



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

**“Caracterización funcional de los elementos de
respuesta al calcitriol en el promotor del oncogén
humano éter à go-gó”**

T E S I S

que para optar por el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. Verna Cázares Ordoñez

Director de tesis:

Dr. Euclides Avila Chávez
Programa en Ciencias Biomédicas

Ciudad Universitaria enero de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Director de tesis:

Dr. Euclides Avila Chávez

Comité tutorial:

Dr. Ángel Zarain Herzberg

Dr. Félix Recillas Targa

Jurado de examen de grado:

Dr. Froylán Gómez Lagunas (Presidente)

Dr. Euclides Avila Chávez (Secretario)

Dr. León Islas Suárez (Vocal)

Dr. Javier Camacho Arroyo (Vocal)

Dr. Luis Beltrán Parrazal (Vocal)

El trabajo experimental se realizó en el Departamento de Biología de la
Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
“Salvador Zubirán”.

Agradecimientos

Al Dr. **Fernando Larrea Gallo** jefe del departamento de Biología de la Reproducción por interesarse en mi trabajo de tesis, por su disposición para analizar los resultados del proyecto y por el apoyo brindado durante mi estancia en el departamento.

A mi tutor el Dr. **Euclides Avila Chávez** por su dirección y ayuda en el trabajo experimental así como por el interés mostrado para que yo desarrollara el pensamiento crítico que fortaleció mi desempeño académico.

A la Dra. **Lorenza Díaz Nieto** por su ayuda en el diseño y realización de experimentos y su soporte en la interpretación de los resultados.

Al Dr. **Víctor Ortiz** y a la M en C. **María Luisa Ordóñez Sánchez** por los tips y la enseñanza metodológica aplicada en el proyecto así como por prestarme el equipo para realizar los experimentos.

A mi comité tutorial integrado por los doctores **Félix Recillas Targa** y **Ángel Zarain Herzberg** de quienes recibí orientación y ayuda para resolver los problemas metodológicos que surgieron en el desarrollo de la tesis.

A la contribución de mi jurado de examen formado por los doctores **Froylán Gómez Lagunas, León Islas Suárez, Javier Camacho Arroyo** y **Luis Beltrán Parrazal** para enriquecer la información, el análisis y los argumentos planteados en el escrito de tesis.

A todos los miembros del **Departamento de Biología de la Reproducción** por crear en el laboratorio una atmósfera fraternal que impulsa la labor del día a día.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, en particular al **Posgrado en Ciencias Biomédicas**, al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM)** y al **Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes** de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGP- UNAM) por su compromiso para sentar en mi las bases de una formación de pensamiento crítico y competitivo.

Al Laboratorio de Bioquímica del **Dr. Makoto Makishima** de la escuela de Medicina de la Universidad de Nihon, Tokio, por recibirme en su laboratorio y enseñarme metodologías que me permitieron concluir el trabajo experimental del proyecto.

Al CONACyT por la beca No. 207284

Índice

1. Resumen	9
2. Abstract	10
3. Introducción	11
3.1 Canales EAG.....	12
3.2 Vitamina D.....	15
3.2.1 Efectos antiproliferativos y prodiferenciantes.....	18
3.2.2 Efectos sobre la apoptosis.....	19
3.2.3 Efectos en la angiogénesis	19
4. Antecedentes	21
5. Hipótesis	23
6. Objetivo general	23
7. Objetivos específicos	23
8. Materiales y métodos	24
8.1 Reactivos.....	24
8.2 Ensayos de inmunofluorescencia	24
8.3 Análisis <i>in silico</i>	25
8.4 Cultivo celular.....	25
8.6 Extracción de DNA genómico.....	26
8.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
8.8 Secuenciación.....	27
8.9 Clonación molecular.....	28
8.10 Mutagénesis sitio dirigida	29
8.11 Ensayos de transactivación.....	29
8.12 Extracción de RNA total	30
8.13 Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	30
8.14 PCR en tiempo real (qPCR).....	31
8.15 Inmunodetección	31
8.16 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	32
8.17 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	33
8.18 Análisis estadístico.....	34
9. Resultados	35
9.1 El calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1.....	35
9.2 El calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1 a nivel de la transcripción	36
9.3 El promotor del oncogén hEAG1 contiene elementos de respuesta negativos al calcitriol. 38	
9.4 Expresión de los factores transcripcionales VDR y VDIR en las líneas celulares de cáncer cervical SiHa y C33A.....	38
9.5 El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 a través de un mecanismo dependiente del VDR.....	42
9.6 El promotor proximal del oncogén hEAG1 responde al calcitriol inhibiendo su actividad transcripcional	43
9.7 El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 vía un elemento regulador cis del tipo caja E.....	46
9.8 El factor transcripcional VDIR se une al elemento de respuesta -771 / -777.....	47

9.9 Los factores transcripcionales VDR, RXR, VDIR y WSTF participan en el mecanismo molecular que utiliza el calcitriol para inhibir la expresión del oncogén hEAG1 48

10. Discusión 53

11. Conclusión 59

12. Bibliografía 60

13. Apéndice 69

1. Resumen

El canal iónico de potasio *éter à go-gó 1* (hEAG1) promueve el crecimiento tumoral. En nuestro grupo se observó por primera vez que el calcitriol inhibe la expresión génica de hEAG1 en diferentes líneas celulares de cáncer. En este trabajo mostramos mediante ensayos de transactivación que el promotor del gen hEAG1 contiene un elemento regulador cis negativo para el calcitriol. La identidad de este elemento regulador cis corresponde a una caja E la cual se identificó *in vitro* por ensayos de movilidad electroforética. Las proteínas que interaccionan con la caja E se identificaron *in vivo* mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. En ausencia de calcitriol un complejo multiproteico formado por el receptor de la vitamina D, el receptor X a retinoides, el factor de transcripción del síndrome de Williams y el represor de interacción a la vitamina D se encuentran unidos a la caja E mientras que, en presencia de calcitriol sólo el represor de interacción a la vitamina D se encuentra unido. Este trabajo presenta evidencia del mecanismo molecular por el cual el calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1.

2. Abstract

The human ether à go-gó 1 potassium channel (hEAG1) is required for cell cycle progression and proliferation of cancer cells. Inhibitors of hEAG1 activity and expression represent potential therapeutic drugs in cancer. Previously, we have shown that hEAG1 expression is downregulated by calcitriol in a variety of cancer cells. Herein, we provided evidence on the regulatory mechanism involved in such repressive effect in cells derived from human cervical cancer. Our results indicate that repression by calcitriol occurs at the transcriptional level and involves a functional negative vitamin D response element (nVDRE) E-box type in the hEAG1 promoter. The described mechanism in this work implicates that a protein complex formed by the vitamin D receptor-interacting repressor, the vitamin D receptor, the retinoid X receptor and the Williams syndrome transcription factor interact with the nVDRE in the hEAG1 promoter in the absence of ligand. Interestingly, all of these transcription factors except the vitamin D receptor-interacting repressor are displaced from hEAG1 promoter in the presence of calcitriol. Our results provide novel mechanistic insights into calcitriol mode of action in repressing hEAG1 gene expression.

3. Introducción

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana, que organizadas forman un poro por donde se desplazan iones a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos se han clasificado de manera general de acuerdo al tipo de ión que dejan pasar en: canales iónicos de sodio (Na^+), de potasio (K^+), de calcio (Ca^{2+}) y de cloruro (Cl^-). El movimiento de éstos iones al interior o al exterior celular define procesos fisiológicos como el potencial de membrana y el volumen celular, eventos implicados en la activación de respuestas celulares relacionadas con aspectos de la biología molecular del cáncer como son la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Deutsch C y Chen LQ 1993; Wonderlin W y Strobl JS 1996; Cahalan M y Chandy KG 1997). En las células de cáncer el potencial de membrana se encuentra alterado como consecuencia de la desregulación de la expresión o de la actividad de los canales iónicos. El concepto de que los canales iónicos están implicados en el proceso del crecimiento anormal de las células de cáncer surgió al observar *in vitro* que bloqueadores de canales de K^+ y Ca^{2+} inhibían la proliferación y la apoptosis celular (DeCoursey T et al, 1984; Fraser S y Pardo L 2008).

Uno de los canales iónicos de K^+ más estudiado por su contribución en la proliferación celular es el éter à go-gó (EAG). Los canales iónicos EAG se identificaron en una mutante de *Drosophila melanogaster* (Warmke J et al, 1991). Las mutantes mostraban un defecto en un tipo de canal de potasio cuyo fenotipo implicaba el temblor de las extremidades de la mosca, efecto parecido al provocado cuando las moscas eran anestesiadas con éter, razón por la cual, el canal iónico se llamó *éter à go-go* (Warmke J et al, 1991).

3.1 Canales EAG

Los canales EAG al igual que otros miembros de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) son tetrámeros formados de 4 subunidades α y que juntos forman un poro central (figura 1). Cada subunidad α consta de 6 segmentos transmembranales. El segmento 4 es rico en aminoácidos con carga positiva y actúa como sensor de voltaje. Entre el segmento 5 y 6 se encuentra la pared del poro del canal por donde pasan los iones K^+ . En el extremo amino de la subunidad α se encuentra el dominio eag, que está formado por un dominio Per-Arnt-Sim (PAS) considerado un sensor de oxígeno y un dominio PAS-cap (Haitin Y et al, 2013). Los extremos amino y carboxilo contienen sitios de unión a calmodulina. El extremo carboxilo contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (Bauer CK y Schwarz JR 2001).

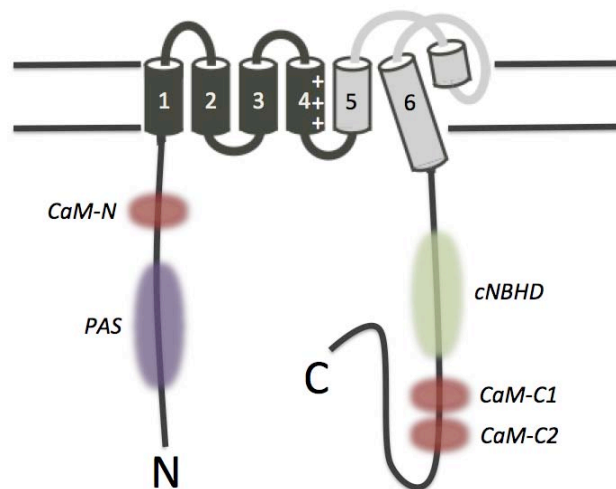


Figura 1. Estructura de una subunidad α del canal iónico EAG. La subunidad α está formada de 6 segmentos transmembranales (S1-S6). Entre el segmento S5 y S6 se encuentra el poro del canal. El segmento S4 actúa como sensor de voltaje. Los extremos amino y carboxilo se ubican en el citoplasma.

El genoma humano codifica para 2 formas de canales iónicos EAG. El canal hEAG1, codificado por un gen de copia única localizado en el cromosoma 1 y el canal hEAG2 codificado por un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 14. Ambos genes codifican para canales Kv en sistemas de expresión heteróloga y cada uno de ellos presenta propiedades electrofisiológicas que permiten distinguirlos (Bauer CK y Schwarz 2001; Schönherr R et al, 2002). Tanto hEAG1 como hEAG2 se expresan en el sistema nervioso central sin embargo, su papel neurofisiológico no es claro pues ratones knockout del canal EAG no presentan un fenotipo diferente al ratón que sí lo expresa (Ufartes R 2013). Además del SNC el canal hEAG1 también se ha encontrado en la placenta y durante la diferenciación del mioblasto (Occhiodoro T et al, 1998; Ju M y Wray D 2002; Camacho J 2006; Diaz L et al, 2009).

El primer trabajo en reportar un vínculo entre el canal hEAG1 y el cáncer fue el publicado por Roman Meyer y Stefan Heinemann en 1998, quienes trabajando con células humanas de neuroblastoma identificaron corrientes de K^+ con características biofísicas similares a las reportadas en canales EAG de rata, además Meyer y Heinemann también observaron que la expresión de los canales hEAG1 en las células de neuroblastoma se relaciona al ciclo celular, pues cuando las células se encuentran en la fase G0/1 la amplitud de la corriente de hEAG1 disminuye un 95% respecto al control (Meyer R y Heinemann SH 1998). Posteriormente se observó que el canal hEAG1 se encontraba expresado en diferentes líneas celulares de cáncer humano y que la sobreexpresión de hEAG1 en células CHO induce un fenotipo con características de células tumorales (Pardo L et al, 1999). Además, la disminución del transcrito de hEAG1 mediante el uso de RNA de interferencia, así como la inhibición de la actividad del canal mediante el uso de anticuerpos reduce la tasa de

proliferación celular y la progresión tumoral *in vitro e in vivo* (Weber C et al, 2006; Gómez-Varela D et al, 2007; Díaz L et al, 2009). Estos datos y las observaciones de Roman Meyer sugirieron una participación directa de los canales hEAG1 en la proliferación celular y llevaron a proponer al gen que codifica a hEAG1 (KCNH1) como un oncogén (Pardo et al, 1999).

El mecanismo por el cual los canales hEAG1 promueven el desarrollo y progresión del cáncer aún no es claro, pues por un lado, se sabe que en líneas celulares de leucemia mieloide aguda el bloqueo de la corriente de K^+ contribuye a la disminución del crecimiento de tumores (Agarwal JR, et al 2010); sin embargo, también se ha observado que una mutante de los canales hEAG1 que no permite el flujo de K^+ sigue contribuyendo a la progresión tumoral (Downie BR et al, 2008). En este sentido, se ha observado que su dominio amino terminal interacciona con la proteína cinasa p38 activando una cascada de eventos celulares que promueven la proliferación celular (Hegle AP et al, 2006).

En la actualidad existe gran interés en investigar los mecanismos que regulan la actividad y expresión del canal hEAG1 tanto en células normales como en células tumorales. Al respecto se ha descrito que el IGF-1 (Borowiec AS et al, 2007), el estradiol, las proteínas oncogénicas E6 y E7 de los papilomavirus de alto riesgo (Díaz L et al, 2009) y el factor de transcripción E2F1 (Lin H et al, 2011) incrementan la expresión del oncogén hEAG1, mientras que el miRNA-34a inhibe su síntesis (Lin H et al, 2011). Por otro lado, algunos bloqueadores no selectivos de canales de K^+ como la imipramina (Gavrilova-Ruch O et al, 2002) y el astemizol (García-Ferreiro RE et al, 2004), así como el calcio intracelular a través de la calmodulina (Schönherr R et al, 2000) inhiben las corrientes de K^+ mediadas por el canal hEAG1. Adicionalmente nuestro grupo ha descrito que el calcitriol, la forma

hormonal de la vitamina D inhibe la expresión génica de hEAG1 (Avila E et al, 2010, García-Becerra R et al, 2010, García-Quíroz J et al, 2012, García-Quíroz J et al, 2014).

3.2 Vitamina D

La vitamina D es una pro-hormona importante en el mantenimiento de órganos y sistemas. Su mayor actividad biológica es la regulación de los niveles de calcio y fósforo en sangre, promoviendo la absorción intestinal de los mismos a partir de los alimentos y la reabsorción de calcio a nivel renal, lo que contribuye a la formación y mineralización ósea y su deficiencia está relacionada con la osteoporosis y el raquitismo (Holick MF 1996).

Para llevar a cabo sus acciones biológicas, la vitamina D₃ requiere de su biotransformación a hormona: el calcitriol (figura 2). El proceso comienza cuando el 7-dehidrocolesterol presente en la piel es transformado por exposición a la luz solar (radiación UVB) a pre-vitamina D₃ y que por efecto de la temperatura corporal conlleva a una isomerización para finalmente originarse la vitamina D₃. La vitamina D₃ es hidroxilada enzimáticamente en el hígado para formar 25-hidroxivitamina D₃ (25OHD₃), el metabolito de la vitamina D₃ más abundante en la circulación (10 – 50 ng/mL). En el riñón la 25OHD₃ es nuevamente hidroxilada por la 25OHD₃ 1 α -hidroxilasa (CYP27B1) formándose finalmente la forma activa la 1,25 dihidroxivitamina D₃ o calcitriol, el cual circula en la sangre en concentraciones de 15 a 60 pg/mL (Lips P 2006).

Los estudios sobre el papel del calcitriol en la biología celular han mostrado que la vía principal a través de la cual actúa esta hormona está dada por su unión a un receptor específico (VDR) regulando la expresión génica. El VDR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares a hormonas esteroideas que regula la expresión génica a través de la

unión a su ligando (Deeb KK et al, 2007). El calcitriol es transportado en la sangre por la proteína de unión a la vitamina D (VDBP). Para actuar sobre su célula blanco el calcitriol atraviesa la membrana por difusión y una vez en el citoplasma se asocia con su receptor el VDR, esta unión da lugar a la disociación de las proteínas de choque térmico del VDR permitiéndose la translocación al núcleo mediante transporte activo (Deeb KK et al, 2007). En el núcleo el VDR unido al calcitriol forma heterodímeros con el receptor X de retinoides (RXR), dichos dímeros reconocen sitios específicos en el DNA que se han denominado como elementos de respuesta a vitamina D (VDREs). Los VDREs pueden localizarse en la región promotora, la región enhancer o en los intrones de los genes blanco del calcitriol (Cristobo I et al, 2011). Los VDREs se componen de la secuencia AGTTCA repetida y separada por 3 o 4 nucleótidos (AGTTCANNAGTTCA o AGTTCANNNNAGTTCA), VDREs tipo DR3 o DR4 respectivamente (Deeb KK et al, 2007). Ejemplos de genes con VDREs y activados transcripcionalmente por el calcitriol son: CYP24A1, que codifica para la enzima 24-hidroxilasa que degrada al calcitriol; BGLAP, que codifica para la osteocalcina expresada en osteoblastos del hueso y CDKN1A, que codifica para p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (Deeb KK et al, 2007).

El otro efecto genómico que tiene el calcitriol es la inhibición transcripcional de genes, para el cual existen dos mecanismos propuestos. El primero, se ha descrito para los genes de la 1α -hidroxilasa, la hormona paratiroidea, la 21-hidroxilasa y la aromatasa (Kato S et al, 2007; Kim MS et al, 2007; Lundqvist J et al, 2012; Lundqvist et al, 2013). Las regiones promotoras de estos genes no presentan los VDREs del tipo DR3 o DR4, en su lugar se encuentran VDREs negativos formados por una secuencia hexamérica llamada caja E (CANNTG) (Kim MS et al, 2007). Estas secuencias funcionan como el sitio de anclaje de un modulador transcripcional conocido como represor de interacción con la vitamina D

(VDIR). El factor transcripcional VDIR pertenece a la familia de proteínas hélice-bucle-hélice (bHLH) y su gen expresa dos isoformas: la isoforma E12 y la isoforma E47 (Kee BL 2009). El complejo calcitriol:VDR:RXR se asocia a proteínas como VDIR y el factor de transcripción del Síndrome de Wiliams (WSTF) (Lundqvist J et al, 2012; Lundqvist et al, 2013). La interacción del calcitriol:VDR:RXR, VDIR y WSTF lleva al reclutamiento de proteínas correpresoras que inhiben la transcripción (figura 3). El segundo mecanismo de inhibición transcripcional del calcitriol es más común y se ha descrito en varios genes cuyas funciones son independientes al control del metabolismo del calcio o el fósforo, en estos casos, el calcitriol unido al VDR interfiere con la función de otros factores de transcripción que activan la transcripción (Kato S et al, 2007).

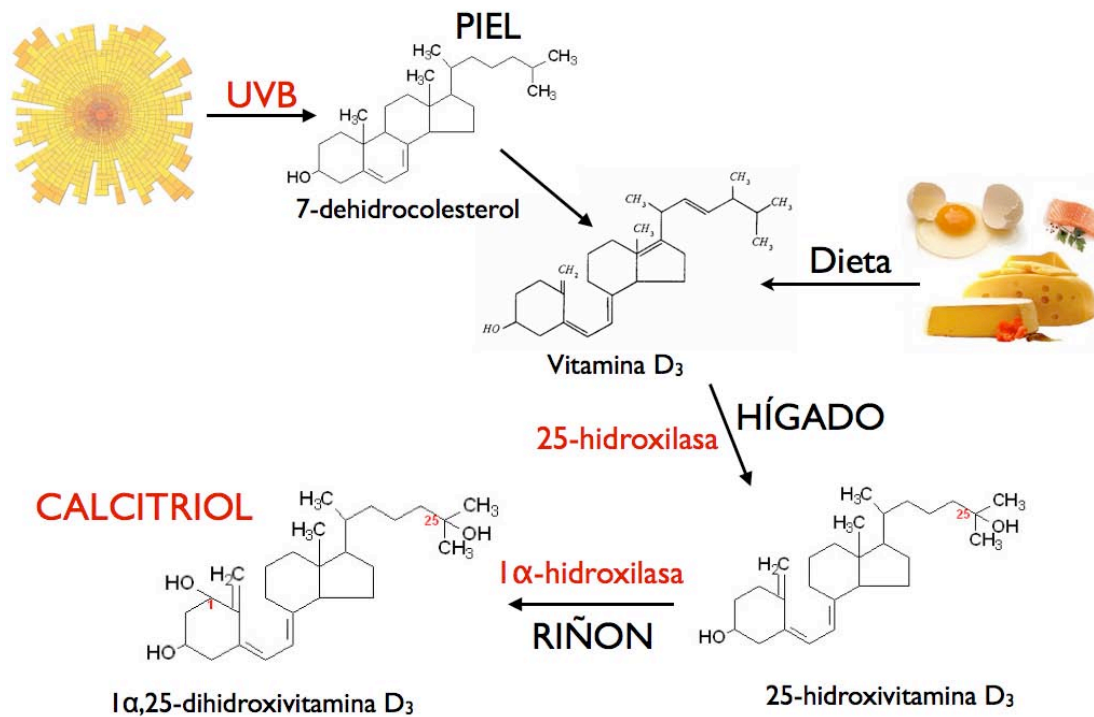


Figura 2. Síntesis del calcitriol. La síntesis de calcitriol se inicia con la reacción de conversión del 7-dehidrocolesterol a vitamina D₃ por acción de los rayos UVB solares en la piel. En el hígado se capta la vitamina D₃ procedente de la piel y también la procedente de la dieta, donde se transforma por acción de la enzima 25-hidroxilasa a 25-hidroxivitamina D₃. Esta forma monohidroxilada en el riñón es nuevamente hidroxilada por la enzima 1α-hidroxilasa para formar 1α,25-dihidroxivitamina D₃ o calcitriol.

Actualmente se estima que un tercio de la población mundial tiene deficiencia de vitamina D que puede ocurrir cuando la ingesta diaria es menor de los niveles recomendados (400 - 800 UI), el riñón no puede transformar la vitamina D en su forma activa o bien, no se puede absorber adecuadamente a nivel del tracto digestivo (Heaney RP y Garmas LA 2014). La deficiencia de vitamina D puede tener consecuencias graves en la salud tanto de niños como de adultos. Por ejemplo se ha documentado la asociación entre la deficiencia de vitamina D y el riesgo de padecer cáncer (Garland CF et al, 2006). Diferentes estudios epidemiológicos han mostrado correlación entre el bajo nivel sérico de 25OHD₃ y un riesgo incrementado para cáncer colorectal, de glándula mamaria y de próstata (Deeb KK et al, 2007). Estudios realizados con ratones Vdr^{-/-} mostraron hiperproliferación y un incremento en la actividad mitótica del colon descendente de los ratones, sugiriendo que el calcitriol regula vías de señalización celular asociadas a la supresión de tumores (Kallay E et al, 2001).

Durante los últimos 25 años una gran cantidad de estudios se han realizado para investigar cómo el calcitriol participa en mecanismos relacionados con la regulación de procesos celulares como son la proliferación, la angiogénesis y la apoptosis. A continuación se describen algunos de los mecanismos descritos.

3.2.1 Efectos antiproliferativos y prodiferenciantes

Si bien la evidencia experimental plantea que el tratamiento con calcitriol genera un efecto de inhibición sobre la progresión del ciclo celular en células tumorales, las bases moleculares que describen dicho efecto difieren de un tipo de células tumorales a otro. Por ejemplo: la activación transcripcional del gen de inhibidor de la cinasa dependiente de

ciclina 1A (CDKN1A) mediada por el calcitriol unido al VDR, induce diferenciación y arresto del ciclo celular en células mielomonocíticas humanas U937 (Deeb KK et al, 2007). Por otro lado, en células MCF7 de cáncer de mama el calcitriol incrementa la expresión de CDKN1A y CDKN1B (el cual codifica para p27, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas) y reprime la expresión de varias ciclinas (D1, D3, A1 y E1) y por lo tanto conduce a la inhibición de la actividad de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y a la hipofosforilación de pRb (Deeb KK et al, 2007). En general, el calcitriol inhibe la proliferación de las células cancerosas al inducir el arresto del ciclo celular y favorecer la acumulación de células en la fase G0/G1 del ciclo celular (Mocellin S 2011).

3.2.2 Efectos sobre la apoptosis

En adición a los efectos del calcitriol sobre la inhibición de la proliferación de células tumorales, se cuenta con evidencia de que esta hormona también actúa regulando a elementos cruciales del proceso apoptótico, reprimiendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas (como BCL2 y BCL-XL) o induciendo la expresión de proteínas pro-apoptóticas (como BAX, BAK y BAD) (Trump DL et al, 2010).

3.2.3 Efectos en la angiogénesis

Sobre este proceso celular se sabe que el calcitriol puede inhibir la proliferación de células endoteliales *in vitro* y reducir la angiogénesis *in vivo* (Deeb KK et al, 2007). Por ejemplo: se tienen reportes de que la formación de tubos celulares endoteliales inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el crecimiento tumoral son inhibidos *in*

in vivo por la administración de calcitriol en ratones con xenógrafos de MCF7 que sobreexpresan VEGF (Mantell DJ et al, 2000).

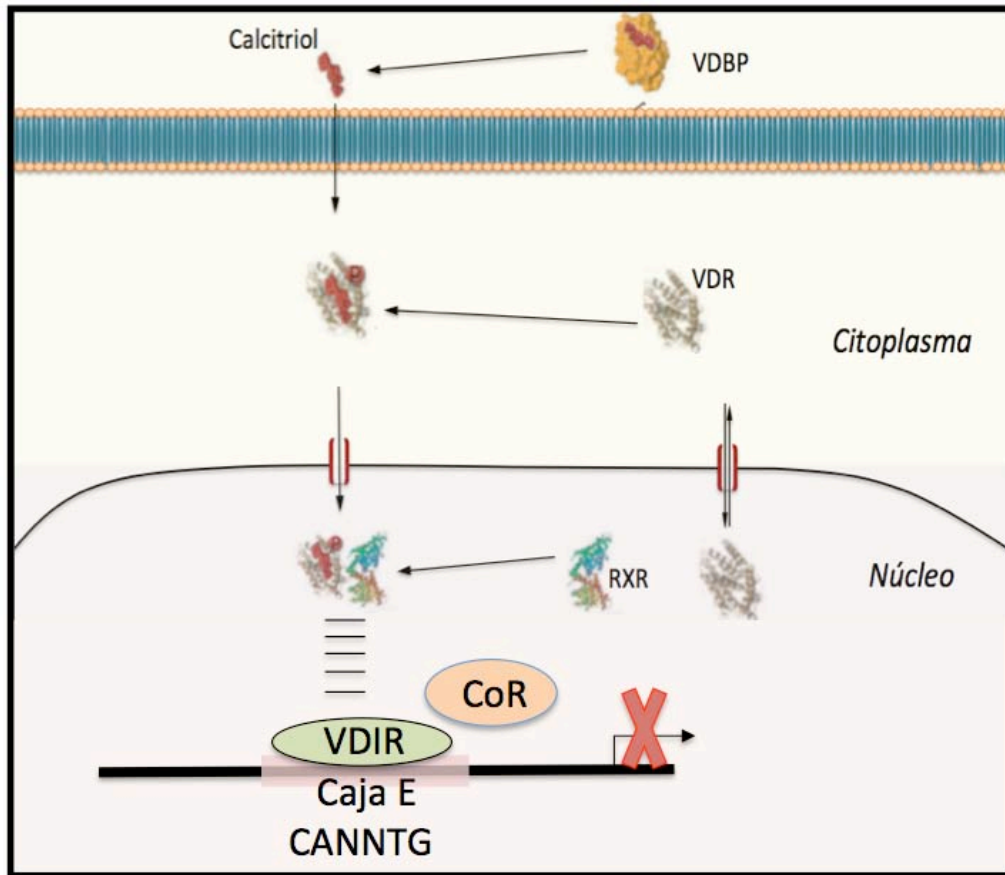


Figura 3. Mecanismo de acción del calcitriol para inhibir la expresión de algunos genes blanco. El calcitriol es transportado en la sangre por la proteína de unión a vitamina D (VDBP). En la célula el VDR unido al calcitriol se mueve del citoplasma al núcleo celular donde forma un heterodímero con el RXR. En el núcleo el heterodímero VDR/RXR se asocia con el factor transcripcional VDIR el cual está unido a elementos reguladores cis del tipo caja E. La asociación del VDR/RXR al VDIR permite el ensamblaje de proteínas correpressoras (CoR) para inhibir la expresión génica.

4. Antecedentes

En nuestro laboratorio se reportó por primera vez que el calcitriol inhibe la expresión génica del oncogén hEAG1. Estas observaciones tuvieron su origen en sincitiotrofoblastos y citotrofoblastos placentarios (Avila E et al, 2010). Posteriormente, considerando las propiedades oncogénicas del canal iónico hEAG1, se evaluó su expresión génica en cultivos primarios de tejido tumoral y en líneas celulares humanas obtenidas de cérvix, tejido mamario y próstata mostrando que el oncogén hEAG1 es un blanco molecular del calcitriol (Avila E et al, 2010, García-Becerra RA et al, 2010, García-Quiroz J et al, 2012). Los efectos del calcitriol sobre la magnitud en la inhibición transcripcional del oncogén hEAG1 depende del tipo celular y de la concentración de calcitriol utilizada (Avila E et al, 2010, García-Becerra RA et al, 2010). Por otro lado, el cotratamiento de un antagonista del receptor de la vitamina D y calcitriol en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cervical bloquea el efecto del calcitriol sobre la inhibición transcripcional del oncogén hEAG1, sugiriendo que el calcitriol regula la expresión del oncogén hEAG1 mediante un mecanismo molecular que requiere de la participación del VDR (Avila E et al, 2010, García-Becerra RA et al, 2010). Además estos estudios mostraron también que en diferentes líneas celulares de cáncer el calcitriol afecta la viabilidad celular (Avila E et al, 2010, García-Becerra RA et al, 2010, García-Quiroz J et al, 2012). Por otro lado, estudios *in vivo* en ratones también han mostrado que el calcitriol tiene efecto sobre la inhibición de la expresión del oncogén hEAG1. Células humanas de cáncer de mama xenoinjertadas en ratones atímicos que recibieron un tratamiento con calcitriol mostraron inhibición en la expresión del oncogén hEAG1 así como una reducción en el tamaño del tumor (García-Quiroz J et al, 2014). Estas observaciones sugieren que la inhibición de la expresión de

hEAG1 dada por el calcitriol contribuye a los efectos antiproliferativos de esta hormona.

La regulación génica del oncogén hEAG1 ha sido poco explorada. En 2011 Lin H et al, reportaron la región 5' UTR correspondiente al promotor proximal así como la ubicación del sitio de inicio de la transcripción del oncogén hEAG1. De sus estudios sabemos que el promotor de hEAG1 contiene un elemento de respuesta funcional al factor transcripcional E2F el cual promueve la replicación del DNA requerido para la activación del ciclo celular. En las células de cáncer la proteína E2F es abundante lo que favorece la constante entrada de las células a la fase S del ciclo celular y como consecuencia la proliferación se mantiene activa (Hallstrom TC et al, 2008). Esta vía explica el mecanismo por el cual porque el canal iónico hEAG1 se encuentra expresado en las células de cáncer sin embargo, la información continua siendo limitada, nada se sabe sobre otros factores transcripcionales que regulen la expresión del gen hEAG1. Esta tesis aporta información sobre el mecanismo de otro factor transcripcional que regula la expresión de hEAG1.

5. Hipótesis

La región promotora del gen hEAG1 contiene secuencias específicas responsables de la represión transcripcional ejercida por el calcitriol.

6. Objetivo general

Estudiar el mecanismo molecular que utiliza el calcitriol para inhibir la transcripción del oncogén hEAG1.

7. Objetivos específicos

- 1) Obtener la secuencia de la región promotora del gen hEAG1 que contenga los posibles elementos de respuesta al calcitriol.
- 2) Identificar y caracterizar funcionalmente mediante análisis de interacción DNA-proteína, los posibles VDREs negativos presentes en la región promotora del gen hEAG1.

8. Materiales y métodos

8.1 Reactivos

- Calcitriol, donado por Hoffmann-La Roche Ltd (Suiza). El calcitriol se disolvió en 0.1 % de etanol. Considerando que el porcentaje de etanol utilizado no tiene efecto sobre la expresión génica, utilizamos 0.1 % de etanol como control de los experimentos.
- Anticuerpos para las proteínas VDR (sc-13133), RXR (sc-774), VDIR (sc-4083) y WSTF (sc-81426) de Santa Cruz Biotechnology (E.E.U.U); gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) Millipore (E.E.U.U). hEAG1 Jackson ImmunoResearch Laboratories (E.E.U.U).

8.2 Ensayos de inmunofluorescencia

Para evaluar la expresión de la proteína de hEAG1 se sembraron 5×10^5 células SiHa en cámaras de dos pozos. Las células se trataron con calcitriol $1 \mu\text{M}$ o con etanol como control durante 24 horas. Las células se lavaron con PBS y se fijaron y permeabilizaron con acetona a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Las células se bloquearon con BSA al 1 % por 1 hora. Las células se incubaron con anti-hEAG1 (1:300) en BSA al 1 % a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche. El anticuerpo anti-hEAG1 se detectó con una inmunoglobulina anti-conejo marcada con Cy3 (1:250) por 2 horas. La visualización de las células se hizo con 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las células fueron fotografiadas con un microscopio de fluorescencia convencional. Para cada campo se adquirieron dos colores Cy3 y DAPI. Se utilizó un microscopio Olympus equipado con una cámara Olympus DP72 (Olympus Optical Co., Ltd,

Tokio, Japón), una lámpara de mercurio 100W high-presión y los filtros adecuados para Cy3 y DAPI. Para cada marcador fluorescente, todas las imágenes se tomaron al mismo tiempo y un total de 90 y 100 células fueron evaluadas para los tratamientos de control y de calcitriol, respectivamente (10 células de cada campo). La magnitud de la fluorescencia se analizó con el programa ImageJ (E.E.U.U).

8.3 Análisis in silico

La búsqueda de VDREs para el receptor de la vitamina D se hizo en un fragmento de 3943 pb 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen de hEAG1 con el programa computacional MatInspector (Genomatix Software, Alemania). El fragmento de 3943 pb se tomó de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con número de acceso 3756.

8.4 Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer cervical SiHa o C33A se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (Gibco, E.E.U.U) y suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) y 1% de mezcla antibiótica-antimicótica (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

Para los experimentos las células fueron sembradas a una densidad de 520 células/cm² en medio DMEM alto en glucosa con 5 % de SFB tratado con carbón dextran y 1% de mezcla antibiótica-antimicótica. Doce horas después el medio de cultivo se sustituyó por medio

fresco con calcitriol o 0.1 % de etanol como control. La concentración de calcitriol varió de acuerdo al experimento, por lo que la concentración utilizada se indicará en los pies de figura de la sección de resultados.

8.6 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se hizo a partir de leucocitos de un donador voluntario sano. Se utilizó el estuche comercial Illustra blood genomicPrep Midi Flow (GE Healthcare Lifesciences, E.E.U.U) siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración de DNA extraído se estimó espectrofotométricamente mediante su absorbancia a 260 nm. La pureza de la muestra se examinó mediante la relación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm utilizando el sistema Epoch™ Spectrophotometer System (BioTek Instruments Inc). El DNA resuspendido en isopropanol se almacenó a -70 °C hasta su uso.

8.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos 5' UTR del oncogén de hEAG1 se hizo a partir de DNA genómico con el estuche comercial FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche, Alemania). Para una reacción de 25 µl se usaron 100 ng de DNA. La síntesis de DNA se hizo en un termociclador Perkin-Elmer 9600, E.E.U.U. El protocolo de PCR se presenta en la tabla 1:

Tabla 1. Condiciones de PCR para amplificar los fragmentos 5' UTR del oncogén hEAG1.

95 °C	2 min	35 ciclos	Desnaturalización inicial
95 °C	30 s		Desnaturalización
60 °C	30 s		Alineamiento
70 °C	1000 pb/15 s		Elongación
70 °C	15 min		Terminación de la elongación

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos 5' UTR del oncogén de hEAG1 se presentan en la tabla 2. Los oligonucleótidos se diseñaron para dejar extremos para la enzima de restricción EcoRV. El tamaño de los fragmentos amplificados varió en el extremo 5'. Para todos los fragmentos amplificados el extremo 3' fue el mismo por lo que sólo se utilizó un oligonucleótido sentido.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para dividir el fragmento de 3943 pb. En letras minúsculas se indica la secuencia de corte para la enzima EcoRV.

	Oligonucleótido	Tamaño del fragmento (pb)
Sentido	5'-ATAgatacTCCCTCTGGCTGC-3'	
Antisentido	5'-TATAgatacGAACACATTTCCCG-3'	281
	5'-ATAgatacCTGTCCAGAAACCTT-3'	832
	5'-ATAgatacCTGTTACCAAGTTTTG-3'	2772
	5'-ATAgatacTCGCAGACCTAGGA-3'	3480
	5'-ATAgatacTAGCTTAGGGCACTT-3'	3943

8.8 Secuenciación

Todas las construcciones generadas se verificaron por secuenciación de DNA utilizando el sistema Dye terminator cycle sequencing with Quick Start kit (Beckman Coulter, E.E.U.U.) en un secuenciador automático CEQ 8800 marca Beckman Coulter.

8.9 Clonación molecular

La funcionalidad del promotor de oncogén hEAG1 se evaluó con el vector reportero pGL4.10 (Promega, E.E.U.U.). El vector pGL4.10 carece de una secuencia promotora y tiene como gen reportero la secuencia del gen de la luciferasa de luciérnaga. En el sitio múltiple de clonación del vector pGL4.10 se insertó la región 5'UTR del oncogén hEAG1 a evaluar (figura 4). Si la secuencia insertada tiene actividad de promotor la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga se activará. Como control endógeno de la expresión se usó el vector pGL4.73. Este vector tiene el promotor SV40 y usa como gen reportero el gen de la luciferasa de *Renilla* (figura 5).

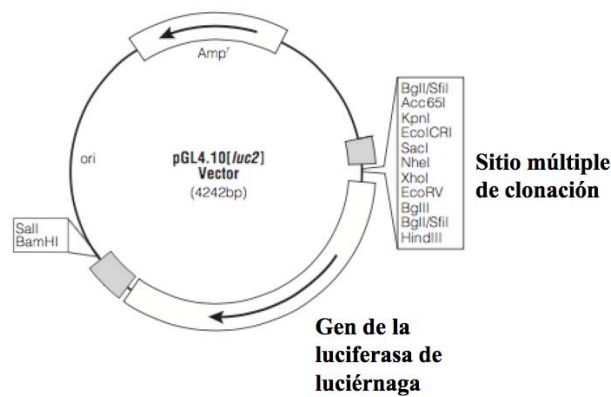


Figura 4. Esquema del vector reportero pGL4.10.

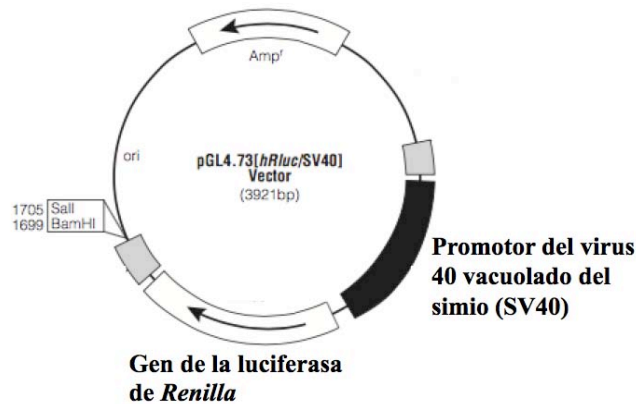


Figura 5. Esquema del vector reportero pGL4.73.

Para insertar el fragmento 5'UTR del oncogén hEAG1 se utilizó el sitio múltiple de clonación EcoRV. La ligación de los fragmentos se hizo con la enzima T4 ligasa (Promega, E.E.U.U.) y se incubó a temperatura ambiente durante 12 horas. Posterior a este tiempo, el DNA se purificó mediante el sistema CleanUp (Promega) y se transformó en bacterias DH5 α por el método de transformación química. Las bacterias se crecieron en medio LB agar con 50 μ g/ml de ampicilina. La selección de colonias positivas se hizo por secuenciación de DNA en el equipo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, E.E.U.U.).

8.10 Mutagénesis sitio dirigida

La generación de las mutantes se realizó con el estuche comercial Transformer site-directed mutagenesis kit (Clontech, E.E.U.U) siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad de la secuencia se verificó por secuenciación de DNA. Los oligonucleótidos utilizados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para generar la mutante del promotor de hEAG1. Los oligonucleótidos estaban fosforilados (P) en su extremo 5'.

Mutación en:	Oligonucleótido
Caja E en el promotor de hEAG1	5'- PCAGTTAGTTTTTACAGCTTATCCCTGGTATACGG -3'
Sitios BamHI y Sall en el vector pGL4.10	5'- PCAAGGGCATCGGTCTGAAGGATACTTATCGATTTTACCAC -3'

8.11 Ensayos de transactivación

Las células SiHa o C33A se sembraron en cajas de 30 mm. Cuando las células se encontraban al 80 % de confluencia se co-transfectaron con 1 μ g de plásmido pGL4.10 o

p4943 o p832 y con 2.5 ng del vector de expresión de la luciferasa de *Renilla* el cual se usó como control para normalizar la eficiencia de la transfección. Las transfecciones se hicieron con el reactivo FuGene (Roche, Alemania). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisaron y se determinó la actividad enzimática de ambas luciferasas usando el Luciferase Assay Dual System (Promega, E.E.U.U.). La actividad transcripcional del promotor de las construcciones p4932 y p832 se expresó como la relación de las luciferasas de luciérnaga/*Renilla* de las células tratadas con calcitriol 1 μ M o etanol como control.

8.12 Extracción de RNA total

La separación de RNA total del resto de los componentes celulares se hizo con la técnica de isotiocianato de guanidina-fenol cloroformo con trizol (Invitrogen, E.E.U.U.), de acuerdo a la técnica derivada de Chomczynski y Sacchi 2006. La pureza de la muestra se examinó mediante la relación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm utilizando el sistema EpochTM Spectrophotometer System (BioTek Instruments Inc, E.E.U.U.).

8.13 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La obtención de cDNA se hizo a partir de 3 μ g de RNA total. Se utilizó el estuche comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Alemania). La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del proveedor. La síntesis de cDNA se hizo a 45 °C durante 90 minutos en el termociclador Perkin-Elmer 9600.

8.14 PCR en tiempo real (qPCR)

La mezcla de reacción para la qPCR se hizo con el estuche comercial LightCycler TaqMan Master y la biblioteca de sondas Taqman para humano (Roche, Alemania), siguiendo las especificaciones del proveedor. La amplificación de DNA se hizo en un equipo LightCycler 2.0 Roche (Roche, Alemania). En la tabla 4 se indica el nombre de los genes estudiados así como los oligonucleótidos y el número de sonda utilizada para cada gen.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de qPCR.

Gen	Oligonucleótido	Número de Sonda
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTGAGAGACAC-3' 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	60
KCNH1	5'-CCTGGAGGTGATCCAAGATG-3' 5'-CCAAACACGTCTCCTTTTCC-3'	49
CYP24A1	5'-CATCATGGCCATCAAAACAA-3' 5'-GCAGCTCGACTGGAGTGAC-3'	88

8.15 Inmunodetección

Las proteínas celulares se obtuvieron por lisis celular con amortiguador de RIPA (fosfato de sodio dibásico 9.1 mM, fosfato de sodio monobásico 1.7 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1 %, SDS 0.1 %, pH 7.4) en presencia de inhibidores de proteasas (Roche, Alemania) e inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 1 mM). La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (Pierce Thermo Scientific, E.E.U.U.). Las proteínas se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10 %. La transferencia de las proteínas se hizo en membranas de nitrocelulosa. Se utilizó leche al 5 % en amortiguador TBS (TRIS-HCl 10 mM, NaCl 50 mM; pH 8.0) como solución bloqueadora. La detección de las proteínas se hizo con los anticuerpos anti GAPDH (1:10000) y anti VDR (1:200). La señal de las proteínas se

visualizó por quimioluminiscencia (Thermo Scientific, E.E.U.U.).

8.16 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

El extracto nuclear utilizado en el EMSA se obtuvo de células SiHa tratadas con calcitriol 100 nM por 3 horas. El extracto de las proteínas nucleares se obtuvo con el estuche Nuclear extract (Sigma, E.E.U.U.). La concentración de proteína se determinó por el método de ácido bicinconínico.

Para el EMSA se utilizó el sistema Gel Shift Assay System (Promega, E.E.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados en el ensayo se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo de EMSA.

	Oligonucleótido
Sonda canónica de una caja E	5'-CCATTAACCCACCTGCCATCTGCC-3' 5'-GGCAGATGGCAGGTGGGTTAATGG-3'
Caja E del promotor del oncogén hEAG1	5'-CCGTATAACCAGGGGTCAGCTGTAAAAAC-3' 5'-GTTTTTACAGCTGACCCCTGGTATACGG-3'
Caja E mutada del promotor del oncogén hEAG1	5'-CCGTATAACCAGGGATAAGCTGTAAAAAC-3' 5'-GTTTTTACAGCTTATCCCTGGTATACGG-3'

Los oligonucleótidos marcados con [γ -³²P-ATP] se incubaron con 8 μ g de proteína nuclear. La identidad de la proteína unida al oligonucleótido marcado se evaluó con los anticuerpos anti-VDIR y anti- γ globulina (Santa Cruz Biotechnology). Los complejos resultantes de la

interacción entre las proteínas nucleares y los oligonucleótidos marcados se visualizaron por quimioluminiscencia (Thermo Scientific, E.E.U.U.).

8.17 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

La cromatina utilizada en este ensayo se obtuvo de células SiHa tratadas o no tratadas con calcitriol 1 μ M durante 2 horas. La reacción de entrecruzamiento se hizo con formaldehído al 1 % durante 15 min. Para la inmunoprecipitación de la cromatina se utilizó el estuche EZ-Magna ChIP A-Chromatin Immunoprecipitation Kit (Merck Millipore, E.E.U.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos anti VDR, RXR, VDIR, WSTF y γ globulina (Santa Cruz Biotechnology, E.E.U.U.) se usaron para inmunoprecipitar la cromatina. El DNA inmunoprecipitado se amplificó por PCR siguiendo el protocolo de la tabla 6 y los oligonucleótidos utilizados se presentan en la tabla 7.

Tabla 6. Condiciones de PCR para el ensayo de ChIP.

95 °C	2 min		Desnaturalización inicial
95 °C	30 s	35 ciclos	Desnaturalización
60 °C	30 s		Alineamiento
72 °C	30 s		Elongación
72 °C	30 s		Terminación de la elongación

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de ChIP.

	Oligonucleótido	Tamaño del fragmento (pb)
Sentido	5'-TGTGGGACATAGGCTTAGTC-3'	282
Antisentido	5'-CTTGTCTCTAAGGGCGAATG-3'	

8.18 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos de la comparación entre los tratamientos y los controles se hizo con la prueba t de Student. El resultado se expresó como la media \pm la desviación estándar (DE). Un valor de $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

9. Resultados

9.1 El calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1

Comenzamos nuestro estudio evaluando el efecto del calcitriol sobre la expresión del gen y la cantidad de proteína de hEAG1 en la línea celular SiHa. Encontramos que en estas células el calcitriol disminuyó en promedio el 40 % de la expresión del oncogén hEAG1 (figura 6) efecto que también se reflejó en la disminución de la proteína sintetizada (figura 7). La comparación de la expresión del oncogén hEAG1 entre la condición calcitriol y la condición control se hizo respecto a la expresión del gen constitutivo Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cuya expresión no varió en las condiciones del experimento (figura 8).

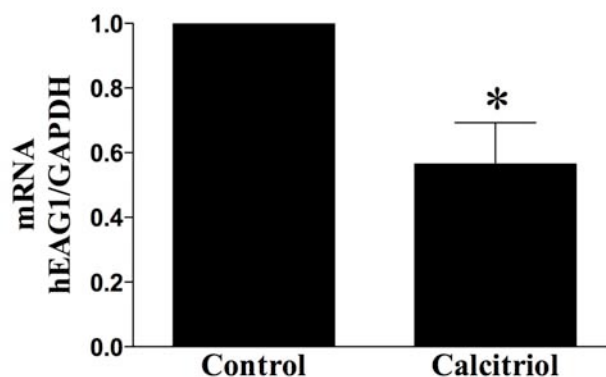


Figura 6. El calcitriol inhibe la expresión génica del oncogén hEAG1. Las células SiHa fueron tratadas con calcitriol 1 μ M o 0.1 % de etanol como control. Después de 24 horas se extrajo el RNA total de las células y se cuantificó el mRNA de hEAG1 por la técnica de qPCR. Los datos se normalizaron usando el gen constitutivo de GAPDH asignando el valor de 1 a la expresión del gen hEAG1 en la condición control. Los datos se expresaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ vs el control.

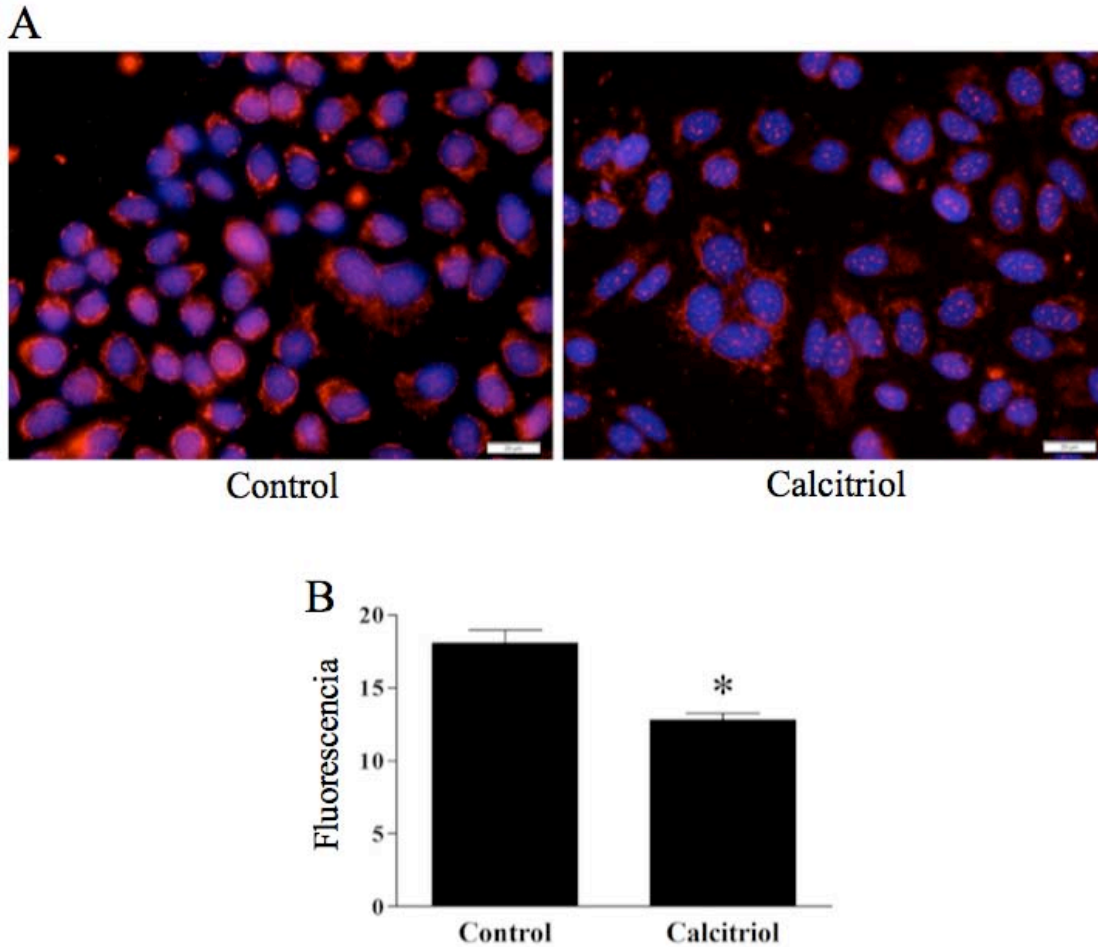


Figura 7. El calcitriol disminuye la cantidad de proteína de hEAG1. Las células SiHa fueron tratadas con calcitriol 1 μ M o etanol como control. Después de 24 horas de tratamiento las células fueron incubadas con anticuerpo anti hEAG1. A) La proteína fue detectada por inmunofluorescencia. En color rojo se muestra la señal de hEAG1 y en color azul se muestran los núcleos celulares. B) El cambio en la señal del anticuerpo entre el calcitriol y el control se expresó en unidades de densidad óptica. Los datos se expresan como la media \pm EE. * $P \leq 0.05$ vs el control.

9.2 El calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1 a nivel de la transcripción

Considerando que el calcitriol puede regular la cantidad de mRNA por mecanismos que involucran una regulación transcripcional o bien, una regulación postranscripcional, comenzamos nuestro estudio indagando sobre el posible mecanismo por el cual el calcitriol regula la expresión del gen hEAG1. Para ello, evaluamos la síntesis de mRNA después de interrumpir la transcripción con actinomicina D. Como control positivo evaluamos el

cambio en la expresión del gen CYP24A1, un gen inducible por el calcitriol. El análisis de los datos mostró que el tratamiento con actinomicina D inhibió la síntesis del mRNA tanto de CYP24A1 (figura 9A) como de hEAG1 (figura 9B). La síntesis del mRNA de CYP24A1 y de hEAG1 se recuperó a las 6 horas y 24 horas después de haber retirado el tratamiento con actinomicina D respectivamente. El calcitriol aumentó la síntesis del mRNA de CYP24A1 mientras que la síntesis de mRNA de hEAG1 se mantuvo inhibida. De este experimento concluimos que el calcitriol mantiene a la baja la expresión del gen hEAG1 a través de un mecanismo de regulación transcripcional. El tratamiento con actinomicina D no afectó la expresión del gen constitutivo (GAPDH) utilizado en el análisis de los datos (figura 10 y Tabla 8).

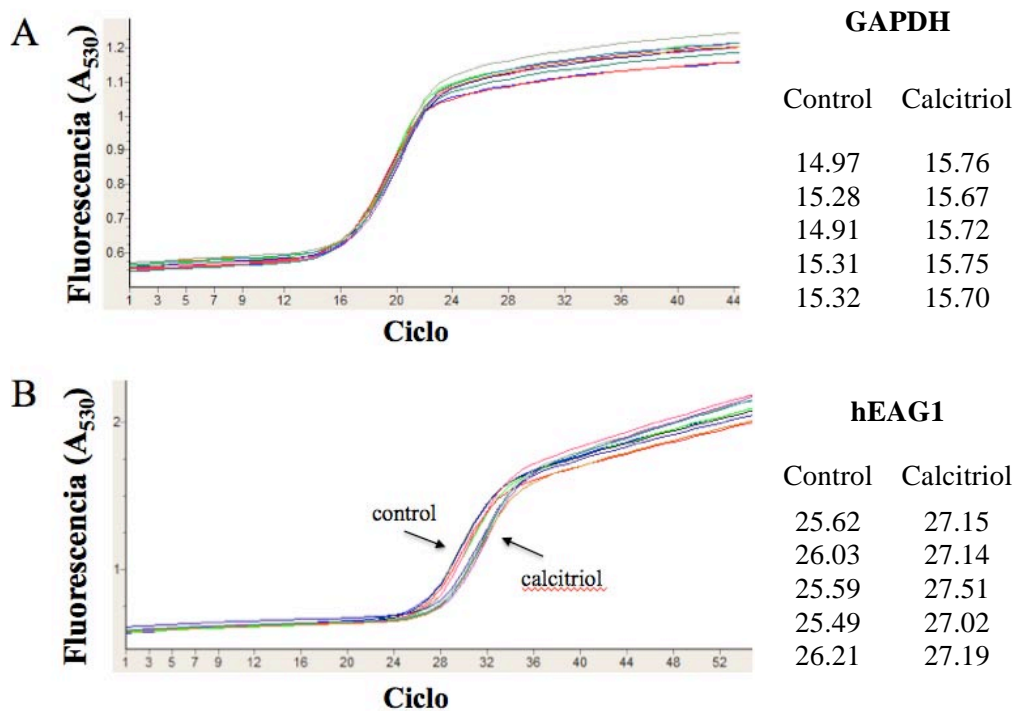


Figura 8. El calcitriol no modifica la expresión del gen de GAPDH. Las células SiHa fueron tratadas con calcitriol 1 μ M o etanol como control. Después de 24 horas se extrajo el RNA total de las células y se comparó la expresión de los genes de GAPDH (A) y hEAG1 (B) en la condición control y la condición calcitriol. A la derecha se indica el número de ciclo en el que los genes amplificaron en la respectiva condición experimental.

9.3 El promotor del oncogén hEAG1 contiene elementos de respuesta negativos al calcitriol

Considerando que nuestro estudio con actinomicina D sugirió que la expresión del gen hEAG1 es inhibida por el calcitriol vía transcripcional, proseguimos a identificar elementos reguladores cis de tipo nVDRE en la región promotora del gen hEAG1. El análisis se hizo con un fragmento de 3943 pb ubicado en el extremo 5' UTR del gen hEAG1. La secuencia se sometió a un análisis *in silico* usando la herramienta de Genomatix MatInspector (www.genomatix.de). El resultado del análisis mostró que la región 5' UTR del gen de hEAG1 contiene varios elementos reguladores del tipo caja E (figura 11). También analizamos el contenido de bases guanina (G) y citosina (C) de la región 5' UTR de hEAG1, en promedio el contenido de GC fue del 42 %, sin embargo, la distribución de estas bases nitrogenadas no es homogénea, habiendo un contenido del 85 % alrededor del sitio de inicio de la transcripción (figura 12).

9.4 Expresión de los factores transcripcionales VDR y VDIR en las líneas celulares de cáncer cervical SiHa y C33A

El factor transcripcional VDR es la proteína clave de las acciones genómicas del calcitriol. El VDR unido al calcitriol puede activar o inhibir la expresión de genes. Estudios previos de Avila E 2010 mostraron que la línea celular SiHa tiene VDR y que es una proteína funcional. Evaluamos la expresión del VDR en otra línea celular de cáncer cervical: C33A. Encontramos que las células C33A no expresan al VDR (figura 13A). Por otro lado, teniendo en cuenta que el factor transcripcional VDIR es la proteína que participa en la inhibición de la expresión génica mediada por el calcitriol, evaluamos su expresión en las

líneas celulares de cáncer cervical SiHa y C33A y encontramos que ambas líneas celulares expresan el VDIR (figura 13B).

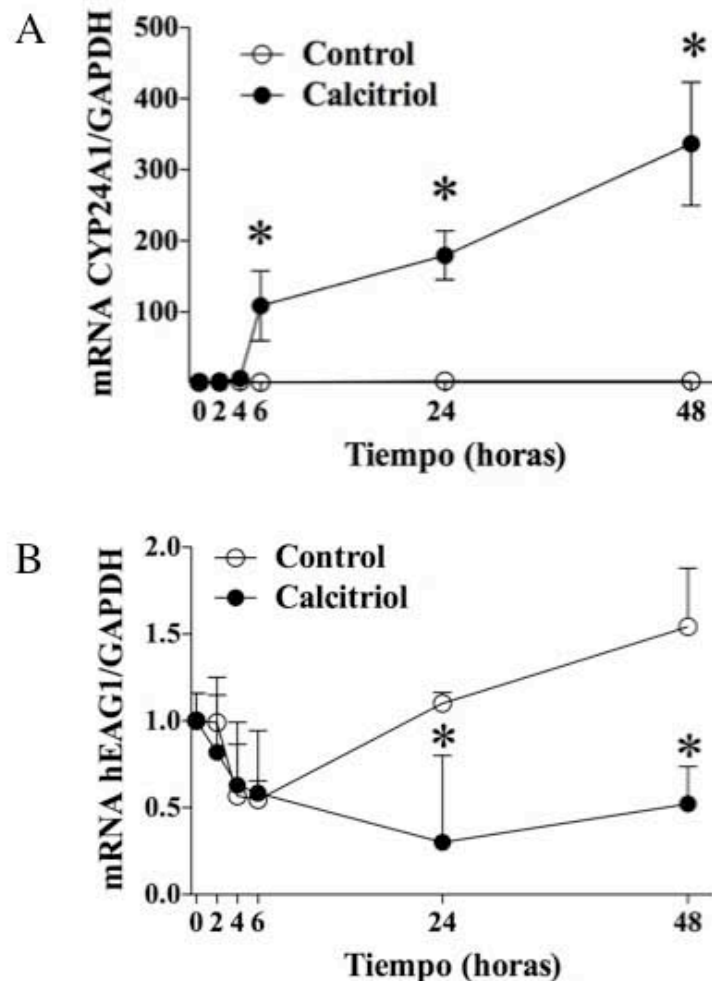


Figura 9. El calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1 a través de un mecanismo transcripcional. Las células SiHa fueron tratadas con actinomicina D 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Después de dos horas el medio de cultivo se cambió por medio con calcitriol 1 μM o etanol como control. Se extrajo el RNA total a los tiempos indicados para evaluar por qPCR la expresión de CYP24A1 (A) y de hEAG1 (B). Los datos se normalizaron usando el gen constitutivo de GAPDH asignando el valor de 1 a la expresión del gen hEAG1 en la condición control. Los datos se expresaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ vs el control.

GAPDH						
Actinomicina D	-			+		
Tiempo	Ciclo	Promedio	DE	Ciclo	Promedio	DE
0 h	12.46 12.65 12.75	12.62	0.15	12.70 12.85 12.79	12.78	0.08
2 h	12.96 12.82 12.73	12.84	0.12	12.90 13.26 12.95	13.04	0.20
4 h	12.84 12.79 13.44	13.02	0.36	12.81 13.28 12.95	13.01	0.24
6 h	12.88 13.02 12.78	12.89	0.12	12.80 12.93 13.17	12.97	0.19
24 h	12.81 13.06 12.98	12.95	0.13	13.07 13.05 13.42	13.18	0.21
48 h	12.87 12.89 13.00	12.92	0.07	12.88 13.03 12.58	12.83	0.23

Tabla 8. La actinomicina D no afecta la expresión de gen constitutivo GAPDH.

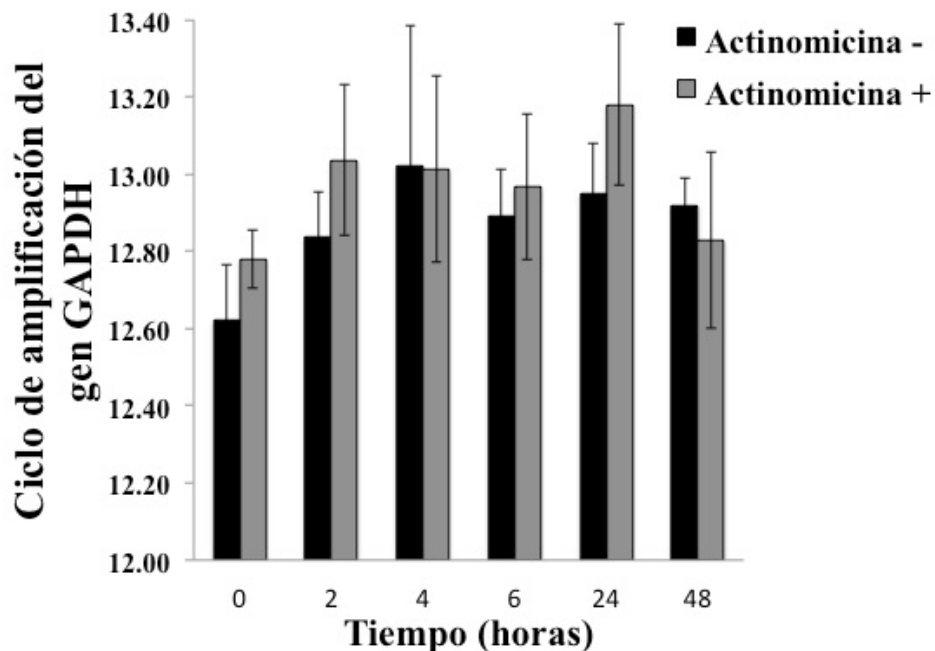


Figura 10. El calcitriol no modifica la expresión del gen de GAPDH. Las células SiHa fueron tratadas con calcitriol 1 μ M o etanol como control. Después de 24 horas se extrajo el RNA total de las células y se comparó la expresión del gen en las condiciones con y sin actinomicina D.

-4000..... . AGAATAGCTTAGGG**CACTTG**GAAGGATATAATTCAATTCTACAAACATT

Caja E

TCACACTATCTATTGGGTAAACCATGGGTGAGTGTAGACCCACATCAGTGCATTCTTTTCC
CCAGTCAATTAGATTCAGGGACTAGTATTTCTTTGAAGCAGATTCTGTCCATTCTCCCAA
CACTAGGGAAATACATCTATAGCAGGGAATCTTTTTTTTTTTCAATGGATATAGTCTGCC
AACATTCTTCCTATAAGATTATTCAAATAGAAGTTTTGTTAACAGAAATCACATATAATAA
GTCAGTCAGTCATTGGGCTATAGAAGCTGAAATTTCTCATGCTGCAAATTCCTCCACTTTT
AGATATTTAGATATTTCACTCCTGGTGGCTGAGTAGTGAAGTCGCCTCTATGTTCAATTTT
TCCTCCGCTTAAGTTGCTAATGACGATGCATCCATGGCCTGCCCTTCCAGC**TCGCAGACC**
TAGGACTCACAGGCAACTTTCTATGTTAGAGAGGTTCTGGCTTTCTAAAATCTGTCACC
CACAC**CATGTG**GTCTTAATGGAAGGAAAAATGAAGTTCTTG

Caja E

CTTTATATGATAACATTTGCCCTTCTGATGTGT.....
.....CAATTGGTTTGCCATGGTACATTGGTATATTGTGAATCCTTTAGAAAT**CTG**
TTACCAAGTTTTGACAAATCTGTAAGATTAAAGTTTACTCTAACTGAGATTCCCATATTAC
AGAGGTAGATCTCAGA**CAGAAC**TTTAAGTTGAG**CAGGTG**CTGGAAGTGAATG

Caja E

Caja E

TCAAGGAGGGAACAAAAGGTGGCAAGTAAAAGGTAAGAAGCACAGTATCCCGTCAACTAGC
ACCAAGAAAGAGGGAGTGTTTACTGG.
.....TTGAACAAACGACCGTTGTCTTAGCCC**CTGTC**
CAGAAACCTTGGGTGTATGTGGTTCTTCCGTATAC**CAGGGT****CAGCTG**TAAA

Caja E *Caja E*

AACTAACTGTATCCTCTGCACTACAGACTACCCTTCAAGCCAAAGCCACGGTTGCTTAATT
AATGCTGCCCTCTCCTGAGCATTGCGCCTTAGAGACAAGTCCACCCCTTTGATGTTGTGTC
AGGCAGTTTGATACTGATCATACAAACATCAGGAGCCTGCATTTGTGTCTACGGTAAAAA
CAACCCAAGACAACCTTCTGAAGCTGAATCTGCCAGTCACTCTAAATCTGCACTATTGCA
ATACGACTTCATTAATTACTGCTCAAACACTGGCCTAGAATCAAGGTGGGGCAACTTTCAC
TAGTCAGGCTAACCTTACAGGAAGGCAAGAAGGTGTTCCAGAGCCTCACAGGTCCCGGGG
GCCCGGCCTGAAACAGAGCAAAGGAAGAGGTTACATCAGCACGCTCCCCTAAGACTTGT
TGGGGGTGAATCCGCCCTGAAAGCTGCTCACAATGCCCTCCTCTCCACCCAGCCCATGGCA
CATCCT**GAACACATTTCCCGCTGA**ACCCAGAGGGTGGCGCTGCCGTCCCAGCCTTGGTCC
ACGGCCGCCCGCCACTTCCCTGCCTCTGCGGGAGCCCCCAGCTTGGTCTCCCGCAGGCCG
GCGGTGGGGCACGAGCCCGGTAGGGGGCGCCGCCCGCCAGGCGCCGCTGCTCCCTCCGCC
CACCCGAGGCGGCTGCCGCTAGCCGAGGCCGGCGCG

+1 =>

TSS

AGTGCCTGCGAGGCGGGCCGCAGGGAGGGAGGCGCGAAGAGGGCGCGA**GGGTAGCAGC**
CAGAGGGAGCCGCCAGCCCTG.....**ATG**

Figura 11. Representación del análisis *in silico* de la secuencia de 3943 nucleótidos de la región promotora del gen hEAG1. En color amarillo se indica el sitio de inicio de la traducción ATG, a partir del cual y en dirección 5' se consideró una secuencia de 4000 nucleótidos para caracterizar el promotor de hEAG1. En fondo azul se indica el oligonucleótido reverso utilizado en combinación con cinco oligonucleótidos directos; mostrados en fondo gris, para obtener las diferentes construcciones de la secuencia de 3943 nucleótidos. El sitio de inicio de la transcripción descrito y las cajas E identificadas *in silico* con puntajes de similitud con la matriz >0.8 se indican por su nombre.

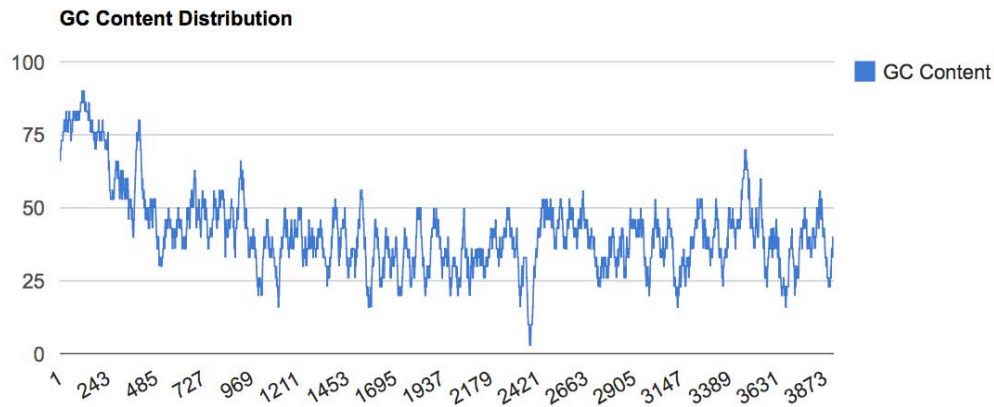


Figura 12. Distribución del contenido de GC en la región 5' UTR de 3943 pb del oncogén hEAG1. El sitio de inicio de la transcripción se ubica en la posición 13. El contenido de adeninas fue del 29 % (1153), timinas del 29 % (1129), guaninas del 22 % (868) y citosinas del 20 % (793).

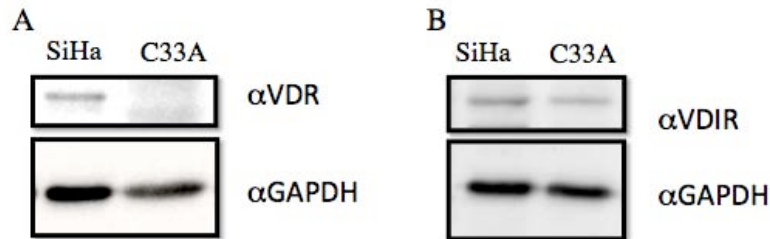


Figura 13. Expresión de los factores transcripcionales VDR (A) y VDIR (B) en las líneas celulares de cáncer cervical SiHa y C33A. El extracto celular de las células SiHa y C33A se separó por SDS-PAGE. La detección de las proteínas de interés se hizo con los anticuerpos anti-VDR, anti-VDIR y anti-GAPDH.

9.5 El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 a través de un mecanismo dependiente del VDR

Evaluamos en una línea celular carente del VDR (línea celular C33A), el efecto del calcitriol en la expresión de los genes CYP24A1 y hEAG1. El estímulo de las células con calcitriol no tuvo efecto en la expresión de los genes respecto al control (figura 14A). Al

estimular con calcitriol las células C33A transfectadas con 100 ng de vector de expresión del VDR (figura 14B) se activó la expresión del gen CYP24A1 mientras que, la expresión del oncogén hEAG1 se inhibió 30 % (figuras 14A). En las células transfectadas con 200 y 400 ng de vector de expresión del VDR el calcitriol activó la expresión del oncogén hEAG1 en 60 % (figura 15).

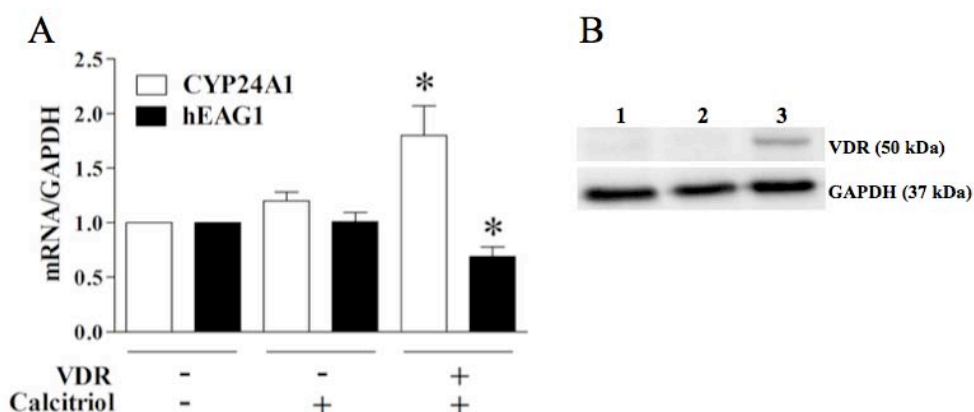


Figura 14. El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 a través de un mecanismo dependiente del VDR. A) Las células C33A transfectadas o no con 100 ng de un vector de expresión del VDR se trataron con calcitriol 1 μ M o etanol como control. Después de 24 horas se extrajo el RNA total y se cuantificó el mRNA de CYP24A1 o de hEAG1 por la técnica de qPCR. Los datos se normalizaron usando el gen constitutivo de GAPDH asignando el valor de 1 a la expresión del gen CYP24A1 o hEAG1 en la condición control. Los datos se expresaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ vs el control. B) La transfección de las células C33A con el vector de expresión del VDR se verificó por Western Blot. El extracto celular de las células C33A transfectadas se separó por SDS-PAGE. La detección de las proteínas de interés se hizo con los anticuerpos anti-VDR y anti-GAPDH. 1. Células C33A no transfectadas; 2. Células C33A no transfectadas y tratadas con calcitriol; 3. Células C33A transfectadas con 100 ng de un vector de expresión del VDR.

9.6 El promotor proximal del oncogén hEAG1 responde al calcitriol inhibiendo su actividad transcripcional

Para determinar si la región 5' UTR del oncogén hEAG1 es funcionalmente activa para regular la transcripción, un fragmento de nucleótidos que abarcó 3943 nucleótidos se

insertó al vector reportero pGL4.10, asignado como p3943. La actividad del promotor se midió por transfección de la construcción p3943 en células SiHa. La construcción p3943 incrementó 200 veces la actividad transcripcional respecto al vector vacío (pGL4.10) indicando que la región 5' UTR de 3943 nucleótidos tenía actividad de promotor (figura 16).

Para identificar la región del promotor con actividad reguladora cis al calcitriol evaluamos la actividad transcripcional de las construcciones p3943 y p832 en células SiHa tratadas con calcitriol o etanol como control. La actividad transcripcional se interpretó como el cambio en las unidades de la actividad enzimática luciferasa del calcitriol respecto al control. La construcción p832 mostró un efecto inhibitorio sobre la transcripción en presencia de calcitriol, mientras que la construcción p3943 tuvo la misma actividad transcripcional en presencia o ausencia de calcitriol (figura 16).

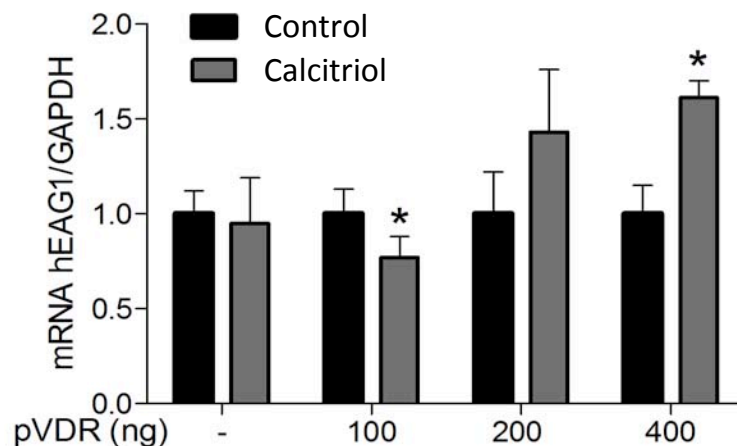


Figura 15. El calcitriol activa o reprime la expresión del oncogén hEAG1 dependiendo de la cantidad presente de VDR en las células. Las células C33A transfectadas o no con concentraciones crecientes de un vector de expresión del VDR (100, 200 y 400 ng) se trataron con calcitriol 1 μ M o etanol como control. Después de 24 horas se extrajo el RNA total y se cuantificó el mRNA de hEAG1 por la técnica de qPCR. Los datos se normalizaron usando el gen constitutivo de GAPDH asignando el valor de 1 a la expresión del gen hEAG1 en la condición control. Los datos se expresaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes. *P \leq 0.05 vs el control.

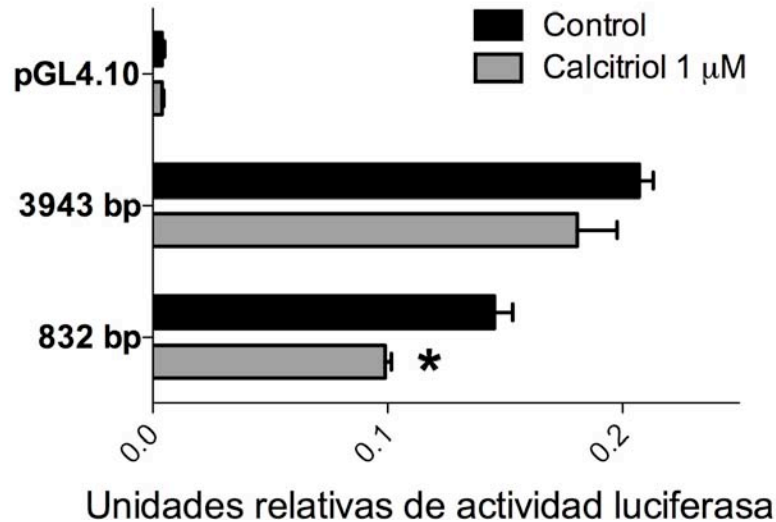


Figura 16. El promotor proximal del oncogén hEAG1 responde al calcitriol inhibiendo su actividad transcripcional. Las células SiHa fueron transfectadas de manera independiente con las construcciones p3943, p832 o pGL4.10 como control negativo. Las células se trataron con calcitriol 1 μ M o etanol como control y se evaluó la actividad de las luciferasas. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *P \leq 0.05 vs el control.

Ahora bien, con el objetivo de confirmar que la presencia del VDR es fundamental en el mecanismo molecular que el calcitriol utiliza para reprimir la expresión del gen hEAG1, evaluamos en la línea celular C33A la actividad transcripcional de la construcción p832. La línea celular C33A transfectada con la construcción p832 se trató con calcitriol y no mostró cambio en la actividad enzimática luciferasa respecto al control (figura 16). Sin embargo, un cambio sobre la actividad enzimática luciferasa se observó en células C33A transfectadas con concentraciones crecientes de un vector de expresión del VDR (100, 200 y 400 ng). Las células transfectadas con 100 ng del vector de expresión del VDR y tratadas con calcitriol mostraron una disminución de la actividad enzimática luciferasa mientras que, las células transfectadas con 200 y 400 ng de vector de expresión del VDR respondieron al calcitriol activando la transcripción del gen reportero de la luciferasa (figura 17). En

conjunto éstos datos indicaron que en el promotor proximal del gen hEAG1 se encuentran contenidos nVDRE responsables de la inhibición transcripcional de éste gen por el calcitriol y confirman la importancia del VDR en el mecanismo molecular del calcitriol sobre la expresión del gen hEAG1.

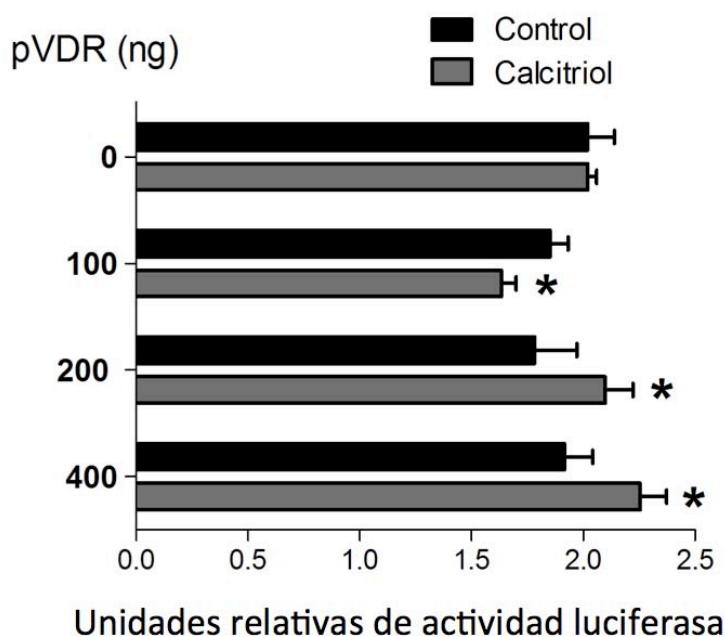


Figura 17. El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 vía el factor transcripcional VDR. Las células C33A fueron transfectadas con concentraciones crecientes del vector de expresión del VDR (100, 200 y 400 ng). Las células se trataron con calcitriol 1 μ M o etanol como control y se midió la actividad de las luciferasas. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ vs el control.

9.7 El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 vía un elemento regulador cis del tipo caja E

La secuencia localizada a -771 / -777 pb del sitio de inicio de la transcripción corresponde a un elemento regulador cis tipo caja E por lo que, considerando los reportes de Kato S et al, 2007; Kim MS et al, 2007; Lundqvist J et al, 2012; Lundqvist et al, 2013 esta secuencia puede ser reconocida por los factores transcripcionales VDIR, WSTF y VDR/RXR. Para

conocer si este mecanismo también ocurre en la secuencia -771 / -777 generamos una mutante de la construcción p832. El cambio se hizo en la secuencia comprendida entre -771 / -777 correspondiente a un par de cajas E separadas por un nucleótido. La actividad transcripcional de la construcción silvestre p832 y de la construcción mutada p832mut se comparó en presencia de calcitriol en células SiHa. La actividad transcripcional de la construcción p832mut es similar en presencia o ausencia de calcitriol (figura 18). La pérdida del efecto del calcitriol en la inhibición de la actividad transcripcional de p832mut (figura 19) indica la importancia de las cajas E ubicadas entre -771 / -777 y que son estas cajas E las que dan identidad al nVDRE ubicado en el promotor proximal del gen hEAG1.

9.8 El factor transcripcional VDIR se une al elemento de respuesta -771 / -777

Para determinar si las proteínas nucleares de las células SiHa se unían *in vitro* a la secuencia de nucleótidos -771 / -777 realizamos ensayos de movilidad electroforética con sondas marcadas radiactivamente. Las sondas usadas correspondieron a: una secuencia consenso tipo caja E (Kim MS et al, 2007), una secuencia correspondiente al elemento de respuesta -771 / -777 y una secuencia mutada del elemento de respuesta -771 / -777 (figuras 20A y B). El complejo DNA-proteína formado por la secuencia consenso y las proteínas nucleares se consideró como nuestro control positivo. La secuencia -771 / -777 generó la formación de un complejo DNA-proteína similar al del control positivo (figura 20A carril 3) mientras que la formación del complejo DNA-proteína disminuyó con la secuencia mutada de -771 / -777 (figura 20B carril 2). Estos resultados indicaron que *in vitro* el elemento regulador cis -771/-777 es reconocido por proteínas nucleares.

La identidad del factor de transcripción unido a la secuencia -771 / -777 se evaluó con el uso de un anticuerpo específico para el factor transcripcional VDIR. En presencia del anticuerpo la intensidad del complejo disminuyó sugiriendo que el sitio de interacción del VDIR al DNA fue bloqueado por el anticuerpo (figura 20A carril 4). Para descartar que la pérdida en la señal de la banda se debiera a interacciones inespecíficas entre el anticuerpo anti-VDIR y el VDIR, comparamos la señal de la banda usando un anticuerpo no relacionado, una IgG de ratón. En presencia de la IgG la intensidad del complejo DNA-proteína fue la misma respecto a la intensidad de la sonda control (figura 20A carril 5).

La especificidad de la unión del VDIR a la secuencia -771 / -777 se comprobó mediante experimentos de competencia añadiendo un exceso de sonda no marcada como competidor. En dichos experimentos observamos que un exceso de la sonda no marcada fue capaz de competir la interacción con la misma sonda marcada (figura 20C).

La incubación de las proteínas recombinantes VDR, RXR y VDIR en sus formas E12 y E47 con la sonda -771/-777 mostró que la formación del complejo DNA-proteína en ausencia de calcitriol solo se forma si el VDR, el RXR y el VDIR en cualquiera de sus dos formas se encuentran al mismo tiempo en la reacción (figura 20D, carriles 5 y 6). En presencia de calcitriol el complejo DNA-proteína tiende a disociarse (figura 20D, carriles 11 y 12) siendo más marcada la disociación con la forma E47 de VDIR (figura 20D, carril 12).

9.9 Los factores transcripcionales VDR, RXR, VDIR y WSTF participan en el mecanismo molecular que utiliza el calcitriol para inhibir la expresión del oncogén hEAG1

La funcionalidad *in vivo* del elemento de respuesta -771 / -777 se evaluó por ensayos de

inmunoprecipitación de la cromatina. Se utilizaron anticuerpos contra las proteínas VDR, RXR, VDIR y WSTF para inmunoprecipitar la cromatina de células SiHa tratadas o no con calcitriol. La unión de las proteínas al DNA se determinó mediante PCR. La amplificación de una banda de 230 pb indicó la formación de un complejo entre el DNA y la proteína evaluada. Nuestros datos mostraron que en ausencia de calcitriol el VDR, el RXR, el VDIR y el WSTF están formando un complejo con la región de DNA -771 / -777 (figura 21). Por otro lado, en presencia de calcitriol el VDR, el RXR y el WSTF son disociados del complejo (figura 21).

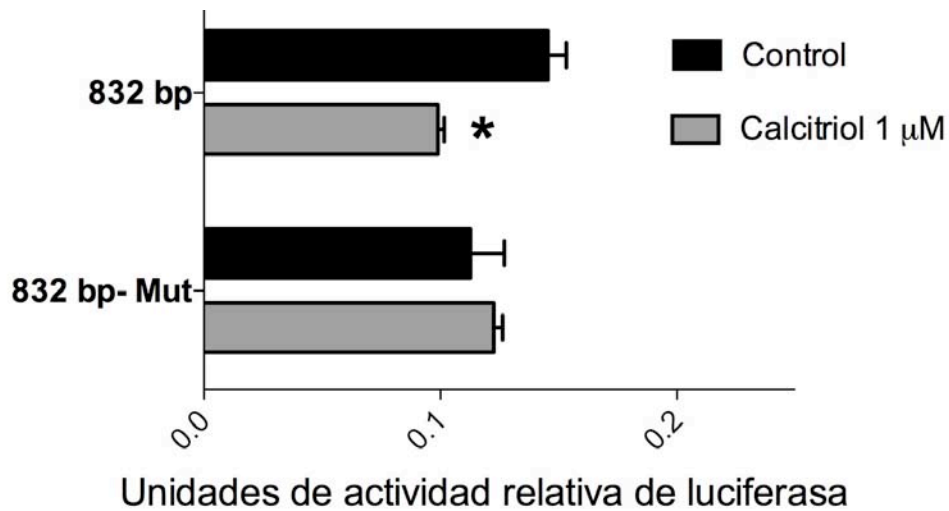


Figura 18. El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 vía un elemento de respuesta de tipo caja E. Las células SiHa fueron transfectadas con el plásmido p832 silvestre o mutado. Las células se trataron con calcitriol 1 μM o etanol como control y se evaluó la actividad de las luciferasas. Los datos se expresan como la media ± DE de tres experimentos independientes. *P ≤ 0.05 vs el control.

Sequence ID: lc|7947 Length: 687 Number of Matches: 2
 Range 1: 1 to 432

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
725 bits(392)	0.0()	420/432(97%)	7/432(1%)	Plus/Minus	
Features:					
Query	1	GGCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCGCTAGCCTCGA-G---G--AT-CTGTCCAGAAAC			53
Sbjct	432	GGCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCGCTAGCCTCGAGGATAGATATCCTGTCCAGAAAC			373
Query	54	CTTGGGTGTATGTGGTTCTTCCGTATACCAGGGGTCAGCTGTAAAACTAACTGTATCCT			113
Sbjct	372	CTTGGGTGTATGTGGTTCTTCCGTATACCAGGGATAAGCTGTAAAACTAACTGTATCCT			313
Query	114	CTGCACTACAGACTACCCTTCAAGCCAAAGCCACGGTTGCTTAATTAATGCTGCCCTCT			173
Sbjct	312	CTGCACTACAGACTACCCTTCAAGCCAAAGCCACGGTTGCTTAATTAATGCTGCCCTCT			253
Query	174	CCTGAGCATTGCGCCCTTAGAGACAAGTCCACCCCTTTGATGTTTGTGAGGCAGTTTGATA			233
Sbjct	252	CCTGAGCATTGCGCCCTTAGAGACAAGTCCACCCCTTTGATGTTTGTGAGGCAGTTTGATA			193
Query	234	CTGATCATACCAAACATCAGGAGCCTGCATTTGTGTCACGGTAAAAACAACCCAAGACA			293
Sbjct	192	CTGATCATACCAAACATCAGGAGCCTGCATTTGTGTCACGGTAAAAACAACCCAAGACA			133
Query	294	ACTCTTCTGAAGCTGAATCTGCCAGTCACTCTAAATCTGCACTATTGCAATACGACTTCA			353
Sbjct	132	ACTCTTCTGAAGCTGAATCTGCCAGTCACTCTAAATCTGCACTATTGCAATACGACTTCA			73
Query	354	TTAATTACTGCTCAAACACTGGCCTAGAATCAAGGTGGGGCAACTTTCAGTACAGGCT			413
Sbjct	72	TTAATTACTGCTCAAACACTGGCCTAGAATCAAGGTGGGGCAACTTTCAGTACAGGCT			13
Query	414	AACCTTACAGGA 425			
Sbjct	12	AACCTACCAGGA 1			

Figura 19. Mutante de la secuencia -771 / -777 del promotor del oncogén hEAG1. Alineamiento de la secuencia reportada del promotor hEAG1 y la mutante de la construcción p832. El cambio generado en la secuencia -771 / -777 se indica en fondo rojo. El alineamiento se hizo con el programa en línea ClustalW2.

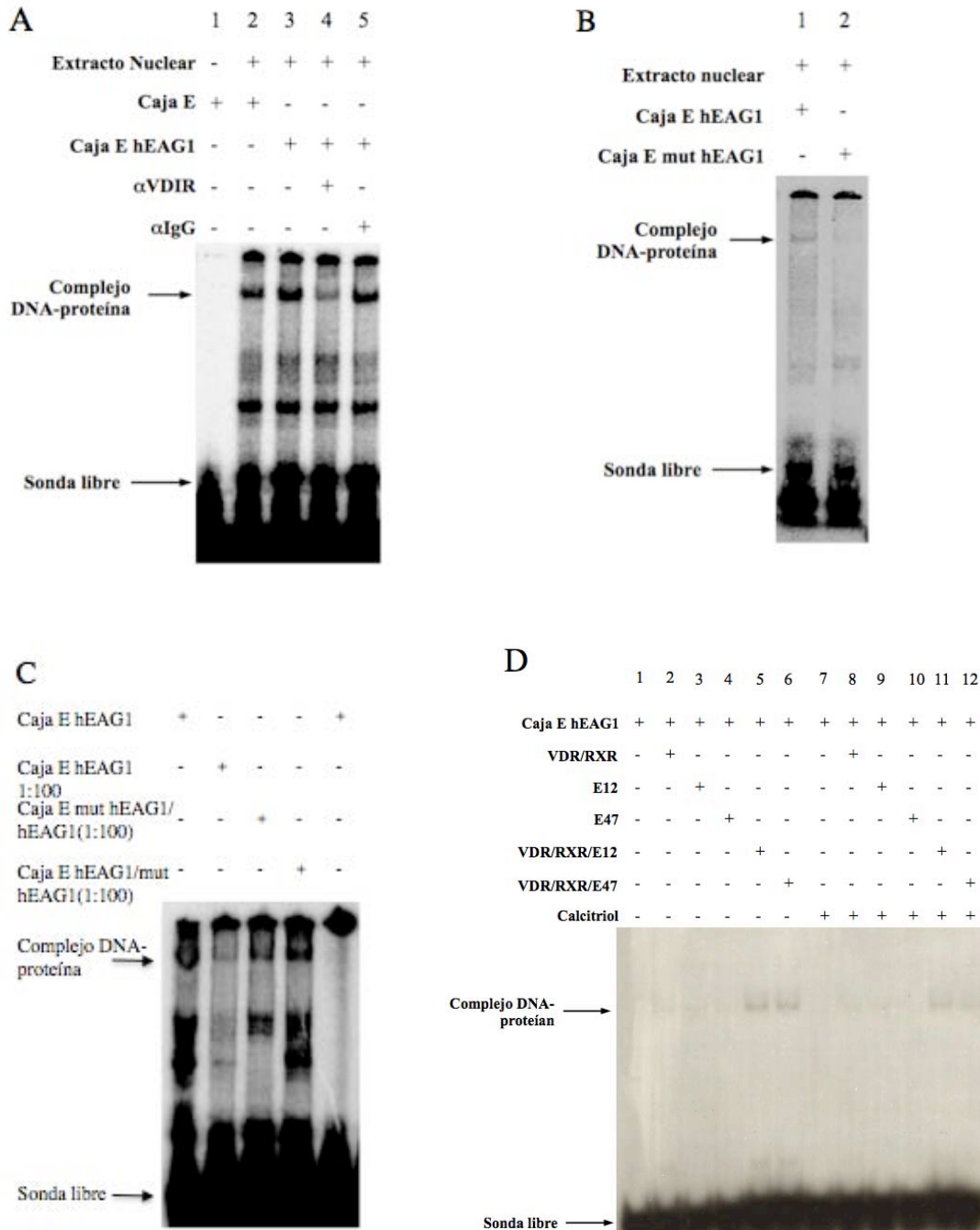


Figura 20. El factor transcripcional VDIR se une al elemento de respuesta tipo caja E. Extractos nucleares de células SiHa se incubaron con sondas de DNA marcadas con ^{32}P que contenían las secuencia consenso de una caja E (A carril 2), la secuencia de una caja E del gen hEAG1 (A carril 3 y B carril 1) y la secuencia mutada de la caja E del gen hEAG1 (B carril 2). Las reacciones se preincubaron con 3 μg de anticuerpo anti-VDIR o anticuerpo anti-IgG. C) Ensayos de competencia D) Las proteínas recombinantes VDR, RXR y VDIR (E12 y E47) obtenidas por traducción *in vitro* se incubaron con sonda marcada con ^{32}P de la caja E del promotor de hEAG1 en presencia o ausencia de calcitriol. Las reacciones de unión se separaron en geles de poliacrilamida.

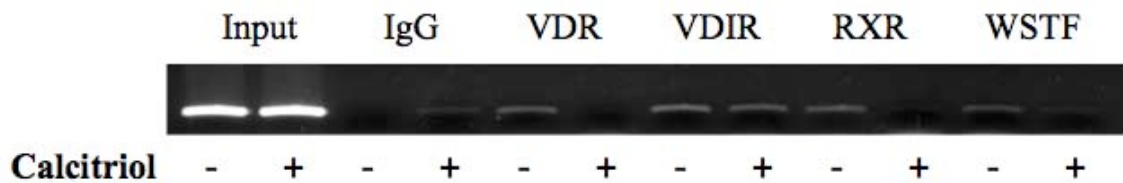


Figura 21. El mecanismo de represión del calcitriol sobre el gen de hEAG1 involucra la participación de las proteínas VDR, RXR, VDIR y WSTF. Las células SiHa se trataron con calcitriol 1 μ M o con etanol como control. Después de dos horas las proteínas unidas al DNA se entrecruzaron con formaldehído al 1 %. Se usaron los anticuerpos anti-VDR, anti-RXR, anti-VDIR y anti-WSTF para inmunoprecipitar la cromatina. Como control negativo se utilizó γ globulina de ratón. El DNA inmunoprecipitado se usó como templado para la amplificación del elemento regulador cis -771/-777 por PCR. El experimento se repitió 3 veces dando siempre los mismos resultados.

10. Discusión

Actualmente se sabe que la expresión génica de diferentes proteínas de membrana como son los canales iónicos tipo potencial transitorio del receptor vaniloide (TRPV) 5 y 6 (Wu Y et al, 2011) y el cotransportador tipo II de sodio dependiente de fosfato (NaPi) (Kido SL et al, 2013) son regulados por el calcitriol. Se ha descrito que estas proteínas de membrana están involucradas en el metabolismo del calcio y el fósforo por lo que la acción del calcitriol sobre éstas proteínas está dada en el contexto de la fisiología del intestino. Por otro lado, es de llamar la atención que el hEAG1 no siendo un blanco fisiológico del calcitriol si lo sea en un contexto patológico, como es el cáncer. Aunque esta situación podría considerarse controversial, en nuestro laboratorio se ha reportado que el calcitriol inhibe la expresión del gen hEAG1 en diferentes líneas celulares de cáncer y el presente trabajo muestra evidencia sobre el mecanismo molecular por el cual el calcitriol puede inhibir la expresión del oncogén hEAG1 en el contexto del cáncer cervical, lo cual muestra que dicho proceso biológico es de interés biomédico.

Nuestro laboratorio reportó que el calcitriol reprime la expresión del gen hEAG1 en las líneas celulares de cáncer cervical SiHa y HeLa (Avila E et al, 2010). Ambas líneas celulares tienen integrado el genoma del virus del papiloma humano 16 y 18 respectivamente. La infección por estos virus es el principal agente etiológico del carcinoma cervicouterino. Se ha demostrado que las proteínas oncogénicas E6 y E7 codificadas en el genoma de éstos virus promueven la expresión del oncogén hEAG1 (Diaz L et al, 2009). Considerando que la expresión de hEAG1 en la línea celular SiHa es abundante decidimos llevar a cabo nuestro trabajo experimental en esta línea celular.

El canal iónico de potasio hEAG1 se ha encontrado expresado en una gran variedad de tumores de diferente origen histológico (Pardo L y Stühmer W 2014). Muchos esfuerzos se han hecho para determinar cómo es que este canal iónico participa en el desarrollo y la progresión del cáncer. En nuestro estudio identificamos de manera *in silico* que el contenido de CG alrededor del sitio de inicio de la transcripción del gen hEAG1 es muy elevado (80 %). Esta observación sugiere que la estructura de la cromatina en el gen hEAG1 se encuentra fuertemente compactada impidiéndose su expresión génica. En el cáncer es posible que la estructura compactada de la cromatina se pierda y esto conlleve a la expresión del oncogén hEAG1 en las células tumorales. En el promotor del oncogén hEAG1 se ha descrito un elemento regulador cis al factor de transcripción E2F ubicado a -12 / -28 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción (Lin H et al, 2011). E2F activa la transcripción de genes implicados en la regulación del ciclo celular como el gen de la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) y el gen de la ciclina E (Dante RA 2014). Es posible que al relajarse la estructura de la cromatina del gen hEAG1 el elemento regulador cis para E2F quede expuesto favoreciéndose la transcripción del gen. A pesar del conocimiento hasta ahora generado sobre la activación de la expresión de hEAG1, poco se sabe sobre su regulación epigenética y sus mecanismos de inhibición transcripcional. Con el objetivo de ampliar el conocimiento de la regulación transcripcional y entender el mecanismo molecular que el calcitriol utiliza para inhibir la expresión del oncogén hEAG1 clonamos su promotor e identificamos que la región 5' UTR del oncogén hEAG1 contiene una secuencia 5'- CAGGGGTCAGCTG -3' que comprende los nucleótidos -771 / -777 y que coincide con la secuencia consenso de un elemento regulador cis del tipo caja E. El análisis de la secuencia -771 / -777 mediante ensayos de movilidad electroforética demostraron que la secuencia -771 / -777 es un sitio de unión al VDIR. Estos datos

indicaron que el mecanismo molecular del calcitriol sobre la inhibición de la transcripción del oncogén hEAG1 compartía similitud con los mecanismos de inhibición transcripcional de los genes CYP27B1, CYP19A1 y CYP21A2 (Kim et al, 2007; Lundqvist J et al, 2012; Lundqvist J et al, 2013), en donde el mecanismo involucra la unión del VDIR a un elemento de regulación cis del tipo caja E. Por otro lado, la mutación en tan sólo dos nucleótidos de la secuencia -771 / -777 (5'- CAGGGtTAGCTG -3') redujo considerablemente tanto su competencia como el efecto del calcitriol sobre la inhibición de la actividad transcripcional. Se ha reportado en el promotor del gen de la lipasa hepática un polimorfismo de una caja E en donde el cambio de un solo nucleótido (C514T) es suficiente para bloquear la unión del factor transcripcional al DNA (Zambon A 2003).

En conjunto estos resultados soportan la hipótesis de que el VDIR es el factor transcripcional que se une al elemento de regulación cis localizado a -771 / -777.

El factor de transcripción VDIR pertenece a la familia de proteínas E que funcionan como reguladores de la transcripción de procesos de desarrollo tanto de vertebrados como de invertebrados. En los mamíferos se conocen cuatro proteínas E: E12, E47, E2-2 y HEB (Wang D et al, 2006). La proteína VDIR es E47 (Kim MS et al, 2007) y nuestros resultados de movilidad electroforética con proteínas recombinantes sugieren que VDIR se encuentra formando un heterodimero con la proteína E12, esta observación es muy importante pues se sabe que las proteínas E pueden unirse al DNA formando homodimeros que funcionan como activadores de la transcripción o bien, pueden unirse al DNA formando heterodimeros que funcionan como activadores o inhibidores de la transcripción (Kee BL et al, 2009). Con base en nuestros datos esta posibilidad podría estar ocurriendo en el mecanismo molecular del calcitriol sobre la inhibición de la expresión del oncogén hEAG1.

La interacción de VDIR con el VDR juega un papel muy importante para que el calcitriol pueda inhibir la expresión de sus genes blanco (Kim MS et al, 2007, Lundqvist J et al, 2012; Lundqvist J et al, 2013). La inhibición de la expresión del oncogén hEAG1 por el calcitriol no es la excepción a este mecanismo. La respuesta de los diferentes órganos blanco al calcitriol depende de la cantidad y biodisponibilidad del VDR. En este sentido nuestros ensayos de expresión de genes y de transactivación en la línea celular C33A, mostraron que en ausencia del VDR el calcitriol no puede inhibir la expresión del oncogén hEAG1 y más llamativo fue observar que la presencia del VDR en la célula no es un indicador de que el calcitriol pueda inhibir la expresión del oncogén hEAG1. Por otro lado, la sobreexpresión del VDR en la línea celular C33A activó la expresión del oncogén hEAG1, una respuesta que potencialmente favorecería los efectos oncogénicos de hEAG1. Esos datos muestran claramente que debe existir un equilibrio estequiométrico finamente regulado entre los factores transcripcionales para que, en su caso, el mecanismo de inhibición transcripcional por el calcitriol se lleve a cabo. Los niveles intracelulares de VDR son regulados tanto por ligandos del VDR como por hormonas, factores de crecimiento que no unen VDR (Brown AJ et al, 1999) y el miRNA-125b (Mohri T et al, 2009). La regulación, que afecta al control de la transcripción y la estabilización del RNA mensajero del VDR así como a la síntesis y degradación de la proteína, es específica en cada tejido o célula ya que el calcitriol activa la transcripción del VDR en las glándulas paratiroides y el riñón y no en el intestino (Brown AJ et al, 1999). La cantidad de VDR en la célula blanco depende también de muchos otros factores, como el estado de proliferación y diferenciación de la célula, las rutas celulares activadas en un determinado momento así como la expresión diferencial de cofactores que intervienen en las acciones del VDR como factor de transcripción (Brown AJ et al, 1999).

En conjunto nuestros resultados nos llevan a proponer que el mecanismo molecular por el cual el calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1 involucra la participación de los factores transcripcionales VDR, RXR, VDIR y WSTF. Estos factores transcripcionales forman un complejo multiproteico que en ausencia de calcitriol está unido a un elemento de respuesta del tipo caja E ubicado en el promotor proximal del oncogén hEAG1 (figura 22A). En presencia de calcitriol se da la disociación del VDR, el RXR y el WSTF del complejo multiproteico quedando únicamente el VDIR unido a la caja E del promotor de hEAG1 (figura 22B).

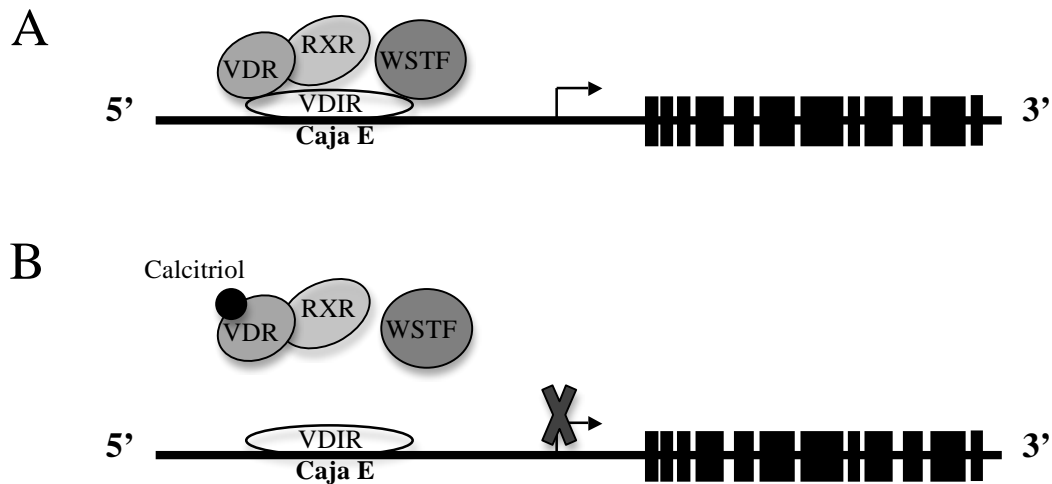


Figura 22. Resumen gráfico del mecanismo molecular del calcitriol para reprimir la expresión del oncogén hEAG1. A) En ausencia de calcitriol los factores transcripcionales VDIR, VDR, RXR y WSTF forman parte del complejo de proteínas asociadas al elemento regulador cis del tipo caja E. B) En presencia de calcitriol las proteínas VDR, RXR y WSTF se disocian del complejo.

En resumen, establecimos las bases de los estudios hechos en nuestro laboratorio que muestran que el calcitriol inhibe la expresión del oncogén hEAG1 y se apoya la idea de que el calcitriol, de manera fisiológica, podría estar involucrado en las etapas tempranas del cáncer, es decir, actuando en la primera línea de defensa contra el crecimiento tumoral, junto con otros mecanismos descritos.

11. Conclusión

El calcitriol reprime la expresión del oncogén hEAG1 mediante un mecanismo de regulación transcripcional que involucra un elemento de respuesta negativo en el promotor proximal del gen. Dicho elemento de respuesta corresponde a una secuencia de tipo caja E (ubicada a -771 / -777 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción) y es reconocida por el factor transcripcional VDIR. En el mecanismo propuesto para explicar la represión de la expresión génica de hEAG1 por el calcitriol participan los siguientes factores de transcripción: VDIR, VDR, RXR y WSTF.

12. Bibliografía

Agarwal JR, Griesinger F, Stühmer W, Pardo LA. The potassium channel Ether à go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer*. 2010 Jan 27;9:18.

Avila E, García-Becerra R, Rodríguez-Rasgado JA, Díaz L, Ordaz-Rosado D, Zügel U, Steinmeyer A, Barrera D, Halhali A, Larrea F, Camacho J. Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res*. 2010 Jul;30(7):2667-72.

Bauer CK, Schwarz JR. Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol*. 2001 Jul 1;182(1):1-15.

Borowiec AS, Hague F, Harir N, Guénin S, Guerineau F, Gouilleux F, Roudbaraki M, Lassoued K, Ouadid-Ahidouch H. IGF-1 activates hEAG K(+) channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation. *J Cell Physiol*. 2007 Sep;212(3):690-701.

Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999;277:F157-75.

Cahalan MD, Chandy KG. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol*. 1997 Dec;8(6):749-56.

Camacho J. Ether à go-go potassium channels and cancer. *Cancer Lett*. 2006 Feb 20;233(1):1-9.

Cervera J, Alcaraz A, Mafe S. Membrane potential bistability in nonexcitable cells as

described by inward and outward voltage-gated ion channels. *J Phys Chem B*. 2014 Oct 30;118(43):12444-50.

Chomczynski P1, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581-5.

Cristobo I, Larriba MJ, de los Ríos V, García F, Muñoz A, Casal JI. Proteomic analysis of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ action on human colon cancer cells reveals a link to splicing regulation. *J Proteomics*. 2011 Dec 21;75(2):384-97.

Dante RA, Larkins BA, Sabelli PA. Cell cycle control and seed development. *Front Plant Sci*. 2014 Sep 23;5:493.

DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 1984. 307: 465–468.

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):684-700.

Deutsch C, Chen LQ. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Nov 1;90(21):10036-40.

Díaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Avila-Chávez E, García-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P, Alvarez-Rios E, Ocadiz-Delgado R, Garcia-Villa E, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Morales A, Ordaz-Rosado D,

García-Latorre E, Escamilla J, Sánchez-Peña LC, Saqui-Salces M, Gamboa-Dominguez A, Vera E, Uribe-Ramírez M, Murbartíán J, Ortiz CS, Rivera-Guevara C, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-à-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3300-7.

Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C, Stühmer W, Pardo LA. Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J Biol Chem.* 2008 Dec 26;283(52):36234-40.

Fraser SP, Pardo LA. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. *Colloquium on Ion Channels and Cancer. EMBO Rep.* 2008 Jun;9(6):512-5.

García-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stühmer W, Pardo LA. Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole. *J Gen Physiol.* 2004 Oct;124(4):301-17.

Gavrilova-Ruch O, Schönherr K, Gessner G, Schönherr R, Klapperstück T, Wohlrab W, Heinemann SH. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol.* 2002 Jul 15;188(2):137-49.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health.* 2006 Feb;96(2):252-61.

Gómez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knötgen H, Sánchez A, Hettmann T, Ossipov D, Weseloh R, Contreras-Jurado C, Rothe M, Stühmer W, Pardo LA. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7343-9.

Haitin Y, Carlson AE, Zagotta WN. The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):444-8.

Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR. An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):11-22.

Heaney RP, G Armas LA. Screening for Vitamin D Deficiency: Is the Goal Disease Prevention or Full Nutrient Repletion? *Ann Intern Med*. 2014 Nov 25. doi: 10.7326/M14-2573.

Hegle AP, Marble DD, Wilson GF. A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-à-go-go K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2886-91.

Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr*. 1996 Apr;126(4 Suppl):1159S-64S.

Ju M, Wray D. Molecular identification and characterisation of the human eag2 potassium channel. *FEBS Lett*. 2002 Jul 31;524(1-3):204-10.

Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, Bajna E, Hahn P, Mazzucco K, Bieglmayer C, Kato S, Cross HS. Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1429-35.

Kato S, Kim MS, Yamaoka K, Fujiki R. Mechanisms of transcriptional repression by 1,25(OH)₂ vitamin D. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007 Jul;16(4):297-304.

Kee BL. E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):175-84.

Kido S, Kaneko I, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K. Vitamin D and type II sodium-

dependent phosphate cotransporters. *Contrib Nephrol.* 2013;180:86-97.

Kim MS, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamaoka K, Yamamoto Y, Mihara M, Takeyama K, Kato S. 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol.* 2007 Feb;21(2):334-42.

Lin H, Li Z, Chen C, Luo X, Xiao J, Dong D, Lu Y, Yang B, Wang Z. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether α go-go K $^+$ channel. *PLoS One.* 2011;6(5):e20362.

Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):4-8.

Lundqvist J, Wikvall K, Norlin M. Vitamin D mediated regulation of CYP21A2 transcription a novel mechanism for vitamin D action. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Oct;1820(10):1553-9.

Lundqvist J, Hansen SK, Lykkesfeldt AE. Vitamin D analog EB1089 inhibits aromatase expression by dissociation of comodulator WSTF from the CYP19A1 promoter-a new regulatory pathway for aromatase. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jan;1833(1):40-7.

Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1- α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2000 Aug 4;87(3):214-20.

Meyer R, Heinemann SH. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol.* 1998 Apr 1;508 (Pt 1):49-56.

Mocellin S. Vitamin D and cancer: Deciphering the truth. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1816(2):172-8.

Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer*. 2009 Sep 15;125(6):1328-33.

Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J*. 1999 Oct 15;18(20):5540-7.

Pardo LA, Stühmer W. The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jan;14(1):39-48.

Occhiodoro T, Bernheim L, Liu JH, Bijlenga P, Sinnreich M, Bader CR, Fischer-Lougheed J. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett*. 1998 Aug 28;434(1-2):177-82.

Schönherr R, Löber K, Heinemann SH. Inhibition of human ether à go-go potassium channels by Ca(2+)/calmodulin. *EMBO J*. 2000 Jul 3;19(13):3263-71.

Schönherr R, Gessner G, Löber K, Heinemann SH. Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett*. 2002 Mar 13;514(2-3):204-8.

Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J*. 2010 Jan-Feb;16(1):1-9.

Tseng GN. I(Kr): the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 May;33(5):835-49.

Ufartes R, Schneider T, Mortensen LS, de Juan Romero C, Hentrich K, Knoetgen H,

Beilinson V, Moebius W, Tarabykin V, Alves F, Pardo LA, Rawlins JN, Stuehmer W. Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice. *Hum Mol Genet.* 2013 Jun 1;22(11):2247-62.

Wang D, Claus CL, Vaccarelli G, Braunstein M, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Rothenberg EV, Anderson MK. The basic helix-loop-helix transcription factor HEBAIt is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):109-19.

Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila eag* locus. *Science.* 1991 Jun 14;252(5012):1560-2.

Weber C, Mello de Queiroz F, Downie BR, Suckow A, Stühmer W, Pardo LA. Silencing the activity and proliferative properties of the human EagI Potassium Channel by RNA Interference. *J Biol Chem.* 2006 May 12;281(19):13030-7.

Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol.* 1996 Nov;154(2):91-107.

Wu Y, Miyamoto T, Li K, Nakagomi H, Sawada N, Kira S, Kobayashi H, Zakohji H, Tsuchida T, Fukazawa M, Araki I, Takeda M. Decreased expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 and TRPV6 in human renal cell carcinoma associated with vitamin D receptor. *J Urol.* 2011 Dec;186(6):2419-25.

Zambon A, Deeb SS, Pauletto P, Crepaldi G, Brunzell JD. Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol.* 2003 Apr;14(2):179-89.

Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF. Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):900-2.

13. Apéndice

Artículo publicado con los resultados de esta tesis.

A cis-acting element in the promoter of human ether à go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells

V. Cázares-Ordoñez, R.J. González-Duarte, L. Díaz, M. Ishizawa, S. Uno, V. Ortiz, M.L. Ordoñez-Sánchez, M. Makishima, F. Larrea, and E. Avila

Abstract: The human ether à go-go 1 potassium channel (hEAG1) is required for cell cycle progression and proliferation of cancer cells. Inhibitors of hEAG1 activity and expression represent potential therapeutic drugs in cancer. Previously, we have shown that hEAG1 expression is downregulated by calcitriol in a variety of cancer cells. Herein, we provided evidence on the regulatory mechanism involved in such repressive effect in cells derived from human cervical cancer. Our results indicate that repression by calcitriol occurs at the transcriptional level and involves a functional negative vitamin D response element (nVDRE) E-box type in the hEAG1 promoter. The described mechanism in this work implies that a protein complex formed by the vitamin D receptor-interacting repressor, the vitamin D receptor, the retinoid X receptor, and the Williams syndrome transcription factor interact with the nVDRE in the hEAG1 promoter in the absence of ligand. Interestingly, all of these transcription factors except the Williams D receptor-interacting repressor are displaced from hEAG1 promoter in the presence of calcitriol. Our results provide novel mechanistic insights into calcitriol mode of action in repressing hEAG1 gene expression.

Key words: 1,25-dihydroxyvitamin D₃, cervical cancer, hEAG K⁺ channel, VDIR, WSTF.

Résumé : Le canal potassique « ether à go-go » (hEAG1) est nécessaire à la progression du cycle cellulaire et à la prolifération des cellules cancéreuses. Les inhibiteurs de l'activité et de l'expression de hEAG1 représentent de potentiels agents thérapeutiques dans le cancer. Précédemment, les auteurs ont montré que l'expression de hEAG1 est régulée à la baisse par le calcitriol dans une variété de cellules cancéreuses. Ils fournissent ici des données relatives au mécanisme régulateur impliqué dans un tel effet répressif chez des cellules dérivées de cancer cervical humain. Leurs résultats indiquent que la répression par le calcitriol s'exerce au niveau transcriptionnel et implique un élément de réponse négatif fonctionnel à la vitamine D (nVDRE) de type à boîte E présent dans le promoteur de hEAG1. Le mécanisme décrit dans cet article implique qu'un complexe protéique formé par le répresseur VDIR (vitamin D receptor-interacting repressor), le récepteur de la vitamine D, le récepteur du rétinoïde X et le facteur de transcription WSTF (William syndrome transcription factor) interagisse avec le nVDRE du promoteur de hEAG1 en absence de ligand. Fait intéressant, tous ces facteurs de transcription, hormis VDIR, sont déplacés du promoteur de hEAG1 en présence de calcitriol. Ces résultats jettent un nouvel éclairage sur le mode d'action du calcitriol dans la répression de l'expression génique de hEAG1. (Traduit par la Rédaction)

Mots-clés : 1,25-dihydroxyvitamine D₃, cancer cervical, canal K⁺ hEAG1, VDIR, WSTF.

Introduction

The human ether à go-go 1 gene (hEAG1, KCNH1) encodes a voltage-gated potassium channel normally expressed in the brain, although its precise function is yet not well understood (Urrego et al. 2014). Lower expression of hEAG1 has been described in other tissues than brain; however, ectopically overexpression of hEAG1 is seen regularly in cancer (Pardo et al. 1999). Indeed, high hEAG1 expression has been detected in a variety of tumoral cells, and inhibition of hEAG1 function in cancer cells by different strat-

egies, reduces cell proliferation (Urrego et al. 2014). It is thought that its role is mainly in its ability to activate critical cellular mechanisms involved in the genesis of cancer (Downie et al. 2008). Therefore, therapies targeted against hEAG1 expression or activity are promising tools in treating cancer.

Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃), the hormonal active form of vitamin D₃ is the product of a metabolic activation process involving the skin, the liver, and the kidney. The main function of calcitriol is the regulation of calcium and phosphorus homeostasis; however, this hormone displays a variety of biological effects

Received 2 June 2014. Revision received 9 October 2014. Accepted 20 October 2014.

V. Cázares-Ordoñez and R.J. González-Duarte, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México; School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad # 3000, México, D.F. 04510, México.

L. Díaz, F. Larrea, and E. Avila, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México.

M. Ishizawa, S. Uno, and M. Makishima, Division of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences, Nihon University School of Medicine, Inabashi-ku, Tokyo, Japan.

V. Ortiz, Department of Physiology of Nutrition, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México.

M.L. Ordoñez-Sánchez, Department of Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Col. Sección XVI, México, D.F. 14000, México.

Corresponding author: Euclides Avila (e-mail: euclides.avila@quezonal.inozz.mx).

Biochem. Cell Biol. 93: 1–8 (2015) doi:10.1139/bcb-2014-0073

Published at www.nrcresearchpress.com/bcb on 22 October 2014.

that include antitumoral properties. The general mode of action of calcitriol is through the modulation of gene expression by binding to the vitamin D receptor (VDR), a nuclear receptor of the family of steroid hormone receptors [Carlberg and Campbell 2013]. According to the canonical model of gene regulation by the VDR, the heterodimer formed between this receptor and the retinoidX receptor (RXR) binds to vitamin D-responsive genes through different types of vitamin D response elements, and this interaction allows the recruitment and assembly of the general transcription machinery. It has been proposed that transcriptional repression by calcitriol is mediated through a protein complex that binds to negative vitamin D response elements (nVDREs) in target genes [Kato et al. 2007]. Most of the nVDREs reported are from the E-box type containing the sequence CANN TG. The VDR-RXR heterodimer, the vitamin D receptor-interacting repressor (VDIR), and the Williams syndrome transcription factor (WSTF) are reported to play important roles in the transcriptional repression by calcitriol [Barnett and Krebs 2011; Lundqvist et al. 2012, 2013; Murayama et al. 2004].

We have previously shown that calcitriol downregulates hEAG1 expression in cells from different types of cancer and from normal placental tissue [Avila et al. 2010; Garcia-Becerra et al. 2010]. Here, we report that the hEAG1 gene promoter contains a cis-acting element responsible of the negative regulation by calcitriol.

Materials and methods

Reagents

Calcitriol was donated by Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland). Antibodies against VDR, RXR, VDIR (E2A), and WSTF were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA). hEAG1 antibody was from Novus Biological (Littleton, USA).

Cell culture

SiHa and C33-A cervical cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, USA). Cells were seeded at a density of 1×10^4 per 100 mm cell culture dish in supplemented medium (DMEM medium without phenol red, with 5% charcoal-stripped heat inactivated fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin) and cultured under cell culture standard conditions for 24 h prior to calcitriol treatment.

hEAG1 immunolocalization and abundance by immunofluorescence staining

To analyze hEAG1 expression, SiHa cells were seeded onto sterile two-well chamber slides and incubated overnight. Afterwards the cells were exposed to 1 µmol/L calcitriol or its vehicle during 24 h. Then, cells were washed with PBS and incubated at -20 °C for 10 min in ice-cold acetone for fixation and permeabilization. After washing, cells were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h. Slides were then incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal anti-hEAG1 (1:300) in 1% BSA. For the negative control, cells were incubated in the absence of primary antibody. After a washing step, hEAG1 was labeled with Cy3-goat-anti rabbit IgG (1:250, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) for 2 h. Finally, a drop of Ultracruz mounting medium (Santa Cruz Biotechnology), which contains 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear visualization, was applied to air-dried slides, which were then cover slipped. Cells were photographed with a conventional fluorescence microscope. For each field, two single-color images were acquired for the evaluation of Cy3-hEAG1 and DAPI, respectively, by using an Olympus microscope equipped with an Olympus DP72 camera (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan), a 100 W high-pressure mercury burner and suitable filters for Cy3 and DAPI. For each fluorescent marker, all images were acquired during the same amount of time and a total of 90 and 100 cells were evaluated for the vehicle and calcitriol treatments, respectively, (10 cells from each field). The intensity of the fluorescent signal depicting hEAG1 protein expression was analyzed with

the ImageJ software (NIH, USA) on single color images (Cy3-hEAG1) obtained by converting the color images to gray scale. Then three different background values (optical densities) were obtained for each image. The average of these values was further subtracted from the measures obtained from each cell analyzed. Whole cell measures (cytoplasm and nucleus optical density) were obtained by using always the same area size. Finally, the mean optical density, standard deviation, and standard error were calculated for each treatment for graphical representation.

Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

Cellular RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 5 µg of total RNA were used for cDNA synthesis (Roche, Germany). Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using the LightCycler Taqman Master System and the LightCycler 2.0 Instrument from Roche. Each 10 µL reaction mixture consisted of 2 µL TaqMan Master 5x, 0.1 µL of specific Universal Probe Library Probe (10 µmol/L), 0.2 µL of each primer (10 µmol/L), and 3 µL template cDNA. Primer sequences were: left hEAG1 5'-CCTGGAGGTGATCCAAGATG-3', right hEAG1 5'-CCAAACAGCTCTCTTTCC-3' with probe number 49; left CYP24A1 5'-CATCATGGCCATCAAAACAA-3', right CYP24A1 5'-GCAGCTCGA-CTGGAGTGAC-3' with probe number 88; left glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 5'-AGCCACATCGCTGAGACAC-3', right GAPDH 5'-GCCCAATACGACAAATCC-3' with probe number 60. Thermal cycling consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 94 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s. Expression levels were calculated after normalization to the housekeeping gene GAPDH and results were expressed relative to values from vehicle-treated cells, which were set at 1.

Construction of luciferase reporter plasmids with hEAG1 promoter

Putative transcription factor binding sites in the hEAG1 promoter [Lin et al. 2011] were identified by MatInspector (Cartharius et al. 2005). Taking the results of this *in silico* analysis into account, a 832 bp fragment of the hEAG1 gene promoter was generated by PCR using the following primers: reverse primer 5'-TCCCTCTGGCTGCTACCC-3' and forward primer 5'-CTGTCCAGAAACCTTGGGTG-3'. Amplification reaction was performed with human genomic DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells derived from a healthy male donor. The resulting amplicon was subsequently cloned into the EcoRV site of the firefly luciferase reporter vector pGL4.10 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) to obtain the hEAG1 promoter-luciferase construct. The E-box of the hEAG1 promoter was mutated with the Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech, Mountain View, USA). The primer used for mutagenesis was 5'-CAGTTAGTTTTTACAGCTATCCCTGGTATACGG-3' and the 832 bp fragment of hEAG1 promoter was used as template. In all cases, sequences were confirmed by DNA sequencing on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Transient transfection of hEAG1 reporter plasmids and luciferase reporter assay

For transfection, SiHa (5×10^5) or C33-A (7×10^5) cells were seeded in 6-well plates in supplemented medium. The next day, cells were transfected using Fugene HD reagent according to the manufacturer's instructions (Roche). For normalization purposes, a Renilla luciferase expression vector was used in transfection studies. After transfection, the cells were treated with 1 µmol/L calcitriol or ethanol as vehicle. The luciferase reporter assay was performed 24 h after transfection. The cells were lysed by lysis buffer and harvested by manually scraping. Dual luciferase assays were performed using a Turner TD-20/20 luminometer according to the manufacturer's guidelines (Promega).

Western blot

Non-transfected and VDR-transfected C33A cells were lysed with RIPA buffer (9.1 mmol/L dibasic sodium phosphate, 1.7 mmol/L monobasic sodium phosphate, 150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) in the presence of protease inhibitors (Roche). Protein concentration was determined by bicinchoninic acid protein assay (Bio-Rad, Hercules, USA) with BSA as a standard. Proteins were separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels and transferred by wet electroblotting overnight at 25 volts to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated for 1 h with blocking buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20, and 5% nonfat milk). Blots were incubated overnight with an anti-VDR antibody (C-20 sc-1008, 1:200) and then incubated with a horseradish peroxidase-conjugated antibody (sc-2020, 1:2000; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h. The VDR was detected using a chemiluminescence assay system (Thermo Scientific, Waltham, USA), and membranes were stripped and reprobed for GAPDH (MAB374, 1:10000, Millipore (Billerica, USA)).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts from SiHa cells treated during 3 h with 0.1 μ mol/L calcitriol were prepared using the Cellytic NuCLEAR Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) following manufacturer's instructions. EMSAs were performed with the Gel Shift Assay System (Promega), using double-stranded probes generated by mixing the complementary oligonucleotides (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, USA) shown in Table 1. EMSAs were performed with 32 P end-labeled probes containing a previously characterized E-box type nVDRE (Murayama et al. 2004), the putative E-box in the hEAG1 gene promoter or a mutant form of this nVDRE. Eight micrograms of SiHa nuclear extracts, 17.5 fmol of each labeled probe, and 2 μ g of poly(dI-dC) were added per reaction. For supershift assays, samples were preincubated during at least 30 min with 3 μ g of a specific antibody against VDR before the incubation of the labeled probes with nuclear extracts. The DNA-protein complexes were resolved on 4% non-denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

EMSA using recombinant proteins was performed as reported previously (Endo-Umeda et al. 2012). In brief, VDR, RXR, and VDR isoforms (E2 and E47) were translated *in vitro* with a TNT Quick-Coupled Transcription/Translation System (Promega). Binding reactions were performed in a buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 50 mmol/L KCl, 0.05 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L MgCl₂, 8.5% glycerol, 1 mmol/L dithiothreitol, 0.5 μ g/ml poly(dI-dC), 0.1% Triton X-100, and nonfat milk. Samples were separated on 5% polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

ChIP was conducted as previously described (Matsunawa et al. 2012). After 2 h of calcitriol or ethanol (control) treatment, cellular components were cross-linked by incubation of SiHa and C33A cells (3×10^6 each) with 1% formaldehyde at 37 °C for 15 min. The cells were scraped with cold PBS. After centrifugation, the pellets were resuspended in lysis buffer (1% SDS, 10 mmol/L EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1) and then sonicated using 5 cycles of 30 s each (Ultrasonic Processor model GEX500, Geneq Inc., Montreal, Canada). The samples were precleared with salmon sperm DNA/protein G-agarose at 4 °C for 30 min. Supernatants were incubated with antibodies against VDR, VDR, RXR, and WSTF (catalog numbers sc-13133 X, sc-133075 X, sc-774 X, and sc-10636 X, respectively; Santa Cruz Biotechnology) or nonspecific IgG (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) at 4 °C overnight with shaking. Then, samples were immunoprecipitated with salmon sperm DNA/protein G-agarose at 4 °C for 1 h. The protein G-agarose was washed with 1 mL of each one of the following buffers: low-salt wash buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, and 2 mmol/L EDTA), high-salt wash buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, and 2 mmol/L EDTA),

Table 1. Primers used for EMSAs. The mutated nucleotides are underlined.

Double-stranded probe	Complementary oligonucleotides sequences
Canonical E-box	5'-CCATTAACCCACCTGGCATCTGCC-3' 5'-GGCAGATGGCAGGGTGGGTAATGG-3'
hEAG1 E-box	5'-CCGTATACCAAGGGGTCA GCTGTAAAAA C-3' 5'-GTTTTTACAGCTGACCCCTGGTATACGG-3'
hEAG1 E-box mut	5'-CCGTATACCAAGGG <u>CTT</u> AGCTGTAAAAAC-3' 5'-GTTTTTACAGCT <u>AAA</u> CCCTGGTATACGG-3'

and LiCl wash buffer (250 mmol/L LiCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.1, 500 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, and 2 mmol/L EDTA), followed by two washes with TE buffer (10 mmol/L Tris and 1 mmol/L EDTA, pH 8.0). DNA-protein complexes as well as the input samples were treated with 5 mol/L NaCl at 65 °C overnight to reverse cross-link and then incubated with proteinase K at 45 °C for 1 h. The DNA samples were purified by the Wizard DNA Clean-Up System (Promega). Using purified DNA as a template, PCR was conducted under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 2 min followed by 35 cycles each with denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 62 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, and final extension at 72 °C for 30 s. Primers used in hEAG1 E-box ChIP analysis were: 5'-TGTTGGGACATAGGCTTAGTC-3' and 5'-CTTGTCTCTAAGGGCGAATG-3'. PCR products were analyzed in 2% agarose gel.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was done using two-tailed Student's *t* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

To investigate the mechanism of repression of hEAG1 gene by calcitriol, we chose as a model the SiHa cells, which are cervical cells containing sequences of human papillomavirus type 16. These cells express high levels of hEAG1, as depicted in red in Fig. 1A (left). After incubating the cells in the presence of calcitriol, immunoreactive hEAG1 was significantly less abundant compared with vehicle treated cells (Figs. 1A and B). Negative control did not show any fluorescent signal (data not shown). According to immunocytochemical results showing that calcitriol reduces hEAG1 immunoreactivity, Fig. 1C shows that hEAG1 mRNA was also reduced in calcitriol-treated SiHa cells, which agree with a previous report from this laboratory (Avila et al. 2010).

To investigate the participation of VDR on calcitriol inhibition of hEAG1 gene expression, we used C33A cervical cells, which do not express the VDR (Fig. 2B, lanes 1 and 2). The relative expression of hEAG1 mRNA was similar in non-transfected C33A cells incubated in the presence or absence of 1 μ mol/L calcitriol (Fig. 2A). Furthermore, the well-known induction of CYP24A1 gene expression by calcitriol was not observed in these cells (Fig. 2A) in contrast to those C33A VDR-transfected cells, in which the calcitriol repressive effect on hEAG1 mRNA was evident (Fig. 2A). It is noteworthy to mention that VDR ectopic expression did not affect hEAG1 mRNA levels in VDR-transfected C33A cells incubated with ethanol as control (Fig. 2A). These results indicate that the VDR is required in the mechanism for hEAG1 repression by calcitriol.

To investigate if calcitriol affects the stability of hEAG1 mRNA, we performed RT-qPCR analysis in SiHa cells treated with calcitriol or its vehicle in the presence of the RNA synthesis-inhibitor actinomycin D. The results in Fig. 3A depict that CYP24A1 mRNA levels in calcitriol-stimulated and nonstimulated cells did not increase in the first 4 h, and that the effect of calcitriol increased progressively thereafter, the difference being significant ($P < 0.05$). The results in Fig. 3B depict that hEAG1 mRNA levels had the same

Fig. 1. Calcitriol downregulates both hEAG1 mRNA and protein expression in S1Ha cells. (A) S1Ha cells were seeded onto glass chamber slides and incubated in the absence (left) or the presence of $1 \mu\text{mol/L}$ calcitriol (right) during 24 h. Labeled with Cy3 (red) hEAG1 is shown. Representative merged pictures for visualizing hEAG1 (red) together with DAPI (blue) for nuclear visualization are shown. (B) Densitometric analysis of hEAG1 immunoreactivity is shown in graphic form. Bars represent the mean \pm SE of 90 and 100 cells evaluated for vehicle (control) and calcitriol treatment, respectively. (C) RT-qPCR analysis in S1Ha cells treated in the presence of $1 \mu\text{mol/L}$ calcitriol or ethanol as vehicle (control). Results are presented as mRNA expression of hEAG1 relative to the GAPDH mRNA. Bars represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control. (Please see online version for colour.)

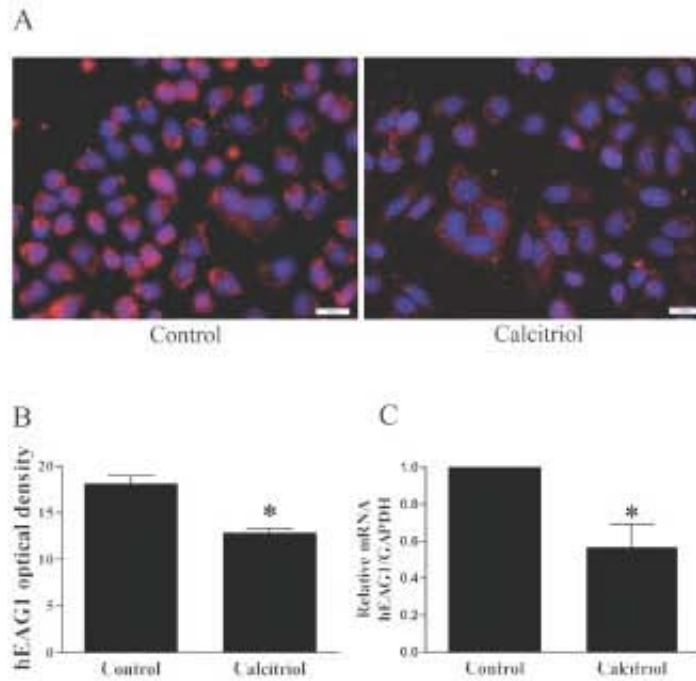


Fig. 2. The VDR is required for downregulation of hEAG1 mRNA by calcitriol. (A) VDR-transfected or non-transfected C33-A cells were grown in supplemented DMEM and then incubated in the presence of $1 \mu\text{mol/L}$ calcitriol or ethanol as vehicle (control) during 24 h. RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR for both hEAG1 (solid bars) and CYP24A1 (open bars). Bars represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. Results are presented as mRNA expression relative to GAPDH mRNA. * $P < 0.05$ vs. respective control. (B) Western blot analysis of VDR and GAPDH in non-transfected C33-A incubated either with vehicle (lane 1) or $1 \mu\text{mol/L}$ calcitriol (lane 2) or in C33-A cells transfected with an expression vector for VDR and treated with $1 \mu\text{mol/L}$ calcitriol (lane 3).

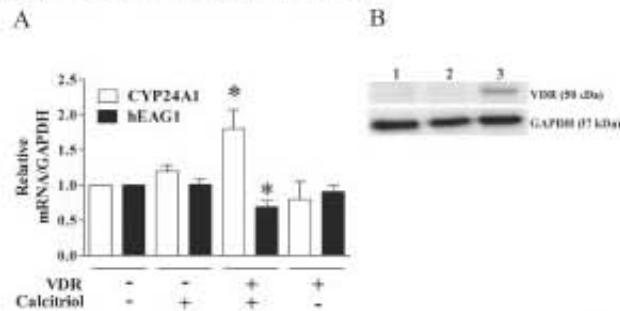
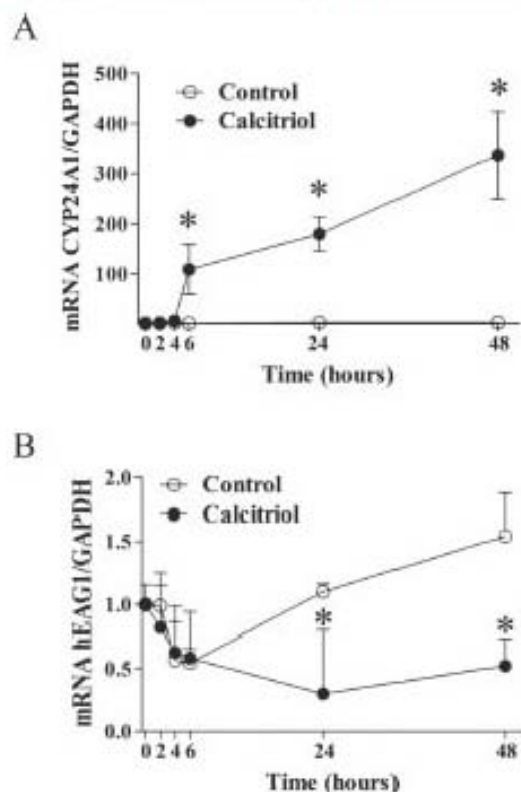


Fig. 3. Calcitriol does not affect the hEAG1 mRNA stability in SiHa cervical cancer cells. SiHa cells were grown in supplemented DMEM and then incubated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of actinomycin D. After 3 h (time zero), cells were incubated in the presence of 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ calcitriol or ethanol as vehicle (control). Then, cells from control and treated groups were harvested at the indicated times, and RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR. Each point represents the mean \pm SD of CYP24A1 (A) or hEAG1 (B) mRNA relative to GAPDH mRNA. Results are expressed relative to values from vehicle-treated cells, which were set at 1. * $P < 0.05$ vs. control at the same time.

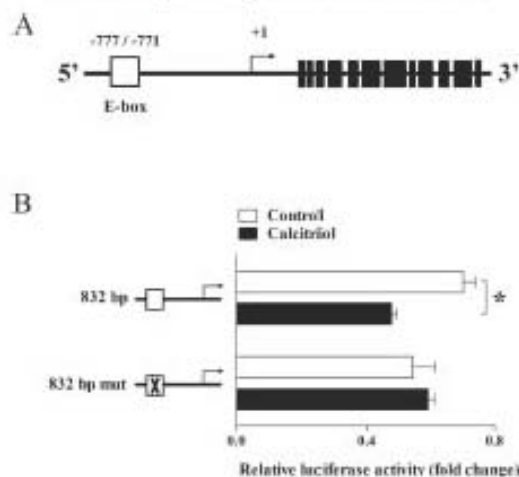


pattern regardless the presence of calcitriol between 0 and 6 h after the addition of actinomycin D, a time frame in which the transcription machinery was inhibited. These results suggest that hEAG1 mRNA stability was not affected by calcitriol at least in this time frame. In accordance to our results in Fig. 2, significantly lower levels of hEAG1 mRNA were observed in calcitriol-treated cells compared with ethanol-treated cells when transcription machinery resumed its function after the inhibition elicited by actinomycin D (Fig. 3B).

To explore the regulatory mechanism of calcitriol on hEAG1 transcription, identification of functional negative vitamin D response elements (nVDREs) in the hEAG1 promoter was investigated, taking into account the previously reported sequence of hEAG1 promoter [Lin et al. 2011]. The *in silico* analysis of a 4 kb sequence upstream from the hEAG1 transcription start site showed a potential nVDRE E-box type, located at -771 to -777 (Fig. 4A).

A fragment of 832 bp comprising this nVDRE was amplified and cloned in a luciferase reporter vector, and the resulting construct

Fig. 4. The hEAG1 promoter contains a cis-acting element responsible of the repression by calcitriol. (A) Schematic representation of the hEAG1 gene depicting the negative vitamin D response element E-box type as an open square. (B) Luciferase reporter assays were performed in SiHa cells transfected with either reporter construct with the wild type E-box or a plasmid bearing a mutation in this E-box. Transfected cells were incubated during 24 h in the presence of 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ calcitriol or ethanol as vehicle (control). Results are expressed as the ratio of dual luciferase activities. Bars represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

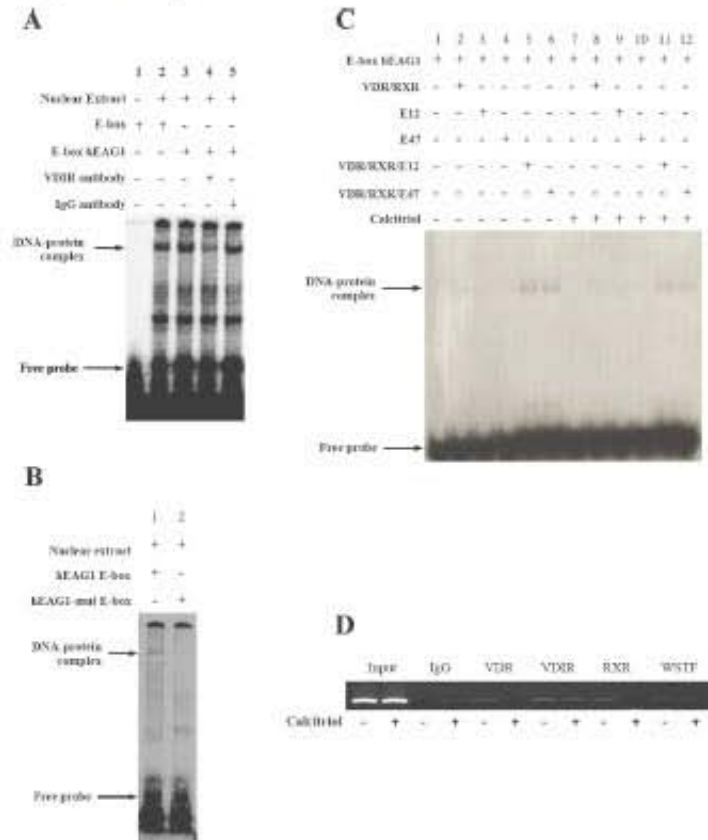


was transiently transfected into SiHa cells to evaluate the effect of calcitriol on hEAG1 promoter activity. Figure 4B shows a significant 30% reduction of luciferase activity in SiHa transfected cells incubated in the presence of 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ calcitriol. In addition, the effect of calcitriol on a luciferase reporter plasmid bearing a nVDRE mutant, as described under material and methods, was also studied. When this mutant reporter was transfected in SiHa cells, calcitriol lost its repressive effect on luciferase activity, compared with wild-type reporter (Fig. 4B). These results indicated that the E-box sequence was important for calcitriol-transcriptional regulation effects on hEAG1.

In addition, the binding activity of nuclear proteins to this nVDRE was studied by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). For this, nuclear extracts from SiHa cells treated during 3 h with calcitriol (100 nmol/L) were incubated with a radiolabeled DNA probe containing the putative nVDRE. Figure 5A shows a protein-DNA complex formed only in the presence of hEAG1-nVDRE, similar to that observed in the presence of a canonical E-box (lanes 2 and 3). Since it has been reported that nVDREs are able to physically interact with the vitamin D receptor-interacting repressor (VDIR) [Murayama et al. 2004], we studied if this transcription factor binds to the hEAG1-nVDRE. The addition of a VDIR specific antibody resulted in reduced complex formation, while a non-specific antibody did not modify the abundance of this complex (Fig. 5A, lanes 4 and 5). Furthermore, incubation in the presence of mutated hEAG1-nVDRE reduced the formation of DNA-protein complex (Fig. 5B lanes 1 and 2).

Figure 5C shows the EMSA results of incubations in the presence of hEAG1-nVDRE and *in vitro* translated VDR, RXR α , and the E12 and E47 isoforms of VDIR. As shown, a DNA-protein complex was formed in the presence of VDR, RXR α , and VDIR isoforms in the absence of calcitriol (Fig. 5 lanes 5 and 6). The complex was also formed in the presence of VDR and RXR (lane 2), E12 (lane 3),

Fig. 5. The E-box in the hEAG1 promoter interacts with VDIR, VDR, RXR, and WSTF. (A) Nuclear extracts of SiHa cells treated with 0.1 μM calcitriol were incubated with the indicated radiolabeled-probes for a canonical E-box or the wild-type E-box in the hEAG1 promoter. A VDIR antibody or an unspecific IgG was used. (B) SiHa nuclear extracts were also incubated with radiolabeled-probes for wild-type hEAG1 E-box or a mutant form of this E-box (hEAG1-mut E-box). (C) RXR, VDR, and E12 and E47 isoforms of VDIR were obtained by *in vitro* translation. The whole lysates were incubated with radiolabeled probes containing the E-box of hEAG1 promoter in the absence or the presence of 1 μM calcitriol. In panels A and B, representative electrophoretic mobility shift assays are shown. (D) Chromatin immunoprecipitation analysis were performed on SiHa cells incubated in the absence or the presence of 1 μM calcitriol during 2 h. Soluble chromatin was immunoprecipitated with antibodies against VDR, VDIR, RXR, and WSTF and subjected to PCR analysis with appropriate set of primers flanking the E-box in the hEAG1 promoter. A non-specific IgG was used as negative control.



and E47 (lane 4), but the signal was very weak. In this case, we expected that if a protein-DNA complex including VDR, RXR, and VDIR was formed, then its migration should be retarded compared with that of a complex containing only VDR and RXR (or only VDIR isoforms). However, one limitation of EMSA is that the mobility of a protein-DNA complex depends on many factors besides the size of the proteins, and for this reason EMSA does not necessarily provide a direct measure of the molecular weights of proteins that are present in the complex (Adams and Fried 2007). Interestingly, the incubation of EMSA reactions with calcitriol resulted in a reduction in the intensity of DNA-protein complex formed in the presence of VDR, RXR α , and VDIR isoforms compared with the respective vehicle-treated controls (Fig. 5, lanes 7-12).

Finally, we studied by ChIP assays if the binding of VDIR, VDR, RXR, and WSTF to the identified hEAG1-nVDRE occurs *in vivo*; therefore, SiHa cells were incubated in the presence or absence of 1 μM calcitriol. Figure 5D shows a 282 bp PCR product in the immunoprecipitates with VDR, VDIR, RXR, and WSTF antibodies in the absence of calcitriol. However, in cells incubated with calcitriol, no PCR product was detected with the DNA purified from anti-VDR, anti-RXR, and anti-WSTF immunoprecipitates. Only in the case of VDIR-immunoprecipitates, the PCR product was evident in calcitriol-treated cells (Fig. 5D).

Discussion

The transcriptional repression of target genes by calcitriol is much less well understood than its transcriptional activation mecha-

nisms. The available information indicates that mechanisms controlling calcitriol mediated downregulation are complex.

Our group have previously reported that binding of calcitriol to VDR represses the expression of hEAG1 in normal cells and several cell lines from prostate, cervical, and breast cancer (Avila et al. 2010; García-Becerra et al. 2010; García-Quiroz et al. 2012). Herein, we examined the mechanism of action of calcitriol upon hEAG1 gene expression in cancer cervical cells. We observed that repression of hEAG1 gene by calcitriol did not involve the degradation of its mRNA, suggesting that the repressive effect occurs at the transcriptional level. The results in SiHa and C33-A cervical cells support that VDR had a key role in the repressive mechanism exerted by calcitriol.

In this report, the transactivation studies with luciferase activity showed that repression by calcitriol is only observed in the presence of hEAG1 promoter bearing an E-box located at -771 upstream the transcriptional start site. These results suggested that this sequence located in the proximal promoter of hEAG1 functions as a negative VDRE, as has been previously characterized in the promoter region of CYP27B1, PTHrP, CYP21A2, and CYP19A1 genes (Kim et al. 2007; Lundqvist et al. 2012, 2013; Murayama et al. 2004).

The CYP27B1 nVDR E-box type interacts directly to E σ isoform of the helix-loop-helix transcription factor VDR rather than to the heterodimer VDR/RXR (Murayama et al. 2004). Interestingly, in this study, the VDR binds both in vitro and in vivo to the E-box located in the hEAG1 promoter regardless of the presence of calcitriol, which suggests that VDR is constitutively bound to this cis-acting element of hEAG1 promoter. Importantly, VDR, RXR, and WSTF were found to be associated with the E-box of the hEAG1 gene only in the absence of calcitriol. Considering all the evidence presented herein, we propose a model for the regulation of hEAG1 gene by calcitriol. In the absence of calcitriol, VDR/RXR, WSTF, and VDR bound to the E-box in the hEAG1 promoter allow for basal transcription of hEAG1 gene. In the presence of calcitriol, VDR remains bound to the E-box, while the VDR/RXR heterodimer and WSTF are displaced from this site, probably being recruited to VDR, which may constitute the signal for the binding of corepressors, histone deacetylases, and chromatin remodeling factors. Such a model share some similarities with the mechanisms of repression of CYP27B1 by liganded-VDR, which involves a corepressor swapping from histone acetyltransferase to a histone deacetylase on a complex formed between VDR and a E-box in the promoter (Murayama et al. 2004). Genome-wide studies have revealed that under basal condition, VDR is widely bound across the genome (Pike 2011). It is possible that VDR prebound on VDRE-box is displaced by ligand treatment, as previously proposed (Pike and Meyer 2013). In this study, we demonstrated that the multifunctional protein WSTF is part of the complex of proteins associated on hEAG1 E-box in the absence of calcitriol. WSTF is an essential factor in the calcitriol mediated suppression of both steroid 21-hydroxylase and aromatase genes (Lundqvist et al. 2012, 2013). In these genes with key roles in steroidogenesis, the complex formed by VDR, VDR, RXR, and WSTF on negative VDREs specifically dissociate WSTF from the promoters in the presence of calcitriol or its analogs. The results presented herein are in line with this evidence. It is interesting to note that WSTF plays roles in transcription regulation, chromatin assembly, and DNA repair (Barnett and Krebs 2011). Although the detailed molecular events occurring on hEAG1 promoter deserves further investigation, the available information suggests that repression by calcitriol is a variant of a general mechanism that includes recruitment of corepressors, as well as epigenetic mechanisms such as histone deacetylation and DNA methylation (Kato et al. 2007). We propose that the VDR may act as a switch of conformational changes that allows other proteins to repress hEAG1 gene expression. In this case, VDR might participate as a key initiator factor for this repressive

effect. Further studies are needed to elucidate the assembly of the repression machinery in the presence of calcitriol.

The overexpression of hEAG1 is considered as an early marker of cervical cancer (Farias et al. 2004; Ortiz et al. 2011). Furthermore, etiological factors of cervical cancer such as E6 and E7 high-risk papillomavirus oncoproteins and estrogens increased the expression of hEAG1 in several models of this disease (Diaz et al. 2009). The immunocytochemical data presented herein demonstrated a high basal expression of hEAG1 in SiHa cervical cells, which probably resulted from the combined effects promoted by E2F transcription factor and E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus-16 (Diaz et al. 2009; Lin et al. 2011). It has been demonstrated that cells derived from cervical cancer are growth-inhibited by calcitriol (Avila et al. 2010). In this type of tumour, high levels of VDR and enzymes needed for calcitriol synthesis and catabolism are observed (Friedrich et al. 2003). Therefore, the expression of key components for vitamin D actions highlights cervical cancer as a potential target of calcitriol.

In summary, this study reports novel mechanistic insights for the understanding of the calcitriol-mediated hEAG1 gene repression.

Acknowledgements

We acknowledge with thanks to Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland) for their calcitriol donation. This work was supported by grant Nos. 106422 and 153862 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). This article is part of the doctoral thesis of VCO who is a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Mexico) under the fellowship 307284 from CONACYT. This work was also supported by the Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) and the Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE-UNAM).

References

- Adams, C., and Fried, M.C. 2007. Analysis of protein-DNA equilibria by native gel electrophoresis. In *Protein Interactions: Biophysical Approaches for the Study of Complex, Reversible Systems*. Edited by P. Schuck. Academic Press, New York. pp. 407–446.
- Avila, E., García-Becerra, R., Rodríguez-Ruiz, J.A., Diaz, L., Ortiz-Rosado, D., Zúñiga, U., et al. 2010. Calcitriol down-regulates human ether a-go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res.* 30(7): 2647–2672. PMID:20662996.
- Barnett, C., and Krebs, J.E. 2011. WSTF does it all: a multifunctional protein in transcription, repair, and replication. *Biochem. Cell Biol.* 89(1): 13–23. doi:10.1007/s12278-010-9195-0. PMID:21126395.
- Carlberg, C., and Campbell, M.J. 2013. Vitamin D receptor signaling mechanisms: improved actions of a well-defined transcription factor. *Semin.* 78(2): 129–136. doi:10.1016/j.semnbs.2012.10.012. PMID:23178230.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, E., Huhnleiner, M., Klugenstein, A., et al. 2005. Macropredictor and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 21(23): 2933–2942. doi:10.1093/bioinformatics/bti178. PMID:15861052.
- Diaz, L., Orta-Ochoa, I., Estrero-Angulo, I., Larrea, F., Avila-Chavez, E., García-Becerra, R., et al. 2009. Estrogen and human papilloma virus oncoproteins regulate human ether a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res.* 69(9): 3300–3307. doi:10.1158/0008-5472.CCR-08-2036. PMID:19121963.
- Dawlat, R.K., Sanchez, A., George, H., Contreras-Jurado, C., Ojomojoko, M., Weber, C., et al. 2008. Igg expression interferes with hypoxia histone marks and induces angiogenesis in tumors. *J. Biol. Chem.* 283(27): 18214–18220. doi:10.1074/jbc.M801831000. PMID:18927018.
- Eado-Umeda, K., Doo, S., Fujitani, K., Naito, Y., Saito, K., Yamagishi, K., et al. 2012. Differential expression and function of alternative splicing variants of human *Wnt1* A receptor alpha. *Mol. Pharmacol.* 81(5): 810–820. doi:10.1124/mol.121.07206. PMID:22109489.
- Farias, L.M., Ocaña, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., et al. 2004. Ether a-go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res.* 64(9): 6946–6951. doi:10.1158/0008-5472.CCR-04-1214. PMID:15461392.
- Friedrich, M., Rab, L., Mischke, T., Tilgen, W., Schmidt, W., and Reichrath, J. 2003. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinoma, breast cancer and ovarian cancer. *Recent results in cancer research. Recent Results Cancer Res.* 164: 239–246. doi:10.1007/978-3-642-02280-0_17. PMID:12691926.
- García-Becerra, R., Diaz, L., Gutierrez, J., Barreto, D., Ortiz-Rosado, D., Morales, A.,

- et al. 2010. Calcitriol inhibits ether-a-go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 316(3): 433–442. doi:10.1016/j.yexcr.2009.11.008. PMID:19922096.
- García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Barrera, D., Santos, N., Avila, E., Ortiz-Saucá, U., et al. 2012. Atrametinol synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy. *PLoS One*, 7(9): e43063. doi:10.1371/journal.pone.0043063. PMID:22946630.
- Kam, S., Kim, M.S., Yamaoka, K., and Fujiki, K. 2007. Mechanisms of transcriptional repression by 1,25(OH)₂ vitamin D. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16(4): 297–304. doi:10.1097/MNH.0b013e318032570. PMID:17563270.
- Kim, M.S., Fujiki, K., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamaoka, K., Yamamoto, Y., et al. 2007. 1,25(OH)₂D₃-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 21(2): 334–342. doi:10.1210/me.2006-0231. PMID:17093373.
- Liu, H., Li, Z., Chen, C., Luo, X., Xiao, J., Dong, D., et al. 2011. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether a go-go K⁺ channel. *PLoS One*, 6(5): e20362. doi:10.1371/journal.pone.0020362. PMID:21603346.
- Lundqvist, J., Wikvall, K., and Norlin, M. 2012. Vitamin D-mediated regulation of CYP24A1 transcription - a novel mechanism for vitamin D action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820(10): 1553–1559. doi:10.1016/j.bbagen.2012.04.017. PMID:22561756.
- Lundqvist, J., Hansen, S.K., and Lykkefeldt, A.E. 2013. Vitamin D analog EB1089 inhibits aromatase expression by dissociation of co-repressor WSTF from the CYP19A1 promoter: a new regulatory pathway for aromatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1831(1): 46–47. doi:10.1016/j.bbancer.2012.10.012. PMID:23083504.
- Matsuzawa, M., Akagi, D., Uno, S., Endo-Umeda, K., Yamada, S., Ikeda, K., and Makishima, M. 2012. Vitamin D receptor activation enhances benz[a]pyrene metabolism via CYP1A1 expression in macrophages. *Drug Metab. Dispos.* 40(11): 2059–2066. doi:10.1124/dmd.112.046820. PMID:22837390.
- Murayama, A., Kim, M.S., Yasagizawa, J., Takeyama, K., and Kam, S. 2004. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.* 23(7): 1598–1608. doi:10.1038/emboj.2004.123. PMID:15034023.
- Ortiz, C.S., Montante-Montes, D., Saqui-Salces, M., Hinojosa, L.M., Gamboa-Dominguez, A., Hernandez-Gallegos, E., et al. 2011. Eagt potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Diagn. Rep.* 24(6): 1377–1383. doi:10.1892/br.2011.1441. PMID:21887469.
- Parfó, L.A., del Camino, D., Sanchez, A., Aves, F., Besagemann, A., Beckh, S., and Stahmer, W. 1999. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 18(20): 3540–3547. doi:10.1093/emboj/18.20.3540. PMID:10523298.
- Pike, J.W. 2011. Genome-wide principles of gene regulation by the vitamin D receptor and its activating ligand. *Mol. Cell. Endocrinol.* 347(1–2): 3–10. doi:10.1016/j.mec.2011.05.012. PMID:21664236.
- Pike, J.W., and Meyer, M.E. 2013. Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jsbmb.2013.11.004. PMID:24230506.
- Urengo, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stahmer, W., and Parfó, L.A. 2004. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc., B*, 369(1638): 20330094. doi:10.1098/rstb.2011.0094. PMID:24403742.