el cAMP es mediada por Smac/DIABLO*

Diversos estudios han demostrado que el cAMP y sus análogos son capaces de inducir apoptosis en una variedad de líneas celulares de cáncer (Boe *et al*, 1995; Fassina *et al*, 1997; Kim *et al*, 2001; Wang *et al*, 2005). Para determinar si esto también sucedía en células de cáncer de cérvix, se expusieron células HeLa al 8-CPT-cAMP. La figura 11a muestra que el análogo del cAMP indujo cambios morfológicos compatibles con apoptosis, tales como encogimiento celular y formación de cuerpos apoptóticos. Adicionalmente se observó una clara condensación y fragmentación nuclear (Fig. 11b). Para determinar si el efecto apoptótico previamente reportado del cAMP pudiera ser mediado por la regulación positiva de Smac/DIABLO, se transfectaron células HeLa con un plásmido que contiene una versión antisentido de esta molécula (Fig. 11c). La expresión disminuida de Smac/DIABLO protegió a las células del efecto apoptótico del 8-CPT-cAMP (Fig. 11b y d). Estos resultados muestran que se requiere la regulación positiva de Smac/DIABLO para los efectos apoptóticos del cAMP.

## DISCUSIÓN

La proteína Smac/DIABLO  $\alpha$  se expresa de manera diferencial en diversos tejidos de humano adulto. Presenta una expresión elevada en testículo, corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario y una baja expresión en cerebro, pulmón, timo y leucocitos. DIABLO presenta un patrón similar de expresión en tejidos de ratón adulto (Du *et al*, 2000; Verhagen *et al*, 2000).

De las cuatro isoformas de Smac/DIABLO hasta ahora reportadas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), se sabe que Smac/DIABLO  $\beta$  se expresa en todas las líneas celulares probadas, incluyendo: HeLa, Jurkat, 293, THP1, MCF-7, A431 y 697, aunque en una cantidad menor que Smac/DIABLO  $\alpha$  (Srinivasula *et al*, 2000; Roberts *et al*, 2001). Por su parte Smac/DIABLO  $\delta$  se expresa, al igual que Smac/DIABLO  $\alpha$ , de manera diferencial en tejidos de humano adulto, así como en las líneas celulares MCF-7, HeLa, 293T, Jurkat y HEK293 (Fu *et al*, 2003). La isoforma  $\gamma$  es la menos estudiada y hasta el momento se desconoce su patrón de expresión en los organismos.

Esta expresión diferencial de las isoformas de Smac/DIABLO se da en condiciones basales, y las diferencias observadas pueden deberse en parte a que los tejidos están expuestos a diferentes estímulos o a la presencia restringida de factores de transcripción específicos en los diversos tejidos. Como una consecuencia, el gen *Smac/DIABLO* está siendo regulado de modo diferencial, dependiendo del microambiente específico presente en cada tejido.

El número de trabajos realizados sobre Smac/DIABLO se ha incrementado en los años recientes. Sin embargo poco se sabe todavía sobre su regulación. Los mecanismos de regulación post-traduccionales han sido los más estudiados y, un poco menos, los mecanismos post-transcripcionales. En cuanto a su regulación transcripcional, existen pocos estudios sobre ello.

Aunque hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares que modulan su expresión en condiciones basales, existen varios reportes que documentan la activación transcripcional de

este gen bajo condiciones de inducción de apoptosis, con estímulos diversos. El tratamiento de una línea de células B inmaduras, derivadas de ratón: WEHI 279, y de células normales pre-B de ratón, dependientes de IL-7, con 10 U/ml de IFN- $\gamma$ , indujo un aumento en los niveles de expresión endógenos del RNA mensajero de Smac/DIABLO. Este incremento sensibilizó a estas estirpes celulares a experimentar apoptosis. La inhibición de la expresión de Smac/DIABLO con un oligonucleótido antisentido, disminuyó la activación de la muerte celular, lo que sugiere un papel directo de Smac/DIABLO en la promoción de la apoptosis inducida por el IFN- $\gamma$  en células de ratón (Yoshikawa *et al*, 2001). La regulación de la expresión de Smac/DIABLO por IFN- $\gamma$ , en células de ratón, podría estar mediada por la activación de la vía de transducción de STAT, ya que un análisis *in silico* mostró que el promotor putativo del gen Smac/DIABLO en ratón, posee varios sitios potenciales de unión a varios miembros de la familia de factores de transcripción de STAT, aunque esta hipótesis requiere confirmación experimental (observación personal).

Por otro lado, el tratamiento de fibroblastos de origen humano GM701, con 40  $\mu$ M del compuesto cíclico, el ácido hidroxámico BMD188, indujo un incremento en la expresión del RNA mensajero de Smac/DIABLO y un aumento en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, junto con un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere una participación directa de la mitocondria en este escenario de apoptosis (Chandra *et al*, 2002). En otro estudio, se trataron ratones Balb/c con 250 mg/kg de ácido fólico para inducir falla renal aguda. Las células de riñón de los ratones tratados, experimentaron apoptosis y se observó un incremento en la expresión del RNA mensajero y la proteína de Smac/DIABLO. Para confirmar estos resultados, los autores trataron células MCT, las cuales son células tubulares proximales provenientes de la corteza renal de ratones SJL, con 30 ng/ml de TNF. El TNF indujo apoptosis y se volvió a observar el incremento en la expresión de Smac/DIABLO (Justo *et al*,



2003). En estos tres estudios no se menciona a través de qué mecanismos moleculares, tales estímulos apoptogénicos indujeron el incremento en la expresión de Smac/DIABLO. Existe un reporte reciente en el cual se hace una aproximación a los eventos moleculares que conducen a la activación transcripcional de Smac/DIABLO, en condiciones de apoptosis. En este estudio se utilizaron células humanas no pequeñas de carcinoma de pulmón, H1299, las cuales no expresan p53. Estas células fueron manipuladas para que pudieran expresar constitutivamente al factor de transcripción E2F1. El tratamiento de estas células con 4-hidroxitamoxifen, causa que E2F1 se transloque al núcleo y active genes blanco para E2F1. Al mismo tiempo, la activación inducida de E2F1 causa apoptosis en estas células. Los autores encontraron que durante la inducción de apoptosis por E2F1, se presentó un incremento en la expresión del RNA mensajero y la proteína de Smac/DIABLO. Adicionalmente, se observó que el factor de transcripción E2F1 fue capaz de unirse al promotor del gen Smac/DIABLO y transactivarlo. La inhibición de la expresión de Smac/DIABLO con RNA de interferencia, causó una disminución en el número de células que experimentaron apoptosis, lo que sugirió un papel directo de Smac/DIABLO en la promoción de la apoptosis inducida por E2F1 (Xie *et al*, 2006).

Con estos antecedentes de por medio, los objetivos del presente trabajo fueron clonar y caracterizar el promotor del gen Smac/DIABLO e investigar el papel del cAMP en la regulación transcripcional de Smac/DIABLO como un mecanismo potencial para los efectos apoptóticos de este segundo mensajero.

El mecanismo de transducción de la señal del cAMP en células de mamífero es una de las vías bioquímicas mejor entendidas. La fosforilación de CREB, mediada por la vía de señalización del cAMP, puede ser iniciada por una amplia variedad de estímulos fisiológicos y está críticamente implicada en la regulación del metabolismo, crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y expresión génica (Cho-Chung, 2003). La regulación transcripcional por el cAMP está mediada

por un grupo de factores nucleares que se unen a y regulan la expresión de genes que contienen el elemento consenso responsivo a cAMP (CRE) en sus promotores. La fosforilación de estas proteínas de unión a CRE (CREBs) por PKA modula su actividad (Montminy *et al*, 1990).

A pesar de que se tiene conocimiento considerable sobre las vías que regulan los efectos proliferativos del cAMP, los determinantes precisos de su efecto de muerte son poco conocidos. Recientemente se ha mostrado que la muerte celular inducida por análogos del cAMP ocurre a través de apoptosis dependiente de PKA y CREB (Yan *et al*, 2000; Zhang e Insel, 2004).

En células hematopoyéticas, la regulación positiva de la proteína Bim por esta vía, es un evento clave de la respuesta apoptótica a los análogos del cAMP y a los glucocorticoides (Zhang e Insel, 2004). Sin embargo, este mecanismo no ha sido explorado en tumores sólidos, los cuales presentan mecanismos divergentes para la inducción de muerte por drogas quimioterapéuticas (Herr *et al*, 2003). Además de la inducción directa de apoptosis, el cAMP puede también sensibilizar a las células al efecto tóxico de drogas antineoplásicas como el paclitaxel (Maldonado *et al*, 1996). Esta droga induce muerte celular a través de una vía dependiente de mitocondria, por medio de la liberación de factores proapoptóticos al citosol, tales como Smac/DIABLO, después de alterar la integridad de este organelo (Andre *et al*, 2000).

Dada la importancia reportada de Smac/DIABLO en la regulación de la apoptosis inducida por E2F1, IFN- $\gamma$ , ácido hidroxámico BMD188 o paclitaxel (Xie *et al*, 2006; Yoshikawa *et al*, 2001; Chandra *et al*, 2002; Song *et al*, 2003) y al hecho de que el efecto de muerte de esta droga es potenciado por el cAMP (Maldonado *et al*, 1996), se decidió investigar si la apoptosis inducida por este segundo mensajero pudiera ser mediada por un mecanismo transcripcional que actuara sobre el promotor de Smac/DIABLO. Para esto, se clonó y analizó un fragmento de 2.9 Kb del extremo 5' del gen y se caracterizó el promotor mínimo requerido para la expresión basal en la

línea de células de cáncer HeLa. Durante esta caracterización se observó un dato interesante. Al comparar la actividad de promotor de la delección D10 con las delecciones de mayor tamaño (D1-D9) y con las construcciones de 1.5 y 3 Kb, se observó una diferencia importante en dicha actividad. Este cambio drástico en la actividad podría indicar que en esa región existen elementos represores que están regulando negativamente la activación del promotor de *Smac/DIABLO*. Existen varios factores de transcripción candidatos que estarían realizando esta función, como Oct-1, MyoD, GATA-2, Sp1 y E2F1, los cuales pueden actuar como activadores o inhibidores de la transcripción, dependiendo del contexto del promotor en el que se encuentren (Hitomi *et al*, 2007; Mal y Harter, 2003; Johnson *et al*, 2007; Huang y Hung, 2006; Xie *et al*, 2006). Es necesario realizar estudios adicionales para demostrar esta hipótesis.

Volviendo con la caracterización del promotor mínimo, el análisis *in silico* mostró la existencia de un sitio consenso compuesto por AP-1/CREB dentro de esta región. Como se esperaba, por este resultado, el cAMP fue capaz de inducir la transcripción de un gen reportero controlado por este promotor mínimo. Inesperadamente, este efecto se incrementó notablemente después de la privación de suero. Esta observación podría deberse a la existencia de factores transcripcionales adicionales que actuarían sobre el promotor potenciando la transcripción, pero que estarían siendo regulados negativamente por un componente del suero. Alternativamente, también podría estar implicado un represor modulado por el suero.

Puesto que el sitio consenso incluía un motivo AP-1, un candidato lógico en la activación, sería la vía de la cinasa del N-terminal de c-Jun (JNK). Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando una versión dominante negativa de la cinasa río arriba de esta vía (SEK-AL), excluyeron claramente esta posibilidad. Actualmente se están investigando factores adicionales.

Ha sido mostrado que varias vías de transducción de señal conducen a la fosforilación y activación de CREB (Mayr y Montminy, 2001). Utilizando inhibidores farmacológicos, se

analizó la participación de las vías de la MAPK (U0126, PD98059), p38 MAPK (SB203580, no mostrado), JNK/SAPK (SP600125) y Akt/PKB (LY-294002, no mostrado), en la regulación transcripcional de Smac/DIABLO. Ninguno de estos inhibidores modificó la expresión basal o inducida de este gen, lo que apoya el papel crucial de la PKA en la activación de CREB y la consiguiente regulación de la expresión de Smac/DIABLO. No obstante, no se puede excluir la participación de otras cinasas no identificadas en la regulación de Smac/DIABLO. Un análisis más amplio y dirigido utilizando un panel de inhibidores, ayudaría a resolver esta pregunta.

Además de ser capaz de inducir la transcripción de Smac/DIABLO, la vía inducida por el cAMP está también implicada en la transcripción basal de este gen, puesto que el tratamiento con el inhibidor permeable a las células H-89, también bloqueó su expresión basal. Esta conclusión se ve adicionalmente apoyada por la sorprendente disminución encontrada en la actividad basal del promotor de Smac/DIABLO, cuando se mutó el sitio CRE, y al hecho de que una versión dominante negativa del efector transcripcional del cAMP, KCREB, bloqueó tanto la expresión basal como la inducida de Smac/DIABLO. Es necesario realizar ensayos adicionales utilizando cultivos celulares primarios para establecer si esto ocurre también en células no transformadas.

Aun cuando el paso regulatorio principal en la actividad de Smac/DIABLO yace en su liberación de la mitocondria, los niveles de expresión podrían ser un mecanismo regulatorio adicional importante. Este paso podría mediar el umbral apoptótico en un contexto particular, ya sea celular o tisular. Por ejemplo, en el caso de la molécula apoptótica APAF-1, la principal proteína efectora de la vía de muerte mitocondrial, la regulación de su expresión es importante. Esta proteína es un blanco transcripcional para el gen supresor de tumores p53 y es modulada en varios tumores y en particular en melanoma (Allen *et al*, 2005; Soengas *et al*, 1999). Aunque hasta el momento no se ha explorado de manera extensa, se han encontrado diferencias en la expresión de Smac/DIABLO en células de cáncer. Se ha reportado que tumores gástricos (Yan *et*

*al*, 2004), renales (Mizutani *et al*, 2005), pulmonares (Sekimura *et al*, 2004) y de cérvix (Espinosa *et al*, 2004), tienen una expresión desregulada de esta molécula. Más importantemente, la expresión de Smac/DIABLO en tumores renales y de pulmón se correlaciona con el pronóstico de estas neoplasias, lo que apunta hacia una posible relevancia clínica (Sekimura *et al*, 2004; Mizutani *et al*, 2005). Estos resultados muestran que Smac/DIABLO es dinámicamente regulado en la progresión del cáncer. Adicionalmente, la existencia de al menos una isoforma citosólica que es capaz de inducir apoptosis aún sin una señal de localización mitocondrial, Smac/DIABLO  $\beta$ , da mayor relevancia a la importancia de la modulación de la expresión como un mecanismo regulatorio (Roberts *et al*, 2001). Los resultados presentados aquí proporcionan el primer análisis de la regulación transcripcional de esta interesante molécula, y se demuestra que el cAMP puede ser uno de los más importantes determinantes de la regulación de Smac/DIABLO.

Las consecuencias celulares de la modulación de la expresión de Smac/DIABLO no han sido estudiadas en un contexto fisiológico. No obstante, en el caso del cáncer, los estudios de sobreexpresión han implicado a Smac/DIABLO en la quimio y radiosensibilización.

Existen varios reportes recientes que han mostrado que el umbral apoptótico puede ser fácilmente modulado al incrementar ectópicamente los niveles de expresión de Smac/DIABLO. Se ha observado que la sobreexpresión de Smac/DIABLO en células de leucemia, incrementa la sensibilidad de éstas a estímulos que activan tanto la vía de apoptosis intrínseca como la vía extrínseca (Guo *et al*, 2002). Similarmente, la transfección de un plásmido que codifica para Smac/DIABLO, sensibiliza a las células de hepatocarcinoma, miogénicas, de adenocarcinoma gástrico y ováricas, a la apoptosis inducida por una variedad de agentes quimioterapéuticos y físicos, incluida la radiación gamma (Zhao *et al*, 2006; Zheng *et al*, 2005; McNeish *et al*, 2003; Jiang *et al*, 2005; Giagkousiklidis *et al*, 2005). *In vivo*, la transferencia del gen Smac/DIABLO a

gliomas malignos intracraneales, sensibilizó a éstos a la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos y a TRAIL (Fulda *et al*, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la modulación de la actividad de CREB utilizando análogos de cAMP puede ser una estrategia atractiva para potenciar no solo la quimioterapia, sino también la radiosensibilización por medio de la modulación de la expresión de Smac/DIABLO. Por estas razones, se requiere conducir más estudios que evalúen la importancia de la regulación de Smac/DIABLO a través de la vía del cAMP, en el cáncer y otras enfermedades humanas.

En conclusión, en este trabajo se proporciona evidencia que el análogo del cAMP, el 8-CPT-cAMP regula positivamente al gen propapotótico Smac/DIABLO a través de un mecanismo dependiente de CREB que actúa sobre su promotor. Este efecto es mediado por el incremento de la transcripción del mRNA de Smac/DIABLO, como se mostró por medio de ensayos de RT-PCR y análisis de gen reportero. La caracterización de un nuevo mecanismo para la regulación de la expresión de Smac/DIABLO debe ayudar a la identificación de blancos potenciales para la terapia.

## CONCLUSIONES

1. El promotor mínimo requerido para la activación del gen Smac/DIABLO mide 196 pb contadas a partir del ATG inicial.
2. El sitio CRE en el promotor de Smac/DIABLO es el responsable de su activación transcripcional por el cAMP.
3. La vía cAMP/PKA/CREB es la responsable de la activación de la transcripción del gen *Smac/DIABLO*.
4. Las vías de MAPK, p38 MAPK, JNK/SAPK y PI3K no participan en la regulación de la expresión del gen Smac/DIABLO.
5. La apoptosis inducida por el cAMP requiere la regulación transcripcional positiva de Smac/DIABLO en células HeLa.

## **PERSPECTIVAS A FUTURO**

A pesar de que la función proapoptótica de la proteína Smac/DIABLO ha sido claramente demostrada, los mecanismos utilizados para ejercer dicha función aun no son completamente entendidos. Hasta el momento se desconocen los mecanismos por los que Smac/DIABLO  $\beta$  promueve la apoptosis sin la necesidad de interactuar con las proteínas IAPs. De igual forma no se sabe cómo Smac/DIABLO  $\delta$  acelera la auto-ubiquitinación y la destrucción de XIAP. En cuanto a las isoformas de Smac/DIABLO, resultados preliminares de nuestro laboratorio apuntan hacia la existencia de más isoformas que las cuatro hasta ahora descritas, por lo que la función y efectos de esta proteína son mucho más complejos de lo que actualmente se conoce.

De igual forma, sería muy importante analizar el promotor del gen Smac/DIABLO, en busca de elementos represores de su transcripción, los cuales hasta ahora no han sido descritos, pero se tienen evidencias de su existencia.

Tampoco se han reportado los mecanismos moleculares que llevan a la expresión diferencial de Smac/DIABLO, a nivel basal, en los diferentes tejidos.

Por otra parte, la utilización de análogos de cAMP puede ser una estrategia para regular positivamente la expresión de Smac/DIABLO y potenciar efectivamente la quimioterapia y la radioterapia.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aharoni D., Dantes A., Oren M. y Amsterdam A. (1995) cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp Cell Research* 218:271-282.
2. Ahn Y.-H., Jung. J. M. y Hong S. H. (2005) 8-Chloro-cyclic AMP-induced growth inhibition and apoptosis is mediated by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase activation in HL60 cells. *Cancer Res* 65(11):4896-4901.
3. Allen J. D., Zhang X. D., Scott C. L., Boyle G. M., Hersey P. y Strasser A. (2005) Is Apaf-1 expression frequently abrogated in melanoma? *Cell Death Differ* 12:680-681.
4. Andre N., Braguer D., Brasseur G., Goncalves A., Lemesle-Meunier D., Guise S., Jordan M. A. y Briand C. (2000) Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells. *Cancer res* 60(19):5349-5353.
5. Antonarakis S. E. (2000) 605219. Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase. OMIM Database: John Hopkins.
6. Arellano-Llamas A., Garcia F. J., Perez D., Cantu D., Espinosa M., De la Garza J. G., Maldonado V. y Melendez-Zajgla J. (2006) High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer* 6:256.
7. Arends M. J. y Wyllie A. H. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-254.
8. Boe R., Gjertsen B. T., Doskeland S. O. y Vintermyr O. K. (1995) 8-Chloro-cAMP induces apoptotic cell death in a human mammary carcinoma cell (MCF-7) line. *Br J Cancer* 72(5):1151-1159.
9. Chai J., Du C., Wu J. W., Kyin S., Wang X. y Shi Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855-862.

10. Chandra D., Liu J. W. y Tang D. G. (2002) Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis. *J Biol Chem* 277:50842-50854.
11. Chauhan D., Li G., Hideshima T., Podar K., Mitsiades C., Mitsiades N., Munshi N., Kharbanda S. y Anderson K. C. (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 20:17593-17596.
12. Cho-Chung Y. S. (2003) cAMP signaling in cancer genesis and treatment. *Cancer Treat Res* 115:123-143.
13. Deveraux Q. L. y Reed J. C. (1999) IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239–252.
14. Down T. A. y Hubbard T. J. (2002) Computational detection and location of transcription start sites in mammalian genomic DNA. *Genome Res* 12:458-461.
15. Du Ch., Fang M., Li Y., Li L. y Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
16. Earnshaw W. C., Martins L. M. y Kaufmann S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383–424.
17. Espinosa M., Cantu D., Lopez C. M., De la Garza J. G., Maldonado V. A. y Melendez-Zajgla J. (2004) SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors *BMC Cancer* 4:84.
18. Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S., Littlewood T. D., Land H., Brooks M., Waters C. M., Penn L. Z. y Hancock D. C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1):119-128.

19. Fassina G., Aluigi M. G., Gentleman S., Wong P., Cai T., Albini A. y Noonan D. M. (1997) The cAMP analog 8-Cl-cAMP inhibits growth and induces differentiation and apoptosis in retinoblastoma cells. *72(6):1088-1094.*
20. Fisher C. L. y Pei G. K. (1997) Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques 23:570-571, 574.*
21. Fu J., Jin Y. y Arend L. J. (2003) Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of XIAP. *J Biol Chem 278: 52660-72.*
22. Fulda S., Wick W., Weller M. y Debatin K. M. (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med 8:808-815.*
23. Giagkousiklidis S., Vogler M., Westhoff M. A., Kasperczyk H., Debatin K. M. y Fulda S. (2005) Sensitization for gamma-irradiation-induced apoptosis by second mitochondria-derived activator of caspase. *Cancer Res 65:10502-10513.*
24. Guo F., Nimmanapalli R., Paranawithana S., Wittman S., Griffin D., Bali P., O'Bryan E., Fumero C., Wang H. G. y Bhalla K. (2002) Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood 99:3419-3426.*
25. Hanahan D. y Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell 100(1):57-70.*
26. Herr I., Ucur E., Herzer K., Okouoyo S., Ridder R., Krammer P. H., von Knebel Doeberitz M. y Debatin K. M. (2003) Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res 63(12):3112-3120.*

27. Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S. y Sasaki Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23:5036-5041.
28. Hitomi T., Matsuzaki Y., Yasuda S., Kawaka M., Yagosawa S., Koyama M., Tantin D. y Sakai T. (2007) Oct-1 is involved in the transcriptional repression of the p15(INK4b) gene. *FEBS Lett* 581(6):1087-1092.
29. Hu S. y Yang X. (2003) Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278:10055-10060.
30. Huang Y., Hutter D., Liu Y., Wang X., Sheikh M. S., Chan A. M. y Holbrook N. J. (2000) Transforming growth factor-beta 1 suppresses serum deprivation-induced death of A549 cells through differential effects on c-Jun and JNK activities. *J Biol Chem* 275:18234-18242.
31. Huang Y. C. y Hung W. C. (2006) 1,25-dihydroxyvitamin D3 transcriptionally represses p45Skp2 expression via the Sp1 sites in human prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 209(2):363-369.
32. Jacobson M. D., Weil M. y Raff M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
33. Jiang B., Xiao W., Shi Y., Liu M. y Xiao X. (2005) Role of Smac/DIABLO in hydrogen peroxide-induced apoptosis in C2C12 myogenic cells. *Free Radic Biol Med* 39:658-667.
34. Johannessen M., Delghandi M. P. y Moens U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal* 16:1211-1227.
35. Johnson K. D., Boyer M. E., Kang J. A., Wickrema A., Cantor A. B. y Bresnik E. H. (2007) Friend of GATA-1-independent transcriptional repression: a novel mode of GATA-1 function. *Blood* Mar 5 (Epub ahead of print).

36. Justo P., Sanz A., Lorz C., Gómez-Garre D., Mezzano S., Egido J. y Ortiz A. (2003) Expression of Smac/Diablo in tubular epithelial cells and during acute renal failure. *Kidney Int* 64,Suppl 86:S52-S56.
37. Kim S. N., Kim S. G., Park J. H., Lee M. A., Park S. D., Cho-Chung Y. S. y Hong S. H. (2000) Dual anticancer activity of 8-Cl-cAMP: inhibition of cell proliferation and induction of apoptotic cell death. *BBRC* 273:404-410.
38. Kim, R., Ohi, Y.R., Inoue, H. y Toge, T. (2000) Enhancement of chemotherapeutic agents induced-apoptosis associated with activation of c-Jun N-terminal kinase 1 and caspase 3 (CPP32) in bax-transfected gastric cancer cells. *Anticancer Res* 20:439-444.
39. Kim S. N., Ahn Y.-H., Kim S. G., Park S. D., Cho-Chung Y. S. y Hong S. H. (2001) 8-Cl-cAMP induces cell cycle-specific apoptosis in human cancer cells. *Int J Cancer* 93:33-41.
40. Knudsen S. (1999) Promoter2.0: for the recognition of PolIII promoter sequences. *Bioinformatics* 15:356-361.
41. Lee Y. S. y Chuong C. M. (1997) Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J Cell Physiol* 170:153-165.
42. Liu Z., Sun C., Olejniczak E. T., Meadows R. P., Betz S. F., Oost T., Herrmann J., Wu J. C. y Fesik S. W. (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408:1004–1008.
43. MacFarlane M., Merrison W., Bratton S. B. y Cohen G. M. (2002) Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* 277:36611-36616.

44. Mal A. y Harter M. L. (2003) MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*(4):1735-1739.
45. Maldonado V., De Anda J. y Melendez-Zajgla J. (1996) Paclitaxel-induced apoptosis in HeLa cells is serum dependent. *J Biochem Toxicology* *11*(4):183-188.
46. Mayr B. y Montminy M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*:599-609.
47. McNeish I. A., Bell S., McKay T., Tenev T., Marani M. y Lemoine N. R. (2003) Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathway. *Exp Cell Res* *286*:186-198.
48. Mizutani Y., Nakanishi H., Yamamoto K., Li Y. N., Matsubara H., Mikami K., Okihara K., Kawauchi A., Bonavida B. y Miki T. (2005) Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J Clin Oncol* *23*:448-454.
49. Montminy M. R., Gonzalez G. A. y Yamamoto K. K. (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* *13*:184-188.
50. Myklebust J. H., Josefsen D., Blomhoff H. K., Levy F. O., Naderi S., Reed J. C. y Smeland E. B. (1999) Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. *J Cell Physiol* *180*:71-80.
51. Putcha G. V., Le S., Frank S., Besirli C. G., Clark K., Chu B., Alix S., Youle R. J., LaMarche A., Maroney A. C. y Johnson E. M. Jr. (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* *38*:899-914.

52. Roberts D. L., Merrison W., MacFarlane M. y Cohen G. M. (2001) The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol* 153:221-227.
53. Sambrook J. y Russell D. W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. 3ª Edición. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
54. Schug J. y Overton G. C. (1997) TESS: Transcription Element Search Software on the WWW. Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0: University of Pennsylvania.
55. Sekimura A., Konishi A., Mizuno K., Kobayashi Y., Sasaki H., Yano M. Fukai I. y Fujii Y. (2004) Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep* 11:797-802.
56. Shi Y. (2001) A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* 8:394-401.
57. Soengas M. S., Alarcon R. M., Yoshida H., Giaccia A. J., Hakem R., Mak T. W. y Lowe S. W. (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284:156-159.
58. Song Z., Yao X. y Wu M. (2003) Direct interaction between survivin and Smac is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during Taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278:23130-23140.
59. Srinivasula S. M., Datta P., Fan X. J., Fernandes-Alnemri T., Huang Z. y Alnemri E. S. (2000) Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275:36152-36157.
60. Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J. y Vaux D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.

61. Walton K. M., Rehfuss R. P., Chrivia J. C., Lochner J. E. y Goodman R. H. (1992) A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol* 6:647-655.
62. Wang H. M., Zheng N. G., Wu J. L., Gong C. C. y Wang Y. L. (2005) Dual effects of 8-Br-cAMP on differentiation and apoptosis of human esophageal cancer cell line Eca-109. *World J Gastroenterol* 11(41):6538-6542.
63. Xie W., Jiang P., Miao L., Zhao Y., Zhimin Z., Qing L., Zhu W y Wu M. (2006) Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Research* 34(7):2046-2055.
64. Yan L., Herrmann V., Hofer J. K. e Insel P. A. (2000)  $\beta$ -adrenergic receptor/cAMP-mediated signaling and apoptosis of S49 lymphoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1665-C1674.
65. Yan Y., Mahotka C., Heikaus S., Shibata T., Wethkamp N., Liebmann J., Suschek C. V., Guo Y., Gabbert H. E. Gerharz C. D. y Ramp U. (2004) Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 91:1349-1357.
66. Yoo N. J., Kim H. S., Kim S. Y., Park W. S., Park C. H., Jeon H. M., Jung E. S., Lee J. Y. y Lee S. H. (2003) Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS* 111:382-388.
67. Yoshikawa H., Nakajima Y. y Tasaka K. (2001) IFN- $\gamma$  induces apoptosis of WEHI 279 and normal pre-B cell lines by expressing direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pI. *J Immunol* 167:2487-2495.



68. Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M. y Horvitz H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *Ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641–652.
69. Yuan J. y Yankner B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802–809.
70. Zhang L. e Insel P. A. (2004) The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/Protein Kinase A- and glucocorticoid-promoted apoptosis of lymphoid cells. *J Biol Chem* 279(20):20858-20865.
71. Zhao J., Jin J., Zhang X., Shi M., Dai J., Wu M., Wang R. y Guo Y. (2006) Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo. *Cancer Gene Ther* 13(4):420-427.
72. Zheng L. D., Tong Q. S., Wang L., Liu J. y Qian W. (2005) Stable transfection of extrinsic Smac gene enhances apoptosis-inducing effects of chemotherapeutic drugs on gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 11:79-83.

# Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation

Moises Martinez-Velazquez, Jorge Melendez-Zajgla<sup>\*</sup>, Vilma Maldonado<sup>\*</sup>

*Molecular Biology Laboratory, Subdireccion de Investigacion Basica, Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico City, Mexico*

Received 20 May 2006; received in revised form 20 December 2006; accepted 8 January 2007

Available online 21 January 2007

## Abstract

Smac/DIABLO is a mitochondrial protein that participates in apoptotic cell death by means of sequestering several members of the inhibitor of apoptosis protein family. This action allows caspase activation, cleavage of key cellular substrates and death. Release from mitochondria is considered the main regulatory step of Smac/DIABLO activity. Nevertheless, the fact that at least one isoform, Smac-beta, does not reside in this organelle implies that transcriptional regulation could also be important. cAMP is a well known second messenger with important apoptotic effects. To analyze if cAMP could be involved in Smac/DIABLO gene regulation, we analyzed 2903 base pairs upstream of the coding sequence and characterized the minimal promoter, which contains a consensus CRE site. We found that cAMP/PKA/CREB pathway is indeed an important regulator of Smac/DIABLO transcription, since exposure to the cAMP analog 8-CPT-cAMP, the adenylyl cyclase activator forskolin, the inhibitor of phosphodiesterase isobutylmethylxanthine or by hindering PKA activation with H89, regulated the promoter activity, as shown by gene reporter and RT-PCR assays. Additionally, the results of site-directed mutagenesis revealed that the consensus CRE site was biologically functional and required for cAMP-induced promoter activity in human HeLa cells. Supporting these results, a negative dominant version of the protein kinase A responsive factor, KCREB, reduced basal Smac/DIABLO expression and rendered the promoter unresponsive to cAMP. Reducing Smac expression using an antisense approach blocked the apoptosis effects of cAMP in cervical cancer cells. These results show that cAMP is an important modulator of the apoptotic threshold in cancer cell by means of regulating Smac/DIABLO expression.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Apoptosis; PKA; cAMP; CREB; Promoter

## 1. Introduction

Smac (Second mitochondria derived activator of caspase) and its murine ortholog DIABLO (*Direct IAP binding with Low pI*) are mitochondrial proteins encoded by nuclear DNA which are released into the cytosol in response to apoptotic stimuli that disrupt the integrity of the mitochondria. Smac/DIABLO participates in the two main apoptotic pathways, the intrinsic or mitochondrial pathway [1,2] and the extrinsic or death receptor pathway [3,4]. After apoptotic stimuli, released Smac acts as a dimer in the cytosol, activating caspases by means of sequestering and neutralizing members of the inhibitor

of apoptosis proteins family (IAPs) [5,6]. Although the exact mechanism that regulates Smac mitochondrial release is unknown, there is evidence that some cellular transduction signal pathways are able to regulate it [7–11]. In addition, as with cytochrome c, Smac release is modulated by members of the Bcl-2 family (Bcl-2, BID and Bcl-w) [12]. Interestingly, mitochondrial release of Smac is blocked by a broad-spectrum caspase inhibitor [13–15], showing the presence of a positive cellular feedback loop.

Aside from the mitochondrial release of Smac/DIABLO, additional regulation mechanisms have been far less studied. Modulation of Smac mRNA and protein has been found in some systems. For example, folic acid and tumor necrosis factor increases Smac/DIABLO mRNA in kidney tubular cells [16]. This increase correlates with apoptosis in vivo. It has also been found that Smac is deregulated in cervical cancer [17], sarcomas [18], lung cancer carcinomas [19] and renal tumors [20]. The reason for the differences in the expression of this molecule in

<sup>\*</sup> Corresponding authors. Molecular Biology Laboratory, División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando # 22, Tlalpan 14000, México, D.F. Mexico. Tel.: +52 55 56280439; fax: +52 55 56280432.

*E-mail addresses:* [jorgezajgla@gmail.com](mailto:jorgezajgla@gmail.com) (J. Melendez-Zajgla), [vilmaml@gmail.com](mailto:vilmaml@gmail.com) (V. Maldonado).

# SMAC/DIABLO Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS\*

MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ<sup>1</sup>, JULIO MORÁN ANDRADE<sup>2</sup>,  
VILMA MALDONADO LAGUNAS<sup>1</sup> Y JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA<sup>1</sup>

## RESUMEN

La apoptosis juega un papel central en el desarrollo y homeostasis de todos los organismos multicelulares. Este proceso es iniciado tanto por la vía extrínseca como por la vía intrínseca. Estas vías inducen finalmente actividades proteolítica y/o nucleolítica asociadas a la muerte celular. Durante la apoptosis la actividad proteolítica es efectuada por miembros de la familia de las caspasas, las cuales cortan múltiples sustratos celulares. Esta actividad está sujeta a la inhibición por los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis. La inhibición de la actividad de las caspasas mediada por las proteínas inhibidoras de apoptosis es removida por la proteína proapoptótica Smac/Diablo. Hasta el momento se han descrito cuatro isoformas de Smac/Diablo, generadas por el procesamiento alternativo del ARN mensajero; dos citosólicas y dos mitocondriales. Estas últimas se liberan de la mitocondria al citosol después de un estímulo apoptótico. Smac/Diablo utiliza su extremo N-terminal para interactuar con las proteínas inhibidoras de apoptosis e inhibir su función. El objetivo de este artículo es presentar la información más relevante con respecto a los mecanismos de regulación conocidos para Smac/Diablo, así como sus implicaciones terapéuticas al actuar como sensibilizador de apoptosis.

**PALABRAS CLAVE:** Smac/Diablo, caspasas, proteínas inhibidoras de apoptosis, apoptosis.

## ABSTRACT

Apoptosis plays a central role in the development and homeostasis of all multicellular organisms. Apoptotic cell death is triggered by extrinsic, receptor-mediated, or intrinsic, mitochondria-mediated, signaling pathways that induce death-associated proteolytic and/or nucleolytic activities. The mechanism of apoptosis is executed by a family of cysteine proteases that cleave after an Asp residue in their substrates, hence the name caspase. Caspases are synthesized as latent proenzymes; once activated they cleave a wide range of molecules that eventually result in the dismantlement of cells. Active caspases can be specifically inhibited by the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). IAP proteins are counteracted by Smac/Diablo. Four Smac/Diablo isoforms generated by alternative splicing have been described so far. Upon receiving proapoptotic signals, Smac/Diablo is released from mitochondria into the cytosol where it interacts with IAPs and abrogates their caspase-inhibitory activity. Smac/Diablo interacts with IAPs *via* its N-terminal IAP-binding motif. This motif is indispensable and sufficient for counteracting IAP's inhibition of caspases. The aim of this paper is to review the most outstanding knowledge regarding to several known regulatory aspects for Smac/Diablo, as well as its potential therapeutic implications by acting as apoptotic sensitizer.

**KEY WORDS:** Smac/Diablo, caspases, IAPs, apoptosis.

## INTRODUCCIÓN

La apoptosis juega un papel central en el desarrollo y homeostasis de todos los organismos multicelulares (1). Se presenta en procesos tan diversos como la embriogénesis, el recambio normal en tejidos adultos y en la atrofia de órganos. Este proceso es también fundamental para la regulación y operación de

procesos fisiopatológicos como la respuesta inmune, la inflamación y la eliminación de células que presentan alteraciones genéticas. En los humanos, la apoptosis excesiva o insuficiente puede tener severas consecuencias patológicas. La supresión de la maquinaria apoptótica causa enfermedades autoinmunes y es un sello caracte-

rístico en el cáncer (2). Por otra parte, la apoptosis en exceso contribuye al desarrollo de enfermedades neurológicas y al SIDA (3).

La capacidad de una célula para experimentar apoptosis en respuesta a una señal de muerte, está relacionada con su estado proliferativo, posición dentro del ciclo

\* Recibido: 13 abril 2004    Aceptado: 28 mayo 2004

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando 22, Tlalpan, 14080, D.F., México. Tel. (+52)(55) 56280439. Fax: (52)(55) 56280432. Correo E: moyocoyo\_98@yahoo.com, vilmaml@yahoo.com, jorgezajgla@hotmail.com. <sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F. Tel. (52-55) 56225616. Fax: (52-55) 56162282 Correo E: jmoran@ifisiol.unam.mx.