



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA REGIÓN  
FLANQUEANTE 5' DEL GEN GPR30.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:  
DAVID SEGURA BAUTISTA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MARCO ALLÁN PÉREZ SOLIS. MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTORAL:

DRA. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA. MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

DR. JOSÉ GERARDO PERERA MARÍN (FMVZ-UNAM)

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

*Porque juntos lo logramos...*

*mi pequeña Sofía Renée*

A tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo  
para que yo pudiera cumplir con el mío.

Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para tí,  
ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí,  
gracias por estar siempre a mi lado,

***Laura.***

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron  
todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por  
motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino  
se terminaba, a ustedes por siempre  
mi corazón y mi agradecimiento,

***Gloria y Leonardo.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Marco Allan Pérez Solís por haber confiado en mí y darme la oportunidad de trabajar junto a él, por su importante y muy valioso apoyo, por su constante e incondicional participación en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia durante todo momento en mis constantes desaciertos. Así también a los miembros del comité tutorial Dra. Cristina Aleida Olivares Segura y Dr. José Gerardo Perera Marín, por su apoyo y sus comentarios durante la realización de este proyecto.

## RESUMEN

Los procesos celulares que promueven el desarrollo del cáncer de mama dependen principalmente de mecanismos de regulación estrogénicos, los cuales hasta hace algunos años, se consideraba que eran llevados a cabo por los receptores nucleares ER $\alpha$  y ER $\beta$ . La noción de este paradigma fue modificada con el descubrimiento de GPR30, un receptor de estrógenos de membrana con la capacidad de inducir los mismos procesos proliferativos que los receptores nucleares en células malignas ER $\alpha$ - como ER $\alpha$ + de glándula mamaria. La comunicación cruzada que mantiene GPR30 con la vía de señalización de receptores miembros de la familia de HER, ha impulsado los estudios para la caracterización estructural y funcional de este nuevo receptor. Aunque la información en este campo es vasta, los mecanismos de regulación transcripcional que determinan la expresión de GPR30 en células malignas de glándula mamaria, han sido poco investigados. Objetivos: Clonación del promotor del gen GPR30 humano. Comparar el desempeño que el promotor clonado tiene en líneas celulares derivadas de epitelio mamario sano y maligno. Encontrar elementos *in cis* funcionales en el promotor de *GPR30*. Material y Métodos: Se amplificó y clonó en pGEM-T un fragmento de ~2.0 kb de la región flanqueante 5' del gen *GPR30*. Se construyeron plásmidos reporteros a partir de 5 diferentes fragmentos truncados del promotor de *GPR30* en pGL3E. Se realizaron ensayos de expresión transitoria en células MCF-7, MDA-MB-231 y MCF10A. Cinco diferentes elementos putativos para el software *Mat-Inspector* fueron mutados y probados en ensayos de expresión transitoria. Resultados: Una región represora en común para las tres líneas celulares fue localizada entre -500 a -1000pb corriente arriba del SIT. Un elemento para factores de la familia ETS, resultó ser responsable de la actividad transcripcional en las células MDA-MB-231 y MCF-10A. La vía de señalización PKA que activa a los factores ERM y/o ER81, produce una actividad similar al elemento ETS hallado previamente. Discusión y Conclusión: El promotor de *GPR30* contiene al menos un elemento entre -500pb y -1000pb que participa en la disminución de la

actividad inducida por la vía de PKA. Serán necesarios más estudios para determinar si ERM o ER81 interaccionan con el promotor de *GPR30*.

Palabras clave: GPR30, promotor, regulación transcripcional, ETS, PKA, ERM, ER81.

## ABSTRACT

The cellular processes that promote the development of breast cancer depend mainly on estrogen regulation mechanisms, which until a few years ago, it was considered that they were carried out only by ER and ER nuclear receptors. The notion of this paradigm was modified with the discovery of GPR30, a membrane-bound estrogen receptor with ability to induce the same proliferative processes as the nuclear receptors in ER-negative and ER-positive malignant cells of mammary gland. The crosstalk that GPR30 has with signaling pathway of HER family members receptors it has prompted studies for structural and functional characterization of this new receptor. Although the information in this field is vast, the transcriptional regulation mechanisms that determine the GPR30 expression in mammary gland malignant cells, it has been little investigated. Objectives: Cloning of the human GPR30 gene promoter. Compare the performance that the cloned promoter has in healthy and malignant cell lines derived from breast epithelium. Find functional cis elements in the GPR30 promoter. Material and Methods: It has been amplified and cloned into pGEM-T a ~2.0 kb fragment of 5' flanking region of the GPR30 gene. Reporter plasmids were created from 5 different truncated fragments of GPR30 promoter in pGL3E. Transitory expression assays were performed in MCF-7, MDA-MB-231, and MCF10 cells. Five different putative elements of Mat-Inspector software were mutated and tested in transient expression assays. Results: One common repressor region to all three cells lines was located between -500 to -1000pb upstream of the ORF. An element for Ets factors family was responsible for the transcriptional activity in MDA-MB-231 and MCF-10A cells. The PKA signaling pathway that activates to ERM and/or ER81 factors, produces a similar activity to ETS element previously found. Discussion and Conclusion: The GPR30 promoter contains at least one element among -500pb and -1000pb involved in the decrease of the activity induced by PKA pathway. Further studies are needed to determine whether ERM or ER81 interact with the promoter of GPR30.

Keywords: GPR30 promoter, transcriptional regulation, ETS, PKA, ERM, ER81.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE .....	vi
LISTA DE CUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Relevancia Fisiológica de GPR30 .....	3
1.2 Caracterización Molecular GPR30 .....	6
1.3 Señalización GPR30 .....	6
1.4 Ligandos de GPR30 .....	7
1.5 Regulación Transcripcional de la Expresión de GPR30 .....	9
2. JUSTIFICACIÓN .....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
4. OBJETIVO GENERAL .....	13
5. OBJETIVOS PARTICULARES .....	13
6. HIPÓTESIS .....	14
7. METODOLOGÍA .....	15
7.1 Líneas Celulares Empleadas .....	15
7.2 Extracción de ADN Genómico Humano .....	15
7.3 Clonación de la Región flanqueante 5' del Gen <i>GPR30</i> humano.....	16
7.4 Diseño de Construcciones Génicas Reporteras .....	19
7.5 Ensayos de Expresión Transitoria de Construcciones Génicas Reporteras.....	22
7.6 Inmunodetección de los Receptores GPR30 y ER .....	22
7.7 Detección del ER mediante RT-PCR .....	24
7.8 Mutagénesis Sitio-Dirigida .....	25
7.9 Ensayos de Expresión Transitoria de Construcciones Mutantes.....	26

7.10 Ensayos de Inhibición de Vías de Señalización .....	26
7.11 Análisis Estadístico .....	27
8. RESULTADOS .....	28
8.1 Determinación de la Expresión del ER en Líneas Celulares de Mama.....	28
8.2 Clonación de la Región Flanqueante 5' del Gen <i>GPR30</i> Humano....	31
8.3 Construcción de los Plásmidos Reporteros .....	34
8.4 Análisis de la Regulación Transcripcional del Promotor Génico de <i>GPR30</i> .....	36
8.5 Inmunodetección del Receptor <i>GPR30</i> Humano .....	41
8.6 Funcionalidad de los Elementos en <i>cis</i> Putativos ETS, ERR1, NGRE y SOX5 .....	43
8.7 Vía de Fosforilación Involucrada en el Mecanismo de Regulación Transcripcional del Elemento ETS del Promotor de <i>GPR30</i> .....	47
9. DISCUSIÓN .....	51
10. CONCLUSIONES .....	57
11. BIBLIOGRAFÍA .....	58

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 7.3.1.	Oligonucleótidos Empleados .....	17
Cuadro 8.4.1.	Análisis predictivo de la secuencia nucleotídica de la región 5' flanqueante del gen <i>GPR30</i> .....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 7.3.1. Mapa del vector pGEM-T, utilizado para la clonación de la región promotora de <i>GPR30</i> .....	18
Figura 7.4.1. Mapa del vector reportero pGL3-Enhancer, usado en para las construcciones génicas .....	20
Figura 7.4.2. Representación esquemática de las construcciones génicas reporteras .....	21
Figura 8.1.1. RT-PCR. Detección del transcrito de ER en células de tejido mamario.....	29
Figura 8.1.2. Inmunodetección del ER .....	30
Figura 8.2.1. Electroforesis del ADN genómico extraído a partir de células MCF-7.....	32
Figura 8.2.2. Amplificación por PCR del fragmento del gen <i>GPR30</i> comprendido de +145 a -1962 a partir del sitio de inicio de traducción a partir de ADN genómico de células MCF-7 .....	33
Figura 8.3.1. Amplificación por PCR de los 5 diferentes fragmentos truncados del promotor <i>GPR30</i> .....	35
Figura 8.4.1. Análisis de actividad transcripcional de las construcciones génicas reporteras pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5 y pGPR0.2 mediante transfección en líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 .....	37
Figura 8.4.2 Análisis de la secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen <i>GPR30</i> . .....	40
Figura 8.5.1. Inmunodetección del receptor <i>GPR30</i> .....	42
Figura 8.6.1. Análisis de actividad de las diferentes construcciones mutantes del promotor de <i>GPR30</i> en células MCF-10A .....	44
Figura 8.6.2. Análisis de actividad de las diferentes construcciones mutantes del promotor de <i>GPR30</i> en células MDA-MB-231 .....	45
Figura 8.6.3. Análisis de actividad de las diferentes construcciones mutantes del promotor de <i>GPR30</i> en células MCF-7 .....	46

Figura 8.7.1. Bloqueo de las principales vías de señalización que fosforilan a los posibles factores de transcripción pertenecientes a la familia ETS en las células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.....	49
Figura 8.7.2. Bloqueo de las principales vías de señalización que fosforilan a los posibles factores de transcripción pertenecientes a la familia ETS en células MDA.MB-231 .....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

Los estrógenos regulan una amplia gama de procesos biológicos en diferentes sistemas dentro del organismo (Prossnitz et al., 2008). Estas hormonas esteroideas, controlan la proliferación y la diferenciación de las células en tejidos reproductivos y no reproductivos a través de una fina red de mecanismos celulares. Además, los estrógenos juegan un papel crucial en la formación de tumores malignos (Lappano et al., 2010), por ejemplo en enfermedades oncogénicas cardiovasculares, al igual que en la osteoporosis, las enfermedades neurodegenerativas, o en los desórdenes metabólicos e inmunes (Prossnitz and Barton, 2011). Después de darse a conocer que la exposición prolongada a estrógenos es un factor de riesgo importante para el desarrollo de tumores malignos en órganos con niveles de receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) elevados, en las dos últimas décadas se ha renovado el interés por conocer los efectos de los estrógenos durante la carcinogénesis (Lappano et al., 2010).

Los efectos biológicos ejercidos por los estrógenos están mediados principalmente por el receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) y el receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) (Barros and Gustafsson, 2011), receptores localizados en el citoplasma y el núcleo de la célula, con un predominio a nivel nuclear y solo el 5% se localizan en el citoplasma (Prossnitz and Barton, 2011). La unión de los estrógenos a su receptor (ER) desencadena un cambio conformacional en el receptor, que le permite liberarse de su complejo de inactivación para su homodimerización u heterodimerización. Una vez activo el receptor se transloca al núcleo celular, donde interaccionan con sitios específicos del ADN llamados elementos de respuesta a estrógenos (ERE), desde donde regulan la actividad transcripcional de sus genes blanco. Además, se ha reportado que los ERs son capaces de encender diferentes vías de señalización que involucran el incremento del calcio intracelular, el adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y la activación de algunas proteínas cinasas activadas por mitógenos (*MAPK-Mitogen Activating Protein Kinase*) (Barton, 2012). Sin embargo, los

mecanismos moleculares bajo los cuales los ERs inducen estos efectos permanecen elusivos y controversiales (Edwards, 2005). De manera interesante se ha descrito que los estrógenos activan las mismas vías de señalización en células carentes de receptores, hecho que se ha relacionado a la presencia de un receptor de estrógenos miembro de la familia de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G, llamado GPR30

En 1997 Carmeci y colaboradores, identificaron en las líneas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231 una proteína homóloga con los miembros de la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Esta proteína resultó ser un receptor huérfano, al cual denominaron como GPR30, el cual demostró tener la capacidad de transducir señales rápidas dependientes de estrógenos. Para el año 2007 este receptor fue designado como receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER1) por la Unión Internacional de Farmacología (Barton, 2012). Actualmente, se ha observado que GPR30 tiene diferentes ligandos, siendo el 17 -estradiol su ligando primario y secundarios el raloxifen, tamoxifen, ICI 182780, genisteína, xenoestrógenos y fitoestrógenos. En cuanto a su distribución dentro de la célula, se ha reportado que GPR30 se localiza tanto en membrana plasmática como en retículo endoplásmico, lo cual depende principalmente de las condiciones fisiológicas y del tipo celular (Langer et al., 2010). Sin embargo, existen evidencias que señalan a la localización de este receptor en el retículo, como un artificio de los métodos de detección empleados para su detección (Funakoshi et al., 2006, Otto et al., 2008, Revankar et al., 2005). Así también, a través de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* se ha logrado determinar la expresión de GPR30 en una amplia gama de tejidos (Wang et al., 2010, Olde and Leeb-Lundberg, 2009). Adicionalmente se ha visto que la expresión GPR30 en cánceres de mama esta correlacionado con biomarcadores clínicos y patológicos de mal resultado (Liu et al., 2009, Prossnitz and Barton, 2011).

Actualmente se ha demostrado que la estimulación de GPR30 a través de estrógenos, activa metaloproteinasas que inducen la liberación de heparina unida al factor de crecimiento epidérmico (*HBEGF-Eparin Binding Epidermal Growth Factor*), el cual activa al receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR-Epidermal Growth Factor Receptor*), conduciendo a la producción de moléculas de señalización como el AMPc y la movilización del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Olde and Leeb-Lundberg, 2009). Además de los rápidos eventos de señalización antes mencionados, GPR30 también regula la actividad transcripcional, mediante la activación de los mecanismos de señalización que implican a MAPK, fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), CSK (*c-Src kinase*) (Dennis et al., 2011) y ERK-1/-2 (*Extracellular Regulated Protein Kinase -1/-2*), provocando diferentes respuestas biológicas, tales como la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular (Meyer et al., 2011, Filardo, 2000).

### **1.1 Relevancia Fisiológica de GPR30**

GPR30 se expresa en el sistema nervioso, reproductor, cardiovascular y óseo. Dentro del sistema reproductor, GPR30 regula la proliferación del epitelio dentro del útero. Además, se ha observado que en humanos, la expresión del GPR30 se correlaciona con una mejora en las respuestas contráctiles inducida por la oxitocina en el miometrio, lo que sugiere un papel en la contractilidad uterina durante la labor de parto. Además se ha documentado que GPR30 regula las vías de proliferación y apoptosis implicados en la espermatogénesis durante el desarrollo reproductivo masculino (Maggiolini and Picard, 2010, Prossnitz and Barton, 2009, Olde and Leeb-Lundberg, 2009).

En el sistema nervioso central y periférico GPR30 se encuentra ampliamente distribuido, donde lleva a cabo efectos sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, desempeñándose como un importante regulador de la función cognitiva. Se ha observado que en el cerebro podría tener un papel en los

desórdenes del estado de ánimo, ya que G-1, un agonista sintético específico de GPR30, presenta propiedades de antidepresivo. Otra de sus funciones es la protección y regeneración neuronal en eventos de daño cerebral, isquemia o intoxicación. Aunque se conoce que el ER puede llevar a cabo varios de estos mismos procesos en el sistema nervioso, se ha observado que la ausencia de GPR30 en ratones *knockout*, puede generar una disminución o anulación de los efectos generados por este sistema en respuesta al 17 -estradiol (Gingerich et al., 2010, Hammond and Gibbs, 2011, Hammond et al., 2011, Prossnitz and Barton, 2009).

En el sistema inmune, estudios en ratones *knockout-ER* y *knockout-GPR30* han demostrado que la anulación de GPR30 disminuye la función inmunoprotectora del 17 -estradiol. En otro estudio, se reportó que el tratamiento con G-1 tiene efectos inmunomoduladores indicando que GPR30 podría tener aplicaciones clínicas en las enfermedades inflamatorias crónicas. Así mismo se ha visto que puede participar en el sistema inmune adaptativo, particularmente en la maduración de células B y células T (Brunsing and Prossnitz, 2011, Maggiolini and Picard, 2010, Prossnitz and Barton, 2009).

Respecto al sistema cardiovascular, GPR30, desempeña funciones de regulación de contracción y vasodilatación como una respuesta cardioprotectiva en patologías que comprometen la integridad de los tejidos del sistema, como la aterosclerosis, hipertensión, isquemia, inflamación o infarto al miocardio. Estos eventos estimulan la expresión de GPR30 en los cardiomiocitos; a través de dos de las principales vías de señalización de GPR30: la fosforilación de ERK-1/-2 y la producción de óxido nítrico (NO). Otros estudios han demostrado beneficios en el tratamiento con G-1 después de un infarto de miocardio y lesiones cerebrovasculares reduciendo las lesiones en modelos animales y en humanos. En células endoteliales humanas, la activación de GPR30 inhibe la proliferación celular, indicando un papel anti-angiogénico. En células de músculo liso vascular de humanos y ratas, la

activación de GPR30 por G-1 o raloxifen resulta en la estimulación de la vía ERK-1/-2 inhibiendo el crecimiento. Por lo anterior, se considera que GPR30 posee un papel potencial en el tratamiento de patologías cardiovasculares (Recchia et al., 2011, Meyer et al., 2011, Prossnitz and Barton, 2011, Olde and Leeb-Lundberg, 2009).

Varias investigaciones sugieren que GPR30 tiene un papel importante en el metabolismo óseo y del cartílago, expresándose en osteocitos, osteoclastos, osteoblastos y condrocitos. Puede regular el crecimiento y desarrollo óseo inducido por estrógenos (Olde and Leeb-Lundberg, 2009, Prossnitz and Barton, 2011). Dentro del sistema metabólico se ha reportado que, en ratones hembras deficientes de GPR30, se presentan niveles elevados de glucosa en sangre, y una reducción en el crecimiento, mientras que en los ratones machos deficientes de GPR30, no se observaron los mismos efectos.

La expresión GPR30 en el tejido adiposo muestra que ratones deficientes en la expresión GPR30 existe un incremento en obesidad entre los 10 a 11 meses de edad. Sin embargo este resultado es contradictorio con otros estudios, en donde reportan poca o ninguna expresión de GPR30 en tejido adiposo de ratones de tipo silvestre, además de mostrar que la cantidad de grasa corporal es similar en líneas de ratón deficientes de GPR30 comparados con ratones de tipo silvestre. Por otra parte, se ha detectado la expresión de GPR30 en tejido adiposo en humanos. Hay evidencia indirecta de que con el uso de raloxifen, GPR30 podría estar implicado en la diferenciación de los adipocitos. Es por este conflicto entre los diferentes estudios, que se requieren estudios adicionales para determinar sí, además de las funciones ya documentadas de GPR30, verdaderamente contribuye dentro de la función metabólica. Los reportes de la expresión de GPR30 en tejidos de sistemas como el inmune, renal, óseo y digestivo, son temas de investigación que se encuentran en las primeras etapas de estudio, y por tal motivo no se cuenta con la suficiente información para definir los mecanismos responsables de los efectos que genera la

activación de GPR30 en estos sistemas (Haas et al., 2009, Olde and Leeb-Lundberg, 2009, Prossnitz and Barton, 2009).

GPR30 también se expresa en algunos tejidos de manera normal sin presentar algún papel relevante en dichos tejidos. Sin embargo, al investigar su papel en un contexto patológico se puede observar su importancia. Tal es el caso de la glándula mamaria, la cual expresa GPR30 en condiciones normales sin manifestar alguna función primordial para la fisiología de la glándula, pero cuando este tejido ha sufrido un evento de malignización que culmina en condiciones fenotípicas favorables, GPR30 participa activamente durante la proliferación y la metástasis. Sin embargo, se ha observado que durante el proceso de la oncogénesis, el nivel de expresión de GPR30 tiende a disminuir en el tejido que forma parte del tumor (Ariazi et al., 2010, Kuo et al., 2007, Wang et al., 2010).

## **1.2 Caracterización Molecular GPR30**

El receptor GPR30 es una proteína de 375 aminoácidos y de 44 kD, que es codificada por un gen mapeado en la banda 22.3 del brazo corto del cromosoma 7 humano. Este gen está conformado por 2 exones y 1 intron de aproximadamente 3.0 kb, los cuales generaran cuatro diferentes transcritos que traducen el mismo polipéptido. Su cDNA tiene una longitud de 2604 pb, con un marco de lectura de 1128 pb. Este receptor presenta una alta homología con el receptor de la angiotensina II tipo 1 y el receptor de la interleucina 8, por lo que ha sido clasificado como un miembro más de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Bonini et al., 1997, Carmeci et al., 1997, Feng and Gregor, 1997).

## **1.3 Señalización GPR30**

GPR30 puede mediar eventos de señalización rápidos no genómicos, incluyendo la estimulación de la adenilil ciclase (que resulta en la producción de

AMPC) y c-Src, a través de la transactivación del EGFR, provocando la fosforilación de moléculas como MAPK, PKA (*Protein Kinase A*), PKB (*Protein Kinase B*), ERK1/2, incluso en células cancerosas carentes de ERs. Se ha demostrado que la señalización del EGFR regula la expresión de GPR30, en las células de cáncer de mama ER-negativas. Por otro lado, GPR30 activa la vía de PLC (*Phospholipase C*), teniendo como función principal la generación de PIP2 (*Phosphoinositide Diphosphate*) a partir del catabolismo de fosfolípidos de la membrana plasmática. A partir de PIP2 se produce IP3 (*Phosphoinositide Triphosphate*), el cual es responsable de la liberación de Ca<sup>2+</sup> al citosol. Así mismo GPR30 regula indirectamente la expresión de genes, ya sea a través de la expresión de factores de transcripción, o por la fosforilación de factores de transcripción. Dentro de los genes regulados por GPR30 se incluyen el gen *FOS* el cual codifica a la proteína *c-fos*, que forma un heterodímero con varias otras proteínas para formar el factor de transcripción AP-1 (*AP-1, Activating Protein-1*). Estudios han demostrado que la transactivación de GPR30 también es capaz de regular la expresión de ciclina D2 (*Cyclins D-type 2*) y Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) en queratinocitos (Barton, 2012, Prossnitz and Barton, 2009, Maggiolini and Picard, 2010).

#### **1.4 Ligandos de GPR30**

Dentro de los ligandos primarios de GPR30 se encuentra el estrógeno 17 - estradiol, este se sintetiza principalmente en ovario, aunque también se produce en muchos sitios en todo el cuerpo, y las concentraciones en los tejidos puede ser mucho mayor que las concentraciones en plasma, como en el tejido mamario y en placenta. Debido a la naturaleza hidrofóbica de los estrógenos, se pueden difundir pasivamente a través de las membranas celulares y alcanzar así sus objetivos intracelulares como GPR30, ER y ER (Prossnitz and Barton, 2011, Prossnitz et al., 2007, Prossnitz and Barton, 2009).

Existen productos químicos naturales y artificiales que también tienen actividad estrogénica como los fitoestrógenos (flavonoides e isoflavones) (Ososki and Kennelly, 2003), xenoestrógenos, pesticidas (DDT-diclorodifeniltricloroetano y DDE-diclorodifenildicloroetileno), herbicidas (atrazine), fármacos que se utilizan en los tratamientos para el cáncer de mama como el tamoxifen y el raloxifen, los cuales actúan como antagonista del ER , mientras que en el receptor GPR30 llegan a actuar como agonista. Aunque la mayoría de los fitoestrógenos y xenoestrógenos se cree que ejercen sus efectos fisiológicos a través de la modulación del ER y ER , muchos de estos actúan como agonistas de GPR30. Actualmente se sabe que GPR30 es capaz de unir al 17 -estradiol, Tamoxifen (TAM) e ICI182 (Prossnitz and Barton, 2011, Dennis et al., 2011, Prossnitz et al., 2007, Prossnitz and Barton, 2009).

Recientemente se sintetizó un agonista selectivo al receptor GPR30, G-1 (1-[4-(6bromobenzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro3H-cyclopenta-[c]-quinolin-8-yl]-ethanone), el cual no tiene actividad en otro receptor acoplado a proteína G, hecho que lo reitera como un ligando específico para GPR30. También se tiene identificado a un antagonista selectivo para GPR30, G-15 (4-(6-bromo-benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]-quinoline).

Estos compuestos se han utilizado para elucidar la función de GPR30 en una variedad de sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*. El agonista selectivo G-1 se ha utilizado más comúnmente para definir el papel que posee GPR30 en la proliferación y supervivencia celular. Mientras que el antagonista selectivo G-15 ha sido empleado para establecer el papel que juega GPR30 en los eventos mediados por estrógeno. Estos ligandos selectivos para GPR30 tienen una amplia gama de aplicaciones funcionales y pueden contribuir a la comprensión de las contribuciones de GPR30 en las vías de señalización en donde esté implicado, particularmente en sistemas donde los receptores de estrógenos clásicos ER y/o ER también se expresan.

Por último, hace apenas 3 años se reportó la síntesis de un nuevo antagonista de segunda generación para GPR30, G-36 (4-(6-Bromo-benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-8isopropyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta-[c]-quinoline), el cual posee una selectividad mejorada hacia GPR30 y una disminución de actividad hacia ER y ER en comparación con la obtenida con G-15. En ensayos funcionales, tanto *in vitro* como *in vivo*, se observó que con G-36 se obtiene una disminución significativa de los efectos sobre ER y ER en comparación con G-15. Estos compuestos, G-1, G-15 y G-36 poseen una estructura similar, se basan en un compuesto común, tetrahidro-3H-ciclopenta [c] quinolina, con las diferencias que en G-1 se presenta de un residuo etanona que no está presente en G-15 y un residuo isopropilo, presente en G-36, que sustituye al residuo etanona de G-1 (Dennis et al., 2011, Albanito et al., 2007, Haas et al., 2009, Prossnitz and Barton, 2009).

### **1.5 Regulación Transcripcional de la Expresión de GPR30**

Como se ha visto, GPR30 participa activamente en diversas vías de señalización, las cuales desencadenan el crecimiento y la proliferación de células cancerosas. Pero se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan, a nivel transcripcional, la expresión de GPR30 en células cancerosas y/o sanas. Recchia et al. (2011), reportaron que dentro de la región promotora del gen *GPR30* existen tres elementos de respuesta a la hipoxia (HREs), los cuales se localizan entre -1822 y -2812 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción (SIT). Dichos investigadores evaluaron el posible papel que juega el receptor GPR30 en la respuesta adaptativa a la hipoxia, debido a que esta condición es una característica fundamental del cáncer, encontrando que las dos subunidades HIF-1 se dimerizan y forman el complejo HIF-1, el cual se transloca al núcleo y es aquí donde se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) situados dentro de la región promotora de los genes diana. Con el fin de evaluar las respuestas transcripcionales a la hipoxia se usó cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), un inductor de hipoxia, en células de cáncer de mama SKBR3 y células de cardiomiocitos HL-1, las cuales presentan un

fenotipo carente de ER $\alpha$  y ER $\beta$ , dichas células se transfectaron transitoriamente con plásmidos de la región promotora de *GPR30* de una longitud de 2,9kb. Observaron que CoCl<sub>2</sub> fue capaz de estimular la expresión de la proteína GPR30. Conjuntamente realizaron ensayos de silenciamiento para corroborar la participación del factor HIF-1 en la regulación de la expresión de GPR30, en donde el silenciamiento de HIF-1 bloqueó la expresión de la proteína GPR30 (Recchia et al., 2011).

Vivacqua et al. (2009), mediante transfecciones transitorias de un fragmento de la región promotora del gen *GPR30* que contiene el sitio AP-1 (*Activating Protein-1*) (-426 a -432 a partir del SIT), demostró que mediante la señalización del receptor de crecimiento epidermal (*EGFR-Epidermal Growth Factor Receptor*), inducida por el factor de crecimiento epidermal (*EGF- Epidermal Growth Factor*) o por el factor de crecimiento tumoral- (*TGF $\beta$* ), se regula en forma positiva la expresión de GPR30, transactivando el sitio AP-1 a través de AP-1 en las células MCF-7 de cáncer de mama. Adicionalmente, llevaron a cabo la mutación sitio-dirigida del sitio AP-1 del promotor del gen *GPR30* y observaron una disminución en la actividad del promotor en ensayos de expresión transitoria (Vivacqua et al., 2009).

Por otra parte, en un estudio con bisfenol A (BPA), un componente de los plásticos de policarbonato y con una estructura semejante a la del 17 $\beta$ -estradiol, Sheng et al. (2013), encontró que el fragmento de la región promotora del gen *GPR30*, que va de la posición -347 a +11 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT), es inducida por bajas concentraciones de BPA en células GC-1 de espermatogonio de rata. Esto ocurre mediante una retroalimentación positiva que existe entre GPR30 y *c-fos*, a través de la vía GPR30-EGFR-ERK-*c-fos*-GPR30 que culmina con el reclutamiento de *c-fos* al sitio AP-1 de la región promotora del gen *GPR30*. Para corroborar la funcionalidad del sitio AP-1, dentro de la región promotora del gen *GPR30*, como el principal responsable de su transactivación, se mutó dicho sitio y no se observó respuesta al BPA (Sheng et al., 2013).

Ya que es relativamente poca la información existente en relación a la regulación transcripcional del gen *GPR30*, es importante profundizar la búsqueda de otros mecanismos que puedan ayudar a explicar la expresión diferencial que presenta el receptor GPR30, particularmente entre las células de mama sanas y las que pasan por un proceso de malignización.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Debido al papel que juega el GPR30 en las vías que inducen la proliferación y supervivencia celular de las células neoplásicas de mama, es de gran importancia comprender los mecanismos moleculares que gobiernan su expresión a nivel transcripcional en dicho contexto celular y compararlos con los de las células de mama sanas. La investigación aquí descrita, se desarrolló con la finalidad principal de aportar conocimientos básicos que ayuden a ampliar la comprensión en relación a las diferencias existentes en los mecanismos de regulación transcripcional de *GPR30* durante las diferentes fases de malignización en el cáncer de mama. Por otro lado, los hallazgos obtenidos aquí, podrían a largo plazo ser útiles para el diseño de tratamientos alternativos de mayor especificidad o nuevos métodos de detección temprana para esta patología.

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Dada la poca información que se tiene respecto a los mecanismos moleculares que regulan la expresión específica de GPR30 se propone el estudio y caracterización de la región flanqueante 5' del gen *GPR30*, con el fin de aportar información que ayude a explicar los mecanismos de regulación transcripcional subyacentes a la expresión diferencial de GPR30 observada entre células epiteliales de la glándula mamaria sanas y malignas.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Encontrar nuevos elementos en *cis* que tengan un papel regulador en la transcripción del gen *GPR30* humano en células de origen canceroso.

#### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Clonar el promotor del gen *GPR30* humano a partir de ADN genómico humano.
- Identificar las regiones del promotor de *GPR30* con activación o supresión significativa en la transcripción tanto en células tumorales y no tumorales.
- Localizar elementos en *cis* putativos para la regulación observada en las regiones previamente determinadas como relevantes.
- Comprobar la funcionalidad de los elementos en *cis* hallados como putativos, en los contextos celulares antes mencionados.
- Dilucidar las vías de señalización y los posibles factores que pudieran participar en los mecanismos regulatorios encontrados.

## **6. HIPÓTESIS**

El promotor del gen *GPR30* humano tiene elementos en *cis* que regulan diferencialmente la expresión transcripcional durante el desarrollo del cáncer en células epiteliales de mama.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Líneas Celulares Empleadas.**

Para este estudio se emplearon la línea celular MCF-10A, la cual expresa el fenotipo de la célula epitelial sana. También se usaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB.231 que expresan fenotipos de la célula epitelial cancerosa, pero con diferentes grados de malignidad. Las células MCF-7 derivan de carcinoma ductal de mama y presentan un grado de malignidad menor en comparación con las células MDA-MB-231, las cuales provienen de carcinoma mesénquimal invasivo y con un grado de malignidad mucho mayor por provenir de un carcinoma metastásico.

### **7.2 Extracción de ADN Genómico Humano.**

Se cultivó la línea celular MCF-7 hasta una confluencia del 75% en placas de 100 mm con DMEM al 10% de suero fetal bovino. Las células se cosecharon con tripsina y se lavaron con solución salina de fosfatos, PBS 0.01M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.016M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01M, NaCl 137 mM), antes de ser lisadas con amortiguador de extracción pH 8.0 (Tris/HCl 1M, EDTA 0.5M, RNAsa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SDS 10%). La suspensión se mantuvo a 37°C durante una hora y posteriormente se incubó 3 horas a 55°C con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Pasados los tiempos de incubación, se hicieron tres extracciones consecutivas con fenol equilibrado en Tris/HCl 0.1M pH 8.0. Las fases se separaron centrifugando el lisado a 3000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo de centrifuga para llevar a cabo la precipitación del ADN con acetato de amonio 7.5 M y etanol absoluto, en una proporción de 1:16. La solución se dejó precipitar a -20°C toda la noche. El ADN obtenido se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 7,300 rpm por 5 min. El precipitado se secó y se eluyó en amortiguador Tris/EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1 mM EDTA- $\text{Na}_2\text{-}2\text{H}_2\text{O}$ ). La cuantificación del ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro Lambda Bio 40

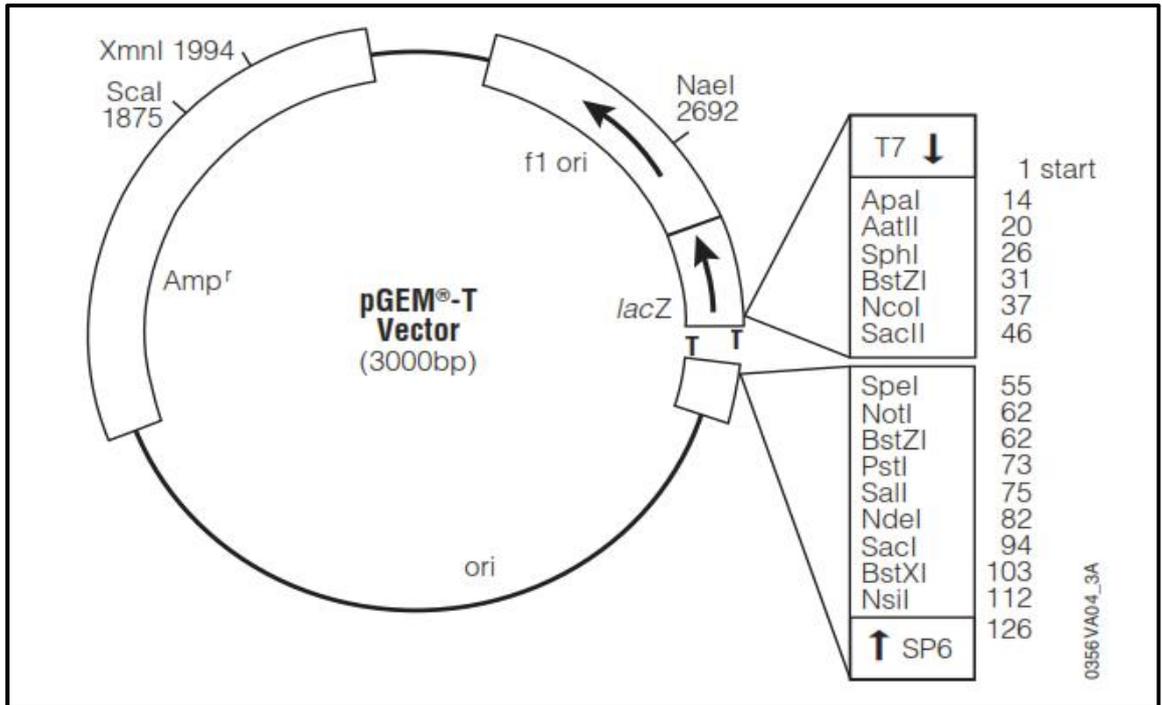
(Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), midiendo A260 y A280 por duplicado.

### **7.3 Clonación de la Región flanqueante 5' del Gen de *GPR30* humano**

Se amplificó por *PCR* un fragmento de ~2 kb usando como template el ADN genómico, extraído anteriormente de las células MCF-7. Se emplearon como cebadores de polimerización los oligonucleótidos mencionados en el Cuadro 7.3.1. La reacción se catalizó por la *Taq DNA polimerasa Expand Long Template PCR System*, (Roche, Indianápolis, IN, USA) durante 30 ciclos con una desnaturalización a 94°C, 20 segundos, un alineamiento a 50.4°C durante 1 minuto y una polimerización a 68°C, por 4 minutos; seguido de una extensión final de 7 minutos a 68°C. El producto de amplificación se ligó al vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA; Fig. 7.3.1) y el plásmido resultante pGEM-GPR30 se propagó en bacterias competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA). Cuatro clones positivas se seleccionaron para la preparación de ADN plasmídico mediante el sistema comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, USA). Cada clona se secuenció por el método de incorporación de dideoxinucleótidos fluorescentes usando el sistema comercial *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Nombre	Secuencia	pb	Aplicación
5FGPR30-s2	5'-AAGCAATAGGTCAACAAATCTCTAG-3'	25	Clonación DNA genómico
5FGPR30-as	5'-GTCTCTGCACCGTGCAGCTTTCAAGA-3'	26	
5FGPR30-s2000	5'-ACGCAGATCTTGCAACAAATCTCTAG-3'	27	Clonación y construcción génica
5FGPR30-s1500	5'-ACGCAGATCTTCTGGGCACCTGTCCTAG-3'	29	Clonación y construcción génica
5FGPR30-s1000	5'-ACGCAGATCTTGACTCTCTCCCTGGAG-3'	27	Clonación y construcción génica
5FGPR30-s500	5'-ACGCAGATCTTTCCACAGGCGACTC-3'	27	Clonación y construcción génica
5FGPR30-s200	5'-ACGCAGATCTTAGCATCTGTTCTTCCC-3'	27	Clonación y construcción génica
5FGPR30-as4	5'-ACGAAGCTTGCTCTGCACCGTGCAGC-3'	27	Antisentido construcciones génicas
ESR163-s	5'-AACTTGCTCTTGACAGGAACC-3'	22	RT-PCR ER $\alpha$
ESR163-as	5'-ATGTGTACTCCAGAATTAAGC-3'	23	
DSBETS1-s	5'-TACCTTCATTGCCCCCTGGGCCTGCTC-3'	27	Construcción Mutante ETS1
DSBETS1-as	5'-GAGCAGGCCAGGGGCAATGAAGGA-3'	27	
DSBSOX5-s	5'-ATTTCCCAAACCATGACCCCTTTC-3'	25	Construcción Mutante SOX5
DSBSOX5-as	5'-GAAAGGGGTCATGGAAAAGGAAAT-3'	25	
DSBERR1-s	5'-TCCCAAACAATTTCCCTTTCACTC-3'	26	Construcción Mutante ERR1
DSBERR1-as	5'-GAGTGAAAGGGGAAATTGTTTTGGGA-3'	26	
DSBNGRE-s	5'-ACTCTCTCCCTGTTGTTTCTCCTAG-3'	26	Construcción Mutante NGRE
DSBNGRE-as	5'-CTAGGAAGAAACAACAGGGAGAGAGT-3'	26	

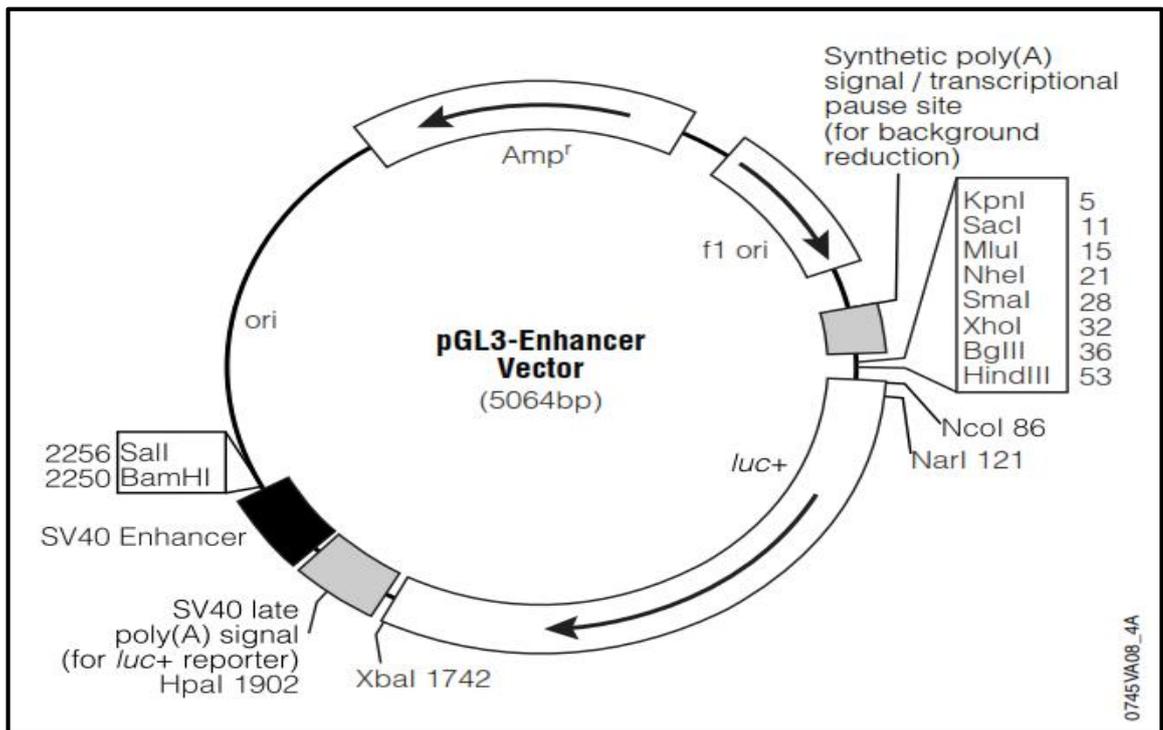
Cuadro 7.3.1. Oligonucleótidos empleados.



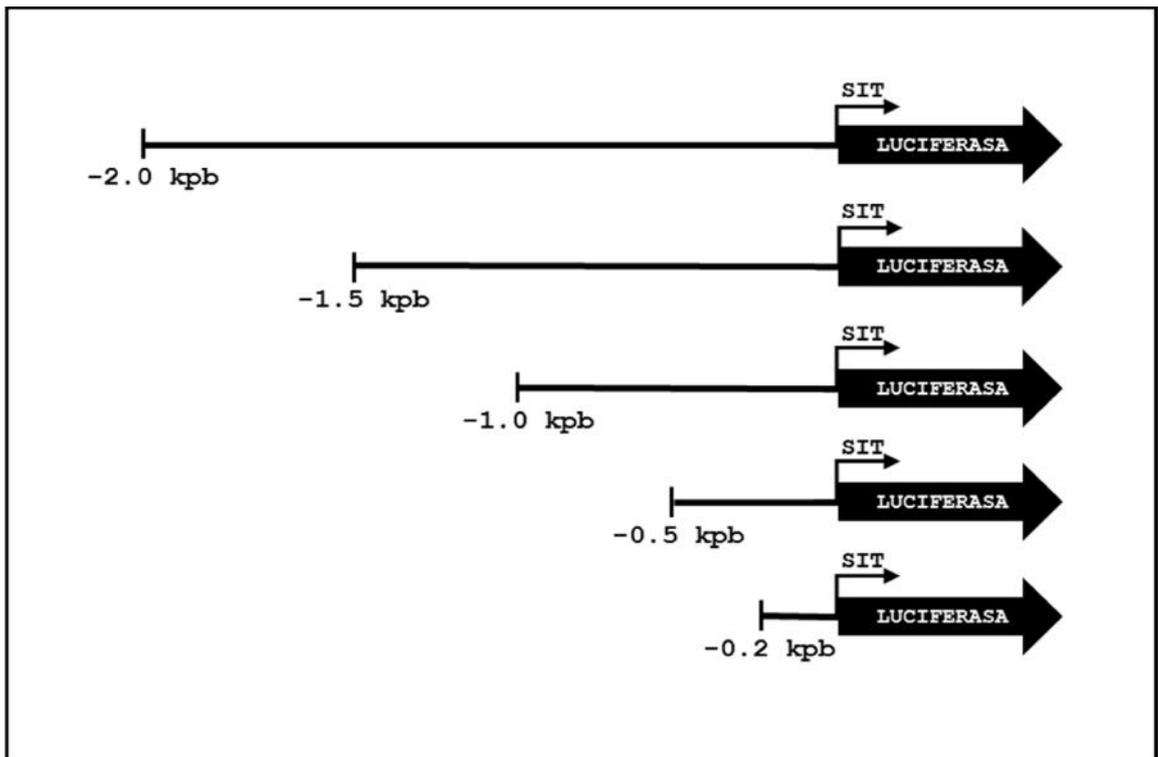
**Figura 7.3.1. Mapa del vector pGEM-T, utilizado para la clonación de la región promotora de *GPR30*.** Amp<sup>r</sup>, gen de resistencia a ampicilina; f1-ori, origen de replicación derivado del fago filamentoso f1; ori, origen de replicación del plásmido de *E. coli*; lac Z, secuencia del gen de la lactosidasa abierto en timinas

#### 7.4 Diseño de Construcciones Génicas Reporteras.

Cinco segmentos de diferentes longitudes (2.0 kb, 1.5kb, 1.0kb, 0.5kb y 0.2 kb) del promotor del gen *GPR30* humano fueron amplificados por *PCR*, mediante el uso de cebadores de polimerización específicos para cada segmento seleccionado (Cuadro 7.3.1). Se usó el plásmido pGEM-GPR30 como templete para todas las reacciones. Cada uno de los oligonucleótidos en sentido, contiene un sitio de restricción para la endonucleasa *Bgl* II en el extremo 5', mientras que el oligonucleótido en antisentido, contiene un sitio de restricción para la endonucleasa *Hind* III. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Cada uno de los productos de *PCR* se purificó a través del sistema comercial *GeneClean III Kit* (MP Biomedical, Solon, Ohio, USA) y posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Hind* III (Roche, Indianápolis, IN, USA). Cada segmento digerido fue nuevamente purificado y clonado en el vector pGL3-Enhancer (Promega, Madison, WI, USA) (Fig. 7.4.1), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Las construcciones resultantes pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5, y pGPR0.2 (Fig. 7.4.2) se propagaron en bacterias competentes *E. coli* JM109 (Promega Madison, WI, USA). Tres clones de cada plásmido se seleccionaron para verificar la fidelidad de los segmentos clonados mediante el sistema de secuenciación anteriormente mencionado.



**Figura 7.4.1. Mapa del vector reportero pGL3-Enhancer, usado en para las construcciones génicas.** *luc+*, secuencia del cDNA de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus*); *Amp<sup>r</sup>*, gen de resistencia a ampicilina; *f1-ori*, origen de replicación derivado del fago filamentos f1; *ori*, origen de replicación del plásmido de *E. coli*.



**Figura 7.4.2. Representación esquemática de las construcciones genéticas reporteras.** Se muestran las supresiones sucesivas de 5' a 3' del promotor de *GPR30* ligadas al vector reportero pGL3-Enhancer. SIT, sitio de inicio de la traducción, LUCIFERASA, gen reportero.

## 7.5 Ensayos de Expresión Transitoria de Construcciones Génicas Reporteras.

Las construcciones génicas reporteras se transfectaron transitoriamente en las líneas celulares MCF-10A, MDA-MB-231 y MCF-7 en placas de 96 pozos en donde se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células por pozo. Se usó el lípido catiónico *FuGENE HD transfection Reagent* (Roche, Indianápolis, IN, USA) y 100 ng de ADN plasmídico por pozo, para cada una de las seis construcciones reporteras. Cabe mencionar que se usó como control negativo al vector pGL3-Enhancer vacío y como control interno de la transfección 30 ng del plásmido pRL-tk por pozo. Un día después de la transfección, las células fueron lisadas y la actividad de las enzimas luciferasas (*Renilla reniformes* y *Photinus pyralis*) fue medida, utilizando el sistema comercial *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) en un luminómetro Sirius L Single Tube Luminometer (Huntsville, AL, USA).

## 7.6 Inmunodetección de los Receptores GPR30 y ER

Para la inmunodetección de GPR30 se extrajeron las proteínas totales a partir de la línea celular MCF-10A (proveniente de tejido mamario no neoplásico), y las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 (provenientes de tejido mamario neoplásico). Se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células en placas de 60 mm, mantenidas en los medios MGEM (Lonza, Walkersville, MD, USA) con toxina de *Vibrio cholerae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MD, USA) para las células MCF10A, DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% para las células MCF-7 y Leibovitz's L-15 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado con FBS 8%, sin antibióticos para las células MDA-MB-231. Se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Posteriormente se lavaron dos veces con 1ml de solución salina de fosfatos (PBS 0.01M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.016M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01M, NaCl 137 mM) antes de ser lisadas con amortiguador RIPA (Tris/HCl 1M pH 7.4, EDTA 6.5M pH 8.0, NaCl 5M, Deoxyocolato 0.4%, Igepal 0.8%), PMSF (*Phenylmethyl sulfonyl fluoride*), *Complete Mini* (Roche) y *Protease Inhibitor Cocktail*

*ProteoBlock* (Fermentas, Meridian Rd, Rockford, IL USA). Se rasparon las células y se depositaron en un tubo de microcentrífuga para hacer un homogenado celular agitando con vortex al tubo cada dos minutos por un periodo de diez minutos a 4°C. Se centrifugó a 13000 rpm durante diez minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para ser cuantificado.

Para el caso del receptor ER se obtuvieron extractos nucleares de las líneas celulares antes mencionadas. Las células se mantuvieron en placas de 60 mm con una densidad celular de  $3 \times 10^6$ . Se incubaron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% por 48 horas. Posteriormente se lavaron dos veces con solución salina de fosfatos (PBS) y se despegaron de la placa con Tripsina/EDTA 0.25%. Las células cosechadas fueron centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos y la pastilla fue lavada dos veces con PBS. La pastilla fue resuspendida en amortiguador A (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF) y mezclado por 20 segundos con NP-40 al 10%. Se centrifugó durante 40 segundos a 14000 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla fue nuevamente resuspendida en amortiguador B (20mM HEPES pH7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) y se mezcló por intervalos de 3 minutos durante 15 minutos a 4°C. Finalmente el extracto se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para ser cuantificado. Se cuantifico la concentración de proteína total y de extractos nucleares por el método de Bradford (Bradford, 1976, Kruger, 2009) en un espectrofotómetro Lambda Bio 40 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), midiendo la absorbancia a 595nm por duplicado.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE 10%). Para la detección de GPR30 se cargaron 50µg y 80µg de proteína y para la detección del ER se cargaron 12.5µg de los extractos nucleares. Previamente a la carga del gel, las muestras se sometieron a una incubación a 37°C durante 30 minutos, para asegurar la desnaturalización total. Posteriormente se corrieron en cámara de electroforesis *Mini-Trans-Blot* (BioRad,

Hércules, CA, USA) a 100 volts por 2.5 horas. La transferencia se realizó en membranas PVDF equilibradas en amortiguador de transferencia (Tris Glicina 10x, metanol 20%), mediante una cámara de transferencia semiseca *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad, Hércules, CA, USA) a 20 volts por 1.2 horas. Se bloqueó con solución de bloqueo (TBS 1x, Tween-20 0.1%, Albumina Sérica Bovina 4%) por 1 hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario específico para GPR30, *Anti-GPER* (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución de dilución de 1:625 en TBS-Tween con BSA 4% y para el ER , *Anti-ER* (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA) a una dilución 1:15000 en TBS-Tween (TBS 1x Tris 50 mM, NaCl 140 mM; Tween-20 0.1%) con BSA 4%. La expresión de la proteína GAPDH se usó como control, la cual se incubó con su anticuerpo primario *Anti-GAPDH* (Millipore, Billerica, MA, USA) a una dilución 1:10000 en TBS-Tween con BSA 4%. Las membranas fueron lavadas durante 15 minutos 3 veces con amortiguador TBS-tween. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios específicos a cada anticuerpo primario: IgG anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA) empleado para GPR30 y IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA) para ER y GAPDH. Para la inmunodetección se utilizó el Kit comercial de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL USA). La intensidad de la señal de las bandas se determinó por densitometría empleando el scanner de membranas LI-COR *C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

## **7.7 Detección del ER mediante RT-PCR**

Mediante *PCR* se amplificó un fragmento de 163 pb del ER , a partir del ADN complementario (ADNc) de las líneas celulares MCF10A, MCF-7 y MDA-MB-231 y con los oligonucleótidos de polimerización específicos para ER (Cuadro 7.2.1). Para obtener el ADNc de las células antes mencionadas, se realizó la reacción en

cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction RT-PCR*). Para la extracción del ARN total de las tres líneas celulares, se sembraron  $3 \times 10^6$  células por placa de 100 mm, se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% por 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). El lisado celular se mezcló vigorosamente con cloroformo por 30 segundos y se centrifugó durante 40 minutos a 14000 rpm a 4°C. La fase acuosa fue recuperada y el ARN fue precipitado con isopropanol a -20°C (Amresco, Cochran Road Solon, OH, USA). A continuación el ARN se centrifugó 1 hora a 14000 rpm a 4°C y se retiró el isopropanol. La pastilla de ARN fue lavada con etanol al 75% y centrifugado por 12 minutos a 14000 rpm a 4°C, Finalmente el ARN fue resuspendido en agua tratada con DEPC (Termo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). El ADNc fue generado a partir del ARN total obtenido mediante el sistema comercial *Phusion RT-PCR Kit* (FINNZYMES, Woburn, MA, USA).

## **7.8 Mutagénesis Sitio-Dirigida.**

La construcción pGPR1.0 fue analizada por el programa computacional *MatInspector* para el análisis de los elementos de mayor homología con secuencias consenso para los factores de transcripción represores. Los elementos seleccionados por este análisis para llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida fueron ETS, SOX5, NGRE y ERR1. Cada uno de estos elementos fueron modificados en su secuencia “core” a través de *PCR*, usando como templete la construcción génica reportera pGPR1.0 y empleando los cebadores de polimerización para cada una de las diferentes construcciones mutantes (Cuadro 7.2.1). Las reacciones de *PCR* se catalizaron por *Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase* (Agilent, Stevens Creek Boulevard, Santa Clara, CA, USA) durante 15 ciclos con una desnaturalización a 94°C, 20 segundos, un alineamiento a 56°C durante 30 segundos y una polimerización a 72°C, por 12 min; seguido de una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron digeridos

con la endonucleasa *Dpn I* (Roche, Indianápolis, IN, USA) los cuales se usaron en la transformación de bacterias competentes JM109 (Promega, Madison, WI, USA). Tres clonas fueron seleccionadas indiscriminadamente para la preparación de ADN plasmídico mediante el sistema comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Cada clona fue secuenciada por incorporación de dideoxinucleótidos fluorescentes usando el sistema comercial *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para confirmar las mutaciones deseadas y la fidelidad del resto de la secuencia. Las construcciones mutantes reporteras fueron identificadas como ETSmut, SOX5mut, ERR1mut y NGREmut.

## **7.9 Ensayos de Expresión Transitoria de Construcciones Mutantes**

Para las transfecciones transitorias que se realizaron a través del procedimiento antes mencionado en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. Se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células en placas de 96 pozos y cada pozo transfectado con 100 ng de ADN plasmídico de cada una de las construcciones mutantes antes mencionadas. Es importante mencionar que se utilizó como control de referencia a la construcción génica reportera pGPR1.0. Para estos ensayos también fue empleado el lípido catiónico *FuGENE HD transfection Reagent* (Roche, Indianápolis, IN, USA). Después de 48 horas de expresión, la actividad de cada construcción mutante se expresó en unidades relativas de luz (URL/s), generada por la luciferasa en presencia de la luciferina usando un luminómetro de un solo tubo Sirius L Single Tube Luminometer (Huntsville, AL, USA).

## **7.10 Ensayos de Inhibición de Vías de Señalización.**

Para discriminar entre los posibles factores de transcripción que pudieran ser responsables de la regulación transcripcional observada por el elemento ETS ubicado entre 0.5 y 1.0 Kb del promotor de GPR30, se bloquearon las tres

principales vías de señalización que fosforilan a ETS-1, ETS-2 y a los diferentes miembros de la subfamilia PEA3. Para ello se usó al inhibidor de la p38 (SB203580, Millipore) donado por la Dra. Clara Ortega Camarillo, el inhibidor de pKA (H89, Millipore) y de ERK (PD98059, Millipore) donados por el Dr. Rubén Gutiérrez Sagal, a una concentración de 10 $\mu$ M cada uno de ellos. Se realizaron transfecciones transitorias en las tres líneas celulares, sembrando 1.5 x 10<sup>4</sup> células por pozo en placas de 96 pozos. Cada pozo se transfectó con 100ng de ADN plasmídico de las construcciones génicas pGPR1.0 y pGPR0.5, cada pozo fue dosificado con uno de los tres inhibidores antes mencionados, además de usar un control sin ningún tipo de inhibidor, únicamente DMSO al 100% como vehículo. Empleado como control basal se transfectó con 100 ng del vector pGL3-E vacío y como control interno 12.5 ng de pRL-tk. Las dosis de los inhibidores se aplicaron a las 22 horas de expresión después de la transfección. Luego de 48 horas de expresión, la actividad de cada inhibidor, expresado en unidades relativas de luz (URL/s) generada por la luciferasa en presencia de la luciferina, se midió en un luminómetro.

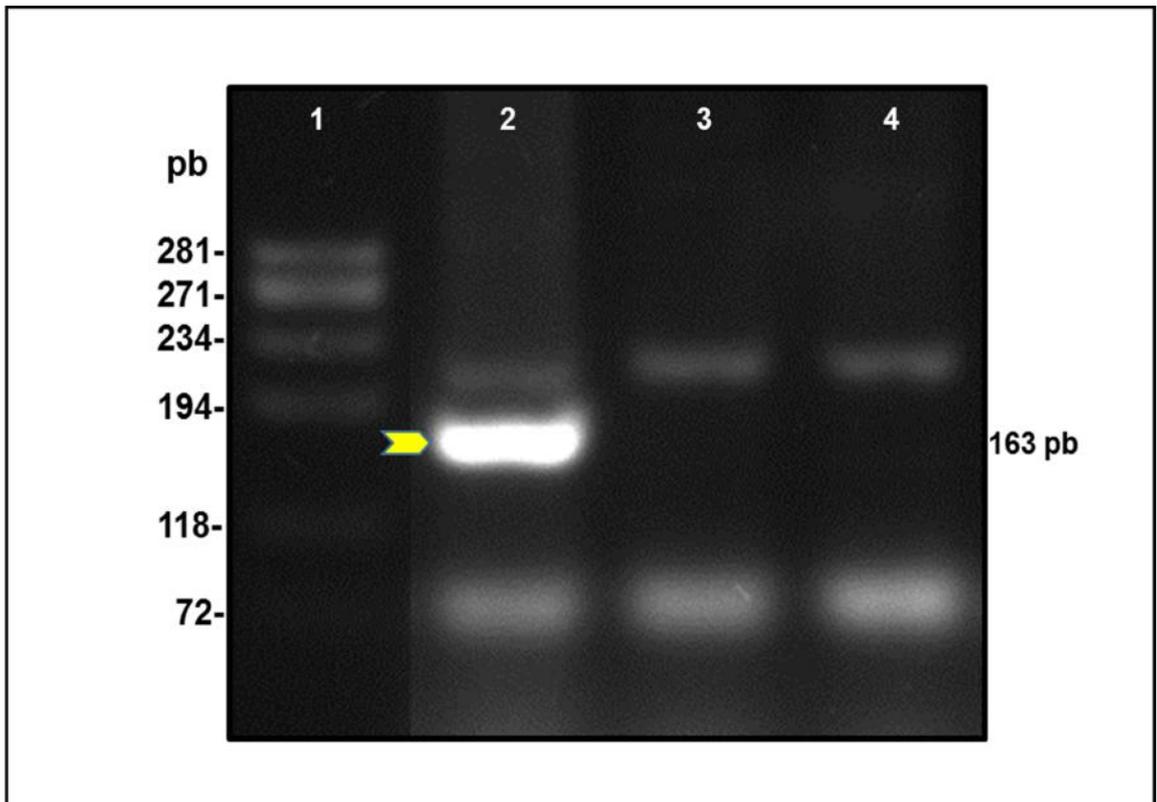
### **7.11 Análisis Estadístico**

Las diferencias obtenidas en la actividad de la luciferasa y la actividad promedio relativa de las cinco construcciones reporteras del promotor de GPR30 en cada línea celular, fueron analizadas por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey. Por otro lado, los efectos generados por las mutagénesis sitio dirigidas y los diferentes tratamientos de inhibidores de señalización celular, fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney con respecto a la construcción silvestre y vehículo, respectivamente.

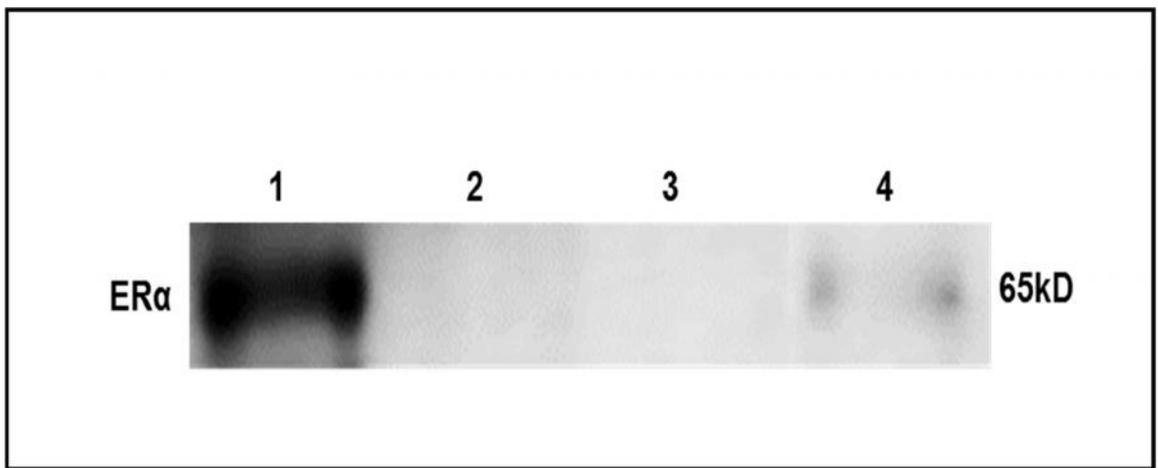
## 8. RESULTADOS

### 8.1 Determinación de la Expresión del ER $\alpha$ en Líneas Celulares de Mama.

La identificación del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 fue a través de la detección del transcrito para el receptor ER por *RT-PCR*, se observó un fragmento de 163 pares de bases (pb) específico para ER $\alpha$ . En la Figura 8.1.1 se presenta el gel de agarosa con la amplificación del fragmento de 163pb esperado, el cual únicamente se presentó en la línea celular MCF-7. Por inmunodetección se logró identificar una proteína de 62 kDa que correspondió al receptor ER $\alpha$  y que únicamente se presentó en la línea celular MCF-7 (Fig. 8.1.2). Estos resultados en conjunto indican que el perfil de expresión del ER $\alpha$  corresponde con la identidad fenotípica reportada para estas líneas celulares que se utilizaron como modelo de estudio.



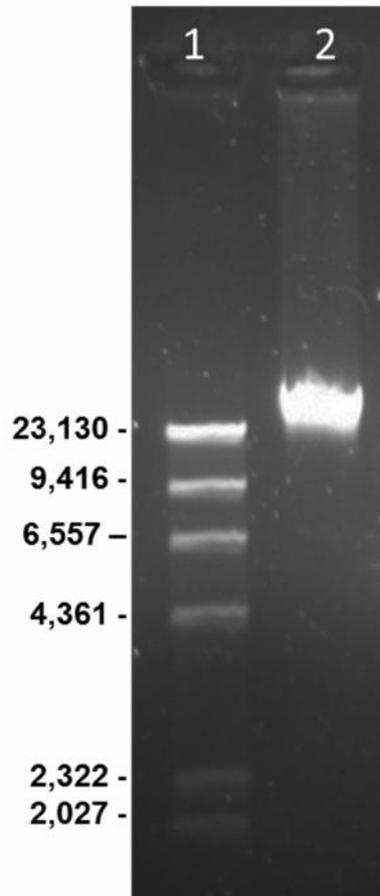
**Figura 8.1.1. RT-PCR. Detección del transcrito de ER en células de tejido mamario.** De izquierda a derecha se muestra: 1) marcador molecular lambda digerido con Hind III, 2) células MCF-7, 3) células MCF-10A, 4) células MDA-MB-231. Marcado con cabeza de flecha se observa un fragmento de amplificación de ~163pb.



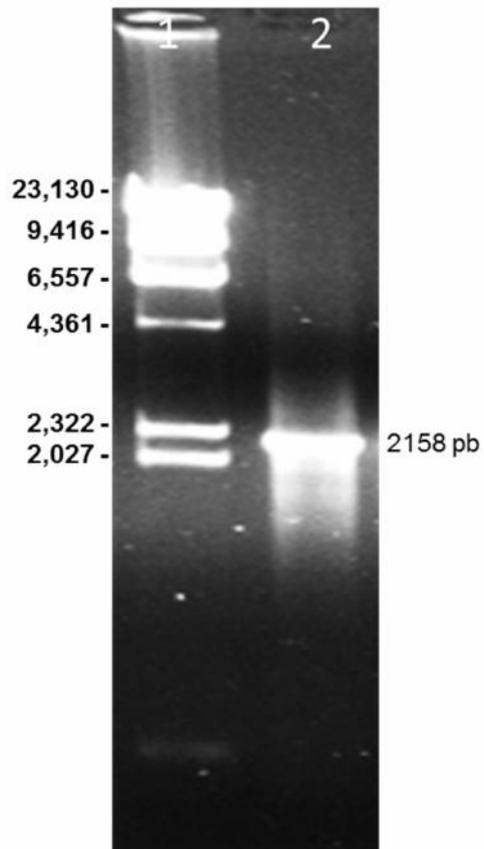
**Figura 8.1.2. Inmunodetección del ER** . Banda 65 kDa correspondiente al ER a partir de extractos nucleares de células de tejido mamario. 1) Células MCF-7, 2) Células MCF-10A, 3) Células MDA-MB-231, 4) Control extracto nuclear comercial células MCF-7.

## 8.2 Clonación de la Región Flanqueante 5' del Gen *GPR30* Humano.

En la figura 8.2.1 se muestra la resolución electroforética del ADN genómico obtenido a partir de las células MCF-7, en donde se puede apreciar una sola banda mayor a 23,130 pares de bases (pb) del marcador molecular lambda digerido con *Hind* III. El ADN genómico obtenido fue empleado como molde para amplificar por *PCR*, el fragmento del gen *GPR30* comprendido de -1962 a +145 a partir del sitio de inicio de traducción. Como se puede observar el producto de amplificación se localizó entre 2,322 y 2,027 pares de bases con respecto al marcador molecular, indicando la obtención de un fragmento con el tamaño esperado de 2,158 pb (Fig. 8.2.2). Este fragmento de 2,158 pb de la región flanqueante 5' del gen *GPR30* se clonó en el vector pGEM-T, dando lugar al plásmido pGEM-GPR30. La secuenciación de las tres clonas seleccionadas, resultaron sin cambios en la fidelidad con respecto a la secuencia del cromosoma 7 humano reportado en el Gene Bank (número de acceso AC091729.4).



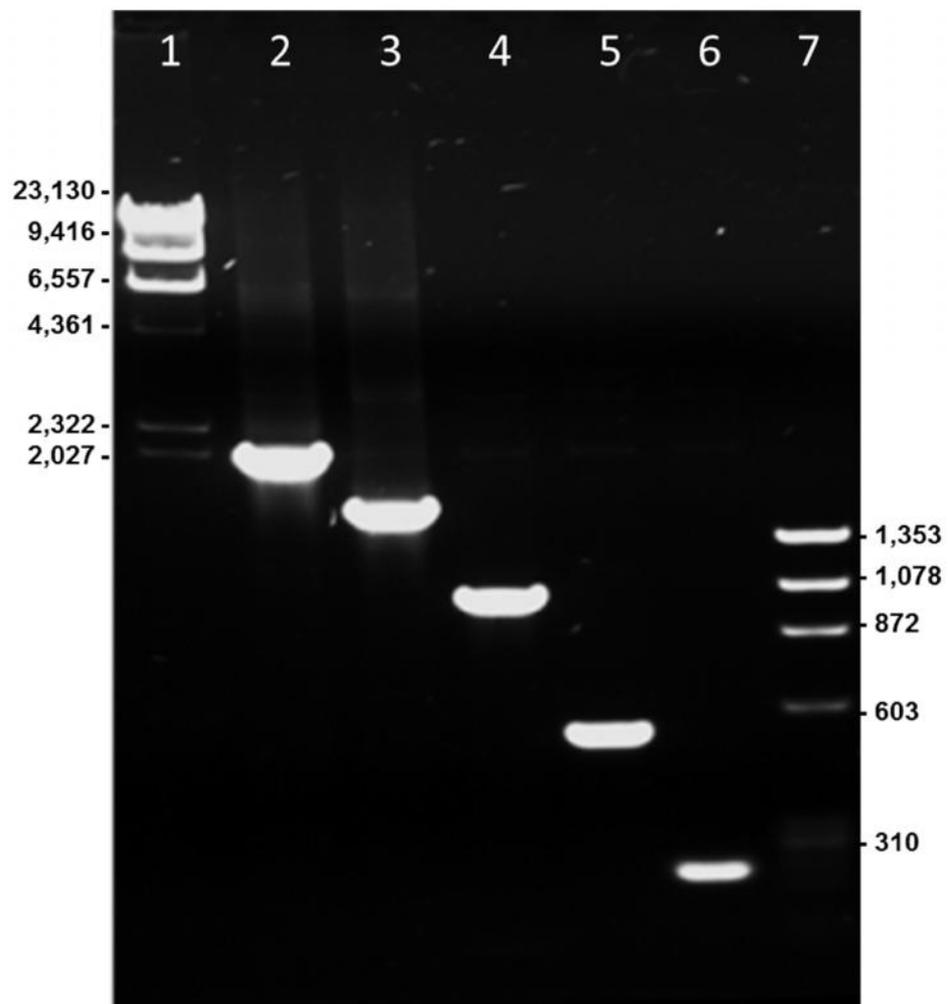
**Figura 8.2.1. Electroforesis del ADN genómico extraído a partir de células MCF-7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, 1) Marcador lambda digerido con *Hind* III, 2) ADN genómico de células MCF-7.



**Figura 8.2.2. Electroforesis de la amplificación por PCR del fragmento del gen *GPR30* comprendido de +145 a -1962 del sitio de inicio de traducción, a partir de ADN genómico de células MCF-7. 1) Marcador lambda digerido con *Hind* III, 2) Producto PCR de la amplificación del promotor de *GPR30*.**

### 8.3 Construcción de los Plásmidos Reporteros.

Usando como molde al plásmido pGEM-GPR30 se amplificaron 5 fragmentos de diferentes longitudes con sitios de restricción para las enzimas *Bgl* II y *Hind* III. La figura 8.3.1 muestra las bandas que corresponden a los diferentes fragmentos amplificados por *PCR*. Dichos fragmentos fueron digeridos con las endonucleasas *Bgl* II y *Hind* III para ligarse al vector reportero pGL3-Enhancer, el cual fue también digerido con las mismas endonucleasas de restricción. Con ello se obtuvieron las construcciones pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5, y pGPR0.2 y el análisis de la secuencia de las tres clonas de cada una de las construcciones génicas reporteras resultaron sin cambios y presentaron la orientación esperada.



**Figura 8.3.1. Amplificación por PCR de los 5 diferentes fragmentos truncados del promotor *GPR30*.** 1) Marcador lambda digerido con *Hind* III, 2) Producto PCR de la amplificación del fragmento de ~2.0kb, 3) Producto PCR de la amplificación del fragmento de ~1.5kb, 4) Producto PCR de la amplificación del fragmento de ~1.0kb, 5) Producto PCR de la amplificación del fragmento de ~0.5kb, 6) Producto PCR de la amplificación del fragmento de ~0.2kb, 7) Marcador Phy X174.

#### **8.4 Análisis de la Regulación Transcripcional del Promotor Génico de GPR30.**

Para localizar las regiones de regulación transcripcional en el promotor de GPR30 clonado, se realizaron ensayos de expresión transitoria mediante el uso de las construcciones génicas reporteras pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5, y pGPR0.2 previamente diseñadas en cada línea celular de mama anteriormente analizadas. En estos experimentos, el patrón de regulación transcripcional del promotor de GPR30 fue similar en las tres líneas celulares. En contraste, la actividad transcripcional promedio para la línea celular MCF-10A resultó 18% superior a MCF-7 ( $p < 0.05$ ) y 24% mayor que MDA-MB-231 ( $p < 0.03$ ). Sin embargo, en un análisis más detallado de los resultados, fue posible observar diferencias más específicas. Por ejemplo, cuando se retiraron 500 pb a la construcción de pGPR2.0, se observó un aumento significativo y generalizado en la actividad del promotor. Mientras que este incremento de la actividad relativa observada entre las construcciones pGPR1.0 y pGPR0.5 resultó en un cambio estadísticamente significativo en las líneas MCF-10A y MDA-MB-231, pero relevante solamente para MCF-10A. Por último, al remover 300 pb de la construcción pGPR0.5, se observó un cambio negativo en la actividad del promotor que resultó significativo y relevante solo en las células MCF-10A y MDA-MB-231 (Fig. 8.4.1).

Cabe mencionar que los resultados de la actividad transcripcional reportera fueron reportados sin normalización de pRL-tk, dado que la actividad de este plásmido que se empleó como control interno, nunca demostró cambios estadísticamente significativos entre los distintos eventos. Lo cual indica que las transfecciones realizadas no alteran la viabilidad celular.

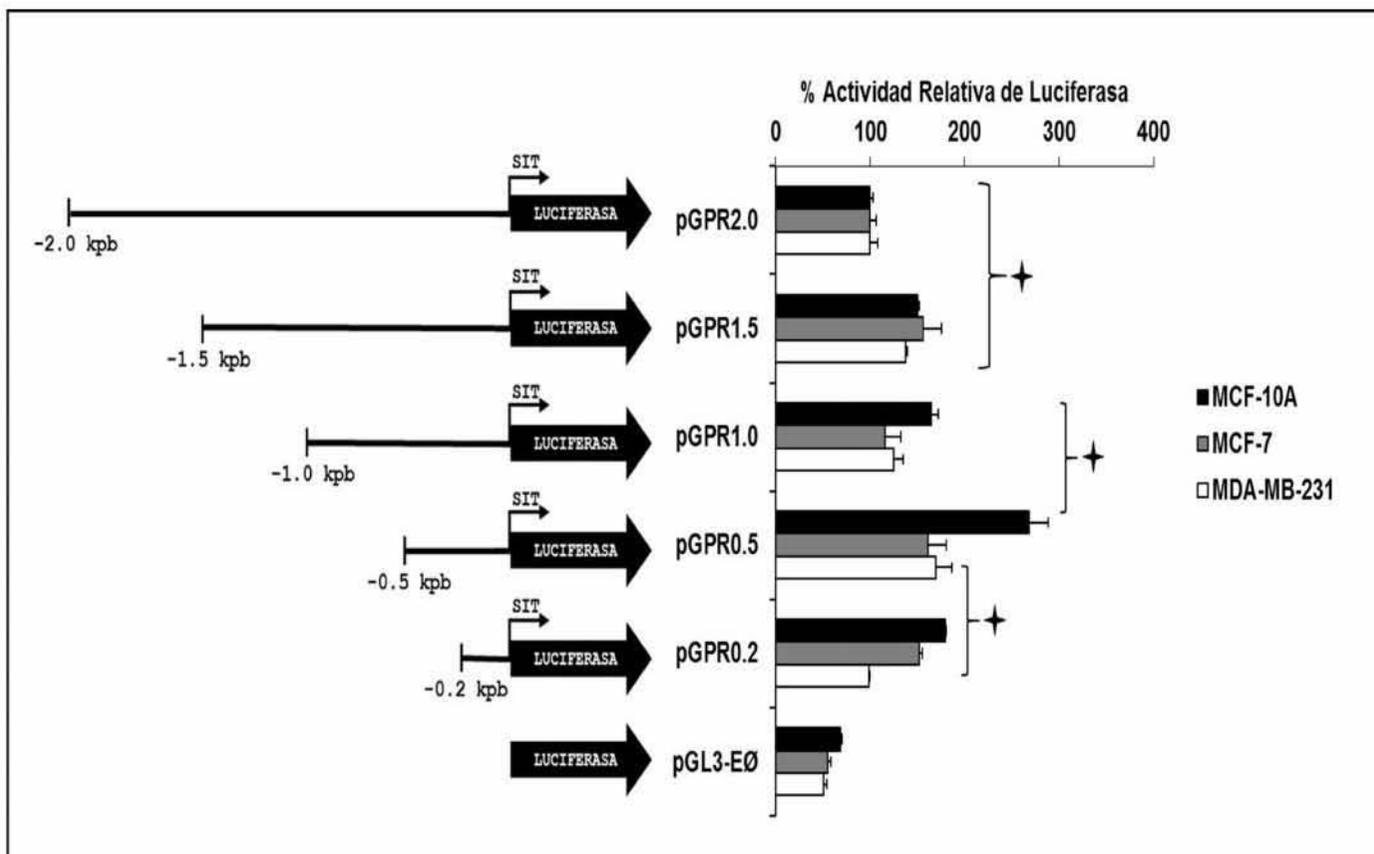


Figura 8.4.1. Análisis de actividad transcripcional de las construcciones génicas reporteras pGPR2.0, pGPR1.5, pGPR1.0, pGPR0.5 y pGPR0.2 mediante transfección en líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. Ensayo representativo de tres repeticiones con triplicados. A la izquierda se muestran esquemas representativos de las construcciones del promotor de GPR30, de lado derecho se muestra la evaluación de la actividad transcripcional de dichas construcciones génicas reporteras. La estrella indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

La secuencia de las regiones del promotor de *GPR30* que mostraron una actividad transcripcional relevante, se analizó a través de la herramienta bioinformática Mat-Inspector, con el fin de deducir los elementos en *cis* putativos de alta homología con sitios de unión para factores de transcripción asociados con el desarrollo del cáncer de mama. En el Cuadro 8.4.1, se muestra que los sitios consenso para los factores de transcripción ETS, SOX5, ERR1 y NGRE, fueron los que resultaron con la mayor homología con los elementos ubicados de -625 a -635 pb, de -893 a -899 pb, de -888 a -894 pb y de -996 a -1006 pb respectivamente, dentro de la región que se encuentra entre 0.5 y 1.0 Kb (Fig.8.4.2).

Factor de Transcripción	Posición	Cadena	Homología (%)	Secuencia (MAYÚSCULAS=sec. "core")
<i>ETS</i>	de -625 a -635 pb	(-)	99.1	caggcccAGGAGcaatg
<i>SOX5</i>	de -893 a -899 pb	(+)	98.9	ccaaACAATgacccctt
<i>ERRα1</i>	de -888 a -894 pb	(-)	98.7	gaaaGgGGTCAttgtttt
<i>NGRE</i>	de -996 a -1006 pb	(-)	97.4	aaCTCCagGGAGAgga
<i>MyB</i>	de -633 a -656 pb	(-)	96.6	ggacAACGgcatttg
<i>GATA-1</i>	de -717 a -711 pb	(-)	95.9	gtaaGATAggag

**Cuadro 8.4.1. Análisis predictivo de la secuencia nucleotídica de la región 5' flanqueante del gen *GPR30*.** Análisis de la región de ~500pb que va de la construcción reportera pGPR0.5 a la construcción pGPR1.0 del promotor de *GPR30* mediante el software Mat-Inspector.

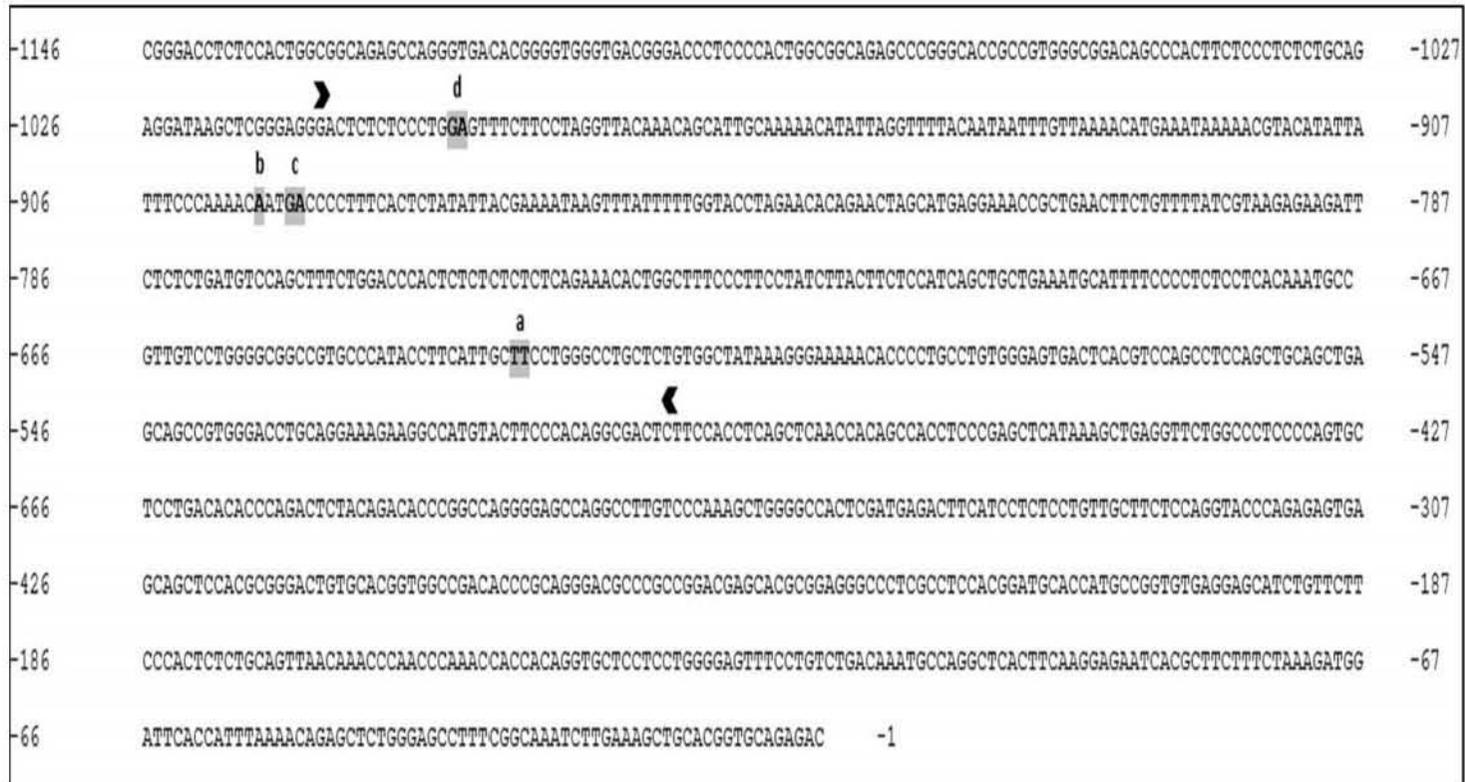
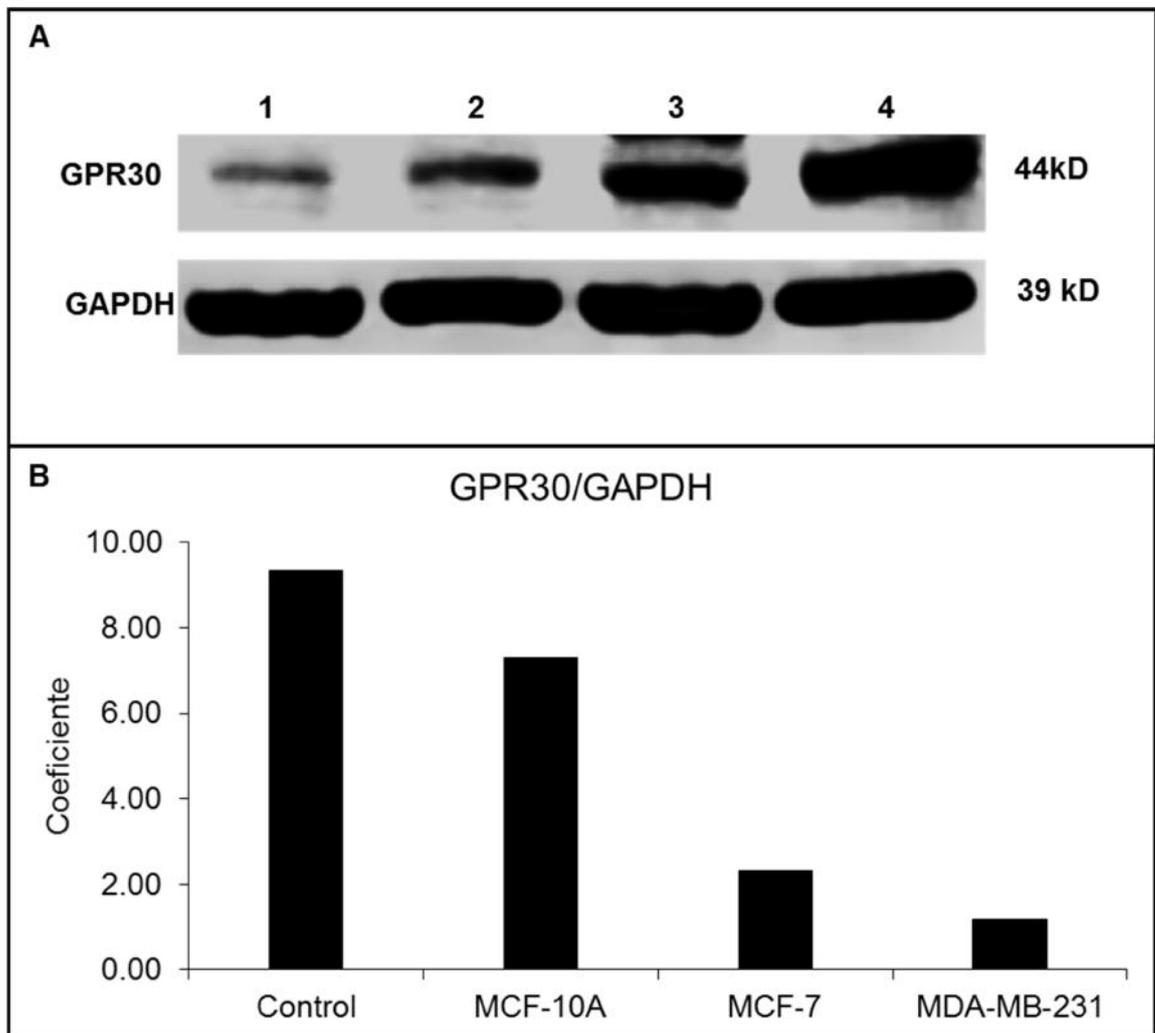


Figura 8.4.2. **Análisis de la secuencia nucleotídica de la región flanqueante 5' del gen GPR30.** Las cabezas de flecha delimitan la longitud de la región de ~500pb que va de la construcción reportera pGPR0.5 a la construcción pGPR1.0, en sombreado se encuentran los nucleótidos que serán mutados de los elementos putativos para los diferentes factores de transcripción a) ETS, b) Sox5, c) ERR $\alpha$ 1 y d) NGRE.

## **8.5 Inmunodetección del Receptor GPR30 Humano.**

En vista que en la línea celular MDA-MB-231 se encontró actividad transcripcional inesperada pero relevante por parte del promotor *GPR30*, se decidió corroborar este hallazgo a través de inmunodetección, asumiendo que el patrón de expresión de este receptor en las líneas celulares de estudio coincidía con lo reportado. En la figura 8.5.1 se muestra la detección inmunológica de la proteína del receptor GPR30 (44 kD) en las tres líneas celulares de mama. Con este resultado se observó que la expresión del receptor GPR30 en la línea celular MCF-10A fue 3.5 veces superior a la expresión en las células MCF-7 y 7 veces mayor que en la línea celular MDA-MB-231. Estos resultados confirman la sospecha de la expresión de GPR30 en MDA-MB-231, además indican una posible correlación negativa entre la expresión de GPR30 y la malignidad celular en el tejido mamario.

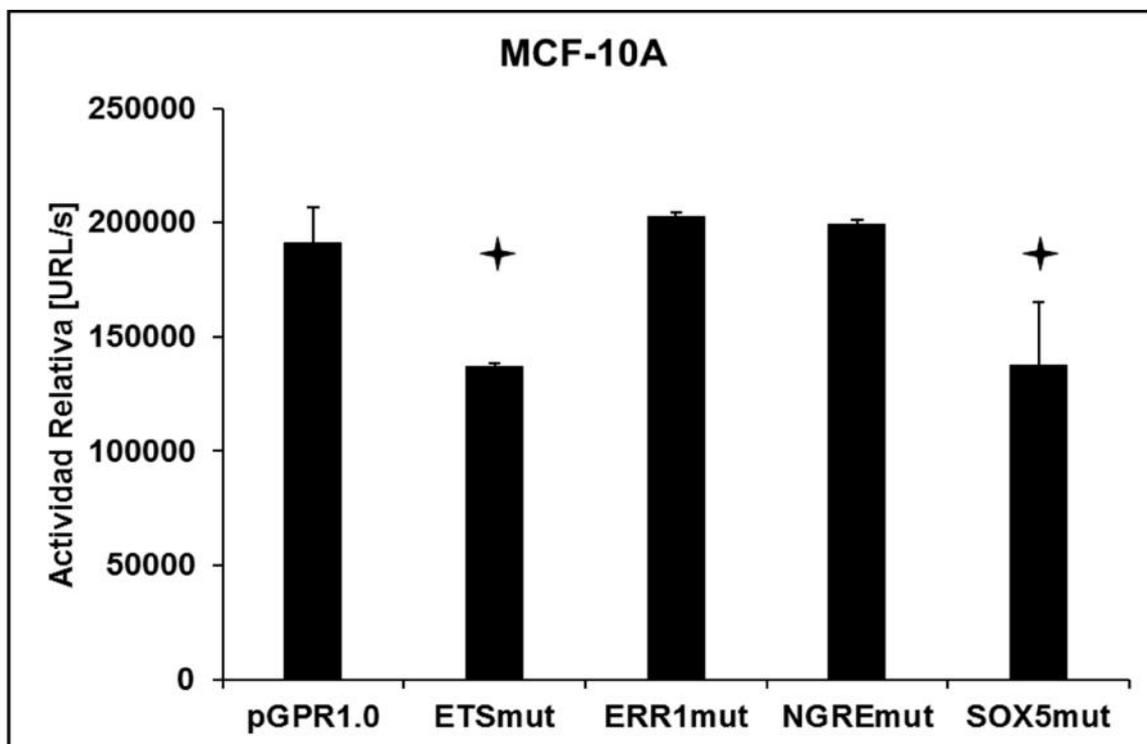


**Figura 8.5.1. Inmunodetección del receptor GPR30.** Realizado en las células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231. (A) Ensayo representativo de tres inmunodetecciones donde se muestran las bandas de 44 y 39 kD correspondientes a la detección del receptor GPR30 y del constitutivo GAPDH respectivamente, en células de tejido mamario. 1) MDA-MB-231, 2) MCF-7, 3) MCF-10A, 4) Control células OVCAR; (B) Coeficiente de expresión GPR30/GAPDH.

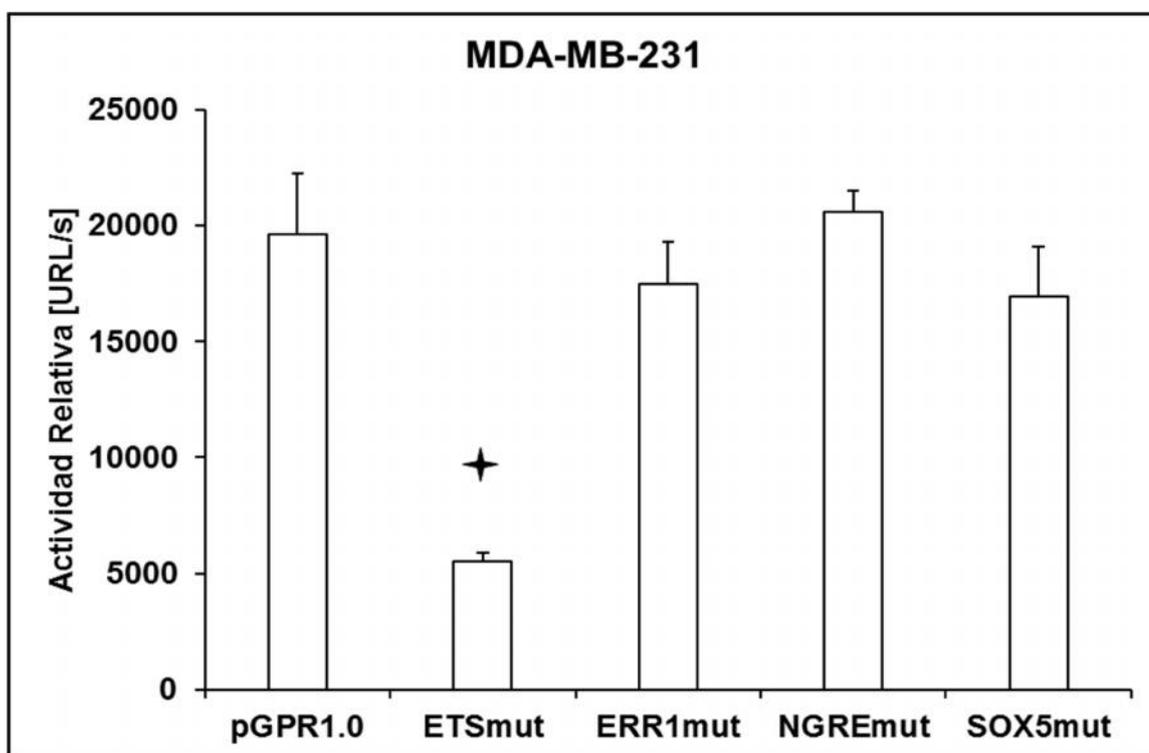
## 8.6 Funcionalidad de los Elementos en *cis* Putativos ETS, ERR1, NGRE y SOX5.

Con el fin de evidenciar la funcionalidad de los elementos en *cis* putativos de mayor homología para los sitios de unión de los factores de transcripción ETS, ERR1, NGRE y SOX5 ubicados dentro de la región que se encuentra entre 0.5 y 1.0 kb de la región promotora de GPR30, se realizaron mutaciones sitio dirigidas en la región “core” de dichos sitios de unión de la construcción pGPR1.0, resultando las construcciones génicas mutantes reporteras: ETSmut, ERR1mut, NGREmut y SOX5mut. Posteriormente fueron realizados ensayos de expresión transitoria con las construcciones mutantes reporteras previamente diseñadas y con las líneas celulares de mama MCF-10A, MCF-7 y MDA.MB-231. En los ensayos, se observó de manera general que las construcciones génicas reporteras ERR1mut, NGREmut y SOX5mut no presentaron ningún cambio significativo en la regulación transcripcional con respecto a la construcción silvestre pGPR1.0. Sin embargo, la construcción mutante ETSmut en las líneas celulares MCF-10A (Fig. 8.6.1) y MDA-MB-231 (Fig. 8.6.2), inesperadamente presentaron una actividad transcripcional que resultó ser significativamente menor a la actividad de la construcción silvestre pGPR1.0. Mientras que la línea celular MCF-7 la construcción mutante ETSmut no mostró ningún cambio significativo en la actividad (Fig. 8.6.3). Lo anterior sugiere que el elemento en *cis* putativo ETS es funcional en las células MCF-10A y MDA-MB-231, pero en forma contraria al aumento de la actividad transcripcional que se esperaba al mutar dicho elemento.

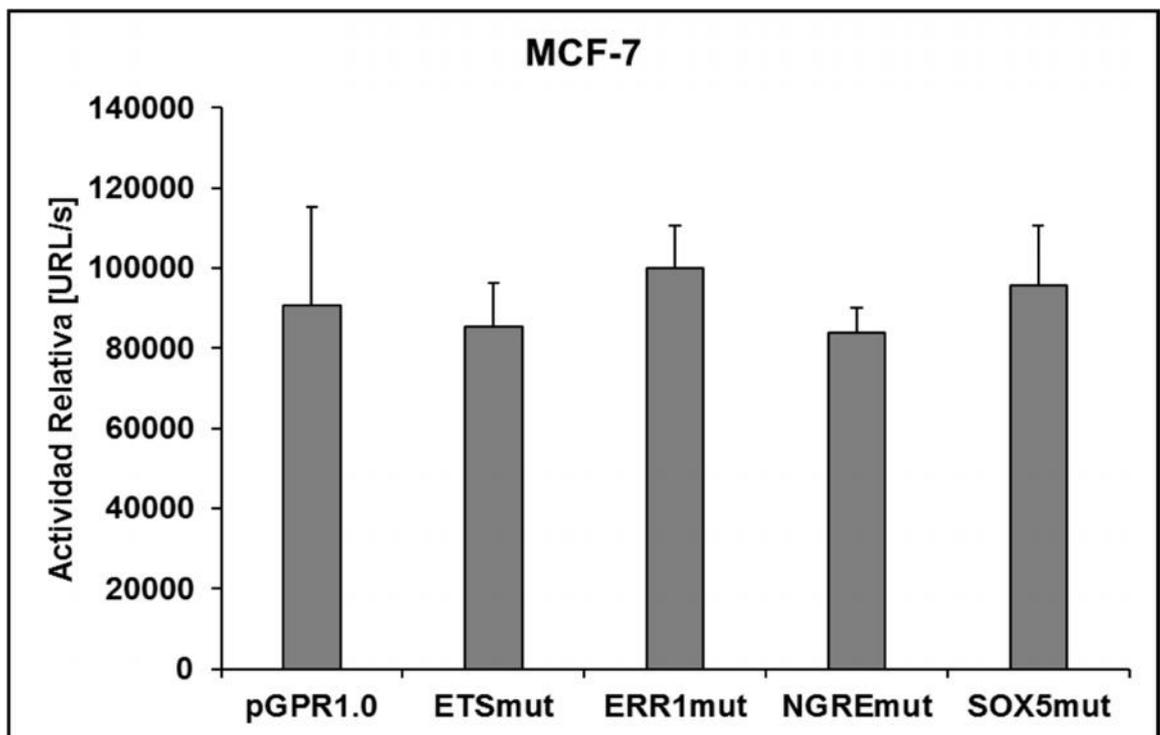
Cabe mencionar que los resultados de la actividad transcripcional reportera fueron reportados sin normalización de pRL-tk, dado que la actividad de este plásmido que se empleó como control interno, nunca demostró cambios estadísticamente significativos entre los distintos eventos. Lo cual indica que las transfecciones realizadas no alteran la viabilidad celular.



**Figura 8.6.1. Análisis de actividad de las diferentes construcciones mutantes del promotor de *GPR30* en células MCF-10A.** Cada construcción mutante fue transfectada transitoriamente en células las MCF-10A. De izquierda a derecha están: pGPR1.0) construcción reportera silvestre; ETSmut) construcción mutante para ETS; ERR1mut) construcción mutante para ERR1; NGREmut) construcción mutante para NGRE; SOX5mut) construcción mutante para SOX5. La estrella indica los cambios significativos ( $p < 0.05$ ) con respecto al silvestre según la prueba de Mann-Whitney.



**Figura 8.6.2. Análisis de actividad de las diferentes construcciones mutantes del promotor de *GPR30* en células MDA-MB-231.** Cada construcción mutante fue transfectada transitoriamente en células las MDA-MB-231. De izquierda a derecha están: pGPR1.0) construcción reportera silvestre; ETSmut) construcción mutante para ETS; ERR1mut) construcción mutante para ERR1; NGREmut) construcción mutante para NGRE; SOX5mut) construcción mutante para SOX5. La estrella indica cambios significativos ( $p < 0.05$ ) con respecto al silvestre según la prueba de Mann Whitney.



**Figura 8.6.3. Análisis de actividad de las diferentes construcciones mutantes del promotor de *GPR30* en células MCF-7.** Cada construcción mutante fue transfectada transitoriamente en células las MCF-7. De izquierda a derecha están: pGPR1.0) construcción reportera silvestre; ETSmut) construcción mutante para ETS; ERR1mut) construcción mutante para ERR1; NGREmut) construcción mutante para NGRE; SOX5mut) construcción mutante para SOX5.

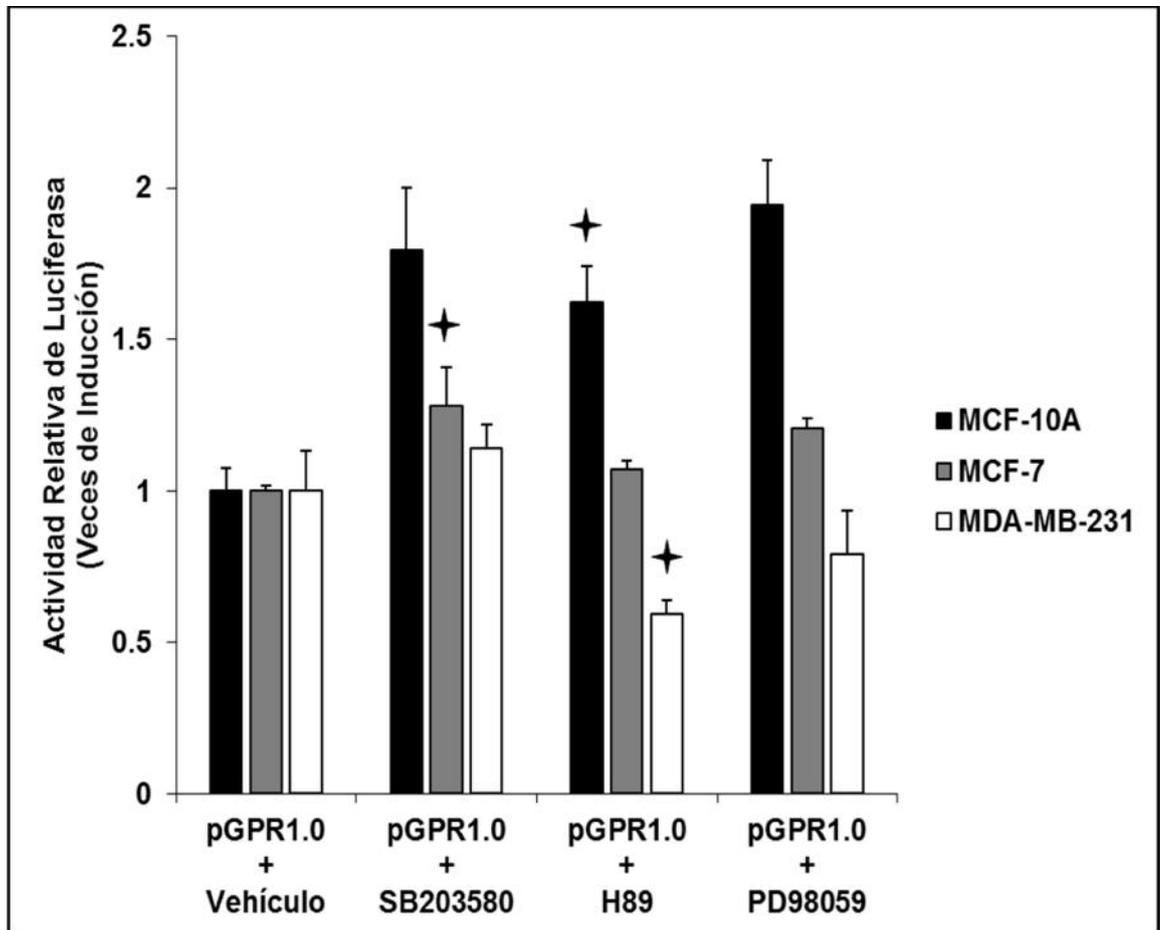
## **8.7 Vía de Fosforilación Involucrada en el Mecanismo de Regulación Transcripcional del Elemento ETS del Promotor de *GPR30*.**

La familia de factores de transcripción ETS está conformada por 27 miembros que se han clasificado en 12 subfamilias. Todos los factores ETS reconocen la misma secuencia 'core' y todas las subfamilias, excepto ERF, TCF y TEL, tienen la capacidad de inducir la actividad transcripcional. Sin embargo, varios estudios clínicos coinciden en que la expresión de Ets-1, Ets-2, PEA3 y ERM tienden a incrementar en relación al desarrollo del cáncer de mama; mientras que factores como PDEF disminuyen notablemente (Galang et al., 2004). De la misma forma, estudios comparativos de la expresión de las subfamilias ETS y PEA3 en líneas celulares derivadas de cáncer de mama, concuerdan en el hecho de que la expresión de estos factores aumenta en células con un fenotipo invasivo como MDA-MB-23 (Baert et al., 1997). La activación de los factores de estas dos familias, se lleva a cabo principalmente a través de las vías de fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (ERK-1, ERK-2), cinasas que responden a estímulos de estrés (p38) y de la proteína cinasa A (PKA). Para tener una mayor indicio sobre la identidad del o los factores responsables de la actividad del elemento ETS ubicado entre 0.5 y 1.0 kb del promotor de *GPR30*, se realizaron experimentos de expresión transitoria con las construcciones génicas pGPR1.0 y pGPR0.5, en las tres líneas celulares anteriormente mencionadas; bloqueando en forma individual cada una de las tres principales vías de señalización que fosforilan a los diferentes factores de transcripción ETS-1, ETS-2, ERM, PEA3 y ER81.

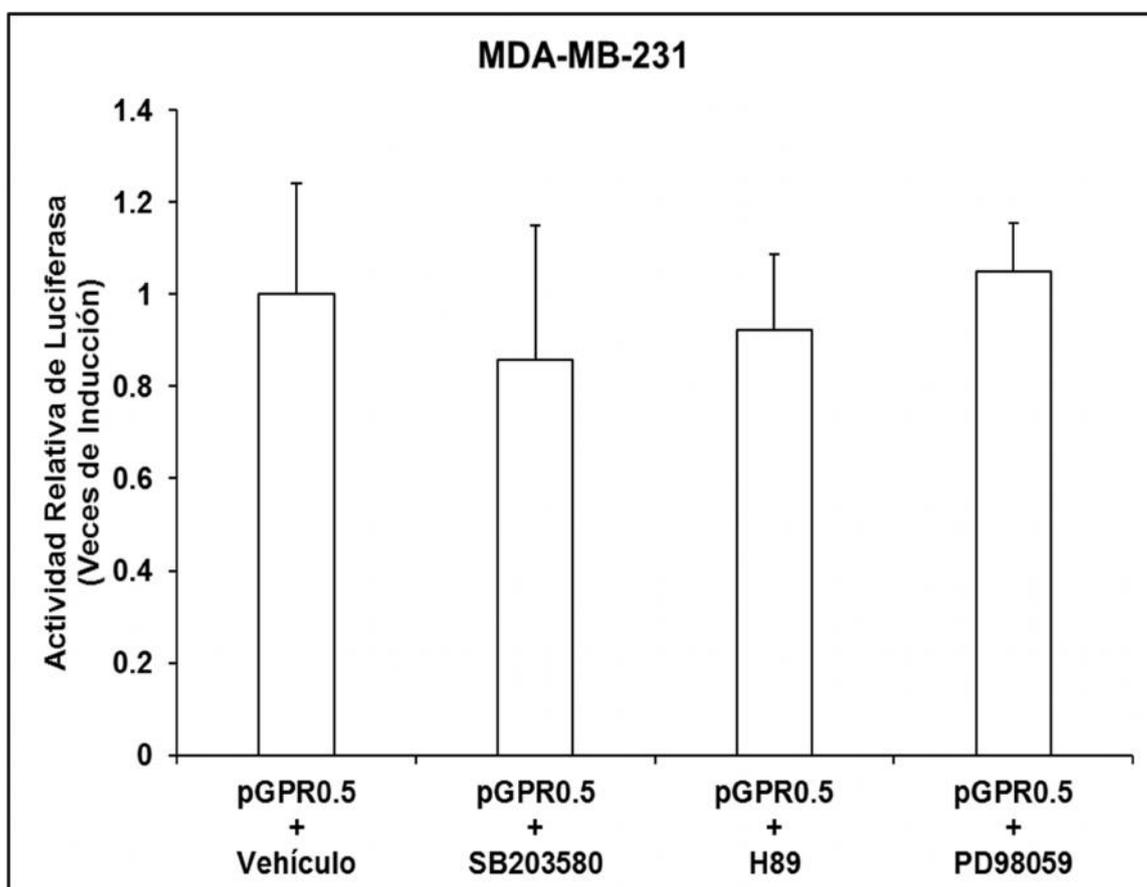
Al transfectar la construcción pGPR1.0 en las células MCF-10A en presencia de los inhibidores SB203580 (p38), H89 (PKA) y PD98059 (ERKs), inesperadamente se obtuvo un aumento significativo en la actividad transcripcional del promotor de *GPR30*, mientras que en MCF-7 el incremento significativo solo se observó con el inhibidor de la p38, SB203580. En contraste, la actividad del promotor de 1.0 kb en MD-MB-231 demostró una disminución de casi el 50% en

presencia de H89, mientras que con el resto de los inhibidores no se observaron cambios relevantes (Fig. 8.7.1). Esto sugiere que la vía de señalización de PKA activa un factor de transcripción que regula positivamente la actividad del promotor, de forma semejante a la observada cuando se muta el elemento ETS en MDA-MB-231. Para verificar que la disminución obtenida en la actividad del gen reportero no fuera causada por algún otro elemento ubicado fuera del intervalo entre los 500 y 1000 pb, la construcción de pGPR0.5 fue expuesta a los mismos tratamientos de inhibidores en MDA-MB-231 (Fig. 8.7.2). Al no obtener cambios significativos en la actividad reportera de la construcción de 500 pb con ninguno de los inhibidores, este ensayo demuestra que la disminución en la actividad del promotor observada con la construcción pGPR1.0 es generada por un elemento ubicado en la vecindad del elemento ETS propuesto.

Cabe mencionar que los resultados de la actividad transcripcional reportera fueron reportados sin normalización de pRL-tk, dado que la actividad de este plásmido que se empleó como control interno, nunca demostró cambios estadísticamente significativos entre los distintos eventos. Lo cual indica que las transfecciones realizadas no alteran la viabilidad celular.



**Figura 8.7.1. Bloqueo de las principales vías de señalización que fosforilan a los posibles factores de transcripción pertenecientes a la familia ETS en las células MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.** Análisis de la actividad mediante la transfección de la construcción reportera pGPR1.0 del promotor de *GPR30* en las células MCF10A, MCF-7 y MDA-MB-231, con la adición de los inhibidores SB203580, H89 y PD98059, además de la adición de DMSO como vehículo. La estrella indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al vehículo según la prueba de Mann-Whitney.



**Figura 8.7.2. Bloqueo de las principales vías de señalización que fosforilan a los posibles factores de transcripción pertenecientes a la familia ETS en células MDA.MB-231.** Análisis de la actividad mediante la transfección de la construcción reportera pGPR0.5 del promotor de *GPR30* en las células MDA-MB-231, con la adición de los inhibidores SB203580, H89 y PD98059, además de la adición de DMSO como vehículo.

## 9. DISCUSIÓN

Los estrógenos son importantes reguladores durante el crecimiento y diferenciación en la glándula mamaria, sin embargo, también participan en diversos mecanismos moleculares críticos para el desarrollo y la progresión del cáncer de mama (Gruvberger S. et al., 2001), esto último se ha vinculado a la transcripción de genes a través de los RE (Lappano et al., 2010). Aproximadamente dos terceras partes de todos los carcinomas de mama son ER positivos; sin embargo, aquellos carcinomas que no expresan dicho receptor manifiestan un grado de malignidad mayor, ya que estos tumores están conformados por células con un fenotipo invasivo y hormonalmente más independiente. Estudios clínicos han corroborado que las pacientes con tumores que expresan ER tienen un mayor grado de supervivencia, pero también generan resistencia a los tratamientos antiestrogénicos, como el tamoxifen e incluso responden a estos con una mayor proliferación celular (Osborne, 1998). En este contexto, varios autores han reportado la participación de GPR30, el cual es activado por antagonistas de los RE nucleares. Mientras que corriente abajo de la activación de GPR30 se dispara una vía de señalización que retroalimenta la actividad de los receptores para factores de crecimiento; considerados la base principal de los procesos de proliferación, supervivencia y metástasis de las células malignas derivadas del epitelio mamario con fenotipo ER negativas (Albanito et al., 2008, Albanito et al., 2007, Filardo, 2002).

Considerando el papel de GPR30 en los procesos carcinogénicos y la correlación existente del ER con la malignidad celular en tumores de la glándula mamaria, el estudio de las diferencias que puedan existir en los mecanismos de regulación transcripcional de *GPR30*, durante el desarrollo del cáncer de mama, puede aportar nuevos conocimientos que ayuden a comprender más profundamente la etiología de esta patología y en el diseño de tratamientos más específicos.

Para poder abordar la presente investigación, se decidió tomar como modelo de estudio tres líneas celulares derivadas de glándula mamaria. La línea celular MCF-10A que expresa el fenotipo de la célula epitelial sana; mientras que MCF-7 y MDA-MB-231, expresan fenotipos de la célula epitelial cancerosa, pero con diferentes grados de malignidad. Es importante mencionar que la agresividad del fenotipo de la línea celular MDA-MB-231, ha sido relacionado con la sobreexpresión de algunos receptores miembros de la familia de EGFR, los cuales a su vez han sido correlacionados con la proliferación, diferenciación y migración celular (Shaw et al., 2002, Albanito et al., 2008). Con el fin de confirmar y establecer estos fenotipos se decidió comprobar la expresión del ER mediante ensayos de inmunodetección y *RT-PCR*. Los resultados de estos ensayos, en donde solo las células MCF-7 expresaron al ER (Fig. 8.1.1 y 8.1.2), confirmaron la información reportada por otros autores (Albanito et al., 2008, Gruvberger S. et al., 2001, Shaw et al., 2002)

Una vez establecida la identidad de las líneas celulares se clonó un fragmento de 1987 pb de la región flanqueante 5' del gen de *GPR30*, a partir de células MCF-7. Dicho fragmento fue secuenciado y comparado con la secuencia del gen de *GPR30* mapeado en la banda 22.3 de brazo corto del cromosoma 7 humano registrado en el GenBank con número de acceso AC091729.4, sin que se encontraran cambios o alteraciones en la secuencia nucleotídica. Lo que significa, que las diferencias que se presentaron en la regulación transcripcional entre las líneas celulares en estudio, se explican solamente en función del contexto celular. Así los cinco plásmidos reporteros, gobernados por diferentes versiones truncadas del extremo 5' del promotor de *GPR30*, para evaluar la actividad transcripcional de cada construcción en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A mostraron que el patrón general de los cambios en la actividad transcripcional del promotor de *GPR30* resultó ser muy similar en las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231, sugiriendo que la regulación de la expresión transcripcional de *GPR30* en estas células podría estar controlada por mecanismos moleculares semejantes (Fig.

8.4.2). Por otro lado, a partir de los resultados en la actividad relativa de la luciferasa en MCF-7, es posible inferir que solamente participan factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de la actividad transcripcional basal del promotor de *GPR30*, ya que muy pocos puntos de regulación resultaron ser significativos en esta línea celular (Fig. 8.4.1). Es importante mencionar que la actividad promedio obtenida del promotor de *GPR30* en cada línea celular coincide con los datos obtenidos de la inmunodetección de la proteína. Con respecto a la polémica existente en relación a la expresión de *GPR30* en la línea MDA-MB-231, nuestro estudio confirma la expresión de dicho receptor en estas células, lo cual consideramos es un dato de gran valor debido al papel que desempeña *GPR30* en los tumores de mama RE negativos (Fig. 8.5.1)(Carmeci et al., 1997, Filardo, 2002, Filardo, 2000, Fraser et al., 2010).

De los puntos de regulación transcripcional encontrados, destaca por su relevancia el incremento obtenido en la actividad transcripcional con la construcción pGPR0.5 en las tres líneas celulares. Este incremento puede obedecer a la presencia de uno o varios elementos en *cis*, entre los -500 y -1000 pb del promotor en estudio, que participan en un mecanismo de regulación negativo. Tomando en cuenta la importancia que tiene *GPR30* en la inducción de proliferación y metástasis a través de la vía de señalización de receptores para factores de crecimiento, consideramos importante iniciar la caracterización estructural del promotor de *GPR30*, determinando el o los elementos responsables de este efecto represor encontrado para la transcripción de *GPR30*.

Dada la cantidad de posibles elementos que pudiera albergar la región de 500 pb entre la construcción pGPR0.5 y pGPR1.0, se realizó un análisis predictivo de los elementos en *cis* putativos de dicha región a través del programa bioinformático *Mat-Inspector* (Cuadro 8.4.1). La información obtenida de este análisis nos permitió seleccionar los elementos con mayor probabilidad de participación en el mecanismo de represión encontrado. Los criterios de inclusión

que se tomaron en cuenta fueron: la homología del elemento, la expresión durante el desarrollo del cáncer de mama del factor de transcripción que une y que dicho factor haya sido reportado como represor. Los factores ERR1, ETS, SOX5 y NGRE fueron los que cumplieron con todos los criterios, se mutaron sobre el *core* de su secuencia para comprobar su funcionalidad en las líneas celulares en estudio (Fig. 8.4.2). De las cuatro mutaciones, solo la generada en el elemento ETS tuvo un efecto en las células MDA-MB-231 que resulto no solo ser significativo, sino también inesperado y sumamente relevante, considerando que en lugar de obtener un aumento en la actividad transcripcional del promotor, como era de esperarse, la actividad transcripcional disminuyó hasta una tercera parte en comparación con la actividad transcripcional alcanzada por la construcción silvestre (Fig.8.6.2). Este resultado es de gran importancia ya que sugiere que el elemento ETS, no participa en el mecanismo de represión observado en los ensayos preliminares con las construcciones silvestres, sino que es el responsable de un mecanismo de activación relevante para el mantenimiento de la actividad basal del promotor. El hecho que este mecanismo se presente únicamente en las células MDA-MB-231, es una evidencia que indica la existencia de mecanismos célula específicos que influyen en el nivel de expresión final de GPR30 durante los diferentes estados de progresión del cáncer de mama.

El haber obtenido un efecto contrario en el evento de mutación del elemento ETS, debe explicarse en el contexto de que la secuencia nucleotídica de este elemento puede ser reconocida por todos los miembros de la familia de factores transcripción ETS. Así también, debe tomarse en cuenta que los factores miembros de esta familia reportados con una función predominantemente represora son la minoría. Estudios tanto clínicos como *in vitro* han reportado que la expresión de los factores activadores ETS-1, ETS-2, PEA3, ERM y ER81 presentan un notorio incremento durante el desarrollo del cáncer de mama (Galang et al., 2004, Maroulakou and & Bowe, 2000, Watson et al., 2010). Esto fue lo que nos indujo a comenzar la búsqueda del o los factores responsables de la transactivación del

promotor de *GPR30*, a través del elemento funcional ETS hallado entre -500 y -1000 pb de este promotor.

La función biológica de los factores de transcripción depende en gran medida de modificaciones post-traduccionales que regulan su capacidad de translocación nuclear, unión al ADN y/o de transactivación. En el caso de los factores ETS-1, ETS-2 y PEA3 se sabe que son blanco tanto de la vía de fosforilación de las ERKs como de la cinasa p38 (Janknecht, 2003, Liu et al., 2005, Svensson et al., 2005). Por otra parte, ERM y ER81 son factores que son fosforilados a través de la vía de PKA (Baert et al., 2002, Watson et al., 2010). Tomando en cuenta estos últimos antecedentes, se decidió utilizar los inhibidores de estas vías para dilucidar la vía de señalización asociada con la actividad del elemento ETS del promotor de *GPR30* y reducir el número de factores putativos que pudieran estar involucrados con la transactivación de dicho elemento. Según la disminución de casi el 50% de la actividad del promotor de *GPR30* obtenida con el bloqueo de H89 en MDA-MB231 (Fig. 8.7.1), es posible discernir que la vía de PKA es la que tiene mayor probabilidad de participar en la transactivación del promotor de *GPR30* a través del elemento ETS en estudio; ya que a pesar de que el inhibidor PD98059 genera también una disminución, esta es mucho menor y estadísticamente no significativa. Además el ensayo realizado con los mismos inhibidores y con la construcción pGPR0.5 en MDA-MB-231 (Fig. 8.7.2), corrobora que al menos un elemento localizado en la región entre los -500 y -1000 pb del promotor de *GPR30* participa en la disminución de la actividad inducida por la vía de PKA. Aun cuando estos últimos resultados no prueban directamente la asociación de la vía de PKA con el mecanismo de regulación positiva del elemento ETS en estudio, es importante mencionar que hasta el momento no hay informes de que la función de transactivación de los reguladores positivos predichos con *Mat-Inspector*, sea regulada a través de la vía de fosforilación de PKA.

De los cinco factores de transcripción de la familia de ETS que se sabe incrementan su expresión durante el desarrollo mamario, solamente ERM y ER81 son fosforilados a través de la vía de PKA (Galang et al., 2004, Baert et al., 2002, Wu and & Janknecht, 2002). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para demostrar la interacción física de estos dos factores con el elemento ETS funcional del promotor de GPR30; así como el impacto a nivel celular de este mecanismo de regulación en células de cáncer de mama ER negativas, principalmente.

## 10. CONCLUSIONES

- La línea celular de cáncer de mama ER<sup>-</sup> negativa, MDA-MB-231, si expresa GPR30.
- En forma global, la regulación transcripcional del promotor del gen *GPR30* humano, sigue un mismo patrón tanto en el contexto celular maligno como no maligno de la célula epitelial de la glándula mamaria.
- El elemento ETS ubicado entre -625 y -635 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen *GPR30* humano, participa en un mecanismo de inducción transcripcional específico del contexto celular ER<sup>-</sup> negativo de la línea celular MDA-MB-231.
- En la línea celular MDA-MB-231, el elemento ETS interacciona funcionalmente con un transfactor que es activado a través de la vía PKA; la cual es una de las vías de fosforilación principales para la activación de los factores ERM y ER81.
- El promotor de *GPR30* cuenta con elementos en *cis* que participan diferencialmente en la regulación transcripcional del gen, durante la malignización de las células epiteliales de la glándula mamaria.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- ALBANITO, L., MADEO, A., LAPPANO, R., VIVACQUA, A., RAGO, V., CARPINO, A., OPREA, T. I., PROSSNITZ, E. R., MUSTI, A. M., ANDO, S. & MAGGIOLINI, M. 2007. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 67, 1859-66.
- ALBANITO, L., SISI, D., AQUILA, S., BRUNELLI, E., VIVACQUA, A., MADEO, A. & MAGGIOLINI, M. 2008. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology*, 149, 3799-3808.
- ARIAZI, E. A., BRAILOIU, E., YERRUM, S., SHUPP, H. A., SLIFKER, M. J., CUNLIFFE, H. E. & JORDAN, V. C. 2010. The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer research*, 70, 1184-1194.
- BAERT, J. L., BEAUDOIN, C., COUTTE, L. & LAUNOIT, Y. 2002. ERM Transactivation Is Up-regulated by the Repression of DNA Binding after the PKA Phosphorylation of a Consensus Site at the Edge of the ETS Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 1002-1012.
- BAERT, J. L., MONTE, D., MUSGROVE, E. A., ALBAGLI, O., SUTHERLAND, R. L. & LAUNOIT, Y. D. 1997. Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *International journal of cancer*, 70, 590-597.
- BARROS, R. P. & GUSTAFSSON, J. A. 2011. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab*, 14, 289-99.
- BARTON, M. 2012. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids*, 77, 935-42.
- BONINI, J. A., ANDERSON, S. M. & STEINER, D. F. 1997. Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G protein-coupled receptor from rat lung. *Biochemical and biophysical research communications.*, 234, 190-193.
- BRADFORD, M. M. 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.
- BRUNSING, R. L. & PROSSNITZ, E. R. 2011. Induction of interleukin-10 in the T helper type 17 effector population by the G protein coupled estrogen receptor (GPER) agonist G-1. *Immunology*, 134, 93-106.
- CARMECI, C., THOMPSON, D. A., RING, H. Z., FRANCKE, U. & WEIGEL, R. J. 1997. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45, 607-617.
- DENNIS, M. K., FIELD, A. S., BURAI, R., RAMESH, C., PETRIE, W. K., BOLOGA, C. G., OPREA, T. I., YAMAGUCHI, Y., HAYASHI, S., SKLAR, L. A., HATHAWAY, H. J., ARTERBURN, J. B. & PROSSNITZ, E. R. 2011. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 358-66.
- EDWARDS, D. P. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*, 67, 335-76.
- FENG, Y. & GREGOR, P. 1997. Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochemical and biophysical research communications.*, 231, 651-654.
- FILARDO, E. J., QUINN, J. A., BLAND, K. I., & FRACKELTON, A. R. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular endocrinology*, 14, 1649-1660.
- FILARDO, E. J., QUINN, J. A., FRACKELTON, A. R., & BLAND, K. I. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology*, , 16, 70-84.

- FRASER, S. P., OZERLAT-GUNDUZ, I., ONKAL, R., DISS, J. K., LATCHMAN, D. S. & DJAMGOZ, M. 2010. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Role in adhesion. *Journal of cellular physiology*, 224, 527-539.
- FUNAKOSHI, T., YANAI, A., SHINODA, K., KAWANO, M. M. & MIZUKAMI, Y. 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 346, 904-910.
- GALANG, C. K., MULLER, W. J., FOOS, G., OSHIMA, R. G. & HAUSER, C. A. 2004. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 11281-11292.
- GINGERICH, S., KIM, G. L., CHALMERS, J. A., KOLETAR, M. M., WANG, X., WANG, Y. & BELSHAM, D. D. 2010. Estrogen receptor alpha and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience*, 170, 54-66.
- GRUVBERGER S., RINGNÉR M., Y., C., S., P., H., S. L., BORG, Å. & MELTZER, P. S. 2001. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer research*, 61, 5979-5984.
- HAAS, E., BHATTACHARYA, I., BRAILOIU, E., DAMJANOVIC, M., BRAILOIU, G. C., GAO, X., MUELLER-GUERRE, L., MARJON, N. A., GUT, A., MINOTTI, R., MEYER, M. R., AMANN, K., AMMANN, E., PEREZ-DOMINGUEZ, A., GENONI, M., CLEGG, D. J., DUN, N. J., RESTA, T. C., PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2009. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res*, 104, 288-91.
- HAMMOND, R. & GIBBS, R. B. 2011. GPR30 is positioned to mediate estrogen effects on basal forebrain cholinergic neurons and cognitive performance. *Brain Res*, 1379, 53-60.
- HAMMOND, R., NELSON, D. & GIBBS, R. B. 2011. GPR30 co-localizes with cholinergic neurons in the basal forebrain and enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 182-192.
- JANKNECHT, R. 2003. Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1). *Oncogene*, 22, 746-755.
- KRUGER, N. J. 2009. The Bradford method for protein quantitation. *In The protein protocols handbook*, 17-24.
- KUO, W. H., CHANG, L. Y., LIU, D. L. Y., HWA, H. L., LIN, J. J., LEE, P. H. & HSIEH, F. J. 2007. The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 42, 135-145.
- LANGER, G., BADER, B., MEOLI, L., ISENSEE, J., DELBECK, M., NOPPINGER, P. R. & OTTO, C. 2010. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*, 75, 603-10.
- LAPPANO, R., ROSANO, C., DE MARCO, P., DE FRANCESCO, E. M., PEZZI, V. & MAGGIOLINI, M. 2010. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 320, 162-70.
- LIU, Q., LI, J. G., ZHENG, X. Y., JIN, F. & DONG, H. T. 2009. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. *Chinese Medical Journal (English Edition)*, 122, 2763-2769.
- LIU, S., LIANG, Y., HUANG, H., WANG, L., LI, Y., LI, J. & WANG, H. 2005. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-1 stimulated glomerular podocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 16, 207-216.
- MAGGIOLINI, M. & PICARD, D. 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*, 204, 105-14.
- MAROULAKOU, I. G. & BOWE, D. B. 2000. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene*, 19(55), 19, 6432-6442.
- MEYER, M. R., PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2011. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol*, 55, 17-25.

- OLDE, B. & LEEB-LUNDBERG, L. M. 2009. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 409-16.
- OSBORNE, C. K. 1998. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast cancer research and treatment*, 51, 227-238.
- OSOSKI, A. L. & KENNELLY, E. J. 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res*, 17, 845-69.
- OTTO, C., ROHDE-SCHULZ, B., SCHWARZ, G., FUCHS, I., KLEWER, M., BRITTAIN, D. & FRITZEMEIER, K. H. 2008. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*, 149, 4846-4856.
- PROSSNITZ, E. R., ARTERBURN, J. B. & SKLAR, L. A. 2007. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266, 138-142.
- PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2009. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89, 89-97.
- PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 715-26.
- PROSSNITZ, E. R., SKLAR, L. A., OPREA, T. I. & ARTERBURN, J. B. 2008. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 116-23.
- RECCHIA, A. G., DE FRANCESCO, E. M., VIVACQUA, A., SISI, D., PANNO, M. L., ANDO, S. & MAGGIOLINI, M. 2011. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 286, 10773-82.
- REVANKAR, C. M., CIMINO, D. F., SKLAR, L. A., ARTERBURN, J. B. & PROSSNITZ, E. R. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307, 1625-1630.
- SHAW, J. A., UDOKANG, K., MOSQUERA, J. M., CHAUHAN, H., JONES, J. L. & WALKER, R. A. 2002. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *The Journal of pathology*, 198, 450-457.
- SHENG, Z. G., HUANG, W., LIU, Y. X. & ZHU, B. Z. 2013. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 267, 88-94.
- SVENSSON, S., JIRSTRÖM, K., RYDÉN, L., ROOS, G., EMDIN, S., OSTROWSKI, M. C. & LANDBERG, G. 2005. ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. *Oncogene*, 24, 4370-4379.
- VIVACQUA, A., LAPPANO, R., DE MARCO, P., SISI, D., AQUILA, S., DE AMICIS, F. & MAGGIOLINI, M. 2009. G Protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF in estrogen receptor -positive cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 23, 1815-1826.
- WANG, D., HU, L., ZHANG, G., ZHANG, L. & CHEN, C. 2010. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine*, 38, 29-37.
- WATSON, D. K., TURNER, D. P., SCHEIBER, M. N., FINDLAY, V. J. & WATSON, P. M. 2010. ETS Transcription Factor Expression and Conversion During Prostate and Breast Cancer Progression. *Open Cancer Journal*, 3, 24-39.
- WU, J. & JANKNECHT, R. 2002. Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 42669-42679.