

00524  
172



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE E3KARP Y MAZ COMO  
CORREGULADORES DE RECEPTORES DE HORMONAS  
ESTEROIDES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ENRIQUE SALVADOR SANCHEZ ALCANTARA



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MEXICO, D. F.

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

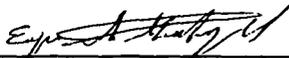
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**Jurado asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>Prof.</b>	<b>Marisol López López</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof.</b>	<b>Jorge Manuel Vázquez Ramos</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof.</b>	<b>Elizabeth Langley McCarron</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Prof.</b>	<b>Raquel Ortega Muñoz</b>
<b>2do. Suplente</b>	<b>Prof.</b>	<b>Manuel Román Saavedra Trejo</b>

**El tema se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".**

  
\_\_\_\_\_  
Asesor  
Dra. Elizabeth Langley McCarron

  
\_\_\_\_\_  
Sustentante  
Enrique S. Sánchez Alcántara

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Enrique Salvador Sánchez Alcántara

FECHA: 08/04/13

FIRMA: Enrique Sánchez Alcántara

## **Dedicatorias**

Antes que nada a mi pequeño mundo, a mi mamá, a quien amo por haberme permitido existir y ser feliz, por acompañarme y seguirme ilusionada en todos mis sueños, que al final resultan ser también los suyos. Gracias, porque se que tu amor y confianza no tienen límites.

A mi madrina, Mina, quien me recibió como a un hijo y me enseñó a vivir y disfrutar de la vida, me mostró sus sueños y me permitió aprender de ellos hasta convertirlos en algo propio. No se que habría sido de mi sino hubieras estado conmigo.

Ustedes son mi mundo, ustedes me han forjado a través de su ejemplo y de su amor, ustedes me han hecho feliz, por eso éste trabajo es de ustedes.

A mis padrinos, Salvador y Socorro Gómez, quienes son ejemplo de aquello que quisiera llegar a ser.

A Cristina Ramos, mi madrina no oficial, y a toda su familia, porque siempre he encontrado en ellos un apoyo que nunca imaginé.

Al Dr. Hector Elizalde, al Sr. Jerge Sánchez, al Dr. Ernesto Fernández y a la Sra. Gracieala Fernández, porque cada uno de ellos ha contribuido para que sea una mejor persona, una persona más feliz.

A Elizabeth Langley (mi HHH jefajj) por la paciencia y la dedicación que le ha puesto a este trabajo, que espero que sea el primero de una fructífera carrera.

### **A mis amigos y compañeros:**

- ▲ Gabriela, una de las personas que mejor me conoce, con quien compartí grandes momentos, sueños, ilusiones, tristezas. Gracias por todo lo que aprendí de ti, gracias por compartir un poquito de tu vida conmigo. Eres una parte muy importante de mi vida.
- ▲ Argelia, a quien le tengo una enorme confianza y cariño, porque has escuchado y tratado de comprender aquello que te he contado, gracias por tu paciencia.
- ▲ Simael, uno de mis pocos amigos, con quien comparto una visión de la vida y de quien he aprendido una forma distinta de vivir y entender la amistad.
- ▲ Lorelei, siempre me has sorprendido por la confianza que me has tenido y que ha provocado que yo te considere como una amiga. También te tengo mucha confianza, gracias por todo.
- ▲ Luis, uno de mis mejores amigos y de los más fieles a pesar de estar alejados. Gracias por tu amistad.

- ▲ A Liz, Miriam, Ángeles Mina y Elena por haber compartido una parte importante de mi vida, mi estancia en la Universidad
- ▲ A Silvia, Betty, Luz, Romina y Erika con quienes he compartido regaños, consejos y el inicio de una buena amistad

### **Agradecimientos:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Química por ser mi hogar durante estos años.

A mis maestros, a aquellos que me marcaron para toda la vida.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por haberme permitido desarrollar parte de mi trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Alfonso León del Río, por iniciar el proyecto y brindarme las facilidades para trabajar en su laboratorio.

A los integrantes del laboratorio Irma y Tulia, a Maribel por soportarme. A Gaby, nuestra agregada cultural, quien ya es parte del laboratorio.

## ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Receptores nucleares.....	5
<b>1. Clasificación</b>	
1.1 Receptores nucleares tipo I ó de hormonas esteroides.....	5
1.2 Receptores nucleares tipo II ó no esteroides.....	9
1.3 Receptores nucleares huérfanos.....	9
<b>2. Estructura de los receptores nucleares</b>	
2.1 Dominio A/B.....	10
2.2 Dominio de unión a DNA (DBD).....	11
2.3 Región D.....	12
2.4 Dominio de unión a ligando (LBD).....	12
<b>3. Mecanismo de acción de los receptores de hormonas esteroides.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Correguladores de receptores nucleares</b>	
4.1 Factores generales de transcripción (GTF).....	16
4.2 Factores de transcripción secuencia específicos.....	19
4.3 Coactivadores.....	20
4.3.1 Familia p160.....	21
4.4 Cointegradores	
4.4.1 CBP/p300.....	23
4.4.2 complejo TRAP/DRIP.....	25
4.5 Otros coactivadores.....	25
4.6 Remodeladores de cromatina.....	27
4.7 Correpresores.....	28
4.8 Mecanismos de regulación de los correguladores de los receptores nucleares.....	31

5. Antecedentes.....	33
6. Objetivo general.....	36
7. Objetivos particulares.....	36
8. Metodología	
8.1 Transfección de MAZ y E3KARP en la línea celular CV-1.....	37
8.2 Ensayo de luciferasa y $\beta$ -galactosidasa.....	40
8.2.1 Ensayo de luciferasa.....	40
8.2.2 Ensayo de $\beta$ -galactosidasa.....	40
8.3 Amplificación de la secuencia de los dominios amino y carboxilo terminal de PR y ER $\alpha$ .....	41
8.4 Clonación de los dominios amino y carboxilo terminal de PR y ER $\alpha$ en pDEST15 (Gateway, Invitrogen) para obtener los dominios fusionados a GST.....	43
8.5 Expresión de los dominios amino y carboxilo terminal de ER $\alpha$ , PR y AR en la cepa BL21-AI de <i>E. coli</i> .....	45
8.6 Purificación de los dominios amino y carboxilo terminal fusionados a GST e interacción in vitro con MAZ y E3KARP marcados con [ $^{35}$ S].....	45
8.7 Visualización de la interacción: autoradiografía y western blot.....	47
9. Resultados	
9.1 Influencia de E3KARP sobre la expresión del gen reportero de luciferasa regulado por los receptores de andrógenos, estrógenos alfa y progesterona.....	49
9.1.1 Transfección de AR y E3KARP en la línea celular CV-1: influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa regulada por AR.....	49
9.1.2 Transfección de ER $\alpha$ y E3KARP en la línea celular CV-1: influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa regulada por ER $\alpha$ .....	51

9.1.3	Transfección de PR y E3KARP en la línea celular CV-1: influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa regulada por PR.....	52
9.2	Influencia de MAZ sobre la expresión del gen reportero de luciferasa regulado por los receptores de andrógenos, estrógenos alfa y progesterona.....	54
9.2.1	Transfección de AR y MAZ en la línea celular CV-1: influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa regulada por AR.....	54
9.2.2	Transfección de ER $\alpha$ y MAZ en la línea celular CV-1: influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa regulada por ER $\alpha$ .....	55
9.2.3	Transfección de PR y MAZ en la línea celular CV-1: influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa regulada por PR.....	57
9.3	Clonación de los dominios amino y carboxilo terminal de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos.....	58
9.4	Interacción <i>in vitro</i> : autorradiografía.....	61
10.	Discusión.....	63
11.	Conclusiones.....	73
12.	Referencias.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ligandos naturales de los receptores de hormonas esteroideas (Tipo I) y de los receptores de hormonas no esteroideas (Tipo II).....	6
Figura 2. Estructura general de un receptor nuclear .....	10
Figura 3. Dominio de unión a DNA (DBD) del receptor de estrógenos alfa.....	11
Figura 4. Estructura del dominio de unión a ligando (LBD) con diferentes hormonas.....	13
Figura 5. Mecanismo general de acción de los receptores de hormonas esteroideas.....	15
Figura 6. Clasificación de coreguladores.....	17
Figura 7. Proceso de transcripción.....	18
Figura 8. Factores de transcripción de secuencia específica (FTSE).....	20
Figura 9. Representación de la estructura de la familia de coactivadores p160.....	23
Figura 10. Probable mecanismo de acción de los coactivadores de los receptores nucleares.....	29
Figura 11. Alineación de la secuencia de aminoácidos de E3KARP y SIP-1.....	34
Figura 12. Influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa mediada por AR en células CV-1.....	50
Figura 13. Influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa mediada por ER $\alpha$ en células CV-1.....	51
Figura 14. Influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa mediada por PR en células CV-1.....	53
Figura 15. Influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa mediada por AR en células CV-1.....	55
Figura 16. Influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa mediada por ER $\alpha$ en células CV-1.....	56
Figura 17. Influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa mediada por PR en células CV-1.....	57
Figura 18. Amplificación de la secuencia de los dominios amino de progesterona y carboxilo del receptor de estrógenos alfa por PCR de gradiente.....	59
Figura 19. Western blot de los dominios amino y carboxilo de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos.....	60
Figura 20. Interacción de E3KARP con los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los receptores nucleares.....	7
Tabla 2. Diseño de las transfecciones transitorias con MAZ y E3KARP.....	38
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares.....	39
Tabla 4. Características de los vectores de fusión y los fragmentos clonados.....	43

**ABREVIATURAS**

AF-1	Región de transactivación 1
AF-2	Región de transactivación 2
AR	Receptor de andrógenos
CBP	Proteína de unión a CREB
CTE	Extensión carboxilo terminal
DA	Dominio de activación
DBD	Dominio de unión a DNA
DIR	Dominio de interacción con RN
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatos
E3KARP	Proteína reguladora de la cinasa A de NHE3
ER	Receptor de estrógenos
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógenos beta
FTSE	Factores de transcripción de secuencia específica
GFP	Proteína verde fluorescente
GR	Receptor de glucocorticoides
GST	Glutación-S transferasa
GTF	Factor general de transcripción
HAT	Actividad de acetiltransferasa
hsp	Proteína de choque térmico
LBD	Dominio de unión a ligando
LXXLL	Secuencia de interacción de coactivadores con RN
MAZ	Proteína asociada a <i>c-myc</i>
MR	Receptor de mineralocorticoides
NLS	Señal de internalización nuclear
NPC	Complejo del poro nuclear
NR	Receptor nuclear
NTD	Dominio amino terminal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Receptor de progesterona
RAR	Receptor de ácido trans retinoico
RE	Elemento de respuesta
RNA	Ácido ribonucleico
RNAPII	RNA polimerasa III
RXR	Receptor de ácido 9- <i>cis</i> retinoico
SERM	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos
SIP-1	Proteína de interacción con SRY
SRC-1	Coactivador de los receptores esteroideos 1
SRY	Factor determinante de testículo
TAF	Factor que interacciona con TBP
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TR	Receptor de hormona tiroidea
URL	Unidad relativa de luz

## RESUMEN

En este trabajo se estudió la influencia que las proteínas E3KARP y MAZ, que fueron identificadas en un ensayo de doble híbrido con el dominio amino del receptor de estrógenos alfa, tienen en la expresión de genes regulados por receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona.

Para la caracterización de E3KARP y MAZ como probables correguladores de los receptores de hormonas esteroides, se cotransfectaron los receptores de hormonas esteroides así como a E3KARP ó MAZ en la línea celular CV-1. Los resultados obtenidos muestran que E3KARP incrementa los niveles de expresión cuando es cotransfectado con los receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona. MAZ, por el contrario, disminuye ligeramente la expresión de luciferasa cuando se cotransfecta con los mismos receptores.

Para comprobar la interacción directa de E3KARP y MAZ con los receptores nucleares, se hicieron construcciones con los dominios de los receptores de estrógenos alfa y progesterona fusionados a GST. Las construcciones de los dominios amino y carboxilo de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos (estos últimos donados por la doctora Elizabeth Wilson), se utilizaron para ensayos de interacción *in vitro*, los cuales mostraron que E3KARP interacciona directamente con la región amino de los tres receptores. Sin embargo, E3KARP también interacciona con la región carboxilo de los tres receptores en ausencia de hormona. La interacción con la región carboxilo de los tres receptores se pierde en presencia de la hormona correspondiente. MAZ no se logró traducir *in vitro*, por lo que no se realizó ningún ensayo de interacción.

A partir de los resultados obtenidos podemos señalar que E3KARP es un coactivador de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos, quedando aún por esclarecer el mecanismo que sigue para incrementar la expresión de los genes blanco. MAZ parece actuar como represor, sin embargo los resultados no son concluyentes por lo que es necesario realizar nuevos ensayos que nos permitan esclarecer el papel de MAZ en la expresión de genes regulados por los receptores de hormonas esteroides.

## INTRODUCCIÓN

El término receptor, en su acepción más general, se utiliza para nombrar a cualquier componente celular que interactúa con un agente químico, el cual puede ser exógeno o endógeno. Sin embargo, si revisamos más a fondo el término podremos llegar a una definición más precisa, en donde se considera a un receptor como una macromolécula celular capaz de interactuar con una especie química o ligando, generando como consecuencia de esta interacción una respuesta fisiológica.

Los receptores se agrupan en cuatro grandes superfamilias, cuyos integrantes tienen en común el mecanismo por el cual ejercen sus efectos.

- a) **Receptores membranales:** Esta superfamilia agrupa a los receptores de hormonas peptídicas, las cuales se asocian a funciones tales como el crecimiento y desarrollo, así como algunas actividades metabólicas agudas. Las proteínas asociadas a membranas plasmáticas actúan al fosforilar a proteínas blanco, como cinasas o proteínas estructurales.

Las principales actividades catalíticas que este tipo de receptores desarrollan son de tipo tirosincinasa, tirosínfosfatasa y cinasa de serina y treonina. Como ejemplo de este tipo de receptores tenemos a los que son específicos de insulina, del factor de crecimiento epidérmico y del factor transformador del crecimiento (TGF $\beta$ ).

- b) **Receptores acoplados a un canal iónico:** En esta superfamilia los receptores se encuentran formados por subunidades proteicas transmembranales, las cuales al unirse el ligando forman canales que son selectivos al paso de iones, generando de esta manera un cambio en el potencial de membrana. Como ejemplo de este tipo de receptores tenemos al receptor colinérgico nicotínico, de GABA<sub>A</sub> y de serotonina, así como a los receptores de glutamato, glicina y aspartato.

- c) **Receptores acoplados a Proteínas G:** El mecanismo que sigue esta familia de receptores requiere de la mediación de una proteína llamada proteína G, la cual es activada por GTP. La activación de la proteína G va a permitir la regulación de diferentes efectores, entre los cuales se encuentran la adenilil ciclasa, las fosfolipasas A<sub>2</sub>, C y D, proteínas de transporte y algunos canales iónicos específicos a calcio, sodio y potasio. Como ejemplo de este tipo de receptores tenemos al de GABA<sub>B</sub>.
- d) **Receptores Nucleares:** Este tipo de receptores son factores de transcripción, responsables de modular directamente la actividad de diversos genes. Como ejemplo de este tipo de receptores tenemos los receptores de hormonas esteroides, los cuales fueron objetos de estudio en este trabajo.

## RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares son factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en actividades reproductivas, metabólicas y del desarrollo. Es decir, son moléculas encargadas de originar una respuesta (transcripción de genes específicos) como consecuencia del estímulo producido por ligandos tales como esteroides sexuales (progesterona, estrógenos y andrógenos), esteroides adrenales (cortisol, dexametasona y aldosterona), vitamina D<sub>3</sub> y hormona tiroidea entre otros (fig. 1).

### 1. CLASIFICACIÓN

Los receptores nucleares se han agrupado tradicionalmente en tres categorías, las cuales comparten características estructurales pero difieren en el reconocimiento a los elementos de respuesta (RE) y en el ligando al cual se unen (ver tabla 1).

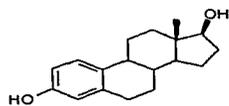
## 1.1 RECEPTORES NUCLEARES TIPO I Ó DE HORMONAS ESTEROIDES

En esta categoría se incluyen a los receptores de progesterona (PR), andrógenos (AR), estrógenos (ER), glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) y el receptor relacionado a estrógenos (ERR).

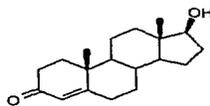
Para que los receptores puedan ejercer su actividad es necesario que sean translocados al interior del núcleo a través de poros nucleares y señales de internalización localizadas en los receptores nucleares. Se ha propuesto que los receptores nucleares tipo I se encuentran distribuidos preferentemente en el citoplasma en ausencia de ligando, formando complejos con diversas proteínas, principalmente de choque térmico como hsp90 y hsp70 (Tsai y O'Malley, 1994; De Franco *et al.*, 1998 ). La unión del ligando a los receptores nucleares provoca una disociación del complejo formado entre los receptores nucleares y las proteínas de choque térmico. La disociación de este complejo origina que las señales de internalización del receptor se encuentren más expuestas, favoreciendo el reconocimiento del complejo del poro nuclear, y esto es lo que permite la translocación del receptor nuclear al interior del núcleo.

A pesar de que el receptor de estrógenos es el ejemplo clásico de los receptores de hormonas esteroideas, es el único que en realidad no se encuentra localizado preferentemente en el citoplasma, sino en el núcleo. Apoyados en el uso de técnicas de fluorescencia, como la asociación del receptor de estrógenos con proteína verde fluorescente (GFP), ha sido posible comprobar que ER se encuentra localizado en el núcleo tanto en ausencia como en presencia de ligando (Hager *et al.*, 2000).

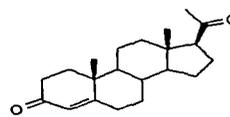
### Ligandos de Receptores de Hormonas Esteroides



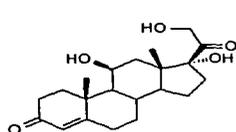
17- $\beta$  estradiol (ER)



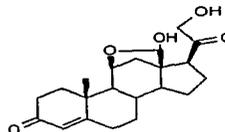
Testosterona (AR)



Progesterona (PR)

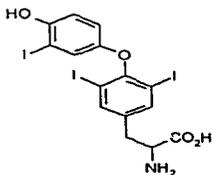


Cortisol (GR)

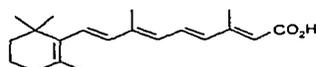


Aldosterona (MR)

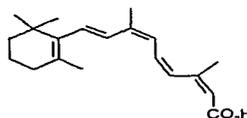
### Ligandos de Receptores No Esteroides Tipo II



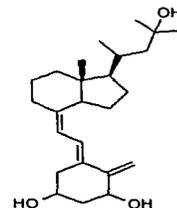
1-3,5,3'-L triiodotironina  
(T3) (TR)



Acido *trans* retinoico (RAR)



Acido 9-*cis* retinoico (RXR)



1,25 dihidroxi  
Vitamina D (VDR)

Figura 1. Ligandos naturales de los receptores de hormonas esteroides (Tipo I) y de los receptores de hormonas no esteroides (Tipo II). Los receptores que corresponden a cada ligando se indican entre paréntesis.

**Tabla 1. Clasificación de los receptores nucleares**

	Receptor	Nombre abreviado	Subtipos	ligando	Tipo de elemento de respuesta	Tipo de asociación a otros receptores
<b>Receptores nucleares tipo I o esteroideos</b>	Andrógenos	AR		Andrógeno	Pal	D
	Estrógenos	ER	$\alpha, \beta$	Estradiol	Pal	D
	Progesterona	PR	A,B	Progestina	Pal	D
	Glucocorticoides	GR	$\alpha, \beta$	Cortisol	Pal	D
	Mineralocorticoides	MR		Aldosterona	Pal	D
	Receptor Relacionado a Estrógenos	ERR	$\alpha, \beta, \gamma$	Estradiol	Pal, Hemisitio	M,D
<b>Receptores nucleares tipo II o no esteroideos</b>	Receptor de la hormona tiroidea	TR	$\alpha, \beta$	Hormona tiroidea ( $T_3$ )	Pal, DR-4,	H
	Vitamina D	VDR		1,25-Dihidroxi-vitamina D	DR-3,	H
	Receptor de ácido retinóico	RAR	$\alpha, \beta, \gamma$	Ácido retinóico	DR-2, DR-5, Pal,	H
	Receptor de ácido 9-cis-retinóico	RXR	$\alpha, \beta, \gamma$	Ácido 9-cis-retinóico	Pal, DR-1	H
	Receptor X del Hígado	LXR	$\alpha, \beta$	Oxisteroles	DR-4	H
	Receptor proliferador del peroxisoma activado	PPAR	$\alpha, \beta, \gamma$	Benzotrieno B4, Wy 14.643	DR-1	H

**Tabla 1. Clasificación de los receptores nucleares (Continuación....)**

	Receptor	Nombre abreviado	Subtipos	ligando	Tipo de elemento de respuesta	Tipo de asociación a otros receptores
<b>Receptores nucleares huérfanos</b>	Receptor de testículo	TR2	$\alpha, \beta$	Desconocido	DR-1 a DR-5	D,H
	Reverso ErbA	RevErb	$\alpha, \beta$	Desconocido	DR-2, hemisítio	M,D
	Factor nuclear de células germinales	GCNF		Desconocido	DR-0	D
	Receptor ubicuo	UR		Desconocido	DR-4	H

Pal = palíndromo DR= Repetición directa (el número indica las bases que se encuentran entre cada secuencias repetida)

H =Heterodímero D = Homodímero M= Monómero

Basado en Arana y Pascual, 2001

Otra característica de los receptores de hormonas esteroideas es la formación de homodímeros cuando se encuentran asociados a ligando. La formación de dímeros de los receptores nucleares les permite unirse a sus elementos de respuesta (RE), que en el caso de los receptores de hormonas esteroideas están formados por secuencias palindrómicas separadas por 3 pares de bases (Arana y Pascual, 2001).

## **1.2 RECEPTORES NUCLEARES TIPO II Ó NO ESTEROIDEOS**

A los receptores nucleares tipo II pertenecen los receptores de hormona tiroidea (TR), del ácido *trans*-retinoico (RAR), del ácido 9-*cis*-retinóico (RXR) y de vitamina D<sub>3</sub>, entre otros. A diferencia de los receptores nucleares tipo I, los receptores tipo II se encuentran localizados exclusivamente en el núcleo celular. En ausencia de ligando se asocian en heterodímeros que se unen a sus elementos de respuesta, ejerciendo un efecto represor sobre la actividad de los promotores, el cual se interrumpe por la unión del ligando al receptor.

Una característica importante de los receptores tipo II es la capacidad para formar heterodímeros, participando RXR en muchos de los casos como segundo receptor. Las secuencias de los elementos de respuesta (RE) a los cuales se unen este tipo de receptores, a diferencia de los receptores tipo I, pueden ser palindrómicas o repeticiones directas separadas por un número variable de pares de bases (Arana y Pascual, 2001).

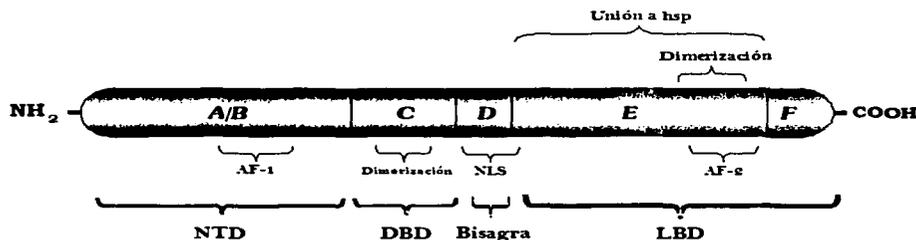
## **1.3 RECEPTORES NUCLEARES HUÉRFANOS**

Esta categoría corresponde a aquellos receptores, probablemente de tipo II, cuyos ligandos aún no han sido caracterizados. De un gran número de estos receptores se desconoce su función, sin embargo han sido incorporados en esta superfamilia debido a que comparten características estructurales e importantes porcentajes de identidad con el resto de los receptores nucleares, principalmente en el dominio de unión a DNA.

## 2. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares poseen una estructura modular integrada por tres dominios con funciones autónomas, definidos por regiones accesibles a proteasas (Weatherman *et al.*, 1999) (fig. 2).

- ◆ Un dominio NH<sub>2</sub>- terminal denominado A/B
- ◆ Un dominio de unión a DNA (DBD) ó dominio C
- ◆ Una región de unión entre el DBD y el LBD o bisagra (región D)
- ◆ Un dominio E/F de unión a ligando (LBD)



**Figura 2.** Estructura general de un receptor nuclear. Su estructura comprende tres dominios y una región que funciona como bisagra entre los dominios de unión a DNA y carboxilo terminal. Presenta regiones de internalización, de dimerización y de activación.

### 2.1 DOMINIO A/B

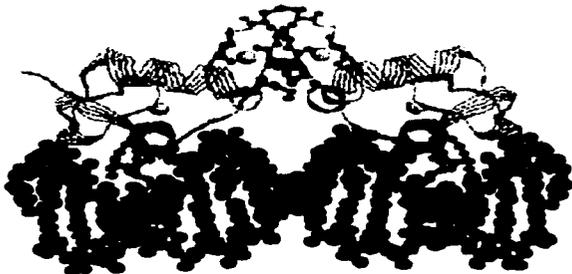
El dominio A/B es el que mayor variabilidad presenta tanto en tamaño como en secuencia entre los receptores nucleares. En algunos casos, como en AR y PPAR $\alpha$ , presenta un dominio de transactivación de gran potencia conocido como AF-1, el cual incrementa su capacidad de transactivación cuando es fosforilado por MAPK (Juge-

Aubry *et al.*, 1999). El sitio AF-1 tiene como principal característica el no depender de la unión a ligando para ejercer su actividad de transactivación.

Otro aspecto importante que conviene señalar es el hecho de que este dominio es blanco de fosforilaciones que afectan la actividad transcripcional de los receptores (Silvio y Lazar, 1993; Rochette-Egly *et al.*, 1999 y Rochette-Egly *et al.*, 2000).

## 2.2 DOMINIO DE UNIÓN A DNA (DBD)

El dominio de unión a DNA (DBD) es el dominio más conservado entre los receptores nucleares. Presenta una extensión carboxilo-terminal (CTE) y dos "dedos de zinc" que se extienden a lo largo de 60 a 70 aminoácidos, cada uno de los cuales está formado por un átomo de zinc coordinado por cuatro residuos de cisteína. El reconocimiento de la secuencia de unión a DNA la realizan los aminoácidos de la denominada caja P, ubicados en la base del primer dedo de zinc, mientras que el segundo dedo de zinc contiene a los aminoácidos encargados de la dimerización del receptor, en la caja D (fig. 3) (Beato y Klug, 2000; Tsai y O'Malley, 1994).



**Figura 3. Dominio de unión a DNA (DBD) del receptor de estrógenos alfa.** En la ilustración se muestra el DBD de un homodímero. En color rojo se muestra la caja P contenida en una hélice y unida al zurco mayor del DNA. En verde se muestra la caja D responsable de la dimerización  
Tomado de Beato y Klug, 2000.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El DBD está constituido por dos  $\alpha$ -hélices que forman entre sí un ángulo recto. La primera es la llamada hélice de reconocimiento, la cual se une al surco mayor del DNA, y contiene al primer dedo de zinc, así como a la caja P. La segunda hélice se inicia con la CTE y hasta el segundo dedo de zinc, incluyendo la caja D. (Luisi *et al.*, 1991)

### 2.3 REGIÓN D

Esta región encuentra poco conservada entre los receptores nucleares y actúa como bisagra entre los dominios LBD y DBD, lo cual permite que la proteína se pliegue y altere su conformación. En algunos casos como en PR, AR y GR contiene una señal de internalización (NLS), así como regiones de transactivación (TR y GR) (Giguere *et al.*, 1986; Godowski *et al.*, 1988; Hollenberg y Evans, 1988; Picard y Yamamoto, 1987; Guiochon-Mantel *et al.*, 1989).

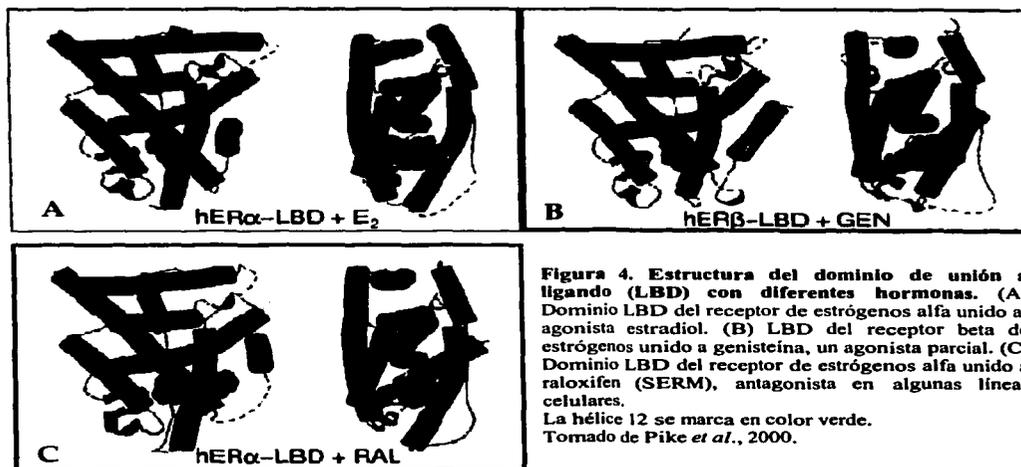
### 2.4 DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO (LBD)

La región LBD está formada por 12  $\alpha$ -hélices, las cuales se distribuyen de tal forma que crean una cavidad de características hidrofóbicas, en donde se une el ligando (Weatherman *et al.*, 1999)

El LBD posee una gran cantidad de funciones, ya que además de la unión del ligando interactúa con diferentes moléculas como las proteínas de choque térmico (hsp), interviene en la homo y heterodimerización de los receptores, presenta una señal de internalización nuclear (NLS) en el caso de los receptores de hormonas esteroides y posee una potente región de transactivación dependiente de ligando que se conoce como AF-2 (Tsai y O'Malley, 1994).

Cuando el ligando se une al receptor, éste sufre un cambio conformacional muy importante que provoca que el receptor se compacte y presente una región de

transactivación (AF-2), originada en la hélice 11 ó 12. En esta región, cuando el receptor ha sido activado por el ligando, interactúan los diferentes correguladores de la actividad transcripcional. Considerando las estructuras tridimensionales del dominio de unión a DNA obtenidas en presencia tanto de antagonistas como de agonistas, se ha propuesto que el mecanismo que siguen las moléculas con actividad antagonista se basa en impedir que la región AF-2, y específicamente la hélice 12, adquiera la conformación correcta, lo cual reduce o incluso evita la interacción con los correguladores; tal y como se puede ver en la figura 4, en donde se muestra al receptor de estrógenos unido a diferentes ligandos (Pike *et al.*, 2000).



**Figura 4. Estructura del dominio de unión a ligando (LBD) con diferentes hormonas. (A) Dominio LBD del receptor de estrógenos alfa unido al agonista estradiol. (B) LBD del receptor beta de estrógenos unido a genisteína, un agonista parcial. (C) Dominio LBD del receptor de estrógenos alfa unido a raloxifen (SERM), antagonista en algunas líneas celulares.**

La hélice 12 se marca en color verde.  
Tomado de Pike *et al.*, 2000.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### **3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES**

La localización de los receptores de hormonas esteroides, PR, AR, GR y MR, es primordialmente citoplasmática, con excepción del receptor de estrógenos cuya localización es preferentemente nuclear. Los receptores de hormonas esteroides, cuando no se encuentran unidos a su ligando, se asocian a diversas proteínas como las hsp que los estabilizan y permiten su maduración (De Franco *et al.*, 1998).

Las hormonas esteroides progestinas, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides (fig. 1), son producidas por células endócrinas que las secretan al torrente sanguíneo, el cual las transporta hasta las células blanco, a las cuales penetran por difusión simple y es entonces que se unen de manera específica a su receptor. Una vez que los receptores se han unido a su ligando, en el caso de los receptores ubicados en el citoplasma, estos sufren un cambio conformacional que origina la exposición de las regiones que contienen las señales de internalización al núcleo (NLS), las cuales son reconocidas por el complejo del poro nuclear (NPC) permitiendo de esta forma su paso al interior del núcleo.

Los receptores nucleares de hormonas esteroides unidos a ligando forman homodímeros, los cuales reconocen a sus RE, constituidos como se mencionó anteriormente, por secuencias palindrómicas. Cuando los receptores se han unido a sus RE reclutan a una serie de proteínas correguladoras que se encargan tanto de remodelar la cromatina, como de reclutar y estabilizar la formación del complejo de iniciación de la transcripción. Una representación esquemática del mecanismo general de acción de los receptores de hormonas esteroides lo podemos ver en la figura 5.

### Mecanismo General de Acción de los Receptores Nucleares Esteroides

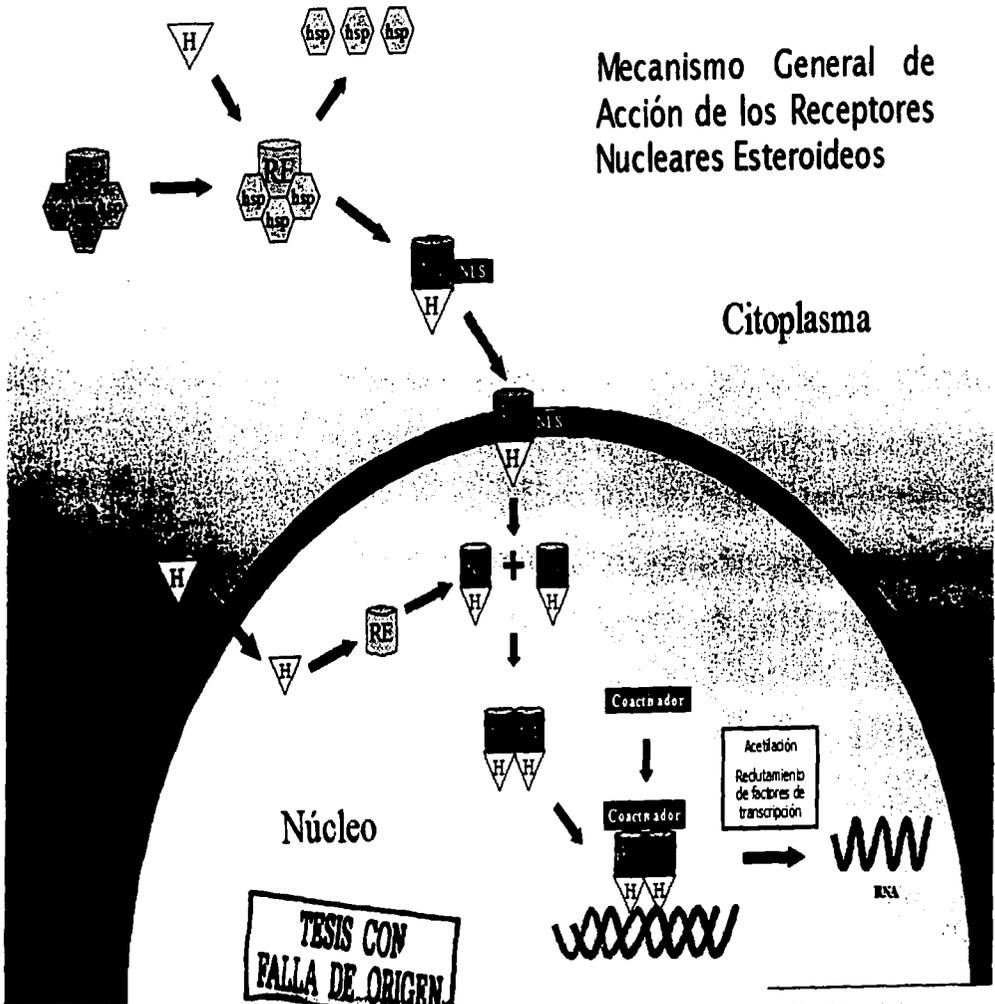


Figura 5. Mecanismo general de acción de los receptores de hormonas esteroides. RE= receptores de hormonas esteroides. H=ligando, hsp= proteínas de choque térmico. NLS = Regiones de internalización

## **4. CORREGULADORES DE RECEPTORES NUCLEARES**

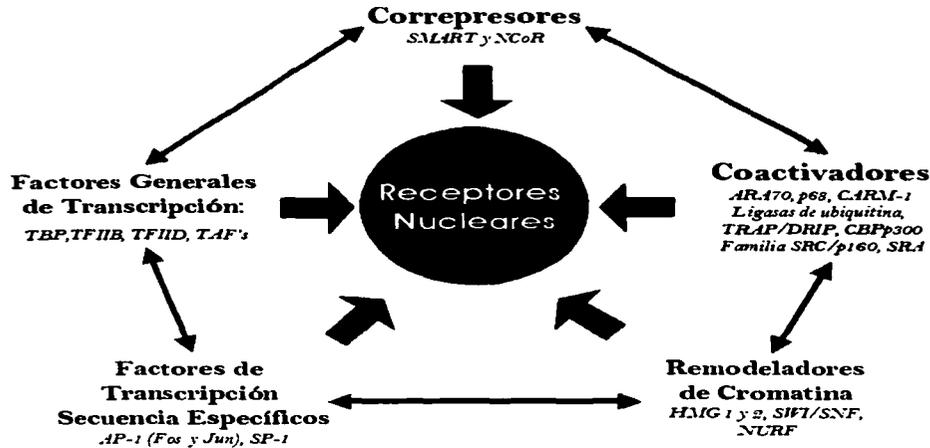
Definimos un corregulador como una molécula capaz de modular el efecto de un factor de transcripción, como los receptores nucleares, sobre un gen blanco. En esta categoría incluimos a aquellas moléculas que intervienen en el proceso de transcripción y además interaccionan directa o indirectamente con los receptores nucleares. Debido a la amplitud del término, existen una gran variedad de correguladores, entre los cuales se establecen relaciones e interacciones que le imprimen un gran dinamismo al mecanismo que siguen para regular la transcripción. Los correguladores de los receptores nucleares se pueden agrupar en cinco grandes categorías, las cuales mencionamos a continuación (fig. 6).

### **4.1 FACTORES GENERALES DE TRANSCRIPCIÓN (GTF)**

Para que se lleve a cabo el proceso de transcripción es necesario que los GTF interaccionen con las secuencias ubicadas en el núcleo del promotor, las cuales contienen la llamada caja TATA así como a la secuencia iniciadora (Inr), las cuales se extienden hasta el sitio de inicio de la transcripción.

El proceso de transcripción (fig. 7) implica la interacción de una proteína que se une a la caja TATA (TBP), la cual se asocia con factores conocidos como TAF para formar el complejo TFIID. El complejo TFIID unido al promotor recluta al factor TFIIB, el cual es capaz de unir a la RNA polimerasa II (RNAPII). El complejo TFIID/TFIIB/RNAPII no es capaz de llevar a cabo la transcripción y solo se activará con la unión de otros GTF como TFIIE y TFIIH (Tsai y O'Malley, 1994).

El mecanismo señalado en el párrafo anterior es muy general y no refleja la complejidad del proceso de transcripción. Por ello es adecuado puntualizar algunos aspectos:



**Figura 6. Clasificación de correguladores.** Los correguladores de los receptores nucleares se agrupan en cinco categorías, las cuales interactúan entre ellas estableciendo mecanismos de regulación muy complejos. Basado en Beato y Klug, 2000.

- Las secuencias de los promotores se encuentran ocultas para los factores de transcripción debido al empaquetamiento de la cromatina.
- Hay un número fijo de GTF disponibles para iniciar el proceso, de tal forma que las secuencias promotoras tendrán que competir por ellos.
- Existen proteínas que bloquean tanto de manera específica como inespecífica la formación de los complejos de iniciación.
- En las secuencias promotoras pueden existir variaciones de la secuencia consenso, las cuales provocan que los GTF se unan con diferentes afinidades. (Zawel y Reinberg, 1995).

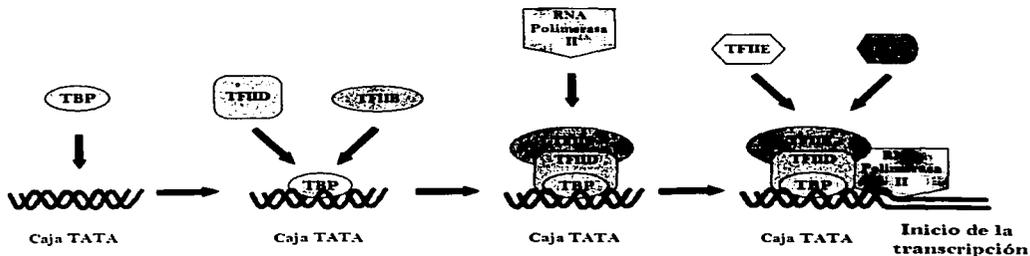


Figura 7. Proceso de transcripción. TBP reconoce y se une a la caja TATA, posteriormente recluta a TFIID y TFIIB. El complejo formado es capaz de unir a la RNA polimerasa II, la cual necesita de la participación de otros factores de transcripción para poder iniciar el proceso de transcripción. Basado en Zawel y Reinberg, 1995

Considerando los puntos anteriores, la presencia de una molécula que, en respuesta a estímulos fisiológicos, facilite el reconocimiento de las secuencias del promotor al hacerlas más accesibles o suprima el efecto de las proteínas represoras y en consecuencia incrementa los niveles de transcripción, nos muestra una visión más completa del proceso y nos brinda la posibilidad de establecer un mecanismo de regulación. Las proteínas encargadas de cumplir con esta función son los factores de transcripción secuencia específicos, dentro de los cuales se encuentran incluidos los receptores nucleares.

Los receptores nucleares modifican la actividad transcripcional dirigida por la RNAPII mediante dos mecanismos:

- La interacción directa con los factores de transcripción como por ejemplo TBP (Berkenstam *et al.*, 1992; Sadovsky *et al.*, 1995; Shulman *et al.*, 1995); TAFII30 (Jack *et al.*, 1994) y TAFII135 que estimulan transcripción mediada por RAR, TR o VDR, pero no así para ER o RXR (Mengus *et al.*, 1997). Otro GTF que es un blanco potencial de los receptores nucleares (NR) es TFIIB, cuya interacción con TR y

VDR se ha reportado (Baniahmad *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1995; Masuyama *et al.*, 1997).

- Mediante la participación de proteínas correguladoras que actúan como puente entre los NR y los GTF (coactivadores y correpresores). Es importante hacer notar que los correguladores no tienen únicamente la función señalada anteriormente, pues son capaces de realizar otras funciones como la acetilación (coactivadores) y desacetilación de histonas (correpresores), entre otras (Zawel y Reinberg, 1995).

#### 4.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE SECUENCIA ESPECÍFICA

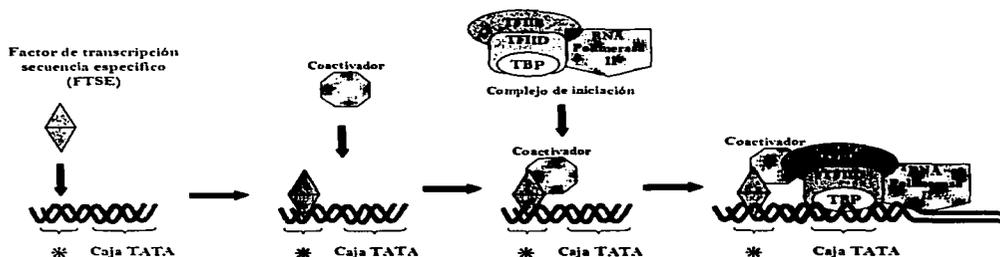
Los factores de transcripción de este tipo, que incluyen a los receptores nucleares, reconocen secuencias río arriba del sitio de inicio de la transcripción y más alejados del núcleo del promotor en donde se unen los GTF. Estos factores, tal y como se mencionó en el apartado anterior, no intervienen en la transcripción basal y su función, en general, es señalar y hacer más accesibles las secuencias promotoras a los GTF (figura 8).

En un promotor natural se observa que existen secuencias que reconocen factores de transcripción como AP-1 ó SP-1 cercanos a los RE de los receptores nucleares, por lo que la interacción directa entre estos factores de transcripción y los receptores nucleares puede ejercer un efecto sinérgico o represor sobre la actividad transcripcional.

El efecto que los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  ejercen en conjunto con los factores de transcripción Jun/Fos en los sitios AP-1 es de particular interés, ya que ER $\alpha$  en presencia de estradiol, dietilestilbestrol (DES), así como con los antiestrógenos raloxifén, ICI164384 y tamoxifén, es capaz de activar a través de sitios AP-1; mientras que ER $\beta$  inhibe la transcripción en presencia de estradiol y DES, pero no con ICI164384, raloxifén y tamoxifén (Peach *et al.*, 1997). Para explicar el mecanismo que los receptores

de estrógenos siguen en la activación por sitios AP-1, se han postulado dos hipótesis, en las cuales se plantea que Fos/Jun es capaz de reclutar un complejo de coactivadores que incluya a miembros de la familia p160, el cual podría unirse a los receptores nucleares a través de los coactivadores de la familia p160 y las regiones AF-1 y AF-2 del receptor de estrógenos  $\alpha$ , activando el complejo y permitiendo la activación. La segunda hipótesis sugiere que el efecto que ejerce ER $\beta$  sobre los sitios AP-1 se debe a que por medio de su dominio de unión a DNA captura complejos de desacetilasas, lo cual permite la activación mediada por Jun/Fos (Kushner *et al.*, 2000).

Esta hipótesis explica como puede incrementar ER $\beta$  los niveles de activación aún cuando carece de un dominio AF-1, el cual es necesario para la activación por ER $\alpha$ .



**Figura 8. Factores de transcripción de secuencia específica (FTSE).** Los FTSE asociados a sus secuencias reclutan diversos coactivadores que remodelan la cromatina para hacer más accesibles secuencias como la caja TATA. Los FTSE y coactivadores también reclutan al complejo de iniciación. [.] Señala la ubicación de la secuencia de unión para los FTSE.

### 4.3 COACTIVADORES

Los coactivadores se definen como moléculas que son capaces de interactuar con los factores de transcripción e incrementar los niveles de transcripción de éstos. Algunos de los coactivadores que actúan sobre los receptores de hormonas esteroides son:

#### 4.3.1 FAMILIA p160

La familia p160 está constituida por al menos tres clases de proteínas con un peso molecular aproximado de 160 KDa, las cuales comparten además del peso molecular algunas características estructurales (Leo y Chen, 2000).

El primer coactivador de los receptores nucleares se identificó a través de la técnica del doble híbrido, utilizando una biblioteca de linfocito B humano y la región LBD del receptor a progesterona (Oñate *et al.*, 1995). El factor aislado se denominó coactivador de receptores de hormonas esteroideas 1 (SRC-1) y se observó que interactuaba con el receptor de progesterona, glucocorticoides, hormona tiroidea, estrógenos, RAR y PPAR. El cDNA que originalmente fue aislado codificaba para una proteína de únicamente 125 kDa, sin embargo otros grupos lograron clonar y expresar la proteína completa, con un peso molecular de 160 kDa, y demostraron que era capaz de interactuar con el dominio LBD del TR (Takeshita *et al.*, 1996).

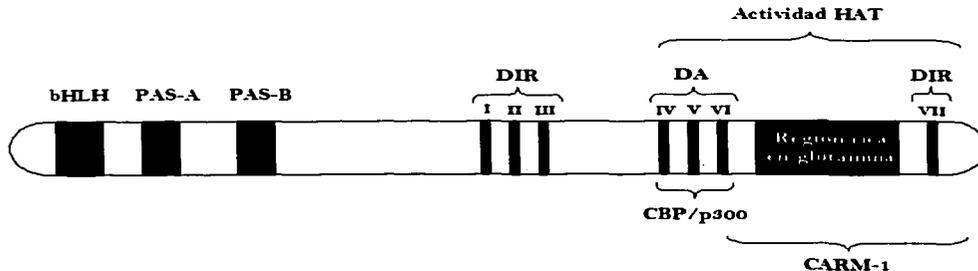
El mecanismo básico de acción de SRC-1 plantea que éste interactúa en forma dependiente de ligando con la región AF-2 de los receptores nucleares, incrementando así los niveles de transcripción. Sin embargo, datos recientes muestran que SRC-1 también es capaz de incrementar la transcripción mediante la interacción con la región AF-1 de los receptores de ER (Webb *et al.*, 1998) y de AR (Alen *et al.*, 1999; Bevan *et al.*, 1999).

El segundo grupo de coactivadores de la familia p160 (se le conoce también como SRC-2) está constituido por el factor intermediario de la transcripción 1 (RIP-140), que fue identificado como una proteína que interactúa con ER y RAR, e incrementa los niveles de transcripción. Utilizando el dominio de unión a ligando del receptor de glucocorticoides como carnada y una biblioteca de ratón en un ensayo de doble híbrido,

se identificó la proteína de interacción con GR (GRIP-1), la cual es la misma que la denominada como RIP-1 (Hong *et al.*, 1996; Voegel *et al.*, 1996).

Los integrantes de la tercera clase de coactivadores, a los cuales también se les conoce genéricamente como SRC-3, se identificaron y reportaron de forma casi simultánea. Hasta la fecha los coactivadores pertenecientes a esta clase son p/CIP (proteína que interacciona con CBP), el cual se identificó por su interacción con la región carboxilo de CBP (Torchia *et al.*, 1997), ACTR (proteína estimulante de hRARb) (Chen *et al.*, 1997), RAC3 (Proteína que interactúa con RAR) (Li *et al.*, 1997), AIB-1 (gen amplificado en cáncer de mama-1) (Anzick *et al.*, 1997) y TRAM-1 (proteína que interactúa con TR) (Takeshita *et al.*, 1997). De estas proteínas ACTR, RAC3, AIB-1 y TRAM-1 corresponden a isoformas de un mismo coactivador en humano, mientras que p/CIP es su homólogo en ratón. AIB-1 es de importancia médica ya que se ha reportado que se encuentra sobreexpresado en la mayoría de las líneas celulares de cánceres de mama, así como en biopsias de cáncer de mama y ovario ER-positivos (Anzick *et al.*, 1997).

Estructuralmente los coactivadores de la familia p160 comparten características estructurales en común (fig. 9). La región amino está muy conservada pues poseen un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) el cual funciona como dominio de unión a DNA o bien de dimerización en algunos factores de transcripción; un dominio PAS el cual también interviene en procesos de dimerización y de interacción proteína-proteína, sin embargo, la función de estos dominios en los coactivadores aún no ha sido esclarecida. Localizada en la región central del coactivador se encuentra la región de interacción con el receptor (DIR) a través de la cual se une a la región AF-2 de los receptores nucleares, y que se encuentra constituida por tres motivos LXXLL en donde L corresponde a la leucina y X a cualquier aminoácido. En el caso de SRC-1 encontramos en la región distal del dominio carboxilo otro motivo LXXLL el cual es importante para la activación completa de RAR, TR y ER (McInerney *et al.*, 1998).



**Figura 9. Representación de la estructura de la familia de coactivadores p160.** Se muestran los dominios bHLH (azul), PAS-A y PAS-B (rojo). Las secuencias LXXLL (I -VII) que constituyen los dominios de unión a receptores nucleares (DIR) y de activación (DA) se muestran en color negro. La región rica en glutamina se muestra en verde. Basados en Leo y Chen, 2000.

Finalmente, en la región carboxilo encontramos una región con actividad de acetiltransferasa (HAT), la cual interviene en la remodelación de cromatina al acetilar histonas y disminuir la afinidad entre el complejo formado por las histonas y el DNA; así como tres dominios LXXLL de unión para otros coactivadores como CARM-1 y CBP/p300, y que constituye el dominio de activación (DA) de la familia p160 (Leo y Chen, 2000).

#### 4.4 COINTEGRADORES

##### 4.4.1 CBP/p300

CBP y p300 han sido caracterizados como coactivadores generales de numerosos factores de transcripción en una gran variedad de tejidos. Originalmente, CBP fue identificada por su interacción con CREB en respuesta a la fosforilación inducida por AMPc ( Kwok *et al.*, 1994); mientras que p300 fue aislada por su interacción con la proteína viral E1A (Eckner *et al.*, 1994).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CBP/p300 son coactivadores de un número importante de factores de transcripción, entre los que destacan CREB, p53, AP-1, STATS, Jun, Fos y los receptores nucleares, entre otros (Shikama *et al.*, 1998; Chakravarti *et al.*, 1996). CBP/p300, al ser coactivadores para una gran cantidad de factores de transcripción de secuencia específica, se les ha considerado como cointegradores de los mecanismos de comunicación extracelular e intracelular (señalización hormonal) y la respuesta celular, ya que constituyen el enlace entre los factores de transcripción (receptores nucleares, AP1, etc.) y el complejo de iniciación.

Los receptores nucleares interactúan de forma dependiente de ligando con la región amino de CBP (Kamei *et al.*, 1996), mediante la región de transactivación AF-2. Se ha logrado comprobar el carácter de coactivador de CBP en los receptores nucleares, ya que su expresión incrementa los niveles de transcripción (Chakravarti *et al.*, 1996; Kamei *et al.*, 1996). La interacción entre los receptores nucleares y CBP/p300 no es exclusivamente directa, ya que CBP/p300 es capaz de establecer interacciones con otros coactivadores de los receptores nucleares, como es el caso de la familia de coactivadores p160 (ver figura 7), la cual ocurre en la región carboxilo de CBP. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, es correcto suponer que los receptores nucleares son capaces de formar complejos ternarios con CBP/p300, lo cual ya había sido propuesto como un mecanismo que explica el sinergismo que producen SRC-1 y CBP en los niveles de transcripción inducidos por ER y PR (Smith *et al.*, 1996).

El ejemplo más típico de interacción entre los miembros de la familia p160 y CBP es p/CIP, quien es miembro de la familia p160 y fue aislado a partir de un ensayo de doble híbrido utilizando CBP como carnada. Posteriormente se establece que los miembros de que la familia p160 interactúan con los primeros 100 aminoácidos de la región carboxilo de CBP (Torchia *et al.*, 1997).

Otro aspecto que es importante considerar es el hecho de que CBP, al igual que la familia p160, posee actividad de acetiltransferasa (HAT) (Bannister y Kouzarides, 1996) lo que sugiere que estos coactivadores, además de servir como enlace entre los receptores nucleares y algunos de los factores del complejo de iniciación, intervienen en el proceso de remodelación de cromatina previo al reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción.

#### 4.4.2 COMPLEJO TRAP/DRIP

TRAP/DRIP pertenecen a la serie de complejos que se han denominado como mediadores, los cuales se han asociado al reclutamiento de la RNA polimerasa II. Se ha reportado que los complejos TRAP y DRIP interactúan directamente con los receptores nucleares en forma dependiente de ligando (Fondell *et al.*, 1996; Fondell *et al.*, 1999; Rachez *et al.*, 1998; Rachez *et al.*, 1999).

TRAP y DRIP son complejos constituidos por 14 a 16 subunidades, de las cuales se han identificado a las subunidades TRAP220 y DRIP 205 como las responsables de la unión con los receptores nucleares, a través de dos regiones que presentan las secuencias LXXLL, que son características de los coactivadores que se unen a la región de transactivación AF-2 de los receptores nucleares (Yuan *et al.*, 1998).

### 4.5 OTROS COACTIVADORES

Debido a la gran cantidad de coactivadores que en años recientes han sido reportados es difícil mantener una lista actualizada, lo cual nos obliga a mencionar solo a algunos de los que resultan más representativos. Es importante tener en mente que los coactivadores además de participar en el proceso de transcripción, es probable que desempeñen otras funciones que no necesariamente deben estar relacionadas con procesos transcripcionales.

PGC-1 (coactivador del PPAR $\gamma$  1) fue identificado a partir de un ensayo de doble híbrido utilizando al receptor PPAR $\gamma$  como carnada. Se le atribuye a PGC-1 un papel importante en el control de la temperatura, ya que se ha observado un incremento en la expresión del mRNA en adipositos y en tejido muscular, los cuales son tejidos que intervienen en el control de la termogénesis (Puigserver *et al.*, 1998).

Un caso particular es SRA, que es un coactivador que se aisló utilizando como carnada el dominio amino terminal del receptor de progesterona. Éste coactivador está constituido por una molécula de RNA que es capaz de incrementar los niveles de transcripción de los receptores esteroides en niveles que van de 5 a 10 veces (Lanz *et al.*, 1999).

Siguiendo con la línea de los coactivadores que incrementan los niveles de transactivación mediante la interacción con la región amino terminal de los receptores nucleares, nos encontramos con la p68 RNA helicasa. Este coactivador se identificó mediante la interacción *in vitro* de la región amino de ER $\alpha$  fusionada a GST con un extracto celular marcado con [<sup>35</sup>S], proveniente de la línea celular MCF-7. p68 es un coactivador específico del receptor de estrógenos alfa, el cual ve potenciada su actividad cuando el receptor es fosforilado en la serina 118 vía MAPK (Endoh *et al.*, 1999).

A las ligasas de ubiquitina tipo E3, E6-AP y RPF-1, además de ubiquitinar a las proteínas para que sean degradadas mediante la vía de la ubiquitina, también se les ha identificado como coactivadores capaces de interactuar con estos receptores a través de la secuencia LXXLL localizada en la región carboxilo terminal (Nawaz *et al.*, 1999).

Las proteínas HMG-1 y HMG-2 han sido reportadas como coactivadores que actúan selectivamente sobre los receptores nucleares del tipo esteroideo. Se ha observado que las proteínas HMG-1 y 2 son capaces de interactuar temporalmente

con los receptores esteroideos, lo que nos hace suponer que esta interacción favorezca la estabilización de los receptores con sus elementos de respuesta. A las proteínas HMG-1 y 2 también se les ha asociado con efectos remodeladores de cromatina (Boonyaratanakornkit *et al.*, 1998).

CARM-1 (coactivador asociado a arginina metiltransferasa 1) se identificó utilizando la región carboxilo terminal de GRIP-1 en un ensayo de doble híbrido (Chen *et al.*, 1999). CARM-1 presenta actividad de metiltransferasa y posee regiones de unión con la familia de coactivadores p160, lo cual nos permite suponer que va a actuar en la remodelación de cromatina para incrementar los niveles de transactivación.

#### 4.6 REMODELADORES DE CROMATINA

Para que activadores, como los receptores nucleares, lleven a cabo la transcripción en organismos superiores es necesario que el DNA, que se encuentra compactado en forma de cromatina, se vuelva más accesible para los diferentes factores de transcripción. Esto se consigue mediante la intervención de diferentes proteínas capaces de modificar a las proteínas asociadas al DNA, constituidas principalmente por histonas. En parte, este proceso lo llevan a cabo, como hemos mencionado en apartados anteriores, coactivadores de la familia p160, CBP/p300 y algunos otros coactivadores como CARM-1 a través de la actividad de acetiltransferasas y metiltransferasas que les son características. La incorporación de grupos acetilo y metilo en las proteínas histónicas genera una reducción en la basicidad de dichas proteínas, lo que produce una disminución de la afinidad de las histonas por el DNA.

Existe otro grupo de proteínas con actividades enzimáticas diferentes, pero que al igual que la familia p160 o CBP/p300, son capaces de remodelar a la cromatina. Un ejemplo de este tipo de proteínas lo tenemos en los componentes del complejo SWI/SNF, el cual fue identificado originalmente en levaduras y es capaz de incrementar

los niveles de transcripción por receptores de hormona esteroides (Yoshinaga *et al.*, 1992). La contraparte humana la tenemos en el homólogo de SWI2, la proteína hBrm que al igual que los complejos SWI/SNF es capaz de remodelar a la cromatina de forma dependiente de ATP e incrementar los niveles de transcripción mediados por el receptor a glucocorticoides (Muchard y Yaniv, 1993). Otro ejemplo de remodeladores de cromatina capaces de interactuar con los receptores esteroides es el factor remodelante de nucleosomas (NURF), el cual se ha reportado que se encuentra involucrado en la activación mediada por el promotor MMTV (DiCroce *et al.*, 1999).

En la figura 10 se esboza un posible mecanismo de acción de los coactivadores de los receptores nucleares, sin embargo es importante hacer notar que tan solo es una aproximación y aún quedan grandes lagunas para elaborar un mecanismo exacto.

#### 4.7 CORREPRESORES

Los correpresores los podemos definir como moléculas que al interactuar con los factores de transcripción son capaces de silenciar la expresión de sus genes blanco.

Tal y como hemos mencionado, los receptores nucleares de tipo II en ausencia de ligando se unen a sus secuencias consenso, estableciendo de esta manera un efecto represor sobre sus genes blanco. Sin embargo, quedaba sin contestar la cuestión de si estos receptores eran capaces de reprimir la transcripción solo por impedimento estérico, el cual evitaba que los factores del complejo de iniciación se unieran a sus secuencias consenso, o bien, si existían otras moléculas que funcionaran como correpresores de los receptores nucleares y colaboraran para silenciar a sus genes blanco.

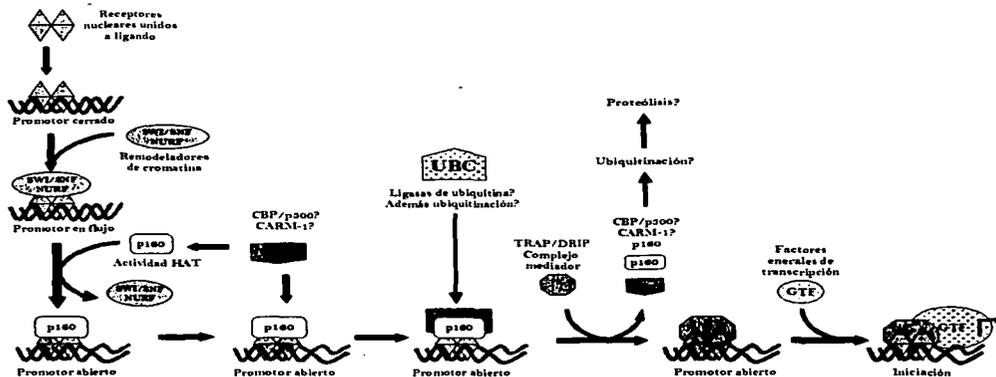


Figura 10. Probable mecanismo de acción de los coactivadores de los receptores nucleares.

Uno de los factores que ha sido caracterizado como correpresor corresponde a una proteína de 270 kDa y a la cual se le denominó correpresor de los receptores nucleares (NCoR). NCoR fue identificado por su asociación con el receptor de la hormona tiroidea y del receptor de ácido retinóico en ausencia de ligando (Horlein *et al.*, 1995). NCoR fue identificado de forma independiente como RIP-13 por su interacción directa en experimentos de doble híbrido en levaduras utilizando a RXR como carnada (Seol *et al.*, 1996).

NCoR o RIP-13 posee dos regiones que son indispensables para su interacción con los receptores nucleares, las cuales se encuentran ubicadas en la región carboxilo terminal de NCoR. En el dominio amino terminal se han identificado tres regiones asociadas a la represión de la transcripción.

Utilizando como carnada a RXR se aisló un factor conocido como SMART, el cual se encuentra relacionado con NCoR (Chen y Evans, 1995). SMART también posee dos

regiones de interacción con receptores en su porción carboxilo terminal, así como las regiones de represión en el dominio amino terminal.

Los dominios de represión presentes en la región amino terminal de NCoR y SMART son capaces de interactuar con la proteína mSin3 que a su vez recluta a complejos de desacetilasas, provocando que el complejo histonas-DNA se compacte (Nagy *et al.*, 1997).

Los receptores de hormonas esteroides, en ausencia de ligando, se encuentran secuestrados por proteínas hsp90 y hsp70, las cuales evitan que la proteína adquiera la conformación adecuada para que los receptores se asocien a sus elementos de respuesta. Sin embargo, cuando los receptores se unen a antagonistas como tamoxifén o RU486 la asociación con las proteínas de choque térmico se pierde y los receptores se unen a sus elementos de respuesta, pero no existe activación debido a la distorsión de la región AF-2 de los receptores y probablemente a la asociación con correpressores, como ocurre con el receptor de progesterona que se asocia con NCoR y SMART en presencia de RU486 (Jackson *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1998), y del receptor de estrógenos que se asocia a SMART en presencia de tamoxifén en algunas líneas celulares (Smith *et al.*, 1997). Es importante señalar que estas asociaciones no ocurren normalmente, ya que solo se han observado en presencia de antagonistas sintéticos como lo son RU486 y tamoxifén, por lo que su papel en condiciones fisiológicas normales se debe tomar con ciertas reservas.

Es claro que los niveles de activación mediados por factores de transcripción, como los receptores nucleares, van a estar regulados en parte por la expresión tejido-específica y las concentraciones de correpressores, de tal forma que un desequilibrio en las cantidades de coactivadores o correpressores disponibles, puede ser responsable de algunos efectos fisiológicos severos, como la resistencia a tamoxifén en el tratamiento de cáncer de mama.

#### 4.8 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LOS CORREGULADORES DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

Los mecanismos de transcripción y en general todos los fenómenos fisiológicos requieren de un alto grado de precisión, lo que origina que todos los procesos se encuentren altamente regulados. Hasta ahora hemos visto cómo los receptores nucleares se encargan de regular los niveles de transcripción, y cómo los mismos receptores son sujetos de regulación a través de los diferentes grupos de coactivadores. La actividad de los coactivadores es crucial para el correcto control de las actividades de los receptores nucleares, lo que origina la necesidad de que éstos también se encuentren fuertemente regulados.

Una de las formas de regulación más extendida es la fosforilación, y a la fecha encontramos que muchos de los coactivadores son blanco de diferentes cinasas, como es el caso de CBP, p300 y la familia p160 (Rowan *et al.*, 2000; Font De Mora y Brown, 2000; Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Los correpresores son también objeto de fosforilaciones, como es el caso de SMART, cuya fosforilación se ha asociado a su exportación hacia el citoplasma (Hong y Privalsky, 2000). Mediante fosforilaciones es probable que se den las señales que determinan la localización celular de los correguladores y asimismo definan la especificidad observada en algunos de los correguladores de los receptores de hormonas esteroideas.

Otra de las formas de regulación es la cantidad de correguladores disponibles, ya sea porque se encuentran en un número reducido o bien porque se encuentran localizados en citoplasma y por lo tanto no son accesibles para llevar a cabo el proceso de transcripción. Un ejemplo de este último caso lo tenemos con la cinasa CASK/LIN2 que se encuentra localizada en el citoplasma, sin embargo, bajo ciertas condiciones se transloca al interior del núcleo y funciona como un coactivador del factor de transcripción Tbr-1 (Hsueh *et al.*, 2000).

Otro mecanismo de regulación es la proteólisis de los receptores nucleares y de los coactivadores. Es importante recordar que algunas de las ligasas de ubiquitina además de su intervención en procesos de proteólisis, también son capaces de interactuar con los receptores nucleares y ejercer funciones de coactivadores, por lo que no es absurdo suponer que intervienen en procesos de regulación de receptores nucleares y coactivadores. Otro ejemplo lo tenemos con la proteína mSiah2, la cual presenta actividad proteolítica e interactúa con el correpresor NCoR. De esta forma mSiah2 es capaz de incrementar los niveles de transcripción al degradar a un correpresor de los receptores nucleares (Zhang y Bieker, 1998).

## 5. ANTECEDENTES

En estudios previos se identificaron y aislaron diversos factores que interaccionan con la región amino terminal del receptor de estrógenos alfa. La identificación se realizó a partir de un ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando como carnada el dominio amino terminal del receptor de estrógenos alfa (del aminoácido 1 al 180) y una genoteca de glándula mamaria (León del Río, sin publicar).

Uno de los factores aislados corresponde al fragmento de un dominio de interacción proteína-proteína conocido como PDZ. La secuencia del fragmento aislado es compartida por dos proteínas diferentes. La primera de ellas corresponde a una proteína regulatoria del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHE3. Esta proteína, conocida como E3KARP, está constituida por 451 aminoácidos y un peso molecular estimado de 50 kDa. Posee dos dominios PDZ de interacción proteína-proteína ubicados de los aminoácidos 10 a 87 y 149 a 227 (Yun *et al.*, 1997).

Adicionalmente, existe una proteína que comparte con E3KARP el mismo fragmento aislado por nuestro grupo. Esta proteína, llamada SIP-1, fue reportada como una proteína que interacciona con la región carboxilo del factor determinante de testículo (SRY) a través de sus dominios PDZ. SIP-1 está constituida por 326 aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de 34 kDa. Al igual que E3KARP, SIP-1 presenta dos dominios PDZ de interacción proteína-proteína, los cuales van del aminoácido 10 al 88 y del aminoácido 150 al 228 (Poulat *et al.*, 1997).

SIP-1 tiene un 99% de identidad en su secuencia de nucleótidos cuando se compara con E3KARP, sin embargo hay una región ubicada entre las bases 855 y 886 de E3KARP que SIP-1 no posee. Por otra parte, E3KARP no posee una citosina en la posición 925, lo que origina que el marco de lectura se recorra una base y por lo tanto a

partir de este sitio la secuencia de aminoácidos de E3KARP y SIP-1 es diferente. Lo anterior nos permite suponer que E3KARP y SIP-1 son proteínas homólogas. En la figura 11 podemos observar la secuencia de aminoácidos.

MAZ fue el segundo de los factores identificados por su interacción con la región amino terminal del receptor de estrógenos alfa. Es una proteína que se une a las secuencias responsables de la regulación del inicio y terminación de la transcripción del proto-oncogen *c-myc* (Bossone *et al.*, 1992), lo que permite considerarlo como un factor de transcripción. MAZ se encuentra constituida por 477 aminoácidos y posee un peso molecular de 52.5 kDa. Estructuralmente posee seis dedos de zinc, que permiten su unión al DNA a través de secuencias específicas. En la región amino terminal presenta una región rica en prolina las cuales pueden funcionar como dominios de transactivación en algunos factores de transcripción.

E3KARP	MAAPEPLRRLCRLVLRGEGGYGFILHIGIKRRIRGQFIRRVPGSPAFAAAL-AGDRLVEVNGVNVVEGETIHIIQVVQRIKAVEGQ
SIP-1	MAAPEPLRRLCRLVLRGEGGYGFILHIGEKRRIRGQFIRRVPGSPAFAAALRAGDRLVEVNGVNVVEGETIHIIQVVQRIKAVEGQ
E3KARP	TRLLVLDQETDEELRRRLTCTEEMAQRGLPPAHDWPWPKPDWAHTGSHSSEAGK KDVSGLPRELRLPRLCHLRKGGPQGYGFNL
SIP-1	TRLLVLDQETDEELRRRLTCTEEMAQRGLPPAHDWPWPKPDWAHTGSHSSEAGK KDVSGLPRELRLPRLCHLRKGGPQGYGFNL
E3KARP	HSDKSRPGQYRSYDIPGSPAARSGLRAQDRLEVNQGVNVEGLRHAEVVASIKAREDEARLLVVDPETDEHFKRLRVTPTEHFVE
SIP-1	HSDKSRPGQYRSYDIPGSPAARSGLRAQDRLEVNQGVNVEGLRHAEVVASIKAREDEARLLVVDPETDEHFKRLRVTPTEHFVE
E3KARP	GPLPSVPTNGTSPAQLNNGGACSSRSDLPGSKDTE
SIP-1	GPLPSVPTNGTSPAQLNNGGACSSRSDLPGSKDTE
E3KARP	ATSEPLPAUGLTLGLPHGPWASACPLLPQIQWTTGGWSCHPEISPSGPEPSPCCPPTGGGLWQDRIREFORCERISETER
SIP-1	EIPSNF
E3KARP	FRERIRERQRESLRARGSRGARAFALPGPAD

Figura 11. Alineación de la secuencia de aminoácidos de E3KARP y SIP-1. Las secuencias enmarcadas corresponden a los dominios PDZ de E3KARP y SIP-1. Alineación basada en las secuencias reportadas por Yun *et al.*, 1997 y Poulat *et al.*, 1997.

MAZ es un factor de transcripción que se une a una caja GA (GGGAGGG) en los sitios ME1a1 ubicados en el promotor de *c-myc*, así como a las secuencias CT del gen. También se asocia a secuencias ricas en GC, similares a las que utiliza el factor de

transcripción SP-1. Se ha reportado que MAZ actúa al reclutar diferentes factores, entre ellos desacetilasas de histonas a través de su dominio de represión, lo que permite suponer que este es el mecanismo que sigue para ejercer su efecto represor (Sung *et al.*, 2001).

## 6. OBJETIVO GENERAL

- Caracterización de MAZ y E3KARP como correguladores de los receptores de hormonas esteroides

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto que E3KARP y MAZ tienen en la expresión de un gen reportero mediada por los receptores ER $\alpha$ , AR y PR en la línea celular CV-1.
- Clonación de los dominios amino y carboxilo terminal de los receptores ER $\alpha$ , y PR para obtener las proteínas recombinadas con GST.
- Comprobar la interacción *in vitro* de E3KARP y MAZ con el dominio amino terminal de los receptores ER $\alpha$ , PR y AR.
- Verificar si existen interacciones entre los dominios carboxilo de los receptores ER $\alpha$ , PR y AR con MAZ y E3KARP.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 TRANSFECCIÓN DE MAZ Y E3KARP EN LA LÍNEA CELULAR CV-1.

Para evaluar el efecto de las proteínas aisladas en la expresión de genes controlados por los receptores de hormonas esteroides, se realizaron transfecciones transitorias. Las transfecciones se realizaron en la línea celular CV-1 (deriva de riñón de mono verde), la cual carece de receptores endógenos de hormonas esteroides, lo que permite evaluar de manera individual y sin interferencias a los receptores transfectados. Para evaluar el efecto se utilizaron plásmidos que poseen un gen reportero de luciferasa regulado a través de promotores que son dirigidos por receptores nucleares de hormonas esteroides. Los reporteros utilizados fueron 3X ERE TATA-LUC (donado por Donald MacDonell), cuyo promotor está conformado por tres repeticiones de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) y una caja TATA localizados río arriba del sitio de inicio del gen de luciferasa. El promotor del reportero PRE TATA-LUC (donado por Elizabeth Wilson) contiene un elemento de respuesta del receptor de progesterona (PRE) y una caja TATA río arriba del sitio de inicio de la transcripción de la luciferasa. Para evaluar al receptor de andrógenos se utilizó el promotor MMTV (*mouse mammary tumor virus*) donado por Ron Evans, que contiene elementos de respuesta a andrógenos.

Debido a que la línea celular CV-1 carece de receptores endógenos, se transfectaron los plásmidos pSG-HEGO, pSG-hPR (donados por Pierre Chambon) así como pCMV-hAR (donado por Elizabeth Wilson), que contienen al receptor de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos respectivamente.

Para determinar la eficiencia de transfección se transfectó el gen de  $\beta$ -galactosidasa, el cual se expresa de forma constitutiva, lo que permite la normalización de la transfección.

Se cotransfectaron los diferentes plásmidos de acuerdo a la tabla 2 que se muestra a continuación:

**Tabla 2. Diseño de las transfecciones transitorias con MAZ y E3KARP**

pSG5-HEGO		pcDNA3.1-E3KARP	3XERE TATA-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pSG5-HEGO		pcDNA1-MAZ	3XERE TATA-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pSG5-hPR		pcDNA3.1-E3KARP	PRE TATA-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pSG5-hPR		pcDNA1-MAZ	PRE TATA-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pSG5-hPR	pSG5-SRC-1		PRE TATA-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pCMV-hAR		pcDNA3.1-E3KARP	MMTV-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pCMV-hAR		pcDNA1-MAZ	MMTV-LUC	$\beta$ -galactosidasa
pCMV-hAR	pSG5-SRC-1		MMTV-LUC	$\beta$ -galactosidasa

Las transfecciones de pSG-hPR y pCMV-hAR fueron hechas con fosfato de calcio. Para determinar las cantidades óptimas de DNA que se utilizaron en los ensayos, se realizaron experimentos con cantidades de coactivadores que van de 60 a 200 ng por pozo, hasta obtener las utilizadas en el protocolo utilizado (Langley *et al.*, 1998).

El día anterior a la transfección se colectaron las células, y se sembraron  $7 \times 10^4$  células/pozo en cajas de 12 pozos (4 cm<sup>2</sup>). Se dejan incubando toda la noche en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y rojo de fenol.

El día que se realizó la transfección se prepararon las soluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 0.25 M y HBS 2X (NaCl 0.28M, HEPES 0.05 M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  $1.5 \times 10^{-3}$  M, pH 7.12)

Se hicieron las diluciones adecuadas para agregar por cada pozo:

50 ng de receptor

1500 ng de reportero de luciferasa

500 ng de reportero de  $\beta$ -galactosidasa

120 ng de coactivador SRC-1, E3KARP ó MAZ.

En un tubo estéril de 5 ml se colocaron los volúmenes adecuados de cada plásmido, se agregaron 50  $\mu$ L de la solución de HBS 2X y se agitó suavemente. A la

mezcla anterior se le agregaron gota a gota y con agitación 50  $\mu$ L de la solución de  $\text{CaCl}_2$  0.25 M. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron las células con PBS 1X dos veces. Se agregaron 100  $\mu$ L de la mezcla a las células y se adicionó 1 mL de D-MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se incubaron las células a 37°C durante cinco horas, y posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X. Se agregó 1 mL de D-MEM sin rojo de fenol y suplementado con suero fetal bovino al 0.2%. En este paso se aplicó el tratamiento hormonal, de acuerdo al cual se agregaron 1 nM de progesterona y dihidrotestosterona, así como 10 nM de estradiol cuando se transfectó con los receptores de progesterona, andrógenos y estrógenos, respectivamente (Langley *et al.*, 1995). Por cada coactivador o factor evaluado se manejó un control negativo al cual no se le aplicó el tratamiento hormonal. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado. El tratamiento hormonal se repitió después de 24 horas y a las 48 horas se cosecharon las células para realizar los ensayos de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa.

En la transfección de pSG5-HEGO se utilizó Lipofectamine con Reagent Plus™ de Invitrogen. Las cantidades de DNA utilizadas en el ensayo son las siguientes:

20 ng de receptor

100 ng de reportero de luciferasa

40 ng de reportero de  $\beta$ -galactosidasa

50 ng de coactivador SRC-1, E3KARP ó MAZ

La transfección se estandarizó con base en las instrucciones del fabricante (Invitrogen) Por cada grupo de 4 pozos se utilizaron 2  $\mu$ L de lipofectamine y 3  $\mu$ L de Reagent Plus™. A las cinco horas de realizada la transfección se trató a las células con las hormonas adecuadas, siguiendo un procedimiento similar al observado con las transfecciones por fosfato de calcio. El tratamiento se repitió a las 24 horas y a las 48 horas se cosecharon las células para realizar los ensayos correspondientes.

## 8.2 ENSAYO DE LUCIFERASA Y $\beta$ -GALACTOSIDASA

Para evaluar el efecto de los receptores de hormonas esteroides sobre el gen reportero se determinaron los niveles de la enzima luciferasa, mediante la reacción de oxidación del sustrato luciferina, la cual emite luz que es detectada en un luminómetro. Para normalizar la transfección se determinan los niveles de la enzima  $\beta$ -galactosidasa mediante una reacción de oxidación en la cual se emite luz que es detectada en un luminómetro y en donde el sustrato es Galacton™.

Después de 48 horas del tratamiento con la hormona correspondiente se aspiró el medio de las células y se lavaron dos veces con PBS 1X, se aspiró a sequedad el PBS y se agregaron 100  $\mu$ l de solución de lisis por pozo (amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, DTT 1mM, Tritón X-100 0.2%, pH 7.8). El extracto se utilizó para el ensayo de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa.

### 8.2.1 ENSAYO DE LUCIFERASA

Se tomaron 50  $\mu$ L del extracto celular y se colocaron en una cubeta para luminómetro. Se agregaron 50  $\mu$ l de luciferina 1 mM y 200  $\mu$ L de solución de reacción (glicilglicina 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0.5 mg/mL, pH 7.8), utilizando los inyectoros del luminómetro. El luminómetro se configuró para que la lectura de la muestra se realice durante 20 segundos (Langley *et al.*, 1995).

### 8.2.2 ENSAYO DE $\beta$ -GALACTOSIDASA

Se tomaron 20  $\mu$ L de lisado y se agregaron 100  $\mu$ L de solución de reacción (amortiguador de fosfatos 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Galacton 1X, pH 8). Se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se ajustó el luminómetro para leer la muestra durante 5 segundos. Se agregaron 150  $\mu$ L de la solución de acelerador (NaOH

0.2 M, solución aceleradora TROPIX® 10%) con el inyector del luminómetro. Se configuró el luminómetro para que la lectura se haga 3 segundos después de que se ha agregado la solución aceleradora. El protocolo se modificó del sugerido por el fabricante.

Para normalizar los resultados se obtuvo la relación URL luciferasa/URL  $\beta$ -galactosidasa. Para determinar la inducción se calculó la relación entre los valores registrados en presencia de hormona y aquellos en los que no se aplicó el tratamiento.

### 8.3 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE PR y ER $\alpha$ .

Para comprobar la interacción de los dominios carboxilo y amino de los receptores de hormonas esteroideas con los factores en estudio, se recurrió al diseño de proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) con los dominios amino y carboxilo de ER $\alpha$  y PR (ver tabla 4).

Para amplificar la secuencia de los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares se diseñaron oligonucleótidos (para mayor detalle ver la tabla 3), que mantuvieran el marco de lectura de los receptores y de GST. Al diseñar los oligonucleótidos, se agregaron las secuencias de recombinación attB1 y attB2 utilizadas por el sistema de clonación Gateway de Invitrogen.

Los dominios amino de ER $\alpha$  y carboxilo de PR se amplificaron utilizando una concentración de 2 mM de magnesio, el amortiguador de reacción proporcionado por el fabricante de la enzima *Taq* polimerasa, 5% de DMSO, 100 ng de templado, dNTPs 0.2 mM, 0.4  $\mu$ M de cada uno de los oligos y una mezcla de *Taq* polimerasa (1.25 U) y *Pfu* (0.4 U) en un volumen de 50  $\mu$ L. La reacción se realizó durante 25 ciclos, en los cuales la temperatura de desnaturalización fue de 94 °C durante 1 minuto, alineamiento 50°C

por 1 minuto y de extensión 72 °C durante 1:30 minutos. La enzima *Pfu* se utilizó para disminuir la posibilidad de mutaciones durante la amplificación de los fragmentos debido a su actividad de exonucleasa.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares.**

Secuencias de recombinación para clonación en el sistema Gateway	
attB1 (5' a 3') Secuencia sentido	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T.
AttB2 (5' a 3') Secuencia antisentido	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT.

Receptor	Dominio	Secuencia sentido (5' a 3')	Secuencia antisentido (5' a 3')
ER $\alpha$	Amino	CC CAT ATG ACC ATG ACC CTC CAC ACC	C CIT GGC AGA TTC CAT AGC C
	Carboxilo	GG CAT ATG TTG AAA CAC AAG CGC CAC	G AAT TCA GAC TGT GGC AGG GAA ACC
PR	Amino	CC CAT ATG ACT GAG CTG AAG GCA AAG GG	G TGG GCT CTG GCT GGC TTC TG
	Carboxilo	CT CAT ATG GTC CTT GGA GGT C	T TCA CTT TTT ATG AAA GAG AAG GGG

Para establecer las condiciones necesarias para la amplificación de los dominios amino de progesterona y carboxilo del receptor de estrógenos alfa, se utilizó un termociclador de gradiente, en el cual se probaron las temperaturas de alineamiento comprendidas en el intervalo de 40 °C a 60 °C. En la reacción se utilizó una concentración de 2 mM de magnesio, 5% de DMSO, el amortiguador de reacción 1X proporcionado por el fabricante de la *Taq* polimerasa, 100 ng de templado, dNTPs 0.2 mM, 0.4  $\mu$ M de cada uno de los oligos y una mezcla de *Taq* polimerasa (1.25 U) y *Pfu* (0.4 U) en un volumen de 50  $\mu$ L. La reacción se realizó durante 25 ciclos. Los tiempos de desnaturalización fueron de 1 minuto a 94 °C, de alineamiento 1 minuto en el intervalo

de 40 °C a 60 °C y de extensión 3 minutos a 72 °C. La temperatura óptima para la amplificación fue de 58 °C para el receptor amino de progesterona y 60 °C para el dominio carboxilo del receptor de estrógenos alfa.

#### **8.4 CLONACIÓN DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE PR Y ER $\alpha$ EN pDEST15 (GATEWAY, INVITROGEN) PARA OBTENER LOS DOMINIOS FUSIONADOS A GST.**

Para clonar los productos de PCR y obtener las proteínas fusionadas, se utilizó el sistema Gateway de Invitrogen. El sistema de clonación Gateway se basa en la recombinación entre las secuencias attB1 y attB2, que se agregan a los productos que se desea clonar mediante la técnica de PCR, y las secuencias de recombinación que posee un plásmido receptor. Los sitios de recombinación corresponden a los que utiliza el virus lambda para integrarse al genoma del hospedero. El sistema utiliza un plásmido primario o receptor (pDONR™) en el cual se clona inicialmente el fragmento de interés. El plásmido primario conserva secuencias de recombinación, lo que permite que el fragmento se pueda transferir a plásmidos que también posean las secuencias de recombinación. Del plásmido primario se puede transferir fragmentos a plásmidos de expresión en procariontes, insectos o mamíferos, así como en vectores para expresar proteínas de fusión, como GST.

**Tabla 4. Características de los vectores de fusión y los fragmentos clonados.**

PDEST PR-N	Progesterona	amino	1-555	1665	555	54.8	788	84.55
PDEST PR-C	Progesterona	carboxilo	632-933	903	301	32.3	534	57.3
PDEST ERA-N	Estrógenos $\alpha$	amino	1-180	540	180	19.3	413	44.3
PDEST ERA-C	Estrógenos $\alpha$	carboxilo	264-594	990	330	35.4	563	60.4

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Los productos amplificados se purificaron a partir de un gel de agarosa al 0.1%. Los productos purificados se clonaron en el plásmido pDONR™ del sistema Gateway de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se transformaron por choque térmico (30 segundos a 42 °C), 20 µL de células competentes DH5α con 1 µL de la mezcla de reacción. Las células se sembraron en cajas con agar Luria (LB) adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Del cultivo obtenido se tomaron 12 colonias y se hizo una minipreparación de DNA plasmídico. Para verificar la clonación de los fragmentos se realizó un PCR a la minipreparación en las mismas condiciones que se señalan para la amplificación. Los detalles de las proteínas obtenidas se pueden consultar en la tabla 4.

Para obtener los dominios de los receptores fusionados a GST, los dominios clonados en el vector pDONR™ se subclonaron por recombinación homóloga en el vector pDEST15™. Para hacer la transferencia de los dominios se tomó 1 µL de la minipreparación y se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver manual de productos GATEWAY de invitrogen). De la mezcla anterior se tomó 1 µL y con él se transformaron 20 µL de células DH5α. Se sembraron en cajas de agar LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Del cultivo se tomaron 12 colonias y se realizó una minipreparación de DNA plasmídico. Para confirmar la clonación y correcta expresión de las proteínas fusionadas, las células BL21-AI fueron transformaron con 1 µL de las mini-preparaciones, y se indujo la expresión de la proteína. La expresión de las proteínas se verificó a través de una transferencia tipo western, utilizando un anticuerpo anti-GST (Invitrogen).

## **8.5 EXPRESIÓN DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE ER $\alpha$ , PR Y AR EN LA CEPA BL21-AI DE *E. coli*.**

Se tomó 1  $\mu$ L de las mini-preparaciones obtenidas en el punto anterior y se transformó por choque térmico (30 segundos a 42 °C), 20  $\mu$ L de células BL21-AI. Las células se sembraron en cajas con agar LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Para expresar los dominios amino y carboxilo de AR, se utilizaron las construcciones pGEX hAR ABC y pGEX hAR LBD, donadas por la Dra. Elizabeth Wilson, las cuales expresan a los dominio amino y carboxilo, respectivamente, de AR fusionados a GST. Se tomaron 50 ng de cada una de las construcciones y se transformaron 20  $\mu$ L de células BL21-AI.

De los cultivos obtenidos se tomó una colonia y se sembró en 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Se incubó a 37 °C durante toda la noche. Se tomaron 2 mL del cultivo anterior para inocular 200 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), y se creció el cultivo con agitación a 37 °C, hasta que se alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.4, medida a 600 nm. Para inducir la expresión de los dominios de ER $\alpha$  y PR fusionados a GST, se adicionó a los cultivos L-arabinosa a una concentración final de 0.2% e IPTG a una concentración final de 1 mM. Para inducir la expresión de los dominios de AR fusionados a GST se utilizó IPTG a una concentración final de 1 mM. Se continua con la incubación durante 4 horas a 30 °C.

## **8.6 PURIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE LOS RECEPTORES, FUSIONADOS A GST E INTERACCIÓN IN VITRO CON E3KARP Y MAZ MARCADOS CON [<sup>35</sup>S].**

Para verificar la interacción entre los dominios de los receptores nucleares y las proteínas en estudio se purificaron los dominios fusionados a GST utilizando perlas de Glutathione Sepharose 4B® (Farmacia Biotech), a las cuales se une de manera específica a GST.

El cultivo utilizado para la expresión de proteínas se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm y 4 °C. El botón se resuspende en 4 mL del amortiguador de sonicación frío (Nonidet P-40 0.5%, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.02 M, pH8), y se sonican en hielo al máximo nivel durante 15 segundos tres veces. El lisado se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se determinaron las proteínas totales por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para comprobar que la interacción entre los factores aislados y los receptores de hormonas esteroides ocurre en el dominio amino, y verificar si esta interacción también sucede en el dominio carboxilo (LBD) de dichos receptores, se realizó el ensayo con el dominio carboxilo en ausencia y presencia de hormona, mientras que con el dominio amino solo se realizó el ensayo en ausencia de hormona. Se aplicaron las tres condiciones señaladas para los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos.

Para cada una de las condiciones señaladas se tomó un volumen de lisado equivalente a 300 µg de proteína total y se agregó a 30 µL de una mezcla al 50% de perlas de Glutathione Sepharose 4B® (Pharmacia Biotech). La mezcla se incubó durante 1 hora con agitación, a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos, se aspiró el sobrenadante y se lavó con el amortiguador de sonicación frío. El lavado se repitió 2 veces.

El botón se resuspendió en amortiguador de sonicación frío. En el caso del dominio carboxilo de los receptores de hormonas esteroides, en donde tenemos dos muestras por cada receptor, una de las muestras se resuspendió en amortiguador de sonicación adicionado con la hormona correspondiente (dihidrotestosterona, estradiol o progesterona) a una concentración de 100 mM.

A cada una de las muestras se les agregó 10 µL de la proteína correspondiente marcada con una mezcla de [<sup>35</sup>S]-metionina/cisteína y traducida *in vitro* por el sistema TNT® Quick Coupled Transcription/Traslation System de Promega, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La mezcla se incubó a 4 °C durante dos horas con agitación. Posteriormente, se lavó 3 veces con buffer de sonicación con o sin hormona, según corresponda. Después del tercer lavado la muestra se resuspendió en 40 µL de amortiguador de carga 1X (SDS 2%, glicerol 10% y Tris 10 mM, pH 6.8) para geles de acrilamida.

#### **8.7 VISUALIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN: AUTORRADIOGRAFÍA Y WESTERN BLOT.**

La muestra obtenida en el procedimiento anterior se calentó a 90 °C durante 5 minutos. Se corrieron 20 µL de cada una de las muestras en un gel de acrilamida al 10%, a 100 mV durante 1 hora. El gel se transfirió a una membrana de PVDF, durante toda la noche a 20 mV y a 4 °C. Para visualizar la interacción se expuso una película de rayos X a la membrana, durante tres días. La película se reveló en un equipo automatizado.

Para verificar la expresión de los dominios amino y carboxilo de los receptores fusionados a GST, se realizó una transferencia tipo western utilizando un anticuerpo anti-GST. Se purificó el equivalente a 300 µg de proteínas totales siguiendo el procedimiento señalado en el punto anterior. Se corrieron 20 µL de cada una de las muestras y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con agitación durante 1 hora en una solución de leche en polvo al 5% disuelta en PBST ( PBS 1X, Tween™ 20 0.1%). Se lavó la membrana tres veces con PBST. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora con una dilución 1:5000 hecha en PBST del anticuerpo anti-GST-HRP. El anticuerpo anti-GST-HRP tiene fusionada la peroxidasa de raíz fuerte, la cual es capaz de oxidar diacilhidrazidas y como consecuencia de la oxidación hay una emisión de luz, la cual es detectada por películas para rayos X o las

películas ECL para quimioluminiscencia. La fusión de la peroxidasa al anticuerpo evita la utilización de un segundo anticuerpo. Para realizar la detección se incubó la membrana con la mezcla de reactivos ECL y se expone a una película Hyperfilm™ ECL (Kodak) durante 15 segundos. La película se revela en un equipo convencional para el revelado de películas para rayos X.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 INFLUENCIA DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO DE LUCIFERASA REGULADO POR LOS RECEPTORES DE ANDRÓGENOS, ESTRÓGENOS ALFA Y PROGESTERONA.**

Para evaluar el efecto de E3KARP, éste se transfectó con cada uno de los receptores estudiados en la línea celular CV-1. Para medir los niveles de activación se transfectó como reportero al gen de luciferasa. La expresión de luciferasa se encuentra regulada por un promotor cuya actividad es dependiente de los receptores de hormonas esteroides. Para monitorear la eficiencia de transfección y normalizar los resultados se transfectó el reportero  $\beta$ -galactosidasa, el cual es expresado en forma constitutiva en células de mamífero. Los resultados mostrados son un experimento tipo, ya que todos los ensayos se repitieron al menos en tres ocasiones.

#### **9.1.1 TRANSFECCIÓN DE AR Y E3KARP EN LA LÍNEA CELULAR CV-1: INFLUENCIA DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR AR.**

La transfección se realizó por el método de fosfato de calcio. Se utilizó como reportero al gen de luciferasa dirigido por el promotor MMTV, el cual es modulado por el receptor de andrógenos en forma dependiente a hormona. Para realizar el experimento se utilizaron tres condiciones diferentes, en la primera se transfectó únicamente al receptor de andrógenos, en la segunda se transfectó al receptor de andrógenos y a E3KARP y en la última se transfectó al receptor de andrógenos con un coactivador conocido, en este caso SRC-1 (coactivador de receptores esteroideos 1), el cual se utilizó como control positivo. Todas las condiciones se ensayaron en ausencia y presencia de dihidrotestosterona 1 nM. El control utilizado en todos los ensayos corresponde al efecto que los receptores ejercen sin la presencia de proteínas adicionales. La inducción se refiere a la relación entre la expresión basal y la inducida por hormona.

En la gráfica 12A, al comparar contra el control el efecto que E3KARP tiene en la expresión de luciferasa, observamos que la expresión se incrementa considerablemente, e incluso es superior al efecto registrado con SRC-1, el cual esperábamos fuera alto ya que se ha reportado como un coactivador de los receptores de hormonas esteroides. De acuerdo a la gráfica 12A el incremento en la expresión es contundente y esto lo confirmamos en la gráfica 12B que muestra la inducción, la cual nos permite establecer que E3KARP incrementó los niveles de expresión de luciferasa 13 veces (1200%) con respecto al control.

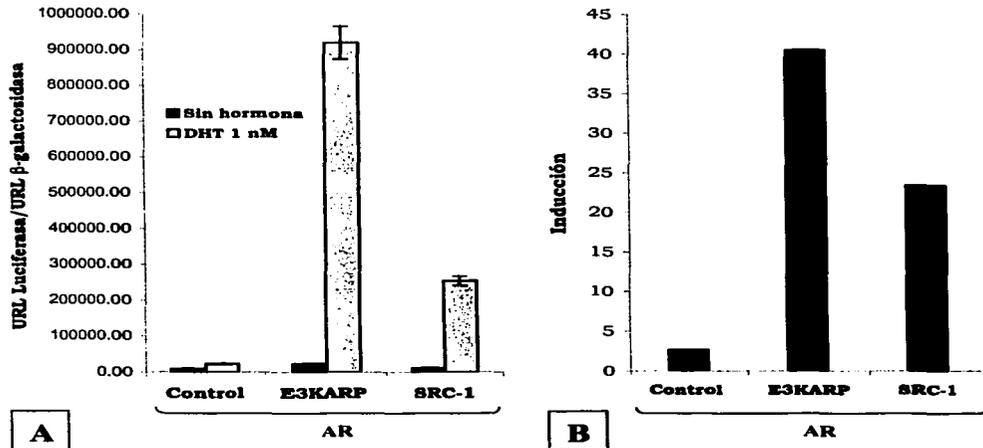


Figura 12. Influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa mediada por AR en células CV-1. A) Se muestran las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa normalizadas con los valores de las unidades relativas de luz (URL) de  $\beta$ -galactosidasa. Las muestras se trataron sin hormona y con dihidrotestosterona 1 nM. B) Se muestra un incremento de 13 veces en la expresión de luciferasa, mientras que SRC-1 incrementa en 8 veces la expresión.

En el caso de SRC-1 se mostró un incremento cercano a 8 veces con respecto al control (800%). Los resultados anteriores nos permiten suponer que E3KARP se trata de un coactivador de AR.

### 9.1.2 TRANSFECCIÓN DE $ER\alpha$ Y E3KARP EN LA LÍNEA CELULAR CV-1: INFLUENCIA DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR $ER\alpha$ .

La transfección se realizó utilizando Lipofectamine y Reagent Plus™ de Invitrogen. Para evaluar el efecto de E3KARP sobre la expresión mediada por  $ER\alpha$ , se empleó al gen reportero de luciferasa regulado por el promotor 3X ERE TATA-LUC, el cual es modulado por el receptor de estrógenos en forma dependiente a hormona. Para este ensayo se transfectaron a  $ER\alpha$  y  $ER\alpha$  con E3KARP. En todos los casos se trabajó en ausencia o presencia de estradiol 10 nM.

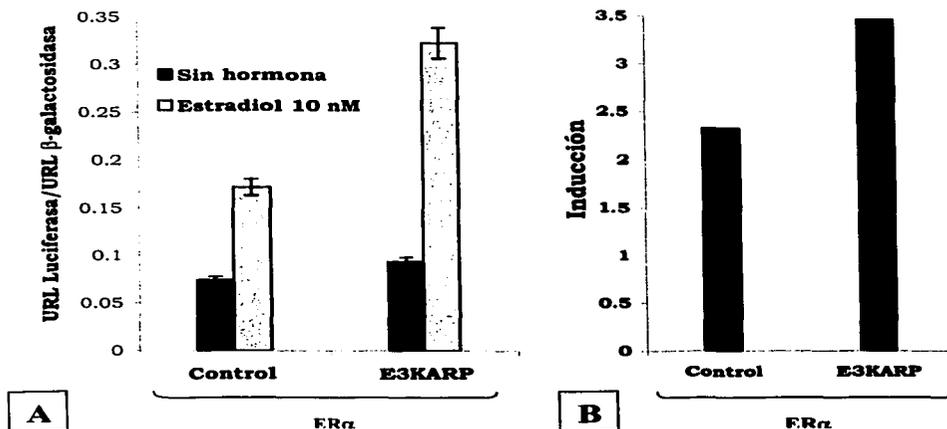


Figura 13. Influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa mediada por  $ER\alpha$  en células CV-1. A) URL de luciferasa normalizadas con URL de  $\beta$ -galactosidasa. Las muestras se trataron con y sin estradiol 10 nM. B) En la gráfica B se muestra la inducción, la cual fue de 2.4 en el control en el que se transfectó únicamente  $ER\alpha$  y 3.4 cuando se cotransfectaron  $ER\alpha$  y E3KARP.

La gráfica 13A muestra que E3KARP incrementa la expresión de luciferasa, sin embargo también es notable que la expresión es alta en ausencia de hormona, lo cual

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

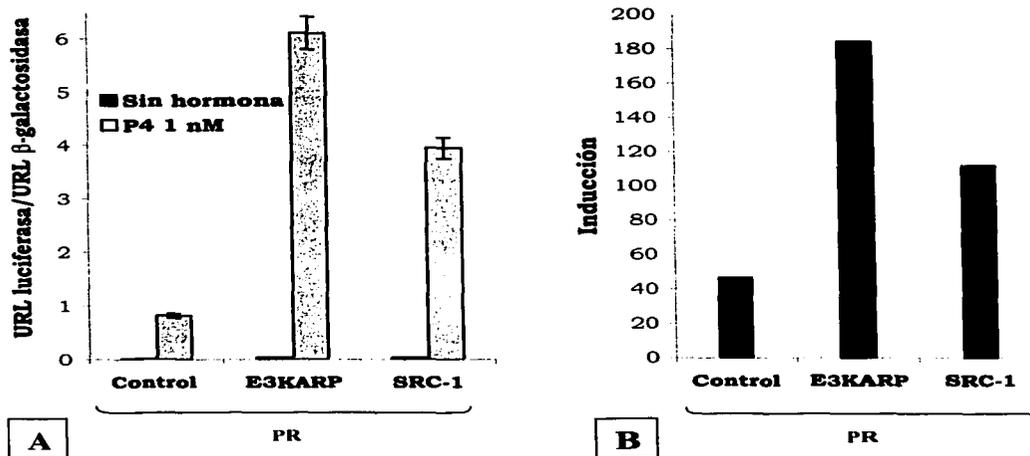
genera un fondo muy alto. La actividad en ausencia de hormona se encuentra relacionada a la construcción del promotor, lo cual se discutirá más adelante. Para determinar el efecto que ejerce E3KARP sobre la expresión mediada por ER $\alpha$ , se calculó la inducción, la cual se muestra en la gráfica 13B. El gráfico 13B nos muestra que la inducción producida por el receptor ER $\alpha$  sin E3KARP es de 2.4 veces, mientras que cuando se cotransfectan ER $\alpha$  y E3KARP el incremento es de 3.4 veces, lo que se traduce en un incremento del 40% con respecto al control. A pesar de que el incremento en la expresión del gen reportero no es tan alto como en el caso de AR, el hecho de que este incremento sea constante en todos experimentos con ER $\alpha$  nos sugiere que E3KARP afecta positivamente la expresión del gen reportero de luciferasa.

### *9.1.3 TRANSFECCIÓN DE PR Y E3KARP EN LA LÍNEA CELULAR CV-1: INFLUENCIA DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR PR.*

Para transfectar PR y E3KARP se empleó el método de fosfato de calcio. Se utilizó como reportero al gen de luciferasa regulado por el promotor sintético PRE TATA-LUC, el cual es modulado por el receptor de progesterona en forma dependiente a hormona. Para realizar el experimento se transfectó únicamente al receptor de progesterona, como control. Se transfectaron también a PR con E3KARP así como PR con SRC-1 como control positivo. En todos los casos se trató a las células en ausencia y presencia de progesterona 10 nM.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14. En la gráfica 14A se observa un incremento considerable en la expresión de luciferasa cuando se cotransfectan PR con E3KARP y PR con SRC-1, aún cuando el incremento provocado por SRC-1 no es tan contundente como el obtenido con E3KARP. Podemos notar también que la expresión basal de luciferasa es muy pequeña, por lo que es de esperar que la inducción muestre perfiles similares a los observados en la gráfica 14A. En la gráfica 14B se muestra que el E3KARP incrementa la expresión de luciferasa 186 veces,

mientras el control sin coactivador muestra un incremento de 46 veces, lo que nos indica que E3KARP incrementó en un 300% la expresión con respecto al control. Con respecto a SRC-1, éste incrementa la expresión de luciferasa 116 veces, lo que equivale a un incremento de 150% con respecto al control. Los resultados obtenidos nos permiten presumir que E3KARP se comporta como un coactivador del receptor de progesterona.



**Figura 14. Influencia de E3KARP sobre la expresión de luciferasa mediada por PR en células CV-1.** A) URL de luciferasa normalizadas con URL de  $\beta$ -galactosidasa. Las muestras se trataron con y sin progesterona 1 nM. B) En la gráfica B se muestra la inducción, la cual fue de 46 sobre el control sin hormona cuando se transfectó únicamente PR y 186 cuando se cotransfectaron PR y E3KARP. La inducción con SRC-1 fue de 116 veces.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **9.2 INFLUENCIA DE MAZ SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO DE LUCIFERASA REGULADO POR LOS RECEPTORES DE ANDRÓGENOS, ESTRÓGENOS ALFA Y PROGESTERONA.**

Para evaluar el efecto de MAZ, se cotransfectó MAZ con cada uno de los receptores, en la línea celular CV-1. La medición de la influencia de MAZ sobre los niveles de expresión se realizó de la misma forma que la indicada con E3KARP.

### **9.2.1 TRANSFECCIÓN DE AR Y MAZ EN LA LÍNEA CELULAR CV-1: INFLUENCIA DE MAZ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR AR**

La transfección de AR y MAZ se realizó siguiendo el método de fosfato de calcio. Se utilizó como reportero al gen de luciferasa dirigido por el promotor MMTV, el cual es modulado por el receptor de andrógenos de forma dependiente a hormona. En el ensayo se transfectó al receptor de andrógenos como control, así como al receptor de andrógenos y MAZ. En ambos casos se les aplicó un tratamiento sin hormona y con dihidrotestosterona 1 nM.

En la gráfica 15A no se observa un cambio significativo en los niveles de expresión; además, la expresión basal es alta, por lo que recurrimos a la gráfica 15B, en donde se muestra la relación entre la expresión basal y la inducida por hormona (inducción), para determinar el efecto que MAZ tiene en la expresión. La gráfica 15B nos indica que hay un ligero decremento en la expresión cuando se transfecta MAZ, ya que la inducción ejercida por el control es de 13 veces, mientras que en presencia de MAZ disminuye a 11, lo que significa una disminución de un poco más del 15%. La disminución observada en el experimento es constante en todos los ensayos, lo cual nos sugiere que puede actuar como un represor, sin embargo se deberán emplear sistemas más complejos para evaluar el efecto de MAZ. Los ensayos y las condiciones necesarias para evaluar el efecto de MAZ se discutirán más adelante.

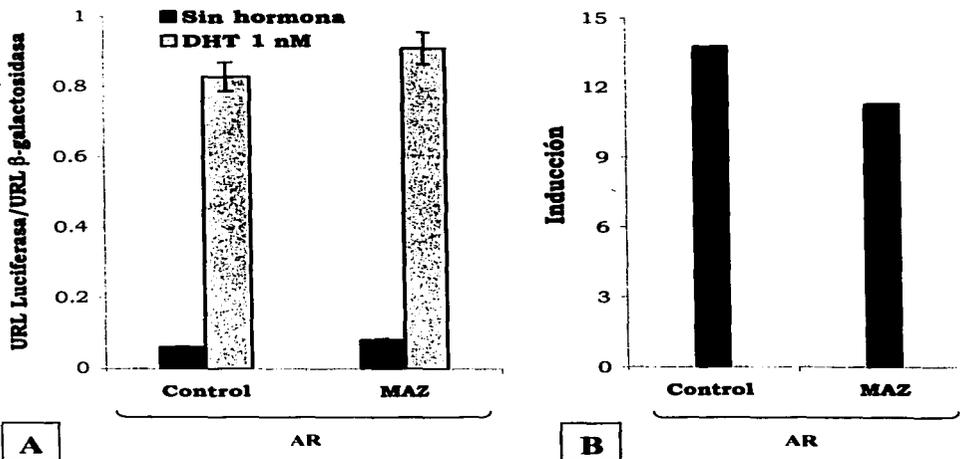
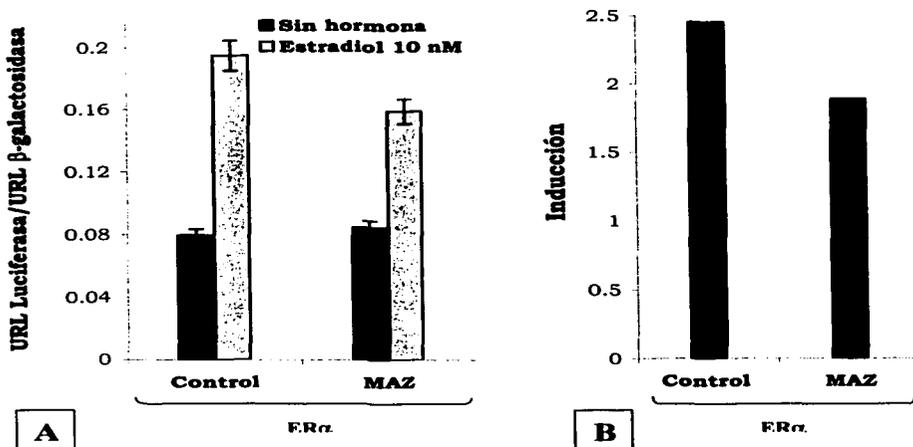


Figura 15. Influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa mediada por AR en células CV-1. A) URL de luciferasa normalizadas con URL de β-galactosidasa. En ambas condiciones se siguió un tratamiento sin hormona y con dihidrotestosterona 1 nM. B) En la gráfica B se muestra la inducción, la cual fue de 13 veces en el control contra 11 veces cuando se transfectó MAZ, lo que representa una disminución en la expresión cercana al 15%.

### 9.2.2 TRANSFECCIÓN DE ERα Y MAZ EN LA LÍNEA CELULAR CV-1: INFLUENCIA DE MAZ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR ERα.

Para transfectar MAZ y ERα se utilizó Lipofectamine y Reagent Plus™ de Invitrogen. En las transfecciones se empleó como reportero al gen de luciferasa regulado por el promotor 3X ERE TATA-LUC, el cual es modulado por los receptores de estrógenos en forma dependiente a hormona. En este ensayo se emplearon dos condiciones diferentes, en la primera se transfectó solo al receptor de estrógenos como control y en la segunda se cotransfectaron a MAZ y al receptor de estrógenos alfa. Ambas condiciones fueron tratadas sin hormona y con estradiol 10 nM.



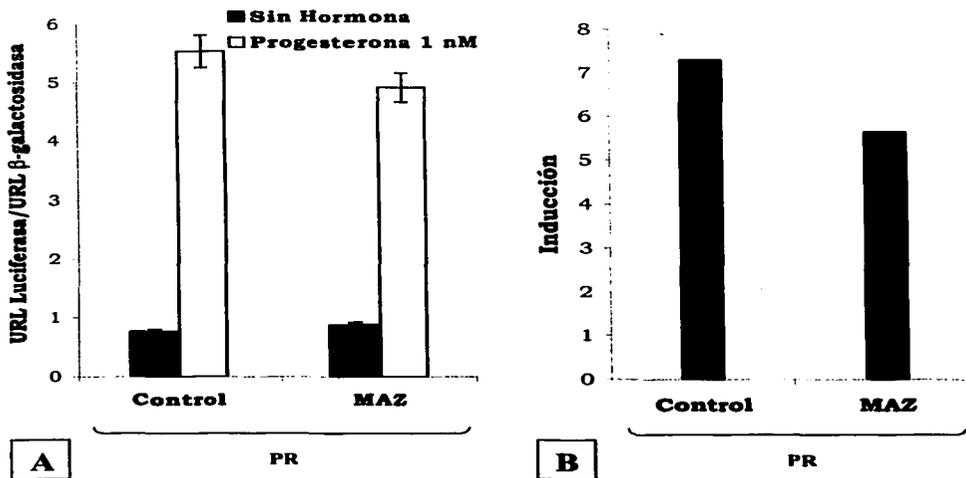
**Figura 16. Influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa mediada por ER $\alpha$  en células CV-1.** A) URL de luciferasa normalizadas con URL de  $\beta$ -galactosidasa. Las muestras se trataron con y sin estradiol 10 nM. B) En la gráfica B se muestra la inducción, la cual fue de 2.5 veces en el control en el que se transfectó únicamente ER $\alpha$  y 1.9 veces cuando se cotransfectaron ER $\alpha$  y MAZ.

En la gráfica 16A se observa que MAZ provoca una disminución en la expresión de luciferasa cuando se compara con respecto al control. Al igual que en el ensayo con E3KARP, se observa una expresión basal (en ausencia de hormona) muy alta. Para evaluar el efecto de MAZ en la expresión de luciferasa se calculó la inducción, la cual se muestra en la gráfica 16B. La gráfica 16B nos permite señalar que la expresión de luciferasa se incrementa 2.5 veces sobre la basal en el control. Sin embargo, cuando se cotransfectan MAZ y el receptor de estrógenos alfa la expresión disminuye hasta 1.9 veces, lo que representa un decremento del 25% con respecto al control. De nuevo los resultados obtenidos nos permiten especular que se trata de un correpressor, sin embargo serán necesarios nuevos ensayos que nos permitan confirmarlo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 9.2.3 TRANSFECCIÓN DE PR Y MAZ EN LA LÍNEA CELULAR CV-1: INFLUENCIA DE MAZ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR PR

La transfección de MAZ y PR se realizó siguiendo el método de fosfato de calcio. Se utilizó como reportero al gen de luciferasa controlado por el promotor PRE TATA-LUC, el cual es modulado por el receptor de progesterona en forma dependiente a hormona. Para realizar este ensayo se emplearon dos condiciones, en la primera se transfectó al receptor de progesterona como control, mientras que en la segunda se cotransfectaron al receptor de progesterona y a MAZ. En ambos se casos se siguió un tratamiento sin hormona y con progesterona 1 nM.



**Figura 17. Influencia de MAZ sobre la expresión de luciferasa mediada por PR en células CV-1. A) URL de luciferasa normalizadas con URL de β-galactosidasa. Las muestras se trataron sin hormona y con estradiol 10 nM. B) La gráfica B muestra la inducción, la cual fue de un poco más de 7.3 veces en el control, mientras que cuando se cotransfectaron MAZ y PR, la inducción fue de casi 6 veces.**

La gráfica 17A nos muestra que el receptor de progesterona, cuando es cotransfectado con MAZ, produce una disminución en la expresión de luciferasa. Esto se ve reflejado en la gráfica 17B en donde se muestra la inducción. La gráfica 17B nos indica que el control incrementa 7.3 veces la expresión de luciferasa, sin embargo cuando es cotransfectado el receptor de progesterona con MAZ la expresión disminuye hasta 5.9 veces, lo cual representa una disminución del 19%. Este resultado nos lleva a considerar a MAZ como un probable correpressor del receptor de progesterona.

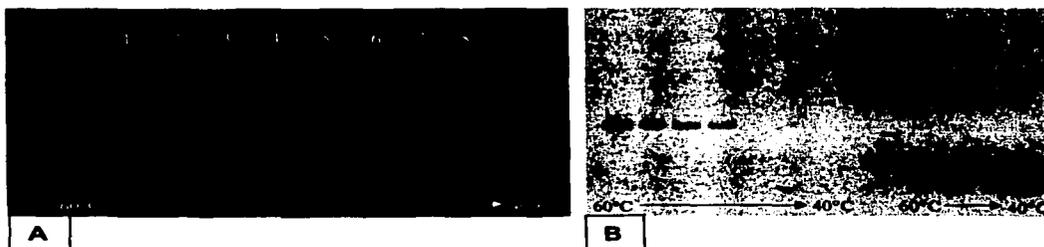
Es importante señalar que a pesar de que MAZ parece actuar como un represor de los receptores de andrógenos, estrógenos alfa y progesterona, los resultados obtenidos no son suficientes para poder afirmarlo. Es necesario realizar una serie de ensayos con otro tipo de promotores, los cuales nos permitirán confirmar si se trata de un correpressor de los receptores antes mencionados. Este punto será discutido con mayor profundidad más adelante.

### **9.3 CLONACIÓN DE LOS DOMINIOS AMINO Y CARBOXILO TERMINAL DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA Y PROGESTERONA.**

Las secuencias de DNA de los dominios amino y carboxilo de los receptores de estrógenos alfa y progesterona se amplificaron y purificaron como se indica en la sección de metodología. La clonación de estos fragmentos se realizó de acuerdo a lo señalado en el protocolo de Gateway (Invitrogen). Los pesos moleculares y tamaños de los fragmentos se muestran en la tabla 4 ubicada en la sección de metodología.

La amplificación de la secuencia de DNA de los dominios de los receptores se realizó en dos etapas. En la primera se logró amplificar la secuencia correspondiente al dominio amino del receptor de estrógenos alfa, así como a la del dominio carboxilo del receptor de progesterona, ambos a una temperatura de desnaturalización de 94 °C

durante 1 minuto, de alineación de 50 °C durante un minuto y 1:30 minutos de extensión a 72 °C.

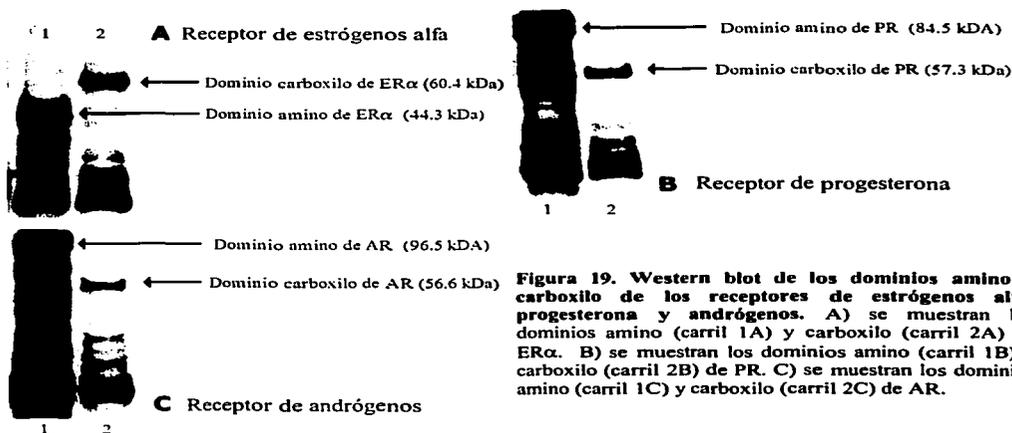


**Figura 18. Amplificación de la secuencia de los dominios amino de progesterona y carboxilo del receptor de estrógenos alfa por PCR de gradiente.** En la figura A se muestra el PCR de gradiente para amplificar la secuencia del dominio amino de progesterona (carriles 1-8). Partiendo de esta información el fragmento se amplificó utilizando una temperatura de alineación de 58 °C. En la figura B se muestra la amplificación de la secuencia del dominio carboxilo del receptor alfa de estrógenos (1-8), en donde se mostró que la mejor temperatura de alineación es a 60 °C. Los carriles 9-12 corresponden a la secuencia del dominio amino de ER $\alpha$ . En ambos geles se utilizó el marcador III (digestión de lambda con *Hind III-EcoRI*). Los características de la reacción se detallan en la sección correspondiente a la metodología.

En la segunda etapa, para estandarizar la amplificación de las secuencias de los dominios amino del receptor de progesterona y carboxilo del receptor de estrógenos alfa se utilizó un termociclador de gradiente, con el cual se determinaron las temperaturas de amplificación (figura 18). La temperatura óptima de alineación para la amplificación de la secuencia del dominio carboxilo del receptor de estrógenos alfa fue de 60 °C, mientras que para el dominio amino del receptor de progesterona la temperatura óptima fue de 58 °C.

El cDNA correspondiente a los dominios de los receptores esteroideos se clonó en el vector pDONR™. Posteriormente el cDNA se subclonó por recombinación homóloga en el vector pDEST™ 15, el cual contiene la secuencia que codifica para GST, por lo que la expresión de este plásmido nos permite obtener los dominios de los receptores fusionados a GST. El plásmido pDEST™ 15 es un vector de expresión para *E. coli*. Para

verificar que las secuencias de DNA de los dominios de los receptores se clonaron y se expresan correctamente en *E. coli*, se hizo un western blot utilizando un anticuerpo anti-GST. Para asegurar que las construcciones pGEX hAR ABC y pGEX hAR LBD donadas por la Dra. Elizabeth Wilson expresaran correctamente los dominios amino y carboxilo del receptor de andrógenos, respectivamente, también se realizó un western blot a sus productos (figura 19).



**Figura 19. Western blot de los dominios amino y carboxilo de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos.** A) se muestran los dominios amino (carril 1A) y carboxilo (carril 2A) de ER $\alpha$ . B) se muestran los dominios amino (carril 1B) y carboxilo (carril 2B) de PR. C) se muestran los dominios amino (carril 1C) y carboxilo (carril 2C) de AR.

Al analizar los western blot en la figura 19, observamos que los dominios amino de todos los receptores sufren una fuerte degradación, lo que provoca que aparezca un barrido en el western blot. Si comparamos el dominio amino terminal de PR con el mismo dominio del receptor de AR, observamos que tiene el mismo comportamiento. En el caso del dominio amino terminal de ER $\alpha$ , éste también se degrada, sin embargo la degradación no es tan marcada como en los casos de AR y PR. Los dominios carboxilo de todos los receptores nucleares se pueden observar claramente y con poca degradación.

#### 9.4 INTERACCIÓN *IN VITRO*: AUTORADIOGRAFÍA.

Una vez que se aseguró que las proteínas fusionadas se expresaban correctamente en la cepa BL21-AI, se diseñó el experimento que nos permitiera comprobar que existe una interacción directa de E3KARP y MAZ con los dominios amino y/o carboxilo de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos.

Para realizar la interacción se tradujeron *in vitro* las proteínas en estudio. Sin embargo, MAZ no se logró traducir. Para asegurar que el plásmido utilizado contenía a MAZ, se secuenció la construcción utilizando el promotor T7 del plásmido, pero no se obtuvo la secuencia. Se utilizó entonces un oligonucleótido que permite secuenciar a partir del promotor SP6, ubicado en el extremo de la secuencia de DNA que codifica la región carboxilo de MAZ, lo que nos permitió obtener la secuencia, la cual coincidía con MAZ.

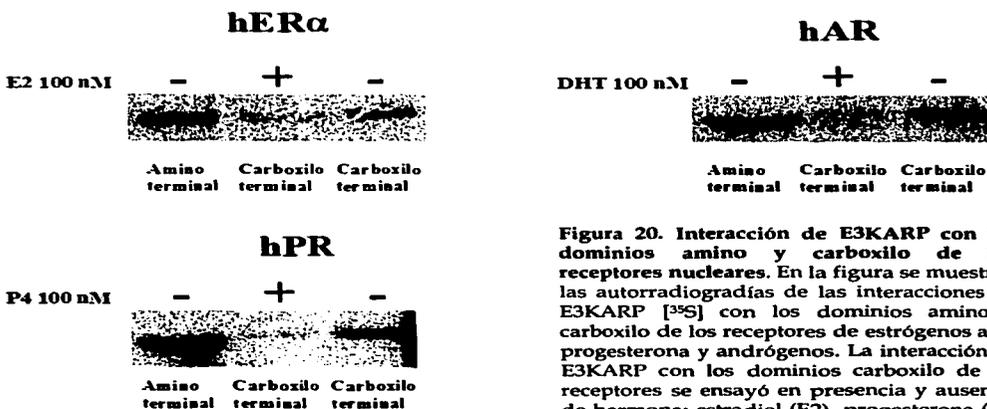


Figura 20. Interacción de E3KARP con los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares. En la figura se muestran las autorradiografías de las interacciones de E3KARP [ $^{35}$ S] con los dominios amino y carboxilo de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos. La interacción de E3KARP con los dominios carboxilo de los receptores se ensayó en presencia y ausencia de hormona: estradiol (E2), progesterona (P4) así como dihidrotestosterona (DHT).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Se puede concluir que MAZ no se logró traducir debido a que el sistema de traducción utilizado requiere del promotor T7, el cual ha perdido su actividad en el plásmido en el que se encuentra clonado MAZ, lo que nos impidió realizar la interacción *in vitro* con MAZ.

E3KARP se tradujo *in vitro*, marcado con [<sup>35</sup>S]-metionina/cistefna y con él se realizaron las interacciones *in vitro* con los dominio amino y carboxilo terminal de los receptores de estrógenos alfa, progesterona y andrógenos.

De la autorradiografía se desprende que E3KARP interactúa con los dominios amino de todos los receptores probados, así como con los dominios carboxilo. Sin embargo, la fuerza de esta interacción es mayor con los dominios amino terminal y más tenue en los dominios carboxilo de los receptores ER $\alpha$ , PR y AR. Es notable que la interacción con los dominios carboxilo sea menor en presencia de hormona y que este patrón se repita para todos los receptores probados. Este hecho se discutirá más adelante.

Por otra parte, la interacción con la región amino sugiere que E3KARP podría interaccionar con la región de transactivación 1, lo cual requiere que se haga un mapeo más específico que nos permita ubicar la región precisa en la que ocurre dicha interacción.

## 10. DISCUSIÓN

La importancia de aislar correguladores que interaccionen con la región amino terminal es clara. A la fecha se han encontrado un gran número de coactivadores que interaccionan con la región de transactivación 2 (AF-2) ubicada en la región carboxilo. Sin embargo, son pocos los coactivadores que se conocen que interactúen con la región amino terminal o con otras regiones de los receptores nucleares. Es probable que el conocimiento de los detalles que nos indique el cómo y cuáles son las proteínas interaccionan con esta región, nos aporten las claves que permitan discernir algunos de los procesos en los que intervienen los receptores nucleares, como la resistencia a tamoxifén que se presenta en pacientes con cáncer de mama después de tratamientos prolongados, o bien la especificidad de la acción sobre ciertos promotores. Como ejemplo de este tipo de proteínas tenemos al coactivador L7/SPA, el cual no interacciona con la región AF-2 de los receptores sino con la región de bisagra, e incrementa los niveles de transactivación en presencia de tamoxifen. Esto refuerza la hipótesis de que regiones distintas al dominio AF-2 son responsables de algunas de las respuestas mediadas por los receptores nucleares.

La primera parte de este trabajo se desarrolló para comprobar que E3KARP y MAZ son capaces de ejercer un efecto en los niveles de transcripción de genes regulados por receptores a estrógenos, andrógenos y progesterona, todos ellos pertenecientes a la familia de los receptores de hormonas esteroides. Era importante desarrollar esta parte del proyecto ya que la sola interacción de una proteína con un factor de transcripción, aún en las regiones de activación, no asegura que desempeñe un papel destacado en el proceso de transcripción.

Los resultados obtenidos nos muestran que E3KARP produce un incremento en la expresión mediada por andrógenos, la cual fue de aproximadamente 13 veces

comparada con el control en ausencia de coactivador, mientras que en los casos de progesterona el incremento fue cuatro veces superior al registrado por el control. El receptor de estrógenos alfa es un caso interesante, ya que en este receptor el incremento fue cercano a un 40%. El hecho de que en el receptor de estrógenos, el efecto de E3KARP no sea tan grande como en el receptor de andrógenos o progesterona, podría encontrar una explicación en reportes que muestran que la actividad del receptor varía de acuerdo a la línea celular y al promotor utilizado (Cowley *et al.*, 1999; Kushner *et al.*, 2000). Por ejemplo, se ha mostrado que el promotor sintético 2ERE-pS2-CAT requiere de las regiones de transactivación AF-1 y AF-2 de ER $\alpha$  para que se lleve a cabo la transcripción, mientras que la activación mediada por el promotor ERE-TK-luc no requiere de la región AF-1 ER $\alpha$  para llevar a cabo la transcripción (Cowley *et al.*, 1999). Esto es congruente con las observaciones que muestran que en promotores simples constituídos únicamente por cajas TATA y elementos de respuesta a estrógenos (como es el caso de 3X ERE-LUC, utilizado en nuestros experimentos) la participación de la región AF-1 es débil, comparada con el efecto que produce en promotores más complejos que contienen sitios de unión para diversos factores de transcripción. Este efecto se ha tratado de explicar por una baja afinidad de la región AF-1 con los coactivadores de la familia p160 principalmente, pero no podemos descartar la posibilidad de que otros factores, como E3KARP, se puedan encontrar en la misma situación. Sin embargo, cuando se trata de un promotor más complejo que posee sitios de unión para otros factores de transcripción, además de los elementos de respuesta a estrógenos, es probable que éstos sean capaces de reclutar complejos de coactivadores que contengan a la familia p160 y con ello se vea solventada la baja afinidad de la región AF-1 del receptor de estrógenos, tal y como se ha propuesto que ocurre con los factores de AP-1. La baja afinidad que la región AF-1 presenta hacia algunos de los miembros de la familia p160 no significa que debido a esto el poder de activación de la región AF-1 sea pequeña (Kushner *et al.*, 2000).

La interacción *in vitro* de E3KARP con los dominios amino y carboxilo de ER $\alpha$ , PR y AR nos muestra que hay una interacción directa con la región amino de los tres receptores, lo cual era de esperarse, al menos en el caso del dominio amino de ER $\alpha$ , ya que E3KARP fue aislado por un ensayo de doble híbrido con este dominio. Se encontró que E3KARP es capaz de interactuar también con la región carboxilo en ausencia de hormona, lo cual fue un hallazgo inesperado. La interacción con la región carboxilo se pierde parcial o totalmente en los tres receptores cuando se adiciona la hormona correspondiente. Es importante resaltar que la fuerza de la interacción entre los dominios de los receptores y E3KARP no es igual para los dominios amino y carboxilo; ya que ER $\alpha$ , PR y AR muestran una interacción muy fuerte en la región amino pero en el dominio carboxilo es menor.

De los resultados obtenidos se desprende que E3KARP interacciona con los receptores nucleares ER $\alpha$ , AR y PR y que es capaz de incrementar los niveles de transcripción en promotores sencillos. Sin embargo, queda por explicar el mecanismo por el cual E3KARP es capaz de incrementar los niveles de transcripción. Proponemos básicamente dos hipótesis, la primera establece que E3KARP es un coactivador de los receptores nucleares que interacciona directamente con la región AF-1, y que podría reclutar e interactuar con otros coactivadores, incluso con miembros del complejo de iniciación. Existen, sin embargo, algunos puntos que quedan sueltos, el primero de ellos es considerar que E3KARP es una proteína cuya ubicación nuclear no ha sido comprobada. E3KARP es además una proteína que se ha relacionado con la regulación de un intercambiador iónico, lo cual la ubica como una proteína citosólica. Es importante señalar que SIP-1, que es una proteína relacionada a E3KARP, funciona como un coactivador de SRY, lo que nos indica que su localización es nuclear (Poulet *et al.*, 1997). Existe, además, el reporte de la proteína CASK7/LIN-2 que es una guanilato cinasa asociada a membrana (MAGUK), la cual puede ser translocada al núcleo en asociación al factor de transcripción Tbr-1. Una vez que el complejo formado entre Tbr-

1 y CASK/LINK-2 es translocado al núcleo, CASK/LIN-2 actúa como un coactivador del factor de transcripción Tbr-1 (Hsueh *et al.*, 2000). Es posible que E3KARP se comporte de una manera similar a CASK/LIN-2, lo cual nos conduciría a un nuevo tipo de proteínas que realiza diversas funciones, y en estructuras poco relacionadas. La posibilidad de que E3KARP sea translocado al núcleo ofrece una explicación que nos permite considerar a E3KARP como un coactivador de los receptores nucleares, sin embargo queda por contestar cuál es el proceso que desencadena su translocación al núcleo, el cual puede estar asociado a fosforilaciones.

Es hasta cierto punto sorprendente que E3KARP funcione como coactivador de al menos tres tipos de receptores nucleares, y que interactúe directamente con la región AF-1 que es, además, la menos conservada. Sin embargo, para tratar de explicar este fenómeno es importante hacer algunas consideraciones. El dominio amino de los receptores nucleares al parecer presenta un plegamiento dinámico, es decir que las estructuras tridimensionales se encuentran cambiando constantemente, por lo que a la fecha no se ha logrado encontrar una estructura terciaria bien definida (Kumar y Thompson, 2003). Debido a las características antes mencionadas se han propuesto diversas hipótesis acerca de cómo se da la unión entre este dominio y los coactivadores con los que interactúa. Se ha propuesto que la interacción con las proteínas que presentan plegamientos dinámicos se da entre regiones cargadas (Hope *et al.*, 1998; Almlof *et al.*, 1995) o bien entre regiones que contengan aminoácidos hidrofóbicos (Almlof *et al.*, 1997), por lo que la existencia de una estructura terciaria permanente y bien definida no es necesaria. Esto nos hace pensar que la interacción de E3KARP ocurre con regiones hidrofóbicas o cargadas de la región amino de los receptores nucleares, lo cual nos permite explicar como puede interactuar con tres diferentes proteínas sin la necesidad de que éstas posean una secuencia en común, pues solo se requerirán regiones con cierta carga o bien regiones hidrofóbicas.

La segunda hipótesis que planteamos establece que el incremento en los niveles de transcripción se debe a la estabilización de los receptores nucleares ubicados en el citoplasma por E3KARP, en ausencia de ligando, tal y como sucede con las proteínas de choque térmico. La estabilidad que se generaría debido a la asociación entre E3KARP y los receptores nucleares, permitiría que los receptores fueran menos accesibles a la actividad de proteasas que los podrían degradar, principalmente la región amino terminal que es la que se encuentra más expuesta debido a que su plegamiento es más dinámico y como consecuencia sería más accesible a la actividad de proteasas. Esta estabilidad se vería reflejada en un incremento en los niveles de transcripción de genes blanco, al permitir que una mayor cantidad de receptor se encontrara disponible para llevar a cabo el proceso de transcripción.

Sin embargo, es poco probable que la sola estabilización de los receptores permita un incremento tan elevado de los niveles de transcripción, como ocurre con AR, cuyos niveles se elevan hasta 13 veces. Por lo tanto, para explicar este fenómeno proponemos la formación de un complejo entre E3KARP y los receptores nucleares, que además de estabilizarlos, genere una señal que permita se transloquen juntos al núcleo, en donde E3KARP podría actuar como coactivador, siguiendo un mecanismo similar al planteado para CASK/LIN-2. La unión del ligando con el receptor nuclear generaría la pérdida de la interacción de E3KARP con la región carboxilo terminal, lo que reforzaría la interacción con la región amino de los receptores y permitiría una mayor exposición de las regiones de internalización al núcleo. Esta hipótesis se plantea de acuerdo a la evidencia obtenida con el ensayo de interacción *in vitro* que muestra que E3KARP se une directamente con la región carboxilo de los receptores nucleares en ausencia de ligando, así como con la región amino. Sin embargo, la asociación con la región carboxilo se pierde en presencia de ligando, tal y como ocurre con las proteínas de choque térmico. Además, es importante tomar en cuenta que E3KARP es una proteína asociada a un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , lo cual la hace que sea más accesible al citoplasma, por lo que el planteamiento de esta segunda hipótesis nos permite elaborar una explicación

que muestra a E3KARP como un coactivador y resuelve en parte el problema que implica la translocación al núcleo y la asociación a la región carboxilo de los receptores nucleares.

Es importante hacer notar que E3KARP y SIP-1 son proteínas que comparten dos dominios PDZ, de los cuales se identificó al segundo dominio como el responsable de la interacción con la región amino de ER $\alpha$ . Esto abre la posibilidad de que exista un grupo de proteínas relacionadas con E3KARP y SIP-1 capaces de interactuar con los receptores nucleares mediante dominios PDZ ubicados en la región amino y central de la proteína y servir como puente para el reclutamiento de otros factores entre los que se encontrarían algunos correguladores de los receptores nucleares. Sin embargo, aún queda por contestar si el resto de receptores nucleares tipo II y III también interactúan con los dominios PDZ o la interacción se da por otras regiones. Por otra parte, el papel que desarrollan los dominios carboxilo tanto de SIP-1 como de E3KARP es probable que sea determinante para poder señalar a estas proteínas como coactivadores, ya que es probable que en estas regiones se encuentren regiones con diferentes funciones, entre ellas señales de translocación o de fosforilación que puedan actuar para que el coactivador penetre al núcleo o bien se presente una cooperatividad con el receptor durante el proceso de translocación.

Para establecer una explicación plausible de cómo actúa E3KARP en los receptores nucleares será necesario realizar los ensayos adecuados, que nos permitan en primer término determinar la localización celular de E3KARP, y si esta localización se ve influenciada por la presencia o ausencia de hormona. Adicionalmente será necesario determinar si la unión de E3KARP con los receptores nucleares completos se pierde al agregar hormona, como sucede con el dominio carboxilo terminal. También será importante determinar si la estabilidad de los receptores se incrementa en presencia de E3KARP. Así mismo, es necesario determinar cuales son las regiones de E3KARP responsables de la interacción con los receptores nucleares, aunque podemos suponer

que se trata de los dominios PDZ, ya que como se ha venido mencionando fue el segundo dominio PDZ de alguna de estas proteínas el que se aisló mediante el ensayo de doble híbrido, en el que se utilizó como carnada el dominio amino del receptor de estrógenos alfa. Finalmente, se deberá establecer si E3KARP es capaz de interactuar directamente con miembros de la familia p160, o con algunos coactivadores generales como CBP y determinar si estas interacciones entre los coactivadores, los receptores nucleares y E3KARP, se llevan a cabo *in vivo* sobre cromatina.

Se conoce que SIP-1 se localiza en el núcleo, por lo que es importante evaluar si SIP-1 es capaz de interactuar e incrementar los niveles de activación de los receptores nucleares, y en caso de que eso suceda comparar los niveles de activación obtenidos con aquellos que presenta E3KARP. En caso de que SIP-1, que se conoce es un coactivador de SRY, sea capaz de interactuar e incrementar los niveles de transcripción en los receptores nucleares, entonces podremos inferir, apoyados además en los experimentos mencionados con anterioridad, que E3KARP es un coactivador de los receptores nucleares y probablemente de SRY.

MAZ se ha reportado como un factor de transcripción que se une a los sitios de unión con cajas GA, específicamente a los ubicados en las secuencias regulatorias de los genes *c-myc* y C2 (Bossone *et al.*, 1992; Izzo *et al.*, 1999). Adicionalmente a estos sitios se ha reportado que MAZ es capaz de unirse a los sitios de unión para el factor de transcripción SP-1, el cual está involucrado en la regulación de diferentes genes, entre ellos el mismo MAZ (Song *et al.*, 1992). Por otra parte, varios promotores regulados por ER $\alpha$  como el de uteroglobina, poseen sitios de unión para el factor SP-1 así como elementos de respuesta a estrógenos, lo cual nos hace pensar que la asociación entre MAZ y al menos el receptor de estrógenos tienen importancia fisiológica (Scholz *et al.*, 1998).

De los resultados obtenidos en las transfecciones con MAZ observamos una pequeña disminución en los niveles de activación mediada por los receptores de andrógenos, estrógenos alfa y progesterona. La disminución es de 15%, 25% y 19% en la expresión mediada por los receptores de andrógenos, estrógenos alfa y progesterona, respectivamente. Sin embargo, se debe señalar que se utilizaron promotores que contienen únicamente los elementos de respuesta a estrógenos y una caja TATA, lo cual condiciona a que el efecto de los posibles correguladores evaluados, como MAZ y E3KARP, se deba únicamente a la unión con los receptores y no a probables interacciones con secuencias específicas como las cajas GA ó GC. Los resultados obtenidos no son contundentes para poder afirmar que se trata de un represor, como lo sugiere la disminución en los niveles de transcripción; este hecho, sin embargo, tampoco nos permite asegurar que no se trata de un correpresor.

Desafortunadamente no se realizó el ensayo de interacción in vitro entre MAZ y los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares, tal y como se hizo con E3KARP. El no contar con los resultados de la interacción in vitro de MAZ nos impide determinar si hay una interacción con alguno de los dominios y sustentar alguna hipótesis que explique el comportamiento de MAZ en las transfecciones.

Continuar con el estudio de MAZ resulta atractivo considerando que se ha reportado que un incremento en los niveles de estradiol, uno de los ligandos naturales de los receptores de estrógenos, se encuentra relacionado con un incremento en los niveles de RNAm de *c-myc* en la etapa temprana de la fase G1 del ciclo celular (Dubik y Shiu, 1992). Este hecho sugiere que el estradiol, posiblemente a través de alguno de los receptores a estrógenos, estimule la transcripción mediante la interacción directa con algunos de los factores de transcripción que sean capaces de unirse al promotor de *c-myc*, como es el caso de MAZ. Es poco probable que el receptor de estrógenos sea capaz de unirse a alguna secuencia del promotor de *c-myc*, ya que se han buscado elementos de respuesta en el promotor y a la fecha no se han localizado (Carpenter *et al.*, 2000).

Esto abre la opción de que al menos el receptor de estrógenos sea capaz de regular la actividad de *c-myc* a través de MAZ, para lo cual sería necesaria la presencia de la secuencia de unión de MAZ, la caja GA. Esta interacción puede ser semejante a la que se presenta con los factores de transcripción Jun/Fos en los sitios AP-1, en donde el receptor de estrógenos no necesita de elementos de respuesta propios para incrementar los niveles de activación, ya que actúa de forma similar a un coactivador.

Para lograr evaluar el efecto real de MAZ será necesario subclonarlo en otro plásmido, como pcDNA 3.1, que nos permita expresarlo *in vitro* y posteriormente hacer las interacciones con los dominios amino y carboxilo de los receptores nucleares. También será necesario evaluar el efecto de MAZ y el receptor de estrógenos sobre un promotor que contenga elementos de respuesta a estrógenos y sitios de unión para MAZ, como es el caso del promotor C2. Otro promotor que posee ambos sitios de unión es el promotor del gen de uteroglobina, en donde se ha demostrado que el factor de transcripción SP-1 y el receptor de estrógenos incrementan los niveles de transcripción, principalmente cuando actúan sobre cromatina (Scholz *et al.*, 1997). Este ensayo nos permitiría conocer si estos dos factores actúan sinérgicamente para incrementar o disminuir los niveles de transcripción. En caso de que se establezca que existe cooperatividad en el proceso de transcripción entre MAZ y el receptor de estrógenos, será importante estudiar el comportamiento de estos factores *in vivo*, lo que permitirá evaluar el efecto que se tiene sobre promotores ubicados en cromatina. Es necesario realizar este tipo de experimentos ya que la actividad transcripcional se ve afectada de manera importante cuando los promotores se estudian asociados a la cromatina, y en donde el sinergismo entre dos factores de transcripción se observa más claramente.

Finalmente, y para cerrar esta discusión me gustaría señalar algunos de los aspectos que hacen que la realización y continuación de este trabajo sea de gran interés. En primer lugar y partiendo de los resultados obtenidos con E3KARP, es importante iniciar la caracterización de SIP-1, ya que es probable que se encuentre involucrado en

la regulación de la actividad que el receptor de andrógenos tiene, por ejemplo, en el proceso de diferenciación sexual y en donde SIP-1 se encarga de dirigir en forma específica la actividad sobre ciertos genes. Para E3KARP será importante determinar el mecanismo que sigue para incrementar los niveles de activación y ubicarlo en el contexto celular. MAZ nos abre la posibilidad de que se tenga evidencia de la interacción de una proteína responsable de la regulación de un proto-oncogen, con un receptor nuclear y la posibilidad de vincularlo con la aparición y desarrollo de cáncer.

## 11. CONCLUSIONES

A partir del trabajo de caracterización de E3KARP y MAZ como correguladores de receptores de hormonas esteroides y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. E3KARP incrementa los niveles de transcripción en promotores sintéticos dirigidos por el receptor de estrógenos alfa, el receptor de andrógenos y el receptor de progesterona.
2. E3KARP interacciona directamente con los dominios amino terminal del receptor de estrógenos alfa, así como con los receptores de andrógenos y progesterona.
3. E3KARP es capaz, además, de interactuar con las regiones carboxilo de los receptores de estrógenos alfa, andrógenos y progesterona en ausencia del ligando.
4. La interacción de E3KARP con los receptores antes mencionados se pierde cuando se adiciona el ligando correspondiente.
5. Se hace necesaria la realización de experimentos para confirmar la localización celular de E3KARP, la interacción con otros coactivadores y los ensayos necesarios que nos permitan trazar el mecanismo que explique los incrementos de la transcripción inducidos por E3KARP.
6. MAZ disminuye el nivel de transcripción en los promotores dirigidos por los receptores de estrógenos alfa, de progesterona y andrógenos, sin embargo la disminución es pequeña y no nos permite asegurar que se trata de un represor.

Sin embargo, se muestra como muy probable su interacción con los receptores nucleares, lo cual deberá ser confirmado por las interacciones in vitro.

7. Para concluir acerca del papel de MAZ como corregulador de los receptores nucleares es indispensable evaluar el efecto de MAZ en promotores más complejos que contengan sitios de unión para MAZ y los receptores nucleares.

## 12. REFERENCIAS

- Ait-Si-Ali S, Ramirez S, Barre FX, Dkhissi F, Magnaghi-Jaulin L, Girault JA, Robin P, Knibiehler M, Pritchard LL, Ducommun B, Trouche D y Harel-Bellan A. (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* 396:184-186.
- Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W y Peeters B. (1999). The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol. Cell Biol.* 19:6085-6097.
- Almlöf T, Gustafsson JA y Wright AP. (1997). Role of hydrophobic amino acid clusters in the transactivation activity of the human glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 17:934-945.
- Almlöf T, Wright AP y Gustafsson JA. (1995). Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 270:17535-17540.
- Anzick SL, Kononen J, Walker R, Azorsa DO, Tanner MM y Guan XY, Sauter G, Kallioniemi, O.P, Trent JM y Meltzer PS. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-968.
- Aranda A, y Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews* 81(3): 1269-1304.
- Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS y Kelly K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89:1175-1184.
- Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai S, Tsai MJ y O'Malley BW. (1993). Interaction of the human Thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8832-8836.
- Bannister AJ y Kouzarides T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643.
- Beato M, y Klug J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update* 2000 6(3):225-236.

Berkenstam A, Ruiz MM, Baretino D, Horikoshi M y Stunnenberg HG. (1992). Cooperativity in transactivation between retinoic acid receptor and TFIID requires an activity analogous to E1A. *Cell* 69: 401-412.

Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery, DM y Parker MG. (1999). The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol. Cell Biol.* 19:8383-8392.

Blanco JC, Wang IM, Tsai SY, Tsai MJ, O'malley BW, Jurutka PW, Haussler MR y Ozato K. (1995). Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1535-1539.

Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, Altmann M, Ronfani L, Bianchi ME, Taraseviciene L, Nordeen SK, Allegretto EA y Edwards DP. (1998). High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding *in vitro* and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 18:4471-4487.

Bossone SA, Asselin C, Patel AJ y Marcu KB. (1992). MAZ, a zinc finger protein, binds to c-MYC and C2 gene sequences regulating transcriptional initiation and termination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:7452-6. *Cell* 90:569-580.

Chakravarti D, Lamorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M y Evans RM. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383: 99-103.

Charpentier AH, Bednarek AK, Daniel RL, Hawkins KA, Laflin KJ, Gaddis S, MacLeod MC y Aldaz CM. (2000). Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res.* 60:5977-83.

Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW y Stallcup MR. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284:2174-2177.

Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y y Evans RM. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300.

Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D y Evans RM. (999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase in process citation. *Cell* 98:675-686.

- Chen JD y Evans RM. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors see comments. *Nature* 377:454-457.
- Cowlen SM y Parker MG. (1999). A comparison of transcriptional activation by ER $\alpha$  y ER $\beta$ . *J. Steroid Biochem. Molec.* 69:165-175.
- DeFranco D, Ramakrishnan C, y Tang Yuting. Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65(1-6): 51-58.
- Di Croce L, Koop R, Venditti P, Westphal HM, Nightingale KP, Corona DF, Becker PB y Beato M. (1999). Two-step synergism between the progesterone receptor and the DNA-binding domain of nuclear factor 1 on MMTV minichromosomes. *Mol Cell* 4(1):45-54
- Dubik D y Shiu RP. (1992). Mechanism of estrogen activation of *c-myc* oncogene expression. *Oncogene* 7:1587-1594.
- Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, Decaprio JA, Lawrence JB y Livingston DM. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8:869-884.
- Edwards P Dean; (1999). Coregulatory proteins in nuclear hormone receptor action. *Vitamins and Hormones* 55: 165-217.
- Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Yashi YK, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzguer D, Hashimoto S y Kato S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator for the activation function 1 of human receptor  $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biology* 19(8):5363-5372.
- Fondell JD, Ge H y Roeder RG. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8329-8333.
- Fondell JD, Guermah M, Malik S y Roeder RG. (1999). Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1959-1964.
- Font de Mora J y Brown M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20:5041-5047.
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG y Evans RM. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46:645-652.

- Godowski PJ, Picard D y Yamamoto KR. (1988). Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* 241:812-816.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Applanat M y Milgrom E. (1989). Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57(7):1147-54.
- Hager GL, Lim CS, Elbi C y Baumann CT. (2000). Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J. Steroid Biochem. Molec.* 74:249-254.
- Hollenberg SM y Evans RM. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 55(5):899-906.
- Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL y Stallcup MR. (1996). GRIP1 a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4948-4952.
- Hong SH y Privalsky. (2000). The SMART correpressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of correpressor function is associated with SMART phosphorylation and nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 20:6612-6625.
- Hope IA, Mahadevan S y Struhl K. (1988). Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature* 333:635-40.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK y Rosenfeld MG. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor see comments. *Nature* 377:397-404.
- Hsueh YP, Wang TF, Yang FC y Sheng M. (2000). Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404:298-302.
- Ikeda M, Kawaguchi A, Takeshita A, Chin WW, Endo T, Onaya T. (1999). CBP-dependent and independent enhancing activity of steroid receptor coactivator-1 in thyroid hormone receptor-mediated transactivation. *Mol. Cell Endocrinol.* 147:103-112.
- Izzo MW, Strachan GD, Stubbs MC y Hall DJ. (1999). Transcriptional repression from the c-myc P2 promoter by the zinc finger protein ZF87/MAZ. *J Biol Chem.* 274(27):19498-19506.

- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L y Horwitz KB. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is control by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMART. *Mol. endocrinol.* 11(6):693-705.
- Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P y Tora L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79:707-717.
- Juge-Aubry Ce, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin Ww, Burger Ag y Meier Ca. (1999). Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol. Chem.* 274: 10505-10510.
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK y Rosenfeld MG. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403-414.
- Krishnan V, Heath H y Bryant UH. Mechanism of action of estrogen and selective estrogen receptors modulators. (2001). *Vitamin and Hormones* 60:123-147.
- Kumar R y Thompson D. (2003). Transactivation of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: Protein folding and coactivators interactions. *Mol. Endocrinol.* 17: 1-10
- Kushner P, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM y Webb P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 74:311-317.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR y Goodman RH. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370:223-226.
- Langley E, Zhou Z y Wilson EM. (1995). Evidence for anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *J. Biol. Chem.* 270(50):29983-29990.
- Lanz RB, Mckenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ y O'Malley BW. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97:17-27.
- Li H, Gomes PJ y Chen JD. (1997). RAC3 a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8479-8484.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193, 265-275.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, y Sigler PB. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497-505.
- Masuyama H, Jefcoat SC Jr y Macdonald PN. (1997). The N-terminal domain of transcription factor IIB is required for direct interaction with the vitamin D receptor and participates in vitamin D-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 11: 218-228.
- McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK y Rosenfeld MG. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* 12:3357-3368.
- McKenna NJ, Lanz RB, y O'Malley BW. (1999). Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology, *Endocrine Reviews* 20(3): 321-344.
- Mengus G, May M, Carré L, Chambon P, y Davidson I. (1997). Human Tafi<sub>II</sub>135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3 and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev.* 11:1381-1395.
- Muchardt C y Yaniv M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila brm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 12:4279-4290.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL y Evans RM. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89:373-380.
- Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ y O'Malley BW (1999). The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:1182-1189.
- Oñate Sa, Tsai SY, Tsai MJ y O'malley BW. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357.
- Peach K, Webb P, Kuipier GG, Nilsson S, Gustafsson, Kushner Pj y Scanlan TS. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP-1 sites. *Science* 277,1508-1510.

- Picard D y Yamamoto KR. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *J. EMBO* 6(11):3333-3340.
- Pike ACW, Brzozowski AM y Hubbard RE. (2000). A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 74: 261-268.
- Poulat F, Santa Barbara P, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B y Berta P. (1997). The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem.* 272(11): 7167-7172.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M y Spiegelman BM. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.
- Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P y Freedman LP. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398: 824-828.
- Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjumentbromage H, Tempst P y Freedman LP. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev* 12:1787-1800.
- Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly Jm y Chambon P. (1997) Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90: 97-107.
- Rochette-Egly C, Gaub Mp, Lutz Y, Ali S, Scheuer I y Chambon P. (1992) Retinoic acid receptor-beta: immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues. *Mol endocrinol* 6: 2197-2209.
- Rowan BG, Weigel NL y O'Malley BW. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 275(6):4475-4483.
- Sadovsky Y, Webb P, Lopez G, Baxter JJ, Fitzpatrick PM, Gizanggsberg E, Cavailles V, Parker MG y Kushner PJ. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol* 15: 1554-1563.
- Scholz A, Truss M, Beato M. (1998). Hormone-induce recruitment of Sp-1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. *J.Biol. Chem.* 273(8):4360-4366.

Schulman IG, Chakravarti D, Juguilon H, Romo A y Evans RM. (1995). Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8288-8292.

Seol W, Mahon MJ, Lee YK y Moore DD. (1996). Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. *Mol Endocrinol* 10:1646-1655.

Shao D y Lazar MA. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 103: 1617-1618.

Shikama N, Lyon J y La Thangue NB. (1998). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol* 7:230-236.

Smith CL, Nawaz Z y O'Malley BW. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11:657-666.

Smith Cl, Onate Sa, Tsai MJ y O'malley BW. (1996). CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8884-8888.

Song J, Ugai H, Kanazawa I, Sun K y Yokoyama KK. (2001). Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements. *J Biol Chem*. 276(23):19897-19904.

Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen CS y Chin WW. (1997). Tram-1, a novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J. Biol Chem* 272: 27629-27634.

Takeshita A, Yen PM, Misiti S, Cardona GR y Liu WW. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 3594-3597.

Torchia J, Glass C y Rosenfeld MG. (1998). Co-activators and corepressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* 10: 373-383.

Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK y Rosenfeld MG. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 677-684.

Tsai M, y O'Malley BW. (1994). Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63:451-486.

- Voegel JJ, Heine MJS, Zechel C, Chambon P y Gronemeyer H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15:3667-3675.
- Wagner BL, Norris JD, Knotts TA, Weigel NL y McDonnell DP. (1998). The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol* 18:1369-1378.
- Weatheran VR, Fletterick Jr y Scanlan ST. (1999). Nuclear Receptors ligand-binding domains. *Annu. Rev. Biochem.* 68:559-581.
- Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang SM, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR y Kushner PJ. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol. Endocrinol.* 12:605-1618.
- Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I y Yamamoto KR. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258:1598-1604.
- Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY y Roeder RG. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7939-7944.
- Yuan X, Lu M, Li T y Balk S. (2001). SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem.* 276(49):46647-46654.
- Yun C, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tse C, Weinman y Donowitz M. (1997). cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NH3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:3010-3015.
- Zawel L y Reinberg D.(1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 64:533-561.
- Zhang J, Guenther MG, Carthew RW y Lazar MA. (1998). Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 1998 12:1775-80.