



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

ESTUDIO FARMACOMOLECULAR DE
LIGANDOS SELECTIVOS PARA LOS SUBTIPOS
ALFA Y BETA DEL RECEPTOR DE
ESTRÓGENOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ROCÍO ANGELES GARCÍA BECERRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO LARREA GALLO

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2008

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección y tutoría del Dr. Fernando Larrea Gallo, con el apoyo financiero del CONACyT (Proyecto No. 24475 y Beca No. 130058), así como al Programa CONRAD, Virginia, EU.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la institución que me ha dado la formación en mi carrera profesional.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad para mi formación profesional y el logro de mis metas.

Al comité tutorial Drs. Jesús Adolfo García Sainz, Armando Roberto Tovar Palacio y Fernando Larrea Gallo y miembros del jurado Drs. Horacio Merchant Larios, Alejandro Manuel García Carrancá, Enrique Antonio Pedernera Astegiano y Edgar Arturo Zenteno Galindo por sus valiosas aportaciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Larrea Jefe de Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su todo apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

A los Drs. Austin Cooney, Michael Mancini y Valeria Vermo del Departamento de Biología Celular del Colegio de Medicina de Baylor de Houston Texas por las facilidades prestadas para la realización de esta tesis.

A los Drs Ana Elena Lemus Bravo, Gregorio Pérez Palacios y Gustavo García de la Mora por sus aportaciones en esta área de investigación.

A mi alumno David Ordaz por su trabajo y apoyo.

Andrés Saralegui por la ayuda y asesoría en el uso del microscopio confocal.

A mis compañeros de laboratorio por compartir una vida de esfuerzo y trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres Angel y Guadalupe, por haberme ayudado a salir adelante, por su amor, ejemplo y valores que han sido la guía en mi camino.

A mi esposo Gustavo por su amor y consideraciones que iluminan y fortalecen mi vida.

A mis queridas hermanas Raquel y Lupita por que siempre he tenido su confianza y cariño en todo momento.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	7
1. Estructura y dominios funcionales de los subtipos α y β del RE	7
2. Moduladores selectivos del RE	9
3. Ligandos selectivos para los subtipos del RE	11
4. Mecanismo de acción hormonal	13
4.1. Efectos en la estructura del receptor inducidos por el ligando	15
4.2. Activación transcripcional	18
4.3. Inhibición transcripcional	20
ANTECEDENTES	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
1. Ligandos	26
2. Cambios conformacionales	26
2.1. Transcripción, traducción <i>in vitro</i> y proteólisis limitada	26
2.2. FRET	29
2.2.1. Construcción de vectores para proteínas de fusión	31
2.2.2. Evaluación de los productos de expresión	34
2.2.3. Inmunoelectrotransferencia	34
2.2.4. Estudios de unión al receptor	36

2.2.5. Transfecciones y análisis del gen reportero	36
2.2.6. Análisis por FRET	38
3. Reclutamiento de coactivadores	40
4. Activación de la transcripción	43
5. Modificaciones estructurales de la cromatina y colocación nuclear de coactivadores y de la RNA polimerasa II	44
6. Análisis estadístico	48
RESULTADOS	50
1. Cambios conformacionales de los receptores nucleares inducidos por ligandos naturales y sintéticos	50
1.1. Proteólisis limitada del receptor	50
1.2. Asociación espacial entre las regiones amino y carboxilo terminal del receptor como modificación estructural inducida por ligandos agonistas	55
2. Evaluación del reclutamiento de coactivadores al REα inducido por ligandos naturales y sintéticos	72
3. Evaluación de la actividad transcripcional de los derivados tetrahidroreducidos de la 19 nortestosterona vía los subtipos del receptor de estrógenos	77
4. Cambios en los procesos de remodelamiento de la cromatina nuclear inducidos por ligandos agonistas y antagonistas	81
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	102
REFERENCIAS	104
ANEXOS	116

RESUMEN

Un número importante de procesos biológicos como el reproductivo, así como los relacionados con la diferenciación y el desarrollo, incluyendo aquellos involucrados en la tumorigénesis son genéticamente regulados y en cuyos mecanismos participan factores de transcripción conocidos como receptores nucleares. Estos factores son activados, en la mayoría de los casos, por ligandos específicos u hormonas los que al acoplarse a otras moléculas o sistemas de señalización modifican la tasa de transcripción de genes responsivos. La descripción de subtipos o en algunos casos de variantes moleculares de estas moléculas receptoras ofrece la oportunidad para el desarrollo de fármacos o ligandos con actividades selectivas y por lo tanto efectos biológicos y/o terapéuticos específicos. En este estudio se describe la caracterización farmacomolecular de ligandos selectivos para el receptor de estrógenos α ($RE\alpha$) con relación a sus efectos sobre la activación conformacional del receptor, a través de su susceptibilidad a la acción de proteasas o de los cambios conformacionales analizados por las propiedades cuánticas de transferencia de energía entre dos proteínas fluorescentes (FRET). La expresión biológica de la activación conformacional del receptor se estudió por el reclutamiento de proteínas correguladoras, así como por el análisis de su actividad transcripcional utilizando sistemas mixtos de dos híbridos o de cotransfección del receptor con genes reporteros, respectivamente. Por último, se estudiaron los efectos moleculares inducidos por los ligandos selectivos a través del análisis de los cambios

dinámicos en la estructura de la cromatina nuclear en células vivas, en tiempo real, utilizando un modelo que se basa en arreglos del promotor de prolactina de mamíferos, así como la interacción con proteínas correguladoras a través de los estudios de colocalización de coactivadores y de la RNA polimerasa II. Los resultados obtenidos demostraron la naturaleza estrogénica intrínseca de los ligandos sintéticos estudiados y nos permitieron identificar su selectividad con subtipos del receptor de estrógenos, así como establecer sus propiedades moleculares de interacción y sus efectos biológicos resultantes. Se considera que los estudios aquí descritos contribuirán a ampliar el conocimiento sobre los efectos biológicos de los estrógenos y conducir al diseño de fármacos con beneficios específicos y selectivos para la salud y prevenir los efectos secundarios indeseables como resultado del uso de los mismos.

ABSTRACT

A significant number of biological processes such as, reproductive function, differentiation and development, including those involved in tumorigenesis are genetically regulated by transcription factors known as nuclear receptors. These factors are activated by specific ligands or hormones which bind to other molecules or signaling systems to modify the rate of transcription of responsive genes. The description of subtypes or in some cases molecular variants of these receptors offers an opportunity to identify or develop compounds with selective activities and therefore specific biological and/or therapeutic effects. This study describes the assessment and characterization by molecular pharmacology of estrogen receptor (ER) α -selective ligands. The active conformation of the receptor was assessed by a protease sensitivity assay and by the analysis of hormone-induced conformational changes evaluated by a fluorescence resonance energy transfer (FRET) approach. In addition, the recruitment of co-regulatory proteins and transcriptional activity, as a biological expression of receptor conformational changes, were studied using a mammalian two-hybrid system or a cell line co-transfected with expression vectors for ER α and ER β and an estrogen-responsive reporter gene. Finally, alterations in chromatin structure as a result of receptor interactions with DNA was studied in live cells using a mammalian promoter array stably transfected into the genome of HeLa cells. In addition, recruitment of coactivators and RNA polymerase II at the array level was also studied. The results showed the utility of this system for the evaluation of the intrinsic estrogenic

properties of natural and synthetic ligands, including the identification of compounds with selective interactions with estrogen receptor subtypes. In addition this novel assay allowed us to evaluate, in individual cells at real time, hormone actions from ligand-dependent receptor activation to ligand-induced receptor interactions with chromatin. It is believed that the studies described herein may contribute to understanding the biological effects of estrogens, providing additional structural basis for the development of potential new formulations with specific health prevention benefits.

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos tienen un papel primordial durante diferentes procesos fisiológicos como el desarrollo, la reproducción, el crecimiento y el mantenimiento del esqueleto. Además, hay evidencias de la contribución de los estrógenos en la función del sistema cardiovascular y del sistema nervioso central (1). Jensen y Jacobsen fueron los primeros en describir que los efectos biológicos de los estrógenos son mediados por una proteína de unión (2), y en 1986 varios grupos informaron la clonación del receptor de estrógenos (RE) (3, 4). Por décadas se pensó en la existencia de una sola forma o especie del receptor nuclear para estrógenos; sin embargo, desde 1996 varios laboratorios informaron la presencia de un segundo tipo de receptor estrogénico tanto en el humano como en diversas especies de mamíferos (5-8). Este nuevo receptor se denominó como receptor de estrógenos β (RE β) con la finalidad de diferenciarlo del clásico RE conocido como RE α . Estos dos receptores son proteínas no relacionadas codificadas por genes separados en diferentes cromosomas y para cada uno de ellos se han descrito diferentes isoformas (9-14).

1. Estructura y dominios funcionales de los subtipos α y β del RE

El RE pertenece a la superfamilia de factores de transcripción que incluye, además de los receptores para hormonas esteroideas, aquellos para las hormonas tiroideas, el ácido retinoico y la 1,25 dihidroxivitamina D, además de un número de proteínas

con estructura homóloga cuyo ligando es desconocido y que reciben el nombre de receptores huérfanos (15). Gracias al advenimiento de la biología molecular se conocen la mayoría de los genes que codifican a los receptores para las diferentes hormonas esteroideas y se ha podido obtener mayor información sobre las propiedades estructurales y funcionales que los caracterizan.

En términos generales, el RE se compone de cuatro dominios principales que corresponden a la región amino terminal, el dominio de unión al DNA, la región de localización nuclear o región de bisagra, y el dominio de unión al ligando (Fig. 1). En el dominio amino terminal se encuentra la función de activación 1 (AF1), cuya acción es independiente del ligando y está involucrada en la transcripción de genes blancos e interacción con proteínas coactivadoras (16). El dominio de unión al DNA tiene una estructura que contiene dos dedos de zinc, cada uno coordinado por 4 moléculas de cisteína. Este dominio juega un papel importante en la dimerización y la unión del receptor a secuencias específicas del DNA (17-19). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio de unión al ligando, además de otras funciones como la dimerización y localización nuclear del receptor, la transactivación de genes blanco e interacción con las proteínas correguladoras (15). Además, contiene la función de activación 2 (AF2), una región cuya función es dependiente del ligando (20).

La homología entre los subtipos α y β del RE es mayor en los dominios de unión al DNA y al ligando (97% y 56 % , respectivamente) y menor en las región del amino terminal (24%) (15).

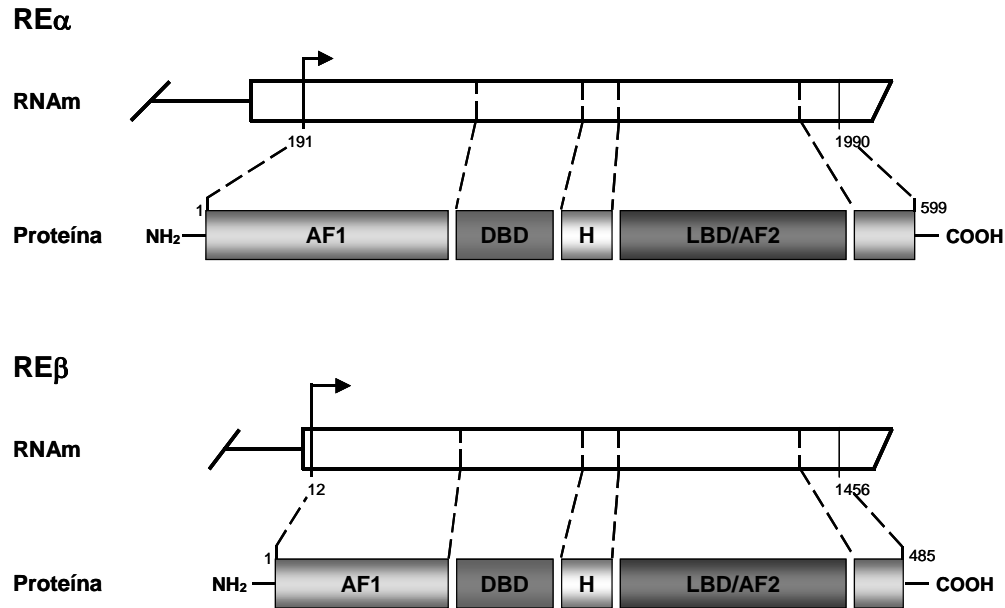


Figura 1. Esquema de los RNAs mensajeros (mRNAs) y de las proteínas que codifican para el RE α y RE β . Se muestran los dominios estructurales de estos receptores, así como los dominios de unión a la hormona (LBD), unión al DNA (DBD) y funciones de transactivación (AF1, AF2) (21).

2. Moduladores selectivos del RE

Además de los estrógenos naturales, otros compuestos como los fitoestrógenos interaccionan con ambos subtipos del RE (22, 23). Como ejemplos, el estrógeno natural 17β estradiol (E_2) y el sintético dietilestilbestrol que interaccionan con ambos receptores con alta afinidad.

En los estudios clásicos *in vitro* utilizando preparaciones subcelulares en incubaciones en presencia de ligandos radiactivos, la determinación de las constantes fisicoquímicas de afinidad, permitieron establecer la unión de los ligandos con su receptor. Sin embargo, estos estudios no discriminan entre las propiedades agonistas o antagonistas, ni la naturaleza tejido específico de la

actividad estrogénica o antiestrogénica de los ligandos en estudio. Un ejemplo de ello es el tamoxifeno, un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento y la prevención del cáncer de mama, con afinidades similares por ambos subtipos del RE, cuya moderada afinidad por el sitio activo del receptor le confiere actividad antagonista (antiestrogénica) en ciertos tejidos como la mama o actividad estrogénica (agonista) en otros como el endometrio, hueso y el sistema vascular (24-26). Este tipo de compuestos, que muestran una farmacología tejido selectiva inusual, son conocidos genéricamente como moduladores selectivos del RE (SERM).

Al igual que el tamoxifeno, el raloxifeno, tiene actividad antiestrogénica en mama y actividad estrogénica en el esqueleto. Sin embargo, el raloxifeno carece de la actividad uterotrópica significativa que es asociada al tamoxifeno, lo que representa un SERM con mejor perfil agonista/antagonista (27-29). Sin embargo, en el cerebro ambos compuestos muestran actividad antiestrogénica, ya que incrementa los síntomas vasomotores en la menopausia, efectos que son atribuidos a la deficiencia de estrógenos. Debido a que ni el tamoxifeno ni el raloxifeno poseen actividad estrogénica importante en el sistema nervioso central, hay evidentemente gran interés en el estudio de otros SERMs. Otros compuestos como el lasofoxifeno, el arzoxifeno y el bazedoxifeno, se encuentran en estudio como posibles candidatos para utilizarse clínicamente en la quimioprevención del cáncer de mama o en el tratamiento y la prevención de la osteoporosis (30-32).

El reconocimiento de los SERMs como compuestos que promueven efectos específicos en ciertos tejidos permitirá ampliar la población potencial que podría

beneficiarse de las terapias de los ligandos del RE. Para el estudio y el desarrollo de los SERMs se requiere del desarrollo de metodologías que permitan discriminar las diferentes actividades biológicas de los compuestos tanto de origen natural como sintético.

3. Ligandos selectivos para los subtipos del RE

Como se describió anteriormente, la mayoría de los compuestos analizados tienen afinidades similares por ambos subtipos del RE (22). Sin embargo, debido a las diferencias en la homología estructural entre el RE α y el RE β , o por las propiedades fisicoquímicas de los ligandos, es razonable que a diferencia de los SERM, algunos ligandos muestren diferencias en la afinidad por los subtipos del receptor.

En el desarrollo de compuestos que discriminen entre los subtipos del RE, se han identificado un número importante de ligando selectivos (Tabla 1). Dentro de estos, compuestos como el pirazol (33, 34) o el tetrahidrocriseno (THC) (35) tienen actividades agonistas selectivas a través del RE α y en la síntesis de sus análogos se han identificado ligandos con actividades tanto agonistas como antagonistas selectivas para los subtipos del RE (36-39). Investigaciones al respecto demostraron que el carácter agonista o antagonista selectivo de los ligandos dependió del tamaño y la disposición geométrica de los grupos funcionales que se adicionan a la molécula original (35). Además, los ligandos antagonistas selectivos tienen estructuras moleculares muy diferentes de los antiestrógenos típicos (tamoxifeno, raloxifeno, ICI 182780).

Tabla 1. Compuestos esteroidales y no esteroidales selectivos para los subtipos del receptor de estrógenos.

Compuesto	Actividad selectiva	Receptor
Pirazol (miembro de la familia diazol) (34)	agonista	RE α
PPT, propil-pirazol-triol (33, 36)	agonista	RE α
FPPT, fluoropropil-pirazol-triol (37)	agonista	RE α
BSC-pirazol, cadena básica lateral (39)	antagonista	RE α
MPP, metil-piperidino-pirazol (36)	antagonista	RE α
DPN, diarilpropionitrilo (36)	agonista	RE β
Pirazolopirimidina (38)	antagonista	RE β
R,R-THC, R,R-tetrahidrocriseno (cromóforo estilbeno) (33, 36)	agonista antagonista	RE α RE β
THC, rac-2b (35)	agonista antagonista	RE α RE β
SKF-82958 (agonista del receptor de dopamina D1) (40)	agonista	RE α
Benzoxatinas (41)	agonista	RE α
Fitoestrógenos: genisteína, daidzeína y S-equol (42, 43)	agonistas	RE β
Benzofurano (44)	agonista	RE α
Benzopiranos (45)	agonista	RE β
6H-Cromeno[4,3-b]quinolinas (46)	agonista	RE β
2-Fenil-isoindol-1.3 diones (47)	agonista	RE β
4'-Hidroxifenil-aril-carbaldehído (48)	agonista	RE β
Derivados de progestinas sintéticas 19 nortestosterona (49, 50) 3 β ,5 α -NET, 3 β ,5 α -LNG 3 β ,5 α -GSD	agonistas	RE α

En nuestro laboratorio se han identificado compuestos sintéticos derivados de la 19 nortestosterona cuya reducción en el anillo A en posiciones $3\beta,5\alpha$ muestran actividad estrogénica de manera selectiva a través del $RE\alpha$ (49, 50).

Consideramos que de la caracterización de estos compuestos, objetivo de la presente tesis, se obtendrá valiosa información para el desarrollo de nuevos fármacos con acciones selectivas que permitirán establecer la relevancia biológica de los subtipos del RE.

4. Mecanismo de acción hormonal

Los estrógenos, transportados vía la circulación sanguínea tanto en su forma libre como unidos a la fracción de albúmina y globulinas, ingresan a las células por un mecanismo de difusión pasiva, dada su naturaleza lipofílica en donde interaccionan con elementos de naturaleza proteínica en el interior de la célula, denominados receptores de estrógenos (RE) (Fig. 2) (1). En términos generales, el mecanismo de acción del RE es similar al de otros miembros de la familia de los receptores esteroidales. En ausencia del ligando, el receptor es transcripcionalmente inactivo y se encuentra en el núcleo de células blanco, unido a un complejo de proteínas de choque térmico (17, 51), en donde la unión con su ligando resulta en su activación, lo que con lleva a cambios conformacionales en la estructura de este (52-54), y la disociación del complejo de proteínas de choque térmico. Posteriormente, el receptor activado se dimeriza e interacciona con elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados dentro de la región reguladora del DNA en los genes blanco (17). En el DNA, el receptor activado

interacciona con diversas proteínas correguladoras que llevan a cabo el reclutamiento organizado de componentes de la maquinaria transcripcional y factores intermediarios que modifican la estructura de la cromatina, por modificaciones en las histonas y remodelaje de los nucleosomas, dando como resultado el incremento o la disminución de la expresión génica (55-60).

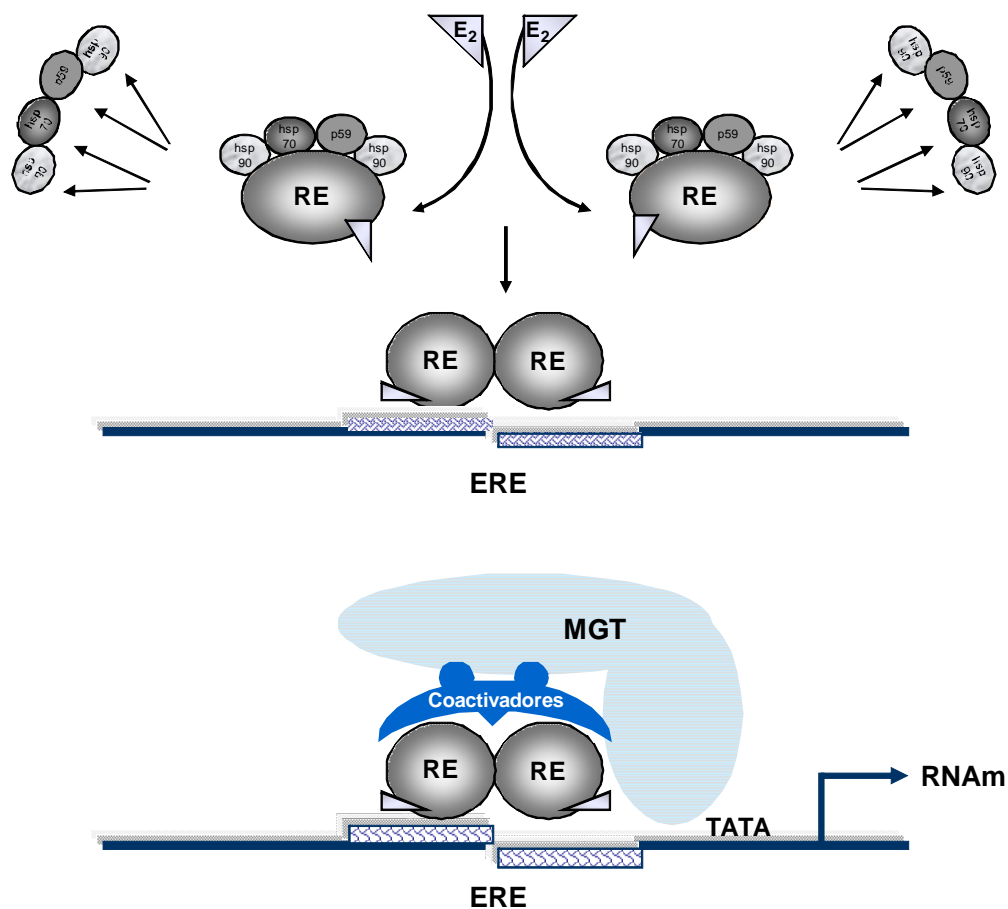


Figura 2. Mecanismo de acción del receptor de estrógenos. La unión del ligando (E_2) al receptor (RE), modifica la tasa de transcripción génica a través de interaccionar con elementos de respuesta hormonal en el DNA (ERE) e iniciar los eventos que conducen a la transcripción de genes susceptibles a estrógenos (61).

4.1. Efectos en la estructura del receptor inducidos por el ligando

La activación transcripcional de los receptores de esteroides requiere de cambios conformacionales. A este respecto se han utilizado diferentes estrategias para el estudio de la estructura y conformación de receptores. Entre los más utilizados se encuentran la digestión con enzimas proteolíticas (62-65), cristalografía de rayos X (20, 66, 67) modelos para el estudio del reclutamiento de coactivadores inducidos por el ligando (65, 68), así como estudios de dinámica molecular, incluyendo modificaciones a nivel de la cromatina como elementos esenciales para iniciar los mecanismos de transcripción (69).

Los estudios en la estructura terciaria del receptor demostraron que el dominio de unión al ligando del RE está constituido por doce hélices (H1-H12) que en conjunto conforman un andamio molecular en forma de “cuña”, donde se establece una cavidad para la unión del ligando. El RE es el único que une a una amplia variedad de compuestos no esteroideos. La molécula aromática del anillo A del E₂ es un requisito importante para la interacción con el dominio de unión al ligando, pero el resto de la cavidad de unión del receptor puede aceptar diferentes grupos hidrofóbicos. Esta promiscuidad del receptor puede ser atribuida al tamaño de la cavidad (450 Å) debido a que tiene casi dos veces el volumen molecular del E₂ (245 Å) (66).

En el complejo receptor-E₂, la hélice 12 se posiciona sobre la cavidad de unión y se orienta contra la hélice 3, hélice 5/6 y la hélice 11. A pesar de que no se realizan contactos directos con el E₂, la hélice 12 forma una “tapa” en la cavidad de unión que protege su superficie hidrofóbica interna alrededor de la hormona (66). Se ha

demostrado que esta posición es un prerrequisito para la activación transcripcional, al generar un AF2 adecuado para interactuar con los coactivadores (70). En el caso de los ligandos antagonistas como el tamoxifeno, el raloxifeno y el ICI 164,384 se unen en el mismo sitio que el E₂, dentro del dominio de unión al ligando. Sin embargo, la cadena lateral de los antagonistas es muy larga y no es contenida dentro de los confines de la cavidad, evitando la alineación de la hélice 12 desplazándola del sitio activo. El desplazamiento de la hélice es una característica general de los antiestrógenos esteroideos y no esteroideos que poseen una cadena lateral voluminosa (66, 71). Además se ha demostrado que el residuo de lisina (Lys362) es necesario para el reclutamiento de ciertos coactivadores dependientes del E₂ (72). Este residuo está localizado en la porción terminal de la hélice 12. El movimiento de la hélice 12 por el antiestrógeno interrumpe la topografía global de la AF2, obstruyendo los sitios de reclutamiento de los coactivadores localizados en la superficie del dominio de unión al ligando lo que impide, muy probablemente, la interacción productiva con los coactivadores (66).

Diferentes estudios han propuesto que miembros del complejo CBP/p300 interactúan con las regiones tanto del amino como del carboxilo terminal de los receptores, permitiendo establecer contacto físico entre proteína y proteína favoreciendo el sinergismo transcripcional entre ambas funciones activadoras (AF1-AF2) (Fig. 3). Estos estudios permitieron establecer los mecanismos que dependiendo del ligando se suceden a nivel del receptor y que se traducen en la capacidad del complejo hormona-receptor de activar la transcripción génica. Como

parte importante, dentro de estos mecanismos, se encuentran los cambios conformacionales del receptor que le confieren su capacidad de interactuar con proteínas coactivadoras y de esta manera establecer las relaciones físicas entre diferentes regiones del receptor necesarias para su adecuada función como transactivador de la transcripción génica (73).

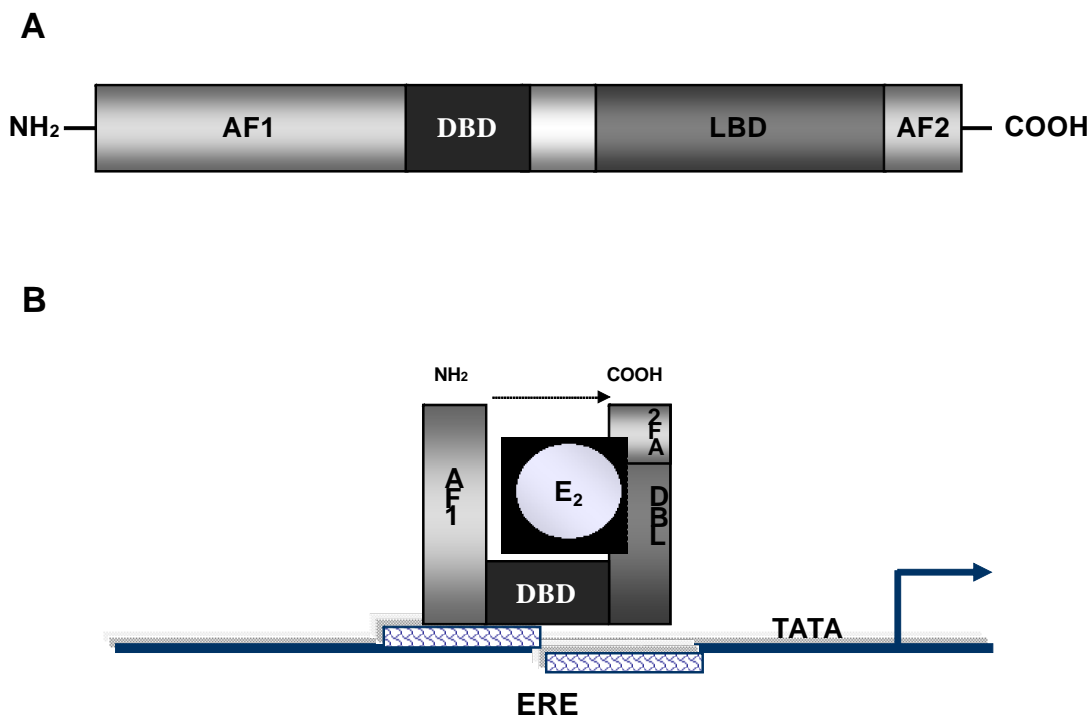


Figura 3. A) Dominios funcionales de los receptores nucleares. B) Asociación espacial entre las funciones activadoras AF1 y AF2 del RE inducida por estradiol (E₂) (74).

Dado que los cambios conformacionales son dependientes del ligando, la caracterización de los mismos representa una herramienta de potencial importancia para el establecimiento de las propiedades agonistas o antagonistas

de ligandos naturales y sintéticos, así como para el diseño y síntesis de nuevas drogas o fármacos con propiedades biológicas específicas (54, 66).

4.2. Activación transcripcional

El RE aún en su forma inactiva puede interactuar con proteínas correguladoras (correpresoras o coactivadoras). Esta facultad depende de la señal intracelular la que puede influir en el grado de interacción y por lo tanto en la magnitud relativa de la actividad basal del receptor. De esta manera, el reclutamiento de complejos correpresores o coactivadores establecerá la actividad transcripcional del complejo hormona-receptor (Fig. 4) (75). En presencia del ligando, el receptor experimenta cambios estructurales. Estos cambios le confieren al receptor la capacidad de interactuar con proteínas correguladoras (76). Para el caso de los complejos coactivadores, los cuales modifican las proteínas histonas y condicionan los cambios para el remodelamiento de la cromatina, representan las funciones necesarias para la activación transcripcional (57, 59, 60). Este proceso establece los mecanismos de asociación y disociación de proteínas a través de tres diferentes, pero vinculados, ciclos transcripcionales: un ciclo inicial no productivo y dos ciclos productivos alternos (55). De los cofactores implicados en este proceso se conocen los siguientes: complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (SWI/SNF), proteínas con actividad acetiltransferasa (CBP/p300, pCAF y SRC/p160s) (77), metiltransferasas (CARM1 y PRMT-1) (78, 79) y mediadores de la transcripción (TRAP/DRIP) (80); los cuales de forma secuencial y cíclica interactúan con la RNA polimerasa para el inicio y

mantenimiento de la transcripción. La regulación de los ciclos productivos (expresión génica y síntesis de RNAm) se lleva a cabo a través de la digestión por proteosomas del complejo receptor-coactivador (75, 81).

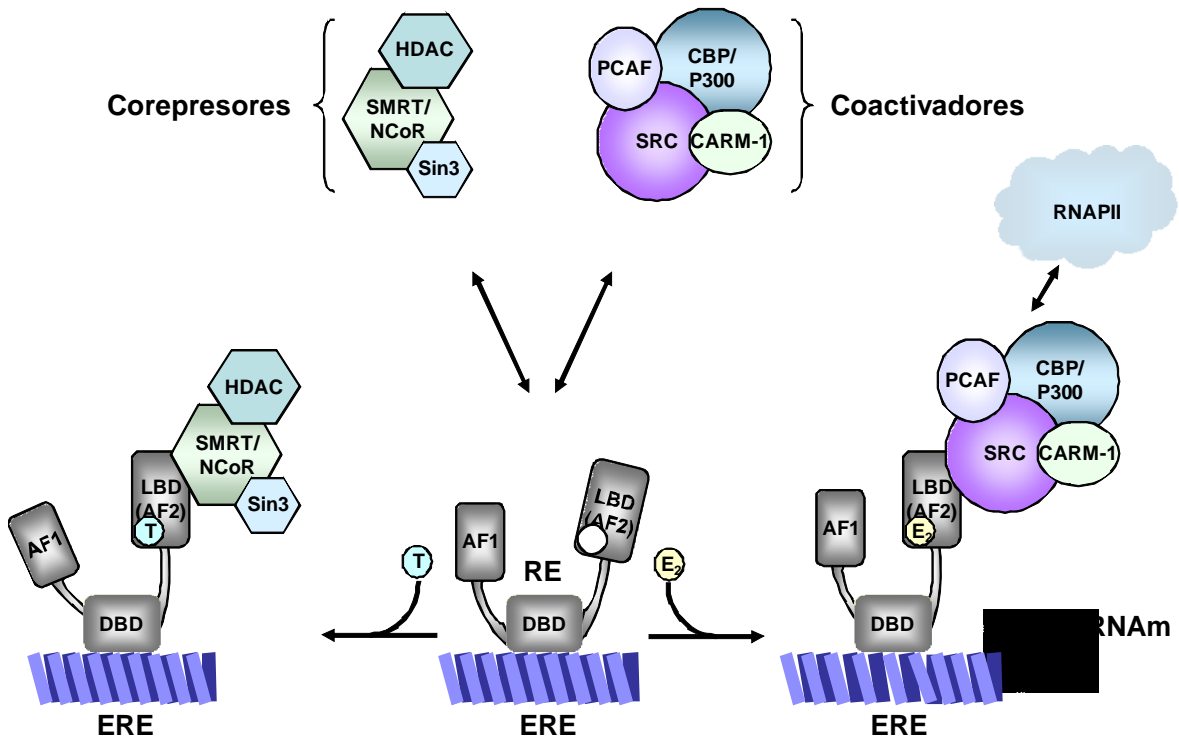


Figura 4. Modelo de interacción de proteínas correguladoras a nivel del promotor de genes estrógeno dependientes (ERE). La figura representa un esquema del intercambio de correguladores implicados en la activación del gen por el RE α . En términos generales, en presencia de un antiestrógeno, como el tamoxifeno (T), el receptor interacciona con un complejo de proteínas correguladoras, que mantienen el gen en un estado inactivo. En el estado no ligado, el RE α puede unir a un complejo corregulador o coactivador. Cuando el Estradiol (E₂) activa al receptor, una serie de complejos coactivadores unen e intercambian en una secuencia programada y cíclica que sucesivamente interaccionan con la RNA polimerasa (RNAPII) para llevar a cabo funciones necesarias para la activación de la transcripción génica (75).

Dentro de los dominios críticos para la función de las proteínas coactivadores se encuentra la denominada caja NR o LCD/LXD. Este dominio es el responsable de interaccionar con la porción carboxilo terminal del receptor nuclear y está constituido (82) por tres motivos conservados LXXLL (L=leucina y XX= cualquier aa) (83, 84) que corresponden a los sitios de ensamble entre el dominio AF2 del receptor y los diferentes cofactores. Al respecto, la proteína coactivadora SRC-1 fue la primera molécula identificada como una proteína que interacciona con la AF2 dependiendo de la naturaleza agonista/antagonista del ligando (85-93).

4.3. Inhibición transcripcional

La unión de un antagonista como el tamoxifeno al RE (94-98) resulta en el reclutamiento a nivel del promotor de un complejo de proteínas entre las cuales se incluyen deacetilasas de histonas (HDACs), complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y proteínas correpresoras, tales como SMRT y NCoR (99, 100) (Fig. 4). Estos complejos modifican la estructura de la cromatina a través del aumento de las interacciones DNA-nucleosomas lo que resulta en la compactación de la cromatina y la generación de un ambiente que inhibe o dificulta el reclutamiento de factores de transcripción y por lo tanto la expresión génica. Los correpresores se unen al receptor activado vía la caja CoRNR, que consiste de un motivo LXXXI/HiXXXI/L (101-104).

ANTECEDENTES

Nuestro laboratorio ha estudiado de manera exhaustiva los mecanismos responsables de los efectos multihormonales de compuestos sintéticos derivados de la 19 nortestosterona (Fig. 5). Estos compuestos ampliamente utilizados en la anticoncepción hormonal tienen, además del efecto progestacional que los caracteriza, efectos de naturaleza estrogénica y androgénica (49, 50, 64). Tal es el caso del efecto en la mujer posmenopáusica de la noretisterona (NET), el levonorgestrel (LNG) y el gestodeno (GSD) de inhibir, a diferencia de la progesterona natural, la secreción elevada de ambas gonadotropinas hipofisarias (105). Varios estudios utilizando al roedor como modelo experimental permitieron establecer que la administración *in vivo* de la noretisterona a ratas hembras ovariectomizadas ocasionó la acumulación del receptor nuclear del estradiol en útero y en la glándula hipofisaria (106). Este efecto fue inhibido de manera significativa con la administración conjunta de tamoxifeno, sugiriendo la participación del receptor de estrógenos en el mecanismo de acción antigonadotrópico de esta progestina. Un hecho de observación interesante fue la incapacidad de la NET de desplazar, en estudios *in vitro*, al estradiol marcado radiactivamente con tritio del sitio activo del RE, sugiriendo la biotransformación de este compuesto a otros metabolitos con actividad estrogénica como responsables del efecto antigonadotrópico observado en el animal *in vivo* (107). Estudios posteriores sobre el metabolismo de la NET, así como de otros derivados de la 19 nortestosterona, demostraron la capacidad de la glándula hipofisaria de

biotransformar a la NET a compuestos tetraidroreducidos, particularmente al $3\beta,5\alpha$ -tetraidronoretisterona ($3\beta,5\alpha$ -NET) (107, 108). La mayoría de los compuestos tetraidroreducidos de los derivados de la 19 nortestosterona ($3\beta,5\alpha$ -NET, $3\beta,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -GSD) interaccionan con el receptor de estrógenos con afinidades significativamente menores que el estradiol pero suficientes para ocasionar una respuesta biológica (109).

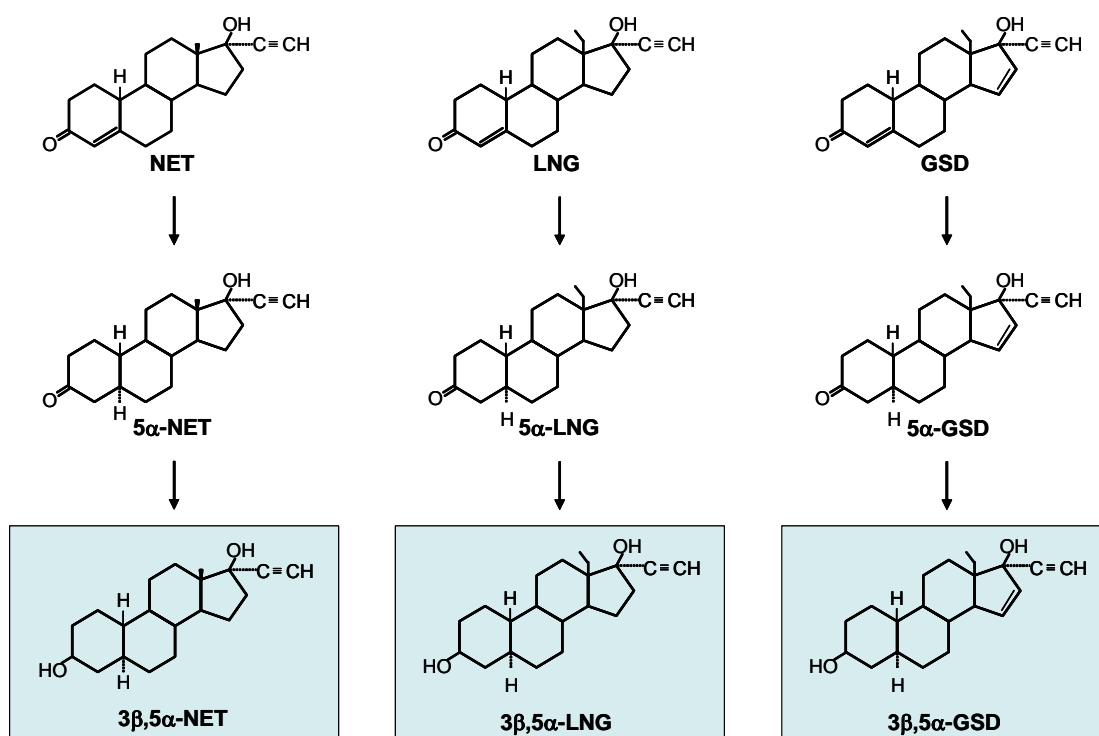


Figura 5. Estructura química de los derivados de la 19 nortestosterona y sus metabolitos 5α - y $3\beta,5\alpha$ -reducidos (49, 50).

En este trabajo se describen los diferentes estudios realizados para la caracterización del mecanismo de acción estrogénico de los metabolitos

tetrahidroreducidos de compuestos derivados de la 19 nortestosterona. Consideramos que los resultados de estas observaciones son importantes en el proceso de construir las bases para el desarrollo de esteroides o fármacos con afinidades selectivas para los subtipos del RE.

HIPÓTESIS

Los derivados de la 19 nortestosterona al ser reducidos en el anillo A de la molécula a compuestos tetrahidroreducidos ($3\beta,5\alpha$ -NET, $3\beta,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -GSD) adquieren la habilidad de interactuar con el RE. En respuesta a esta interacción se inducirán cambios estructurales en el receptor que consistirán en la asociación espacial entre las funciones activadoras (AF1 y AF2), lo que conducirá a la interacción con genes responsivos a estrógenos y al reclutamiento de proteínas coactivadoras que modificarán la estructura de la cromatina (descondensación), lo que permite el acceso a la RNA polimerasa II e incrementar la transcripción génica de manera similar a los que ocurre con ligandos naturales. Los eventos moleculares responsables del mecanismo de acción a nivel genómico de los compuestos tetrahidroreducidos (conformación, reclutamiento de proteínas coactivadoras, descondensación de la cromatina y transcripción) se llevarán a cabo a través de la interacción selectiva o con ambos subtipos del RE.

OBJETIVOS

1. Identificar los cambios conformacionales de naturaleza agonista y/o antagonista de los subtipos del receptor de estrógenos α y β inducidos por ligandos naturales y sintéticos.
2. Evaluar el reclutamiento de proteínas coactivadoras al receptor de estrógenos inducido por diferentes ligandos.
3. Evaluar la capacidad de los ligandos naturales y sintéticos para la activación de la transcripción vía los dos subtipos de receptores estrogénicos.
4. Describir las modificaciones a nivel de la dinámica molecular de la cromatina nuclear, incluyendo el acoplamiento y colocalización de proteínas coactivadoras y de la RNA polimerasa II inducidos por ligandos naturales y sintéticos.

MATERIAL Y METÓDOS

1. Ligandos

El estradiol (E_2), $[2,4,6,7-^3H]E_2$ (Ae.72 Ci/mmol), progesterona (P), 5α -dihidrotestosterona (DHT), flutamida y tripsina (tipo III) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). El antiestrógeno ICI 182,780, así como la mifepristona (RU486) se obtuvieron de Zeneca Pharmaceuticals (Wilmington, DE) y Roussel Uclaf (Romainville, France), respectivamente. La noretisterona (NET) (17α -etinil, 17β -hidroxi, 4-estren, 3-ona), levonorgestrel (LNG) (13β -etil, 17α -etinil, 17β -hidroxi, 4-gonen, 3-ona) y gestodeno (GSD) (13β -etil, 17α -etinil, 17β -hidroxi, 4-15 gonadien, 3-ona) fueron proporcionados por Shering Mexicana, S.A. Los metabolitos $3\beta,5\alpha$ -tetrahidroreducidos de NET, LNG y GSD (Fig. 5) y el análisis de sus constantes físicas y espectroscópicas se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita previamente por nuestro laboratorio (49, 107, 108, 110, 111) en colaboración con el Dr. Gustavo García de la Mora de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2. Cambios conformacionales

2.1. Transcripción, traducción *in vitro* y proteólisis limitada

La interacción del ligando con el sitio activo del receptor ocasiona cambios conformacionales que dependiendo de la naturaleza agonista o antagonista del

ligando condicionan la activación del receptor y su capacidad de interactuar con proteínas correguladoras tanto activadoras como represoras de la transcripción. Estos cambios conformacionales, mismos que no pueden ser identificados por estudios de unión al ligando, ocasionan modificaciones en la estructura terciaria de la proteína que pueden ser reconocidas de manera indirecta por el análisis del patrón de los productos de digestión enzimática de la tripsina. Para esta finalidad se sintetizó *in vitro* a los receptores de progesterona (RP), andrógenos (RA) y los subtipos α y β del RE (RE α , RE β) en presencia de L-[³⁵S]-metionina (>1000 Ci/mmol, Amersham, Piscataway, NJ, EU) utilizando un sistema de transcripción y traducción simultánea (50 μ l) TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega Corporation Madison WI, EU) (62, 63, 65). Los productos de síntesis (4.5 μ l) se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos en presencia de concentraciones crecientes del ligando (10^{-8} a 10^{-6} M) y sujetos a digestión enzimática con tripsina (50 μ g/ml) por 10 minutos. Los productos generados (1-2 μ l) fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, y visualizados por autoradiografía (Fig. 6).

Los plásmidos de expresión que codifican para el RA (pcDNAHisARmcs) el RP (pCR3.1-RPB) y los subtipos α o β del RE (pCR3.1-hER α , pCR3.1-hER β respectivamente) fueron descritos previamente (63, 81, 112, 113).

La estructura agonista del receptor se obtuvo de incubaciones en presencia de DHT, P y E₂ y la antagonista en presencia de RU486, flutamida e ICI 182,780 para el caso del RP, RA, RE α y RE β , respectivamente. Incubaciones en ausencia del

ligando fueron representativas del patrón generado por ligandos que no interactúan con el receptor.

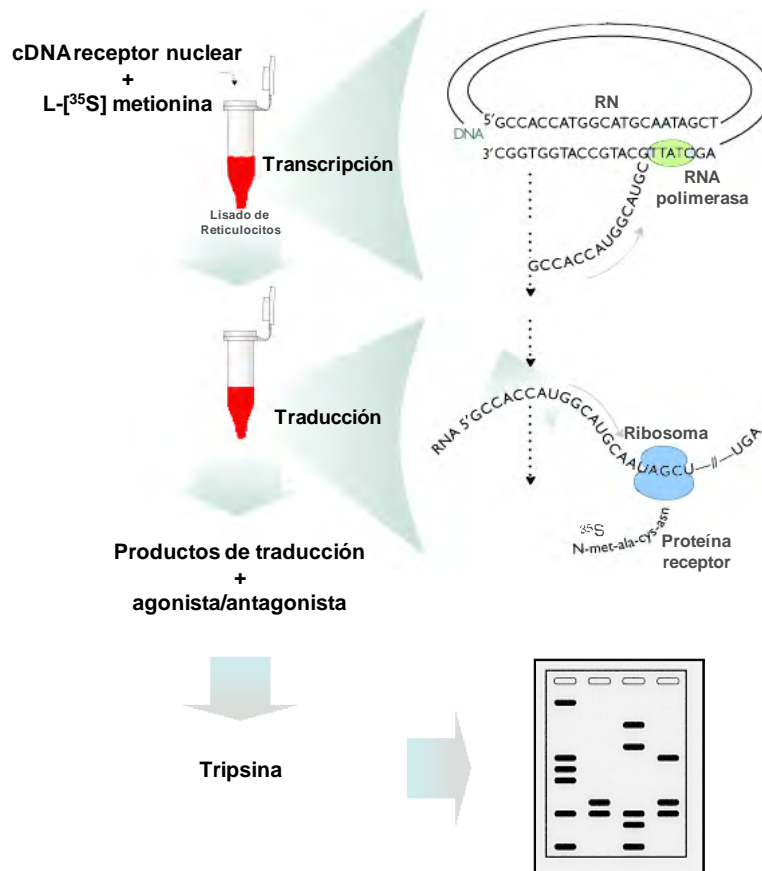


Figura 6. Sistema de transcripción y traducción simultánea para la síntesis *in vitro* de receptores nucleares (RN) (Manual Técnico In Vitro Translation: The Basics, Applied Biosystems and Ambion, EU).

Los pesos moleculares aproximados para el RP, RA, RE α y RE β son de 100, 110, 66 y 56 kDa respectivamente y se verificaron utilizando un marcador de peso molecular (Kaleidoscope 161-0375 Bio-Rad, Hercules, CA EU). Los patrones

típicos de interacción agonista muestran productos de digestión caracterizado por la presencia predominante de la banda de 30 kDa para el RP y RA y en el caso de los REs α y β de 28 y 26 kDa respectivamente. En contraste, la interacción antagonista es caracterizada por una banda predominante de 27 kDa en el RP y de 35 kDa en el RA. Patrones similares a lo observado con incubaciones en presencia del vehículo para los REs. La abundancia relativa se estableció por análisis de densitometría, normalizando la intensidad de la banda obtenida del patrón agonista (28 kDa) generado de las incubaciones de los ligandos naturales y sintéticos con el RE α con la obtenida de su respectivo fragmento de 25 kDa. Para las incubaciones en presencia del RE β se normalizo la banda de 26 kDa contra la de 24 kDa.

2.2. FRET

Un cambio conformacional característico del receptor de estrógenos que sucede al interaccionar con ligandos agonistas lo representa el plegamiento del receptor con la finalidad de acercar espacialmente las dos funciones activadoras AF1 y AF2 localizadas en el amino y carboxilo terminal, respectivamente (73, 74). Para evaluar este cambio conformacional en el RE se sintetizaron receptores de estrógenos fusionados tanto en el amino como carboxilo terminal a proteínas fluorescentes aprovechando uno de los fenómenos en mecánica cuántica conocido como transferencia de energía resonante (FRET; fluorescence resonance energy transfer). Este fenómeno ocurre entre un donador (D) y un aceptor (A) fluorescente, siempre y cuando el espectro de emisión de D se

sobreponga con el espectro de excitación de A, y la cercanía entre ambos sea $<100 \text{ \AA}$. Bajo condiciones óptimas, la excitación a la longitud de onda de D resultará en la transferencia de energía hacia al aceptor (114). En este caso, la disminución de la emisión de D es acompañada del aumento concomitante en la fluorescencia a la longitud de onda de A. La eficiencia en la transferencia de energía es proporcional a la distancia entre los dos fluoróforos (115, 116). De esta manera, cambios en la intensidad de fluorescencia o en la relación de las intensidades de emisión del donador y del aceptor son utilizadas para estimar la proximidad entre las dos macromoléculas marcadas con los fluoróforos (Fig. 7). En este estudio, los cambios estructurales de los receptores fusionados con proteínas fluorescentes fueron analizados en sistemas de cultivo celular en presencia de diferentes ligandos naturales y sintéticos utilizando microscopía confocal. Los objetivos específicos involucraron la construcción de vectores quiméricos que contienen las secuencias de nucleótidos que codifican para el $RE\alpha$ y de diferentes proteínas fluorescentes localizadas en las secuencias que delimitan el amino y carboxilo terminal, así como la evaluación de la actividad biológica del receptor quimérico y la evaluación de los patrones de emisión tanto en cultivo o fracciones subcelulares de células transfectadas con los vectores quiméricos. Este enfoque tiene aplicaciones clínicas, así como farmacológicas para el desarrollo de compuestos con actividades selectivas tanto estrogénicas como antiestrogénicas. La meta a alcanzar fue la obtención de un modelo experimental que permita la evaluación bajo condiciones dinámicas y fisiológicas en tiempo real de los cambios conformacionales, dependientes del ligando, de proteínas nucleares involucradas

en el efecto biológico de compuestos naturales o sintéticos con actividad estrogénica.

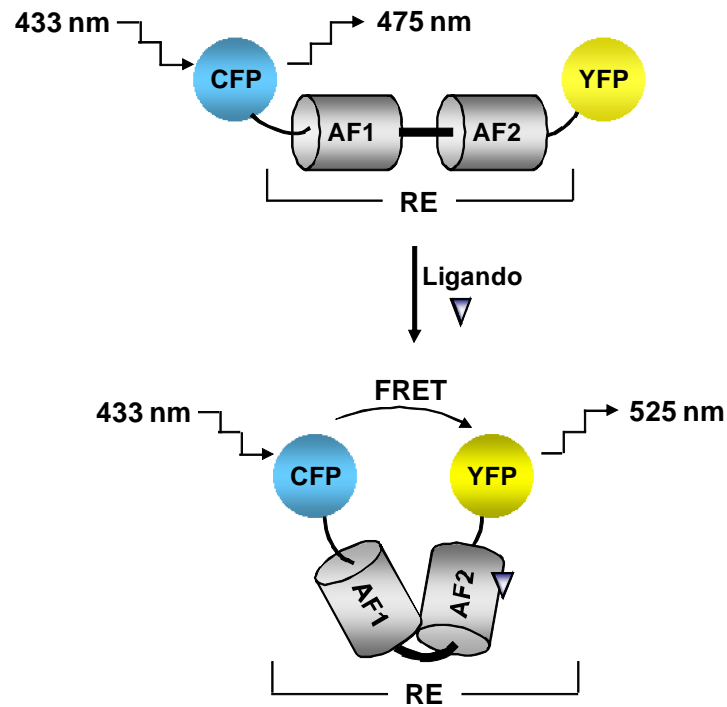


Figura 7. Modelo para el análisis conformacional del RE α por la transferencia de energía entre dos proteínas fluorescentes (CFP y YFP) acopladas las funciones activadoras (AF1 y AF2) del RE (117).

Para la obtención de proteínas de fusión se utilizó la siguiente estrategia experimental:

2.2.1. Construcción de vectores para proteínas de fusión

Los plásmidos que codifican para los fluoróforos CFP y YFP utilizados en este estudio (pECFP-C1 y pEYFP-N1) se obtuvieron de Clontech, Palo Alto, CA. El

vector pBK-CMV (4518 pb) se obtuvo de Stratagene (La Jolla, CA). El cDNA que codifica la secuencia completa de aminoácidos del RE α se obtuvo por PCR **(I)** utilizando como templado el plásmido pT7BhER α donado por el Dr. Austin J. Cooney del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad de Baylor, Houston, Tx. El producto de PCR fue subclonado en pCR[®] II-TOPO (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad California) y obtenido por digestión con Xho1 y BamH1. La construcción del plásmido pBK-CMVCFP-ER α -YFP se llevó a cabo a través de subclonar el cDNA del CFP obtenido por PCR **(II)** utilizando como templado pECFP-C1 generando el vector pBK-CMVCFP. El cDNA del RE α fue posteriormente subclonado en los sitios Xho1 y BamH1 de pBK-CMVCFP obteniendo el vector pBK-CMVCFP-RE α . Las secuencias de YFP se obtuvieron por PCR **(III)** utilizando como templado pEYFP-N1 incorporando al producto de PCR sitios de restricción para BamH1 para su inserción en pBK-CMVCFP-ER α y generar el vector pBK-CMVCFP-ER α -YFP. Posteriormente se ligaron en las regiones 3' y 5' del cDNA del RE α subclonado diferentes secuencias de nucleótidos que codifican para cadenas de un número variable de aminoácidos y optimizar el plegamiento adecuado de la proteína e incidir sobre la sensibilidad de análisis por FRET (118). Cada paso en la construcción de los vectores se verificó por electroforesis en geles de agarosa, PCR y secuenciación para asegurar la identidad de los productos generados y la orientación adecuada de los insertos. Como controles se generaron vectores paralelos con diferencias en la posición de los fluoróforos (vgr. pBK-CMVYFP-ER α -CFP) utilizando las metodologías arriba señalada y las enzimas

correspondientes. La ubicación correcta de las cadenas de nucleótidos se corroboró por PCR y secuenciación de los productos generados.

A continuación se muestran los oligonucleótidos que fueron utilizados como iniciadores en las reacciones de cadena de la polimerasa durante la construcción de los vectores quiméricos.

Iniciadores:

(I)

ER α -S: GGA CTC AGA TCT CGA GCT ATG ACC ATG ACC CTC CA

ER α -A: GTA ATT ATA TGG ATC CCT GAC TGT GGC AGG GAA ACC CTC

(II)

CFP FP-C1- S: TAC AAG TCC GGA CTC AGA TC

FP-C1-A: GAT CTG AGT CCG GAC TTG TA

(III)

YFP FP-N1- S: CCA CCG GTC GCC ACC ATG

FP-N1-A: CAT GGT GGC GAC CGG TGG

S: sentido; A: antisentido

Secuencias de aminoácidos espaciadores:

(IV)

CFP-ER α (7): CFP-SGLRSRA-ER α

ER-YFP (7): ER α -RDPPVAT-YFP

CFP-ER α -YFP (7-7): CFP-SGLRSRA-ER α -RDPPVAT-YFP

YFP-ER α -CFP (7-7): YFP-SGLRSRA-ER α -RDPPVAT-CFP

CFP-ER α -YFP (20-7):	CFP-SGLRSRAKAYELHGGFSSRA-ER α -RDPPVAT-YFP
YFP-ER α -CFP (20-7):	YFP-SGLRSRAKAYELHGGFSSRA-ER α -RDPPVAT-CFP
CFP-ER α -YFP (7-26):	CFP-SGLRSRA-ER α -SLGSESKGELIPAHWRPLLVDPPVAT-YFP
YFP-ER α -CFP (7-28):	YFP-SGLRSRA-ER α -LGSESKGELIPAHWRPLLVDPRVPVAT- CFP
CFP-ER α -YFP (20-26):	CFP-SGLRSRAKAYELHGGFSSRA-ER α -SLGSESKG ELIPAHWRPLLVDPPVAT-YFP
YFP-ER α -CFP (20-28):	YFP-SGLRSRAKAYELHGGFSSRA-ER α -SLGSESKG ELIPAHWRPLLVDPRVPVAT-CFP

2.2.2. Evaluación de los productos de expresión

La caracterización de las propiedades estructurales y funcionales del RE α fusionado con las proteínas fluorescentes (ER α -PF) se evaluó con relación a sus propiedades inmunológicas, de afinidad por ligandos naturales, así como por su capacidad de activar la transcripción de genes reporteros. Para esta finalidad se llevaron a cabo los siguientes métodos:

2.2.3. Inmunoelectrotransferencia

La detección de las proteínas ER α -PF se realizó en extractos de células HeLa (ATCC, Manassas, VA) transfectadas con los vectores pBK-CMVCFP-ER α -YFP o pBK-CMVYFP-ER α -CFP (1 μ g). El día previo a las transfecciones, las células HeLa se sembraron a una densidad de 2.75×10^5 células/pozo en medio MEM (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 5% de suero fetal de

bovino (Hyclone Laboratories Inc. Logan, UT), 100 μ /ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta obtener una confluencia entre el 30-50%. Las transfecciones se realizaron por triplicado utilizando PolyFect (QIAGEN Inc, Valencia CA. EU) a 37°C (las transfecciones se llevaron a cabo como está descritos en párrafos posteriores) (49, 50). Las células HeLa expresando transitoriamente las proteínas ER α -PF se homogenizaron en solución de lisis (400 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA, 1% Nonidet P-40, 10 mg/ml PMSF, 30 μ /ml aprotinina y 100 nM ortovanadato de sodio) e incubaron a 4°C por 15 min. Subsecuente, los lisados se centrifugaron (21 000 x g) por 15 min. La concentración de proteína de las muestras se determinó por el análisis de proteína utilizando el estuche de Bio-Rad (Hercules, CA EU) utilizando BSA como estándar. Las proteínas (10 μ g) se separaron en geles de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) mediante electroforesis. Las membranas se lavaron en PBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) conteniendo 10% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó incubando la membrana en solución de PBS-T-1 % de leche conteniendo el anticuerpo para el RE α (F-10 sc-8002, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA EU) (1:1000) durante 1 hora. Después de varios lavados con PBS-T, la membrana se incubó por 1 hora con el segundo anticuerpo HRP-conjugado (Dilución 1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, CA EU). La detección quimioluminiscente se realizó con el reactivo ECL+ plus (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia).

2.2.4. Estudios de unión al receptor

Con la finalidad de establecer la integridad funcional del ER α -PF, se llevaron a cabo estudios de afinidad para estimar las características fisicoquímicas de los receptores expresados. Las células HeLa transfectadas transitoriamente con los diferentes vectores se homogenizaron en solución amortiguadora de Tris 0.01M, pH 7.7, EDTA 0.001M, monotioglicerol 0.1% y NaCl 0.4 M, obteniéndose la fracción soluble por centrifugación a 30000 rpm durante 1 h a 4°C. Se incubaron alícuotas de 0.1 ml de la fracción soluble en presencia de [3 H]-E $_2$ (10^{-9} M) y concentraciones crecientes de E $_2$ no radiactivo (10^{-12} – 10^{-7} M) durante 18 h a 4°C. La separación de la fracción libre de la unida se llevó a cabo por la adición de una solución de carbón/dextrán y la determinación de la unión no específica se realizó por incubaciones en paralelo conteniendo un exceso de hormona no radiactiva (500x). Se llevaron a cabo estudios control utilizando el RE α nativo o el producto de expresión de RE no fusionado con PF con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con los productos de expresión de los vectores de fusión. Para el caso de ligandos sintéticos, los resultados se analizaron por curvas de desplazamiento de [3 H]E $_2$ obteniendo los valores correspondientes a la afinidad relativa de unión (ARU) al 50%.

2.2.5. Transfecciones y análisis del gen reportero

Las células COS-1 y HeLa se sembraron un día antes de la transfección a una densidad de 2.75×10^5 células/pozo en medio DMEM HG (alto en glucosa) sin rojo fenol, suplementado con 5% de suero fetal de bovino, 100 μ /ml de penicilina y 100

$\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e incubadas a 37°C en 5% de CO_2 . Al día siguiente, las transfecciones se realizaron por triplicado usando PolyFect (QIAGEN Inc. Valencia CA, EU) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Brevemente: al medio DMEM-HG libre de suero (0.1 ml) se adicionaron: $1\mu\text{g}$ del plásmido reportero ERE-EIb-LUC o pROLUC, 0.025 a $0.5\mu\text{g}$ de los vectores de expresión para las proteínas fluorescentes $\text{ER}\alpha$ -PF (pBK-CMVCFP- $\text{ER}\alpha$ -YFP o pBK-CMVYFP- $\text{ER}\alpha$ -CFP) o $0.025\mu\text{g}$ del vector de expresión que codifica para el $\text{RE}\alpha$ (pCMV5-h $\text{ER}\alpha$) y 20 ng del plásmido pRL-TKLUC mismo que se utilizó como control interno de transfección. A la reacción se adicionaron $10\mu\text{l}$ del reactivo SuperFect y se agitó durante 10 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se agregó 0.6 ml de medio. El medio conteniendo el complejo de transfección se adicionó a las células en monocapa. Las células se incubaron por 3 h a 37°C en 5% de CO_2 . Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se adicionó DMEM-HG sin rojo fenol (3 ml). Veinticuatro horas después, el medio se reemplazó con otro conteniendo E_2 a diferentes concentraciones (10^{-9} a 10^{-7} M). Como vehículo se utilizó etanol. Para evaluar la actividad de la luciferasa se adicionaron 0.6 ml de solución de lisis pasiva (Promega Corporation Madison, WI, EU) a cada plato. Los platos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con movimiento. El lisado se centrifugó por 2 minutos a 4°C . Se transfirió el sobrenadante ($20\mu\text{l}$) a tubos de poliestireno y la actividad luminiscente del gen reportero se determinó en un luminómetro Monolight 3010 (Pharmingen, San Jose, CA, EU).

El vector de expresión para el RE α (pCMV5-hER α) fue donado por la Dra. B.S. Katzenellenbogen, de la Universidad de Illinois (Urbana, IL). El plásmido reportero con los elementos de respuesta a estrógenos (ERE-Elb-LUC) contiene un fragmento del promotor del gen de la vitelogenina A2 (posición -331 a -87 en la posición 5' de la caja Elb TATA del adenovirus fusionada al gen de la luciferasa (LUC). El plásmido de respuesta a estrógenos pROLUC contiene el promotor de la oxitocina (119). El vector pRL-TK (Promega Corporation Madison WI. EU) contiene el DNA complementario que codifica para la luciferasa de Renilla.

2.2.6. Análisis por FRET

Los análisis de transferencia de energía del fluoróforo donador al fluoróforo aceptor, como indicadores de los cambios conformacionales del RE α inducidos por los ligandos, se llevaron a cabo en células HeLa transfectadas con 1 μ g de los vectores de expresión para RE α -FP. Para esta finalidad, el día previo a las transfecciones, las células se sembraron a una densidad de 1-3 X 10⁵ células en cámaras estériles montadas sobre portaobjetos (LabTek Chambered coverglasses, Nalge Nunc, Rochester, NY) en medio MEM suplementado con 5% de suero fetal de bovino y antibióticos e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las transfecciones se realizaron por triplicado utilizando PolyFect. Las células se estimularon con diferentes concentraciones de los ligandos y se excitaron a diferentes longitudes de onda (458 y 514 nm para CFP y YFP respectivamente). La fluorescencia se detectó y cuantificó a diferentes tiempos, por microscopía confocal (Zeiss LSM510 META, Carl Zeiss, Inc. EU) utilizando

filtros de emisión de 480-520 nm y/o 525-536 nm (120-122). En cada análisis la concentración de proteínas de expresión fue evaluada por estudios de unión tal y como fueron descritos en párrafos anteriores. Los espectros de emisión fueron analizados utilizando la paquetería para análisis ImagenJ PixFRET plug-in. En cada caso, se estudiaron individualmente los espectros de emisión en por lo menos 40 células. Se utilizaron como controles de emisión los plásmidos que codifican para los fluoróforos CFP y YFP (pECFP-C1 y pEYFP-N1). Para estimar las mediciones de FRET se utilizó el método de Feiger y cols (123) en el cual a partir de las imágenes del FRET se efectuaron las correcciones de acuerdo a la cantidad de emisión en los canales del donador y aceptor, respectivamente. La intensidad emitida por cada filtro fue normalizada contra la fluorescencia basal antes de efectuar la estimación de la energía transferida. La estimación de la concentración de FRET se llevó cabo utilizando la siguiente ecuación (124):

$$FRET = I_{FRET} - BT_{DONOR} * I_{DONOR} - BT_{ACCEPTOR} * I_{ACCEPTOR}$$

Normalización del FRET (125):

$$NFRET = \frac{I_{FRET} - I_{DONOR} \times BT_{DONOR} - I_{ACCEPTOR} \times BT_{ACCEPTOR}}{I_{DONOR} \times I_{ACCEPTOR}}$$

de donde:

I = intensidad del valor de gris

BT= (Bleed-through), intensidad basal.

I_{FRET} = imagen de FRET

I_{DONOR} = imagen del donador

$I_{ACCEPTOR}$ = imagen del aceptor

3. Reclutamiento de coactivadores

La participación de factores reguladores de la transcripción génica en la acción de las hormonas esteroideas, como es la unión de moléculas coactivadoras, es consecuencia de los cambios conformacionales que ejercen ligandos agonistas sobre la estructura del receptor. En este estudio y con la finalidad de investigar si los ligandos $3\beta,5\alpha$ tetrahidroreducidos derivados de la 19 nortestosterona al interactuar con el RE ocasionan los cambios conformacionales en el receptor para permitir el reclutamiento de coactivadores como el SRC-1 o el CBP, se decidió utilizar un sistema para la detección de interacciones proteína-proteína. Este sistema conocido como Mammalian Two Hybrid System (Promega Corporation Madison, WI. EU) consiste en la transfección de células HeLa con los siguientes vectores: 1) el vector pBIND contienen el dominio de unión al DNA de un factor de transcripción (GAL4) y expresa a la luciferasa de Renilla reniformis, la que se utilizó para normalizar la eficiencia de la transfección, 2) el plásmido pACT con el dominio de un activador de la transcripción (dominio de activación del virus del herpes simple (VP-16)), y 3) el vector reportero pG5luc contiene cinco dominios de unión al factor de transcripción GAL4 y codifica a la luciferasa de *firefly*, como marcador de la activación transcripcional (Fig. 8A). Los vectores de expresión pBIND, pACT y el gen reportero pG5luc fueron obtenidos de Promega Corporation (Madison, WI. EU).

El vector pBIND está fusionado con el SRC-1 o el CBP y el pACT con el dominio de unión al ligandos del RE α . De tal forma que el reclutamiento de SRC-1 o CBP al RE α inducido por el ligando resulta en el rearrreglo de GAL4 con VP-16 que al

interaccionar con los dominios de unión de GAL4 contenidos en el vector reportero promueve el aumento en la tasa transcripcional (Fig. 8B).

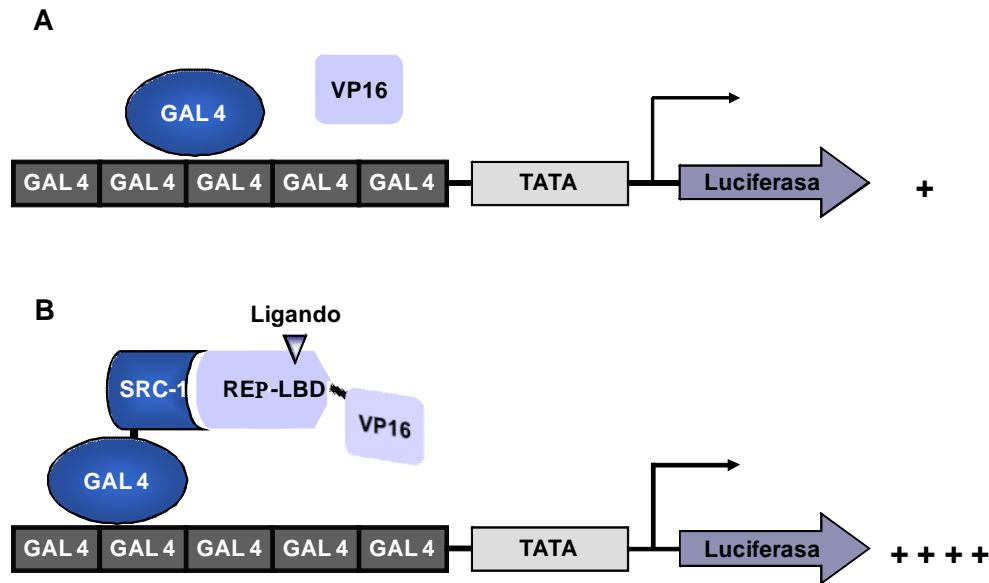


Figura 8. Sistema mixto de dos híbridos para el análisis de la interacción entre el $RE\alpha$ y el coactivador SRC-1. A. Representación esquemática de la expresión de las proteínas GAL4, VP16, y el gen reportero que contiene las secuencias que codifican para la luciferasa. B. La interacción de las proteínas de fusión VP16- $RE\alpha$ -LBD (VP16 fusionado con las secuencias para el dominio de unión al ligando del $RE\alpha$) y GAL-SRC-1 (GAL fusionado con el coactivador SRC-1) con el dominio de unión al DNA de GAL4, inducida por el ligando, promueve el aumento en la tasa transcripcional del gen reportero (Manual Técnico Mammalian Two Hybrid System, Promega Corporation, Madison, WI EU).

El vector de expresión GAL-SRC-1 fue construido substituyendo el fragmento *Bst*Z171-*Xba*I del pBIND (126) con el nucleótido *Bst*Z171-*Spe*I fragmento del cDNA del SRC-1. El coactivador SRC-1 fue obtenido del cDNA de las células HeLa

usando los oligonucleótidos 5'-TGT GTT CAG TCA AGC TGT CC-3' y 5'-GAG CAT TCC ACT AGT CTG TAG-3'.

El vector de expresión quimérico VP16-ER α fue generado en el plásmido pACT de la siguiente manera: 882 pb del cDNA que codifica para el dominio de unión al ligando (LBD) del RE α que corresponde a los aminoácidos 302-595 fueron amplificados por PCR a partir del plásmido pCMV₅hER α utilizando los oligonucleótidos 5'-GGG ATC CGTA AGAA GAA CAG CTG GCC TTG TTC C-3' y 5'-TCT AGA GAC TGT GGC AGG GAA ACC CTC TGCC-3'. Los fragmentos resultantes de PCR fueron subclonados en el vector pCR3.1 usando el estuche comercial de clonación TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU), y se aisló posteriormente como un fragmento *Bam*HI-*Xba*I y subclonado en el vector pACT en los sitios correspondientes para generar el pACT-ER α .

Los estudios de interacción del RE α activado con proteínas coactivadoras se llevaron a cabo en células HeLa transfectadas transitoriamente con los siguientes vectores: 0.1 μ g de GAL-SRC-1 o GAL-CBP, 1 μ g del vector VP16-ER α LBD, y 1 μ g del vector reportero pG5luc. Las transfecciones control se llevaron a cabo utilizando concentraciones similares de los vectores GAL4 (-SRC-1) o bien GAL4 (-CBP) y el vector VP16pACT. Veinticuatro horas después, el medio se reemplazó con otro conteniendo los ligandos a diferentes concentraciones (10^{-10} M- 10^{-6} M). Se utilizó etanol como vehículo. Para evaluar la actividad de la luciferasa se adicionaron 0.5 ml de solución de lisis pasiva (Promega Corporation Madison WI, EU) a cada pozo. Las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente con agitación. El lisado se centrifugó por 1 minuto a 4°C. La actividad de la luciferasa

(50 μ l) se cuantificó en el luminómetro Monoligth 3010 (Pharmingen, San Jose, CA, EU).

4. Activación de la transcripción

La expresión biológica de la activación conformacional del receptor y su interacción con coactivadores se estudió por el análisis de su actividad transcripcional. Estos estudios se llevaron a cabo en cultivos de células HeLa cotransfectadas con vectores de expresión conteniendo la secuencia completa que codifica para el RE α y el RE β humano (pCMV5-hER α y pCMV5-hER β) donados por los doctores B.S. Katzenellenbogen, Universidad de Illinois (Urbana, Illinois) y J-A. Gustafsson, Karolinska Institute, Huddlinge, Suecia, respectivamente y plásmidos reporteros sensibles al receptor de estrógenos y que codifican a la luciferasa o cloramfenicol acetil transferasa (CAT) (ERE-E1b-CAT, pROLUC), donado por el Dr. Austin Cooney del Departamento de Biología Celular y Molecular del Colegio de Medicina de Baylor en Houston, Texas, (50, 65) (Fig. 9). Brevemente: las células transfectadas se incubaron en medio fresco conteniendo E₂ u otros ligandos (esteroides sintéticos tetrahidroreducidos de la 19-nortestosterona, antiestrógenos) a diferentes concentraciones (10^{-12} - 10^{-6} M). La estimación de la actividad transcripcional de los diferentes ligandos se evaluó a través de cuantificar la actividad enzimática de CAT o luciferasa. Se utilizó como control de transfección y normalización de los resultados a las células transfectadas con la luciferasa de *Renilla* codificada por el vector pRL-TK (Promega Corporation Madison WI. EU). Los resultados se expresaron en

porcentaje de la actividad de luciferasa o CAT obtenida con E_2 a una concentración de 10^{-8} M.

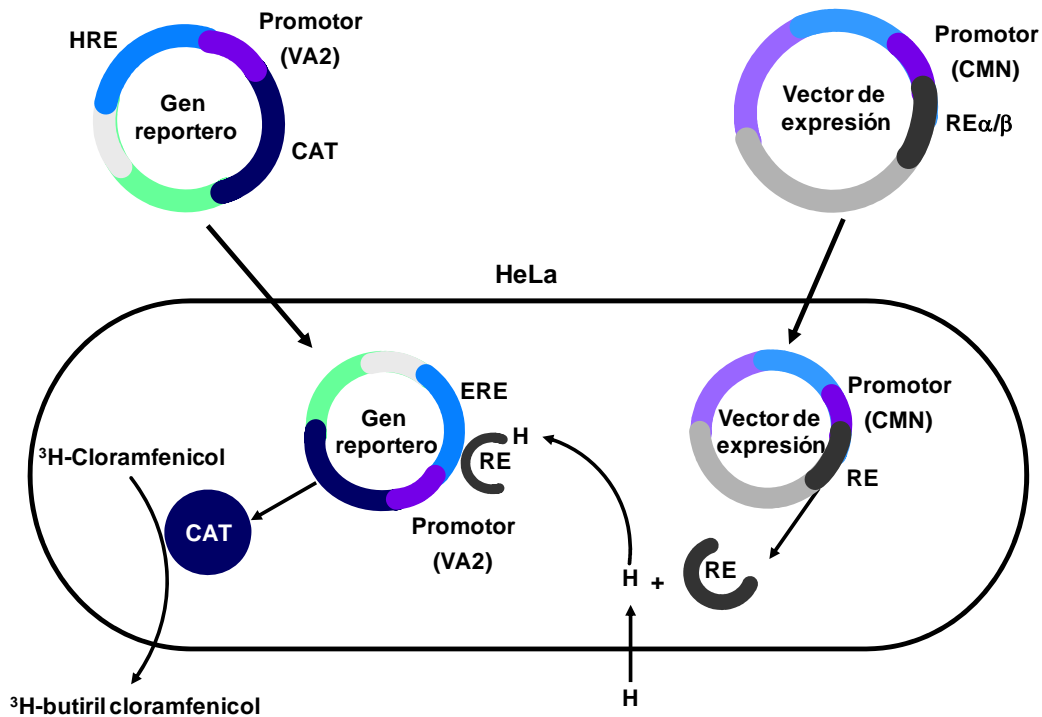


Figura 9. Sistema de cotransfección del gen estructural del RE α o RE β y el gen reportero con elementos de respuesta hormonal a estrógenos (ERE). La inducción de la actividad de CAT está relacionada a la activación de la transcripción vía el RE α o RE β en su interacción con los ligandos naturales o sintéticos.

5. Modificaciones estructurales de la cromatina y colocación nuclear de coactivadores y de la RNA polimerasa II

Uno de los eventos finales a nivel nuclear derivado del efecto de las hormonas esteroideas es el reclutamiento de proteínas estables a manera de complejos que

de forma secuencial y altamente ordenada se suceden a nivel del promotor de genes responsivos, conduciendo a un ambiente permisivo para iniciar el proceso de la transcripción génica (ciclo productivo). Estos eventos han sido identificados utilizando diferentes metodologías incluyendo dentro de las más actuales a los análisis basados en la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y los estudios en tiempo real, en células vivas, utilizando arreglos a nivel de promotores con la finalidad de visualizar los cambios dinámicos a nivel de la cromatina nuclear. En este estudio y con el objetivo de caracterizar la sinergia transcripcional (agonismo/antagonismo) inducida por ligandos naturales y sintéticos del RE, se utilizó un arreglo basado en el promotor y el aumentador del gen de la prolactina el cual contiene 5 elementos de respuesta a estrógenos y 4 a factores de transcripción como Pit-1 (Fig. 10). Esta construcción se integró de manera estable a los cromosomas de las células HeLa (PRL-HeLa) la cual genera una concentración local de elementos de respuesta a estrógenos que son visibles como un discreto locus cuando se asocia con el receptor de estrógenos fusionado a proteínas fluorescentes. El uso de este modelo permitió evaluar, por microscopía de fluorescencia, los cambios producidos a nivel de la cromatina nuclear en presencia de E₂ o ligandos sintéticos. Estas células fueron donadas por el Dr. M.A. Mancini del Departamento de Biología Celular y Molecular del Colegio de Medicina de la Universidad de Baylor en Houston, Tx., las cuales se han caracterizado previamente (69). El uso de estas células transfectadas transitoriamente con vectores que codifican tanto al RE α como al RE β fusionados con proteínas fluorescentes (GFP-RE α o YFP-RE β) permite evaluar la descondensación o la

condensación de la cromatina nuclear generada por un agonista o un antagonista respectivamente, así como visualizar el reclutamiento de coactivadores endógenos (SRC-1), incluyendo a la RNA polimerasa II por medio de su incubación con anticuerpos específicos.

Las células PRL-HeLa fueron mantenidas en medio Opti-MEM I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) conteniendo 5% de suero bovino fetal. Veinticuatro horas antes de la transfección, las células fueron sembradas en cubreobjetos con poli-lisina D en pozos de 35 mm a una concentración de $1-1.25 \times 10^5$ células/pozo en medio DMEM libre de rojo fenol (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) conteniendo 5% de suero dializado y tratado con carbón/dextrán para que esté libre de hormonas esteroides. Las células fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pEGFP-ER α o el pEGYFP-ER β y el vector pBluescript (Stratagene, La Jolla CA) como DNA control para igualar las concentraciones de DNA (radio1:1) utilizando el reactivo de transfección TransFectin (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA EU) de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante. Veinticuatro horas después, los ligandos a evaluar: 10 nM 4-hidroxitamoxifeno (TAM), diferentes concentraciones (10^{-10} M - 10^{-6} M) del ligando natural o los sintéticos, se incubaron por 2 h. Las células fueron fijadas en 4% de formaldehído en solución PEM (80 mM potasio PIPES, pH 6.8, 5 mM EGTA, pH 7.0, y 2 mM MgCl₂) por 30 min a 4°C. Las células fueron incubadas en 1 M de cloruro de amonio diluido 1:10 en PEM y permeabilizadas por 30 min en 0.5 % de Triton X-100 en PEM. Los portaobjetos fueron bloqueados por 1 h a temperatura ambiente en 5% de leche en TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,

0.1% Tween 20, pH 7.4) e incubados por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-RNA polimerasa II CTD (Ab5408) obtenido de Abcam Inc. (Cambridge, MA, EU) y el anti-SRC-1 (generosamente donado por el Dr. Jeimin Wong, Baylor College of Medicine, Houston, Tx), diluidos 1:1000 en solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios anti-RNA polimerasa II o anti-SRC-1 fueron detectados usando anticuerpos contra ratón o conejo IgG y conjugado a Alexa Fluor 555 y 647 respectivamente (Invitrogen, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EU dilución 1:1000). Las células se fijaron nuevamente para asegurar la estabilización del complejo antígeno-anticuerpo, para su mayor resolución en las imágenes y el almacenaje de las laminillas, y se incubaron en cloruro de amonio como se describe en párrafos anteriores. Subsecuente, para marcar el DNA, las células fueron teñidas por 1 minuto en 1 μ g/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EU) y montadas en solución Slow Fade (Molecular Probes).

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de luz invertida (IMT-2; Olympus, Success, NY) equipado con una cámara Nikon 40X Plan S Fluor (Photometrics; Tucson, A). Para generar imágenes de alta resolución se obtuvieron diferentes secciones ópticas del núcleo que fueron colectadas a través de un proceso de deconvolución como previamente se ha descrito (127). El área de fluorescencia de por lo menos 20 células se evaluó cuantitativamente utilizando la paquetería ScionImage (Scion Corp, Frederick, MD EU).

Los plásmido de expresión pEGFP-hER α o el pEYFP-hER β fueron construidos al insertar el DNA complementario que codifica para el RE α o el RE β en los sitio KpnI y BamHI del vector pEGFP-C1 o pEYFP-C1 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) respectivamente (128).



Figura 10. Arreglo del promotor con la región aumentadora y las secuencias responsivas a estrógenos (PRL1-5) y Pit-1 (AD-4D en *itálicas*) (69).

6. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media y error estándar de por lo menos tres experimentos individuales. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La significancia comparativa de los resultados se llevó a cabo utilizando

la t de Student de dos colas y un análisis de varianza un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

1. Cambios conformacionales de los receptores nucleares inducidos por ligandos naturales y sintéticos

1.1. Proteólisis limitada del receptor

Con la finalidad de investigar los cambios conformacionales de los receptores nucleares al interactuar con ligandos agonistas o antagonistas, se decidió aprovechar las modificaciones que ocurren a nivel del receptor una vez que el ligando interactúa con el dominio de unión de los mismos. Para esta finalidad se estudiaron los patrones de proteólisis limitada generados en ausencia y presencia de diferentes ligandos y se compararon con los obtenidos utilizando los ligandos naturales para cada tipo de receptor nuclear. Esta metodología evalúa de manera indirecta la conformación espacial de las proteínas receptoras que le confieren ligandos tanto agonistas como antagonistas, al ser diferencialmente degradados por la acción de proteasas como la tripsina (62, 63, 112). Los receptores nucleares fueron sintetizados *in vitro* como fue señalado en la sección de material y métodos utilizando un sistema de transcripción y traducción simultánea (Fig. 6). Los resultados se muestran en la figura 11. Para el caso del RP (Fig. 11A), el receptor sin digerir (C) muestra una banda con peso molecular aproximado de 100 kDa. En ausencia del ligando (V), el receptor es sensible a la acción de la enzima mostrando tres productos de digestión enzimática de 36, 30 y 27 kDa. Sin embargo, la incubación con 10^{-8} M del ligando natural (A) resultó en los mismos fragmentos proteolíticos pero caracterizado por la presencia de una banda

predominante de 30 kDa, lo cual indica que este fragmento fue el que interactuó con el ligando, por lo que esta banda fue protegida por el mismo de futuras digestiones y representa un patrón típico de acción agonista. La incubación en presencia del antagonista (ANT) RU486 o promegestona (10^{-8} M) mostró una banda predominante de 27 kDa originando el patrón característico de la conformación antagonista del receptor. Los patrones de digestión enzimática para los compuestos sintéticos NET, LNG y GSD fueron similares a los obtenidos con la progesterona natural. Para el caso de los compuestos $3\beta,5\alpha$ -NET, $3\beta,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -GSD, los patrones fueron similares a lo observado con incubaciones en presencia del vehículo (datos no mostrados), indicando la ausencia de interacción entre estos derivados con el receptor de progesterona. Estos resultados permitieron establecer la naturaleza progestacional de los compuestos analizados y por otra validar esta metodología como una herramienta indirecta para el análisis de los cambios conformacionales a ser evaluados con otros receptores. Con este mismo enfoque experimental se llevaron a cabo diferentes estudios para investigar los cambios conformacionales en el receptor de andrógenos y los subtipos α y β del receptor de estrógenos inducidos por NET, LNG y GSD, incluyendo a sus derivados tetrahidroreducidos. El receptor de andrógenos (Fig. 11B), el $RE\alpha$ (Fig. 11C) y el $RE\beta$ (Fig. 11D) sin digerir muestran bandas de 110, 66 y 56 kDa respectivamente. Como puede observarse en la figura 11B, todos los compuestos sintéticos (NET, LNG y GSD) se comportaron de manera similar a la dihidrotestosterona (DHT), a juzgar por la abundancia relativa de la banda de 30 kDa.

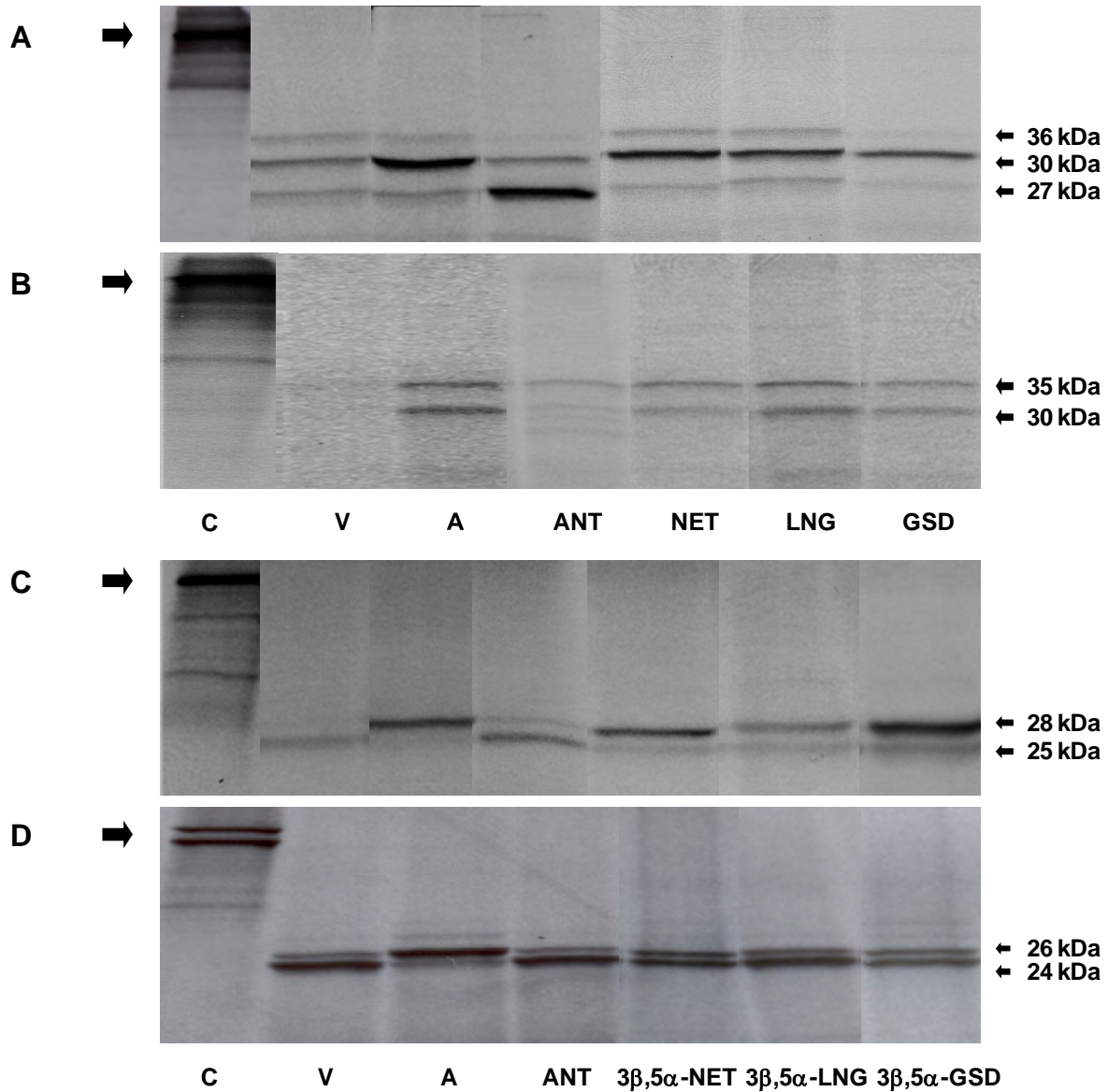


Figura 11. Patrones de la digestión limitada del receptor de progesterona (A), receptor de andrógenos (B), RE α (C) y RE β (D) en geles de poliacrilamida. Los receptores sintetizados *in vitro* fueron digeridos con tripsina en ausencia (V) o presencia de 10^{-8} M del agonista natural (A), antagonista (ANT) y los compuestos sintéticos o sus derivados $3\beta,5\alpha$ tetrahidroreducidos. Los receptores sin digerir (C) y los fragmentos resistentes a la proteólisis son indicados por flechas.

Para los compuestos sintéticos ($3\beta,5\alpha$ - NET, -LNG y -GSD), los patrones obtenidos fueron similares a lo observado con incubaciones en presencia del vehículo (datos no mostrados) indicando que solo hubo interacción de NET LNG y GSD con el receptor de andrógenos. Estos resultados permiten establecer la naturaleza androgénica de los compuestos analizados y corroborar estudios previos realizados en nuestro laboratorio (109).

Los resultados utilizando los subtipos α y β del RE mostraron la presencia de efectos diferenciales dependiendo del subtipo de receptor estudiado. Como puede observarse en la figura 11C y 11D, la presencia de E_2 resultó en la generación de un patrón agonista caracterizado por la abundancia relativa de las bandas de 28 kDa y de 26 kDa para el $RE\alpha$ y $RE\beta$, respectivamente. Estos patrones de digestión limitada con tripsina fueron comparados con los obtenidos utilizando los ligandos sintéticos derivados de la serie 19 nortestosterona. Los resultados demostraron, que a diferencia de la NET, LNG y GSD (datos no mostrados), los derivados reducidos ($3\beta,5\alpha$ -) mostraron patrones de digestión enzimática similares al E_2 solamente para el $RE\alpha$, sin efecto, a juzgar por los patrones obtenidos con el vehículo, cuando las incubaciones se llevaron a cabo con el $RE\beta$. Además, las incubaciones en presencia de concentraciones crecientes (10^{-8} M - 10^{-6} M) de E_2 o de los compuestos 5α - 3β -reducidos incrementaron la estabilidad de la banda de 28 kDa en el $RE\alpha$ (Fig. 12A). En contraste, incubaciones del $RE\beta$ (Fig. 12B) en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos tetrahidroreducidos no mostraron cambios en el patrón de fragmentación cuando se comparó con el receptor en ausencia del ligando.

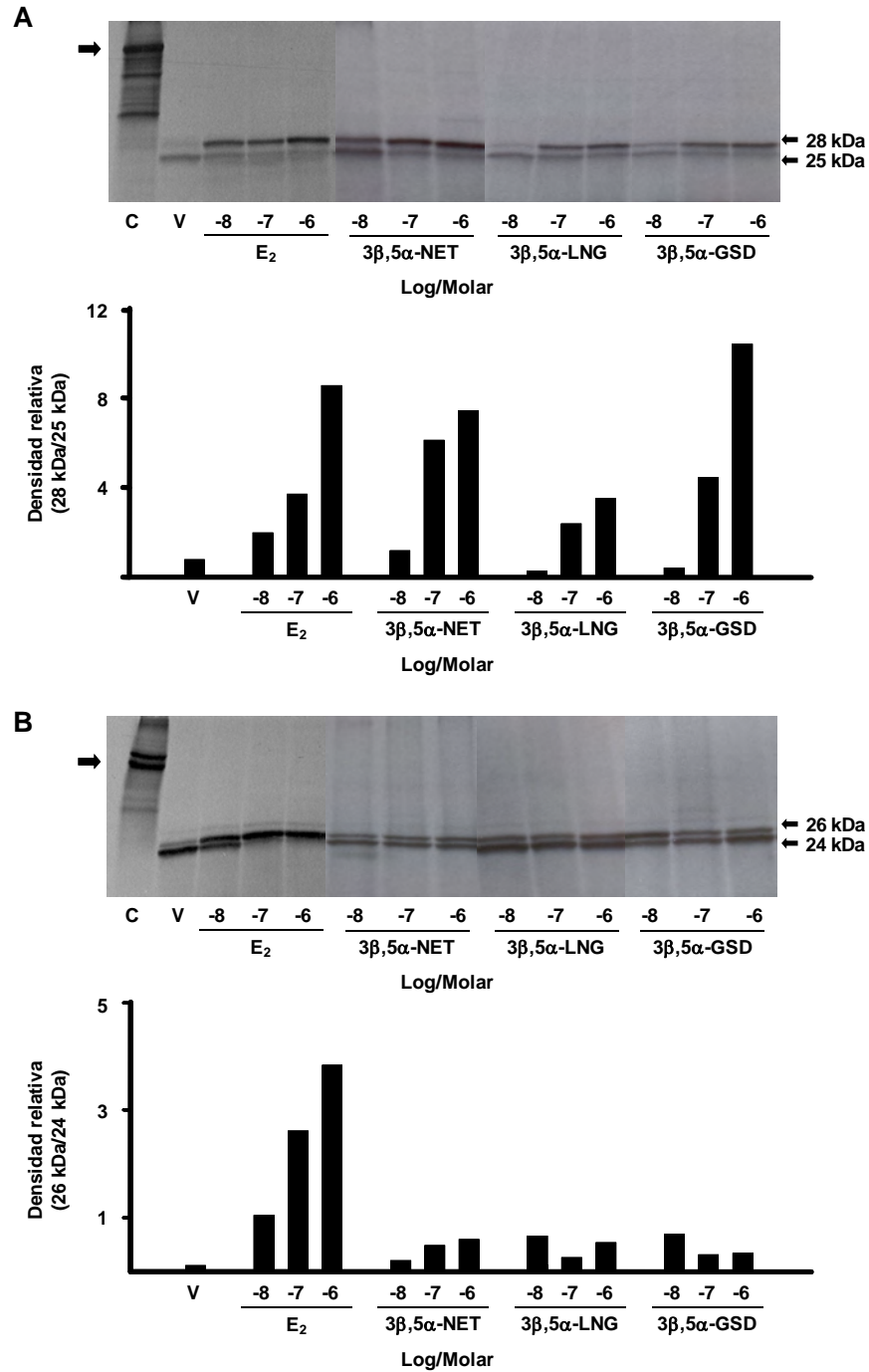


Figura 12. Patrones de la digestión limitada del RE α (A) y RE β (B). Los receptores sintetizados *in vitro* fueron digeridos con tripsina en ausencia (V) o presencia de concentraciones crecientes del agonista natural (E₂) y los compuestos sintéticos 3 β ,5 α - tetrahidroreducidos. La abundancia relativa del fragmento de 28 kDa se normalizó contra la banda de 25 kDa para el RE α o el fragmento de 26 kDa contra la banda de 24 kDa para el RE β .

Con estos resultados podemos sugerir que los ligandos sintéticos no reducidos en el anillo A, se comportaron de manera similar que la progesterona y la DHT por lo que les confiere un comportamiento agonista de naturaleza tanto progestacional como androgénica. Por otra parte, la observación de que sólo los compuestos $3\beta,5\alpha$ -NET, $3\beta,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -GSD mostraron patrones de digestión similares al E_2 en presencia del $RE\alpha$ sugirió propiedades agonistas selectivas de estos compuestos sobre la conformación del receptor.

1.2. Asociación espacial entre las regiones amino y carboxilo terminal del RE como modificación estructural inducida por ligandos agonistas

Con base en la evidencia de la interacción entre las dos funciones activadoras (AF1 y AF2) localizadas en el amino y carboxilo terminal del receptor dependiente del ligando (73, 74), se decidió estudiar este fenómeno a través de la utilización de la transferencia de energía entre dos fluoróforos, donador y aceptor, que ocurre cuando la distancia entre ambos es menor de 100 Å. Dada esta facultad cuántica entre dos proteínas fluorescentes se procedió a sintetizar proteínas de fusión constituidas por el $RE\alpha$ y proteínas fluorescentes (CFP y YFP) localizadas en su extremo amino y carboxilo terminal. El análisis de FRET se llevó a cabo por microscopía como se describió en la sección de material y métodos (Fig. 7). Los vectores diseñados (Fig. 13) se transfectaron en células HeLa con la finalidad de evaluar la integridad inmunológica, afinidad de unión y eficiencia transcripcional de los productos de expresión.

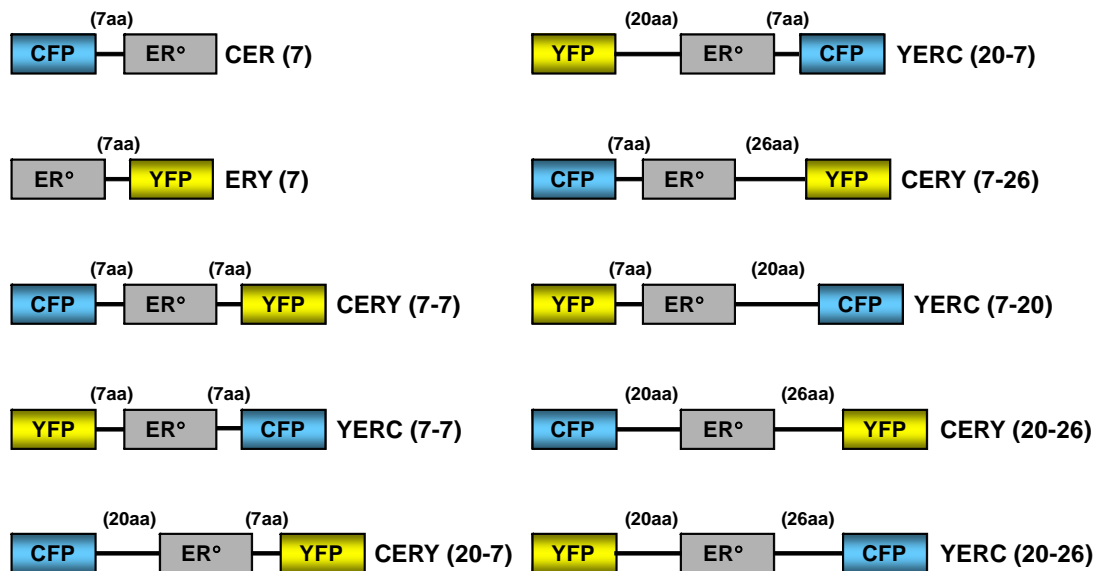


Figura 13. Vectores quiméricos para la expresión de proteínas de fusión CERY o YERC. Los números entre paréntesis indican la longitud de la cadena de aminoácidos entre proteína fluorescente y el RE α .

De todos los productos de expresión estudiados por el análisis de inmunoelectrotransferencia, las proteínas de fusión CERY (7-7), CERY (7-26), YERC (7-7), YERC (20-7) y la YERC (7-20) mostraron reactividad cruzada con el anticuerpo policlonal específico para el RE α (Fig. 14), además de presentar pesos moleculares aparentes de acuerdo a los estimados con respecto a los del RE α nativo, así como el de las proteínas fluorescentes, respectivamente. Esta propiedad fue importante para seleccionar las clonas y utilizarlas para su análisis posterior en estudios de unión a ligandos, así como de su actividad transcripcional.

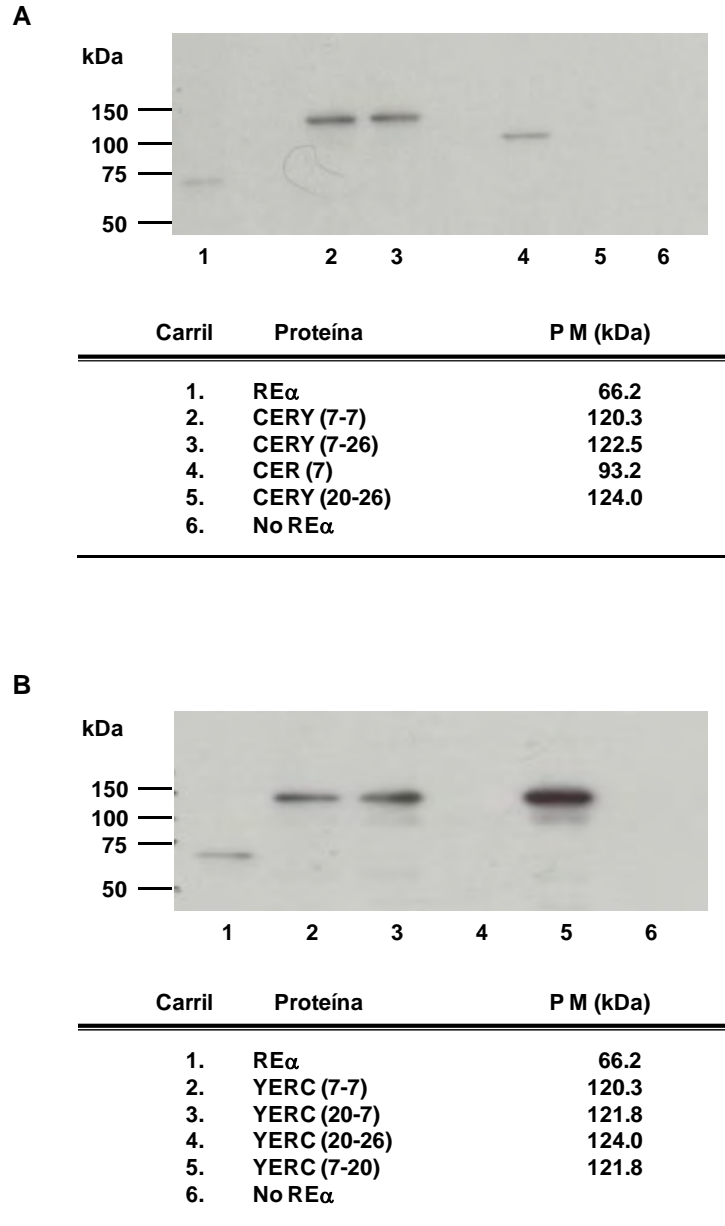


Figura 14. Análisis por inmunoelectrotransferencia de los productos de expresión de los vectores quiméricos mostrados en las figura 13. Se muestra la expresión de las proteínas de fusión que contienen la proteína fluorescente de color azul (A) o amarilla (B) hacia la región amino terminal del RE α .

La habilidad de los RE α fusionados a proteínas fluorescentes (CERY (7-7) y CERY (7-26)) para interactuar con E₂ se determinó por incubaciones al equilibrio utilizando la fracción soluble de homogenizados de células HeLa en presencia de [3H]-E₂ y concentraciones crecientes de E₂ no radiactivo. Como se muestra en la figura 15, ambas proteínas quiméricas mostraron curvas de desplazamiento similares y con afinidades relativas de unión (ARU) al E₂ de 80% y 136%, sugiriendo que ambos productos de expresión conservan intacto el dominio de unión al ligando. La proteína de fusión YERC (7-7) que contienen el fluoróforo aceptor hacia la región amino terminal del receptor mostró una ARU de 103% y se utilizó como control negativo de transferencia de energía.

Con relación a la capacidad de activar la transcripción génica de las proteínas de fusión CERY (7-7) y CERY (7-26) inducida por estradiol, se procedió al análisis de la actividad de genes reporteros con promotores conteniendo la secuencia de consenso de los elementos de respuesta a estrógenos o de aquellos que responden naturalmente a ellos como es el caso del promotor de la oxitocina, utilizando dos sistemas celulares diferentes (COS-1 y HeLa). Como puede observarse en las figuras 16 y 17, las dos proteínas de fusión analizadas fueron capaces de activar significativamente la transcripción del gen reportero, en respuesta a E₂ de manera similar al RE α . Esto se observó en ambos promotores e independientemente de las líneas celulares utilizadas. En todos los casos los efectos sobre la transcripción fueron dosis dependientes y significativamente mayores a concentraciones desde 10⁻⁹ M (CERY (7-7)) o 10⁻⁸ M (CERY (7-26)) de E₂ con relación al vehículo.

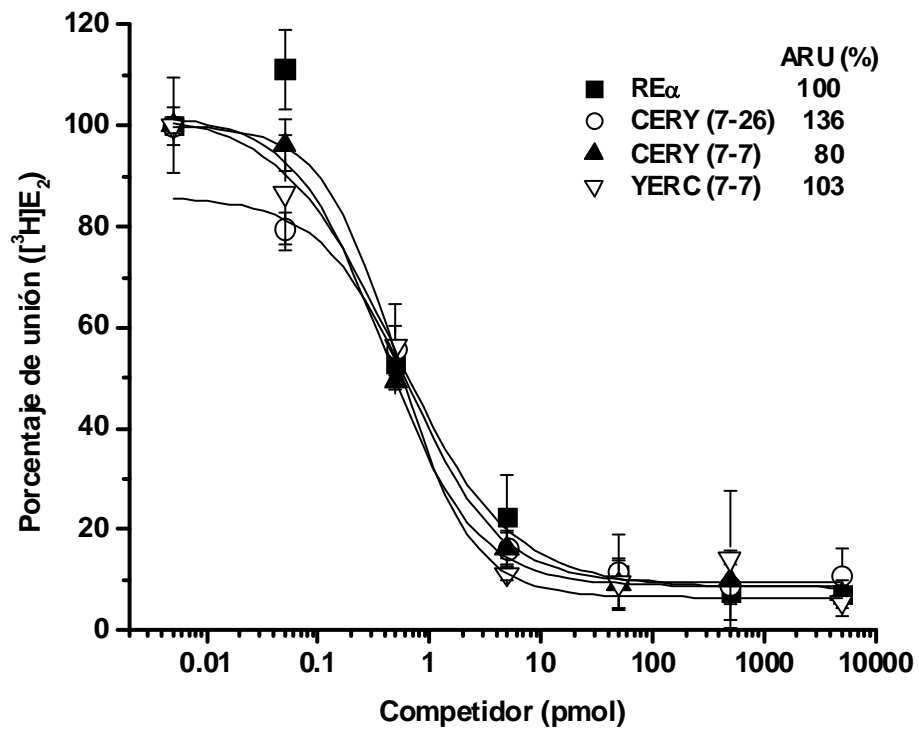


Figura 15. Curvas de desplazamiento del E₂ en presencia de diferentes productos de expresión de los vectores quiméricos. Los extractos de células HeLa transfectadas con los vectores de expresión para el RE α o las proteínas de fusión fueron incubadas en presencia de 1 pmol de [³H]E₂ y concentraciones crecientes E₂ no marcadas. Los valores son la media de un experimento representativo realizado por duplicado \pm SD.

Como control negativo se utilizó la proteína de fusión CERY (20-26) la cual no demostró identidad inmunológica ni propiedades de unión al E_2 . En este caso (Fig. 18), ni la adición del E_2 , ni el incremento en las concentraciones del plásmido de expresión modificaron de manera significativa la actividad del gen reportero a juzgar por los valores de la actividad enzimática de luciferasa, independientemente del tipo de promotor y línea celular utilizada.

Tomando en consideración estas observaciones y los eventos moleculares que participan en la activación de genes estrógeno regulados, ya referidos en la introducción, se puede concluir que el sistema cumple con los postulados establecidos para el mecanismo de acción de los receptores nucleares (interacción, activación, conformación y transcripción) y puede ser utilizado para el análisis de los cambios conformacionales del receptor, dependientes del ligando, en células vivas y en tiempo real, a través de la interacción de dos fluoróforos acoplados a las funciones activadoras del receptor (FRET). Para esta finalidad, se transfectaron células HeLa con el vector que codifica para la proteína de fusión CERY (7-7) en presencia o ausencia de E_2 o de los ligandos sintéticos a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Las células transfectadas e incubadas se excitaron a la longitud de onda del fluoróforo donador (458 nm) evaluando la transferencia de energía al aceptor por medio de la utilización de filtros sensibles a longitudes de onda de 480-520 nm y 525-536 nm para CFP y YFP, respectivamente.

Como controles experimentales se utilizaron células HeLa transfectadas con el vector de expresión del $RE\alpha$ nativo, así como con los vectores de expresión de

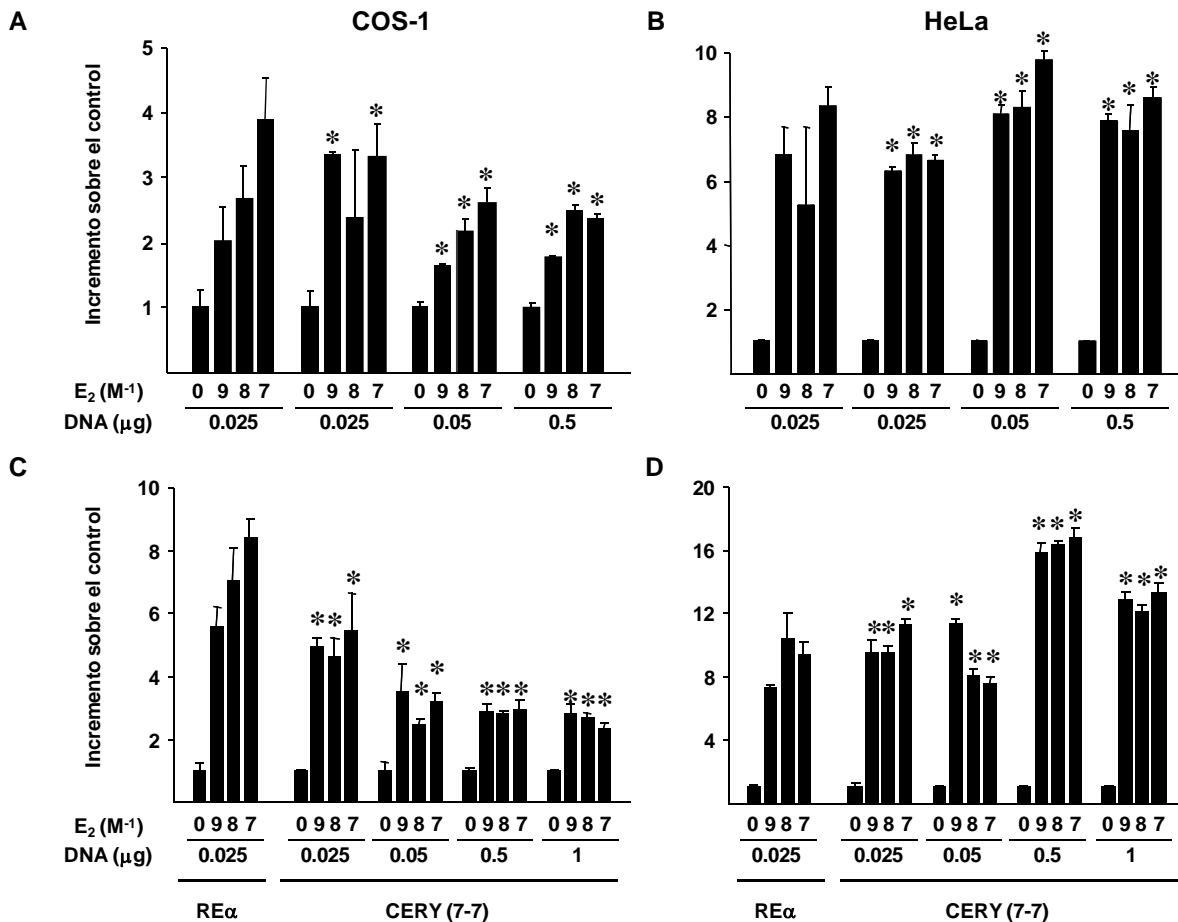


Figura 16. Análisis de la actividad transcripcional de CERY (7-7) en dos sistemas celulares (HeLa y COS-1) y promotores sintéticos (A y B) o naturales (C y D). Las células fueron transitoriamente cotransfectadas con los vectores de expresión que codifican para CERY 7-7 o el RE α junto con el plásmido reportero sintético o el natural; y el vector pRL-TKLUC como control interno de la eficiencia de transfección. Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de E $_2$ y se evaluó la actividad de luciferasa. El incremento en la actividad enzimática fue calculado por dividir el valor obtenido de las células tratadas con E $_2$ con el valor en ausencia de ligando. Los valores son la media de un experimento representativo realizado por triplicado \pm SD. * $P < 0.05$ vs 0.

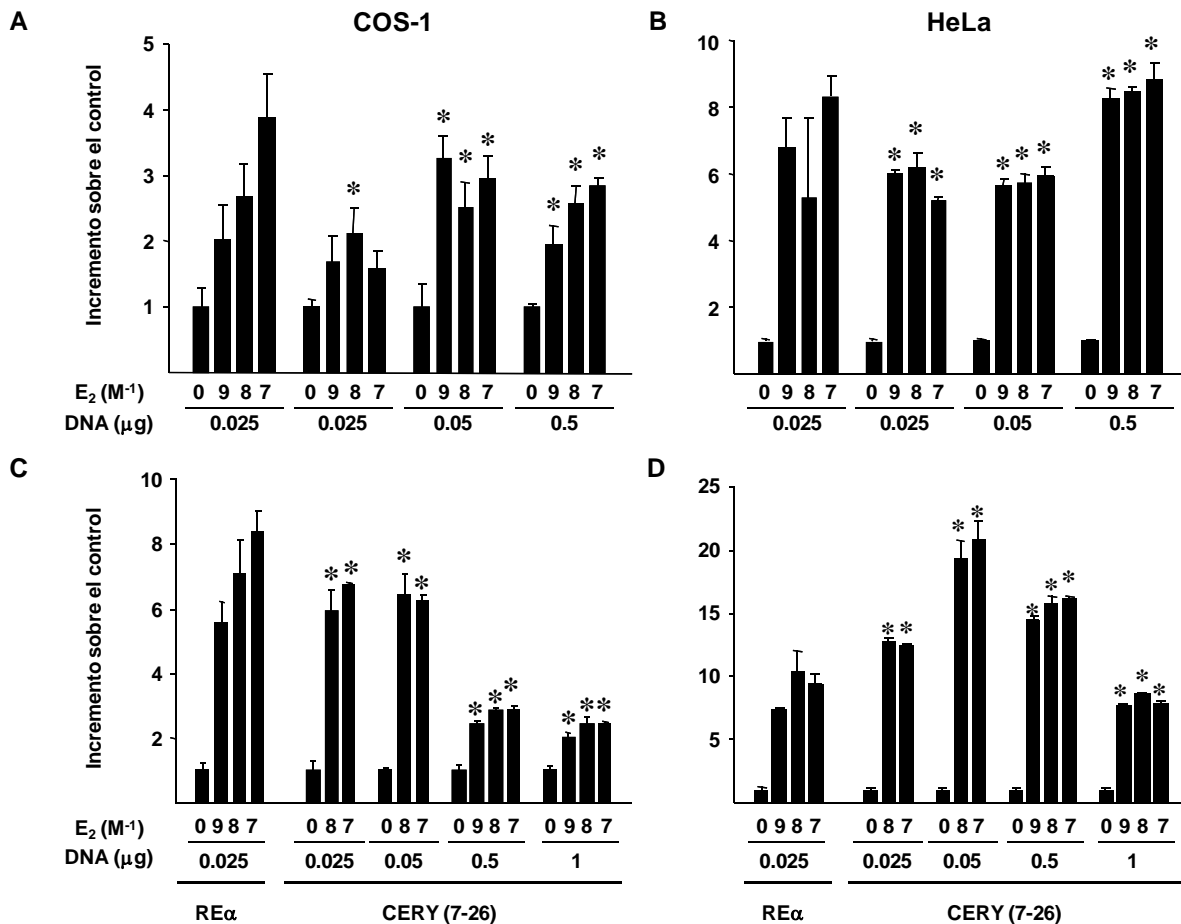


Figura 17. Análisis de la actividad transcripcional de CERY (7-26) en dos sistemas celulares (HeLa y COS-1) y promotores sintéticos (A y B) o naturales (C y D). Las células fueron transitoriamente cotransfectadas con los vectores de expresión que codifican para CERY (7-26) o el RE α junto con el plásmido reportero sintético o el natural; y el vector pRL-TKLUC como control interno de la eficiencia de transfección. Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de E₂ y se evaluó la actividad de luciferasa. El incremento en la actividad enzimática fue calculado por dividir el valor obtenido de las células tratadas con E₂ con el valor en ausencia de ligando. Los valores son la media de un experimento representativo realizado por triplicado \pm SD. **P* < 0.05 vs 0.

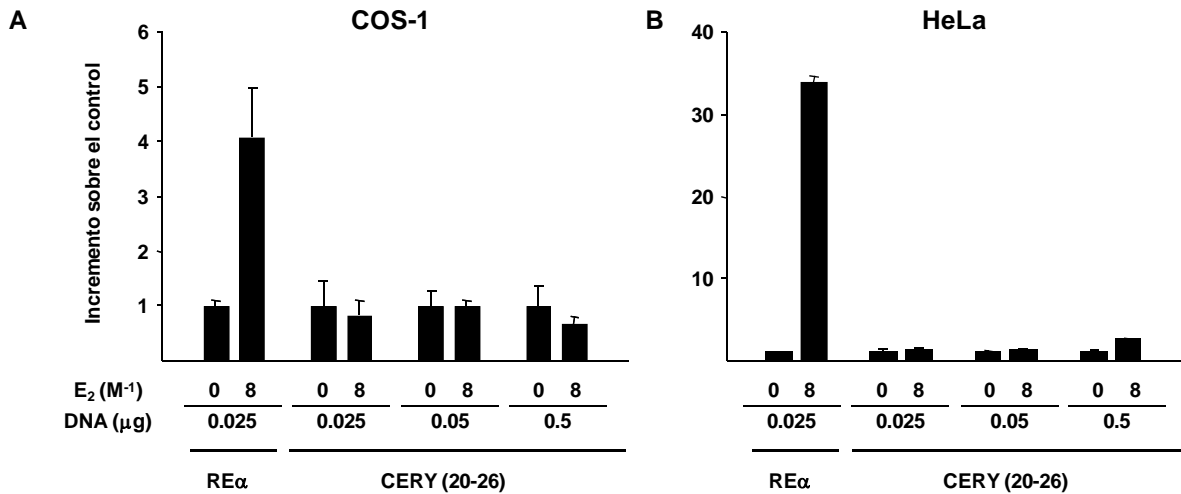


Figura 18. Análisis de la actividad transcripcional de CERY (20-26) en dos sistemas celulares (HeLa y COS-1) y el promotor conteniendo la secuencia consenso sintética de los elementos de respuesta hormonal. Las células fueron transitoriamente cotransfectadas con los vectores de expresión que codifican para CERY (20-26) o el RE α junto con el plásmido reportero sintético o el natural; y el vector pRL-TKLUC como control interno de la eficiencia de transfección. Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de E₂ y se evaluó la actividad de luciferasa. El incremento en la actividad enzimática fue calculado por dividir el valor obtenido de las células tratadas con E₂ con el valor en ausencia de ligando. Los valores son la media de un experimento representativo realizado por triplicado \pm SD. * $P < 0.05$ vs 0.

CFP, YFP y CERY (7,7), evaluándose la localización intracelular de las proteínas, así como su excitabilidad por microscopía confocal.

Como puede observarse en la figura 19, la excitación de las células HeLa a la longitud de onda de CFP (458 nm) y la lectura del espectro de emisión a 480-520 nm y 525-536 nm, respectivamente no mostró imágenes de epifluorescencia en ningún campo estudiado cuando las células fueron transfectadas con el RE α nativo e incubadas en presencia de E₂ (10⁻⁸ M). Resultados similares se obtuvieron cuando las células fueron incubadas en ausencia del ligando (Fig. 19V).

La transfección de células HeLa con los plásmidos que contienen las secuencias que codifican para CFP o YFP, respectivamente mostraron la expresión de estas proteínas y la fluorescencia fue localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (Fig. 20).

Por otra parte, la transfección de células HeLa con el vector para CERY (7-7) y los análisis de los espectros de emisión para CFP y YFP, posterior a la excitación a la longitud de onda de cada fluoróforo (458 nm y 514 nm, respectivamente) demostraron la expresión de la proteína de fusión con la epifluorescencia respectiva localizada exclusivamente a nivel nuclear (Fig. 21). Estos resultados nos permitieron establecer la integridad funcional de las proteínas fluorescentes. Por otra parte, la fusión de estas proteínas al RE α no modificó las características de excitabilidad de CFP y YFP, así como las propiedades de localización nuclear del RE α .

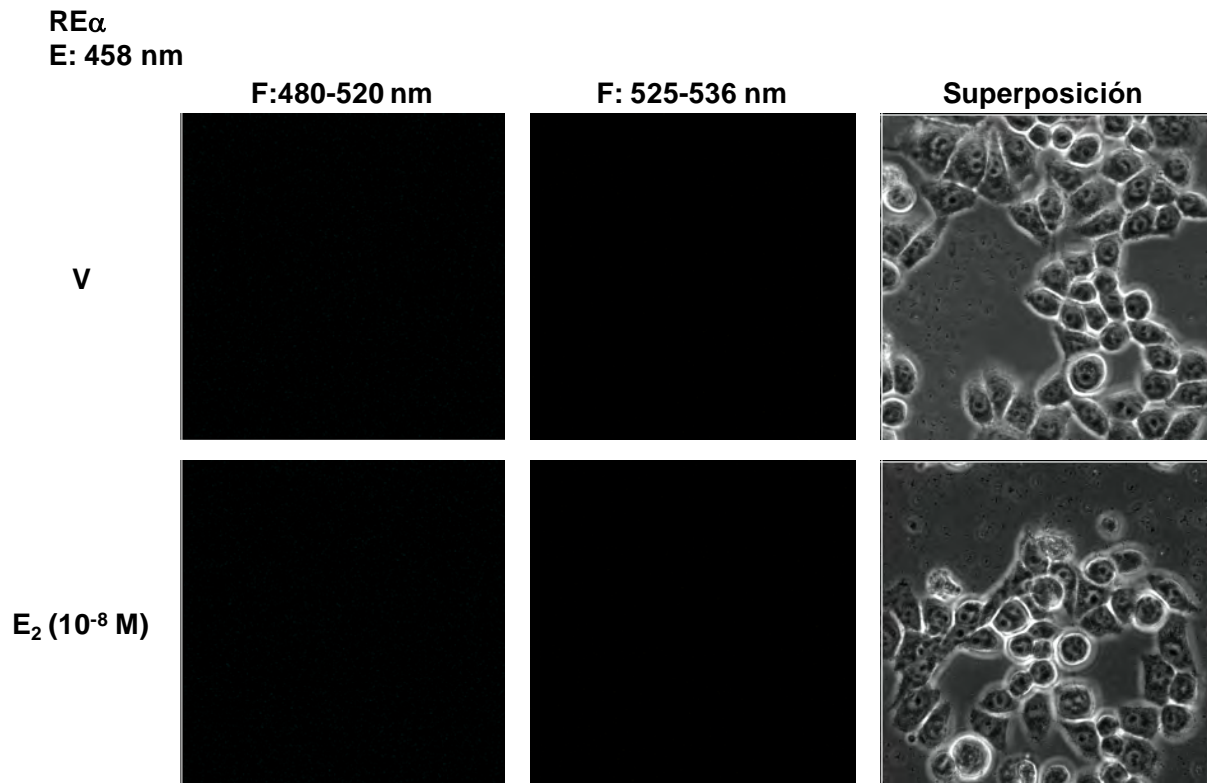


Figura 19. Imagen por microscopía confocal de las células HeLa transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pT7BhER α que codifica para el RE α nativo e incubadas en ausencia (V) o presencia de E₂. Las células fueron excitadas a la longitud de onda de 458 nm. E: filtros de excitación, F: filtros de emisión.

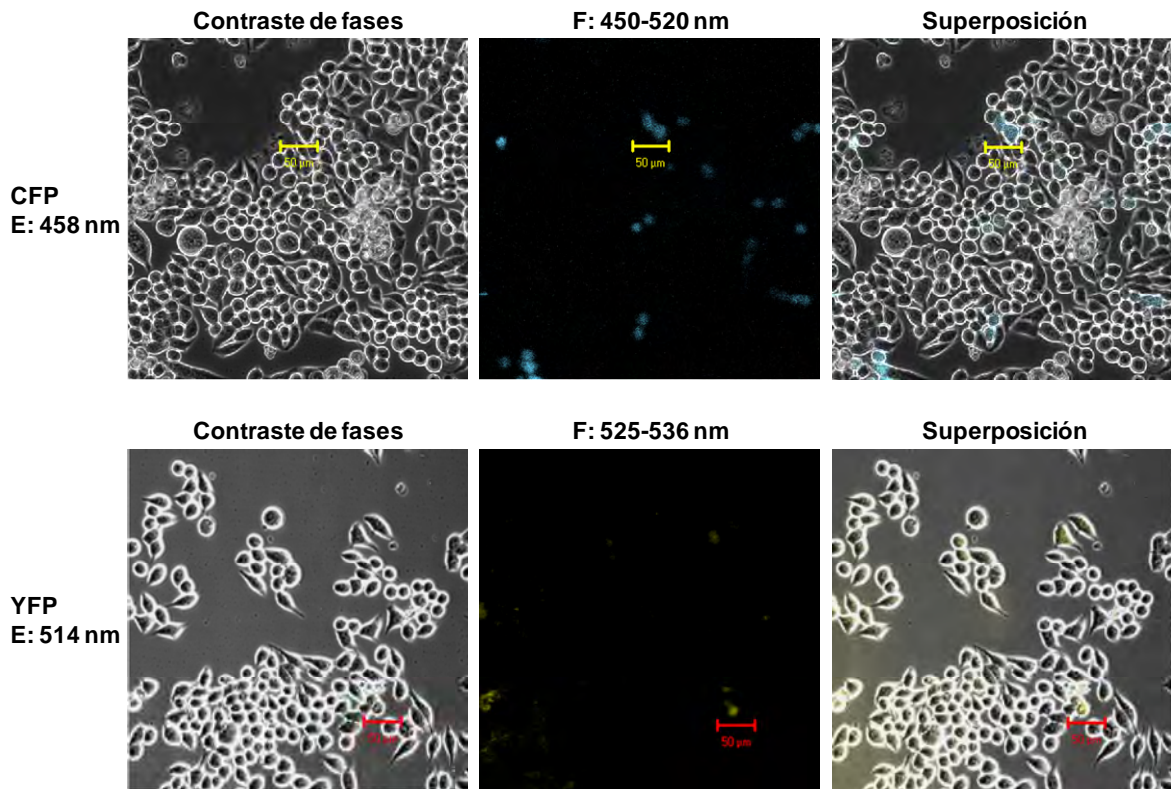


Figura 20. Imagen por microscopía confocal de las células HeLa transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión pECFP-C1 y pEYFP-N1 que codifican para las proteínas fluorescentes CFP o YFP no fusionadas al RE α y excitadas a la longitud de onda de 458 y 514 nm respectivamente. E: filtros de excitación, F: filtros de emisión.

CERY (7-7)

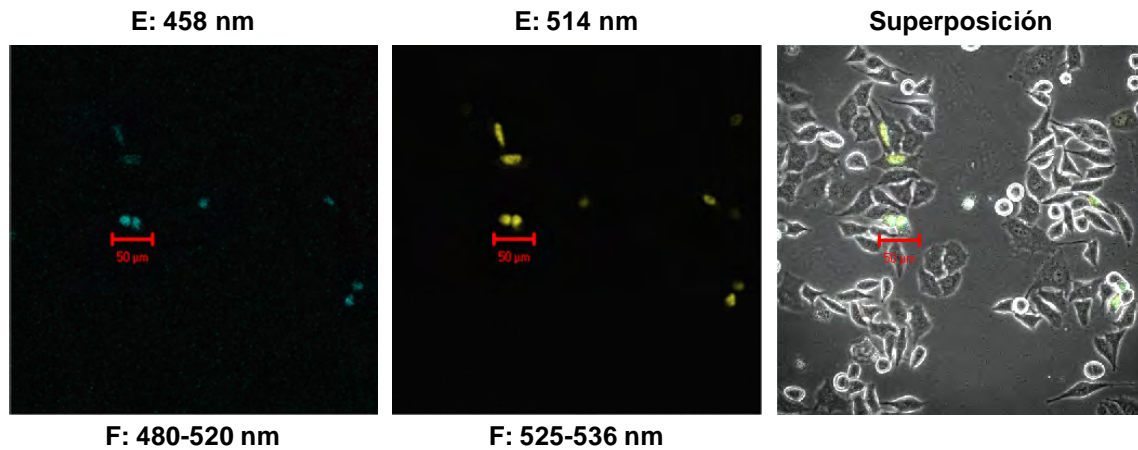


Figura 21. Imagen por microscopía confocal de las células HeLa transfectadas transitoriamente con el vector quimérico pBK-CMVCFP-ER α -YFP que codifican para la proteína de fusión CERY (7-7). Las células fueron excitadas a la longitud de onda de CFP y YFP, respectivamente y analizadas con los filtros correspondientes. E: filtros de excitación, F: filtros de emisión.

Estas observaciones fueron importantes para establecer las condiciones adecuadas y realizar los estudios de los cambios conformacionales del RE α , a través de visualizar por FRET la interacción entre CFP y YFP acopladas al amino y carboxilo terminal del receptor. Los cambios conformacionales esperados son aquellos que consistieron en la asociación espacial entre las funciones activadoras del receptor (AF1-AF2), por lo que la transferencia de energía del fluoróforo donador al aceptor representó el marcador funcional del efecto agonista del ligando. Por el contrario, la ausencia de energía hacia el aceptor fue tomada como marcador de la función antagonista o bien de la conformación inactiva del

receptor. Es importante hacer notar que parte de la activación del receptor (cambios conformacionales) es independiente de ligando y puede observarse aún en presencia de compuestos antagonistas, por lo que los estudios de reclutamiento de proteínas correguladoras y de dinámica conformacional de la cromatina nuclear en tiempo real son de relevancia funcional.

Los estudios de FRET se llevaron a cabo en células HeLa transfectadas con el vector de expresión CERY (7,7) en presencia o ausencia de ligandos naturales o sintéticos, incluyendo la adición de antagonistas. Los resultados fueron analizados por microscopía confocal utilizando la longitud de onda correspondiente al fluoróforo donador (458 nm) y evaluando los espectros de emisión tanto a 480-520 y 525-536 nm para CFP y YFP, respectivamente. En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos utilizando una dosis de E_2 (10^{-8} M) y analizadas a diferentes tiempos de incubación. Como puede observarse, el efecto FRET se obtuvo de manera clara desde los 30 minutos, lográndose un efecto máximo a los 90 minutos de incubación. La superposición de los espectros de emisión de la epifluorescencia con las imágenes de las células obtenidas por contraste de fase permitieron establecer la localización nuclear del fenómeno.

La dependencia estrogénica de FRET, se estableció en incubaciones de células transfectadas con la proteína de fusión CERY (7-7) en presencia de concentraciones crecientes de E_2 (10^{-10} M – 10^{-6} M). En la figura 23 se muestran los espectros de emisión obtenidos con diferentes dosis de E_2 , Como puede observarse, el efecto FRET fue dosis dependiente y visibles sobre todo a concentraciones fisiológicas (10^{-9} M) y mayores.

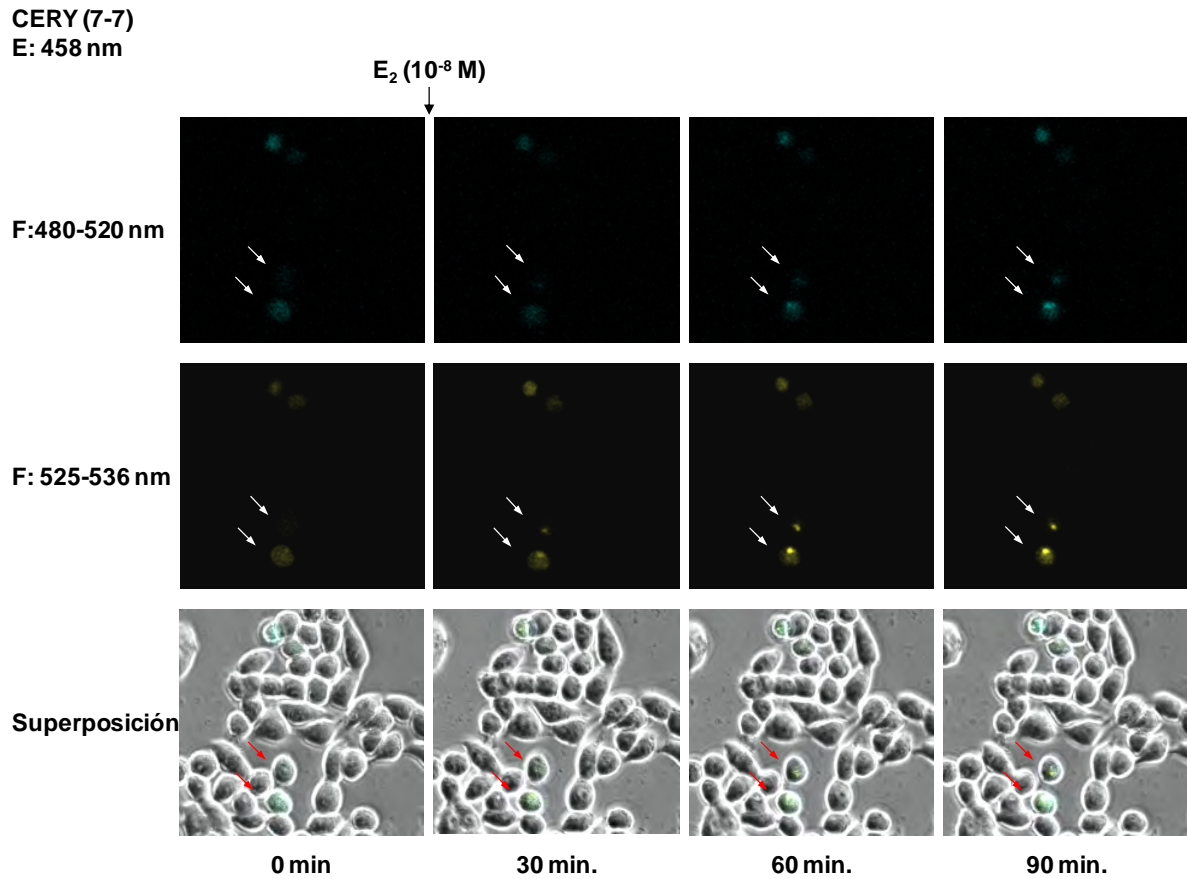


Figura 22. Imagen por microscopía confocal de las células HeLa transfectadas transitoriamente con el vector quimérico pBK-CMVCFP-ER α -YFP que codifican para la proteína de fusión CERY (7-7) e incubadas con E $_2$ (10^{-8} M) y analizadas a diferentes períodos de tiempo. Las células fueron excitadas a 458 nm. E: filtros de excitación, F: filtros de emisión.

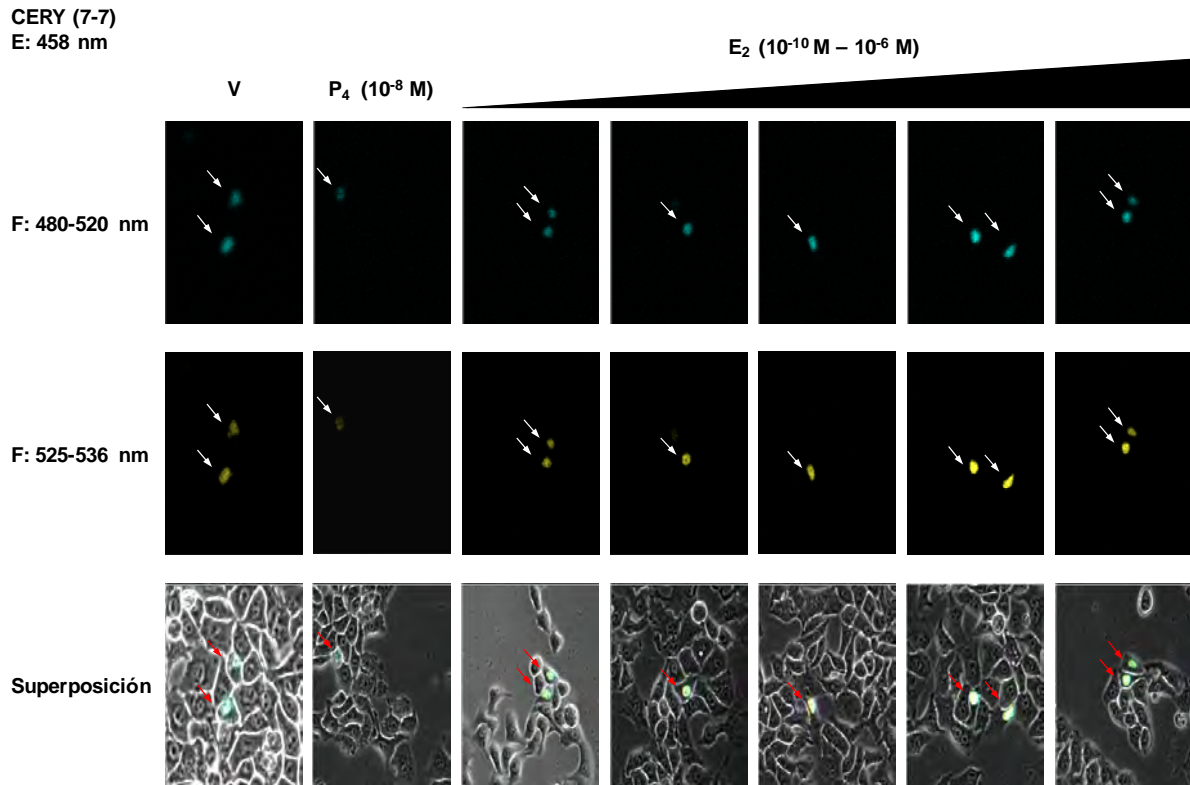


Figura 23. Imagen por microscopía confocal de las células HeLa transfectadas transitoriamente con el vector quimérico pBK-CMVCFP-ER α -YFP que codifican para la proteína de fusión CERY (7-7) e incubadas en presencia de diferentes dosis de E₂. Los controles experimentales fueron llevados a cabo en presencia del vehículo (V) y la progesterona (P₄). Las células fueron excitadas a 458 nm. E: filtros de excitación, F: filtros de emisión

La incubación con un esteroide no relacionado con el sitio activo del RE α , como lo es la progesterona (10^{-8} M), no mostró cambios en el patrón de epifluorescencia. La superposición de las imágenes de epifluorescencia con las células en contraste de fase demostró la localización nuclear del fenómeno. Estos resultados permitieron establecer los cambios dinámicos estructurales del receptor dependientes del E $_2$, que por localización de los fluoróforos donador y aceptor en los dominios del receptor sugieren fuertemente que estos consistieron en el plegamiento de la molécula y por lo tanto de la asociación espacial entre los dominios de las funciones activadoras localizadas en el amino y carboxilo terminal, respectivamente. Con estos datos, decidimos investigar si los efectos selectivos de compuestos tetrahydroderivados de la 19 nortestosterona se acompañan de cambios conformacionales en el receptor similares a los obtenidos con el ligando natural y de esta manera establecer y confirmar molecularmente su naturaleza agonista. Para esta finalidad utilizamos como ejemplo al derivado tetrahydroreducido de la NET ($3\beta,5\alpha$ -NET) comparando los resultados con los obtenidos con el E $_2$. Como puede observarse en la figura 24, la incubación de las células HeLa transfectadas con CERY (7,7) en presencia de concentraciones crecientes (10^{-10} M, 10^{-8} M y 10^{-6} M) de $3\beta,5\alpha$ -NET resultó en la presencia de epifluorescencia con filtros con una longitud de onda de 525-536 nm indicando la excitación y transferencia de energía del fluoróforo donador al aceptor y por lo tanto de los cambios conformacionales del RE α dependientes del ligando sintético. Fue interesante observar la presencia de epifluorescencia en incubaciones en ausencia del ligando sugiriendo, como ha sido previamente descrito, la activación

del receptor independiente del ligando y representando muy posiblemente un fenómeno fortuito y no conducente a un ciclo productivo desde el punto transcripcional (12, 129). De manera similar al ligando natural, el 3 β ,5 α -NET indujo la conformación del receptor a concentraciones de 10⁻⁸ M con unidades FRET no significativas. La sobreexposición de las imágenes de epifluorescencia con las células en contraste de fase demostró la localización nuclear del receptor quimérico tanto en incubaciones en presencia del ligando sintético como del ligando natural.

Estos resultados sugieren fuertemente la naturaleza agonista del ligando sintético 3 β ,5 α -NET y apoyan observaciones previas de nuestro grupo sobre los efectos estrogénicos de esta variedad de progestinas sintéticas (107-109).

2. Evaluación del reclutamiento de coactivadores al RE α inducido por ligandos naturales y sintéticos

Otro de los aspectos esenciales que participan en los efectos genómicos de las hormonas esteroideas es la interacción que tienen con factores que regulan la transcripción génica. Esta interacción es dependiente y obedece a los cambios conformacionales inducidos por el ligando, que específicamente ocurren en una de las hélices (H12) que constituyen el dominio de unión del receptor (66). Dependiendo de su orientación el receptor recluta proteínas correguladoras a través de la interacción con regiones conservadas en los coactivadores o correpresores (cajas NR y CoRNR, respectivamente (84, 104).

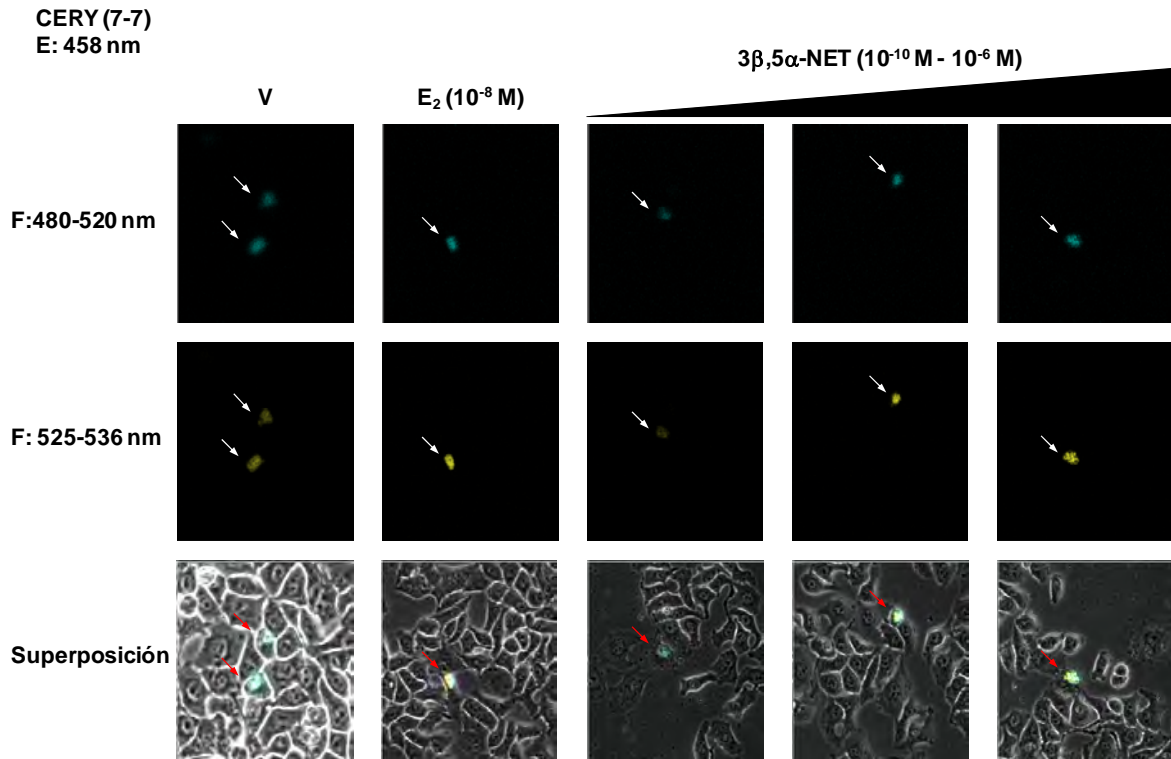


Figura 24. Imagen por microscopía confocal de las células HeLa transfectadas transitoriamente con el vector quimérico pBK-CMVCFP-ER α -YFP que codifican para la proteína de fusión CERY (7-7) e incubadas con diferentes dosis (10⁻¹⁰, 10⁻⁸ y 10⁻⁶ M) de 3β,5α-NET. Las células fueron excitadas a 458 nm. E: filtros de excitación, F: filtros de emisión.

Con la finalidad de conocer si los cambios conformacionales descritos en la sección anterior conducen a la expresión de un efecto biológico (reclutamiento), se decidió estudiar la capacidad del RE α activado para interactuar con proteínas coactivadoras (SRC-1 y CBP). Para este propósito, se utilizó un sistema para la evaluación de la interacción proteína-proteína ya descrito en la sección de material y métodos y ejemplificado en la figura 8. Los controles experimentales incluyeron incubaciones en presencia y ausencia del ligando, así como en presencia de un antagonista específico del RE α y de un esteroide no relacionado con el sitio de unión o bien en ausencia de los coactivadores.

Como puede observarse las células cotransfectadas con los vectores VP16-ER α LBD y pBIND-SRC-1 (Fig. 25A) o pBIND-CBP (Fig. 26A) al estimularlas con 10^{-8} M de E $_2$ incrementaron significativamente la actividad de la luciferasa. Sin embargo, la incubación en ausencia de ligando (V), así como en presencia de progesterona no mostró de manera significativa activación del gen reportero, indicando que la interacción del dominio de unión al ligando del RE α con los coactivadores SRC-1 y CBP fue dependiente del E $_2$. La incubación a la misma dosis con los ligandos sintéticos resultó en el reclutamiento de ambos coactivadores al RE α de manera similar al ligando natural (aproximadamente tres veces más comparado con el vehículo). Estos efectos fueron estrógeno dependientes debido al efecto inhibitorio del antagonista en la interacción entre el receptor y los coactivadores inducido por el ligando, a juzgar por los resultados obtenidos del estímulo simultáneo de ICI con el E $_2$ o los derivados sintéticos (Fig. 25), cuya actividad transcripcional fue similar a la obtenida con el antiestrógeno.

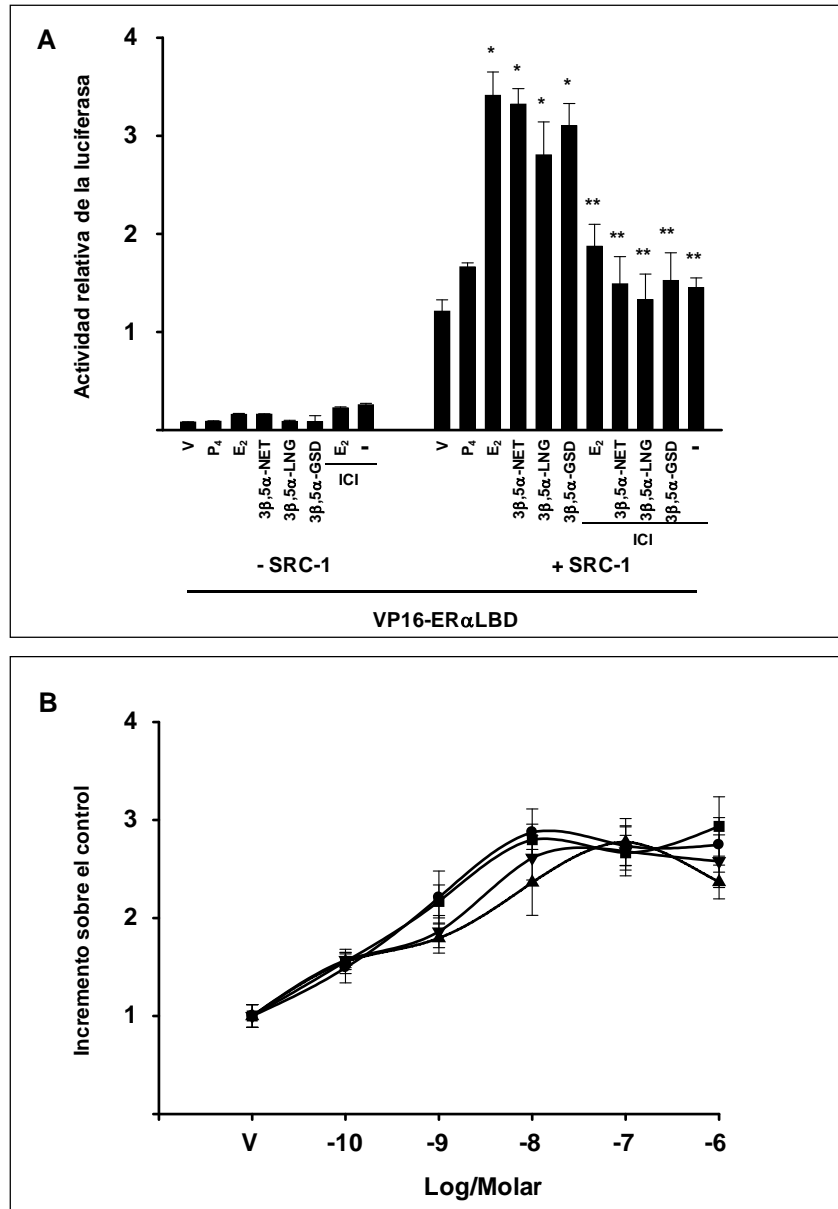


Figura 25. Reclutamiento del coactivador SRC-1 al dominio de unión del ligando del RE α . A. Las células HeLa fueron transfectadas con VP16-ER α LBD en presencia (+SRC-1) o ausencia (-SRC-1) de pBIND-SRC-1 y estimuladas con 10^{-8} M de E₂ o los compuestos tetrahidroreducidos. Los controles experimentales fueron llevados a cabo en presencia del vehículo (V), progesterona (P₄) o el antagonista (ICI). B. Reclutamiento dosis dependiente de SRC-1 al ER α LBD inducido por E₂ (●) o los compuestos 3β,5α-NET (■), 3β,5α-LNG (▲), 3β,5α-GSD (▼). **P*<0.05 vs V; ***P*<0.05 vs E₂. Los datos se representan como el promedio \pm S.E.M. de tres experimentos independientes.

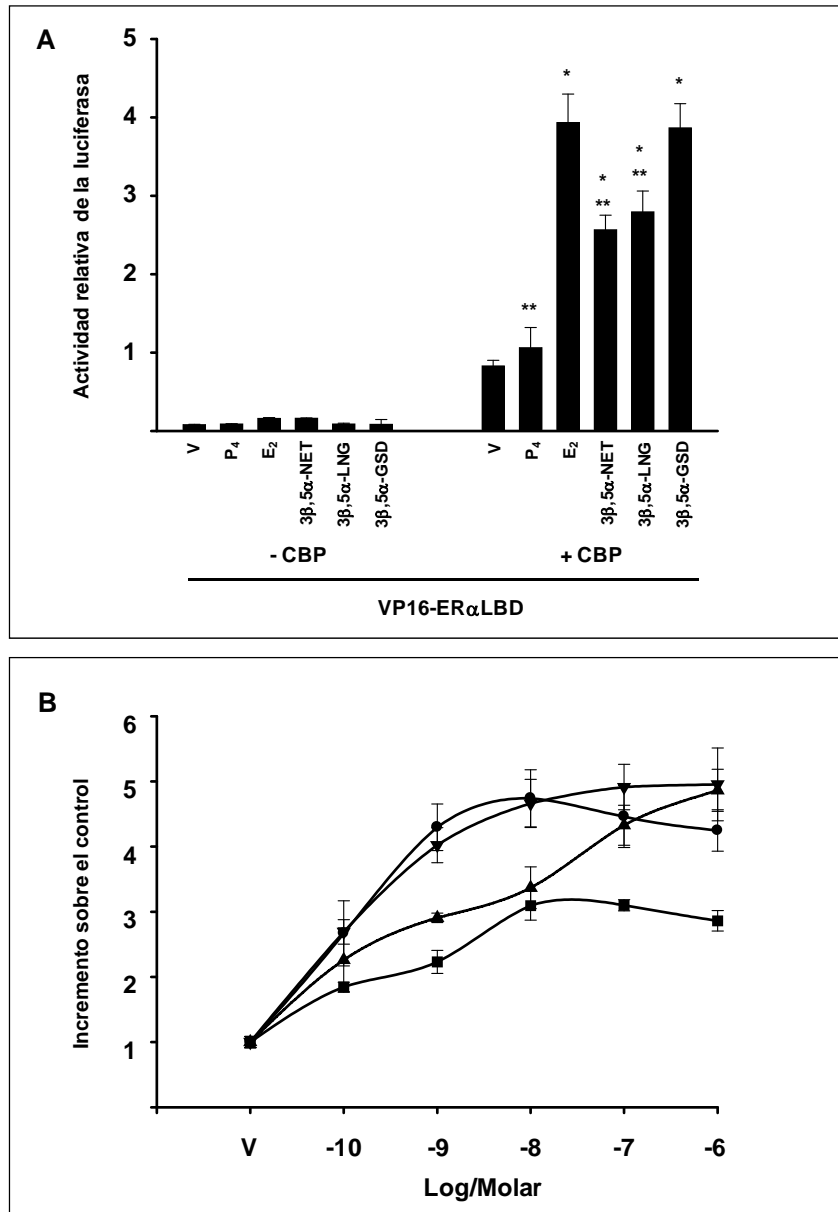


Figura 26. Reclutamiento del coactivador CBP al dominio de unión del ligando del RE α . A. Las células HeLa fueron transfectadas con VP16-ER α LBD en presencia (+CBP) o ausencia (-CBP) de pBIND-CBP1 y estimuladas con 10^{-8} M de E₂ o los compuestos tetrahidroreducidos. Los controles experimentales fueron llevados a cabo en presencia del vehículo (V) o progesterona (P₄). B. Reclutamiento dosis dependiente de CBP al ER α LBD inducido por E₂ (●) o los compuestos 3β,5α-NET (■), 3β,5α-LNG (▲), 3β,5α-GSD (▼). * $P < 0.05$ vs V; ** $P < 0.05$ vs E₂. Los datos se representan como el promedio \pm S.E.M. de tres experimentos independientes.

El incremento en la concentración de los ligandos sintéticos indujo reclutamiento dosis dependiente de ambos coactivadores (Fig. 25 y 26 Panel B) y fue similar al observado con el ligando natural. Por otra parte, la eficacia relativa de unión de los coactivadores con dominio de unión al ligando del RE α inducida por los derivados 3 β ,5 α -reducidos de NET, LNG y GSD fue similar a la obtenida con el E $_2$ sugiriendo la naturaleza agonista de los compuestos sintéticos estudiados (Tabla 2).

Tabla 2. Eficacia relativa de los ligandos para el reclutamiento de coactivadores.

Coactivadores	E $_2$ *	3 β ,5 α -NET*	3 β ,5 α -LNG*	3 β ,5 α -GSD*
SRC-1	2.84 x 10 ⁻¹⁰	3.08 x 10 ⁻¹⁰	2.55 x 10 ⁻¹⁰	3.16 x 10 ⁻¹⁰
CBP	1.00 x 10 ⁻¹⁰	1.52 x 10 ⁻¹⁰	8.26 x 10 ⁻¹⁰	1.14 x 10 ⁻¹⁰

*M

3. Evaluación de la actividad transcripcional de los derivados tetrahidroreducidos de la 19 nortestosterona vía los subtipos del receptor de estrógenos

Con la finalidad de corroborar los hallazgos obtenidos con los patrones de digestión enzimática con tripsina, se decidió investigar la capacidad de activación de la transcripción génica de estos compuestos vía el RE α o el RE β a través de utilizar un enfoque experimental descrito en material y métodos y ejemplificado en la figura 9. En estos estudios utilizamos un sistema de cotransfección de vectores que codifican al RE α y RE β , respectivamente, así como de plásmidos reporteros

responsivos en la región del promotor a ambos receptores estrogénicos y que codifican para la enzima CAT.

La actividad de CAT fue indicativa del efecto estrogénico vía los subtipos del RE. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27. Como puede observarse la adición de E₂ sobre la activación estrógeno dependiente del gen reportero resultó en el incremento significativo de la actividad de CAT en cultivos transfectados tanto con las secuencias para el RE α como para el RE β (Panel A y B, respectivamente). Estos resultados demostraron la integridad estructural y funcional de ambos subtipos del RE expresados. Por otra parte, la adición de concentraciones crecientes de NET, LNG y GSD no modificaron de manera significativa la actividad enzimática de CAT, sugiriendo que estos compuestos no interaccionaron con los receptores tal y como fue observado en los estudios con la digestión enzimática con tripsina. Sin embargo, la incubación con los ligandos sintéticos (3 β ,5 α -NET, -LNG, -GSD) mostraron la activación diferencial del reportero dependiendo del subtipo del RE transfectado. Como puede observarse (Panel C), la adición de concentraciones crecientes de los derivados reducidos resultó en el aumento significativo dosis dependiente de la actividad enzimática de CAT. Este aumento se observó con dosis del orden de 10⁻⁹ M de los compuestos considerados dentro del rango fisiológico como se muestra en la tabla 3. En esta tabla se muestran las dosis efectivas al 50% (DE₅₀) de los ligandos, cuyos valores fueron de 10 o 100 veces mayores a los obtenidos con E₂, pero dentro del rango esperado para las constantes fisicoquímicas de disociación descritas para el RE α (0.1 - 1 nM) (22).

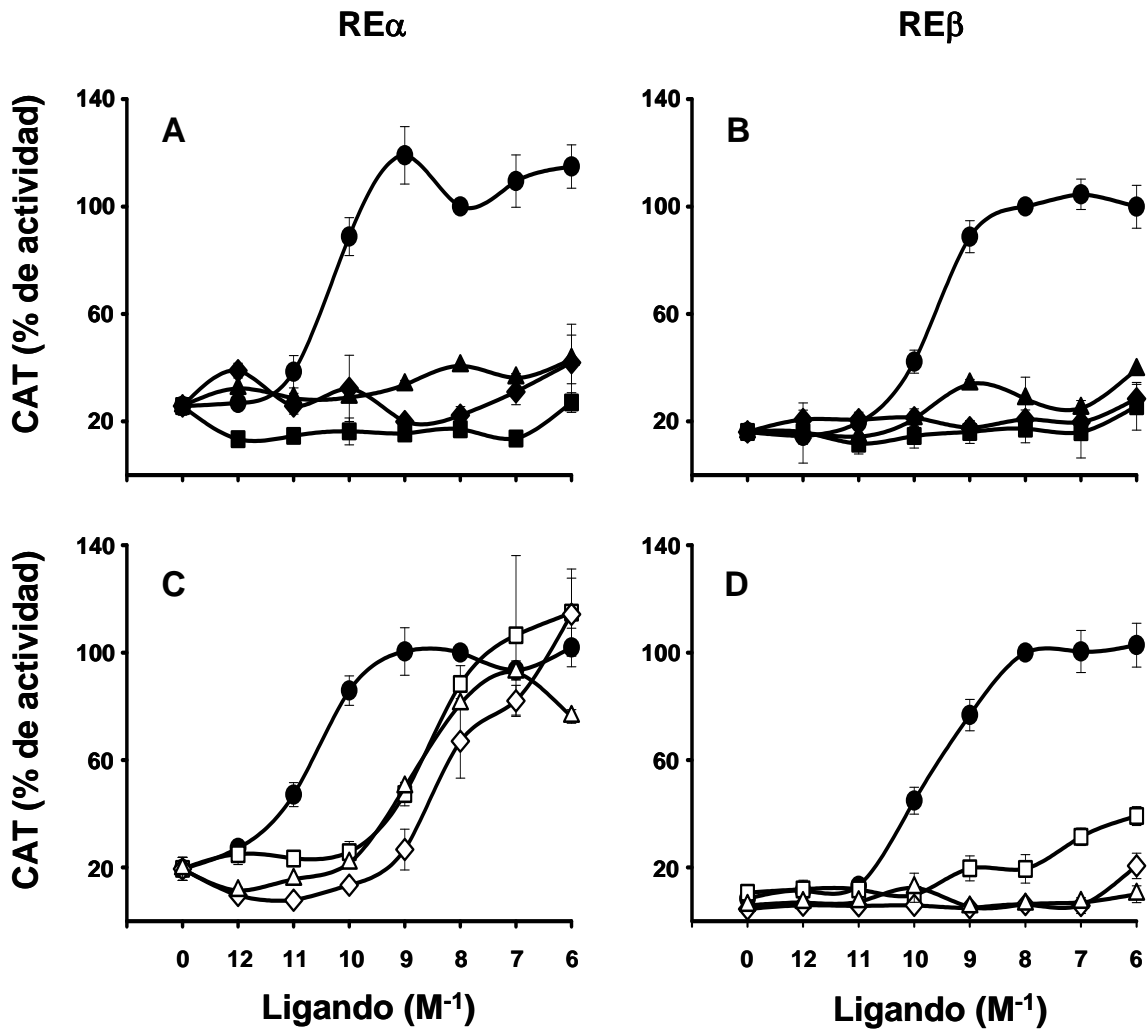


Figura 27. Actividad transcripcional de E₂ (●), NET (■), LNG (◆), GSD (▲), 3 β ,5 α -NET (□), 3 β ,5 α -LNG (◇) y 3 β ,5 α -GSD (Δ). Las células HeLa fueron cotransfectadas transitoriamente con los vectores de expresión para el RE α (A y C) o el RE β (B y D) y el gen reportero ERE-E1b-CAT, y estimuladas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (10^{-12} - 10^{-6} M) del ligando natural o los ligandos sintéticos. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de actividad tomando al E₂ a la dosis de 10^{-8} M como el 100%. Los datos se representan como el promedio \pm S.D. de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos para el caso de la activación de la transcripción a través del RE β se muestran en la figura 27D. En esta gráfica se puede claramente observar, en comparación con el RE α , la relativa inhabilidad de los derivados reducidos (3 β ,5 α -NET, -LNG y -GSD) para modificar significativamente la tasa de transcripción basal (vehículo), a juzgar por el análisis de la actividad enzimática de la CAT.

Tabla 3. Dosis efectivas (DE₅₀) de los compuestos para activar la transcripción

Compuesto	RE α (mol/L)	RE β (mol/L)
E ₂	1.79 X 10 ⁻¹¹	2.22 X 10 ⁻¹⁰
3 β ,5 α -NET	3.34 X 10 ⁻⁹	7.11 X 10 ⁻⁸
3 β ,5 α -LNG	5.02 X 10 ⁻⁹	-
3 β ,5 α -GSD	9.10 X 10 ⁻¹⁰	-

Estos resultados nos permiten apoyar las observaciones previas obtenidas del análisis de patrón de fragmentación enzimática de ambos subtipos de receptores estrogénicos en presencia o ausencia de ligandos naturales o sintéticos. El patrón caracterizado por la generación de una banda de 28 kDa en presencia de E₂, así como de los derivados tetrahidroreducidos de la NET, LNG y GSD, sugirieron la conformación agonista del receptor inducida por los ligandos únicamente para el caso del RE α y no del RE β . Estos hallazgos nos permitieron identificar ligandos con afinidades selectivas para el subtipo α del RE y la actividad fue corroborada por el análisis de su actividad transcripcional. Los estudios de FRET y del

reclutamiento de coactivadores fueron determinantes para establecer la conformación agonista del RE α activado, así como nos permitieron evaluar la significancia biológica de estos cambios, a través del reclutamiento de coactivadores en la estructura del receptor.

4. Cambios en los procesos de remodelamiento de la cromatina nuclear inducidos por ligandos agonistas y antagonistas

La unión del complejo receptor esteroide activado con los elementos de respuesta de genes sensibles a los estrógenos induce la interacción de complejos proteínicos que llevan a cabo el reclutamiento organizado de componentes de la maquinaria transcripcional y factores intermediarios. Este proceso se acompaña, entre otros, de modificaciones en la organización estructural de la cromatina, debido a la actividad enzimática de las proteínas coactivadoras o correpressoras que inducen descondensación o condensación de la cromatina, respectivamente (Fig. 28) (55, 56, 59). Las modificaciones de la estructura de la cromatina han sido utilizadas por diferentes investigadores para describir las propiedades agonistas o antagonistas de diferentes ligandos (69, 130). En la actualidad existen modelos que permiten estudiar en células vivas y en tiempo real los eventos que a nivel de la cromatina ocurren una vez que el complejo esteroide receptor activado interacciona con los elementos *cis* reguladores en la región promotora de genes sensibles (131). En términos generales, estos modelos consisten en la localización de la región promotora utilizando marcadores como el RE α fusionado con la proteína fluorescente GFP y a través de este analizar los cambios dinámicos que

ocurren a nivel de la cromatina (130). Este fenómeno puede ser visualizado y evaluado por microscopía de fluorescencia en células transfectadas con arreglos de promotores de mamíferos que establemente se incorporaron al DNA genómico (69).

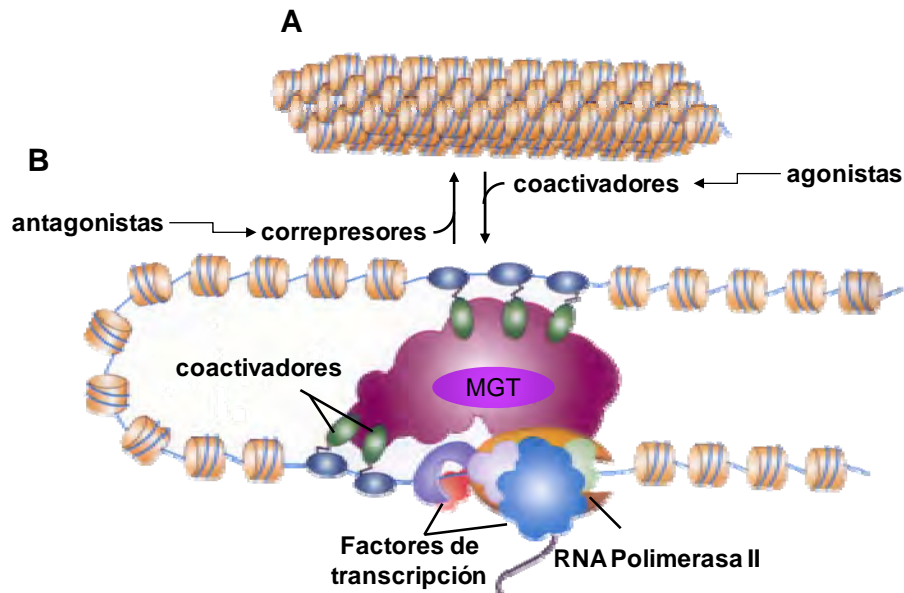


Figura 28. Cambios estructurales de la cromatina nuclear inducidos por el reclutamiento de reguladores a los receptores nucleares activados. A. La cromatina es modificada por acción de la actividad de proteínas correpresoras inducida por ligandos antagonistas. B: Ligandos agonistas inducen el reclutamiento de proteínas coactivadoras y la maquinaria general de transcripción (MGT) que descondensan a la cromatina para su lectura por la RNA polimerasa II (132).

Con la finalidad de evaluar los cambios dinámicos de la cromatina nuclear inducidos por ligandos naturales y sintéticos, se utilizó una línea celular (PRL-HeLa) establemente transfectada con el promotor conocido como Prolactin Pit-1 ID-ERE (Fig. 10), el cual contiene 5 elementos de respuesta hormonal al RE, además para Pit-1, factor regulador de la transcripción del gen de la prolactina, así

como transfectada transitoriamente con los vectores pEGFP-ER α (GFP-RE α) o pEYFP-ER β (YFP-RE β).

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos cuando las células PRL-HeLa expresando transitoriamente al GFP-RE α se incubaron en presencia o ausencia de los ligandos agonistas y antagonistas. Las imágenes de fluorescencia de la proteína de fusión GFP-RE α se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia y se analizaron con la paquetería ScionImage (Scion Corp. Frederick, MD, EU) a 528 nm. Para evitar artefactos debido a la sobre expresión de GFP-RE α se examinaron únicamente las células con niveles bajos de fluorescencia (por debajo del 10% de la población). Como puede observarse (Panel A), las células incubadas en presencia de E $_2$ o de 3 β ,5 α -GSD (10 $^{-8}$ M), como ejemplo de los compuestos tetrahidroreducidos de la 19 nortestosterona, mostraron cambios en los patrones de distribución de la fluorescencia, a nivel del núcleo celular, caracterizados por el incremento de la dispersión de la fluorescencia. Estos cambios, evaluados como el área de fluorescencia relativa (panel B), incrementaron aproximadamente 1.5 veces y fueron significativos comparados con el vehículo. Por el contrario, incubaciones en presencia de tamoxifeno (TAM), un antagonista del receptor de estrógenos, resultó en patrones de fluorescencia significativamente menores (0.7 veces) que los obtenidos con el vehículo. Estos resultados demostraron que el efecto agonista estrogénico se caracteriza por un patrón de dispersión de la fluorescencia indicativo de la descondensación de la cromatina nuclear y el efecto antagonista por el patrón de fluorescencia compactado indicativo de la condensación de la cromatina.

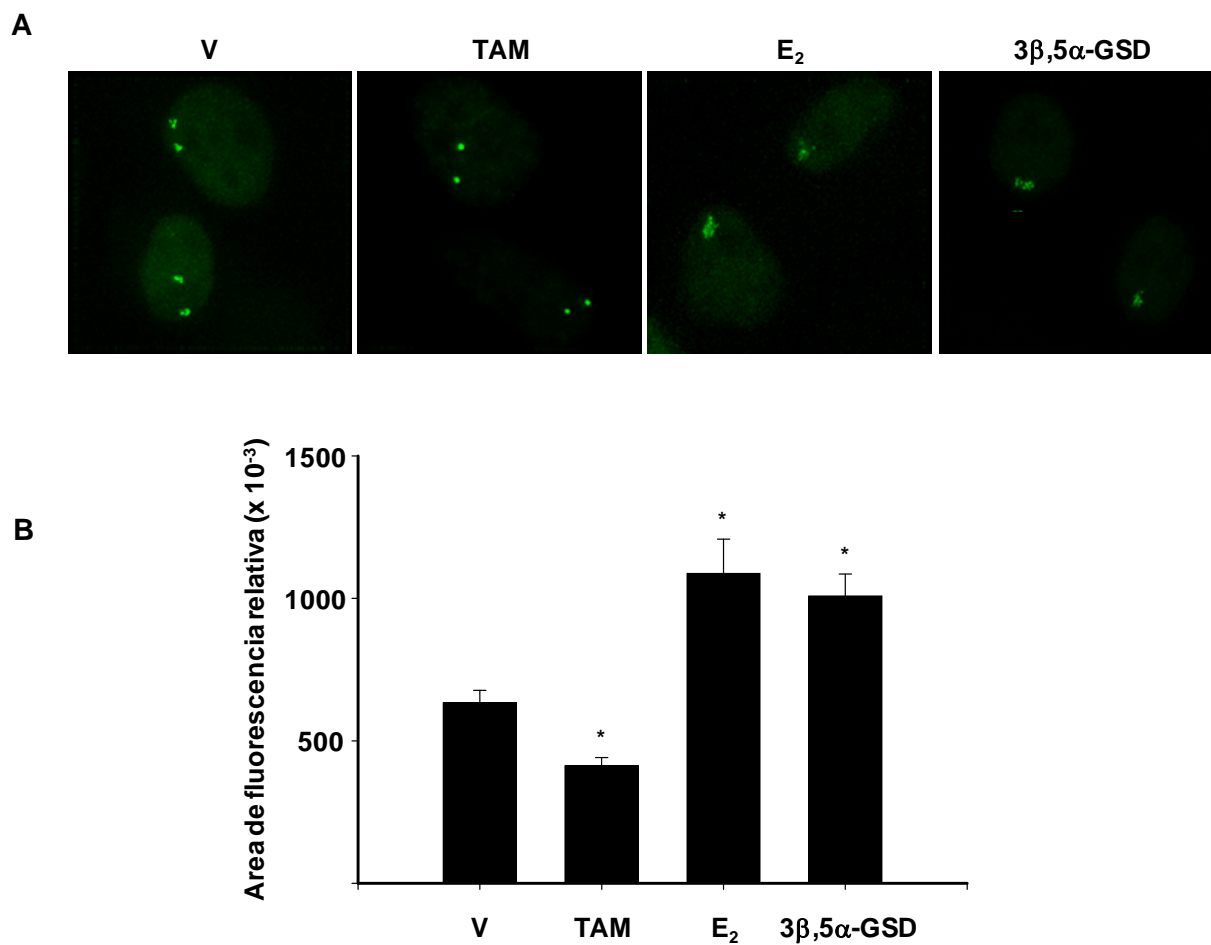


Figura 29. A) Cambios conformacionales de la cromatina nuclear en células PRL-HeLa incubadas en presencia de 10^{-8} M de E_2 , tamoxifeno (TAM) o $3\beta,5\alpha$ -GSD. B) Áreas de fluorescencia relativa inducida por los ligandos agonistas o antagonistas. La intensidad y el tamaño de la fluorescencia fueron cuantificadas usando un programa de microscopía especializado ScionImage ($n > 20$). Los valores son la media \pm el error estándar. * $P < 0.005$ vs V.

Las células incubadas en presencia de concentraciones crecientes de E_2 o $5\alpha,3\beta$ -GSD (10^{-10} M - 10^{-6} M) (Fig. 30, panel A) mostraron el aumento significativo, dosis dependiente, en las áreas de fluorescencia a nivel del promotor de PRL comparadas con las obtenidas en incubaciones control en ausencia del ligando (panel B). Las áreas de fluorescencia a juzgar por las curvas dosis respuesta generadas en presencia de E_2 y $3\beta,5\alpha$ -GSD no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Con la finalidad de establecer si los cambios observados obedecen a la participación de proteínas coactivadoras con actividad intrínseca de acetilación, como es el caso de la SRC-1, se decidió estudiar la presencia de este coactivador a través de la incubación con anticuerpos específicos anti-SRC-1 y visualizados con anticuerpos secundarios de anti conejo conjugados a Alexa Fluor-555 y analizados por microscopía fluorescente a 685 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 31. Como puede observarse la adición de E_2 y $3\beta,5\alpha$ -GSD a la concentración de 10^{-8} M resultó en un patrón agonista en la colocalización del coactivador (SRC-1) similar al observado cuando el análisis se efectuó a 528 nm (GFP-RE α). Las células PRL-HeLa no transfectadas con el RE α (no GFP-RE α) no presentaron las señales de colocalización, demostrando la funcionalidad del GFP-RE α . Por otra parte, los resultados obtenidos con tamoxifeno mostraron la colocalización de SRC-1 pero sin los cambios dinámicos de la cromatina observados con E_2 y el ligando sintético.

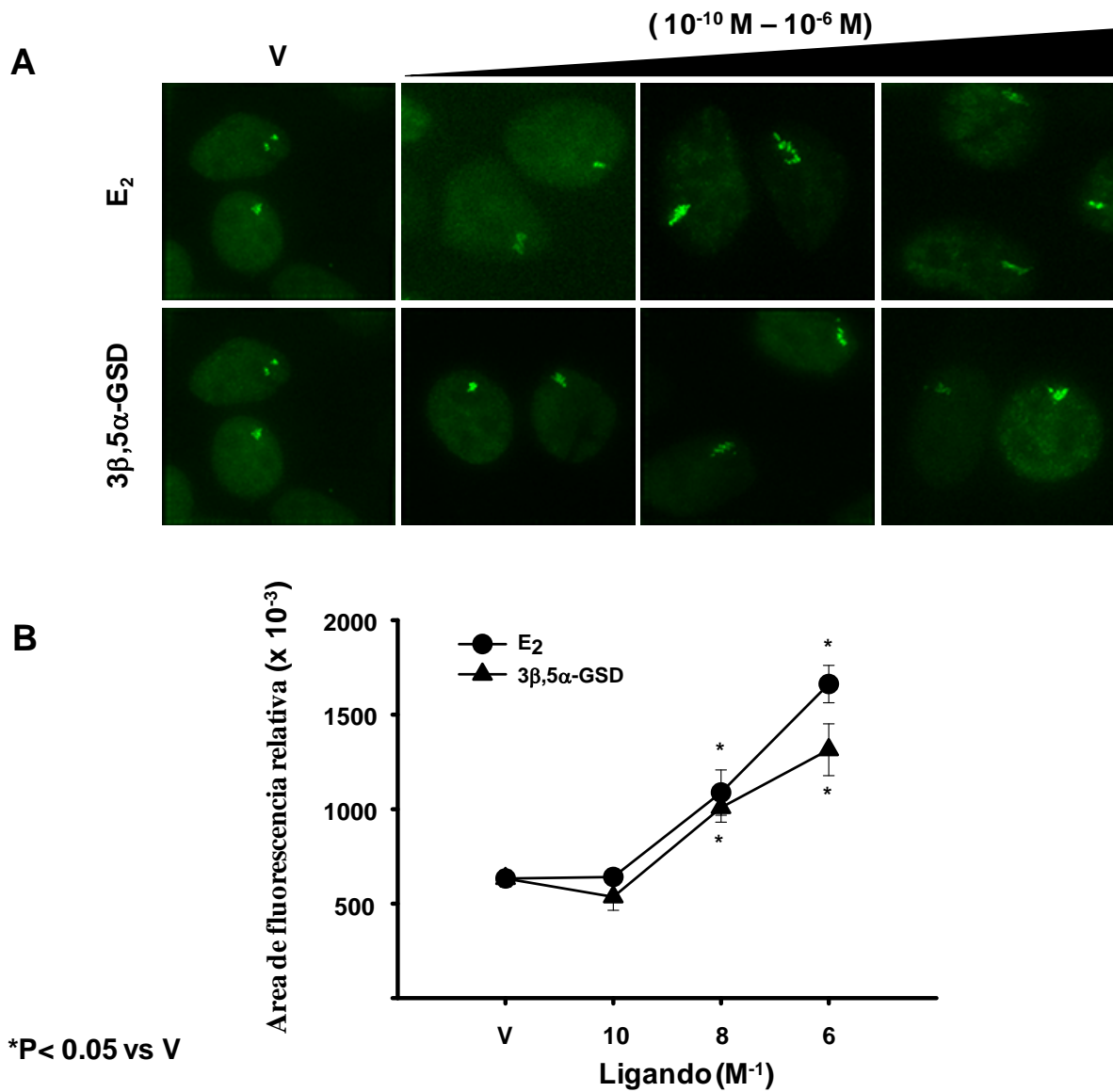


Figura 30. A) Cambios conformacionales de la cromatina nuclear en células PRL-HeLa incubadas en presencia de concentraciones crecientes de E₂ o 3β,5α-GSD. B) Curva dosis respuesta de las áreas de fluorescencia relativa. *P < 0.05 vs V.

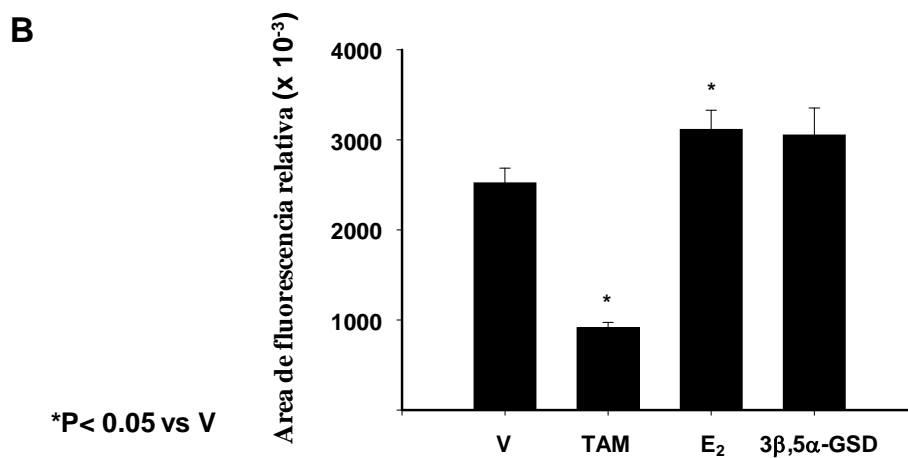
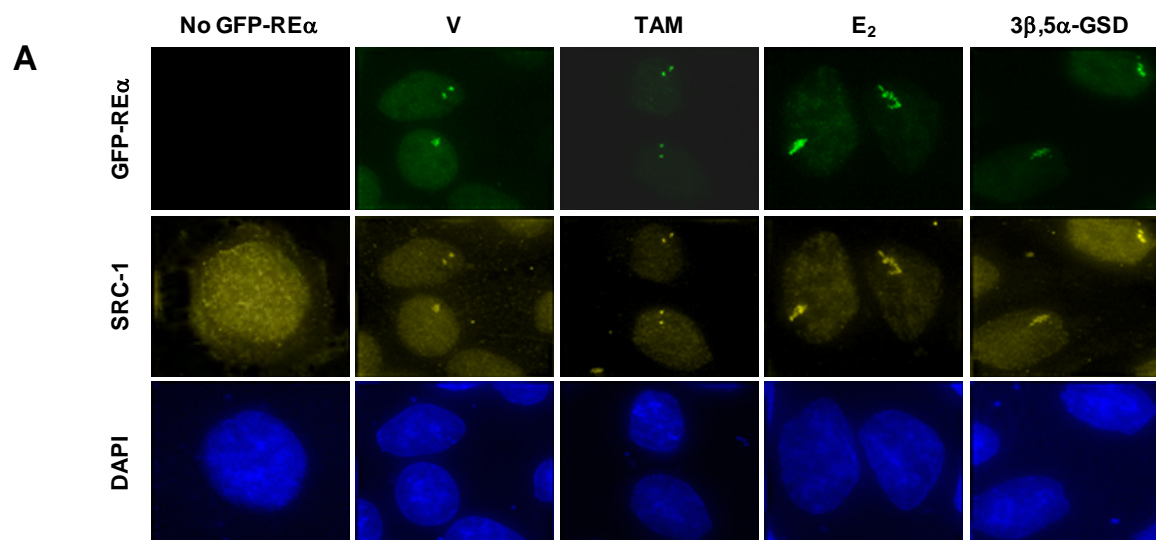


Figura 31. A) Colocalización del coactivador SRC-1 en células PRL-HeLa en presencia del ligando natural y del sintético, así como del antagonista (TAM) (10^{-8} M). B) Areas de fluorescencia relativa para SRC-1 obtenidas con E₂ y 3 β ,5 α -GSD. La tinción con DAPI demuestra la localización nuclear de estos eventos. * $P < 0.05$ vs V.

Los análisis comparativos de las imágenes de fluorescencia con los patrones de tinción con DAPI, demostraron la localización nuclear de los cambios dinámicos observados (descondensación, condensación y colocalización). Se esperaría que el resultado de estos efectos moleculares en este sistema de análisis dependiente de ligandos agonistas trascendieran en la generación de un ciclo productivo a nivel transcripcional (síntesis de RNAm) y no sólo reflejar la ocurrencia de eventos al azar no productivos. A este respecto, se decidió investigar la colocalización de la RNA polimerasa II a nivel del arreglo del promotor como un evento indicativo de activación de la transcripción génica.

Estos estudios se llevaron a cabo de manera similar a los descritos para la colocalización de SRC-1. Las células PRL-HeLa fueron incubadas en presencia de anticuerpos específicos anti-RNA polimerasa II y el complejo visualizado con anticuerpos secundarios de anti ratón IgG conjugados con Alexa Fluor-647 y analizados por microscopía de fluorescencia a 617 nm (Fig. 32).

La incubación de las células PRL-HeLa con E_2 o $3\beta,5\alpha$ -GSD a la concentración de 10^{-8} M mostró de manera similar a SRC-1 la presencia de la RNA polimerasa II a nivel del arreglo del promotor e incrementó aproximadamente 2 veces comparado con el vehículo. La incubación en presencia de TAM no mostró reacción inmunológica con el anticuerpo específico, sugiriendo la conformación de una estructura tridimensional antagonista, muy probablemente secundaria al reclutamiento de proteínas correpresoras (deacetilación de las proteínas histonas y la condensación de la cromatina nuclear) (130). La presencia de actividad inmunológica en las células incubadas en ausencia del ligando, así como en

aquellas no transfectadas con el RE α , podría ser también indicativa de la ocurrencia de eventos de asociación casuales y por lo tanto desde el punto de vista transcripcional no productivos (55, 129). De manera similar a SRC-1, la localización de los cambios dinámicos visualizados a través de la colocación de la RNA polimerasa II fue a nivel nuclear, a juzgar por el patrón de tinción con DAPI de las células PRL-HeLa. Estos resultados demuestran que el sistema utilizado para analizar la naturaleza agonista o antagonista de los ligandos selectivos, incluyendo al ligando natural y al antagonista, son representativos de los cambios que se suceden a nivel molecular y responsables del mecanismo de acción a nivel genómico de los receptores nucleares. Así, las modificaciones observadas en la cromatina nuclear fueron indicativas de una serie ordenada de interacciones proteína-proteína que condujeron al acoplamiento de la RNA polimerasa II al complejo inicial de transcripción génica. Los resultados sugieren que los ligandos sintéticos tetrahidroreducidos de la 19 nortestosterona modifican la tasa de transcripción génica a través de interaccionar con el RE α de una manera similar al E₂.

Con la finalidad de corroborar la selectividad en la interacción de los compuestos sintéticos de la serie 19 nortestosterona con el RE α , se decidió estudiar a las células PRL-HeLa transfectadas con el RE β . Las incubaciones, condiciones y el análisis de los resultados fueron similares a lo descrito para las células PRL-HeLa transfectadas con el RE α . Como puede observarse en la figura 33, incubaciones en presencia del ligando natural resultaron en un patrón de distribución del YFP-RE β que sugirió un patrón agonista de la descondensación de la cromatina similar

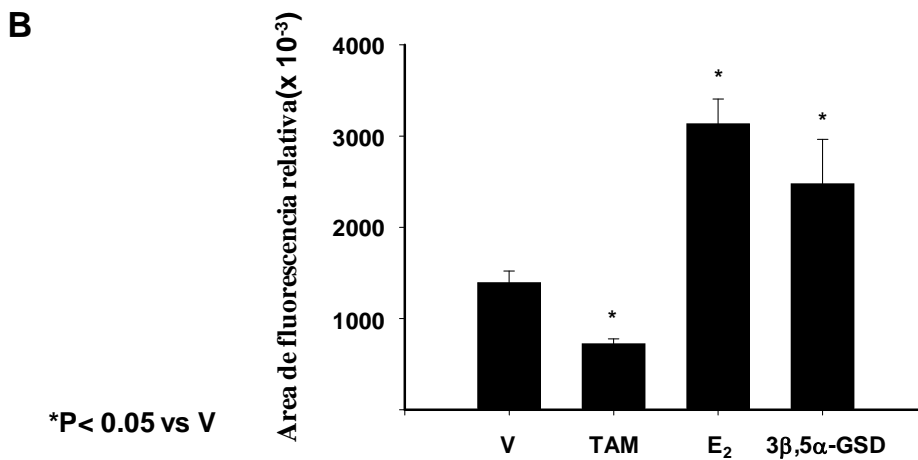
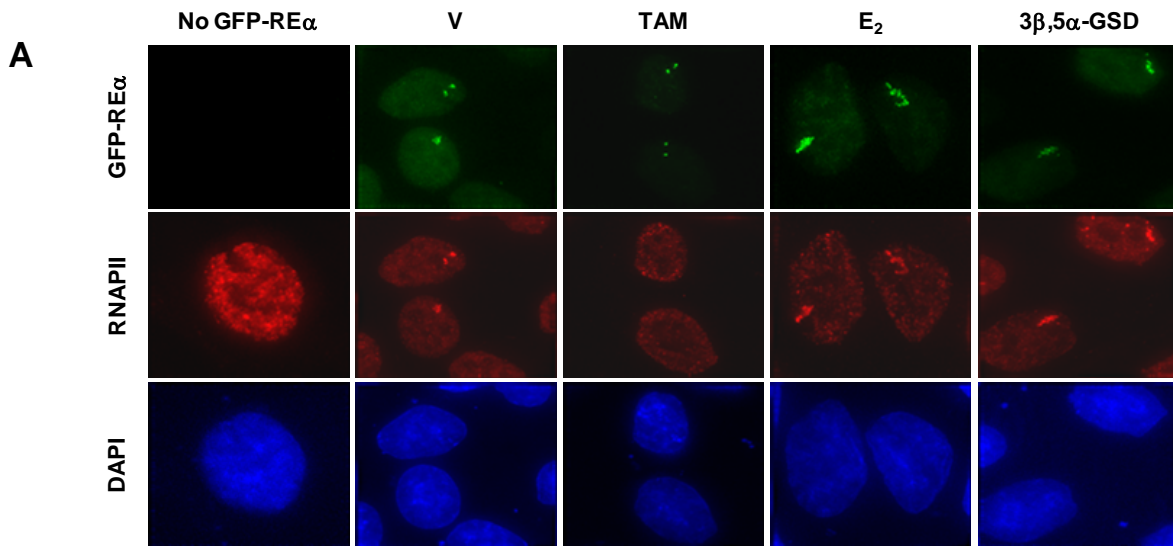


Figura 32. A) Colocalización de la RNA polimerasa II (RNAPII) en células PRL-HeLa en presencia de ligandos naturales y sintéticos, así como del antagonista (TAM) (10^{-8} M). B) Las áreas de fluorescencia relativa para RNAPII inducidas por E₂ y 3 β ,5 α -GSD. La tinción con DAPI demuestra la localización nuclear de estos eventos. *P < 0.05 vs V.

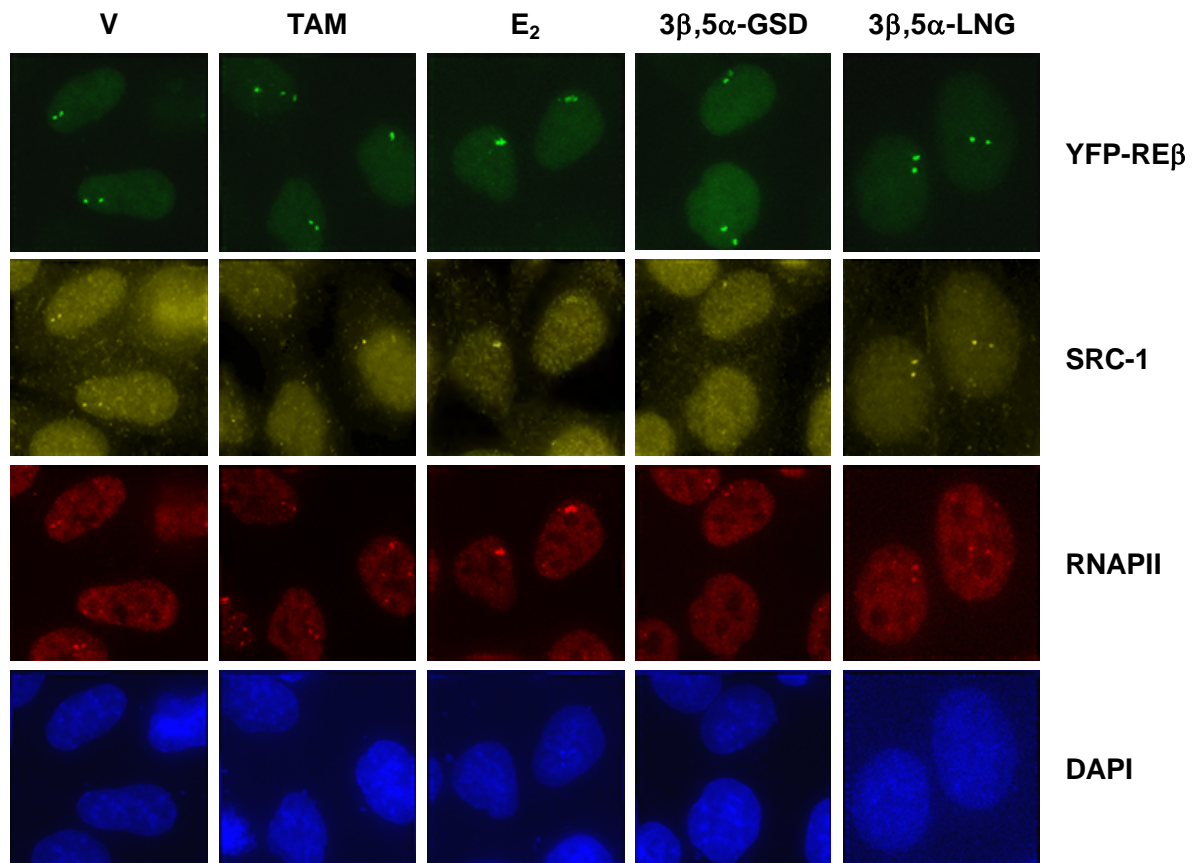


Figura 33. Cambios conformacionales de la cromatina nuclear y colocación de YFP-REβ, SRC-1 y RNAPII inducidos por ligandos agonistas naturales y sintéticos en células transfectadas con YFP-REβ. Nótese las diferencias en los patrones de fluorescencia relativa con E₂ y los compuestos 3β,5α-GSD, 3β,5α-LNG indicando la falta de interacción de este ligando sintético con el dominio de unión del YFP-REβ.

al obtenido con el RE α . Sin embargo, y a diferencia de lo observado con el RE α , las células PRL-HeLa expresando transitoriamente el YFP-RE β e incubadas en presencia de los ligandos sintéticos 3 β ,5 α -GSD o 3 β ,5 α -LNG no mostraron un patrón sugestivo de descondensación de la cromatina nuclear. Los resultados fueron similares cuando se analizó la colocalización del coactivador SRC-1 y la RNA polimerasa II, respectivamente. Los resultados obtenidos en células HeLa transfectadas con RE β corroboraron de manera indiscutible las observaciones iniciales sobre la naturaleza selectiva de los ligandos sintéticos.

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización farmacomolecular de compuestos sintéticos con efectos multihormonales secundarios o no a su biotransformación a metabolitos con la facultad de interaccionar con diferentes receptores nucleares. Tal es el caso de los derivados de la 19 nortestosterona los que al ser reducidos en el anillo A de la molécula a compuestos tetrahidroreducidos adquieren la habilidad de interaccionar con los receptores para hormonas con actividad estrogénica y a través de estos ejercer efectos biológicos diferentes a sus correspondientes compuestos neutros no reducidos (49, 50, 107). Las estrategias experimentales utilizadas en este estudio se basaron en el conocimiento actual que se tiene sobre los eventos moleculares responsables del mecanismo de acción a nivel genómico de las hormonas esteroides (activación, conformación, reclutamiento de proteínas correguladoras, descondensación de la cromatina, transcripción, etc...) y así el diseño de modelos para el análisis de los eventos moleculares que ocurren durante la señalización intracelular del complejo hormona receptor.

Para el análisis de las modificaciones conformacionales de los receptores para hormonas inducidas por varios derivados sintéticos de la 19 nortestosterona, se utilizó el análisis de los patrones de digestión enzimática de los receptores nucleares expresados *in vitro*. Los resultados obtenidos demostraron que los compuestos NET, LNG y GSD, se comportan de manera similar que la DHT y la P₄ por lo que les confiere un comportamiento agonista de naturaleza tanto

androgénico como progestacional. Estos resultados corroboran y extienden observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio de las diferentes propiedades hormonales de los derivados de la 19 nortestosterona (109). Por otra parte, la observación de que sólo los ligandos sintéticos ($3\beta,5\alpha$ -NET, -LNG y -GSD) mostraron un patrón de digestión similar al E_2 en presencia del $RE\alpha$, sin ningún efecto sobre el $RE\beta$, indicó efectos estrogénicos selectivos de estos compuestos sobre la conformación del receptor. Estos resultados apoyan observaciones previas en los que se demostró que los compuestos tetrahidroreducidos interaccionan con el receptor de estrógenos (107-109). Estos hallazgos permitieron identificar algunos dominios en estos ligandos sintéticos responsables de la selectividad de interacción entre los dos subtipos del receptor. Al respecto, es bien conocido que la capacidad de compuestos C-19 de interaccionar con los receptores estrogénicos depende, además de su aromatización, de la reducción del anillo A de la molécula (133), como es el caso, del derivado tetrahidroreducido de la testosterona ($3\beta,5\alpha$ -androstane-3,20-diol). Este compuesto interacciona con ambos subtipos del RE (22, 134) por lo que se deduce que la reducción en C-3 y C-5 no participa en las propiedades selectivas del ligando. Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que la naturaleza selectiva de los compuestos derivados de la 19 nortestosterona radica más en la adición de un grupo etinilo en C-17 y la demetilación en C-19 de la molécula de la testosterona (133). Estos hallazgos representan la primera observación en la literatura de la identificación de compuestos esteroidales con la capacidad de

interaccionar selectivamente con el RE α y motivó la caracterización a nivel molecular de la dinámica de tal interacción.

Con la finalidad de evaluar la interacción espacial entre las funciones activadoras (AF1 y AF2) del RE, se construyó un modelo que se basa en la transferencia de energía entre dos fluoróforos. Este enfoque experimental conocido como transferencia de energía por fluorescencia resonante (FRET, fluorescence resonance energy transfer) se refiere a la transferencia de energía de un fluoróforo donador excitado a un fluoróforo aceptor, vía su aproximación espacial, conduciendo a la reducción en la intensidad fluorescente del donador con un aumento concomitante en la intensidad del aceptor. La transferencia de energía requiere del empalme del espectro de emisión del donador con el espectro de excitación del aceptor (115). Estas características hacen del FRET una metodología eficiente para estudiar los cambios conformacionales que ocurren en el receptor en respuesta a su interacción con el ligando (Fig. 7). Con la finalidad de obtener proteínas de fusión funcionales se diseñaron diferentes vectores de expresión que contienen el RE α fusionado a proteínas fluorescentes y se evaluó la actividad biológica de cada producto de expresión (Fig. 13). La caracterización de los productos de expresión demostró que las proteínas de fusión que tienen insertada una secuencia de siete aminoácidos en las regiones amino y/o carboxilo terminal del receptor (CERY 7-7, CER-Y 7-26 o YERC 7-7), conservan sus propiedades inmunológicas, de afinidad de unión del estradiol, de localización nuclear e inducen la transcripción del gen reportero en respuesta a estradiol. Sin embargo, las proteínas de fusión que contienen espaciadores con mayor número

de aminoácidos entre el receptor y las proteína fluorescente (CERY 20-26 o YERC 20-26) no se expresaron en células en cultivo a juzgar por los estudios de inmunoelectrotransferencia, posiblemente debido a que la longitud de los aminoácidos entre el receptor y las proteínas fluorescentes es demasiado grande y no permite el procesamiento y/o funcionamiento adecuado de la proteína. La caracterización funcional de los diferentes vectores quiméricos nos permitieron seleccionar a la proteína de fusión CERY (7-7) para la evaluación de los cambios dinámicos estructurales del receptor dependientes del E_2 o de los ligandos sintéticos. Utilizando esta proteína de fusión los análisis de transferencia de energía del fluoróforo donador al fluoróforo aceptor en presencia de E_2 permitieron establecer los cambios en la estructura terciaria del receptor, que por localización de los fluoróforos donador y aceptor en los dominios del receptor (AF1 y AF2), sugirieron el plegamiento de la molécula y por lo tanto la asociación espacial entre los dominios de las funciones activadoras localizadas en el amino y carboxilo terminal, respectivamente. La obtención de este modelo experimental permitió evaluar bajo condiciones fisiológicas los cambios conformacionales del $RE\alpha$ de compuestos sintéticos con actividad estrogénica, como los derivados de la 19 nortestosterona. Los cambios estructurales obtenidos con los ligandos sintéticos como el $3\beta,5\alpha$ -NET fueron similares a los obtenidos con E_2 . Estos resultados sugieren la configuración agonista del receptor condicionada por el ligando. A diferencia de otros estudios (117), la utilización de la estructura completa del receptor para su análisis conformacional permitirá la identificación y caracterización de ligandos agonistas tanto naturales como sintéticos para

establecer de manera selectiva el papel funcional de los subtipos del RE. Este modelo podrá aplicarse a otros receptores nucleares con la finalidad de discriminar la naturaleza agonista/antagonista de diferentes ligandos sintéticos y naturales.

La habilidad de los ligandos para alterar la conformación estructural del receptor tiene un papel crítico en la regulación de sus interacciones con proteínas correguladoras, las cuales modifican la estructura de la cromatina y modulan la expresión de los genes (55, 56, 59). La unión de ligandos agonistas inducen cambios que ocurren principalmente en la conformación del dominio de unión al ligando que se traducen en el reclutamiento de proteínas coactivadoras. Los coactivadores mejor estudiados son aquellos pertenecientes a la familia de la p160/SRC, los que contienen una región conservada que consiste en una secuencia de aminoácidos (LXXLL; L por leucina y X por cualquier aminoácido) conocida como la caja NR, la que interacciona con el receptor activo (83, 84). Las proteínas p160/SRC proveen la plataforma para el reclutamiento de otros coactivadores entre los que se incluyen las proteínas de la familia p300/CBP, que en conjunto modifican la estructura de la cromatina (descondensación) e incrementan la actividad transcripcional. Con la finalidad de conocer si los cambios conformacionales ligando inducibles del receptor conducen al reclutamiento de proteínas coactivadoras como SRC-1 o CBP se utilizó el sistema de dos híbridos para la evaluación de la interacción proteína-proteína. Los resultados demostraron que los tres ligandos sintéticos promueven el reclutamiento de SRC-1 y CBP con eficiencia similar al E₂, sugiriendo que estos compuestos modifican estructuralmente al receptor de manera similar al ligando natural. Estos cambios

se traducen en los efectos biológicos esperados como el resultado de la asociación de varios eventos moleculares, incluyendo el reclutamiento de proteínas coactivadoras y la activación de la transcripción génica.

Como se mencionó anteriormente, otro de los eventos moleculares en el mecanismo de acción de los receptores nucleares son las modificaciones estructurales de la cromatina. Estas modificaciones puede ser visualizadas y evaluadas por microscopía de fluorescencia en células transfectadas con arreglos de promotores de mamíferos que establemente se incorporaron al DNA genómico (69). Este modelo, a diferencia de otros, permite evaluar en células vivas los cambios dinámicos en tiempo real, de la cromatina inducidos tanto por ligandos agonistas como antagonistas. Los resultados utilizando este modelo demostraron y confirmaron la naturaleza agonista selectiva de los ligandos sintéticos reducidos de la 19 nortestosterona al inducir modificaciones en la estructura de la cromatina (descondensación) a través del $RE\alpha$ de manera similar al ligando agonista natural. Además, las modificaciones observadas en la cromatina nuclear inducida por los ligandos sintéticos fueron indicativas de una serie ordenada de interacciones proteína-proteína que condujeron al reclutamiento de la SRC-1 y al acoplamiento de la RNA polimerasa II al complejo inicial de transcripción génica, como se demostró con los estudios de colocalización.

Considerando los resultados obtenidos en los que se demostró que los ligandos sintéticos ($3\beta,5\alpha$ -NET, -LNG y -GSD) tienen la habilidad de activar la transcripción de genes reporteros a través del $RE\alpha$, con poca o nada de actividad transcripcional a través del $RE\beta$, se sugiere fuertemente que estos ligandos

sintéticos modifican la tasa de transcripción génica a través de inducir una conformación agonista del receptor para el caso del RE α y no del RE β . Además, los estudios de FRET y del reclutamiento de coactivadores fueron determinantes para establecer la conformación agonista del RE α y permitieron evaluar la significancia biológica de estos cambios, a través del reclutamiento de coactivadores en la estructura del receptor. Estas observaciones sugieren que la composición primaria de los elementos que participan en la conformación final de la maquinaria de transcripción se encuentra lista para modificar la cromatina nuclear (acetilación de las proteínas histonas) (75, 135), así como incorporar la asociación de la RNA polimerasa II y con esto dar inició a un ciclo transcripcionalmente productivo (síntesis de RNA) (Fig. 28).

Los resultados con el reclutamiento de coactivadores y las alteraciones en la estructura de la cromatina inducidas por los ligandos sintéticos fueron similares a los obtenidos con el ligando natural. Sin embargo, la potencia transcripcional de las progestinas derivadas de la 19 nortestosterona a través del RE α fue significativamente menor que la del E $_2$. No obstante, todas las respuestas de los ligandos sintéticos ocurrieron a dosis fisiológicas. Las diferencias entre la potencia transcripcional con la eficacia para el reclutamiento de correguladores y los cambios en la estructura de la cromatina podrían tener varias explicaciones; sin embargo, estas son probablemente debidas a las interacciones preferenciales intrínsecas del evento molecular evaluado.

Como es bien conocido, la expresión de los subtipos del RE es tejido específica. Por ejemplo, el RE α se expresa predominantemente en el útero, vagina, y núcleo

arcuato, a diferencia del RE β cuya expresión es en órganos como el pulmón, la próstata, el ovario y células de la granulosa. Sin embargo, en otros tejidos, como el hueso y la hipófisis se expresan ambos subtipos del RE (22, 136). El papel de los subtipos del RE se ha investigado a través del uso de técnicas de deleción génica, mismas que han permitido la generación de ratones carentes del RE (REKO) (137-140), en donde la deleción de uno o ambos receptores de estrógenos puede ser correlacionada con los fenotipos y cambios en los efectos de estrógenos en diferentes tejidos. Aunque el análisis de ratones REKO ha sido clave para ampliar el entendimiento en el papel fisiológico de los estrógenos, este enfoque tiene sus inconvenientes. Por ejemplo, no se pueden separar los efectos de los estrógenos en el desarrollo, de aquellos de la edad adulta. Además, algunas respuestas biológicas pueden ocurrir como consecuencia de variantes de transcritos para el RE α en algunos RE α KO (141). Por lo que los estrógenos sintéticos selectivos a los subtipos del RE son potencialmente útiles como herramientas para elucidar el papel fisiológico del RE α y el RE β , considerando que estos compuestos pueden ser utilizados en animales en cualquier estado de su desarrollo. Así, los resultados obtenidos en esta tesis podrían complementar los estudios en los ratones REKO en ampliar los mecanismos de acción estrogénica. Por otra parte, el uso de ligandos sintéticos selectivos ofrece la oportunidad de identificar productos de expresión específicos dependientes del subtipo de receptor que se active. De esta manera, estudios utilizando los compuestos aquí descritos contribuirán a ampliar el conocimiento sobre los efectos biológicos derivados de los estrógenos y conducir al diseño de fármacos con beneficios

específicos y selectivos para la salud y prevenir los efectos secundarios indeseables derivados del uso de los mismos.

Consideramos que nuestras observaciones sobre la capacidad de los ligandos sintéticos de modificar la estructura del receptor, conduciendo a su reconocimiento por proteínas correguladoras y de esta manera modificar la transcripción génica por la acción de la RNA polimerasa II, selectivamente a través del RE α , representan una contribución significativa para el diseño y generación de nuevos fármacos o drogas con acciones selectivas o tejido específicos. Además, los enfoques moleculares descritos en este trabajo pueden ser aplicables para evaluar las propiedades hormonales de cualquier compuesto.

CONCLUSIONES

1. Los derivados de la 19 nortestosterona al ser reducidos en el anillo A de la molécula a compuestos tetrahidroreducidos adquieren la habilidad de interaccionar con los receptores para hormonas con actividad estrogénica y a través de estos ejercer efectos biológicos diferentes a sus correspondientes compuestos neutros no reducidos.
2. Los ligandos sintéticos tetrahidroreducidos ($3\beta,5\alpha$ -NET, -LNG y -GSD) inducen cambios conformacionales de naturaleza agonista del receptor similares a los obtenidos con el ligando natural. Estos cambios fueron selectivos para el $RE\alpha$.
3. Los cambios estructurales, a juzgar por el análisis de FRET, consistieron en la asociación espacial entre los dominios de las funciones activadoras (AF1 y AF2) localizadas en el amino y carboxilo terminal respectivamente.
4. La habilidad de los ligandos sintéticos para alterar la conformación terciaria del $RE\alpha$ conducen al reclutamiento de proteínas coactivadoras como SRC-1 o CBP, así como a la activación de la transcripción génica.
5. Los ligandos sintéticos reducidos de la 19 nortestosterona inducen modificaciones en la estructura de la cromatina (descondensación) a través del $RE\alpha$ de manera similar al ligando agonista natural.
6. Las modificaciones observadas en la cromatina nuclear inducidas por los ligandos sintéticos fueron indicativas de una serie ordenada de interacciones proteína-proteína (reclutamiento de la SRC-1 y acoplamiento de la RNA

polimerasa II al complejo inicial de transcripción génica). Estos efectos fueron selectivos para el RE α .

7. La capacidad de los ligandos sintéticos para modificar la estructura del RE α , incluyendo el reconocimiento por proteínas correguladoras y la modificación de la transcripción génica por la acción de la RNA polimerasa II, representa la contribución más significativa de este trabajo de tesis para el diseño y generación de nuevos fármacos o drogas con acciones selectivas o tejido específicas.

REFERENCIAS

1. **Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC** 2002 Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-352
2. **Jensen EV, Jacobsen HI** 1962 Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18:387-414
3. **Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P** 1986 Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139
4. **Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J** 1986 Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231:1150-1154
5. **Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA** 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930
6. **Mosselman S, Polman J, Dijkema R** 1996 ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53
7. **Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V** 1997 Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11:353-365
8. **Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA** 1997 Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265
9. **Friend KE, Resnick EM, Ang LW, Shupnik MA** 1997 Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. *Mol Cell Endocrinol* 131:147-155
10. **Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Coutts A, Watson P** 1998 The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:175-180
11. **Zhang QX, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Borg A** 1996 Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:251-260
12. **Metivier R, Penot G, Carmouche RP, Hubner MR, Reid G, Denger S, Manu D, Brand H, Kos M, Benes V, Gannon F** 2004 Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *Embo J* 23:3653-3666

13. **Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM** 1998 Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247:75-78
14. **Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M** 1998 Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26:3505-3512
15. **Tsai MJ, O'Malley BW** 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486
16. **Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang SM, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ** 1998 Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol* 12:1605-1618
17. **Beato M** 1989 Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344
18. **Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D** 1993 The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75:567-578
19. **Umesono K, Evans RM** 1989 Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57:1139-1146
20. **Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL** 1998 The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95:927-937
21. **Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS** 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621
22. **Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA** 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870
23. **Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA** 1998 Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263
24. **Gottardis MM, Robinson SP, Satyaswaroop PG, Jordan VC** 1988 Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res* 48:812-815
25. **Jordan VC, Robinson SP** 1987 Species-specific pharmacology of antiestrogens: role of metabolism. *Fed Proc* 46:1870-1874

26. **Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL** 1992 Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 326:852-856
27. **Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR** 1999 Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *Jama* 282:637-645
28. **Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, Farrerons J, Karasik A, Mellstrom D, Ng KW, Stepan JJ, Powles TJ, Morrow M, Costa A, Silfen SL, Walls EL, Schmitt H, Muchmore DB, Jordan VC, Ste-Marie LG** 2001 Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat* 65:125-134
29. **Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C** 1997 Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337:1641-1647
30. **Gruber C, Gruber D** 2004 Bazedoxifene (Wyeth). *Curr Opin Investig Drugs* 5:1086-1093
31. **Ke HZ, Qi H, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Simmons HA, Thompson DD** 2000 Lasofoxifene (CP-336,156), a selective estrogen receptor modulator, prevents bone loss induced by aging and orchidectomy in the adult rat. *Endocrinology* 141:1338-1344
32. **Suh N, Glasebrook AL, Palkowitz AD, Bryant HU, Burris LL, Starling JJ, Pearce HL, Williams C, Peer C, Wang Y, Sporn MB** 2001 Arzoxifene, a new selective estrogen receptor modulator for chemoprevention of experimental breast cancer. *Cancer Res* 61:8412-8415
33. **Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 1999 Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta. *Endocrinology* 140:800-804
34. **Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA** 2000 Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem* 43:4934-4947
35. **Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA** 1999 Estrogen receptor subtype-selective ligands: asymmetric synthesis and biological evaluation of cis- and trans-5,11-dialkyl- 5,6,11, 12-tetrahydrochrysenes. *J Med Chem* 42:2456-2468

36. **Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 2003 Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol* 206:13-22
37. **Vijaykumar D, Al-Qahtani MH, Welch MJ, Katzenellenbogen JA** 2003 Synthesis and biological evaluation of a fluorine-18 labeled estrogen receptor-alpha selective ligand: [18F] propyl pyrazole triol. *Nucl Med Biol* 30:397-404
38. **Compton DR, Sheng S, Carlson KE, Rebacz NA, Lee IY, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA** 2004 Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *J Med Chem* 47:5872-5893
39. **Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 2002 Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 143:941-947
40. **Walters MR, Dutertre M, Smith CL** 2002 SKF-82958 is a subtype-selective estrogen receptor-alpha (ERalpha) agonist that induces functional interactions between ERalpha and AP-1. *J Biol Chem* 277:1669-1679
41. **Kim S, Wu JY, Birzin ET, Frisch K, Chan W, Pai LY, Yang YT, Mosley RT, Fitzgerald PM, Sharma N, Dahllund J, Thorsell AG, DiNinno F, Rohrer SP, Schaeffer JM, Hammond ML** 2004 Estrogen receptor ligands. II. Discovery of benzoxathiins as potent, selective estrogen receptor alpha modulators. *J Med Chem* 47:2171-2175
42. **Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K** 2003 Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 51:7632-7635
43. **Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA** 2004 Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* 12:1559-1567
44. **Smith RA, Chen J, Mader MM, Muegge I, Moehler U, Katti S, Marrero D, Stirtan WG, Weaver DR, Xiao H, Carley W** 2002 Solid-phase synthesis and investigation of benzofurans as selective estrogen receptor modulators. *Bioorg Med Chem Lett* 12:2875-2878
45. **Richardson TI, Dodge JA, Wang Y, Durbin JD, Krishnan V, Norman BH** 2007 Benzopyrans as selective estrogen receptor beta agonists (SERBAs). Part 5: Combined A- and C-ring structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem Lett* 17:5563-5566
46. **Vu AT, Campbell AN, Harris HA, Unwalla RJ, Manas ES, Mewshaw RE** 2007 ERbeta ligands. Part 6: 6H-Chromeno[4,3-b]quinolines as a new series of estrogen receptor beta-selective ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 17:4053-4056

47. **Ullrich JW, Unwalla RJ, Singhaus RR, Jr., Harris HA, Mewshaw RE** 2007 Estrogen receptor beta ligands: design and synthesis of new 2-phenyl-isoindole-1,3-diones. *Bioorg Med Chem Lett* 17:118-122
48. **Mewshaw RE, Bowen SM, Harris HA, Xu ZB, Manas ES, Cohn ST** 2007 ERbeta ligands. Part 5: synthesis and structure-activity relationships of a series of 4'-hydroxyphenyl-aryl-carbaldehyde oxime derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 17:902-906
49. **Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F** 2002 The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor-alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82:333-341
50. **Larrea F, Garcia-Becerra R, Lemus AE, Garcia GA, Perez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL, Cooney AJ** 2001 A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER alpha. *Endocrinology* 142:3791-3799
51. **Smith DF, Toft DO** 1993 Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11
52. **Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 1993 Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* 7:1266-1274
53. **Fritsch M, Leary CM, Furlow JD, Ahrens H, Schuh TJ, Mueller GC, Gorski J** 1992 A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* 31:5303-5311
54. **Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai MJ, O'Malley BW** 1992 Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J Biol Chem* 267:19513-19520
55. **Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F** 2003 Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-763
56. **Glass CK, Rosenfeld MG** 2000 The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121-141
57. **McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW** 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344
58. **Robyr D, Wolffe AP, Wahli W** 2000 Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14:329-347
59. **Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG** 2002 Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab* 13:55-60
60. **McKenna NJ, O'Malley BW** 2002 Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-474

61. **Giangrande PH, McDonnell DP** 1999 The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 54:291-313; discussion 313-294
62. **Kuil CW, Berrevoets CA, Mulder E** 1995 Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. *J Biol Chem* 270:27569-27576
63. **Zeng Z, Allan GF, Thaller C, Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ** 1994 Detection of potential ligands for nuclear receptors in cellular extracts. *Endocrinology* 135:248-252
64. **Garcia-Becerra R, Cooney AJ, Borja-Cacho E, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F** 2004 Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91:21-27
65. **Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Smith CL, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F** 2006 Synthetic 19-nortestosterone derivatives as estrogen receptor alpha subtype-selective ligands induce similar receptor conformational changes and steroid receptor coactivator recruitment than natural estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99:108-114
66. **Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M** 1997 Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389:753-758
67. **Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M** 1999 Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *Embo J* 18:4608-4618
68. **Katzenellenbogen BS, Sun J, Harrington WR, Kraichely DM, Ganessunker D, Katzenellenbogen JA** 2001 Structure-function relationships in estrogen receptors and the characterization of novel selective estrogen receptor modulators with unique pharmacological profiles. *Ann N Y Acad Sci* 949:6-15
69. **Sharp ZD, Mancini MG, Hinojos CA, Dai F, Berno V, Szafran AT, Smith KP, Lele TP, Ingber DE, Mancini MA** 2006 Estrogen-receptor-alpha exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J Cell Sci* 119:4101-4116
70. **Beato M, Sanchez-Pacheco A** 1996 Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587-609
71. **Pike AC, Brzozowski AM, Walton J, Hubbard RE, Thorsell AG, Li YL, Gustafsson JA, Carlquist M** 2001 Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure (Camb)* 9:145-153

72. **Henttu PM, Kalkhoven E, Parker MG** 1997 AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 17:1832-1839
73. **Metivier R, Penot G, Flouriot G, Pakdel F** 2001 Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 15:1953-1970
74. **Kraus WL, McInerney EM, Katzenellenbogen BS** 1995 Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12314-12318
75. **Smith CL, O'Malley BW** 2004 Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25:45-71
76. **Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P** 1989 The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487
77. **Liu Z, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 2001 Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12426-12431
78. **Chen D, Huang SM, Stallcup MR** 2000 Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* 275:40810-40816
79. **Klinge CM** 2000 Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65:227-251
80. **Fondell JD, Ge H, Roeder RG** 1996 Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8329-8333
81. **Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 1999 The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:1182-1189
82. **Bramlett KS, Wu Y, Burris TP** 2001 Ligands specify coactivator nuclear receptor (NR) box affinity for estrogen receptor subtypes. *Mol Endocrinol* 15:909-922
83. **Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG** 1997 A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733-736
84. **McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG** 1998 Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12:3357-3368

85. **Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-1357
86. **Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H** 1996 TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* 15:3667-3675
87. **Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR** 1997 GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17:2735-2744
88. **Li H, Gomes PJ, Chen JD** 1997 RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8479-8484
89. **Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM** 1997 Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90:569-580
90. **Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Glass B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG** 1996 A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403-414
91. **Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG** 1997 The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387:677-684
92. **Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS** 1997 AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-968
93. **Takeshita A, Yen PM, Misiti S, Cardona GR, Liu Y, Chin WW** 1996 Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137:3594-3597
94. **Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW** 1998 Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2920-2925
95. **Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB** 1997 The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11:693-705
96. **Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW** 1997 Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11:657-666

97. **Dotzlaw H, Moehren U, Mink S, Cato AC, Iniguez Lluhi JA, Baniahmad A** 2002 The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol* 16:661-673
98. **Schulz M, Eggert M, Baniahmad A, Dostert A, Heinzl T, Renkawitz R** 2002 RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. *J Biol Chem* 277:26238-26243
99. **Shang Y, Brown M** 2002 Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295:2465-2468
100. **Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M** 2000 Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-852
101. **Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al.** 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404
102. **Chen JD, Umesono K, Evans RM** 1996 SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7567-7571
103. **Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG** 1999 Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13:3198-3208
104. **Huang HJ, Norris JD, McDonnell DP** 2002 Identification of a negative regulatory surface within estrogen receptor alpha provides evidence in support of a role for corepressors in regulating cellular responses to agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* 16:1778-1792
105. **Perez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Perez AE** 1981 Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem* 15:125-130
106. **Larrea F, Escobar N, Garza Flores J, Moctezuma O, Martinez-Campos A, Perez-Palacios G** 1983 Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vivo administration of norethisterone: an alternate mechanism for gonadotropin inhibition. *J Steroid Biochem* 19:1747-1752
107. **Larrea F, Vilchis F, Chavez B, Perez AE, Garza-Flores J, Perez-Palacios G** 1987 The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem* 27:657-663
108. **Vilchis F, Chavez B, Perez AE, Garcia GA, Angeles A, Perez-Palacios G** 1986 Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J Steroid Biochem* 24:525-531

109. **Chavez BA, Vilchis F, Perez AE, Garcia GA, Grillasca I, Perez-Palacios G** 1985 Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22:121-126
110. **Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chavez BA, Garcia GA, Grillasca I, Perez-Palacios G** 1992 Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:881-890
111. **Lemus AE, Zaga V, Santillan R, Garcia GA, Grillasca I, Damian-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F, Perez-Palacios G** 2000 The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J Endocrinol* 165:693-702
112. **Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW** 1999 Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1858-1862
113. **Coleman KM, Dutertre M, El-Gharbawy A, Rowan BG, Weigel NL, Smith CL** 2003 Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J Biol Chem* 278:12834-12845
114. **Schmid JA, Sitte HH** 2003 Fluorescence resonance energy transfer in the study of cancer pathways. *Curr Opin Oncol* 15:55-64
115. **Selvin PR** 1995 Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* 246:300-334
116. **Stryer L** 1978 Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 47:819-846
117. **De S, Macara IG, Lannigan DA** 2005 Novel biosensors for the detection of estrogen receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96:235-244
118. **Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY** 1997 Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882-887
119. **Burbach JP, Lopes da Silva S, Cox JJ, Adan RA, Cooney AJ, Tsai MJ, Tsai SY** 1994 Repression of estrogen-dependent stimulation of the oxytocin gene by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I. *J Biol Chem* 269:15046-15053
120. **Bai Y, Giguere V** 2003 Isoform-selective interactions between estrogen receptors and steroid receptor coactivators promoted by estradiol and ErbB-2 signaling in living cells. *Mol Endocrinol* 17:589-599
121. **Llopis J, Westin S, Ricote M, Wang Z, Cho CY, Kurokawa R, Mullen TM, Rose DW, Rosenfeld MG, Tsien RY, Glass CK** 2000 Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4363-4368

122. **Vaca L, Sampieri A** 2002 Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem* 277:42178-42187
123. **Feige JN, Sage D, Wahli W, Desvergne B, Gelman L** 2005 PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microsc Res Tech* 68:51-58
124. **Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B** 1998 Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 74:2702-2713
125. **Xia Z, Liu Y** 2001 Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J* 81:2395-2402
126. **Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW** 2000 The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 5:939-948
127. **Agard DA, Hiraoka Y, Shaw P, Sedat JW** 1989 Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol* 30:353-377
128. **Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA** 2000 Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 14:518-534
129. **Metivier R, Reid G, Gannon F** 2006 Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep* 7:161-167
130. **Nye AC, Rajendran RR, Stenoien DL, Mancini MA, Katzenellenbogen BS, Belmont AS** 2002 Alteration of large-scale chromatin structure by estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 22:3437-3449
131. **Hinojos CA, Sharp ZD, Mancini MA** 2005 Molecular dynamics and nuclear receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 16:12-18
132. **Lodish H BA, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J** 2005 Control transcripcional de la expresión génica. In: C.V. EMPSAD ed. *Biología Celular y Molecular*. 5a ed. Buenos Aires; 448
133. **Thieulant ML, Samperez S, Jouan P** 1981 Evidence for 5 alpha-androstane-3 beta, 17 beta-diol binding to the estrogen receptor in the cytosol from male rat pituitary. *Endocrinology* 108:1552-1560
134. **Perez-Palacios G, Santillan R, Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Larrea F, Damian-Matsumura P, Gonzalez L, Lemus AE** 2006 Enhanced formation of non-phenolic androgen metabolites with intrinsic oestrogen-like gene transactivation potency in human breast cancer cells: a distinctive metabolic pattern. *J Endocrinol* 190:805-818
135. **Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 1997 Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389:194-198

136. **Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA** 1998 The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19:253-286
137. **Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O** 1993 Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11162-11166
138. **Couse JF, Korach KS** 1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417
139. **Krege JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O** 1998 Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15677-15682
140. **Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS** 1999 Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286:2328-2331
141. **Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O, Korach KS** 1995 Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 9:1441-1454

ANEXOS

Contribuciones científicas generadas por la postulante durante la realización del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM.

1. **García-Becerra R**, Cooney AJ, Borja-Cacho E, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 91(1-2):21-27.
2. **García-Becerra R**, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Smith CL, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. Synthetic 19-nortestosterone derivatives as estrogen receptor alpha subtype-selective ligands induce similar receptor conformational changes and steroid receptor coactivator recruitment than natural estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 99(2-3):108-114.
3. Pérez-Palacios G, Santillán R, **García-Becerra R**, Borja-Cacho E, Larrea F, Damián-Matsumura P, González L, Lemus AE. Enhanced formation of non-phenolic androgen metabolites with intrinsic oestrogen-like gene transactivation potency in human breast cancer cells: a distinctive metabolic pattern. *J Endocrinol.* 2006; 190(3):805-818.
4. González-Arenas A, Avendaño-Vázquez SE, Cabrera-Wrooman A, Tapia-Carrillo D, Larrea F, **García-Becerra R**, García-Sáinz JA. Regulation of LPA receptor function by estrogens. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783(2):253-62.

5. **Rocío García-Becerra**, Valeria Berno, Michael A. Mancini, David Ordaz-Rosado, Austin J. Cooney and Fernando Larrea. Ligand-induced large-scale chromatin modeling as a biosensor for the detection of estrogen receptor subtype selective ligands. Enviado, 2008.
6. Mención Honorífica en el área de Investigación Básica en el Premio CANIFARMA 2007.

Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins

Rocio García-Becerra^a, Austin J. Cooney^b, Elizabeth Borja-Cacho^a,
Ana E. Lemus^c, Gregorio Pérez-Palacios^d, Fernando Larrea^{a,*}

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Quiroga No. 15, México City 14000, Mexico

^b Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

^c Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

^d School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, Mexico

Received 18 December 2003; accepted 2 February 2004

Abstract

Synthetic 19-nortestosterone-derived progestins show affinity for the androgen receptor (AR) and retain varying degrees of androgenic activity. In this study, AR- and progesterone receptor (PR)-dependent transcriptional activation induced by norethisterone (NET), levonorgestrel (LNG) and gestodene (GSD), and their 5 α -reduced derivatives, including limited trypsin digestion of AR in the presence of natural and synthetic progestins were investigated. The results confirmed the progestogenic activity of the three 19-nortestosterone derivatives, which decreases after reduction of the 4-ene-double bond. These compounds were able to activate AR-dependent reporter gene expression, LNG and GSD being the stronger activators. 5 α -Reduction of LNG and GSD did not change their androgenic transcriptional activity; however, the activation of AR by 5 α -NET was four-fold higher than NET. The highest selectivity transcriptional index, as a measure of progestogenicity versus androgenicity, was obtained for NET. The 5 α -reduced derivatives had values significantly lower than those of their parent compounds. Non-reduced and 5 α -reduced 19-nortestosterone progestins induced virtually identical proteolysis fragmentation patterns of the AR to those observed with DHT.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Androgenic effects; Androgen receptor; Contraception; Gene expression; Synthetic progestins

1. Introduction

Oral contraceptives have been shown to induce metabolic changes, particularly in lipid and carbohydrate metabolism [1]. These metabolic disturbances are thought to be associated with the intrinsic androgenicity of progestins [2], which together with the androgenic cosmetic side-effects, represent the primary reasons for discontinuing their oral contraceptive use [3]. The androgenic potencies of synthetic progestins derived from 19-nortestosterone and their relative binding affinities for the AR have been previously reported [4–6]. In these studies, partial structural requirements for AR binding, such as the differential susceptibil-

ity of 19 nor-androgens/-progestins to 5 α -reduction, have been reported; however, they are still far from being well defined. In as much as selectivity index studies for the major progestins used in oral contraception showed significantly higher indices for the relatively new progestins, receptor binding studies do not allow differentiation between agonist or antagonist effects, including hormonal metabolism, pharmacokinetics and dynamics; therefore, observations made from binding parameters can only be taken as a relative reference for biological potency. In this study, AR- and PR-dependent transcriptional activation by 19-nortestosterone-derived progestins currently used in oral contraceptive formulations (levonorgestrel, norethisterone and gestodene) was compared as an experimental strategy to re-evaluate their corresponding progestational and androgenic potencies. In addition, limited proteolysis of *in vitro* produced human AR was used to study ligand-induced changes in receptor conformation.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 55 73 11 60; fax: +52 55 56 55 98 59.

E-mail address: larrea@sni.conacyt.mx (F. Larrea).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Non-radioactive progesterone (P), 5 α -dihydrotestosterone (DHT) and trypsin (type III) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). ³[H]chloramphenicol (specific activity 38.9 Ci/mmol) was purchased from DuPont NEN Research products (Boston, MA). Unlabeled RU486 (RU 38486, mifepristone) was a gift from Roussel Uclaf (Romainville, France). Radioactivity was determined in a Beckman LS6500 scintillation system (Beckman Instruments, CA) using Biodegradable Counting Scintillant (Amersham, CA) as counting solution. Cell culture medium was purchased from Life Technologies (Grand Island, NY). Fetal bovine serum (FBS) was from Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT). Authentic NET (17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-gonen-3-one) and LNG (13 β -ethyl-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-gonen-3-one) were kindly provided by Schering Mexicana, S.A. (Mexico City) and GSD (13 β -ethyl-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4,15-gonadien-3-one) by Schering AG (Berlin, Germany). Synthesis of the corresponding 5 α -dihydro (5 α -NET, 5 α -LNG and 5 α -GSD) metabolites, including the description of their physical and spectroscopic constants have been previously described [7–9]. All other solvents and reagents used were of analytical grade.

2.2. Plasmids

The pLEN-hPR_B was generated by inserting the full-length human PR_B cDNA into the *Bam*HI site of the pLEN vector as previously described [10]. The expression vector containing the coding sequence of the AR (pSVhAR.BHEXE) [11,12] was kindly provided by Dr. E.L. Young (National University of Singapore). The androgen and progesterone responsive reporter plasmid (PRE-E1b-CAT) contains an oligonucleotide containing a progesterone/androgen response element upstream of the adenovirus E1b TATA box fused to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene as previously described [10,13].

2.3. Transfections and reporter gene assays

HeLa cells were plated the day before transfections, at a density of 2.5×10^5 cells/well/six-well plate as previously described [10]. Transfections were performed in triplicate using PolyFect™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA) according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly: serum-free media (0.1 ml) was aliquoted and DNA added (1 μ g of the reporter gene plasmid and 0.025–0.5 μ g of the expression vector depending upon whether AR or PR assays were being performed), after vortexing, 10 μ l of PolyFect™ reagent was added and vortexed for 10 s. Following incubation at room temperature for 5–10 min, 0.6 ml of sup-

plemented DMEM-HG was added to each sample. The medium containing the transfection complexes was added to the cell monolayer, which had previously been rinsed with PBS. The plates were incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, the plates containing the transfection complexes were rinsed with PBS and 3 ml of supplemented DMEM-HG was added to each well. Twenty-four hours later, the medium was replaced with medium containing the compounds of interest at various concentrations (10^{-12} to 10^{-6} M). Dimethyl sulphoxide (DMSO) or ethanol (EtOH) were used as vehicle. CAT activity using 5 μ g of protein, 10 μ g of butyryl coenzyme-A (Sigma), 2×10^5 cpm of xylene-extracted [³H]chloramphenicol in 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, was assayed as previously described [10,14,15]. Stimulatory concentration (EC₅₀) values were obtained by non-linear regression analysis using sigmoidal fitting with a sigmoidal dose–response curve with the aid of a scientific graphing software. Statistical significance was determined using two tailed *t*-test.

2.4. In vitro translation and partial protease digestion

The generation of the in vitro expression vector for the expression of AR (pcDNAHisARmcs) in rabbit reticulocyte lysates has been previously described [16]. The in vitro synthesis of recombinant AR using T7 RNA polymerase and the T7 TnT kit (Promega) has been previously described [16,17]. Briefly: in vitro translation reactions were carried out in rabbit reticulocyte lysates according to the manufacturers instructions (Promega) in the presence of L-[³⁵S] methionine (>1000 Ci/mmol, Amersham, Buckinghamshire, UK) using 1 μ g of expression plasmid. In vitro translated receptor (4.5 μ l) was incubated in the presence of 10^{-7} M of the corresponding steroid at room temperature for 10 min. Partial proteolytic digestion was performed by incubation with 0.5 μ l trypsin (50 μ g/ml) for 10 min at room temperature. One to two microliters of the various reactions were mixed with 5 μ l SDS loading buffer and denatured at 100 °C for five min. The samples were analyzed by 10% SDS-PAGE [18].

3. Results

3.1. Transcriptional activation through PR and AR of 19-nortestosterone-derived progestins and their A-ring reduced derivatives

The progestogenic and androgenic activities of each of the synthetic progestins, including those of their 5 α -reduced metabolites are shown in Fig. 1. PR- and AR-mediated agonistic activity upon transcriptional activation was studied by incubation in the presence of increasing concentrations (10^{-12} to 10^{-6} M) of either NET, LNG or GSD and their corresponding A-ring reduced derivatives (5 α -NET/LNG/-GSD). Similar concentrations of natural hormones

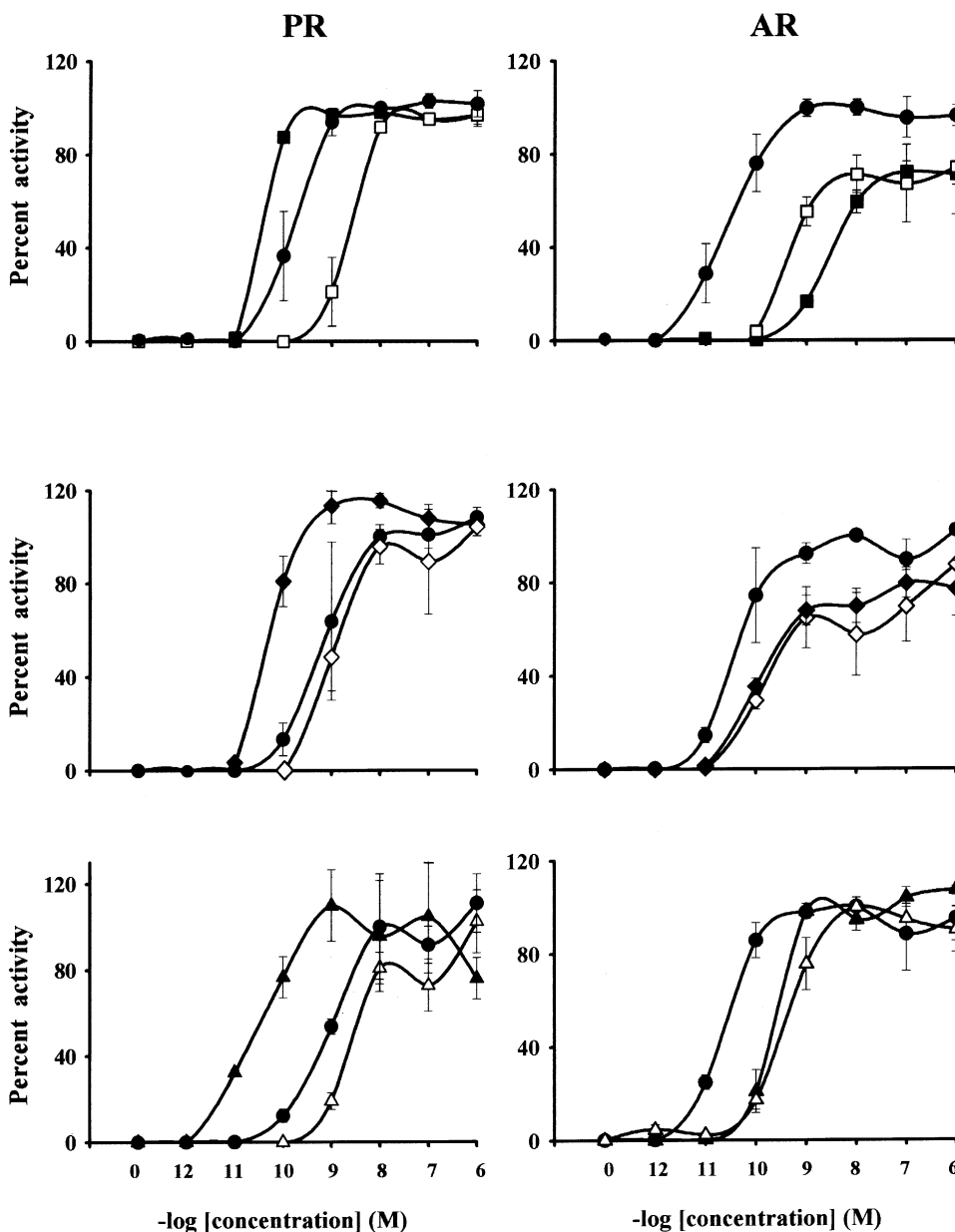


Fig. 1. Transcriptional activation via the progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR). HeLa cells were transiently transfected using the PRE-Elb-CAT reporter plasmid and the expression vectors for PR or AR, respectively. Cells were cultured in the absence or presence of increasing concentrations (10^{-12} to 10^{-6} M) of NET (■), LNG (◆), GSD (▲), 5 α -NET (□), 5 α -LNG (◇), or 5 α -GSD (△). CAT activity was determined in 5 μ g of cellular protein. Natural P and DHT (●) were used as positive controls for the PR and AR, respectively. Each point represents the mean \pm S.D. of three independent experiments and values are expressed as the percentage of the CAT activity induced by 10^{-8} M P and DHT (100%), respectively. Each experiment was run in triplicate.

progesterone (P) or dihydrotestosterone (DHT) were used as positive controls for PR- or AR-mediated reporter gene induction, respectively. As shown, all the non A-ring reduced progestins tested were more potent transcriptional activators than P, and reduction of the 4-ene-double bond was followed by a significant reduction of their receptor-mediated transcriptional activities. As judged by the EC_{50} values (Table 1), obtained from data shown in Fig. 1, GSD was the most effective compound in activating transcription

through the PR, with similar values for NET and LNG. The data also indicated that all the compounds behave as full PR agonists.

In the case of AR-mediated transcriptional activation, all the tested compounds showed intrinsic androgenic agonistic activity. As shown in Fig. 1, LNG and GSD were stronger than NET but weaker than DHT in transactivation of gene expression. With the exception of NET, in which 5 α -reduction increased its androgenic activity four-fold, A-ring reduc-

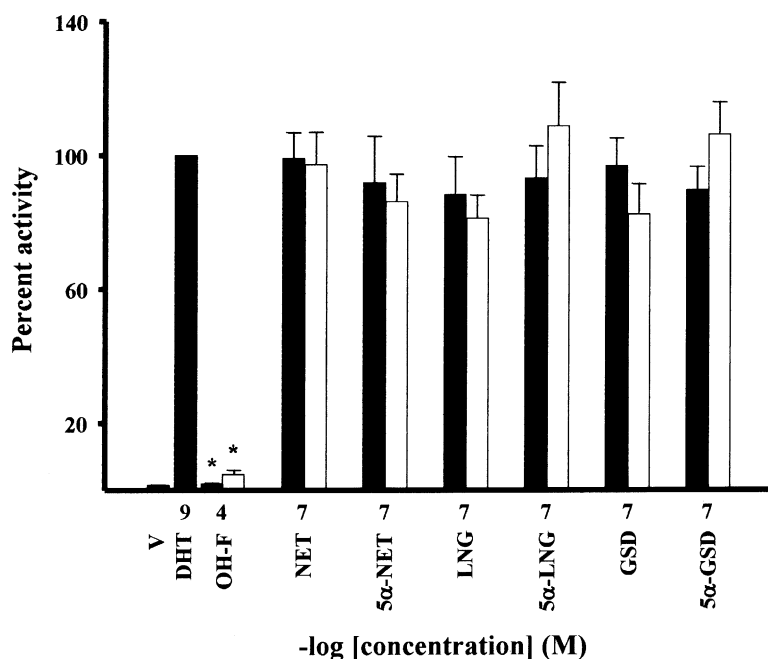


Fig. 2. Effects upon DHT-dependent transcriptional activation of non-reduced and 5 α -reduced 19-nortestosterone progestins. HeLa cells, transiently co-transfected with pSVhAR.BHEXE and PRE-E1b-CAT as described in Section 2, were incubated with DHT (10^{-9} M), NET, LNG, GSD or their corresponding 5 α -reduced derivatives (10^{-7} M), including the antiandrogen hydroxyflutamide (OH-F) (10^{-4} M) (closed bars). Parallel incubations with DHT (10^{-9} M) in the presence of 10^{-7} M of the indicated ligands or 10^{-4} M OH-F are represented by open bars. CAT activity was determined in 5 μ g of cellular protein. Bars represent the mean \pm S.D. of two experiments and values are expressed as the percentage of the CAT activity induced by 1nM DHT (100%). Each experiment was ran in triplicate. Responses below 5% of those induced with 1 nM DHT were obtained in incubations in the absence of ligand (V). * $P < 0.001$ vs. DHT.

tion of these steroids did not significantly change their abilities to activate transcription (Table 1). According to the EC₅₀ values derived from Fig. 1, the following androgenicity ranking was obtained for the three A-ring non-reduced progestins: LNG > GSD > NET. No transcriptional activation, above that obtained with the vehicle, was observed with P and DHT through the AR and PR, respectively (data not shown).

As shown in Fig. 2, all compounds acted as agonists and none of them, especially the 5 α -reduced derivatives altered or inhibited in a significant manner the DHT-mediated reporter gene expression. The antiandrogen hydroxyflutamide

(OH-F) inhibited the effects of DHT, including those of NET, LNG and GSD.

3.2. Effects of 19-nortestosterone-derived progestins on conformation of the AR

To study the ligand-induced transformation of the AR partial proteolytic analysis was used as an indirect assay [16]. To this end, in vitro produced AR was first incubated in the presence of each one of the three 19-nortestosterone progestins, including their A-ring reduced dihydro- and tetrahydro-derivatives followed by limited trypsinization. Protease resistant fragments were analyzed by SDS-PAGE and compared with those obtained with DHT. As shown in Fig. 3A, in the absence of ligand the receptor was totally degraded (lane 3). In the presence of DHT two protease resistant fragments (35 and 30 kDa) were observed (lane 2), similar results were obtained when AR was incubated in the presence of NET, LNG and GSD and their corresponding 5 α -dihydro-derivatives (lanes 4–9). With increasing concentrations (10^{-8} to 10^{-6} M) of NET, LNG or GSD a shift in the relative abundance of the 30 kDa proteolytic resistant fragment of the AR was observed (Fig. 3B) with no apparent changes in the 35 kDa fragment. The relative abundance of 30 kDa species was established by densitometric analysis normalizing the 30 kDa band intensity generated with

Table 1

Transcriptional stimulatory concentrations (EC₅₀) of natural and 19-nortestosterone-derived ligands for the PR, AR and androgen-to-progestin (AR/PR) EC₅₀ ratios

Ligand	PR (mol/L)	AR (mol/L)	AR/PR
P ₄	8.76×10^{-10}	–	–
DHT	–	2.75×10^{-11}	–
NET	8.16×10^{-11}	2.07×10^{-9}	25.4
GSD	1.83×10^{-11}	2.37×10^{-10}	12.95
LNG	6.07×10^{-11}	1.05×10^{-10}	1.73
5 α -GSD	2.30×10^{-9}	3.61×10^{-10}	0.157
5 α -LNG	9.93×10^{-10}	1.48×10^{-10}	0.148
5 α -NET	1.80×10^{-8}	5.22×10^{-10}	0.029

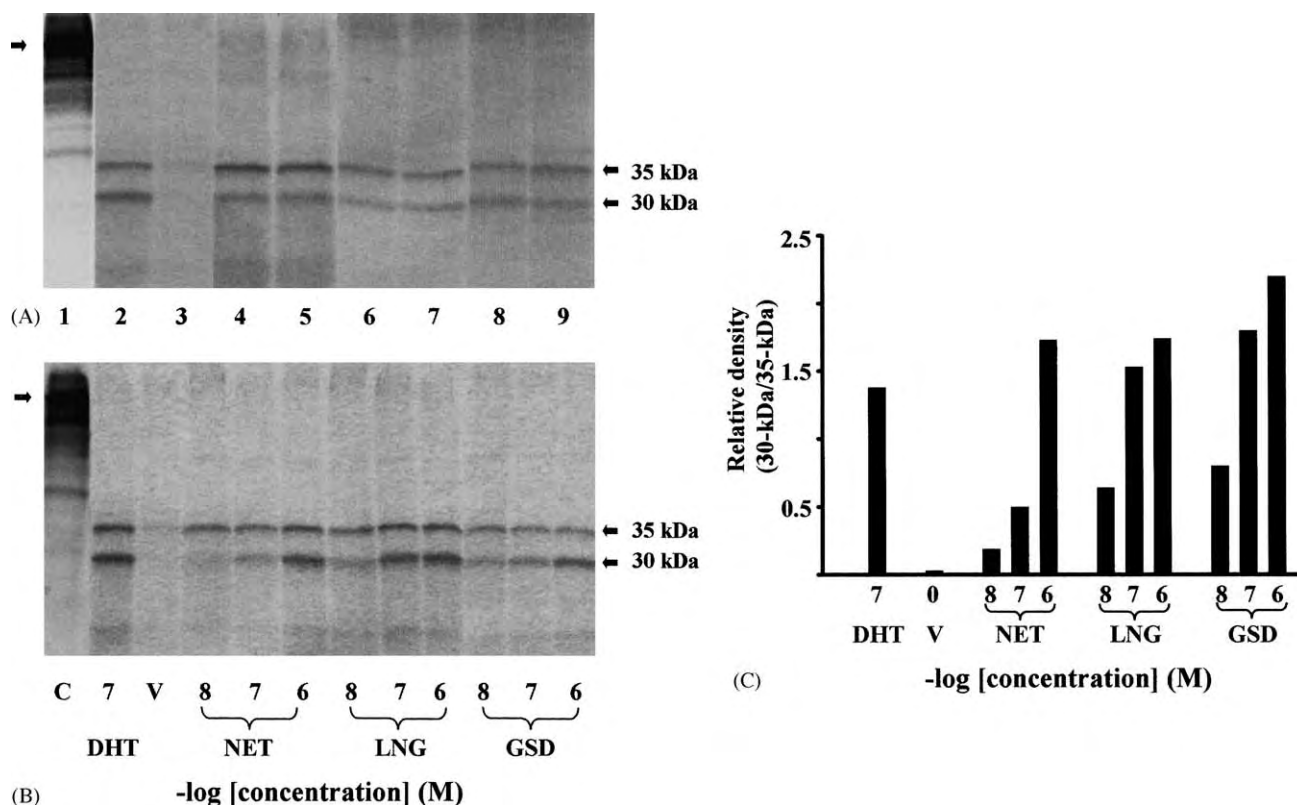


Fig. 3. SDS-PAGE of limited trypsinization products of the AR. (A) In vitro translated [35 S] methionine-labeled AR was incubated in the presence of DHT (lane 2), NET (lane 4), 5 α -NET (lane 5), LNG (lane 6), 5 α -LNG (lane 7), GSD (lane 8), or 5 α -GSD (lane 9) before limited trypsin digestion. Control incubations were performed in the absence of trypsin (lane 1) or ligand (lane 3). All steroids were incubated at the same concentration of 10^{-7} M. Undigested AR and protease resistant fragments are indicated by the arrows. (B) In vitro translated [35 S] methionine-labeled AR was incubated in the presence of ligands at the indicated concentrations before trypsinization. Control incubations were also performed in the absence of trypsin (C) and ligand (V). Undigested AR and protease resistant fragments are indicated by the arrows. The relative abundance of the 30 kDa fragment normalized against the 35 kDa band under different concentrations of compounds is shown in (C).

different concentrations of NET, LNG or GSD with that obtained with their respective 35 kDa fragment (Fig. 3C). This shift indicated that the 30 kDa proteolytic resistant fragment was the one interacting with the ligand at the level of the ligand binding domain in the AR. Similar results were obtained with 5 α -dihydro derivatives of NET, LNG and GSD, respectively (data not shown).

3.3. Transcription selectivity indices

Selectivity indices were obtained from the EC_{50} values for each progestin reflective of their ability to activate transcription through the AR and PR, respectively. We took the androgen-to-progestin EC_{50} transcription activation ratio (AR/PR) as a measure of progestogenicity versus androgenicity; thus, the higher the ratio the greater the difference between these two activities. As shown in Table 1, the highest selectivity index was found for NET followed by GSD and LNG. As expected, the lowest EC_{50} AR/PR ratios were found for the 5 α -reduced derivatives, particularly for 5 α -NET in which the ratio was significantly lower than that obtained for the other A-ring reduced compounds.

4. Discussion

In the present study we investigated the ability of three synthetic progestins and their corresponding A-ring reduced metabolites to transactivate gene transcription through the AR and PR. Receptor binding affinities for these compounds have been previously reported for both receptors [4–6,8,19–21]; however, varying estimates may occur since the binding data usually comes from separate studies, as well as from different experimental conditions. Of particular importance is the observation that steroid receptors are mainly found associated with the nuclear fraction and in many of the studies the cytosolic fractions were used as the source of the receptors. The aim of the present study was to re-evaluate the androgenicity of three 19-nortestosterone-derived progestins widely used in hormonal contraception by means of a hormone-dependent transcriptional activation assays. This assay, in addition to estimating the hormone-dependent receptor activity upon transcription, allowed us to determine both agonistic and antagonistic properties of these compounds, which are not considered in receptor binding studies.

In this study we confirmed the potent progestin activity of 19-nortestosterone derivatives. As judged by the EC_{50} of each compound, in terms of their ability to activate transcription through the PR, GSD was three to five times more potent than LNG and NET, which agreed with previous PR binding studies [5]. Reduction of the 4-ene-double bond in GSD, LNG and NET into their corresponding 5 α -dihydro derivatives significantly decreased the ability of these compounds to activate PR-dependent gene transcription, indicating that A-ring reduction at the C-5 position results in a steric molecule, which either does not appropriately fit the ligand binding pocket, as has been previously suggested by receptor displacement studies [8,19], and/or interferes with receptor-dependent gene transcription, as reported previously [10,22]. These data agree with and may also offer a plausible explanation for the antagonist effects of 5 α -NET on the previously reported progesterone-induced uteroglobin gene transcription and PR down-regulation in rabbit endometrium [23].

As the desired biological effect of progestins in fertility regulation is related to their progestin selectivity, estimations of undesired hormonal activities are of importance in predicting the clinical effects and acceptability of these compounds. Regarding this, 19-nortestosterone-derived progestins are known to exhibit androgenicity, which is caused by their direct binding to receptors and also by their effects on SHBG [24], including the degree to which they bind to it [4]. Although these studies indicate a putative intrinsic androgenic property of these compounds, the translation of receptor binding data into biological activity is generally missing. In this study, an androgen-driven transcription activation assay was used and revealed that the three progestins studied had a significant intrinsic androgenic activity. Both LNG and GSD were active at a potency of about one third to one tenth of that of DHT and had comparable abilities to stimulate reporter gene transcription; however, they showed an EC_{50} approximately 15-fold lower in comparison to that of NET. This observation agrees with a number of studies indicating that addition of the 18-ethyl group, as in the case of LNG, increases the binding affinity for the AR and the presence of an extra double bond at the C-15 position, as in GSD, has little if any further effect [5,6,25].

In tissues like prostate and seminal vesicles, testosterone is enzymatically biotransformed to DHT by the action of the enzyme 5 α -reductase. The binding affinity of DHT for AR and its bioactivity is three to five times greater than of testosterone [26]. Since 19-nortestosterone-derived progestins undergo extensive *in vitro* and *in vivo* enzyme-mediated 5 α -reduction [8,27,28], it was of interest to investigate the androgenic potencies of the 5 α -dihydro metabolites upon androgen-mediated reporter gene activation and compare them with those of their parent compounds. The results demonstrated that 5 α -reduction resulted in a slight but not significant increase in the EC_{50} for LNG and GSD to activate transcription; however, in the case of 5 α -NET there was a significant decrease in the EC_{50} of approximately

four-fold when compared to that observed with NET, but it was three-fold higher than that of 5 α -LNG and 5 α -GSD, and nearly 20-fold with respect to that of DHT. These results indicate that A-ring reduction may not be as critical, as in the case of testosterone, in potentiating the androgenic properties of 19-nortestosterone-derived progestins. Our results agree with others demonstrating that A-ring reduction of 19-nortestosterone derivatives did not increase their biological androgenic activities. Indeed, in this study, with the exception of 5 α -NET, a decrease of 1.5-fold in androgenic potencies was observed. In addition, these observations are consistent with the postulate that the androgenic versus anabolic actions of 19-nortestosterone derivatives are dependent upon the relative biotransformation to their corresponding 5 α -dihydro metabolites in target tissues [19,29].

In this study, we took the androgen-to-progestin-dependent transcriptional activation potency (EC_{50}) ratio as a measure of progestogenicity versus androgenicity for each of the synthetic steroids being investigated. The higher the ratio, the greater the difference between the progestational activity and the androgenic responses. In this study, the highest ratio was obtained with NET (25.4) and the lowest with LNG (1.73). In addition, all 5 α -reduced metabolites of NET, LNG and GSD had values significantly lower than those of their parent compounds, which agree with this study and other previous communications [8,19] that 5 α -reduction decreases the affinity for the PR. These observations, from the profile of androgen and progesterone transcriptional activation of each compound, suggest that NET possesses a better transcription-level selectivity index followed by GSD and LNG, even though GSD is a more potent progestogen than NET and LNG. However, *in vivo* metabolic biotransformation should be taken into consideration, particularly with NET where reduction of the 4-ene-double bond significantly decreases its progesterone-dependent transcriptional activity and increases its androgen receptor dependent transcriptional activity.

In this study, all 19-nortestosterone progestins, including their 5 α -reduced derivatives, induced a conformational change in the AR, observed after partial proteolytic digestion of the *in vitro* translated protein. This change, which resulted in a dose-dependent specific 30 kDa protease-resistant fragment, was virtually identical to that observed with naturally occurring androgens, thus indicating the intrinsic androgenic agonist nature of these compounds. These results agree with those, also reported herein, at the transcriptional level, since ligand-induced conformational change in the ligand binding domain of the receptor precedes and is required for transcriptional activation [30].

Although pharmacokinetics and dynamics are not considered in this study, the results may offer a better estimation of the intrinsic hormonal properties of these progestins than those derived from receptor binding studies alone, and may also contribute to the understanding of the undesired metabolic side-effects of these compounds in humans.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Contraceptive Research and Development Program, Arlington, Virginia (to A.J.C. and F.L.), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (to F.L.) and the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization, Geneva, Switzerland (to F.L.). We thanks Dr. G.A. García (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México) for the synthesis and chemical analysis of some of the steroids used in this study.

References

- [1] I.F. Godsland, D. Crook, R. Simpson, T. Proudler, C. Felton, B. Lees, V. Anyaoku, M. Devenport, V. Wynn, The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism, *N. Engl. J. Med.* 323 (1990) 1375–1381.
- [2] D.C. Collins, Sex hormone receptor binding, progestin selectivity, and the new oral contraceptives, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170 (1994) 1508–1513.
- [3] W.R. Pratt, C.A. Bachrach, What do women use when they stop using the pill? *Fam. Plan. Perspect.* 19 (1987) 257–266.
- [4] E. Bergink, F. Van Meel, E.W. Turpijn, J. Van der Vies, Binding of progestagens to receptor proteins in MCF-7 cells, *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 1563–1570.
- [5] H.J. Kloosterboer, C.A. Vonk-Noordergraaf, E.W. Turpijn, Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives, *Contraception* 38 (1988) 325–332.
- [6] A. Phillips, K. Demarest, D.W. Hahn, F. Wong, J.L. McGuire, Progestational and androgenic receptor binding affinities and in vivo activities of norgestimate and other progestins, *Contraception* 41 (1990) 399–410.
- [7] F. Vilchis, B. Chávez, A.E. Pérez, G.A. García, A. Angeles, G. Pérez-Palacios, Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors, *J. Steroid Biochem.* 24 (1986) 525–531.
- [8] A.E. Lemus, F. Vilchis, R. Dasky, B.A. Chávez, G.A. García, I. Grillasca, G. Pérez-Palacios, Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41 (1992) 881–890.
- [9] A.E. Lemus, V. Zaga, R. Santillan, G.A. García, I. Grillasca, P. Damián-Matsumura, K.J. Jackson, A.J. Cooney, F. Larrea, G. Pérez-Palacios, The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites, *J. Endocrinol.* 165 (2000) 693–702.
- [10] F. Larrea, R. García-Becerra, A.E. Lemus, G.A. García, G. Pérez-Palacios, K.J. Jackson, K.M. Coleman, R. Dace, C.L. Smith, A.J. Cooney, A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER α , *Endocrinology* 142 (2001) 3791–3799.
- [11] P. Kasemi-Esfarjani, M.A. Trifiro, L. Pinsky, Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG) n -expanded neuropathies, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 523–527.
- [12] E.L. Yong, T.G. Tut, F.J. Ghadessy, G. Prins, S.S. Ratnam, Partial androgen insensitivity and correlations with the predicted three dimensional structure of the androgen receptor ligand-binding domain, *Mol. Cell. Endocrinol.* 137 (1998) 41–50.
- [13] V.E. Allgood, R.H. Oakley, J.A. Cidlowski, Modulation by Vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 20870–20876.
- [14] A.J. Cooney, X. Leng, A.Y. Tsai, B.W. O'Malley, M.-J. Tsai, Multiple mechanisms of COUP-TF-dependent repression of VDR, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4152–4160.
- [15] B. Seed, J.Y. Sheen, A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity, *Gene* 67 (1988) 271–277.
- [16] Z. Zeng, G.F. Allan, C. Thaller, A.J. Cooney, S.Y. Tsai, B.W. O'Malley, M.-J. Tsai, Detection of potential ligands for nuclear receptors in cellular extracts, *Endocrinology* 135 (1994) 248–252.
- [17] C.E. Kuil, C.A. Berrevoets, E. Mulder, Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 27569–27576.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [19] F. Larrea, F. Vilchis, B. Chávez, A.E. Pérez, J. Garza-Flores, G. Pérez-Palacios, The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level, *J. Steroid Biochem.* 27 (1987) 657–663.
- [20] K. Sundaram, N. Kumar, C. Monder, C.W. Bardin, Different patterns of metabolism determine the relative anabolic activity of 19-norandrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53 (1995) 253–257.
- [21] U. Fuhrmann, E.P. Slater, K.-H. Fritzmeier, Characterization of the novel progestin gestodene by receptor binding studies and transactivation assays, *Contraception* 51 (1995) 45–52.
- [22] R. García-Becerra, E. Borja-Cacho, A.J. Cooney, K.J. Jackson, A.E. Lemus, G. Pérez-Palacios, F. Larrea, The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- α , *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82 (2002) 333–341.
- [23] A.M. Pasapera, M.A. Cerbon, I. Castro, R. Gutiérrez, I. Camacho-Arrollo, G.A. García, G. Pérez-Palacios, Northisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits, *Biol. Reprod.* 52 (1995) 426–432.
- [24] J. Van der Vange, M.A. Blankenstein, H.J. Kloosterboer, A.A. Haspels, J.H. Thijssen, Effects of seven low-dose combined oral contraceptives on sex hormone binding globulin, corticosteroid binding globulin, total and free testosterone, *Contraception* 41 (1990) 345–352.
- [25] K. Pollow, M. Juchem, H.-J. Grill, W. Elger, S. Beier, D. Henderson, K. Schmidt-Gollwitzer, B. Manz, Gestodene: a novel synthetic progestin, *Contraception* 40 (1989) 325–341.
- [26] J.D. Wilson, R.E. Gloyna, The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction, *Recent Prog. Horm. Res.* 26 (1970) 309–336.
- [27] A.E. Lemus, R. Santillan, P. Damián-Matsumura, G.A. García, I. Grillasca, G. Pérez-Palacios, In vitro metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with estrogenic activity, *Eur. J. Pharmacol.* 417 (2001) 249–256.
- [28] F. Pommier, A. Sioute, J. Godbillon, Simultaneous determination of norethisterone and six metabolites in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection, *J. Chromatogr. B* 674 (1995) 155–165.
- [29] M. Tóth, T. Zakár, 19-Nortestosterone and their 5 α -reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins: a suggested role of 5 α -reductive steroid metabolism in the dissociation of “myotropic” and “androgenic” activities of 19-nortestosterone, *J. Steroid Biochem.* 17 (1982) 653–660.
- [30] G.F. Allan, X. Leng, S.Y. Tsai, N.L. Weigel, D.P. Edwards, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19513–19520.

Synthetic 19-nortestosterone derivatives as estrogen receptor alpha subtype-selective ligands induce similar receptor conformational changes and steroid receptor coactivator recruitment than natural estrogens

Rocio García-Becerra^{a,1}, Elizabeth Borja-Cacho^{a,1}, Austin J. Cooney^b, Carolyn L. Smith^b, Ana E. Lemus^c, Gregorio Pérez-Palacios^d, Fernando Larrea^{a,*}

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Mexico City 14000, Mexico

^b Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA

^c Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

^d Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City 11000, Mexico

Received 1 August 2005; accepted 9 January 2006

Abstract

The binding of estradiol (E_2) to estrogen receptors (ER) is followed by conformational changes resulting in coactivator or corepressor recruitment that influences gene transcription. A series of synthetic A-ring reduced 19-nortestosterone-derived progestins has the capacity to selectively bind and activate transcription through the ER α . Herein, the molecular mechanisms involved in ER subtype-selective interactions of these compounds as assessed by their effects upon both ER α and ER β structural conformation and their ability to induce recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) to ER α were investigated. The results demonstrated that all synthetic A-ring 3 β ,5 α -tetrahydro-reduced derivatives of 19-nortestosterone induced an ER α trypsin digestion pattern similar to that seen with E_2 , without effects upon ER β . In addition, these compounds had the ability to recruit SRC-1 to the ligand-binding domain of ER α similar to E_2 . Our data indicate that A-ring 3 β ,5 α -tetrahydro-reduced 19-nortestosterone-derived progestins behave as selective ER α agonists with ligand–receptor structural and functional responses similar to those induced with natural E_2 .

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Estrogen receptors; Selective ligands; Progestins; Coactivators; Estrogen action

1. Introduction

Estrogens by interacting with nuclear transcription factors known as intracellular receptors modulate the expression of target genes [1]. The estrogen receptors (ERs), ER α and ER β , belong to the steroid and thyroid hormone receptor superfamily [2], which upon ligand-binding and activation interact with specific DNA sequences and stim-

ulate gene transcription [3]. It has been demonstrated that ligand-induced activation of steroid receptors involves the dissociation of receptor-associated heat shock proteins, as well as changes in the conformation of the receptor [4]. This hormone-induced change in the receptor structure can be detected by limited proteolysis, which produces, depending on the receptor, a prominent proteolytic resistant fragment encompassing the ligand-binding domain [4]. In as much as ligand-dependent protection from proteolysis is a general phenomenon for all steroid receptors, it can be used as screening assay to identify and characterize agonist or antagonist properties of new or established natural and synthetic ligands. In this regard, the estrogenic activity

* Corresponding author. Tel.: +52 55 55 73 11 60; fax: +52 55 56 55 98 59.

E-mail address: larrea@innsz.mx (F. Larrea).

¹ Both authors contributed equally to the conduction of this study and are designed co-first authors.

of 19-nortestosterone-derived progestins has been well established [5]. Indeed, we have shown that enzymatic A-ring reduction of 19-nortestosterone derivatives such as norethisterone (NET), levonorgestrel (LNG) and gestodene (GSD) to their corresponding tetrahydro-reduced metabolites results in compounds with significant estrogenic activities [6–8]. Among the compounds studied, the 3 β ,5 α -reduced metabolites of NET, LNG and GSD were able to bind to the estrogen receptor (ER), with an affinity lower than estradiol, and induced activation of gene transcription by a mechanism involving ER α , but not ER β . This ER α specific effect might be of use not only in identifying ligand requirements for ER selectivity, but in the process of developing new potential selective agonist/antagonist ligands for ER subtypes.

In this study we have examined the relative agonist/antagonist estrogenic properties of several 19-nortestosterone-derived progestins in terms of their abilities to change the conformational structure of ER by limited trypsinization and to recruit coactivator proteins.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Non-radioactive estradiol (E₂), progesterone (P₄) and trypsin (type III) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Cell culture medium was purchased from Life Technologies (Grand Island, NY). Fetal bovine serum (FBS) was from Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, UT). The antiestrogen ICI 182,780 was purchased from Zeneca Pharmaceuticals (Wilmington, DE) and unlabeled RU486 (RU 38486, mifepristone) was a gift from Roussel Uclaf (Romainville, France). Authentic NET (17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-estren-3-one) and LNG (13 β -ethyl-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-gonen-3-one) were kindly provided by Schering Mexicana, S.A. (Mexico D.F., Mexico) and GSD (13 β -ethyl-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4,15-gonadien-3-one) from Schering AG (Berlin, Germany). Synthesis of the corresponding 5 α -dihydro (5 α -NET, 5 α -LNG and 5 α -GSD), and the 3 α ,5 α - (3 α ,5 α -NET, 3 α ,5 α -LNG and 3 α ,5 α -GSD) and 3 β ,5 α - (3 β ,5 α -NET, 3 β ,5 α -LNG and 3 β ,5 α -GSD) tetrahydro derivatives, including the description of their corresponding physical and spectroscopic constants have been previously described [6,9]. All other solvents and reagents used were of analytical grade.

2.2. Plasmids

The expression vectors for hPR_B (pCR3.1-hPR_B), ER α (pCR3.1-hER α) and ER β (pCR3.1-hER β ; aa 1-530) for in vitro transcription and translation were described previously [10–12]. The parent vector, pCR3.1 was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Plasmids for the mammalian two-hybrid expression plasmids pBIND (GAL4) and pACT (VP16), and the GAL4 responsive reporter plasmid (pG5luc) were obtained from Promega Corp. (Madison, WI). The

construction of the pBIND-hSRC-1e plasmid encoding the GAL4 DNA binding domain fused to the amino-terminus of SRC-1e was previously described [13]. The VP16-ER α vector encodes the VP16 activation domain linked to the amino-terminus of the ER α ligand-binding domain (LBD) in the pACT vector [14].

2.3. In vitro translation and partial protease digestion

The in vitro synthesis of recombinant ER α , ER β or PR_B using T7 RNA polymerase and the T7 TnT-coupled transcription-translation kit (Promega Corp., Madison, WI) has been previously described [15,16]. Briefly in vitro translation reactions were carried out in rabbit reticulocyte lysates according to the manufacturers instructions in the presence of L-[³⁵S]methionine (>1000 Ci/mmol, Amersham, Buckinghamshire, UK) using 1 μ g of plasmid for human ER α (pCR3.1-hER α), ER β (pCR3.1-hER β) or PR_B (pCR3.1-hPR_B) expression plasmid. In vitro translated receptor was incubated in the presence of various concentrations (10⁻⁶ to 10⁻⁸ M) of the corresponding steroid at room temperature for 10 min or the vehicle alone (0.1% ethanol) as control. Partial proteolytic digestion was performed by incubation with trypsin at a final concentration of 50 μ g/ml for 10 min at room temperature. About 1–2 μ l of the various reactions were mixed with 5 μ l SDS loading buffer and denatured at 100 °C for 5 min. The samples were analyzed on a 10% SDS-PAGE [17], and visualized by autoradiography.

2.4. Cell culture and transfections

HeLa cells were maintained in culture at a density of 2.75 \times 10⁵ cells/well/6-well plate and transfected as previously described [14]. Briefly transfections were performed using FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) and 1.0 μ g pACT-hER α , 0.1 μ g pBIND-hSRC-1e and 1.0 μ g pG5luc. The plates were incubated for 12 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, media were replaced with phenol-red free DMEM-HG (Invitrogen) containing the compounds of interest at various concentrations (10⁻⁶ to 10⁻¹⁰ M). Dimethyl sulphoxide (DMSO) or ethanol alone (EtOH) were used as vehicles. After 12 h incubation, cells were harvested and cell extracts were obtained using lysis buffer (Promega Corp.). Luciferase activity in cell extracts was measured by using a Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System according to the protocol provided by the manufacturer (Promega Corp.). Statistical significance was determined using two tailed *t*-test.

3. Results

3.1. Protease resistance of ligand-activated progesterone receptor (PR)

[³⁵S]methionine-labeled PR was incubated in the presence of P₄, A-ring reduced or non-reduced NET, LNG and

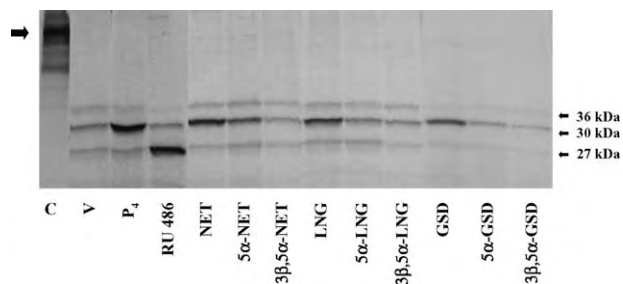


Fig. 1. SDS-PAGE of limited trypsinization products of radiolabeled PR_B. Before treatment with trypsin, *in vitro* transcribed and translated [³⁵S]methionine-labeled PR_B was incubated in the presence of 10⁻⁸ M natural or synthetic ligands or the vehicle alone (V), including the receptor antagonist RU486. Undigested PR_B (C) and protease resistant fragments are indicated by the arrows.

GSD, RU486 or the vehicle alone and digested with trypsin (50 μg/ml) for 10 min. After analysis by SDS-PAGE three main proteolytic fragment species with apparent molecular weights of 36-kDa, 30-kDa and 27-kDa were observed (Fig. 1). Treatment with the vehicle alone (V) resulted in a PR highly sensitive to trypsin, whereas a distinctive fragment pattern was obtained when PR was incubated in the presence of natural or synthetic steroids or the PR antagonist RU486. For all ligands used, the difference was mainly observed in two fragments: a fragment of 30-kDa, whose presence, following trypsin digestion, was more prominent when PR was incubated with P₄ or the non-reduced NET, LNG or GSD, and a 27-kDa fragment following PR treatment with RU 486. Among the A-ring reduced metabolites, all the 5α-dihydro derivatives of NET, LNG and GSD induced a proteolytic fragmentation pattern similar to that obtained with P₄, even though with a lesser degree of resistance to trypsin. The A-ring-reduced 3β/3α,5α derivatives of NET, LNG and GSD, respectively, resulted in a fragmentation pattern similar to that of the vehicle alone. The results by limited proteolysis revealed distinct ligand-induced receptor conformational changes, which correlated well, as previously described [18], with the relative agonist/antagonist activity of the compounds. Thus, in the case of PR, the presence of a prominent 30-kDa or 27-kDa resistant fragment was indicative of a conformation characteristically induced by an agonist- or antagonist-bound to the PR, respectively. In addition, these results confirmed us the PR agonist properties of the synthetic parental compounds used throughout this study.

3.2. ERα and ERβ conformational changes induced by 19-nor synthetic progestins

As in the case of PR, we examined the fragmentation pattern of ERα and ERβ in the presence or absence of estradiol, the antiestrogen ICI 182,780 (ICI) or the 19-nor synthetic progestins, including their A-ring reduced derivatives, in order to determine the ability of the latter set of compounds to induce agonist- or antagonist-like ER conformations. The prote-

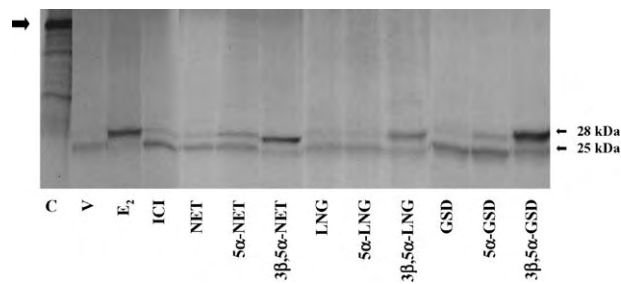


Fig. 2. Limited trypsinization of radiolabeled ERα. As described in Fig. 1, [³⁵S]methionine-labeled ERα was incubated in the presence of E₂ or the A-ring reduced and non-reduced synthetic ligands or the antiestrogen ICI 182 780 (ICI). All steroids were incubated at the same concentration of 10⁻⁸ M. Control incubations were performed in the absence of trypsin (C) or ligand (V). Undigested ERα and protease resistant fragments are indicated by the arrows.

olytic digestion patterns of [³⁵S]methionine-labeled ERα or ERβ incubated in the presence of different ligands were examined. As shown in Fig. 2, the full-length ERα in the absence of ligand (V) was degraded by trypsin into two proteolytic fragments with approximate molecular weights of 28-kDa and 25-kDa, a pattern characteristic of the unliganded receptor [19]. Similar results were obtained with the antiestrogen ICI. Upon treatment with E₂ the 28-kDa fragment was stabilized, indicative of protection of this band, which represents the active conformation of the receptor, by the natural ligand from further digestion. Incubations in the presence of non reduced NET, LNG or GSD, including their 5α-dihydro (Fig. 2) and the 3α,5α-tetrahydro derivatives (not shown), resulted in a fragmentation pattern similar to that seen with the unliganded receptor. However, incubations in the presence of 3β,5α-NET, -LNG or -GSD produced a proteolytic fragment pattern virtually identical to that obtained with E₂. Furthermore, incubations with increasing concentrations of E₂ or the 3β,5α-derivatives of NET, LNG or GSD increased in a dose-dependent manner the stability of the upper 28-kDa band (Fig. 3).

The trypsin cleavage pattern of ERβ was similar but somewhat smaller to that of ERα (26-kDa and 24-kDa versus 28-kDa and 25-kDa, respectively). In the presence of E₂ the upper 26-kDa band was stabilized, suggesting the acquisition of an active conformation of the receptor, indicating the agonist nature of the ligand. As in the case of ERα, treatment with the antagonist ICI produced a proteolytic fragment pattern similar to that observed with the unliganded receptor (data not shown), indicative of an inactive conformation and the antagonist nature of the ligand. As expected from previous observations by our group [7,8], neither of the 19-nortestosterone-derived progestins nor their A-ring reduced metabolites, including the 5α-reduced dihydro derivatives interact in an agonist or antagonist manner with ERβ. Trypsin treatment in the presence of all these steroids showed a cleavage pattern similar to that of the unliganded receptor, characterized by the persistence of the lower molecular weight 24-kDa band. Incubation in the presence

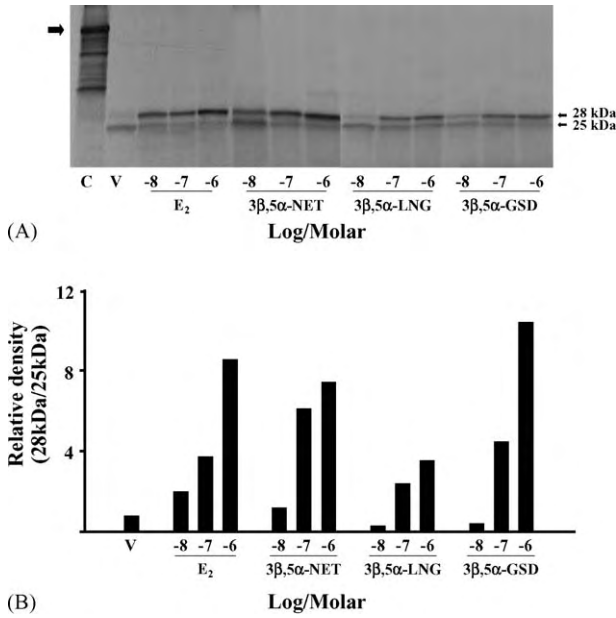


Fig. 3. Panel A. Limited trypsinization of radiolabeled ERα after incubation in the presence of various concentrations of natural or the 3β,5α-tetrahydro A-ring reduced synthetic ligands. Conditions are similar to those described in Fig. 1. The relative abundance of the 28-kDa fragment normalized against the constitutive 25-kDa band under different ligand concentrations is shown in panel B.

of increasing concentrations of those synthetic steroids that interact with ERα (3β,5α-derivatives) did not consistently change the fragmentation pattern of ERβ when compared to the unliganded receptor (Fig. 4).

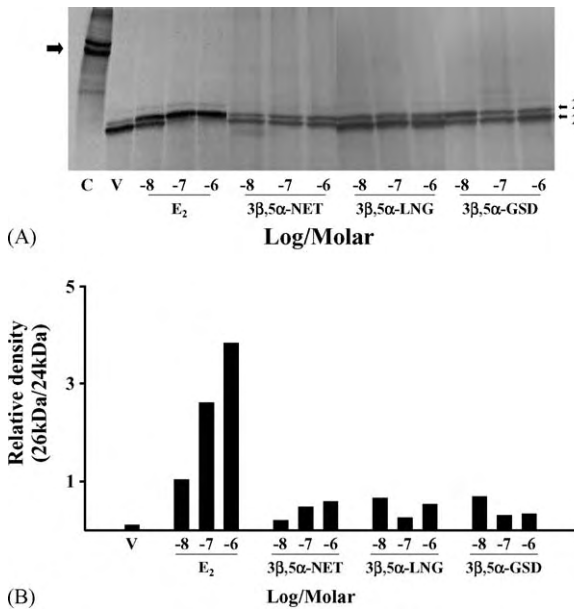


Fig. 4. Panel A. Limited trypsinization of radiolabeled ERβ after incubation in the presence of various concentrations of natural or the 3β,5α-tetrahydro A-ring reduced synthetic ligands. Conditions are similar to those described in Fig. 1. The relative abundance of the 26-kDa fragment normalized against the constitutive 24-kDa band under different ligand concentrations is shown in panel B.

3.3. Recruitment of coactivator proteins by the ERα

Because transcriptional activity of steroid receptors is determined by the agonist/antagonist-induced conformations in the receptor, we examined the pattern of interaction between ligand-activated ERα and a member of the p160 (SRC-1) family. As shown in Fig. 5A, E₂ (10⁻⁸ M) treatment significantly increased luciferase activity indicating a ligand-dependent ERα interaction with SRC-1. Addition of the antiestrogen ICI inhibited interaction between receptor

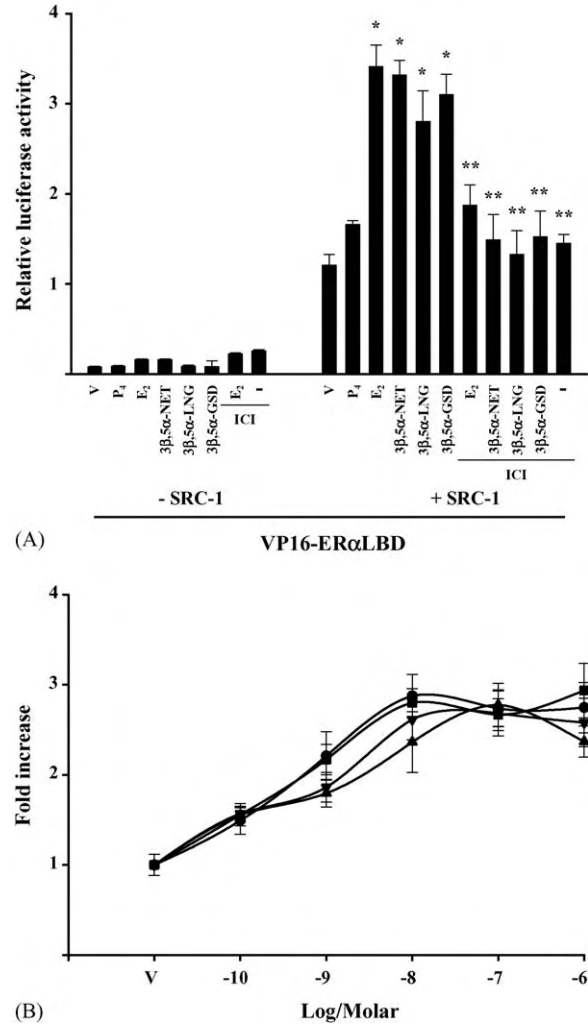


Fig. 5. Mammalian two-hybrid assay of SRC-1 coactivator interaction with the ERαLBD. Panel A. HeLa cells were transfected with VP16-ERαLBD in the presence (+SRC-1) or absence (-SRC-1) of pBIND-SRC-1 and treated with 10⁻⁸ M natural or A-ring reduced synthetic ligands and/or the antiestrogen ICI, 182 780 (ICI). Control incubations were performed in the presence of vehicle (V) or in the presence of a ligand that does not bind to ERα (P₄). *P < 0.05 vs. V; **P < 0.05 vs. E₂ or A-ring reduced compounds. The value set to 1 for the relative luciferase activity corresponds to that obtained for pBIND-SRC-1 and VP16 in the presence of vehicle and results were normalized against this value. Panel B. Dose-response curve of ligand-induced SRC-1 recruitment to the ERαLBD. E₂ (●), 3β,5α-NET (■), 3β,5α-LNG (▲), 3β,5α-GSD (▼). Data in A and B are presented as the average ± S.E.M. of three independent experiments.

and SRC-1 with an activity similar to that observed with the vehicle alone (V) or P₄. All 3 β ,5 α -tetrahydro derivatives of NET, LNG and GSD increased ER α interaction with SRC-1 in a dose-dependent manner (Fig. 5B). In addition, control cotransfections of VP16-ER α with GAL expression vector in the absence of SRC-1 (–SRC) showed no significant interaction either in the presence or absence of 10^{–8} M E₂ or the different compounds. Recruitment of SRC-1 was consistent with the agonist nature of the ligands as observed by limited proteolysis. Binding efficacy of SRC-1 to ER α in the presence of 19-nortestosterone derivatives was similar to that of E₂.

4. Discussion

We have previously shown that synthetic 19-nortestosterone-derived progestins have intrinsic estrogenic activities with relative receptor binding affinities lower than those of natural estradiol [5,7–9]. The ability of these compounds to bind and activate ER-dependent gene transcription depends on their biotransformation to non-phenolic, tetrahydro-A-ring-reduced metabolites. Interestingly, these metabolites, especially the 3 β ,5 α -tetrahydro derivatives, behave as selective ligands for ER α with little if any interaction with ER β [7,8]. This observation raised the possibility that A-ring reduction at C-3 and C-5 and the addition of steric bulk at the 17 α -position, in NET, LNG and GSD, are important structural requirements for ER ligand recognition and selective binding to ER α , respectively.

In this study, we have analyzed the conformational changes of both ER subtypes induced by various 19-nortestosterone synthetic derivatives, and their comparison with those generated by estradiol and the antiestrogen ICI. The aim of this investigation was in part to yield further insight into the ER-subtype selectivity of the 3 β ,5 α -tetrahydro derivatives through an agonist-like conformational effect on the receptor ligand-binding domain as determined by a protease sensitivity assay. This assay has proven to be a reliable method to analyze the ligand-induced conformation of both ER subtypes and their agonist versus antagonist bound conformations [15,18,19]. In the case of ER α , partial proteolysis of agonist-bound receptor, which is dependent on the location of the cleavage sites, results in the formation of a proteolytic resistant fragment of approximately 28-kDa. Likewise, limited proteolysis of agonist-activated ER β results in a stable core ligand-binding domain structure of approximately 26-kDa. In both cases, treatment with an antagonist results in a proteolytic fragment smaller than those protected with the agonist [19,20].

In the present study, we support and extend previous observations that A-ring reduced tetrahydro derivatives of NET, LNG and GSD act as selective agonists of ER α . In addition to this study, the receptor subtype selectivity of these compounds has been demonstrated by data from transient

transfection assays in HeLa and HEK cells using a consensus ERE or complex natural estrogen responsive promoters [7,8]. These results indicate that those tissues uniquely expressing ER α or that express more ER α than ER β are for sure the most likely targets to the estrogen agonist activity of these compounds. Although the data presented herein clearly show an agonist-like conformational effect of these compounds upon the ER α , their agonist activity was somewhat different from that of estradiol. Indeed, in contrast to estradiol, which binds and activates transcription through both receptor subtypes, 19-nortestosterone tetrahydro-derivatives only bind and activate transcription via ER α . As reported previously [7,8,21], binding affinities and transcriptional activation potencies of these compounds are lower than those of estradiol even though, as shown in this study, they act as agonists in partial proteolytic assays. These observations suggest that differences in subtype potency and efficacy of these compounds may involve ligand–receptor interactions that are not discriminated by the protease digestion assay. Indeed, in this study protease digestion with trypsin was able to discriminate between ligand occupied and unoccupied receptor complexes, but could not distinguish between E₂ and the various selective agonists being used. Consistent with these data, and together with the observation that different agonist conformations within the receptor may be induced by various ligands [22], we determined the binding efficacy of SRC-1 to ER α in the presence of the A-ring tetrahydro 19-nortestosterone derivatives. Our results showed a pattern of coactivator recruitment by ER α as expected on the basis of the agonist nature of the ligand. In general, the finding that all three specific ER α ligands promoted the recruitment of SRC-1 to the receptor with an efficiency close to E₂, suggested that these 19-nortestosterone synthetic derivatives were able to induce agonist conformational changes in receptor-LBD structure similar to E₂ [23,24]. Therefore, it is suggested that transcriptional differences between E₂ and the synthetic compounds cannot only be in part explained on the bases of receptor conformation, but also on the cellular environment, including the participation of other potential interacting proteins.

As previously shown, none of the 19-nortestosterone tetrahydro derivatives were able to activate transcription via the ER β [7]. Indeed, in this study none of the synthetic steroids induced an active conformation in ER β , as judged by the absence of a prominent 26-kDa proteolytic resistant fragment after treatment with trypsin. This finding agrees with previous observations that the lack of effects of these compounds upon transcription was probably not related to differences in the amino-terminal regions between ER α and ER β , but rather to the ability of the dissimilar primary sequences of these receptors' ligand-binding domains to bind and respond to different ligands [25,26].

Based on the above results, we suggest that 5 α reduction of the four double bonds and the presence of a hydroxyl group at C-3 in NET, LNG and GSD tetrahydro derivatives induced, as in the case of testosterone A-ring reduced

metabolites [27,28], affinity for ER. However, the presence of the 17 α -ethynyl group on the D-ring and the absence of the C-19 angular methyl in tetrahydro-reduced metabolites of these 19-nortestosterone derivatives are probably associated with ER- α ligand recognition. The selectivity of these compounds for an ER subtype may provide additional structural basis for the development of new therapeutic and/or contraceptive formulations with disease-prevention benefits.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Contraceptive Research and Development Program, Arlington, Virginia (to A.J.C. and F.L.), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (to F.L.) and the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization, Geneva, Switzerland (to F.L.). We thanks Dr. G.A. García (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México) for the synthesis and chemical analysis of some of the steroids used in this study.

References

- [1] J.A. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, Nuclear hormone receptors: ligand activated regulators of transcription and diverse cell responses, *Chem. Biol.* 3 (1966) 529–536.
- [2] D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, R.M. Evans, The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell* 83 (1995) 835–839.
- [3] M.J. Tsai, B.M. O'Malley, Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 451–486.
- [4] L.M. Beekman, G.F. Allan, S.Y. Tsai, M.-J. Tsai, B.M. O'Malley, Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain, *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 1266–1274.
- [5] F. Larrea, F. Vilchis, B. Chávez, B.A.E. Pérez, J. Garza-Flores, G. Pérez-Palacios, The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level, *J. Steroid Biochem.* 27 (1987) 657–663.
- [6] F. Vilchis, B. Chávez, A.E. Pérez, G.A. García, A. Angeles, G. Pérez-Palacios, Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors, *J. Steroid Biochem.* 24 (1986) 525–531.
- [7] F. Larrea, R. García-Becerra, A.E. Lemus, G.A. García, G. Pérez-Palacios, K.J. Jackson, K.M. Coleman, R. Dace, C.L. Smith, A.J. Cooney, A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonist for ER α , *Endocrinology* 142 (2001) 3791–3799.
- [8] R. García-Becerra, E. Borja-Cacho, A.J. Cooney, K.J. Jackson, A.E. Lemus, G. Pérez-Palacios, F. Larrea, The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- α , *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82 (2002) 333–341.
- [9] A.E. Lemus, V. Zaga, R. Santillán, G.A. García, I. Grillasca, P. Damián-Matsumura, K.J. Jackson, A.J. Cooney, F. Larrea, G. Pérez-Palacios, The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites, *J. Endocrinol.* 165 (2000) 693–702.
- [10] Z. Nawaz, D.M. Lonard, C.L. Smith, S.Y. Tsai, M.-J. Tsai, B.W. O'Malley, The Angelman syndrome-associated gene E6-AP is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 1182–1189.
- [11] Z. Nawaz, D.M. Lonard, A.P. Dennis, C.L. Smith, B.M. O'Malley, Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 1858–1862.
- [12] K.M. Coleman, M. Dutertre, A. El-Gharbawy, B.G. Rowan, N.L. Weigel, C.L. Smith, Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor- α (ER α)- and ER β -dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s), *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 12834–12845.
- [13] M. Dutertre, C.L. Smith, Ligand-independent interactions of p160/SRC coactivators and CREB binding protein with estrogen receptor- α : regulation of phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains, *Mol. Endocrinol.* 17 (2003) 1296–1314.
- [14] B.M. Jaber, R. Mukopadhyay, C.L. Smith, Estrogen receptor- α interaction with CREB binding protein coactivator is regulated by the cellular environment, *J. Mol. Endocrinol.* 32 (2004) 307–323.
- [15] Z. Zeng, G.F. Allan, C. Thaller, A.J. Cooney, S.Y. Tsai, B.M. O'Malley, M.-J. Tsai, Detection of potential ligands for nuclear receptors in cellular extracts, *Endocrinology* 135 (1994) 248–252.
- [16] R. García-Becerra, A.J. Cooney, E. Borja-Cacho, A.E. Lemus, G. Pérez-Palacios, F. Larrea, Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91 (2004) 21–27.
- [17] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [18] G.F. Allan, X. Leng, S.Y. Tsai, N.L. Weigel, D.P. Edwards, M.-J. Tsai, B. O'Malley, Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19513–19520.
- [19] D.M. Kraichely, J. Sun, J.S. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands to estrogen receptor- α and estrogen receptor- β : correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members, *Endocrinology* 141 (2000) 3534–3545.
- [20] G. Lazennec, T.R. Ediger, L.N. Petz, A.M. Nardulli, B.S. Katzenellenbogen, Mechanistic aspects of the estrogen receptor activation probed with constitutively active estrogen receptors: correlations with DNA and coregulator interactions and receptor conformational changes, *Mol. Endocrinol.* 11 (1997) 1375–1386.
- [21] B.A. Chávez, F. Vilchis, A.E. Pérez, G.A. García, I. Grillasca, G. Pérez-Palacios, Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 22 (1985) 121–126.
- [22] K.S. Bramlett, Y. Wu, T.P. Burris, Ligands specificity coactivator nuclear receptor (NR) β affinity for estrogen receptor subtypes, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 909–922.
- [23] A.M. Brzozowski, A.C. Pike, Z. Dauter, R.E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G.L. Greene, J.-A. Gustafsson, M. Carlquist, Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature* 389 (1997) 753–758.
- [24] A.K. Shiau, D. Barstad, P.M. Loria, L. Cheng, P.J. Kushner, D.A. Agard, G.L. Greene, The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen, *Cell* 95 (1998) 927–937.
- [25] G.G.J.M. Kuiper, B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Hagblad, S. Nilsson, J.-A. Gustafsson, Comparison of the lig-

- and binding specificity and transcript tissue distribution of the estrogen receptors α and β , *Endocrinology* 138 (1997) 863–870.
- [26] F. Delaunay, K. Pettersson, M. Tujague, J.-A. Gustafsson, Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors α and β , *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 584–590.
- [27] M. García, H. Rochefort, Evidence and characterization of the binding of two ^3H -labeled androgens to the estrogen receptor, *Endocrinology* 104 (1979) 1797–1804.
- [28] M.L. Thieulant, S. Samperez, P. Jouan, Evidence for 5α -androstane- 3β -diol binding to the estrogen receptor in the cytosol from male rat pituitary, *Endocrinology* 108 (1981) 1552–1560.

Enhanced formation of non-phenolic androgen metabolites with intrinsic oestrogen-like gene transactivation potency in human breast cancer cells: a distinctive metabolic pattern

Gregorio Pérez-Palacios¹, René Santillán^{1,2}, Rocío García-Becerra², Elizabeth Borja-Cacho², Fernando Larrea², Pablo Damián-Matsumura³, Leticia González³ and Ana E Lemus³

¹Reproductive Health Research, Training and Communication Unit, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México and Instituto Nacional de Perinatología, México City, México

²Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S. Zubirán, México City, México

³Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Delegación Iztapalapa, México City, México

(Requests for offprints should be addressed to A E Lemus; Email: anaenalemus@aol.com)

Abstract

Breast cancer is a sex steroid hormone-dependent malignant neoplasia. The role of oestradiol in this malignancy has been well documented; however, the involvement of androgens has remained controversial. To determine the role of non-phenolic androgen metabolites in human breast cancer, we studied the metabolism of [¹⁴C] testosterone and [¹⁴C] androstenedione in oestrogen-dependent MCF-7 cells and non-oestrogen-dependent MDA-MB 231 cells, at different substrate concentrations (1–10 µM) and time periods (30 min–48 h). Cultured non-oestrogen-dependent HeLa and yeast cells served as controls. Metabolites were identified and quantified by reverse isotope dilution. A distinctive pattern of androgen metabolism was identified in MCF-7 cells, being the 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (3 α ,5 α -diol) and its 3 β epimer (3 β ,5 α -diol), the major conversion products of testosterone (48.3%), with 5 α -dihydrotestosterone as intermediary. The formation of 3 α ,5 α -diol and 3 β ,5 α -diol (diols) was substrate concentration- and time-dependent, and abolished by finasteride. In contrast, very little of any diol formation was observed in MDA-MB 231, HeLa and yeast cell incubations. Additional enzyme gene expression studies revealed an overexpression of 5 α -steroid reductase type-1 in

MCF-7 cells, as compared with MDA-MB 231 cells. The oestrogen-like activities of diols were assessed in HeLa cells co-transfected with expression vectors for α or β subtypes of the human oestrogen receptor (hER) genes and for an oestrogen-responsive reporter gene. The results show that 3 β ,5 α -diol and to a lesser extent 3 α ,5 α -diol bind with high relative affinity to hER α and hER β .

Both diols induced hER-mediated reporter gene transactivation in a dose–response manner, similar to that induced by oestradiol, though with lower potency, an effect that was abolished by ICI-182 780. Furthermore, 3 β ,5 α -diol and to lesser extent 3 α ,5 α -diol induced MCF-7 cell proliferation. The overall results demonstrated that MCF-7 cells exhibit enhanced expression and activity of androgen-metabolising enzymes, leading to rapid and large diol formation, and provide evidence that these androgen metabolites exert a potent oestrogen-agonistic effect, at genomic level, in oestrogen-dependent breast cancer cells. The data suggest that diols may act as *in situ* intracrine factors in breast cancer and that its formation can be pharmacologically inhibited.

Journal of Endocrinology (2006) **190**, 805–818

Introduction

The key role of oestrogens for both the initiation and progression of most breast cancer tumours has been well established (Kirschner 1979, Nicholson *et al.* 1988, Pike & Spicer 1991, Pike *et al.* 1993, Musgrove & Sutherland 1994, Pasqualini & Chetrite 1996, Girdler & Brothrick 2000); however, the precise involvement of other sex steroid hormones on this malignancy has remained a controversial issue. Evidence has accumulated indicating that androgens may act as either stimulating or inhibiting hormonal agents

in breast cancer, though the mechanisms by which they exert these effects have not yet been elucidated. Indeed, numerous studies in animal models have shown that androgens, at physiological concentrations, stimulate growth in mammary cancer (Smith & King 1972, Liao *et al.* 1998, Xie *et al.* 1999, Liao & Dickson 2002, Somboonporn & Davis 2004), while other reports have indicated that their administration results in tumour regression of chemically and hormone-induced breast cancers (Costlow *et al.* 1976, Zhou *et al.* 2000). The inhibitory capability of androgens in human breast cancer has been documented in experimental and clinical studies

(Poulin *et al.* 1988, Jørgensen *et al.* 1997, Szelei *et al.* 1997, Adams 1998, Labrie *et al.* 2003, Greeve *et al.* 2004, Somboonporn & Davis 2004), though the absence of anti-proliferative effects on several human breast cancer cells has also been reported (Roy *et al.* 1992). Interestingly, several studies have shown that androgens may exhibit an initial inhibitory effect that shift to a late stimulatory effect on human breast cancer cell proliferation (Lippman *et al.* 1976, Hackenberg *et al.* 1993, Labrie *et al.* 1998, Aspinall *et al.* 2004).

The presence of androgens in normal and malignant breast tissue, as well as their enzyme-mediated conversion to oestrogens, has been well documented in pre- and post-menopausal women (reviewed in Pasqualini & Chetrite (1996)). Although the aromatisation of androgens in breast cancer cells has remained controversial, low, but reproducible aromatase activity has been detected in MCF-7 cells (Sonne-Hansen & Lykkesfeldt 2005). To avoid oestrogen formation, several aromatase inhibitors have been widely used in therapeutic schemes in breast cancer (Coombes *et al.* 1987, Santen *et al.* 1990, Demers 1994, Goss 1999, Ragaz 1999, Sasano *et al.* 1999), although the oestrogen-like effects of androgens are not completely suppressed by this treatment (Brodie *et al.* 1977, Brodie & Longcope 1980, Coombes *et al.* 1984, Wing *et al.* 1985, Lippman 1998, Buzdar 2002, Lønning 2004, Brueggemeier *et al.* 2005). These observations raise the important question as to whether androgens are locally bioconverted to non-phenolic metabolites with intrinsic oestrogenic activities. Androgen-metabolising enzymes, other than aromatase, have been identified and characterised in human breast cancer tissue and cells (Bonney *et al.* 1983, Labrie *et al.* 1992, 1997, 2000, Sasano *et al.* 1996, Gingras *et al.* 1999, Ariga *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2000), and an over-expression of 5 α -steroid reductase type-1 gene has been reported in human breast cancer tumours (Suzuki *et al.* 2001).

To determine whether androgens are bioconverted to A-ring-reduced derivatives with intrinsic oestrogen-agonistic potency in breast cancer, we studied the metabolism of [¹⁴C]-labelled testosterone and Δ^4 A in oestrogen-dependent (MCF-7) and non-oestrogen-dependent (MDA-MB 231) human breast cancer cells. Non-oestrogen-dependent human uterine cervical cancer (HeLa) cells and yeast cells served as experimental controls. The results disclose a distinctive androgen-metabolic pathway in MCF-7 cells, characterised by overexpression and enhanced activities of the androgen-metabolising enzymes, resulting in a large formation of 3 α ,5 α -diol and 3 β ,5 α -diol. In subsequent studies, the oestrogen-like activity of both the diols, was assessed by their binding affinity to the α and β subtypes of the human oestrogen receptor (hER), their capability to activate oestrogen response elements of a reporter gene in the construct assay employed, and their ability to induce cell proliferation in MCF-7 cells.

Further interest for the conduction of this study stemmed from the recent observations in our laboratory (Lemus *et al.* 2000, 2001, Larrea *et al.* 2001, Santillán *et al.* 2001,

García-Becerra *et al.* 2002), demonstrating that the A-ring tetrahydro-reduced metabolites of norethisterone, levonorgestrel and gestodene, possess oestrogen-agonistic activities, suggesting that they could be involved in the activation of breast cancer cell proliferation induced by high doses of synthetic contraceptive progestins derived from 19-nor testosterone, as it has been previously reported (Catherino *et al.* 1993, Schoonen *et al.* 1995a, 1995b).

Materials and Methods

Steroids and chemicals

[4-¹⁴C] Testosterone ([¹⁴C]-T), specific activity (sp. act.) 45 mCi/mmol; [4-¹⁴C] androstenedione ([¹⁴C]- Δ^4 A), sp. act. 57.5 mCi/mmol; [2,4,6,7,16,17-³H] oestradiol ([³H]-E₂), sp. act. 148 Ci/mmol, [ring-3,5-³H] chloramphenicol, sp. act. 50 Ci/mmol and [³H] thymidine, sp. act. 14 Ci/mmol were purchased from NEN Research Products (Boston, MA, USA) and non-radioactive steroids were supplied by Sigma. Cell culture media, enzymes, gene primers and reverse transcriptase (RT)-PCR kits and reagents were purchased from Invitrogen. Fetal bovine serum (FBS) was supplied by Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, UT, USA). All reagents and solvents used were of analytical grade.

Cell lines and culture

Human breast cancer cells lines MCF-7 (hER dependent) and MDA-MB 231 (hER independent), obtained from Dr A Zentella (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S. Zubirán, Mexico City, México) were cultured in T-45 flasks with phenol red Dulbecco's modified Eagle medium-high glucose (DMEM-HG) containing L-glutamine and supplemented with 5% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10 nM oestradiol, in a 95% air:5% CO₂ atmosphere, at 37 °C. Human uterine cervical cancer (HeLa) cells, kindly supplied by Dr A J Cooney (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA), were cultured in T-45 flasks with phenol red DMEM-HG containing L-glutamine and supplemented with 10% stripped FBS, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in a 95% air:5% CO₂ atmosphere, at 37 °C. Yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*), were cultured in gold medium at 32 °C by continuous shaking using air as the gas phase.

Androgen metabolism

To assess the *in situ* conversion of androgens to A-ring-reduced derivatives in human breast cancer, the metabolism of [¹⁴C]-T and [¹⁴C]- Δ^4 A in MCF-7 and MDA-MB 231 cells maintained in culture was studied using HeLa and yeast cells as experimental controls. Incubations were done at a cell density of 2×10^6 , at 37 °C, in a 95% air:5% CO₂ atmosphere, using the increasing substrate concentrations (1–10 μ M) of either

[¹⁴C]-T or [¹⁴C]- Δ^4 A, for different time periods (30 min–48 h), at pH 7.4 and 5.2, in the absence or presence of 1 mM finasteride (Merck). All incubations were carried out in phenol red-free and oestradiol-free, supplemented DMEM-HG culture medium. To determine the activities of the two types of 5 α -steroid reductases (Russell & Wilson 1994), incubations were carried out at pH 7.4 and 5.2. In addition, similar incubations were done using cell homogenates at pH 7.4 and 5.2, in the presence of 2.5 μ M NADPH. Final incubation volume was 3 ml. Cell-free and boiled inactivated cell incubations, carried out under identical conditions, were used as negative controls. Protein content was determined by a protein-dye-binding method (Bradford 1976) using BSA as standard. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by the addition of ethyl acetate, and radiolabelled steroids were extracted (4 \times) using three volumes of water-saturated ethyl acetate. The organic extracts were partitioned between petroleum ether and 10% aqueous methanol, and 2.5 μ g each of the following steroid carriers were added to the methanolic extracts: testosterone (T), 17 β -hydroxy-4-androstene-3-one; 5 α -dihydrotestosterone (DHT), 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one; 3 α ,5 α -androstane diol (3 α ,5 α -diol), 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol; 3 β ,5 α -androstane diol (3 β ,5 α -diol), 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol; androstenedione (Δ^4 A) 4-androstene-3,17-dione and 5 α -dihydroandrostenedione (5 α -A), 5 α -androstane-3,17-dione. The identification and radiochemical purity of androgen metabolites were established by a reverse isotope dilution technique, which included identical behaviour to that of the steroid carriers in two different thin layer chromatographic systems (chloroform:acetone, 9:1 and benzene:ethyl acetate, 2:1) and recrystallisations to obtain a constant sp. act. Radioactive labelled [¹⁴C] metabolites were located on chromatographic plates using a Packard instant imager (Downers Grove, IL, USA). Radioactivity was otherwise determined in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer model 1900 TR (Packard Instrument Company, Inc.), using toluene containing 4 g/l 2,5-diphenyloxazole (PPO) and 100 mg/l dimethyl 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzene as the counting solution. The counting efficiency for [¹⁴C] was 86% and [³H] was 65% and quenching was corrected in all samples by external standardisation. Non-radioactive steroid carriers were detected on chromatograms using the *p*-anisaldehyde-sulphuric/acetic acids reagent. The formation rates of the metabolic conversion products of androgens are expressed as pmol/mg of protein per hour. The enzyme-mediated bioconversion of androgens in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells is expressed as the percent conversion of testosterone and Δ^4 A to their non-phenolic metabolites, as a function of time.

Steroid enzyme expression

The gene expression of androgen-metabolising enzymes in MCF-7 and MDA-MB 231 cells was studied by RT-PCR. Total RNA from the cells (6 \times 10⁶) was extracted using TRIzol reagent and an aliquot (5 μ g) from each sample was

subjected to reverse transcription using a Superscript first strand cDNA synthesis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Semi-quantitative PCR was performed using 2.5 U Platinum Taq DNA polymerase, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs and 4 mM of each gene-specific steroid enzyme primer, using GAPDH as an internal standard. All PCRs were done up to 30 cycles, each cycle consisting of 5 min at 94 °C, 30 s at 52–64 °C and 7 min at 72 °C. PCR products were electrophoresed on ethidium bromide-containing 1.2% agarose gels, and the bands were subjected to scanning densitometry using a gel analyzer (Kodak). Results are given as relative density (mRNA enzyme/mRNA GAPDH). Gene-specific primer sequences were as follows: human steroid 5 α -reductase type-1 (SRD5A1; NM_001047): 5'TGGGAGGAGGAAAGCCTATG (sense), 5'GCCACA-CCACTCCATGATTTC (anti-sense); human steroid 5 α -reductase type-2 (SRD5A2; NM_000348): 5'CATACG-GTTTAGCTTGGGTGT (sense), 5'GCTTTCCGAGATTT-GGGGTAG (anti-sense); human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1; NM_001353) 5'GTAAAGCTTT-AGAGGCCAC (sense), 5'CACCCATGCTTATTATCGG (anti-sense); human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2; NM_001354) 5'GTAAA GCTCTAGAGGCCGT (sense), 5'CACCCATGGTTCTTCTCGA (anti-sense) and human GAPDH: 5'TTCGCTCTCTGCTCCTCCTG (sense), 5'ACCCGTTGACTCCGACCTTC (anti-sense).

Each PCR was run three times in duplicate according to the manufacturer's recommendations and default settings.

Plasmid constructs

The expression vectors for human ER α and ER β genes (plasmid of the cytomegalovirus (pCMV)₅-hER α and pCMV₅-hER β) containing the coding sequence of hER α and hER β were kindly provided by Dr A J Cooney. The oestrogen responsive reporter plasmid containing a fragment of the vitellogenin A2 gene promoter (positions –331 to –87) upstream of the adenovirus E1b promoter region fused to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene (ERE-E1b-CAT) was constructed according to the method described by Smith *et al.* (1993).

Transfections

The HeLa cells were plated the day before transfections in a six-well plate at a density of 3 \times 10⁵ cells/well in phenol red-free DMEM-HG supplemented with 5% stripped FBS, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were maintained in a 95% air:5% CO₂ atmosphere at 37 °C. The next day, cells were visualised in a microscope to assure that the cell density was 30–50% confluent. Transfections were performed in triplicate using SuperFect (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Briefly, serum-free media (100 μ l) was aliquoted and DNA added (1 μ g reporter gene plasmid and 0.025 μ g of either hER α or hER β

gene expression vectors) and vortexed. SuperFect reagent (10 µl) was added and vortexed for additional 10 s. Following incubation at room temperature for 5–10 min, 600 µl supplemented DMEM-HG was added to each tube. The medium containing the transfection complexes was added to the cell monolayer previously rinsed with PBS. The plates were incubated for 3 h in a 95% air:5% CO₂ atmosphere, at 37 °C. After incubation, the plates were rinsed with PBS and 3 ml supplemented DMEM-HG was added to each well.

Binding affinity of androgen metabolites to hER

After transfection, cells were harvested by centrifugation and washed with TEDLM buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4 °C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, 10 µg/ml leupeptine and 10 mM sodium molybdate) in a ratio (w/v) 1:6. The cytosolic fraction was obtained by vortexing the cells with glass beads in TEDLM buffer followed by centrifugation at 180 000 *g*, for 1 h, at 2 °C, in an SW 50.1 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). To assess the binding affinity of 3α,5α-diol and 3β,5α-diol to hERα and hERβ, cytosol aliquots (0.5 mg protein/ml) of the co-transfected HeLa cells were incubated with 1 nM [³H]-E₂ at 4 °C for 18 h, in the absence or presence of increasing concentrations (1–1000 nM) of radioinert oestradiol, 3α,5α-diol and 3β,5α-diol. Bound and free steroid fractions were separated by the addition of 800 µl Dextran-coated charcoal suspension (250 mg Norit-A and 25 mg Dextran T-70) in 100 ml TEDLM buffer and incubated for 10 min at 4 °C. Following centrifugation at 800 *g*, at 4 °C, for 15 min, aliquots (200 µl) of the supernatants were submitted to radioactive counting. Radioactive content in the aqueous samples was determined using Insta-Gel Plus (Packard, Downers Grove, IL, USA) as counting solution. The results are expressed as the relative binding affinities (RBA) and the inhibition constants (*K_i*) of steroid competitors, as described by Reel *et al.* (1979) and Cheng & Prusoff (1973) respectively.

Oestrogen-agonistic effect of androgen metabolites

The oestrogen-agonistic actions of androgen metabolites were assessed in transiently co-transfected HeLa cells with the mammalian expression vector for hERα or hERβ genes and its cognate reporter vector ERE-E1b-CAT, using oestradiol as control. Twenty-four hours after co-transfection, cells were incubated in a complete medium containing the increasing concentrations (1 × 10⁻¹²–1 × 10⁻⁶ M) of 3α,5α-diol, 3β,5α-diol and oestradiol, using dimethyl sulfoxide as the steroid vehicle. Incubations were carried out in the absence or presence of 1 × 10⁻⁷ M ICI-182 780 (Zeneca Farma, Mexico City, Mexico), a potent steroidal antioestrogen, in a 95% air:5% CO₂ atmosphere, for 24 h at 37 °C. At the end of the incubation period, cells were harvested and submitted to the liquid CAT assay as previously described (Lemus *et al.* 2000, García-Becerra *et al.* 2002). Results of the transactivation studies are expressed as the effective concentration values (EC₅₀) of 3α,5α-diol, 3β,5α-diol and oestradiol, obtained by

a non-linear regression analysis, using a scientific graphic software (Origin 6.1; OriginLab, Northampton, MA, USA).

Cell proliferation studies

The MCF-7 cells were cultured in DMEM without phenol red, containing heat-inactivated FBS (5% v/v), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were incubated in six-well plates at a density of 1 × 10⁶ cell/well in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C. After 24 h, the medium was replaced with DMEM containing dextran/charcoal-stripped FBS (2.5%) and oestradiol (1 × 10⁻⁹ M) or 3α,5α-diol or 3β, 5α-diol (1 × 10⁻⁷ M) dissolved in ethanol and incubated for 48 h. Cells were quantified and scored to measure proliferation rate (Lopez-Diazguerrero *et al.* 2006). [³H]-Thymidine (1 µCi) was added to the culture medium and incubated for additional 24 h. Cells were washed with PBS and fixed for 15 min with 500 µl of 95% methanol in PBS. Subsequently, cells were gently washed twice with PBS and 500 µl 0.2 M NaOH were added. Alkaline extracts were submitted to radioactivity counting. Results were expressed as the cell proliferation (%) induced by diols, using oestradiol and vehicle as controls.

Statistical analysis

The comparisons of experimental groups with controls in metabolic studies were done by one-way ANOVA and statistical differences between groups were established by Student's *t*-test, using the SigmaStat statistical software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Group differences were considered significant when *P* < 0.001 was reached (two-tailed test). Variance analysis of enzyme expression and cell proliferation studies was performed using the statistical software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and group differences were considered significant when *P* < 0.05 was reached.

Results

Androgen metabolism in MCF-7 and MDA-MB 231 cells

After partition of the MCF-7 cells organic extracts, 96% of the incubated radioactive material was recovered in the methanolic fraction. When aliquots of methanolic extract from [¹⁴C]-T incubations were submitted to thin-layer chromatography, four radioactive zones were detected, as shown in Fig. 1A. Zone 1 (*R_F* = 0.22), representing the major metabolic conversion products of [¹⁴C]-T, had a chromatographic behaviour identical to those of the 3α,5α-diol and 3β,5α-diol carriers. After elution, representative aliquots were separately mixed with additional radioinert 3α,5α-diol and 3β,5α-diol and recrystallised to constant sp. act. (Table 1). Formation of 3α,5α-diol was higher than that of its 3β isomer. Zone 2 (*R_F* = 0.34) was identified as unchanged [¹⁴C]-T,

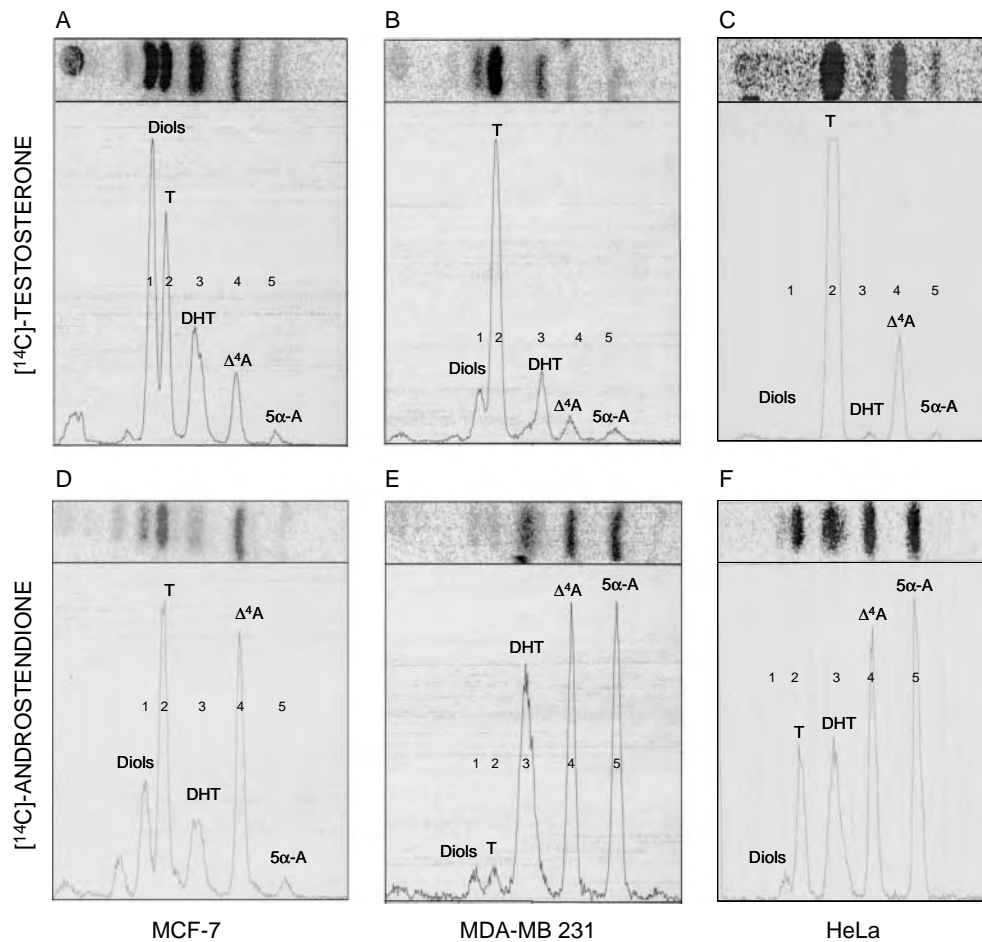


Figure 1 Representative chromatographic profiles of the methanolic extracts of MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells incubated with 2 μM [^{14}C]-labelled androgens. Extract aliquots were chromatographed on thin-layer plates. The radioactive zones detected are numbered according to their chromatographic mobility. The major metabolic conversion products of [^{14}C] testosterone (T) in MCF-7 cells (A) were 3 α ,5 α - and 3 β ,5 α -androstane diols (diols), while in MDA-MB 231 cells was 5 α -dihydrotestosterone (DHT) (B) and in HeLa cells (C) was androstenedione ($\Delta^4\text{A}$). [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ incubated with MCF-7 cells (D), was extensively bioconverted to testosterone and diols and to a lesser extent to DHT, whereas [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ incubated with MDA-MB 231 cells (E) was extensively bioconverted to 5 α -A and DHT. The major metabolic conversion products of [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ in HeLa cells (F) were 5 α -A, testosterone and DHT. Only unchanged [^{14}C]-labelled substrates were detected in the extracts from yeast cells, cell-free and boiled inactivated cells, used as negative controls. For details see text.

while zones 3 ($R_F=0.46$) and 4 ($R_F=0.55$) corresponded to DHT and $\Delta^4\text{A}$ respectively. The radiochemical purity of these [^{14}C]-T metabolites is shown in Table 1. Chromatographic analysis of the MDA-MB 231 cells methanolic extracts revealed a completely different [^{14}C]-T conversion pattern (Fig. 1B), with limited conversion to DHT and diols, and very little formation of $\Delta^4\text{A}$. The metabolism of [^{14}C]-T in HeLa cells was characterised by large bioconversion to $\Delta^4\text{A}$ and limited formation of DHT and 5 α -A. No diols were detected in the HeLa cells methanolic extracts, as depicted in Fig. 1C.

Chromatographic analysis of the organic extracts from [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ incubations with MCF-7 cells revealed the presence of five radioactive zones (Fig. 1D). Zone 1

($R_F=0.22$) and zone 2 ($R_F=0.34$), representing one the major metabolic conversion products of [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$, were identified as diols and testosterone respectively. Their radiochemical purity is shown in Table 1. Zone 3 ($R_F=0.46$) had a chromatographic behaviour identical to that of DHT. Zone 5 ($R_F=0.67$) had a chromatographic mobility corresponding to that of 5 α -A and zone 4 ($R_F=0.55$) corresponded to unconverted [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$. The radiochemical purity of A-ring-reduced metabolites of [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ is shown in Table 1. In contrast, the metabolic conversion pattern of [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ in MDA-MB 231 cells (Fig. 1E) was completely different from that observed in MCF-7 cells. The metabolism of [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ in HeLa cells was characterised by a limited

Table 1 Representative radiochemical purity of isolated metabolites after *in vitro* incubations of human breast and uterine cervical cancer with [¹⁴C]-labelled testosterone (T) and androstenedione (Δ⁴A)

	Successive crystallizations specific activity ([¹⁴ C] dpm/mg)	Isolated metabolites from [¹⁴ C]-Δ ⁴ A incubations	Successive crystallizations specific activity ([¹⁴ C] dpm/mg)		
Isolated metabolites from [¹⁴C]-T incubations					
3α, 5α-Androstenediol	C ₁ ^a	797	5α-Androstenedione	C ₁	527
	C ₂	658		C ₂	518
	C ₃	597		C ₃	509
	ML ₃ ^b	504		ML ₃	562
3β, 5α-Androstenediol	C ₁	385	Testosterone	C ₁	1285
	C ₂	291		C ₂	1133
	C ₃	214		C ₃	987
	ML ₃	224		ML ₃	915
5α-Dihydrotestosterone	C ₁	741			
	C ₂	660			
	C ₃	697			
	ML ₃	515			
Androstenedione	C ₁	981			
	C ₂	763			
	C ₃	525			
	ML ₃	493			

^aCrystals.^bMother liquors.

biotransformation to testosterone and 5α-reduced metabolites, as depicted in Fig. 1F.

The metabolism of testosterone in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, as a function of substrate concentration is shown in Fig. 2. Incubations were carried out at 37 °C, for 2 h, at pH 7.4 and 5.2. The metabolic pattern of [¹⁴C]-T in MCF-7 cells (Fig. 2A and B) was similar in incubations carried out at both pH levels, with the distinctive feature of a large formation of diols, noticed even at the lowest substrate concentration. Interestingly, a significantly larger formation of diols occurred in incubations at pH 7.4 as compared with those at pH 5.2. In contrast, very little, if any, diol formation was noticed in incubations of MDA-MB 231 and HeLa cells with [¹⁴C]-T, even at the highest substrate concentration studied (Fig. 2C–F). A large formation of Δ⁴A at both pH levels was observed in HeLa cells and a limited bioconversion of testosterone to DHT. When MCF-7 cell homogenates, added with NADPH, were incubated with [¹⁴C]-T for 2 h, the percent conversion of testosterone to diols was significantly higher at pH 7.4 (63.2%), as compared with those at pH 5.2 (37.4%).

The metabolism of [¹⁴C]-Δ⁴A in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, as a function of substrate concentration, at pH 7.4 and 5.2 is shown in Fig. 3. The bioconversion pattern of Δ⁴A in MCF-7 cells was similar in incubations carried out at both pH levels (Fig. 3A and B), and was characterised by a simultaneous large formation of testosterone and 5α-reduced metabolites (5α-A, diols and DHT). A moderately large formation of 5α-reduced [¹⁴C]-Δ⁴A metabolite was noticed in incubations at pH 7.4 as compared with those at pH 5.2. Similar results were obtained in incubations of MCF-7 cell homogenates with [¹⁴C]-Δ⁴A. On the contrary, the bioconversion pattern of [¹⁴C]-Δ⁴A in MDA-MB 231 and

HeLa cells was characterised by very little formation of testosterone, noticed only at the highest substrate concentration used, and a relatively higher formation of 5α-A, particularly in incubations undertaken at pH 7.4 (Fig. 3C–F).

The enzyme-mediated formation of 5α-reduced metabolites of testosterone in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, as a function of time, is depicted in Fig. 4. Cells were incubated with 2 μM [¹⁴C]-T at 37 °C, pH 7.4, at different time periods. The results demonstrated that radiolabelled testosterone incubated with MCF-7 cells was extensively bioconverted to diols, presumably through its prior conversion to DHT. Indeed, the maximal accumulation of DHT occurred at 30 min of incubation with a subsequent decline and a concomitant time-dependent increase on the formation of diols (Fig. 4A). At 48 h incubation, 48.3% of the [¹⁴C]-labelled testosterone was bioconverted to diols. According to recrystallisation data, the formation of 3α,5α-diol and 3β,5α-diol occurred in a ratio of 2:1. In sharp contrast, the absence of formation of diols was observed in incubations of MDA-MB 231 and HeLa cells with [¹⁴C]-T, with very small and delayed formation of DHT (Fig. 4B and C). The effect of a 5α-steroid reductases inhibitor on the metabolism of androgens in MCF-7 cells is shown in Fig. 5. Cells were incubated with 2 μM [¹⁴C]-T or [¹⁴C]-Δ⁴A, at 37 °C, for 48 h, at pH 7.4, in the absence or presence of 1 mM finasteride. As it can be seen, the addition of finasteride resulted in a significant diminution of the bioconversion of radiolabelled testosterone and Δ⁴A to their corresponding 5α-dihydro metabolites and in an abolishment of diols formation (Fig. 5, inserts). In all incubations with MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, neither oestradiol nor oestrone was detected as conversion products of [¹⁴C]-T and [¹⁴C]-Δ⁴A.

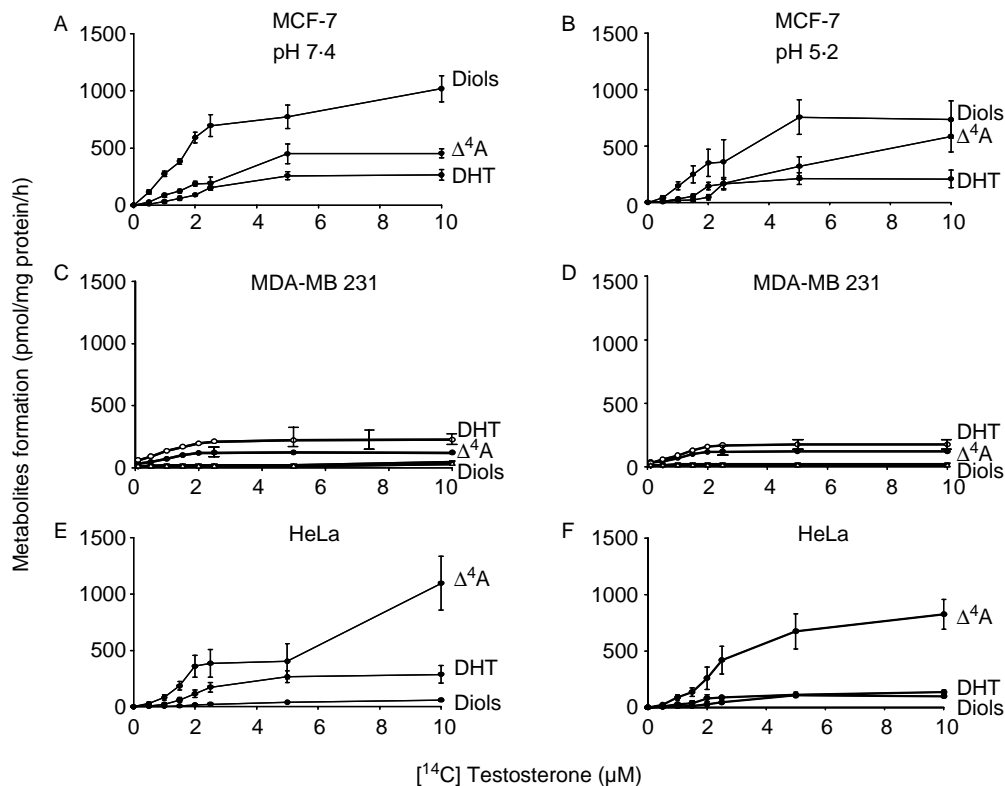


Figure 2 Bioconversion of [^{14}C] testosterone to non-phenolic metabolites in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, as a function of substrate concentration. Incubations were carried out for 2 h at 37 °C, using increasing substrate concentrations, at two different pH levels. The $3\alpha,5\alpha$ - and $3\beta,5\alpha$ -androstanediols (diols) were identified as the major metabolic conversion products in MCF-7 cells, even at the lowest substrate concentration. Diol formation was higher in incubations at pH 7.4 (A), as compared with those at pH 5.2 (B). Androstenedione ($\Delta^4\text{A}$) and 5α -dihydrotestosterone (DHT), in a smaller proportion, were also identified as testosterone metabolites at both pH levels (A) and (B). On the contrary, very little formation of metabolites occurred in incubations of [^{14}C]-testosterone with MDA-MB 231 cells (C) and (D), whereas a large bioconversion of [^{14}C]-testosterone to $\Delta^4\text{A}$ was observed in HeLa cells incubations, at both pH levels (E) and (F). Each point represents the mean \pm S.E.M. of five experiments in triplicate.

Only unmodified [^{14}C]-labelled substrates were identified in incubations using yeast cells, boiled inactivated cells and cell-free preparations, used as negative controls.

Enzymes gene expression profile in MCF-7 and MDA-MB 231 cells

The results from androgen-metabolising enzymes gene expression in the two cell lines studied, as determined by semi-quantitative RT-PCR assays, are shown in Fig. 6. The level of expression of SRD5A1 was significantly ($P < 0.05$) higher in MCF-7 cells, as compared with MDA-MB 231 cells. In contrast, the expression of SRD5A2 in both cell lines did not exhibit differences. Interestingly, the expression of SRD5A1 was significantly higher ($P < 0.01$) in both cell lines, as compared with SRD5A2. The expression level of AKR1C1 and AKR1C2 was similar in MCF-7 and MDA-MB 231 cells, though the expression of AKR1C1 was

significantly higher ($P < 0.001$) than that of AKR1C2 in both cell lines studied.

Binding affinity of androstane diols to hER

The effect of increasing concentrations of non-radioactive diols upon the [^3H]-E $_2$ binding to hER in HeLa cells transfected with expression vectors for either hER α or hER β is shown in Fig. 7. The [^3H]-E $_2$ bound to hER in the absence of steroid competitors was set at 100% in this radioligand competitive assay. Even though both diols were competitors for hER α , the $3\beta,5\alpha$ -diol exhibited higher affinity (RBA = 1.9%; $K_i = 3.25$ nM) than its 3α -isomer (RBA = 0.009%; $K_i = 625$ nM). The $3\beta,5\alpha$ -diol was more efficient competitor for the β subtype of hER (RBA = 0.92%; $K_i = 6.5$ nM) than $3\alpha,5\alpha$ -diol (RBA = 0.006%; $K_i = 950$ nM). The $3\beta,5\alpha$ -diol and to a lesser extent its 3α -isomer, bound to both subtypes

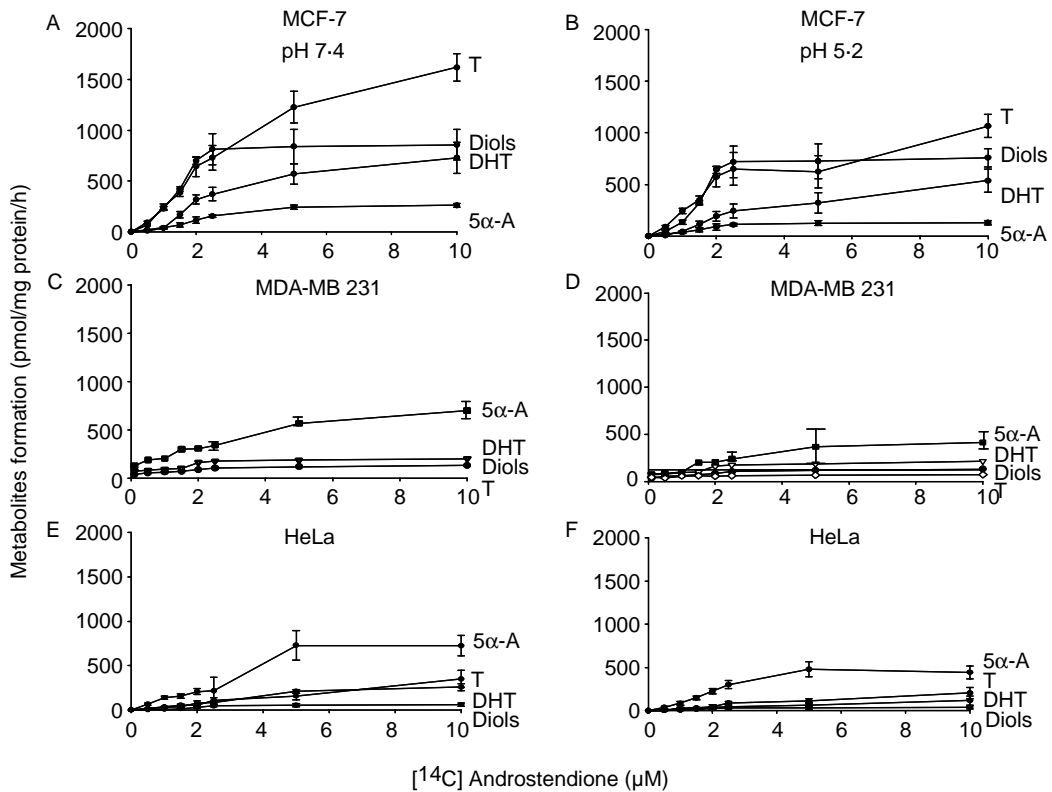


Figure 3 Bioconversion of [^{14}C]-labelled androstenedione ($\Delta^4\text{A}$) to non-phenolic metabolites in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, as a function of substrate concentration. Incubations were carried out for 2 h at 37 °C, using increasing substrate concentrations, at two different pH levels. Testosterone (T) and 3 α ,5 α - and 3 β ,5 α -androstanediols (diols) were identified as the major metabolic conversion products in MCF-7 cells (A) and (B). A larger formation of T and 5 α -reduced $\Delta^4\text{A}$ metabolites occurred at pH 7.4 (A), as compared with incubations at pH 5.2 (B). The major metabolic product of [^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$ in MDA-MB 231 and HeLa cells (C–F) was 5 α - dihydroandrostanedione (5 α -A) with very little formation of T and DHT. Each point represents the mean \pm S.E.M. of five experiments in triplicate.

of hER, in a similar manner to that of oestradiol used as positive control, though with lower affinity.

Oestrogen-like transactivation effect of androstane diols

The transactivation effect of 3 α ,5 α -diol and its 3 β -isomer in the co-transfected cell expression system employed is shown in Fig. 8. Both diols induced the transactivation of hER α -mediated CAT activity, in a dose–response manner, similar to that induced by oestradiol, yet with lower potency (Fig. 8A and B). At steroid concentrations that induced the highest CAT gene transactivation, the oestrogen-like effect of 3 β ,5 α -diol (1×10^{-7} M) was 100-fold less potent than oestradiol (1×10^{-9} M), whereas 3 α ,5 α -diol (1×10^{-6} M) was tenfold less potent than 3 β ,5 α -diol as depicted in Fig. 8A and B. The effect of both diols on hER β -mediated reporter gene transcription, as compared to that of oestradiol, is shown in Fig. 8C and D. The highest oestrogen-agonistic transactivation effect of 3 β ,5 α -diol (1×10^{-7} M) was 100-fold less potent than oestradiol (1×10^{-9} M), while 3 α ,5 α -diol

induced transactivation only at the highest concentration employed (1×10^{-6} M). The comparative potencies of both diols and oestradiol, to induce CAT gene transactivation mediated by the subtypes α and β of hER, as judged by their EC₅₀, are depicted in Table 2.

The addition of ICI-182 780 to cell culture incubations, significantly inhibited ($P < 0.001$) the ability of 3 β ,5 α -diol, 3 α ,5 α -diol and oestradiol to stimulate hER α - and hER β -mediated transcriptional activities as shown in Fig. 9. These results ensured the stimulatory activity of diols via both subtypes of hER.

Effect of diols in cell proliferation

To assess the effect of 3 α ,5 α - and 3 β ,5 α -diols on cell proliferation in MCF-7 cells, a set of experiments using [^3H]-thymidine incorporation method was undertaken in triplicate. Oestradiol and vehicle served as experimental controls. The results indicated that after 48 h treatment, 3 β ,5 α -diol (1×10^{-7} M) was capable of increasing the proliferation rate

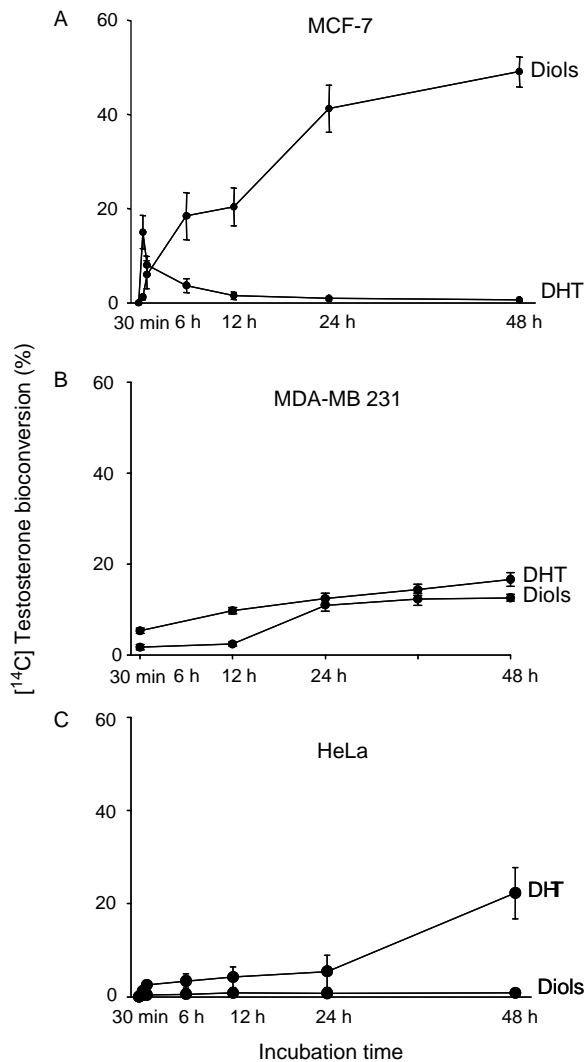


Figure 4 Formation of 5α -reduced testosterone metabolites in MCF-7, MDA-MB 231 and HeLa cells, as a function of time. Incubations were carried out using $2 \mu\text{M}$ [^{14}C] testosterone, at 37°C , pH 7.4, for different time periods. An early (30 min) bioconversion of testosterone to 5α -dihydrotestosterone (DHT) and a subsequent large formation of $3\alpha,5\alpha$ - and $3\beta,5\alpha$ -androstenediols (diols) were observed in MCF-7 cells (A). After 48 h incubation, 48.3% of the radiolabelled substrate was bioconverted to diols. A limited formation of diols was observed in MDA-MB 231 cells incubations (B), while a delayed formation of DHT without further conversion to diols occurred in HeLa cells incubations (C). Each point represents the mean \pm S.E.M. in five experiments in triplicate.

in MCF-7 cells significantly (150%) as compared with vehicle, in a similar fashion to that exerted by 1×10^{-9} M oestradiol (140%). Treatment with 1×10^{-7} M $3\alpha,5\alpha$ -diol also increased cell proliferation (50%) as compared with vehicle in MCF-7 cells. The effect of oestradiol, $3\alpha,5\alpha$ - and $3\beta,5\alpha$ -diols on MCF-7 cell proliferation was not seen in MDA-MB 231 cells.

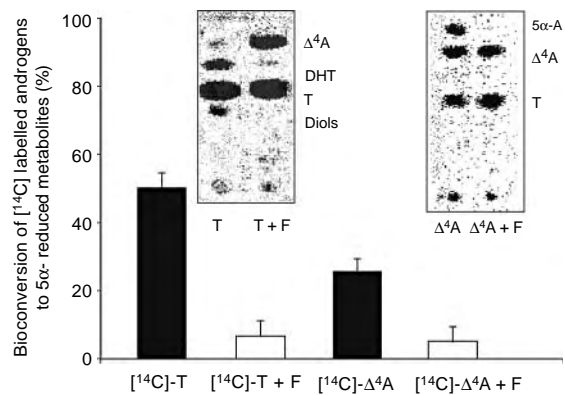


Figure 5 Effects of finasteride (F), a 5α -steroid reductases inhibitor, on androgen metabolism in MCF-7 cells. Incubations were carried out with $2 \mu\text{M}$ [^{14}C] testosterone ([^{14}C]-T) or $2 \mu\text{M}$ [^{14}C] androstenedione ([^{14}C]- $\Delta^4\text{A}$), at 37°C , pH 7.4, for 48 h, in the presence or absence of 1 mM finasteride. Addition of the enzyme inhibitor diminished the formation of 5α -dihydrotestosterone (DHT) or 5α -androstenedione (5α -A) and precluded the formation of androstenediols (diols). The data represent the mean \pm S.E.M. of five experiments in triplicate. Location of radiolabelled steroids in chromatographic plates is shown in the inserts.

Discussion

The results of this study clearly demonstrate that oestrogen-dependent human breast cancer cells efficiently biotransform androgens to A-ring tetrahydro-reduced metabolites, which possess the capability to transactivate oestrogen-regulated genes mediated by the α and β subtypes of hER. Indeed, MCF-7 cells incubated with radiolabelled androgens exhibited a large and rapid formation of tetrahydro-reduced metabolites, thus indicating a great activity of 5α -steroid reductases, types 1 and 2, and two enzymes of the aldo-keto reductases family, the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase and the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. The large conversion of testosterone to $3\alpha,5\alpha$ - and $3\beta,5\alpha$ -diols in MCF-7 cells had DHT as an obligatory intermediary as it was demonstrated by its inhibition induced by finasteride. This observation supports the concept that formation of diols from testosterone requires enzyme-mediated 5α -reduction (trans A/B ring junction) as the first metabolic step. In contrast, non-oestrogen-dependent MDA-MB 231 cells exhibited a limited bioconversion of androgens to 5α -reduced metabolites and very little, if any, formation of diols. An absence of bioconversion of androgen to diols was observed in HeLa and yeast cell incubations used as controls. The finding of an enhanced enzyme 5α -steroid reductase activity in MCF-7 cells, particularly in experiments carried out at pH 7.4, is in line with the report of Suzuki *et al.* (2001), who have demonstrated an overexpression of the 5α -steroid reductase type-1 gene in human breast cancer tissues. Interestingly, our results revealed a selectively higher expression level of SRD5A1 in MCF-7 cells as compared with MDA-MB 231 cells, indicating a good agreement between enzyme expression levels and activities in human breast cancer cells. In contrast, no difference on the

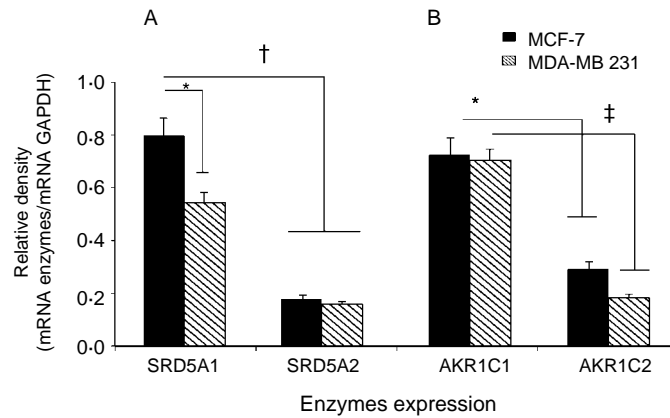


Figure 6 5α -Steroid reductases type-1 (SRD5A1) and type-2 (SRD5A2), 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) and 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2) mRNA expression levels in MCF-7 and MDA-MB 231 cells. The expression of SRD5A1-mRNA is significantly higher in MCF-7 cells (1.45-fold) as compared with those of MDA-MB 231. No differences were observed in the SRD5A2 expression levels in both cell lines. Interestingly, the mRNA expression of SRD5A1 in MCF-7 and MDA-MB 231 cells were significantly higher than that of SRD5A2 expression (4.4- and 3.4-fold respectively). The AKR1C1 expression levels in MCF-7 and MDA-MB 231 cells did not exhibit significant differences, while the mRNA expression of AKR1C2 was higher in MCF-7 as compared with MDA-MB 231 cells. The expression of AKR1C1 in MCF-7 and MDA-MB 231 cells was significantly higher than that of AKR1C2 (2.4- and 3.6-fold respectively). Values are given as relative density ratios. The data represent the mean \pm s.d. of four experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.001$.

expression levels of AKR1C1 and AKR1C2 in MCF-7 and MDA-MB 231 cells was noticed. These results confirm and extend the report of Wiebe *et al.* (2000), who, using radiolabelled progesterone as substrate, demonstrated an

enhanced 5α -steroid reductase activity and also an over-expression of the 5α -steroid reductase type-1 gene in MCF-7 cells, as compared with oestrogen-resistant breast cells (MCF-10A). Furthermore, Wiebe & Lewis (2003) demonstrated the

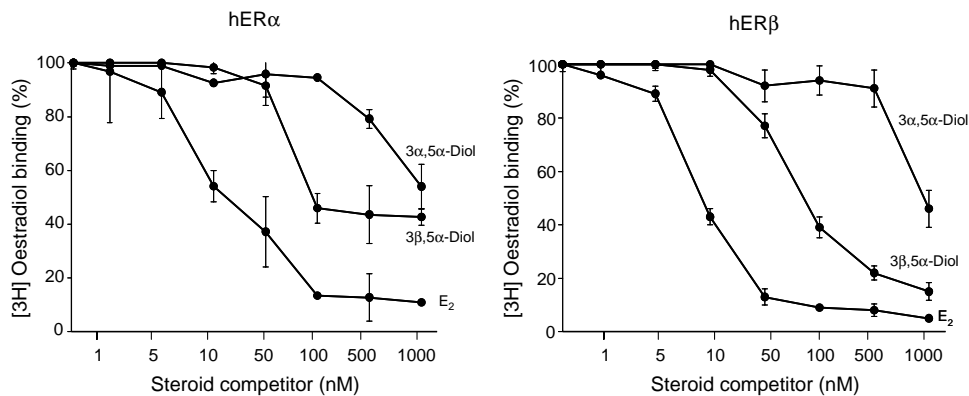


Figure 7 Binding affinities of $3\alpha,5\alpha$ - and $3\beta,5\alpha$ - androstenediols (diols) to human oestrogen receptors (hER). Cytosol aliquots of HeLa cells transfected with either hER α or hER β gene expression vectors were incubated with 1 nM [3 H] oestradiol at 4 °C, for 48 h, in the absence or presence of increasing concentrations of radioinert $3\alpha,5\alpha$ -diol, $3\beta,5\alpha$ -diol and oestradiol (E_2). Bound and free steroid fractions were separated by the addition of dextran-coated charcoal. The $3\beta,5\alpha$ -diol efficiently bound to both subtypes of hER, though with higher affinity for hER α . The $3\alpha,5\alpha$ -diol also bound to hER α and hER β , but only at the highest concentration used. E_2 , used as the control, was the most potent competitor for α and β subtypes of hER. Results represent the mean \pm s.d. of five experiments in triplicate.

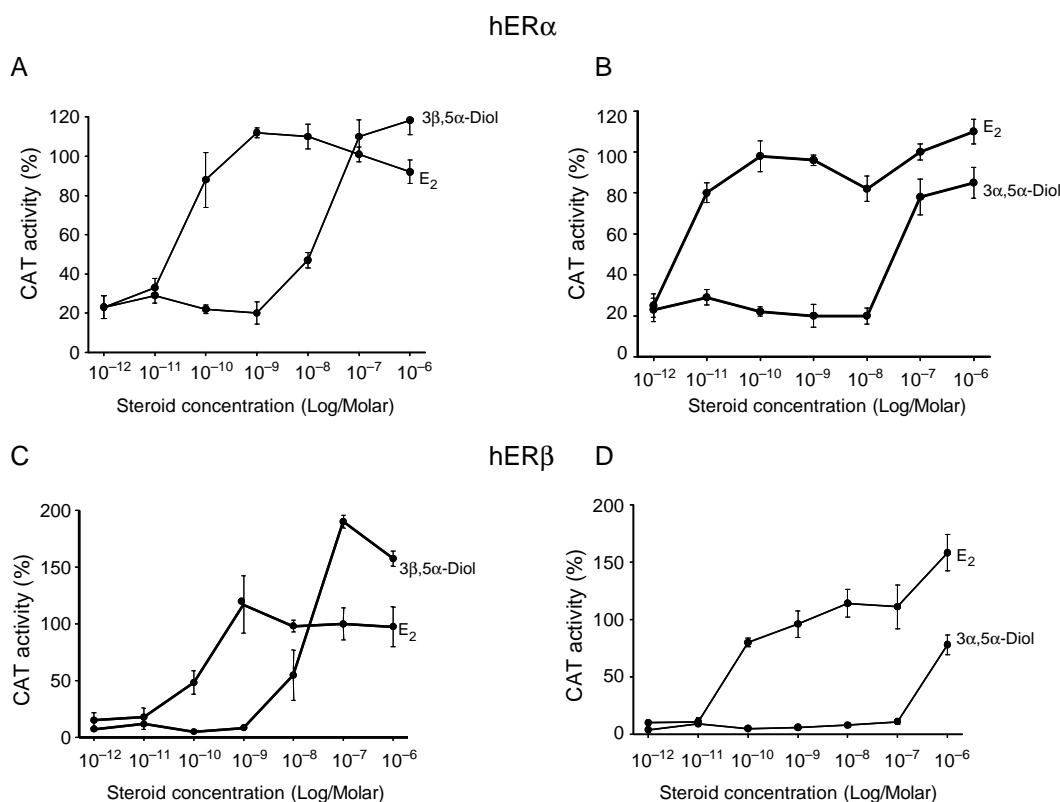


Figure 8 Oestrogen-like transactivation effects of androstanediols. Increasing concentrations of 3 α ,5 α -androstanediol (3 α ,5 α -diol), 3 β ,5 α -androstanediol (3 β ,5 α -diol) and oestradiol (E $_2$) were incubated with HeLa cells transiently co-transfected with expression vectors for hER α or hER β and an ERE-E1b-CAT reporter gene, for 24 h, at 37 °C. Results are expressed as percentage of CAT activity. Concentrations of 1×10^{-8} M onwards of 3 β ,5 α -Diol efficiently induced hER α - and hER β -mediated transactivation, in a similar manner to that of E $_2$ (A) and (C). 3 α ,5 α -diol also induced hER α - and hER β -mediated transactivation, yet with lower potency (B) and (D). Values are the mean \pm s.d. of five experiments performed in triplicate. For details see text.

lower expression levels of 3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase genes in breast cancer tissues as compared with paired breast normal tissue.

Another striking finding of this study was that 3 α ,5 α - and 3 β ,5 α -diols, the major metabolic conversion products of testosterone in MCF-7 cells, interact with relatively high binding affinity with both subtypes of hER and are capable of transactivating an oestrogen-dependent reporter gene (CAT) in the transiently co-transfected cell expression system employed, resembling the effects of naturally occurring oestradiol, though with lower potency. It must be underlined that even the formation of 3 α ,5 α -diol from testosterone was almost double than that of its 3 β -epimer, according to recrystallisation data, the 3 β ,5 α -diol exhibited higher hER-binding affinity and higher oestrogen-like transactivation potency, as compared with its 3 α -epimer, as shown in Fig. 8 and Table 2. Further evidence that diols-induced gene transactivation in the construct assay is mediated via hER α and hER β , was derived from the observation that ICI-182 780 was able to preclude this effect. Our results confirm and extend previous reports on the activation of

hER α by 3 β ,5 α -diol. (Maggiolini *et al.* 1999, García-Becerra *et al.* 2002). These data are similar, though non-identical, with our previous observations with the tetrahydro-reduced metabolites of synthetic 19-nor progestins, which are also able to transactivate oestrogen-dependent genes mediated through hER α , but not through hER β , behaving as selective hER modulators (Lemus *et al.* 2000, Larrea *et al.* 2001,

Table 2 Human oestrogen receptors (hER)-mediated gene transactivation induced by androstanediols in a co-transfected cell expression system

Steroids	EC $_{50}$	
	hER α (mol/l)	hER β (mol/l)
Oestradiol	6.74×10^{-11}	3.37×10^{-12}
3 β ,5 α -Androstanediol	1.61×10^{-9}	1.41×10^{-8}
3 α ,5 α -Androstanediol	9.10×10^{-8}	3.05×10^{-6}

Oestradiol served as control. Results are presented as the effective concentration values (EC $_{50}$). For details see text.

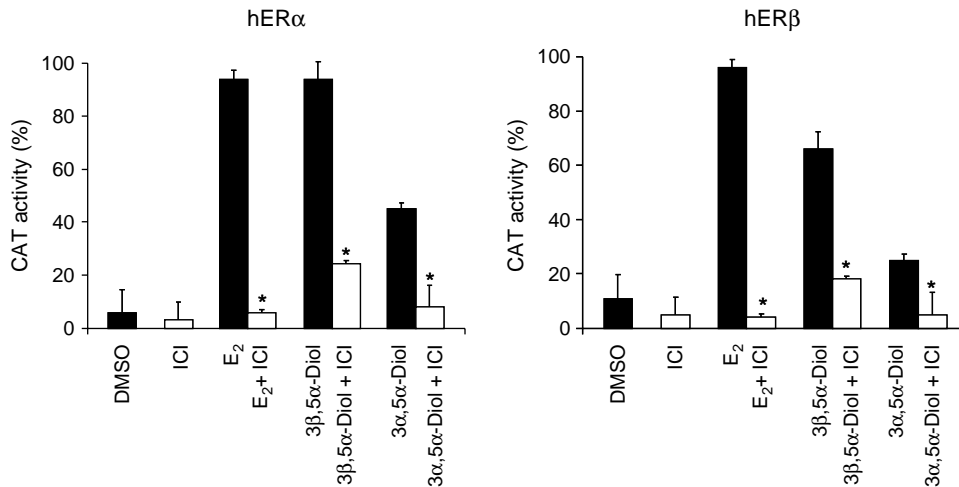


Figure 9 Effect of the antioestrogen ICI-182 780 on hER-mediated transactivation induced by androstane diols. HeLa cells transiently co-transfected with expression vectors for hER α or hER β and an ERE-E1b-CAT reporter gene were incubated with 1×10^{-7} M 3 β ,5 α -androstane diol (3 β ,5 α -diol), 3 α ,5 α -androstane diol (3 α ,5 α -diol) and 1×10^{-8} M oestradiol (E₂), in the presence or absence of 1×10^{-7} M ICI-182 780 (ICI). Incubations with ICI alone and with steroid vehicle (DMSO) served as controls. Results are expressed as percentage of CAT activity. Addition of the antioestrogen significantly inhibited ($P < 0.001$) the transactivation induced by androstane diols and E₂. Values are the mean \pm s.d. of five experiments performed in triplicate. * $P < 0.001$ vs DMSO. For details see text.

García-Becerra *et al.* 2002). Even though the different structural characteristics for the α and β subtypes of hER displayed by the tetrahydro metabolites of naturally occurring androgens and those of 19-nor progestins have been studied (Kubli-Garfias *et al.* 1998, 2002), the understanding of their binding mechanisms still awaits further studies.

The study of enzyme gene expression disclosed that the large formation of diols in MCF-7 cells, with potent intrinsic oestrogen-agonistic effects at the genomic level, is the result of enhanced local activities of 5 α -steroid reductases. This is mainly due to an overexpression of SRD5A1 and may have an important physiopathological significance, since these locally produced androgen metabolites are exerting their oestrogen-like intracrine effects in the same cells in which their synthesis take place, without significant diffusion into the circulation (Gingras *et al.* 1999, Labrie *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2005). Although diols could be inactivated via glucuroconjugation, the enzymes responsible for this metabolic process (glucuronosyl-transferases) have not been characterised in the human mammary gland (Labrie *et al.* 2003). This observation is in line with the results of the present study, in which no water-soluble androgen metabolites were found. Furthermore, the role of 3 β ,5 α -diol in breast cancer and other hormone-dependent neoplasias deserves further investigation because, in addition to its potent oestrogen-agonistic effects mediated via both subtypes of hER, its bioformation, in contrast to 3 α ,5 α -diol, is virtually irreversible (Steckelbroeck *et al.* 2004). In addition, 3 β ,5 α -diol may exert anti-proliferative and apoptotic effects in prostate epithelial cells through its interaction with hER β (Weihua *et al.* 2001, 2002). The preliminary results presented herein

demonstrating that 3 β ,5 α -diol and to a lesser extent its 3 α -epimer are capable of inducing cell proliferation in cultured MCF-7 cells, in a similar manner to that of oestradiol, yet with lower potency, suggest the involvement of diols in breast cancer progression, however, further studies are required to have a better understanding on the role of diols in this malignancy. The on-going studies in our laboratories indicate that diols bind with low affinity to the human androgen receptor (hAR) and induce very limited hAR-mediated transactivation, particularly the 3 α ,5 α -diol (A E Lemus, P Damian-Matsumura, R Garcia-Becerra, L Gonzalez, D Orolaz, F Larrea & G Perez, Unpublished observations). The finasteride-induced inhibition of DHT and diols formation in MCF-7 cells, as demonstrated in this study, may have additional interest, since various locally formed A-ring-reduced metabolites of progesterone (Wiebe *et al.* 2000, Wiebe & Muzia 2001, Wiebe & Lewis 2003) are capable of inducing cell proliferation in human breast cancer, through a novel, non-genomic mechanism (Weiler & Wiebe 2000). The overall results demonstrated that finasteride inhibits the formation of oestrogenic steroids (diols) generated downstream of DHT, as suggested recently by Ishikawa *et al.* (2006). In all, this study discloses a distinctive metabolic pathway of androgens in MCF-7 cells leading to a large formation of diols with oestrogen-agonistic activities, providing an insight into the controversial role of testosterone in human breast cancer. The data also demonstrated that pharmacological inhibition of 5 α -steroid reductases precludes the bioconversion of androgens to non-phenolic metabolites with oestrogen-like effects, opening a new avenue of approach in breast cancer research and treatment.

Acknowledgements

Supported partially by Research Macroproject Programme, School of Medicine and PAPIIT (Grant IN202102-3), DGAPA, UNAM; Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization (Geneva) and the Division of C B S, UAM-I. The expert assistance of Dr Armando Tovar is greatly appreciated. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Adams JB 1998 Adrenal androgens and human breast cancer: a new appraisal. *Breast Cancer Research and Treatment* **51** 183–188.
- Ariga N, Moriya T, Suzuki T, Kimura M, Ohuchi N, Satomi S & Sasano H 2000 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in ductal carcinoma *in situ* and intraductal proliferative lesions of the human breast. *Anticancer Research* **20** 1101–1108.
- Aspinall SR, Stamp S, Davison A, Shenton BK & Lennard TWJ 2004 The proliferative effects of 5-androstene-3 β , 17 β -diol and 5 α -dihydrotestosterone on cell cycle analysis and cell proliferation in MCF7, T47D and MDAMB231 breast cancer cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **88** 37–51.
- Bonney RC, Reed MJ, Davidson K, Beranek PA & James VH 1983 The relationship between 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and oestrogen concentrations in human breast tumours and in normal breast tissue. *Clinical Endocrinology* **19** 727–739.
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248–254.
- Brodie AM & Longcope C 1980 Inhibition of peripheral aromatization by aromatase inhibitors, 4-hydroxy- and 4-acetoxy-androstene-3,17-dione. *Endocrinology* **106** 19–21.
- Brodie AM, Schwarzel WC, Shaikh AA & Brodie HJ 1977 The effect of an aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, on estrogen-dependent processes in reproduction and breast cancer. *Endocrinology* **100** 1684–1695.
- Breuggemeier RW, Hackett JC & Diaz-Cruz ES 2005 Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews* **26** 331–345.
- Buzdar AU 2002 New generation aromatase inhibitors – from the advanced to the adjuvant setting. *Breast Cancer Research and Treatment* **75** S13–S17.
- Catherino WH, Jeng MH & Jordan VC 1993 Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through an oestrogen receptor mediated mechanism. *British Journal of Cancer* **67** 945–952.
- Cheng YC & Prusoff WH 1973 Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **22** 3099–3108.
- Coombes RC, Goss P, Dowsett M, Gazet JC & Brodie A 1984 4-Hydroxy androstenedione in treatment of postmenopausal patients with advanced breast cancer. *Lancet* **2** 1237–1239.
- Coombes RC, Goss PE, Dowsett M, Hutchinson G, Cunningham D, Jarman M & Brodie AMH 1987 4-Hydroxyandrostenedione treatment for postmenopausal patients with advanced breast cancer. *Steroids* **50** 245–252.
- Costlow ME, Buschow RA & McGuire WL 1976 Prolactin receptors and androgen-induced regression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinoma. *Cancer Research* **36** 3324–3329.
- Demers LM 1994 Effects of fadrozole (CGS 16949A) and letrozole (CGS20267) on the inhibition of aromatase activity in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* **30** 95–102.
- García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez-Palacios G & Larrea F 2002 The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- α . *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **82** 333–341.
- Gingras S, Moriggl R, Groner B & Simard J 1999 Induction of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase type 1 gene transcription in human breast cancer cell lines and in normal mammary epithelial cells by interleukin-4 and interleukin-13. *Molecular Endocrinology* **13** 66–81.
- Girdler F & Brotherick I 2000 The oestrogen receptors (ER α and ER β) and their role in breast cancer: a review. *Breast* **9** 194–200.
- Goss PE 1999 Risks versus benefits in the clinical application of aromatase inhibitors. *Endocrine-Related Cancer* **6** 325–332.
- Greeve MA, Allan RK, Harvey JM & Bentel JM 2004 Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by 5 α -dihydrotestosterone; a role for p21 (Cip1/Waf1). *Journal of Molecular Endocrinology* **32** 793–810.
- Hackenberg R, Turgetto I, Filmer A & Schulz KD 1993 Estrogen and androgen receptor mediated stimulation and inhibition of proliferation by androst-5-ene-3 β ,17 β -diol in human mammary cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **46** 597–603.
- Ishikawa T, Glidewell-Kenney C & Jameson JL 2006 Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 α -reductase inhibitor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **98** 133–138.
- Jørgensen L, Brüner N, Spang-Thomsen M, James MR, Clarke R, Dombrowsky P & Sventrup B 1997 Steroid metabolism in the hormone dependent MCF-7 human breast carcinoma cell line and its two hormone resistant subpopulations MCF-7/LCC1 and MCF-7/LCC2. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **63** 275–281.
- Kirschner MA 1979 The role of hormones in the development of human breast cancer. In *Breast Cancer 3: Advances in Research and Treatment, Current Topics.*, New York: Plenum Press. pp 199–229.
- Kubli-Garfias C, Vázquez R & Mendieta J 1998 Austin model 1 study of the effect of carbonyl and hydroxyl functional groups on the electronic structure of androstane. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **428** 189–194.
- Kubli-Garfias C, Vázquez R, Cooney AJ & Larrea F 2002 *Ab initio* electronic structure of the progestogen norethisterone and its 5 α -derivatives. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **82** 385–391.
- Labrie F, Simard J, de Launoit Y, Poulin R, Theriault C, Dumont M, Dauvois S, Martel C & Li S-M 1992 Androgens and breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* **16** 31–38.
- Labrie F, Luu-The V, Lin S-X, Labrie C, Simard J, Breton R & Bélanger A 1997 The key role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* **62** 148–158.
- Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez J-L & Candas B 1998 DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids* **63** 322–328.
- Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G & Bélanger A 2000 Intracrinology: role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology* **25** 1–16.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Lin S-X & Pelletier G 2003 Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocrine Reviews* **24** 152–182.
- Larrea F, García-Becerra R, Lemus AE, García GA, Pérez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL & Cooney AJ 2001 A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER α . *Endocrinology* **142** 3791–3799.
- Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García GA, Grillasa I, Damián-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F & Pérez-Palacios G 2000 The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *Journal of Endocrinology* **165** 693–702.
- Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasa I & Pérez-Palacios G 2001 *In vitro* metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity. *European Journal of Pharmacology* **417** 249–256.
- Liao DJ & Dickson RB 2002 Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **80** 175–189.

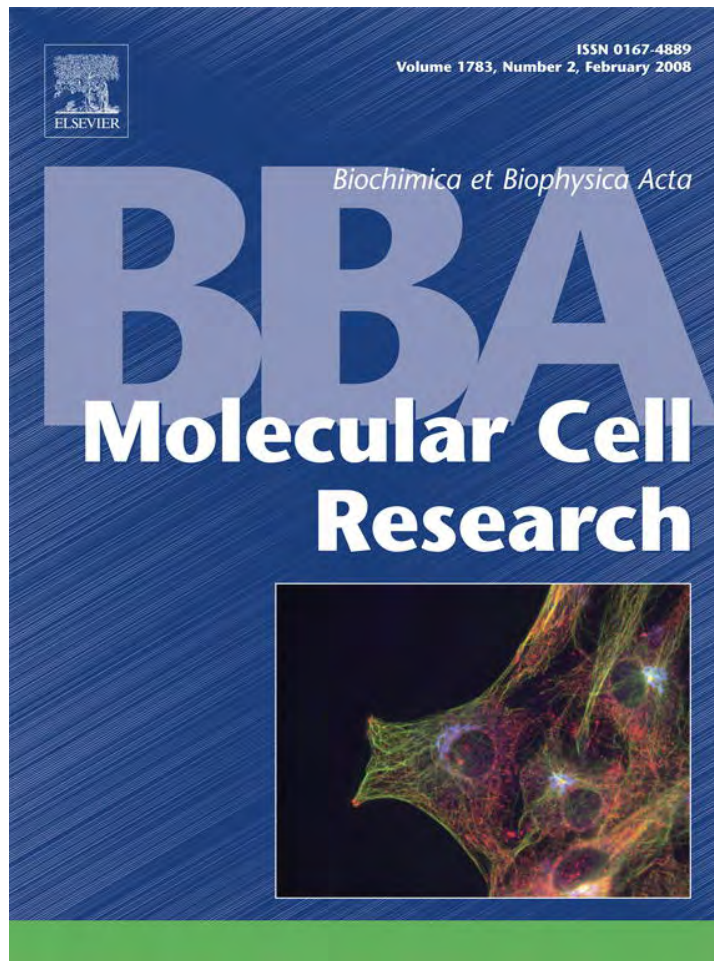
- Liao D-ZJ, Cooley GP, Pantazis CG, Hou X & Li SA 1998 Promotion of estrogen-induced mammary gland carcinogenesis by androgen in the male Noble rat: probable mediation by steroid receptors. *Carcinogenesis* **19** 2173–2180.
- Lippman M 1998 Endocrine-responsive cancer. In *Williams Textbook of Endocrinology*, pp 1675–1692. Eds JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg & PR Larsen. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.
- Lippman M, Bolan G & Huff K 1976 The effects of androgens and antiandrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Research* **36** 4610–4618.
- Lønning PE 2004 Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **11** 179–189.
- Lopez-Diazguerrero NE, Lopez-Araiza H, Conde-Perezprina JC, Bucio L, Cardenas-Aguayo MC, Ventura JL, Covarrubias L, Gutierrez-Ruiz MC, Zentella A & Konigsberg M 2006 Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Radical Biology and Medicine* **40** 1161–1169.
- Maggiolini M, Donzé O, Jeannin E, Andò S & Picard D 1999 Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor α . *Cancer Research* **59** 4864–4869.
- Musgrove EA & Sutherland RL 1994 Cell cycle control by steroid hormones. *Seminars in Cancer Biology* **5** 381–389.
- Nicholson RI, Gotting KE, Gee J & Walker KJ 1988 Actions of oestrogens and antiestrogens on rat mammary gland development: relevance to breast cancer prevention. *Journal of Steroid Biochemistry* **30** 95–103.
- Pasqualini JR & Chetrite G 1996 Activity, regulation and expression of sulfatase, sulfotransferase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in breast cancer. In *Hormone-Dependent Cancer*, pp 25–80. Eds JR Pasqualini & BS Katzenellenbogen. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Pike MC & Spicer DV 1991 Endogenous estrogen and progesterone as the major determinants of breast cancer risk: prospects for control by “natural” and “technological” means. In *Hormonal Carcinogenesis*, pp 209–216. Eds JJ Li, S Nandi & SA Li. New York, NY, USA: Springer-Verlag.
- Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L & Press MF 1993 Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiologic Reviews* **15** 17–35.
- Poulin R, Baker D & Labrie F 1988 Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Research and Treatment* **12** 213–225.
- Ragaz J 1999 Status of aromatase inhibitors in relation to other breast cancer treatment modalities. *Endocrine-Related Cancer* **6** 277–291.
- Reel JR, Humphrey RR, Shih Y-H, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL & Edgren RA 1979 Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fertility and Sterility* **31** 552–561.
- Roy R, Dauvois S, Labrie F & Bélanger A 1992 Estrogen-stimulated glucuronidation of dihydrotestosterone in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41** 579–582.
- Russell DW & Wilson JD 1994 Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **63** 25–61.
- Santen RJ, Manni A, Harvey H & Redmond C 1990 Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocrine Reviews* **11** 221–265.
- Santillán R, Pérez-Palacios G, Reyes M, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I & Lemus AE 2001 Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *European Journal of Pharmacology* **427** 167–174.
- Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG & Nagura H 1996 Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 4042–4046.
- Sasano H, Sato S, Ito K, Yajima A, Nakamura J, Yoshihama M, Ariga K, Anderson TJ & Miller WR 1999 Effects of aromatase inhibitors on the pathobiology of human breast, endometrial and ovarian carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* **6** 197–204.
- Schoonen WGEJ, Joosten JWH & Kloosterboer HJ 1995a Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **55** 423–437.
- Schoonen WGEJ, Joosten JWH & Kloosterboer HJ 1995b Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: II, T47D cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **55** 439–444.
- Smith JA & King RJ 1972 Effects of steroids on growth of an androgen-dependent mouse mammary carcinoma in cell culture. *Experimental Cell Research* **73** 351–359.
- Smith CL, Conneely OM & O'Malley BW 1993 Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *PNAS* **90** 6120–6124.
- Somboonporn W & Davis SR 2004 Testosterone effects on the breast: implications for testosterone therapy for women. *Endocrine Reviews* **25** 374–388.
- Sonne-Hansen K & Lykkesfeldt AE 2005 Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **93** 25–34.
- Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B & Penning TM 2004 Human cytosolic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Journal of Biological Chemistry* **279** 10784–10795.
- Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M & Sasano H 2000 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters. *British Journal of Cancer* **82** 518–523.
- Suzuki T, Darnel AD, Akahira J-I, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T & Sasano H 2001 5 α -Reductases in human breast carcinoma: possible modulator of *in situ* androgenic actions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 2250–2257.
- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N & Sasano H 2005 Sex steroid producing enzymes in human breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **12** 701–720.
- Szelei J, Jimenez J, Soto AM, Luizzi MF & Sonnenschein C 1997 Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* **138** 1406–1412.
- Weihua Z, Mäkelä S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M & Gustafsson J-Å 2001 A role for estrogen receptor β in the regulation of growth of the ventral prostate. *PNAS* **98** 6330–6335.
- Weihua Z, Lathe R, Warner M & Gustafsson J-Å 2002 An endocrine pathway in the prostate, ER β , AR, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *PNAS* **99** 13589–13594.
- Weiler PJ & Wiebe JP 2000 Plasma membrane receptors for the cancer-regulating progesterone metabolites, 5 α -pregnane-3,20-dione and 3 α -hydroxy-4-pregnen-20-one in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272** 731–737.
- Wiebe JP & Muzia D 2001 The endogenous progesterone metabolite, 5 α -pregnane-3,20-dione, decreases cell-substrate attachment, adhesion plaques, vinculin expression, and polymerized F-actin in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrine* **16** 7–14.
- Wiebe JP & Lewis MJ 2003 Activity and expression of progesterone metabolizing 5 α -reductase, 20 α -hydroxysteroid oxidoreductase and 3 α (β)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BMC Cancer* **3** 1–15.
- Wiebe JP, Muzia D, Hu J, Szwajcer D, Hill SA & Seachrist JL 2000 The 4-pregnene and 5 α -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Research* **60** 936–943.
- Wing LY, Garrett WM & Brodie AM 1985 Effects of aromatase inhibitors, aminoglutethimide, and 4-hydroxyandrostenedione on cyclic rats and rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors. *Cancer Research* **45** 2425–2428.
- Xie B, Tsao SW & Wong YC 1999 Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female Noble rats: the role of androgens. *Carcinogenesis* **20** 1597–1606.
- Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuyi O, Anderson K & Bondy CA 2000 Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB Journal* **14** 1725–1730.

Received in final form 2 May 2006

Accepted 15 May 2006

Made available online as an Accepted Preprint
9 June 2006

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Ligand-induced large-scale chromatin dynamics as a biosensor for the detection of estrogen receptor subtype selective ligands

Rocio García-Becerra¹, Valeria Berno², David Ordaz-Rosado¹,
Z. Dave Sharp³, Austin J. Cooney², Michael A. Mancini^{2*}
and Fernando Larrea^{1*}

¹Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Mexico City 14000, Mexico, ²Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA., and ³Institute of Biotechnology, Department of Molecular Medicine, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX 15355

*Co-corresponding authors:

Fernando Larrea:

Tel: (5255)55.73.11.60

Fax: (5255)56.55.98.59

E-mail: larrea@innsz.mx

Michael A. Mancini:

Tel: 713.798.8952

Fax: 713.798.3179

Email: mancini@bcm.edu

ABSTRACT

Estrogen receptors (ER), members of the nuclear steroid receptor superfamily, act to activate transcription through ligand-dependent recruitment of coregulators and chromatin modifications. A series of synthetic A-ring reduced 19-nortestosterone-derived progestins has the capacity to selectively bind ER α for activated transcription, and to recruit coregulatory factors. In this study, we have analyzed the ability of synthetic 19-nortestosterone derivatives to visibly alter the configuration of ER-target gene chromatin using a novel mammalian promoter transcriptional biosensor (PRL-array) stably transfected into the genome of HeLa cells (PRL-HeLa cells). Results from synthetic steroid-treated cells expressing functional GFP-ER α or YFP-ER β chimeras were compared to those obtained with estradiol (E₂) and the antiestrogen tamoxifen. In the presence of synthetic ligands or E₂ a concentration-dependent increase in area of the biosensor array was observed in GFP-ER α -expressing PRL-HeLa cells. No significant differences were found between the effects obtained with natural and synthetic steroids. Similarly, E₂ or synthetic steroids-treated PRL-HeLa cells also resulted in similar colocalization of SRC-1- and RNAPII-immunofluorescence at the array. YFP-ER β -expressing PRL-HeLa cells treated with E₂ showed increases in array area that were similar to ER α ; however, treatment of YFP-ER β -expressing cells with synthetic ligands were indistinguishable from vehicle controls. These data indicate that A-ring reduced 19-nortestosterone derivatives have an estrogen-like effect on chromatin, including recruitment of transcription factors through selective interactions with ER α .

Keywords: Chromatin, Estrogen receptor subtypes, Ligand selectivity, Synthetic progestins, Transcription

INTRODUCTION

Estrogen actions on growth, development, behavior and regulation of a number of reproductive functions are mediated by a ligand-regulated transcription factor that belongs to the nuclear receptor superfamily (1, 2)[Carson-Jurica, 1990 #65; Beato, 1996 #29]. As with other nuclear receptors, estrogen receptors (ER) have three main distinct domains: an N-terminal transactivation domain, a central DNA binding domain, and a C-terminal ligand binding domain. Once bound to its ligand, the ER undergoes conformational changes (3-5)[Fritsch, 1992 #125; Beekman, 1993 #31; Brzozowski, 1997 #30] followed by specific interaction with DNA regulatory sequences allowing the receptor to regulate gene transcription by the recruitment of chromatin modifying complexes, including the basal transcriptional machinery (6)[McKenna, 1999 #32]. The ER exists as two subtypes, ER α and ER β , which are products from distinct genes that differ in their tissue distribution and ligand selectivity (7-10)[Mosselman, 1996 #33; Kuiper, 1996 #199; Mosselman, 1996 #33; Kuiper, 1997 #23; Couse, 1997 #97].

Results from several studies suggest that a number of compounds may exhibit differential binding and relative binding affinities for both ER subtypes (9, 11-13)[Kuiper, 1997 #23; Sun, 1999 #18; Stauffer, 2000 #19; Harris, 2002 #8]. Regarding this, we have systematically characterized the estrogenic activity of a number of synthetic 19-nortestosterone derivatives that function as agonists with large potency and efficacy preferences for ER α (14-20)[Chavez, 1985 #76; Larrea, 1987 #26; Lemus, 1992 #221; Lemus, 2000 #222; Larrea, 2001 #27; Garcia-Becerra, 2002 #28; Garcia-Becerra, 2006 #12]. Among these compounds, the A-ring 3 β ,5 α -reduced derivatives of norethisterone (NET), levonorgestrel (LNG) and gestodene (GSD) behave as complete ER α agonists but inactive on ER β in terms of receptor binding, recruitment of coactivators and

transcriptional activation (18, 20)[Garcia-Becerra, 2006 #12; Larrea, 2001 #27]. Although, the precise molecular basis for their ER α selectivity remains unclear, these compounds may be of interest in identifying or developing new ligands for ER subtypes.

In this study, our goal was to further expand our comparisons on the intrinsically selective interactions of 19-nortestosterone derivatives with ER α or ER β . For this purpose we used a recently developed transcriptional biosensor constructed from mammalian promoter/enhancer components to study ligand-dependent large-scale chromatin modifications at the single cell level, including recruitment of endogenous chromatin-remodeling complexes at the promoter level.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Non-radioactive estradiol (E_2) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and cell culture medium from Life Technologies (Gaithersburg, MD). Fetal bovine serum (FBS) was from Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, UT). The antiestrogen tamoxifen was purchased from Zeneca Pharmaceuticals (Wilmington, DE). Authentic NET (17α -ethynyl- 17β -hydroxy-4-estren-3-one) and LNG (13β -ethyl- 17α -ethynyl- 17β -hydroxy-4-gonen-3-one) were kindly provided by Schering Mexicana, S.A. (Mexico D.F., Mexico) and GSD (13β -ethyl- 17α -ethynyl- 17β -hydroxy-4,15-gonadien-3-one) from Schering AG (Berlin, Germany). Synthesis of the corresponding $3\beta,5\alpha$ - ($3\beta,5\alpha$ -NET, $3\beta,5\alpha$ -LNG and $3\beta,5\alpha$ -GSD) tetrahydro derivatives, including the description of their corresponding physical and spectroscopic constants have been previously described (17, 21)[Lemus, 2000 #222; Vilchis, 1986 #378]. All other solvents and reagents used were of analytical grade.

Plasmids

The expression vectors for GFP-hER α and YFP-hER β , used for transient transfections, were generated as previously described (22, 23)[Stenoien, 2000 #350; Muddana, 2003 #401]. The carrier DNA pBluescript vector was purchased from Stratagene (La Jolla CA). The correct sequences of all final constructs were confirmed by sequencing.

Cell culture and hormonal treatments

The PRL-HeLa line used in this and other studies (24-26)(Sharp et al, 2006; Amazit et al, 2007; Berno et al, 2008) was designed for single-cell studies of transcription factor function.

The generation and detailed description of the PRL-HeLa cell line bearing integrated rat PRL promoter-enhancer have been published in detail elsewhere (24)[Sharp, 2006 #7]. The cells were maintained in Opti-MEM (growth-factor-containing minimal essential medium) (Life Technologies, Inc.) containing 5% charcoal-stripped FBS. Twenty-four hours before transfection, cells were seed onto poly-D-lysine-coated coverslips in 35 mm wells at a concentration of 1×10^5 cell/cm² in phenol red-free DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 5% charcoal-stripped and dialyzed FBS. Cells were transiently transfected with pEGFP-ER α or pEYFP-ER β and carrier DNA vectors at 1:1 ratio using TransFectin (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) according to protocols provided by the manufacturer. Twenty-four hours later, the medium was replaced with fresh DMEM containing natural or synthetic hormones at different concentrations in the presence or the absence of 10 nM 4-hydroxytamoxifen or ethanol as the vehicle alone. As in a previously discussed (24)[Sharp, 2006 #7], only GFP/YFP-ER-transfected PRL-HeLa cells with levels of expression similar to those found in non-transfected MCF-7 cells were used in this study in order to avoid overexpression artifacts. Transcriptional responses of our chromosomally integrated PRL-based array have previously been documented by *in situ* hybridization of accumulated reporter mRNA (24)[Sharp, 2006 #7], which confirmed the biological functionality and physiological relevance of the mammalian promoter array to study transcription and chromatin regulation.

Colocalization of endogenous coactivators and RNAPII

Cells were grown on acid-etched and poly-D-lysine-coated glass coverslips. After treatment, cells were immediately rinsed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) fixed in 4% formaldehyde, permeabilized in 0.5% Triton X-100, and then washed and quenched in sodium borohydride as previously described (24, 25)[Amazit, 2007 #13; Sharp, 2006 #7]. After incubation for 1 h at room temperature in 5% nonfat dry milk, cells were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies and then with fluorophores conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor-555 and Fluor-647; Molecular Probes, for SRC-1 and RNAPII, respectively). Affinity-purified rabbit antibodies against SRC-1 and mouse monoclonal anti-RNAPII were obtained from Abcam Inc. (Cambridge, MA). After primary and secondary antibody labeling, cells were postfixated and quenched as described above, and counterstained with DAPI (4,6-diamidino- 2-phenylindole) prior to mounting onto slides (ProLong Gold; Molecular Probes).

Imaging

Imaging of PRL-HeLa transiently expressing pEGFP-ER α /pEYFP-ER β and immunofluorescently labeled cells were performed using a DeltaVision restoration microscopy system (Applied Precision, Inc., Issaquah, WA) as previously described (22)[Stenoien, 2000 #350]. A z series of focal planes was digitally imaged and deconvolved with the Delta Vision constrained iterative algorithm to generate high- resolution images. Whole nuclear volumes were collected at 0.2 μ m Z-steps, and images from select focal planes or 3D projections were imported into Adobe PhotoShop. Histogram adjustments were made relevant to negative controls, which routinely included non-transfected cells

and/or omission of primary antibodies. Live imaging was performed by collecting short Z-stacks (~5-10 focal planes at 300-nm increments); neutral density for the green channel was set at 50% and the images were binned 2X2. Typical exposures were for <1 second, and time points from 3-10 minutes per stack. Quantitative image analyses by high throughput microscopy (HTM) using the Cell Lab IC 100 Image Cytometer (Beckman Coulter, Inc) was performed as previously described (24, 27)[Sharp, 2006 #7; Berno, 2006 #56].

Statistical analysis

All results were expressed as means value \pm S.E.M. Statistical significance of differences between groups was calculated by Student's *t*-test. A *P* value equal or lower than 0.05 was considered as significant.

RESULTS

ER α -dependent changes in chromatin structure in response to ligands

To address the question, do synthetic ER agonists demonstrate in vivo large-scale chromatin responses comparable to those previously observed for E₂?, we treated GFP-ER α -expressing PRL-HeLa cells with either E₂, tamoxifen, the A-ring reduced 19-nortestosterone derivative, 3 β ,5 α -GSD or vehicle. As previously observed (24)[Sharp, 2006 #7], treatment with tamoxifen resulted in significant (compared to vehicle) condensation of the area of fluorescence at the array demarcated by GFP-ER α (**Fig. 1**). E₂ treatment resulted in a significant increase of the array area, and sub-array texture (**Fig. 1**). Incubation of GFP-ER α -expressing PRL-HeLa cells with 3 β ,5 α -GSD, resulted in an array area similar to that obtained with E₂.

GFP-ER α -targeted PRL array responses to variable concentrations of natural and synthetic ligands are shown in **Fig. 2**. As depicted, both E₂ and 3 β ,5 α -GSD induced a significant concentration-dependent increase in array size with similar dose-response curves. GFP-ER α -targeted PRL arrays in the presence of the lowest concentration (10⁻¹⁰ M) of ligands exhibited array sizes that were no different than that obtained with vehicle alone. Similar responses were obtained with other synthetic A-ring reduced 19-nortestosterone derivatives (data not shown).

ER α - and ligand-dependent colocalization of endogenous SRC-1 and RNAPII

For this purpose, we used PRL-HeLa cells transiently expressing GFP-ER α or non-transfected controls, which were immunolabeled using antibodies specific for SRC-1 or the active form of RNAPII. In the absence of GFP-ER α neither SRC-1 nor RNAPII

immunofluorescence signals showed focal concentrations consistent with array morphology (e.g., no marked increase in signal over the GFP-ER α -marked array versus the rest of the nucleoplasm). Conversely, in vehicle-treated, GFP-ER α -expressing cells, both SRC-1 and RNAPII immunofluorescence exhibited marked colocalization at the GFP-ER α -targeted PRL array, but with an array size significantly lower to that obtained in the presence of ligands (**Figs. 3 and 4, respectively**). Treatment with tamoxifen resulted in condensation of the GFP-ER α -labeled array, but with minimal diminishment of SRC-1 immunofluorescence signal at the array (**Fig. 3**). RNAPII immunofluorescence, however, was displaced from the PRL array by tamoxifen treatment (**Fig. 4**). As shown also in **Fig 3**, incubation of PRL-HeLa cells expressing GFP-ER α with E₂ or 3 β ,5 α -GSD resulted in SRC-1 and RNAPII recruitment, with the array area being significantly greater compared to vehicle.

Similar patterns of nuclear and array-associated fluorescence and SRC-1 and RNAPII immunofluorescence at the array were obtained with other synthetic A-ring 19-nortestosterone derivatives (3 β ,5 α -NET and 3 β ,5 α -LNG, data not shown).

ER β -dependent chromatin effects and recruitment of endogenous transcription factors to the PRL array.

We have previously reported that 19-nortestosterone A-ring reduced derivatives stimulated ER α - but not ER β -driven reporter activity, including recruitment of coactivators (18, 20)[Larrea, 2001 #27; Garcia-Becerra, 2006 #12]. We hypothesized that this receptor-specific transcription response would correlate with differential chromatin modification at the PRL-array, i.e., treatment of GFP-ER β -expressing cells with synthetic ligands would not result in decondensed arrays.

As shown in **Fig. 5** and similar to cells expressing GFP-ER α , YFP-ER β fluorescence and SRC-1 and RNAPII immunofluorescence accumulated over the PRL promoter/enhancer array in PRL-HeLa cells incubated in the presence or absence of E₂. Also in concert with GFP-ER α -expressing cells, YFP-ER β -positive cells incubated in E₂ demonstrated significantly increased areas of array-associated fluorescence; as with GFP-ER β , SRC-1 and RNAPII immunofluorescence were recruited to the YFP-ER β -targeted arrays. In contrast, unlike GFP-ER α -expressing cells, when YFP-ER β -positive cells were treated with 3 β ,5 α -GSD or 3 β ,5 α -LNG, both the size of the PRL array, and recruitment of SRC-1 or RNAPII were similar to vehicle control (**Fig. 5**).

DISCUSSION

There is a critical need to identify novel ER selective ligands that provide health benefits while eliminating side effects. Potential selective ligands have been identified using steroid-receptor competition or transcription-based assays but most of them are time consuming and include significant cost and safety issues. Herein, we have taken advantage of a recently developed mammalian promoter/enhancer array system to test *in vivo* ligand-dependent nuclear receptor-chromatin interactions at the single cell level.

In this report, we extend previous observations of ER α selective interactions and transactivation of transcription by synthetic A-ring reduced 19-nortestosterone derivatives (18-20)[Larrea, 2001 #27; Garcia-Becerra, 2002 #28; Garcia-Becerra, 2006 #12]. Our results are consistent with the ability of these ligands to induce ER α -dependent decondensation of chromatin encompassing the PRL-array. Our results also highlight the close correlation between selective ER α -based large-scale chromatin changes and colocalization of SRC-1 and RNAPII that are induced by synthetic ligands, suggesting a permissive state exists at the chromatin level for *trans*-acting factors to influence the responsiveness of the multicopy promoter/enhancer's response. In contrast to E₂, which induced large-scale chromatin decondensation in both ER α - and ER β -expressing cells, 3 β ,5 α -derivatives induced changes in chromatin structure in ER α -expressing cells, but not those expressing ER β . In this study, significant changes in array size are interpreted as an alteration in the chromatin and transcriptional state of the reporter, based on ER-mediated colocalization of SRC-1 and RNAPII (Figs. 4 & 5), and colocalized reporter mRNA accumulation (24, 26)[Sharp, 2006 #7; Berno et al 2008]. Addition of an ER agonist (E₂) to PRL-HeLa cells is followed by a visible decondensation of the PRL-promoter array and

colocalization of endogenous transcription factors. In contrast, the presence of an ER antagonist results in a marked condensation pattern of the array relative to controls in the absence of ligand (24)[Sharp, 2006 #7]. These changes in array size are consistent with large-scale chromatin relaxation leading to or concomitant with increased activity of the reporter transcription units. These chromatin decondensation/condensation events likely result from ER-dependent coregulator recruitment and histone modification (24, 25)[Amazit, 2007 #13; Sharp, 2006 #7]. This leads to progression or inhibition of a transcription cycle, which requires a series of integrative events comprising *cis*- and *trans*-acting factors and the basal transcription machinery, including RNAPII. Our results obtained with the synthetic ligands demonstrate an agonist pattern of chromatin dynamics and recruitment of endogenous SRC-1 and RNAPII, similar to that found with E₂. Collectively, these findings supports and extend our previous observations of the full agonist, ER α selective activity of A-ring reduced 19-nortestosterone derivatives (17-19)[Garcia-Becerra, 2002 #28; Larrea, 2001 #27; Lemus, 2000 #222].

Although the mechanistic difference by which ligands selectivity discriminates between the two ER subtypes is not well understood, the dynamic and plastic nature of the ER ligand-binding domain is presumed to play an important role. The ability of the ER to bind structurally diverse compounds might be partially attributed to the size and composition of the ligand-binding pocket (5, 28)[Brzozowski, 1997 #394; Zhu, 2006 #395]. Although there are sequence differences in the ER α and ER β ligand binding domains, similar amino-acids participate in E₂ binding. This suggests that other amino-acids, in addition to the size and flexibility of the respective binding pockets, also play a role in determining ligand binding preference(29-31) [Ekena, 1997 #17; Pike, 1999 #305; Matthews, 2000 #397]. Given the interest in searching for specific ER α or ER β ligands for therapeutic uses, a number of

potential compounds with greater or lesser affinity for either ER subtype has been identified. Among the best characterized agonists for ER α are the triaryl-alkyl-substituted pyrazoles and furans (12, 32)[Stauffer, 2000 #19; Stauffer, 2001 #20]. Phytoestrogens such as genistein and coumesterol have a higher affinity for ER β (33-36)[Kuiper, 1997 #23; Bowers, 2000 #396; Norman, 2006 #398; Ullrich, 2007 #370]. However, the molecular basis for ER-ligand subtype selectivity still remains to be determined.

Given the structural similarity between our selective ER α compounds with androstanediol (5 α -androstan, 3 β ,17 β -diol), an A-ring reduced derivative of testosterone, which activates transcription through both ER subtypes (19)[Garcia-Becerra, 2002 #28], raises the possibility that A-ring reduction at the C-3 and C-4 induces affinity for ER. On the other hand, the presence of steric bulk at C-17 and the absence of methyl group at C-19, as in the case of 19-nortestosterone derived progestins, are associated with ER α ligand selectivity (37)[Kubli-Garfias, 2002 #402]. However, this awaits X-ray crystallography analyses.

We have previously shown that binding affinities of 19-nortestosterone derived progestins for ER α are significantly lower than those of natural E₂ (14, 17-19)[Chavez, 1985 #76; Garcia-Becerra, 2002 #28; Larrea, 2001 #27; Lemus, 2000 #222]. However, their transcriptional potencies, recruitment of coactivators or alterations in chromatin structure as shown in this study are very much similar to those obtained with equimolar doses of E₂. In fact, all responses occur at physiological concentrations of ligands. These differences in ligand-binding affinity compared to ligand potency or efficacy could have several explanations, but most likely are due to intrinsic preferential interactions of the ER subtype-ligand complex for coregulatory proteins that mediate its effects on transcription beyond the receptor-ligand affinity constants (38)[Katzenellenbogen, 1996 #22]. In this

regard, our laboratory is currently analyzing, by fluorescence resonance energy transfer-based biosensors, the ability of a number of potential selective ligands to induce conformational changes in the ER ligand-binding domain as part of the mechanisms involved in recruitment of coregulatory proteins and transcriptional activation (39)(Zwart et al, 2007, EMBO; Zwart et al, *submitted*). We believe that these 19-nortestosterone compounds are useful tools to understand the biological roles of both ER subtypes, particularly in conjunction with both wild-type and ER-knock-out animals.

In summary, a single-cell approach allowing the direct visualization of ER α and ER β at a physiologically regulated transcription locus, including ligand-dependent cofactor recruitment and large-scale chromatin re-modeling was used to better quantify the unique selectivity of synthetic 19-nortestosterone derived ligands for ER α . In addition, our results, which are increasingly amendable to high throughput imaging-based acquisition and analyses (24, 26, 27)(Berno et al, 2006; Sharp et al, 2006; Berno et al, 2008) show the benefits of this mammalian promoter array for the evaluation of novel ligands with receptor subtype selective interactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by grants from the Contraceptive Research and Development Program, Arlington, Virginia (to A.J.C. and F.L.) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (to F.L.). We thank Dr. G.A. García (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico) for the synthesis and chemical analysis of steroids used in this study. All imaging was performed in the Department of Molecular and Cellular Biology Integrated Microscopy Core (Center for Reproductive Biology, O'Malley; Dan L. Duncan BCM Cancer Center, Osborne; John S. Dunn Gulf Coast Consortium for Chemical Genomics, Davies and Mancini).

REFERENCES

1. **Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW** 1990 Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11:201-220
2. **Beato M, Chavez S, Truss M** 1996 Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61:240-251
3. **Fritsch M, Leary CM, Furlow JD, Ahrens H, Schuh TJ, Mueller GC, Gorski J** 1992 A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* 31:5303-5311
4. **Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW** 1993 Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* 7:1266-1274
5. **Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M** 1997 Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389:753-758
6. **McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW** 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344
7. **Mosselman S, Polman J, Dijkema R** 1996 ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53
8. **Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA** 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930
9. **Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA** 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870

10. **Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS** 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621
11. **Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 1999 Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta. *Endocrinology* 140:800-804
12. **Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA** 2000 Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem* 43:4934-4947
13. **Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 2002 Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERalpha-selective ligand. *Endocrinology* 143:4172-4177
14. **Chavez BA, Vilchis F, Perez AE, Garcia GA, Grillasca I, Perez-Palacios G** 1985 Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22:121-126
15. **Larrea F, Vilchis F, Chavez B, Perez AE, Garza-Flores J, Perez-Palacios G** 1987 The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem* 27:657-663
16. **Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chavez BA, Garcia GA, Grillasca I, Perez-Palacios G** 1992 Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and

specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:881-890

17. **Lemus AE, Zaga V, Santillan R, Garcia GA, Grillasca I, Damian-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F, Perez-Palacios G** 2000 The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J Endocrinol* 165:693-702
18. **Larrea F, Garcia-Becerra R, Lemus AE, Garcia GA, Perez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL, Cooney AJ** 2001 A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER alpha. *Endocrinology* 142:3791-3799
19. **Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F** 2002 The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor-alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82:333-341
20. **Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Smith CL, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F** 2006 Synthetic 19-nortestosterone derivatives as estrogen receptor alpha subtype-selective ligands induce similar receptor conformational changes and steroid receptor coactivator recruitment than natural estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99:108-114
21. **Vilchis F, Chavez B, Perez AE, Garcia GA, Angeles A, Perez-Palacios G** 1986 Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J Steroid Biochem* 24:525-531

22. **Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA** 2000 Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 14:518-534
23. **Muddana SS, Peterson BR** 2003 Fluorescent cellular sensors of steroid receptor ligands. *Chembiochem* 4:848-855
24. **Sharp ZD, Mancini MG, Hinojos CA, Dai F, Berno V, Szafran AT, Smith KP, Lele TP, Ingber DE, Mancini MA** 2006 Estrogen-receptor-alpha exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J Cell Sci* 119:4101-4116
25. **Amazit L, Pasini L, Szafran AT, Berno V, Wu RC, Mielke M, Jones ED, Mancini MG, Hinojos CA, O'Malley BW, Mancini MA** 2007 Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 27:6913-6932
26. **Berno V, Amazit L, Hinojos C, Zhong J, Mancini MG, Sharp ZD, Mancini MA** 2008 Activation of estrogen receptor-alpha by E2 or EGF induces temporally distinct patterns of large-scale chromatin modification and mRNA transcription. *PLoS ONE* 3:e2286
27. **Berno V, Hinojos CA, Amazit L, Szafran AT, Mancini MA** 2006 High-resolution, high-throughput microscopy analyses of nuclear receptor and coregulator function. *Methods Enzymol* 414:188-210
28. **Zhu BT, Han GZ, Shim JY, Wen Y, Jiang XR** 2006 Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* 147:4132-4150

29. **Ekena K, Weis KE, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 1997 Different residues of the human estrogen receptor are involved in the recognition of structurally diverse estrogens and antiestrogens. *J Biol Chem* 272:5069-5075
30. **Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M** 1999 Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *Embo J* 18:4608-4618
31. **Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T** 2000 Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:223-234
32. **Stauffer SR, Huang Y, Coletta CJ, Tedesco R, Katzenellenbogen JA** 2001 Estrogen pyrazoles: defining the pyrazole core structure and the orientation of substituents in the ligand binding pocket of the estrogen receptor. *Bioorg Med Chem* 9:141-150
33. **Kuiper GG, Gustafsson JA** 1997 The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 410:87-90
34. **Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM** 2000 Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141:3657-3667
35. **Norman BH, Dodge JA, Richardson TI, Borromeo PS, Lugar CW, Jones SA, Chen K, Wang Y, Durst GL, Barr RJ, Montrose-Rafizadeh C, Osborne HE, Amos RM, Guo S, Boodhoo A, Krishnan V** 2006 Benzopyrans are selective

- estrogen receptor beta agonists with novel activity in models of benign prostatic hyperplasia. *J Med Chem* 49:6155-6157
36. **Ullrich JW, Unwalla RJ, Singhaus RR, Jr., Harris HA, Mewshaw RE** 2007 Estrogen receptor beta ligands: design and synthesis of new 2-phenyl-isoindole-1,3-diones. *Bioorg Med Chem Lett* 17:118-122
37. **Kubli-Garfias C, Vazquez R, Cooney AJ, Larrea F** 2002 Ab initio electronic structure of the progestogen norethisterone and its 5 alpha-derivatives. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82:385-391
38. **Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS** 1996 Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 3:529-536
39. **Zwart W, Griekspoor A, Berno V, Lakeman K, Jalink K, Mancini M, Neefjes J, Michalides R** 2007 PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERalpha towards co-activator SRC-1. *EMBO J* 26:3534-3544

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. A. Large-scale chromatin changes induced by tamoxifen, estradiol (E₂) and the 3β-5α-GSD synthetic derivative. PRL-HeLa cells were transiently transfected with GFP-ERα and 24 h later cells were cultured in the presence or absence (V) of 1 X 10⁻⁸ M ligands during 2 h prior to fixation. B. Automated quantification of GFP-ERα at the promoter array using high-resolution HTM. Each bar represents the mean ± SD of three experiments. P<0.05 vs V

FIGURE 2. A. Changes in chromatin structure of the GFP-ERα-targeted PRL array in response to several doses (1 X 10⁻¹⁰ M to 1 X 10⁻⁶ M) of estradiol (E₂) or 3β-5α-GSD. Experimental conditions were as described in Fig. 1. B. After fixation and staining with DAPI, cells were imaged and array size was quantified using HTM. Each point represents the mean ± SD of three experiments. P<0.05 vs V

FIGURE 3. A. Colocalization of GFP-ERα and endogenous SRC-1 at the PRL-array. PRL-HeLa cells transiently transfected with or without GFP-ERα were incubated in the presence of 1 X 10⁻⁸ M of tamoxifen, estradiol (E₂), 3β,5α-GSD or the vehicle alone (V) for 2 h and immunolabeled for SRC-1 as described in material and methods. B. Automated quantification of GFP-ERα and SRC-1 colocalized at the promoter array using high-resolution HTM. Cells were stained with DAPI. Each bar represents the mean ± SD of three experiments. P<0.05 vs V.

FIGURE 4. Colocalization of GFP-ER α and RNAPII at the PRL array. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 3.

FIGURE 5. Colocalization of YFP-ER β and endogenous SRC-1 at the PRL-array. PRL-HeLa cells transiently expressing YFP-ER β were incubated in the presence of 1 X 10⁻⁸ M of tamoxifen, estradiol (E₂), 3 β ,5 α -GSD, 3 β ,5 α -LNG or the vehicle alone (V) for 2 h and immunolabeled for SRC-1 and RNAPII as described in the materials and methods.

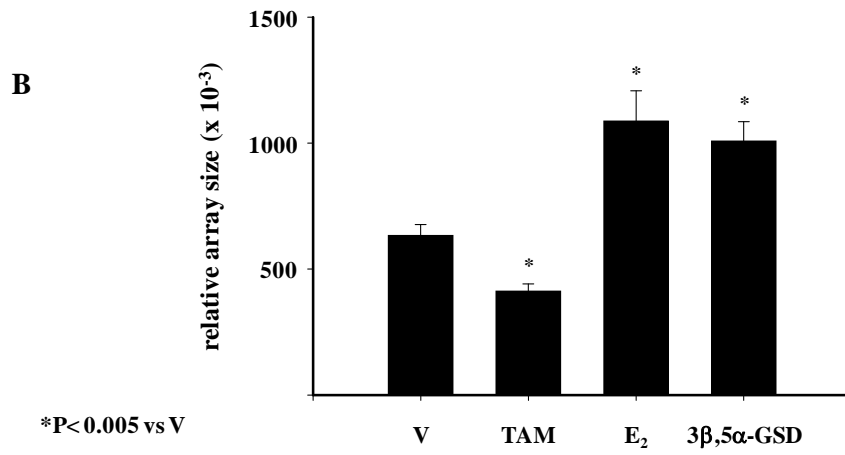
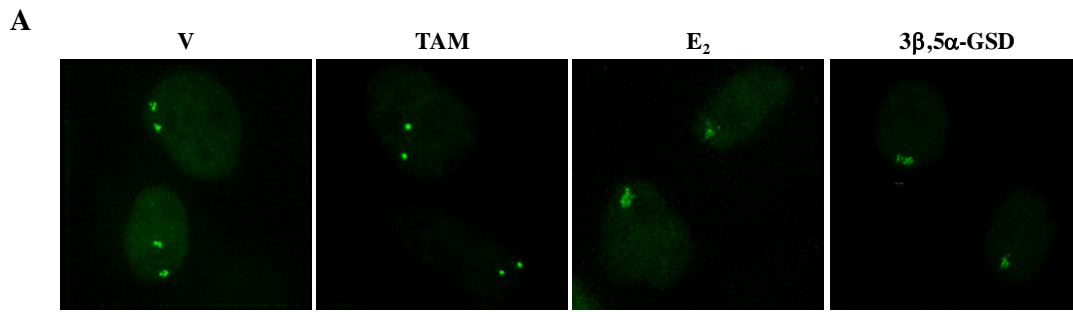


Figure 1

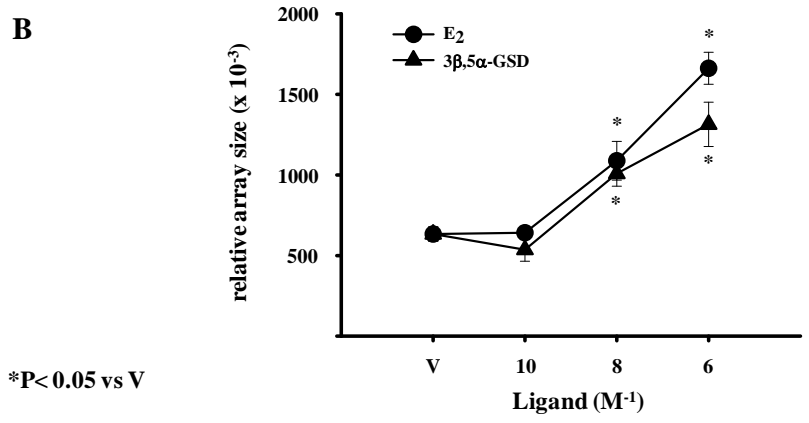
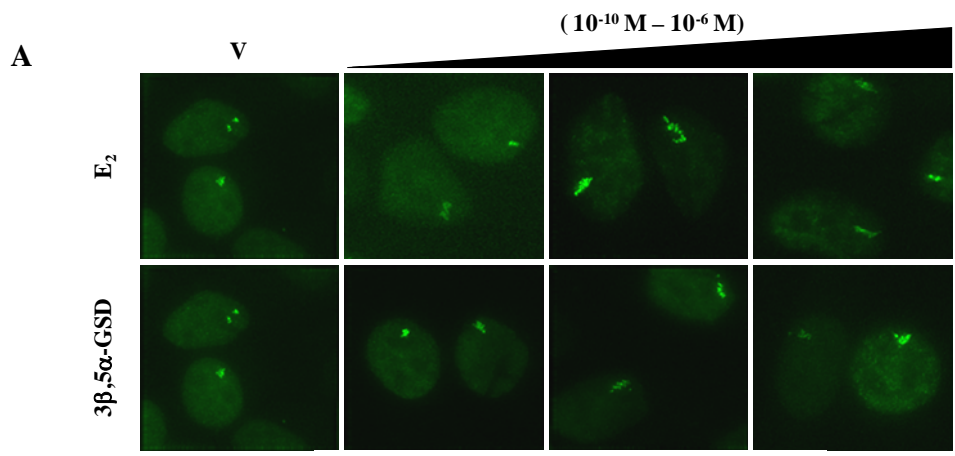


Figure 2

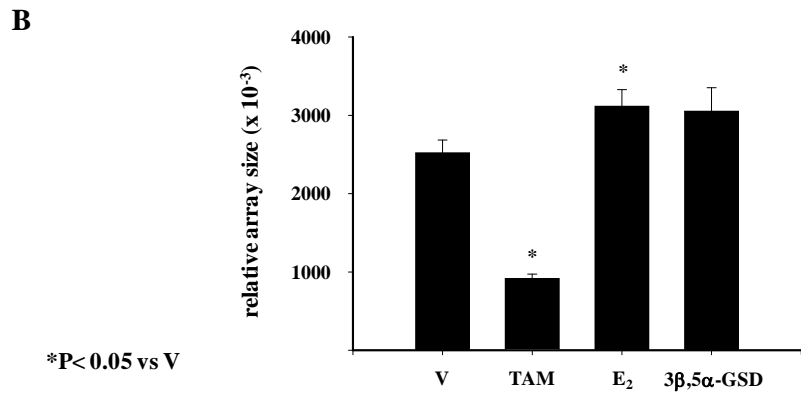
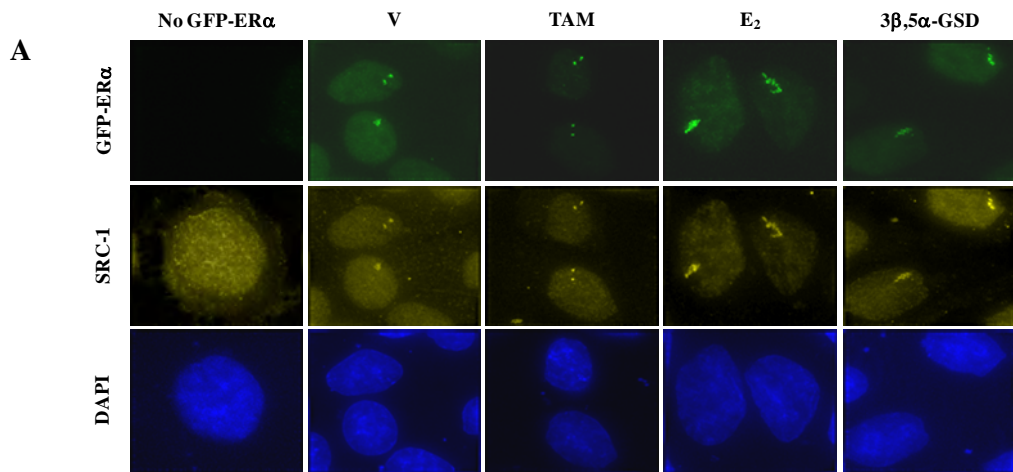


Figure 3

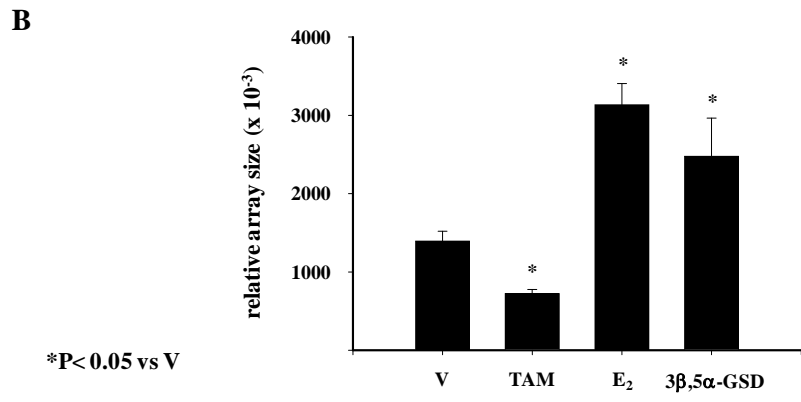
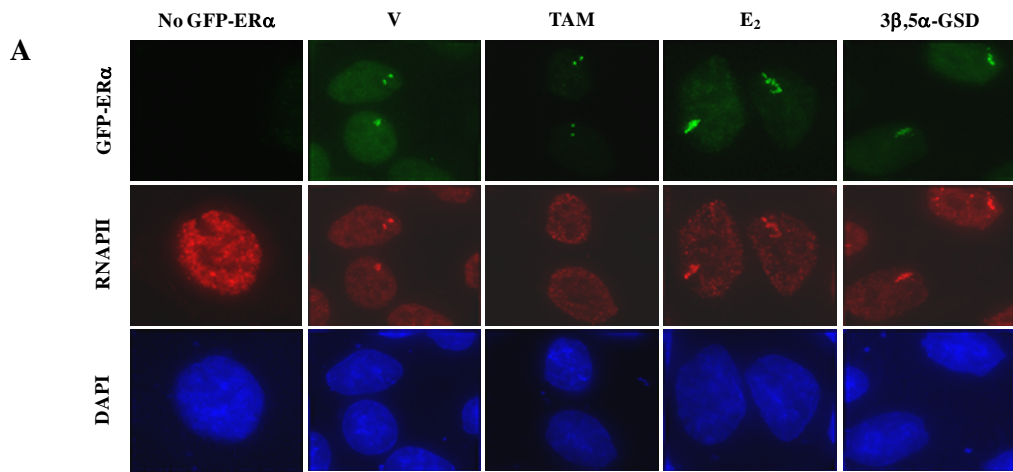


Figure 4

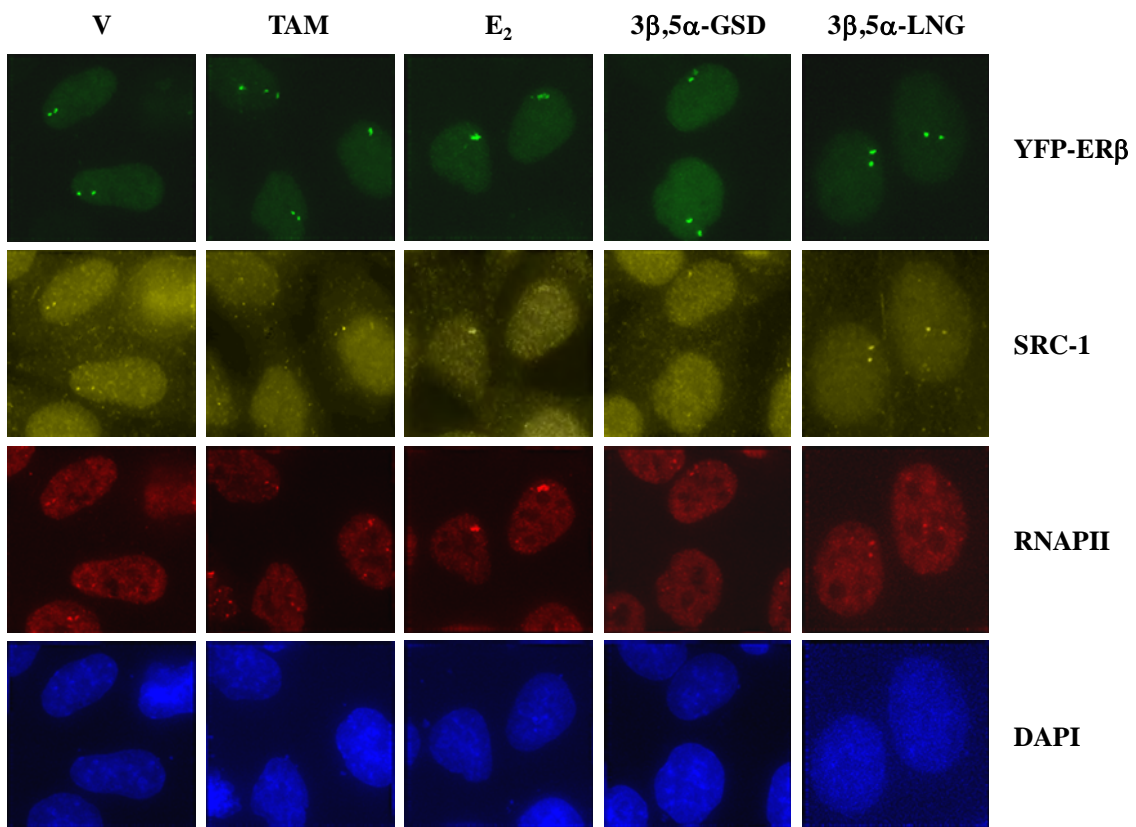


Figure 5



LA CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA
Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA



CONACYT

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

M. C. Rocío García Becerra

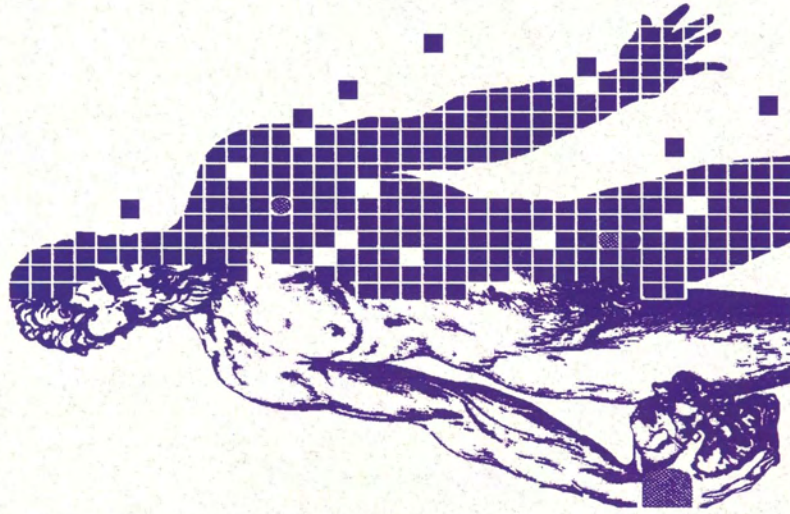
COMO COLABORADORA EN EL TRABAJO:

“Evaluación farmacomolecular de ligandos selectivos
para subtipos del receptor de estrógenos”

QUE SE HIZO ACREEDOR A

MENCIÓN HONORÍFICA DEL PREMIO CANIFARMA 2007

en Investigación Básica



PREMIO
CANIFARMA



2007



Lic. Carlos Abelleyra Cordero
PRESIDENTE DE CANIFARMA