

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Caracterización Funcional de DRAL como
Coregulador del Receptor de Estrógenos α ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

CYNTHIA MONTIEL HERNÁNDEZ

ASESOR: ALFONSO LEÓN DEL RÍO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres,

*Ma. Victoria Hernández García
José Luis Montiel Sosa*

DEDICATORIAS

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta esta etapa de mi vida y cuidarme siempre en cada camino y lugar en donde me encuentro, por los momentos difíciles en que has estado conmigo y por todo el amor que me das.

A mis padres

Ma. Victoria Hernández García.

José Luis Montiel Sosa.

Por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por su ejemplo que me ha permitido ser una persona con valores, sus consejos y su motivación para que siempre siga adelante. Les agradezco por su paciencia, por todo el amor y la comprensión que me han dado para poder culminar mi carrera. Por que son pocas las palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí y por que quiero que sepan que siempre los llevo en mente, por eso esto es para ustedes por que sin ustedes no lo hubiera logrado. Gracias!! Los quiero.

A mis hermanos

Jessica A. Montiel Hernández

Victor Luis Montiel Hernández

Por su confianza y amistad en todo momento, por que no se necesita ser el mayor para ser un buen ejemplo ya que también de ustedes he aprendido muchas cosas que día a día me han enseñado, por que siempre han estado cuando los he necesitado. Por su gran tolerancia y paciencia y por todos los momentos y alegrías que han dejado en mi. ¡Los quiero mucho!

A Carlos Palma Flores

Por ser un buen compañero durante esta etapa de mi vida, por compartir tus experiencias y consejos y por motivarme siempre a sobresalir en las cosas que hago. Por la amistad que me has ofrecido y por el tiempo que has compartido conmigo. Gracias!!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Dr. Alfonso León Del Río** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y ofrecerme la oportunidad de involucrarme en el área de la investigación así como por su asesoramiento en el desarrollo de esta tesis.

Al **Biol. Exp. Rafael Cervantes Roldán** por su asesoría, sus enseñanzas y consejos para la elaboración de mi proyecto.

A Mis sinodales: **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, QFB. Rosalía Bonilla Sánchez. QFB. Gabriela Escalante Reynoso y QFB. Maritere Domínguez Rojas** por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM: Anylú, Iván, Sandra, Tonatiuh y Vanessa, por su colaboración y ayuda así como por su amistad que me han ofrecido durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la FES Cuautitlán,: Maricela, Adrián, Esmeralda, Alondra y Martín, por brindarme siempre su invaluable amistad incondicional y su apoyo en todo momento.

A mis profesores de la FES Cuautitlán por transmitir su conocimiento y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitirme formar parte de esta gran casa de estudios.

INDICE

| | Página |
|---|---------------|
| Abreviaturas ----- | III |
| Relación de Figuras ----- | V |
| Capítulo I | |
| 1. Introducción ----- | 1 |
| 1.1 Regulación Transcripcional | 1 |
| 1.1.1 Factores de Transcripción | 3 |
| 1.2.Receptores Hormonales Nucleares | 5 |
| 1.2.1 Familias de Receptores Hormonales Nucleares | 6 |
| 1.2.2 Estructura de los Receptores Hormonales Nucleares | 7 |
| 1.3.Receptor Nuclear de Estrógeno | 11 |
| 1.3.1 Mecanismo de Acción del Receptor Nuclear de Estrógeno | 13 |
| 1.4.Cáncer de Mama | 16 |
| 1.4.1 Papel del ER en el Desarrollo de Cáncer de Mama | 17 |
| 1.4.2 Tamoxifén y el papel de AF-1 en la resistencia al tratamiento | 17 |
| 1.5.Clonación de Factores que Interactúan Directamente con la Región AF-1 Del ER Humano | 19 |
| 1.6. DRAL | 20 |
| Capítulo II | |
| 2.1 Hipótesis ----- | 22 |
| 2.2 Objetivos ----- | 23 |
| Capítulo III | |
| 3. Material y Métodos ----- | 24 |
| 3.1. Estrategia Experimental | 24 |
| 3.2 Material | 25 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1 Material Biológico | 25 |
| 3.2.2 Material Químico | 25 |
| 3.3 Metodología | 25 |
| 3.3.1 Cultivo celular | 25 |
| 3.3.2 Expresión de proteínas en células HepG2 | 26 |
| 3.3.3 Ensayo de Luciferasa y de - Gal | 28 |
| 3.3.4 Análisis estadístico | 29 |
| Capítulo IV | |
| 4. Resultados -----30 | |
| 4.1 Curva de concentraciones de ER | 30 |
| 4.2 Efecto de SRC1 sobre la actividad de ER | 31 |
| 4.3 Evaluación de DRAL sobre la transactivación mediada por el ER | 32 |
| 4.4 Cotransfección de DRAL y SRC1. | 33 |
| 4.5 Curva de concentraciones de E3K | 34 |
| 4.6 Efecto de DRAL y E3K sobre la actividad del ER | 35 |
| Capítulo V | |
| 5. Discusión ----- 36 | |
| Capítulo VI | |
| 6. Perspectiva ----- 41 | |
| Capítulo VII | |
| 7. Conclusiones ----- 42 | |
| Capítulo VIII | |
| 8. Bibliografía ----- 43 | |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| ➤ -MEM | Alpha Minimum Essential Medium |
| ➤ ACTR | Proteína Relacionada a Actina |
| ➤ AF-1 | Función de Activación 1 |
| ➤ AF-2 | Función de Activación 2 |
| ➤ AIB1 | Proteína Amplificada en Cáncer de Mama 1 |
| ➤ AR | Receptor de Andrógenos |
| ➤ ARC | Proteína Asociada a la actividad Reguladora del Citoesqueleto |
| ➤ ATP | Adenosin Trifosfato |
| ➤ CBP | Proteína de unión a CREB |
| ➤ DNA | Acido Desoxirribonucleico |
| ➤ DBD | Dominio de unión a DNA |
| ➤ DRAL | Downregulated in Rhabdomyosarcoma LIM Protein |
| ➤ DRIP | Proteínas que Interactúan con el Receptor de vitamina D |
| ➤ E ₂ | Estrógeno |
| ➤ E3K | Proteína Reguladora de la Cinasa A NHE3 |
| ➤ EGF | Factor de Crecimiento Epidermal |
| ➤ ER | Receptor de Estrógenos |
| ➤ ERAP | Proteínas Asociadas al Receptor de Estrógenos |
| ➤ ERE | Elemento de Respuesta a Estrógeno |
| ➤ ER | Receptor de Estrógenos |
| ➤ ER | Receptor de Estrógenos |
| ➤ FBS | Suero Fetal Bovino |
| ➤ FHL | Four and a Half LIM |
| ➤ GR | Receptor de Glucocorticoides |
| ➤ GRIP1 | Proteína de interacción con el Receptor de Glucocorticoides 1 |
| ➤ GTF's | Factores Generales de Transcripción |
| ➤ HAT's | Acetilinasas de Histonas |
| ➤ HLH | Helix-Loop-Helix |
| ➤ HRE's | Elementos de Respuesta a Hormona |
| ➤ hsp70 | Proteína de choque térmico de 70 kDa |
| ➤ hsp90 | Proteína de choque térmico de 90kDa |
| ➤ HTH | Helix-Turn-Helix |
| ➤ IGF | Factor de Crecimiento de Insulina |
| ➤ LBD | Dominio de unión al ligando |
| ➤ MAPK | Proteína Cinasa Activada por Mitogeno |

| | |
|--------------|---|
| ➤ MR | Receptor de Mineralocorticoides |
| ➤ p160 | Proteína 160 kDa |
| ➤ p300 | Proteína 300 kDa |
| ➤ PBS | Buffer Salino de Fosfatos |
| ➤ pCIP | Proteína de Interacción con CBP |
| ➤ PR | Receptor de Progesterona |
| ➤ RAC3 | Coactivador Asociado al Receptor 3 |
| ➤ RAR | Receptor del Acido Retinoico trans |
| ➤ RHN | Receptores Hormonales Nucleares |
| ➤ RIP140 | Proteína que interactúa con el Receptor 240 |
| ➤ RNA pol II | RNA Polimerasa II |
| ➤ RNAm | Acido Ribonucleico mensajero |
| ➤ RXR | Receptor del Acido Retinoico cis |
| ➤ SRA | Activador del RNA del Receptor Esteroideo 1 |
| ➤ SRC1 | Coactivador del Receptor Esteroideo 1 |
| ➤ TFIIA | Factor de iniciación de Transcripción IIA |
| ➤ TFIIB | Factor de iniciación de Transcripción IIB |
| ➤ TFIID | Factor de iniciación de Transcripción IID |
| ➤ TFIIE | Factor de iniciación de Transcripción IIE |
| ➤ TFIIF | Factor de iniciación de Transcripción IIF |
| ➤ TFIIH | Factor de iniciación de Transcripción IIH |
| ➤ TGF | Factor de Crecimiento Tumoral |
| ➤ TIF1 | Factor Intermediario de Transcripción 1 |
| ➤ TOT | Tamoxifén |
| ➤ TR | Receptor de Tiroides |
| ➤ TRAP | Proteínas Asociadas al Receptor de Hormonas Tiroideas |
| ➤ VDR | Receptor de Vitamina D |

RELACIÓN DE FIGURAS

| FIGURA | Pag |
|--|------------|
| Fig. 1 Maquinaria Transcripcional Eucariótica | 2 |
| Fig. 2 Modelo de la Acetilación de Histonas | 4 |
| Fig. 3 Dimerización de los Receptores Hormonales Nucleares | 7 |
| Fig. 4 Estructura Común de los Dominios de los Receptores Hormonales Nucleares | 8 |
| Fig. 5 Dominio de Unión a DNA (DBD) | 9 |
| Fig. 6 Dominio de Unión a Ligando | 11 |
| Fig. 7 Estructura Química del Estradiol | 12 |
| Fig. 8 Curva de concertaciones de ER | 30 |
| Fig. 9 Efecto de SRC1 sobre la actividad de ER | 31 |
| Fig. 10 Evaluación de DRAL sobre la transactivación mediada por ER | 32 |
| Fig. 11 Cotransfección de DRAL y SRC1 | 33 |
| Fig. 12 Curva de concentraciones de E3K | 34 |
| Fig. 13 Efecto de DRAL y E3K sobre la actividad del ER | 35 |

Capítulo I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación Transcripcional

El DNA de cada una de nuestras células tiene una longitud total de aproximadamente 2 metros en los que se encuentran dispersos de 45,000 a 100,000 genes; todos ellos contenidos en el núcleo celular, el cuál tiene un tamaño promedio de 2 μm . En cualquier momento, y dependiendo del tejido en que se encuentra, una célula promedio expresa de 10,000 a 20,000 diferentes proteínas, lo que significa, que un número semejante de genes debe ser específicamente localizado en el genoma y su secuencia de DNA convertida a RNAm, proceso conocido como transcripción, para que después, esta molécula salga del núcleo y sea traducida a proteína en el citoplasma celular.

El mantenimiento de la homeóstasis del organismo, así como la ejecución de procesos biológicos tales como el desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis, requieren de un estricto y cuidadoso control en la expresión de genes; de tal modo, que la habilidad de cada célula para programar su genoma y establecer cuales genes serán expresados o no en un determinado tiempo y bajo un estímulo específico, es crucial para el funcionamiento correcto del organismo [Emmerson, 2002]. La expresión del material genético se encuentra regulada en varios puntos que van desde el inicio de la transcripción, el procesamiento del RNAm, su estabilidad o vida media, su transporte hacia el citoplasma y finalmente su traducción en los ribosomas. Sin embargo, los eventos de regulación principales, ocurren a nivel de la transcripción genética [Maston *et al.*, 2006].

El inicio de la transcripción, está dado por el ensamblaje de un complejo multiprotéico conformado por la RNA polimerasa II (RNA pol II) y otros factores adicionales definidos bioquímicamente como Factores Generales de Transcripción (GTF's).

El grupo de GTF's, dentro de los cuales se incluye a TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, es requerido para dirigir la unión específica de la RNA pol II a una secuencia corta de DNA, conocida como promotor, dentro de la cual, se encuentra el sitio de inicio de la transcripción [Naar *et al.*, 2001].

Este paso, es en principio, suficiente para dar inicio a la transcripción únicamente a niveles muy bajos en un proceso conocido como transcripción basal. Sin embargo, la regulación de la actividad transcripcional selectiva de cada gen a un nivel más alto, requiere de otros factores adicionales conocidos como factores de transcripción, así como de proteínas coactivadoras [Maston *et al.*, 2006], (Fig. 1).

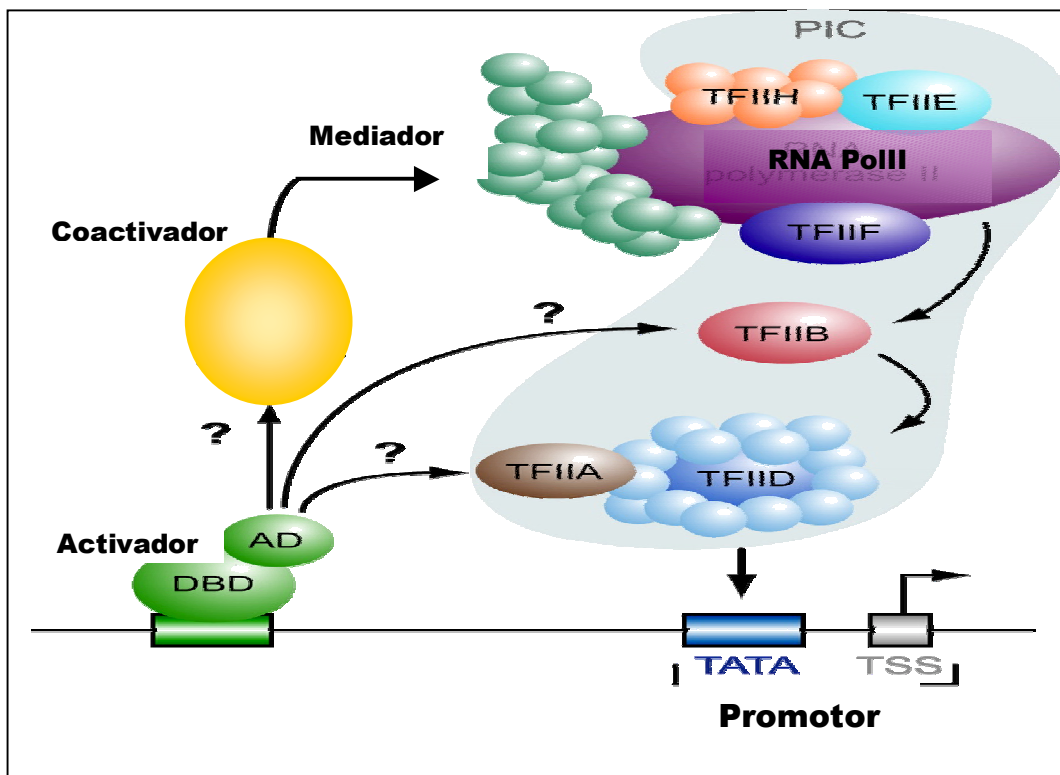


Figura 1. Maquinaria Transcripcional Eucariótica. Los factores involucrados en la transcripción por la RNA pol II incluyen a tres grupos: los GTF's, los activadores y los coactivadores. Adaptado de Maston *et al.*, 2006.

1.1.1 Factores de Transcripción

Los factores de transcripción, son proteínas capaces de interactuar de una manera específica con secuencias reguladoras de DNA, localizadas en la región promotora de sus genes blanco ó con otras proteínas para llevar a cabo la regulación de la tasa transcripcional de estos genes ya sea positiva ó negativamente (activadores y represores respectivamente) [Villard, 2004].

En el control transcripcional de la célula eucariota, se encuentran involucrados varios niveles de regulación; las concentraciones y actividades de los activadores y represores que controlan la transcripción de muchos genes, son reguladas durante la diferenciación y en respuesta a hormonas y señales a partir de células vecinas. Estos activadores y represores en conjunto, regulan cambios en la estructura de la cromatina y la acetilación y desacetilación de histonas influyendo en la habilidad de los GTF's para unirse al promotor. La mayoría de estos factores de transcripción son activadores, los cuales permiten un incremento en los niveles transcripcionales de genes blanco actuando mediante diferentes mecanismos; por un lado incrementando la formación del complejo de iniciación de la transcripción a través de un mecanismo que involucra una interacción directa con uno o más componentes de la maquinaria basal ó con otros activadores transcripcionales y de un modo indirecto, mediante la unión a coactivadores que por sí mismos son capaces de contactar al aparato de transcripción basal. La formación y disociación de estos complejos son una parte fundamental en la regulación de muchos procesos celulares [Villard, 2004].

La activación transcripcional requiere de la remodelación de la estructura de la cromatina la cuál, es a menudo la barrera principal que impide la transcripción genética, debido a que obstaculiza la interacción de la maquinaria de transcripción basal con el promotor. Para resolver este problema algunos activadores transcripcionales son capaces de reclutar complejos proteicos cuya actividad enzimática modifica químicamente la cromatina disminuyendo o aumentando la afinidad de los nucleosomas por el DNA. Los complejos remodeladores

dependientes de ATP, utilizan energía para producir modificaciones en la cromatina de una manera no covalente.

Por otro lado, los complejos modificadores de histonas, que adicionan o remueven grupos covalentes como son grupos acetilo conocidos como acetilasas de histonas (HAT's), relajan la cromatina lo cual, permite el acceso de la maquinaria transcripcional [Lee y Young, 2000], (Fig. 2).

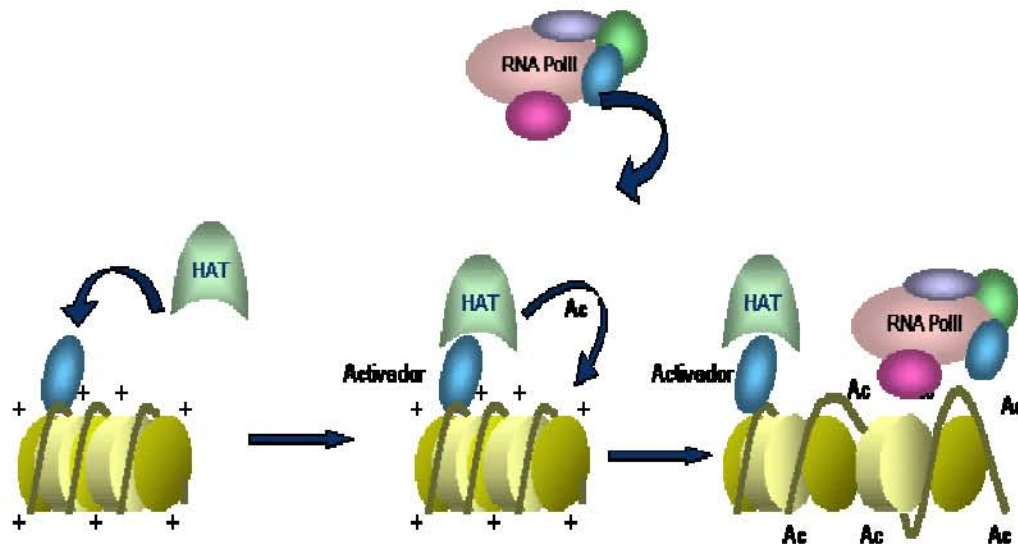


Figura 2. Modelo de la acetilación de histonas. Algunos activadores reclutan compuestos que acetilan las histonas permitiendo la entrada de la maquinaria basal transcripcional.

Un activador, usualmente es capaz de activar múltiples genes dentro del genoma generando un mecanismo para coordinar el control de dichos genes. Así mismo, genes individuales pueden ser regulados a través de la acción de múltiples activadores los cuales, proveen un mecanismo para un control a base de diferentes combinaciones; sin embargo la acción de los activadores que permite establecer el perfil de expresión, está determinado principalmente por su estructura y configuración.

La mayoría de los factores de transcripción, presentan varios dominios funcionales que les permiten llevar a cabo su actividad. Entre los dominios presentes en los factores se encuentra: (a) El dominio de unión a DNA (DBD); definido por los aminoácidos que están comprendidos en esta región y que la agrupación de éstos se

basa en la relación a los dominios que definen la estructura de la proteína capaz de unirse al DNA. Los dominios descritos son los dominios HLH, el dominio de cierre de leucina, el dominio de dedo de zinc y los dominios HTH.

(b) Los dominios de activación, generalmente están presentes en los factores de transcripción, los cuales son caracterizados por ser dominios ricos en glutamina, prolina o ricos en aminoácidos de carácter ácido; estos dominios pueden actuar reclutando o acelerando el ensamblaje de los GTF's sobre el promotor. (c) El dominio de unión a ligando (LBD), es un dominio presente en algunos de los factores de transcripción tales como los pertenecientes a la familia de receptores hormonales nucleares que se unen a ligando, los cuales, son esenciales para regular su actividad [Wray *et al.*, 2003].

Las actividades de muchos factores de transcripción, se encuentran reguladas por hormonas las cuales, son secretadas por distintos tipos celulares y son transportadas para afectar la función de las células en diferentes partes del organismo. Una clase de hormonas está compuesta por pequeñas moléculas liposolubles, característica que les permite el libre paso a través de la capa lipídica de la membrana celular. Este tipo de moléculas funcionan como ligando capaces de regular a la principal clase de factores transcripcionales llamados Receptores Hormonales Nucleares.

1.2 Receptores Hormonales Nucleares

Los Receptores Hormonales Nucleares (RHN), forman una gran familia de factores de transcripción activados por ligando. Estos factores, a diferencia de los factores de transcripción basal, inician la transcripción de sus genes blanco únicamente en presencia de su ligando, que en el caso de los RHN, son hormonas. Los RHN, se encuentran involucrados en el control de diferentes procesos biológicos que incluyen desarrollo, crecimiento, reproducción, diferenciación celular, proliferación y apoptosis [Nagy y Schwabe, 2004]. Los ligandos descritos hasta ahora para los receptores hormonales nucleares incluyen a las hormonas esteroideas y tiroideas; vitaminas, eicosanoides, oxiesteroles y ácidos biliares.

1.2.1 Familias de Receptores Hormonales Nucleares

Mediante diversos estudios, los RHN se han dividido en tres subfamilias dentro de las cuales se encuentran: los receptores de Tipo I, también conocidos como los clásicos receptores esteroideos que incluyen, al Receptor de Progesterona (PR), el Receptor de Estrógeno (ER), el Receptor de Andrógeno (AR), Receptor de Glucocorticoides (GR) y por último al Receptor de Mineralocorticoides (MR), los cuales son translocados al núcleo, en respuesta a la unión de su ligando [Mckenna *et al.*, 1999]. En ausencia de ligando, se encuentran asociados a proteínas de choque térmico, estado en el cual, se ha pensado que no son capaces de influir sobre la tasa transcripcional. Los receptores de este grupo, se unen a secuencias específicas de los promotores de sus genes blanco en un arreglo homodimérico únicamente en presencia de su ligando [Mckenna *et al.*, 2002], (Fig. 3).

Los receptores de Tipo II comprenden al Receptor de Tiroides (TR), el Receptor de Ácido Retinoico trans (RAR), el receptor de Ácido Retinoico cis (RXR) y el Receptor de Vitamina D₃ (VDR), los cuales son capaces de unirse al DNA en ausencia de su ligando [Mckenna *et al.*, 1999]. Estos receptores generalmente se unen como heterodímeros con el RXR y tales interacciones pueden servir para modular el grado transcripcional en respuesta a ligando [Mangelsdorf *et al.*, 1995], (Fig. 3).

Existe una tercer clase de RHN para los cuales su ligando no ha sido identificado por lo que se conocen como los Receptores Nucleares Huérfanos [Mckenna *et al.*, 2002].

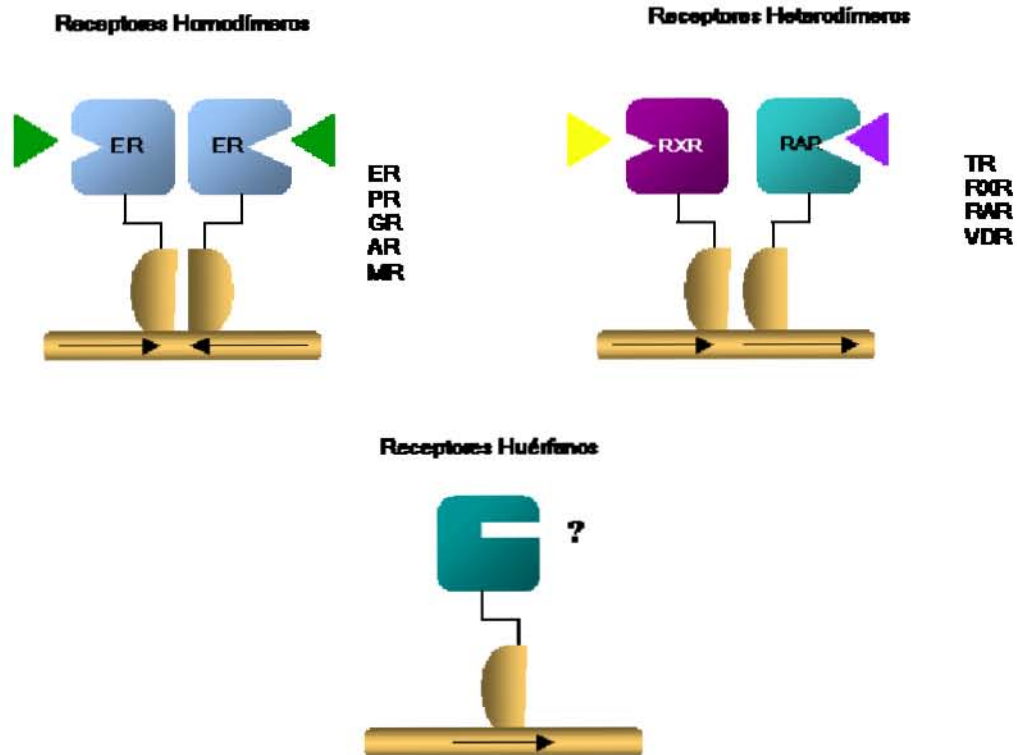


Figura 3. Dimerización de los Receptores Hormonales Nucleares. Los receptores nucleares se agrupan en tres clases de acuerdo al tipo de ligando al que se unen, de esto dependen sus propiedades de unión al DNA y su dimerización. Adaptado de Mangelsdorf *et al.*, 1995.

1.2.2 Estructura de los Receptores Hormonales Nucleares

Los RHN, como la mayoría de los factores de transcripción, están compuestos de diversos dominios con actividades funcionales independientes. La estructura de los receptores nucleares se caracteriza por presentar seis dominios: A, B, C, D, E y F, (Fig. 4). El dominio A/B, también llamado AF-1 (Activating Function 1), localizado en la región amino Terminal, es la región menos conservada desde el punto de vista de su secuencia de aminoácidos entre todos los receptores nucleares y es indispensable para la función de la activación transcripcional. La región E ó LBD

(Ligand Binding Domain) es la responsable de la unión de ligando y contiene un segundo dominio de activación transcripcional llamado AF-2 (Activating Function 2). La actividad de AF-2, a diferencia de AF-1 es dependiente de ligando y es altamente conservada entre la familia de los RHN.

La región C conocida como DBD, (DNA Binding Domain) contiene el dominio de unión a DNA que posee una estructura característica de dedos de zinc formada por la coordinación de X C e H, coordinados por un átomo de Zinc. Como su nombre lo indica, esta estructura es utilizada por el receptor para reconocer una secuencia específica en el DNA del promotor de los genes blanco. La parte comprendida por la región D, es una región de bisagra que conecta al DBD con el LBD permitiendo la rotación del DBD y al igual que la región A/B, muestra una gran variabilidad entre los receptores. Algunos receptores presentan la región F, cuya función hasta ahora permanece desconocida.

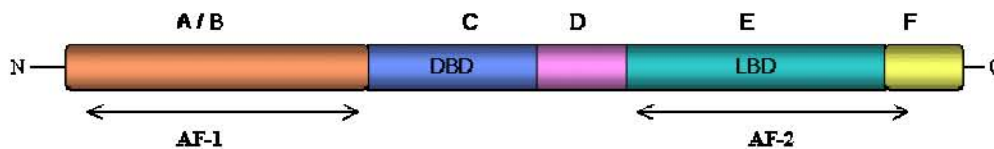


Figura 4. Estructura común de los dominios de los Receptores Hormonales Nucleares. Un receptor nuclear común, contiene una región variable en el amino terminal (A/B), un DBD conservado (C), una región de bisagra (D), un LBD conservado (E), y una región carboxilo terminal variable (F).

Dominio AF-1

La región A/B es la región moduladora más variable tanto en secuencia como en longitud. Esta región contiene un dominio AF-1, el cual muestra una actividad específica de célula y promotor lo que sugiere que contribuye a la especificidad de acción para los receptores; por otro lado, este dominio es el blanco para la fosforilación mediada por diferentes vías de señalización, por lo que su modificación puede afectar significativamente la actividad transcripcional [Shao y Lazar, 1999]. El dominio AF-1 puede consistir de regiones capaces de tener una conformación α -hélice, la cual es importante para activar la transcripción [Warnmark *et al.*, 2003]. Diversas proteínas involucradas también en la regulación de la transcripción, han

sido capaces de unirse al dominio AF-1 de los receptores hormonales nucleares, induciendo un cambio en la estructura de este dominio, lo que sugiere que la formación de un complejo AF-1-coactivador, podría ser un paso importante en la activación mediada por AF-1. Sin embargo, el mecanismo por el cual AF-1 contribuye de manera sinérgica en la activación transcripcional mediada por receptores hormonales nucleares permanece desconocida.

Dominio de unión a DNA (DBD)

El DBD es el dominio más conservado de los receptores hormonales nucleares; esta formado por ocho cisteínas las cuales coordinan dos iones de Zn^{+} , cada una coordinada en un arreglo tetraédrico por cuatro cisteínas. El DBD contiene dos dedos de zinc que se doblan para formar un dominio estructural sencillo, (Fig. 5). El primer modulo de zinc es el responsable para el reconocimiento de secuencias blanco y el segundo dedo de zinc se encuentra involucrado en la dimerización así como en la orientación del receptor. La parte principal del DBD, contiene dos hélices la primera, comienza en el tercer residuo de cisteína uniéndose al surco principal de DNA para establecer un contacto con bases específicas y la segunda que acopla al carboxilo terminal del segundo dedo de zinc formando un ángulo recto con la hélice de reconocimiento. [Aranda y Pascual., 2001]. Las dos hélices se mantienen unidas a través del empaquetamiento de cadenas laterales hidrofóbicas, lo que estabiliza el doblamiento del DBD y determina la orientación relativa de las dos estructuras.

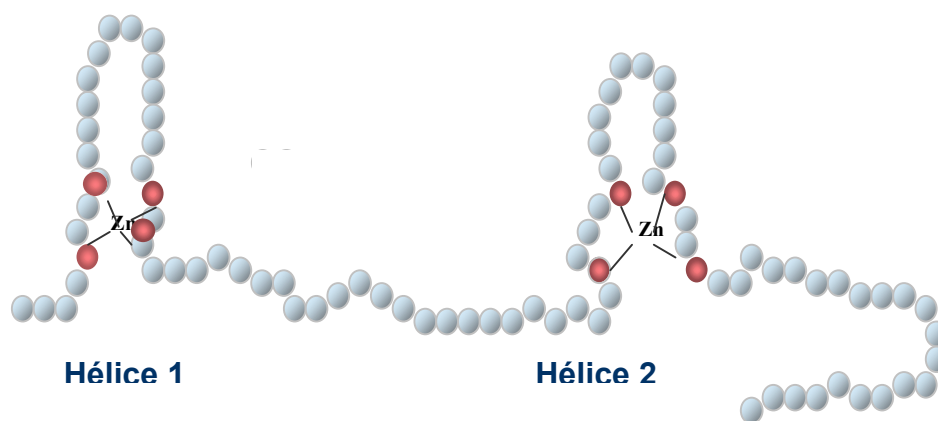


Figura 5. Dominio de unión a DNA (DBD). En los dos dedos de zinc, cuatro cisteínas se encuentran coordinando un ion de zinc. Adaptado de Aranda y Pascual., 2001.

Los receptores nucleares regulan la transcripción mediante la unión a secuencias específicas de DNA en los genes blanco conocidas como elementos de respuesta a hormona (HREs). Diversos estudios han permitido la identificación de dos motivos consenso, los cuales parecen constituir el centro del sitio de reconocimiento: la secuencia AGGTCA y la secuencia AGAACA.

De acuerdo al modo de unión de los receptores hormonales nucleares, los HREs pueden dividirse en tres clases, la primera de ellas es aquella en donde la secuencia AGGTCA se muestra en una forma sencilla para el reconocimiento de receptores que se unen como monómeros; la segunda clase consiste en la secuencia AGAACA duplicada como una secuencia palíndrome invertida para el caso de unión de receptores que forman homodímeros y por último la misma secuencia duplicada como una repetición directa en el caso de los receptores que forman heterodímeros con el RXR [Renaud y Moras, 2000].

Dominio de unión al ligando (LBD)

La segunda región más conservada entre los receptores hormonales nucleares es el LBD. Este dominio contiene el sitio de unión al ligando, es el mediador de la homodimerización y heterodimerización y contiene la función de activación (AF-2), siendo así el dominio que permite la activación dependiente de ligando. Además de esto, se ha demostrado que el LBD es capaz de interactuar con otras proteínas ya sea de choque térmico o bien, proteínas que también se encuentran involucradas en la regulación de la transcripción [Nagy y Schwabe, 2004]. En base a esto, se le ha caracterizado como el dominio más complejo presente en los receptores hormonales nucleares. El LBD, está conformado por 12 regiones conservadas -hélice numeradas de la H1 a la H12; se encuentra doblado formando tres capas de hélices antiparalelas. Una capa central de las tres hélices, se encuentra empacada entre dos capas adicionales formando una cavidad conocida como la bolsa de unión al ligando en donde, como su nombre lo indica, es el sitio donde se sitúa el ligando; este dominio es altamente hidrofóbico y se encuentra hacia el fondo de la mitad inferior del LBD [Shao y Lazar, 1999], (Fig.6).

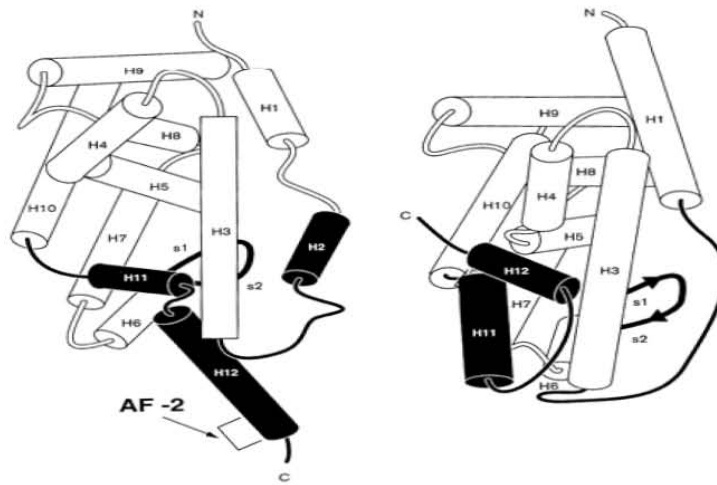


Figura 6. Dominio de unión al ligando. Del lado izquierdo, la estructura del LBD del RXR inactivo. Del lado derecho, el LBD del mismo receptor unido al ligando. Adaptado de Aranda y Pascual., 2001.

Diversos estudios han demostrado que la unión al ligando provoca un cambio conformacional en el LBD, produciendo una estructura más compacta exhibiendo una nueva superficie a la cuál diferentes proteínas coactivadoras puedan unirse y así llevar acabo la activación de la transcripción [Renaud *et al.*, 1995].

1.3 Receptor Nuclear de Estrógeno

El Receptor Nuclear de Estrógeno (ER), es un factor transcripcional perteneciente a la superfamilia de los RHN, encargado de regular la transcripción de genes que responden a estrógeno (E_2). El estrógeno, es una hormona esteroidea principalmente sintetizada y secretada por los ovarios la cual, es un regulador clave para el crecimiento, diferenciación y el funcionamiento de un amplio grupo de tejidos, (Fig.7). Sus principales blancos son glándula mamaria, útero, hueso, sistema cardiovascular, cerebro y el tracto urogenital. [Gustafsson y Warner, 2000]. En glándula mamaria así como en el útero, el E_2 es requerido para la diferenciación celular, el desarrollo y el funcionamiento fisiológico; en el sistema cardiovascular funciona ejerciendo un efecto cardio-protector; y en hueso, es capaz de regular la densidad ósea [Katzenellenbogen, 1996; Marcantonio *et al.*, 2001]. En base a esto, la importancia biológica del E_2 es evidente por el hecho de que alguna alteración en

su producción o bien, cualquier anomalía en su receptor, se asocia a un gran número de enfermedades [Gustafsson y Warner, 2000].

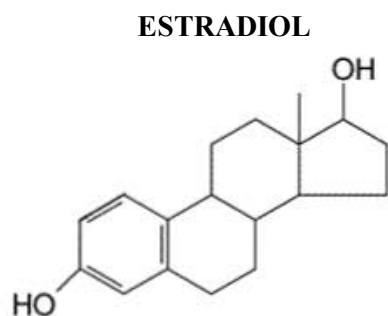


Figura 7. Estructura química del estradiol. El estradiol es una hormona perteneciente al grupo de los estrógenos.

Los efectos biológicos del E₂, se encuentran mediados por la actividad de dos receptores diferentes; el ER α y el ER β los cuales, son dos isoformas del ER siendo un producto de genes distintos localizados en diferentes cromosomas; el primero de ellos se encuentra en el cromosoma 6 y el segundo en el cromosoma 14.

Ambos receptores poseen la estructura modular de dominios funcionales característica de los receptores hormonales nucleares mostrando una homología en la región DBD (96%) así como en la región LBD (58%) lo cual, se relaciona con la propiedad que tienen ambos receptores de unirse al DNA de manera similar y de la unión a su ligando con la misma afinidad [Couse *et al.*, 1997]. A diferencia de esto, el dominio localizado en el extremo amino Terminal, presenta una variabilidad entre los dos receptores muy común dentro de la superfamilia de los receptores hormonales nucleares y que generalmente les atribuye diferencias en su funcionalidad. [Delaunay *et al.* 2000].

El papel del ER α , en la mediación de los efectos del estrógeno, adquiere su importancia debido al gran número de procesos que son regulados por esta hormona en diferentes tejidos. Diversos estudios tanto bioquímicos como histológicos dirigidos a determinar la localización tisular del ER α , han revelado la expresión de este factor transcripcional en glándula mamaria, útero, cervix, vagina, placenta, cerebro, testículo, hueso y algunos otros órganos blanco adicionales. [Pelletier y El-Alfy, 2000].

1.3.1 Mecanismo de Acción del Receptor Nuclear de Estrógeno

En ausencia de E_2 , el ER se encuentra en el núcleo de células blanco, formando un complejo inhibitorio con proteínas de choque térmico tales como hsp90 o hsp70; una vez que el E_2 se une al ER, se produce un cambio conformacional que involucra la disociación de estas proteínas y la formación de un homodímero de ER ocupado por el ligando [Webb *et al.*, 1998]. La regulación de la expresión de genes que responden a estrógeno llevada a cabo por el ER puede realizarse mediante dos mecanismos diferentes; el primero de ellos implica una interacción directa del ER con otros factores de transcripción de modo que esta interacción, estabiliza la unión de estos factores con el DNA para incrementar su actividad. El segundo mecanismo conocido como la vía clásica, es aquel en donde una vez unido al ligando, el ER es capaz de reconocer a una secuencia específica localizada dentro de regiones reguladoras de sus genes blanco, conocida como Elementos de Respuesta a Estrógeno (ERE), y una vez unido a esta secuencia, recluta a un complejo coactivador hacia el promotor el cuál es capaz de aumentar la transcripción de genes o bien, contacta directamente algunos componentes del complejo de iniciación de la transcripción. [Webb *et al.*, 1999; Klinge, 2001].

La actividad transcripcional del ER, se encuentra regulada por las dos funciones de activación de la transcripción presentes en los receptores hormonales nucleares. La función de activación AF-1 localizada dentro de la región amino Terminal, realiza su función en una manera independiente de ligando y su actividad puede ser modulada por ciertos eventos de fosforilación; por otro lado, la función de activación AF-2 se encuentra dentro del LBD en la región carboxilo Terminal y requiere la presencia del estrógeno para llevar a cabo su función. Ambas funciones de activación (AF-1 y AF-2), actúan sinérgicamente para aumentar los niveles transcripcionales de genes que responden a estrógeno; sin embargo, también son capaces de funcionar individualmente en células y promotores específicos; por lo que la actividad transcripcional requiere de ambas funciones de activación en

algunas células o bien, de sólo una de ellas específicamente en otras, lo que indica que el ER no interactúa con la maquinaria transcripcional del mismo modo en todas las células [Merot *et al.*, 2004].

La relación tanto física como funcional establecida entre el ER y la maquinaria transcripcional, implica a un grupo de proteínas conocidas como coactivadores, las cuales son capaces de interactuar directamente con el ER. La región AF-2 del ER, funciona como un puerto de anclaje para estos coactivadores gracias al reconocimiento por parte de un fragmento hidrofóbico formado en la superficie del LBD unido al ligando, de un dominio que contiene la secuencia LXXLL presente en los coactivadores; sin embargo, no en todas las ocasiones la presencia de este dominio es suficiente para la interacción y se requiere de otras secuencias adicionales. [Chen *et al.*, 2000].

La mayoría de los coactivadores se encuentran formando parte de grandes complejos los cuales, son reclutados por el ER sobre el promotor de genes blanco para activar la transcripción. Hasta la fecha se han identificado varias clases de coactivadores capaces de interactuar con la región AF-2 del ER dentro de los cuales se encuentran, la familia p160/SRC que incluye a SRC-1, GRIP-1/TIF2 y pCIP/ACTR/AIB1/RAC3; una de las principales funciones de esta familia de coactivadores, es la de reclutar otros coactivadores transcripcionales tales como CBP/p300 y p/CAF los cuales, muestran una actividad de acetilasas de histonas permitiendo la descondensación de la cromatina mediante una modificación covalente de las histonas [Deblois y Giguere, 2003].

Un segundo complejo coactivador, incluye a las proteínas del complejo mediador SMCC/TRAP/DRIP/ARC el cuál permite un contacto directo del ER con el aparato general de transcripción facilitando la activación de la transcripción por la RNA pol II [McDonell y Norris, 2002]. Este gran complejo formado, cuyas subunidades poseen estas propiedades, es el responsable de la habilidad que tiene AF-2 para estimular la expresión de genes.

Además de la unión a coactivadores, se ha demostrado la capacidad de la región AF-2 de reconocer proteínas correpressoras tales como RIP140 y TIF1 que reclutan la actividad de desacetilasas de histonas. En base a lo anterior, se ha establecido que la actividad transcripcional de genes que responden a estrógeno se encuentra regulada por el intercambio de estos complejos proteicos permitiendo la activación o bien la represión de estos genes.

La región AF-1 del ER no se ha estudiado del mismo modo que la región AF-2; hasta hace algún tiempo, se pensaba que AF-1 únicamente funcionaba de manera sinérgica junto con AF-2 sin embargo, recientemente se ha descubierto que AF-1 es capaz de actuar de manera individual en un modo independiente de ligando en algunos tipos celulares y promotores. Hasta hace poco se han descubierto algunos coactivadores que pueden interactuar con esta región de manera similar a la descrita para AF-2 [Berry *et al*, 1990]. En particular, se ha demostrado el reclutamiento de SRC1 por parte de AF-1 el cual permite la activación de esta región; además de este coactivador, la proteína SRA y TIF2 también han mostrado ser capaces de mediar la acción del ER a través de AF-1, así como la proteína p68 [Benecke *et al*, 2000]. Diversos estudios han demostrado que la activación del ER por medio de la región AF-1, puede llevarse a cabo bajo una fosforilación de residuos de serina inducida por la vía MAPK la cual, se ha asociado con la actividad independiente de ligando de este receptor [Ali *et al*, 1993].

El ER regula la expresión de genes que responden a estrógeno; estos genes se han identificado principalmente en células de cáncer de mama y algunos otros en hueso, células de hígado, sistema vascular y neuronas entre otros. El ER y el ER son genes que también responden a estrógeno, por lo que es posible que el ER sea capaz de autorregular su expresión en algunos promotores [Castles *et al*, 1997].

Diversos estudios han demostrado un gran número de genes asociados a tumores cuya expresión depende de estrógeno; oncogenes tanto como genes involucrados en el desarrollo de tumores son altamente regulados por el ER, mientras que aquellos que participan en la supresión de tumores son regulados en un nivel

menor; todo esto, en conjunto, es asociado al efecto producido por estrógeno, de promover el crecimiento. Debido a la participación del ER en la regulación de genes y vías de señalización involucrados en la proliferación celular tales como *c-fos*, *c-myc*, ras o bien, en el ciclo celular incluyendo a la ciclina D, EGF, TGF, IGF; además de la importancia del estrógeno en el desarrollo y crecimiento de glándula mamaria, el ER se ha asociado con el origen y la progresión de cáncer de mama [Marcantonio *et al*, 2001; Liu *et al.*, 2001].

1.4 Cáncer de mama

El cáncer de glándula mamaria es una de las primeras causas de muerte en mujeres de todo el mundo y la segunda causa de mortalidad provocada por tumores malignos en mujeres de edad reproductiva en México. El incremento del riesgo se asocia con la historia familiar del padecimiento de cáncer de ovario, mama y algunos otros factores [Russo. I y Russo. J, 1998].

El origen del cáncer, es causado por una mutación en algún gene que se encuentra regulando el crecimiento y división celular. Algunas de estas mutaciones son hereditarias y otras, debidas a la exposición a ciertos agentes capaces de provocar un daño al DNA o bien, pueden ocurrir espontáneamente como resultado de algunos errores generados durante la duplicación del material genético antes de iniciar la división celular. Cuando las mutaciones ocurren en genes que controlan la proliferación celular o en genes supresores de tumores, estos cambios son repetidos en cada generación nueva de células, lo que lleva a una proliferación descontrolada y el inicio del cáncer

En tejido de glándula mamaria, el estrógeno es capaz de promover la proliferación celular durante cada ciclo menstrual programando a la glándula mamaria para el momento de la fecundación; si esta no ocurre, los niveles de estrógeno disminuyen considerablemente al final de este ciclo y en ausencia de altos niveles de esta

hormona, aquellas células de tejido de glándula mamaria que han proliferado, son deterioradas y mueren, seguido de un ciclo similar de proliferación y muerte celular.

A pesar de que el estrógeno no es capaz de causar directamente un daño al material genético, el hecho de que se encuentre regulando la expresión de genes que están involucrados tanto en la proliferación celular, así como genes que participan en el desarrollo de tumores, además de su función de estimular el crecimiento celular, implica que puede estar asociado con un crecimiento incontrolado de células promoviendo así la formación del tumor e incrementando el riesgo en las mujeres de desarrollar cáncer de mama. El 70% de los tumores de mama detectados en pacientes postmenopáusicas dependen de estrógeno para su crecimiento y proliferación; mientras que en pacientes más jóvenes, solo el 25% de los tumores son dependientes de esta hormona [Van de Vijver y Nusse, 1991]

1.4.1 Papel del ER en el Desarrollo de Cáncer de Mama

El ER juega un papel muy importante en la regulación del crecimiento y diferenciación del epitelio de glándula mamaria normal, así como en el desarrollo y progresión del cáncer en este tejido, ya que es el encargado de mediar los efectos del estrógeno. Dos terceras partes de todos los tumores de mama son ER positivos, mientras que la otra tercera parte carece de esta proteína. En una pequeña población de células epiteliales localizadas en glándula mamaria, el ER se encuentra expresado a niveles muy bajos sin embargo, a pesar de que en tejido normal también se encuentre expresado el ER, la cantidad de esta proteína producida en tumores ER positivos es significativamente mayor.

Los factores principales que determinan el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama son la edad, el tamaño del tumor, el tipo histológico del tumor así como el grado patológico; sin embargo, el nivel de expresión del ER se ha convertido en un factor importante a considerar ya que los tumores con niveles normales de ER suelen ser más susceptibles al tratamiento con antiestrógenos permitiendo la identificación de las pacientes con cáncer de mama que responderán al tratamiento; sin embargo, no todas las pacientes con tumores ER positivos, son capaces de responder a la terapia hormonal [Girault *et al*, 2006].

1.4.2 Tamoxifén y el papel de AF-1 en la resistencia al tratamiento

La dependencia de estrógeno para la formación y proliferación de tumores en glándula mamaria, ha llevado al desarrollo de diversos compuestos con actividad antiestrogénica para el tratamiento de la enfermedad. El Tamoxifén (TOT), es el fármaco con actividad antiestrogénica más utilizado para el control de cáncer de mama que actúa como un antagonista de estrógeno. El uso de este fármaco ha contribuido a la reducción en el número de muertes por esta enfermedad en todo el mundo.

El TOT presenta una estructura de trifeniletileno con dos anillos que corresponden a los anillos A y D del estrógeno, estructura que le permite actuar como antagonista del estrógeno, compitiendo con esta hormona para unirse al LBD del receptor con la diferencia de que el TOT no es capaz de dirigir la respuesta normal y por lo tanto inhibe la acción de la hormona. Una vez que el TOT es administrado, es convertido en el hígado a 4-Hidroxitamoxifén y esta conversión aumenta la afinidad de este componente por el receptor aproximadamente 100 veces más. Por esta razón, el TOT es utilizado en el tratamiento contra el cáncer de mama teniendo la característica de prevenir la enfermedad en mujeres de alto riesgo y de bloquear la recurrencia en mujeres que la padecen, al inhibir la proliferación de células tumorales [Klinge *et al*, 2002; Ishibashi *et al*, 2001]. Sin embargo, en algunos tejidos como útero y hueso, el TOT puede actuar como agonista parcial del receptor de estrógeno. Esto indica que la actividad del TOT es dependiente del contexto celular, pero de manera más importante, se hace evidente el riesgo de utilizar este fármaco por periodos prolongados ya que predispone al desarrollo de cáncer en estos tejidos. [Watanabe *et al*, 1997].

Otro inconveniente del uso del TOT como agente terapéutico en el cáncer de mama es que algunas pacientes no responden de manera eficaz al tratamiento y el crecimiento tumoral no se detiene y en general, todas las mujeres tratadas con TOT tienden a desarrollar resistencia al medicamento. De esta manera, si la neoplasia no es eliminada completamente mediante cirugía y/o el tratamiento hormonal, el cáncer regresa y en esta ocasión no puede ser controlado hormonalmente con un pronóstico grave [Berry *et al*, 1990].

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que la integridad de la región AF-1 del ER es indispensable para que el TOT se comporte como agonista parcial del receptor de estrógeno. De igual manera, la refractareidad al tratamiento con TOT en células en cultivo, parece depender de la función AF-1. Por tal motivo, la caracterización del mecanismo por el cuál la región AF-1 regula la actividad del ER, puede dar las bases necesarias para el entendimiento de la resistencia al tratamiento con TOT así como la identificación de factores que permitan determinar a posibles candidatas a desarrollar la enfermedad o bien a aquellas pacientes que no responderían al tratamiento con TOT. [Berry *et al*, 1990].

1.5 Clonación de Factores que Interactúan Directamente con la Región

AF-1 del ER Humano

Anteriormente se mencionó que la región AF-1 del ER era capaz de interactuar con algunos coactivadores de una manera similar a la de AF-2, este reclutamiento puede estar mediando el sinergismo entre ambas regiones o bien, la actividad individual de la región AF-1 en la activación del ER, por lo que la identificación de factores que son capaces de interactuar directamente con esta región, es el comienzo de la caracterización del mecanismo a través del cuál la región AF-1 es capaz de activar al ER.

En el laboratorio del Dr. Alfonso León Del Río del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se identificaron algunas proteínas que son capaces de interactuar con la región AF-1 del ER mediante el sistema de doble híbrido en levadura. Este sistema utiliza un fragmento de una proteína conocida, unida al DBD de la proteína GAL4 de *S. Cerevisiae* como carnada para atrapar proteínas que interactúan con esta región. En este caso, el fragmento de proteína utilizado fue la región AF-1 del ER a través del cual se tamizó una librería de cDNA de mama fusionada al dominio de transactivación de GAL4. La interacción de las proteínas de la librería que reconocen específicamente a AF-1, permite la reconstitución de la proteína GAL4 lo que conlleva a la activación de genes reporteros tales como His3 y LacZ cuya expresión se encuentra controlada por GAL4. Las levaduras en las cuales AF-1 se asoció a alguna proteína de la librería, pudieron sobrevivir en medios de crecimiento carentes del aminoácido leucina o triptofano; finalmente a estas colonias, se les realizó un ensayo de β -galactosidasa con la finalidad de realizar una selección doble para descartar las posibilidades de falsos positivos y de esta manera identificar proteínas desconocidas que interactúan con AF-1. Una vez realizado este experimento, los plásmidos que codifican estas proteínas fueron aislados y secuenciados, dando como resultado la identificación de diferentes fragmentos de seis genes diferentes los cuales fueron denominados como ERAP 1-6 (Estrogen Receptor Associated Proteins).

1.6 DRAL (Downregulated in Rhabdomyosarcoma LIM protein)

Una de las seis proteínas encontrada capaz de interactuar con la región AF-1, fue identificada en la base de datos del NCBI como un cofactor transcripcional conocido con el nombre de DRAL (Downregulated in Rhabdomyosarcoma LIM protein). Esta proteína es un miembro de la superfamilia de proteínas LIM que se caracterizan por la presencia de uno o más copias del dominio LIM. Este dominio, es un dominio rico en cisteínas los cuales forman dos estructuras de dedos de zinc que están

involucrados principalmente en la interacción proteína-proteína. Una clase de este tipo de proteínas, comprende a las proteínas LIM-only las cuales están compuestas únicamente de dominios LIM; dentro de esta clase de proteínas se ha identificado a un subgrupo de proteínas que consiste en cuatro dominios LIM completos y un dominio LIM a la mitad designado como proteínas FHL (Four and a Half LIM) dentro del cuál se encuentra agrupada la proteína DRAL también conocida como FHL2 [Scholl *et al.*, 2000].

DRAL presenta una secuencia de 279 aminoácidos, esta proteína se encuentra involucrada en diversos procesos celulares tales como son la regulación de la expresión genética, adhesión celular, movilidad celular y transducción de señales. En estudios realizados acerca de la expresión de DRAL en diferentes tejidos, se observó que DRAL, se encuentra expresada abundantemente en corazón sin embargo, también se encuentra expresada en otros órganos en un nivel más bajo como en placenta, músculo esquelético y ovario [Chan *et al.*, 1998].

La distribución de DRAL dentro de las células muestra un patrón variado con respecto al tipo celular; en algunas células se encuentra predominantemente en núcleo mientras que en otras muestra una distribución uniforme; sin embargo, se ha encontrado que la distribución subcelular de DRAL en algunas ocasiones es regulada por ciertos estímulos como algunos componentes del suero o bien, por el tratamiento de las células con luz UV. Esta regulación de la distribución subcelular de DRAL a partir de estímulos sugiere un papel importante en procesos de transducción de señales. [Marlon y Sassone-Corsi, 2003].

La versatilidad de las funciones de esta proteína, es debida al gran número de proteínas con las que es capaz de interactuar las cuales, forman parte de distintas clases funcionales tales como receptores, proteínas estructurales, factores de transcripción, proteínas involucradas en la transducción de señales entre otras; sin embargo, el mecanismo molecular por el cuál esta proteína lleva a cabo cada una de sus funciones aún no esta establecido en su totalidad. El estudio de estas

interacciones proteína-proteína es de gran importancia, ya permite el entendimiento de las funciones de DRAL en los tejidos en que es encontrada [Johannessen *et al*, 2006].

Dentro de las funciones principales que se le han atribuido a DRAL es la de su posible participación en el desarrollo de la fisiología cardíaca; la expresión de DRAL en osteoblastos humanos así como los niveles de transcrito aumentados durante la diferenciación de hueso, le sugieren un papel dentro de la osteogenesis; diversos experimentos también han mostrado un papel importante para DRAL en procesos musculares tal como la estabilización mecánica de células musculares al interactuar específicamente con ciertos receptores de integrinas en sitios de adhesiones focales [Amaar *et al*, 2000; Samson *et al*, 2004].

Además de las funciones mencionadas anteriormente se ha determinado que DRAL es también un cofactor transcripcional ya que participa en distintos procesos permitiendo que la transcripción de ciertos genes se lleve a cabo. DRAL es capaz de actuar como un activador para ciertos receptores nucleares como RXR y TR sin embargo, el factor transcripcional para el que más ha sido caracterizada su función como coactivador es el AR a través de su interacción con dominio AF-2 de este receptor [Muller *et al*, 2000].

El hecho de que DRAL sea capaz de actuar como un coactivador del receptor hormonal de andrógenos, además de la identificación en nuestro laboratorio de la interacción de esta proteína con la región AF-1 del ER, sugiere su participación en la regulación de la transactivación mediada por el receptor de estrógeno. La caracterización funcional de DRAL sobre la actividad del ER nos permitirá entender con mayor detalle el funcionamiento del dominio AF-1 y posiblemente sienta las bases para un estudio a largo plazo encaminado a entender el proceso de resistencia al tratamiento con TOT.

Capítulo II

2.1 HIPÓTESIS

- Si la proteína DRAL se une al dominio AF-1 de Receptor de Estrógenos , entonces modificará la actividad transcripcional de este receptor.

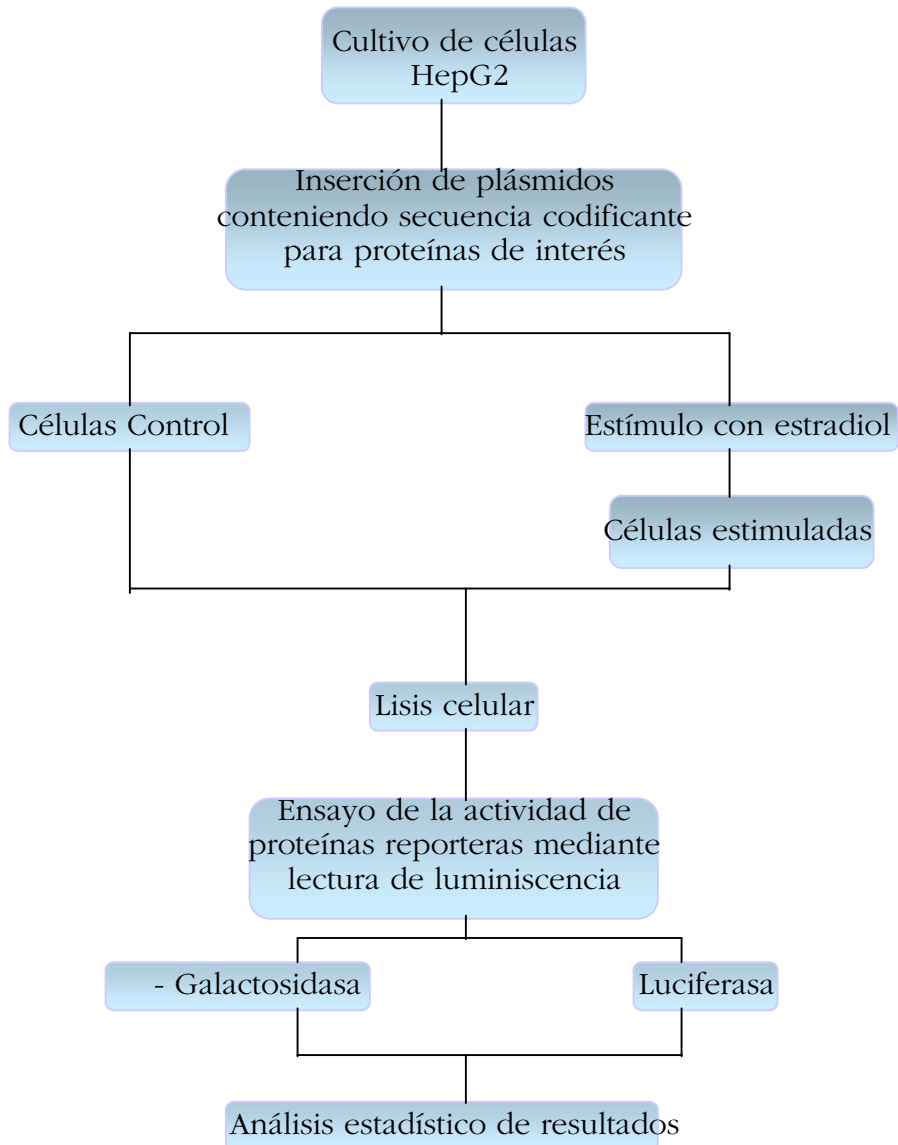
2.2 OBJETIVOS

- Caracterizar funcionalmente a DRAL como un corregulador del ER .
- Estudiar la formación de complejos multipéptídicos de DRAL con otras proteínas capaces de reconocer a los dominios AF-1 y AF-2 de ER .

Capítulo III

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Estrategia Experimental



3.2 Material

3.2.1 Material Biológico

- Línea celular de hepatoblastoma humano HepG2, obtenida de American Type-Cell Collection.
- Vectores de expresión: pcDNA3.1 Hys hER , PBKCMV DRAL, LacZ-CMV-pFIV -Gal, pcDNA3.1 Hys E3K, pcDNA3.1 Hys SRC-1.

3.2.2 Material Químico

- Alpha MEM (Gibco)
- PBS (Gibco)
- Trpsina/EDTA (Gibco)
- Antibiótico/Antimicótico (Gibco)
- FBS (Hycone)
- CaCl₂
- HeBS 2X
- Buffer de lisis Tritón X-100 1 %
- Buffer de -Gal
- KTME
- ATP 200 mM
- Luciferina 50 mM
- DTT 1 M
- Galactón (TROPIX)
- Acelerador (TROPIX)

3.3 Metodología

3.3.1 Cultivo Celular. Las células HepG2, fueron descongeladas de nitrógeno líquido y transferidas a un frasco T25 (25cm²) en una campana de flujo laminar previamente tratada con luz U.V. manteniéndolas en 5 mL de medio Alpha MEM (GIBCO) suplementado con 10% de FBS (HyClone) y penicilina/estreptomicina (GIBCO) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Se determinó la ausencia de contaminación por bacterias y hongos así como la confluencia de las células observando diariamente las células al microscopio.

El medio fue reemplazado cada tercer día, lavando la capa de células que se encontraba pegada al frasco, con PBS (GIBCO) dos veces, y mantenidas en medio Alpha MEM (GIBCO) a una temperatura controlada.

Las células fueron divididas en platos T75 (75cm²) una vez que llegaban a un 80% de confluencia, lavándolas con PBS/EDTA (GIBCO) para facilitar su desprendimiento y agregando de Tripsina/EDTA 10X(GIBCO) dejando actuar a ésta durante un tiempo aproximado de 3-4 min a 37°C 5%CO₂ para despegar la mayoría de las células de la superficie del frasco. Las células despegadas fueron transferidas a un tubo Falcón de 50mL y las células que quedaron en el frasco, fueron recuperadas lavando el frasco con medio de cultivo depositándolo al tubo Falcón. El contenido del tubo fué centrifugado para obtener el pellet de células y eliminar la tripsina. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo varias veces con la finalidad de disgregarlas perfectamente evitando la formación de grumos. Una vez divididas, fueron mantenidas en Alpha MEM 10% FBS (Hyclone) a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂. De esta manera, se generaron un número de frascos necesarios para llevar a cabo los siguientes experimentos.

3.3.2 Expresión de proteínas en células HepG2. La expresión de las proteínas DRAL, ER , SRC1, E3K, Luciferasa y -galactosidasa en células HepG2, se realizó mediante ensayos de transfección transitoria, los cuáles consisten en la inserción de plásmidos que contienen el gen que codifica para cada una de estas proteínas a células eucariotas en donde el DNA insertado, no es incorporado al material genético de la célula sino simplemente es expresado transitoriamente. El proceso por el cuál este DNA es introducido a la célula, es a través de la formación de cristales de fosfato de calcio. Una solución salina de buffer HEPES (HeBS) que presenta iones de fosfato, se combina con una solución de cloruro de calcio, la cual contiene el DNA que será introducido. Una vez mezcladas ambas soluciones, se forma un fino precipitado de fosfato de calcio que lleva unido en su superficie el DNA que será transfectado, este precipitado se introduce a las células por un proceso que aun no se conoce y junto con el, el DNA también es introducido. Los ensayos de transfección transitoria para este proyecto, se realizaron de la siguiente manera.

Las células HepG2 a un 80% de confluencia fueron tripsinizadas y recuperadas en un tubo Falcón, eliminando la tripsina mediante una centrifugación a 2000rpm durante 10 minutos, para ser sembradas en 6-wells un día anterior a la transfección.

Las células fueron contadas en la cámara de Newbawer utilizando azul de tripan con el objetivo de sembrar aproximadamente 300,000 células en cada pozo y una vez sembradas con medio Alpha MEM (GIBCO), fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. El día de la transfección, el medio fue removido de las células lavándolas dos veces con PBS (GIBCO) e incubadas nuevamente durante un tiempo aproximado de dos horas.

Los plásmidos que contienen los genes que expresan las proteínas a estudiar, fueron precipitados con una solución de acetato de sodio, glicógeno y etanol al 100%; la cantidad de cada uno de estos plásmidos para cada ensayo, se encuentra indicada al pie de figura en la sección de resultados. El precipitado de fosfato de calcio fue formado, adicionando al DNA previamente disuelto en agua estéril, la solución de cloruro de calcio y el buffer HeBS. Es importante considerar que la solución no fue agitada hasta que se adicionó el buffer HeBS con la finalidad de formar un precipitado muy fino para que sea más sencillo de entrar a la célula. La formación del precipitado de fosfato de calcio ocurre aproximadamente de 20-30 minutos después.

Las células sembradas en los 6-wells fueron transfectadas con el fosfato de calcio, e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante cuatro horas para permitir que la mayor parte de precipitado unido a DNA entre a la célula. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron estimuladas con estradiol, removiendo el medio a las células para eliminar el resto de cristales de fosfato que no entraron a la célula ya que este puede provocar toxicidad a las células después de un largo tiempo de exposición; las células fueron lavadas dos veces con PBS (GIBCO) y en base a cada experimento, el medio adicionado contenía o no estradiol. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

3.3.3 Ensayo de Luciferasa y de β -Gal. La luciferasa es una enzima comúnmente utilizada para emitir bioluminiscencia ya que cataliza la oxidación de su sustrato (luciferina) produciendo una gran cantidad de energía la cuál es transformada en luz casi en su totalidad. La emisión de la luz, es captada por un luminómetro lo cuál permite la observación de procesos biológicos.

En este estudio, la luciferasa fue utilizada como una proteína reportera, capaz de medir la actividad transcripcional del ER al estar unida a una secuencia ERE la cuál es reconocida por el ER para activar la transcripción, por lo que la proteína sintetizada es capaz de catalizar la oxidación de su sustrato luciferina y así emitir cierta cantidad de luz que es proporcional a la proteína producida. Por otro lado, β -galactosidasa, es otra enzima que corta a la lactosa en glucosa y galactosa; una vez que se une a su sustrato, produce un compuesto colorido capaz de emitir luz y de ser medido en el luminómetro. La actividad de β -galactosidasa fue utilizada para normalizar los datos obtenidos de la actividad de luciferasa, ya que en base a esta se puede determinar la eficiencia de transfección. Los ensayos de luciferasa y β -galactosidasa fueron realizados de la siguiente manera: Las células transfectadas con los plásmidos correspondientes, fueron lavadas dos veces con PBS 1X y posteriormente lisadas con el Buffer de LISIS Tritón X-100 1% para obtener las proteínas sintetizadas después de la transfección. Las células fueron incubadas con este buffer a una temperatura de 4°C para que la lisis se llevara a cabo y posteriormente centrifugadas para eliminar los restos celulares.

Para el ensayo de β -Gal, se preparó un buffer de reacción mezclando el Galactón (TROPIX) con el buffer de β -Gal. Una cantidad del sobrenadante obtenido el cuál contiene a la enzima β -galactosidasa fue incubado a temperatura ambiente con este buffer de reacción durante una hora; pasado este tiempo se llevo a cabo la lectura de la actividad de β -galactosidasa en un luminómetro adicionando Acelerador (TROPIX) a cada ensayo.

El ensayo de Luciferasa se llevo a cabo, preparando una mezcla que contiene DTT y KTME, la cuál se adicionó a celdas de lectura para luminometro. La lectura para medir la actividad de luciferasa en el luminometro se realizó adicionando a las celdas que contenían la mezcla anterior, el sobrenadante obtenido del lisado celular y finalmente una solución que contenía KTME, DTT, ATP y luciferina para que la reacción se lleve a cabo.

Inmediatamente después de esto se realizó la lectura en el luminómetro previamente programado para leer actividad de luciferasa.

3.3.4 Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y al menos en tres ocasiones diferentes utilizando las mismas preparaciones. Los resultados de la lectura de luciferasa fueron normalizados con los valores obtenidos de -Gal y expresados en actividad de luciferasa observada en células HepG2 con o sin estímulo de E_2 . Los datos son presentados como la media de tres experimentos +/-E.S.

Capítulo IV

4. RESULTADOS

4.1 Curva de concentraciones de ER

Para poner a prueba la hipótesis de que la proteína DRAL actúa como un regulador de la actividad transcripcional del ER a través de su unión específica a la región AF-1, lo primero que se realizó, fue una curva de concentraciones del ER, con la finalidad de determinar la concentración óptima de ER a utilizar en los ensayos posteriores. Se transfectaron cantidades crecientes del plásmido que contiene la secuencia codificante de ER en células HepG2 en ausencia y presencia de E₂. El efecto de ER fue determinado mediante la medición de la actividad del reportero unido a una secuencia de elemento de respuesta a estrógeno 3XERELuc que también fue transfectado junto con el ER. Como se observa en la Figura 8, la actividad transcripcional ejercida por el ER es directamente proporcional a su concentración en células estimuladas con E₂, lo que nos permitió determinar que la concentración óptima para trabajar con el ER en los ensayos de transfección posteriores es de 500ng siendo esta concentración la ideal al mostrar un incremento en la actividad transcripcional de 150% con respecto a la basal.

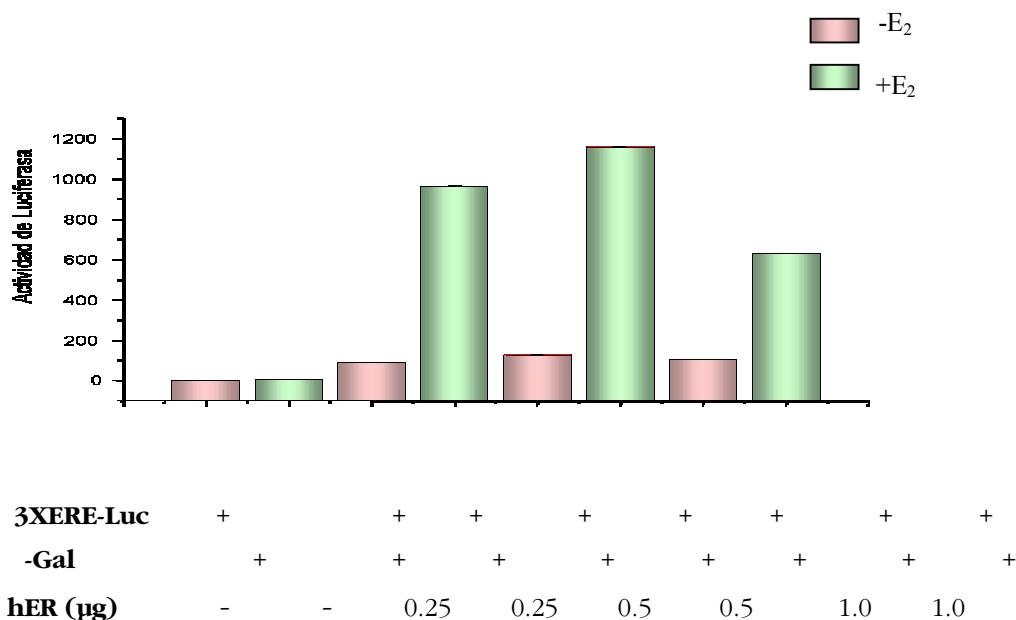
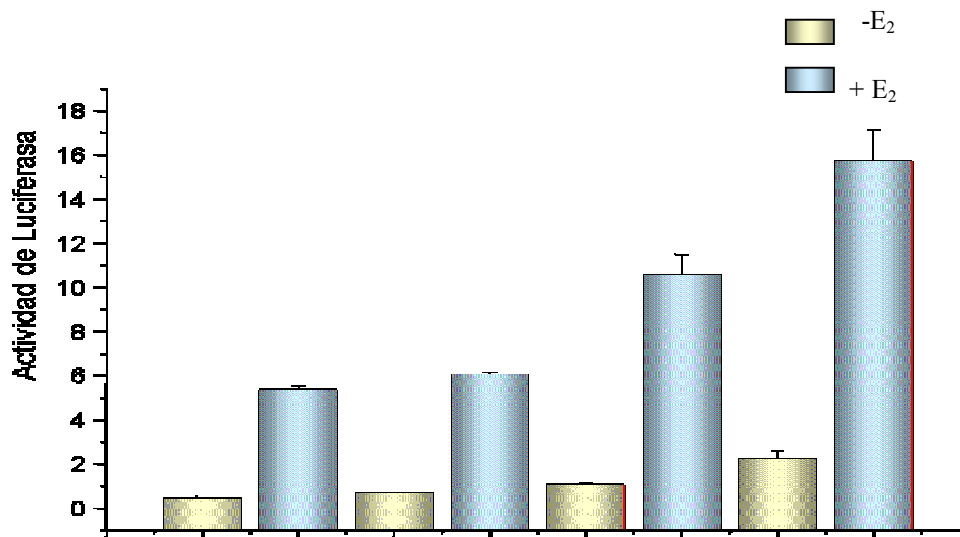


Figura 8. Curva de concertaciones de ER. Se realizó la transfección en células HepG2,

introduciendo la cantidad de plásmido señalada en la parte inferior para determinar la funcionalidad del sistema

4.2 Efecto de SRC1 sobre la actividad de ER

Para comprobar que el modelo experimental utilizado permite observar el efecto de proteínas correguladoras en la actividad de ER se realizó una curva de concentraciones de la proteína SRC-1. Esta proteína es el coactivador conocido más potente de ER. El plásmido que dirige la expresión de SRC-1 fue cotransfectado en concentraciones crecientes, junto con el plásmido que codifica para el ER en células HepG2. El resultado obtenido, muestra que a una concentración de 250ng, SRC-1 no causa un incremento significativo en la actividad transcripcional del ER, sin embargo cuando aumentamos la concentración de SRC-1 a 500 y 1000ng se observa un incremento de 2 y 2.8 veces respectivamente con respecto a la actividad basal. Estos resultados concuerdan con el dato de que SRC-1 actúa como un coactivador del ER y al mismo tiempo confirman que el modelo utilizado nos permite determinar el efecto de DRAL como un corregulador del ER. Figura. 9.

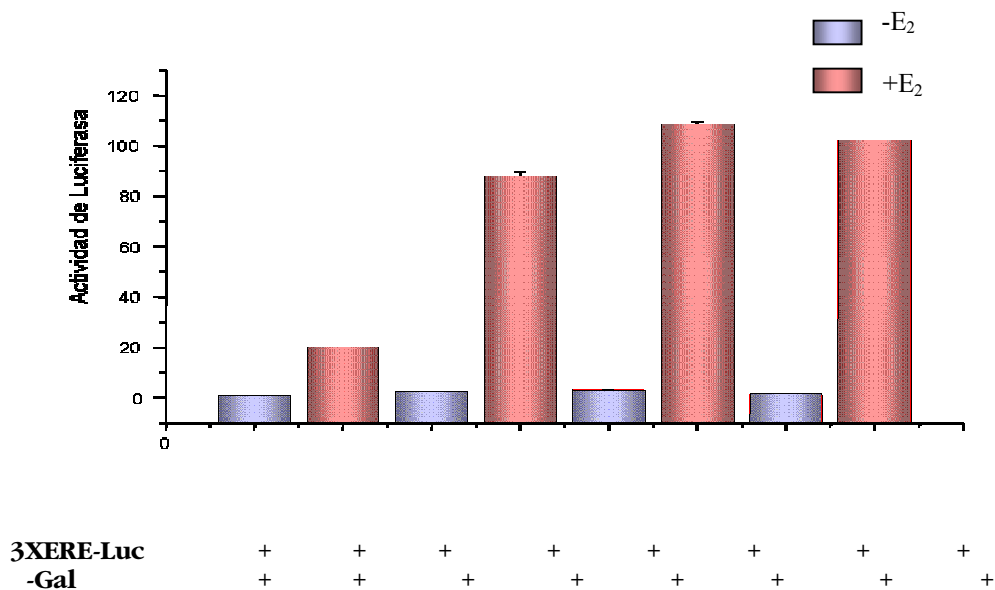


| | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 3XERE-Luc | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| -Gal | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| hER (µg) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| SRC1 (µg) | - | - | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | |

Figura 9. Efecto de SRC1 sobre la actividad de ER . La evaluación del sistema para medir efectos producidos por correguladores del ER sobre la actividad del mismo, fue determinada mediante el uso de un coactivador ya reportado para el ER en concentraciones crecientes.

4.3 Evaluación de DRAL sobre la transactivación mediada por el ER

La identificación de una interacción específica de la proteína DRAL con la región AF-1 del ER , sugiere que DRAL puede estar participando en la regulación de la actividad de este receptor, lo que nos llevo a la formulación de nuestra hipótesis; por lo tanto, para determinar el papel de DRAL como un corregulador de la actividad del ER , ambas proteínas fueron expresadas en células HepG2 junto con el reportero 3XERELuc. Los resultados obtenidos nos muestran que la coexpresión de DRAL junto con ER resulta en un incremento de la actividad transcripcional del ER , el aumento en la concentración de DRAL en las células, muestra un comportamiento similar al observado en la coactivación ejercida con SRC-1 el cual permite que la activación transcripcional llevada a cabo por el ER , vaya en aumento. De tal modo que 250, 500 y 1000ng de DRAL, incrementan la actividad del receptor 4.3, 5.6 y 5.2 veces respectivamente, comparada con la actividad basal del ER estimulada con E₂ . En conjunto estos datos nos sugieren que DRAL, se encuentra regulando positivamente la actividad transcripcional del ER a través de su unión a la región AF-1. Figura 10.

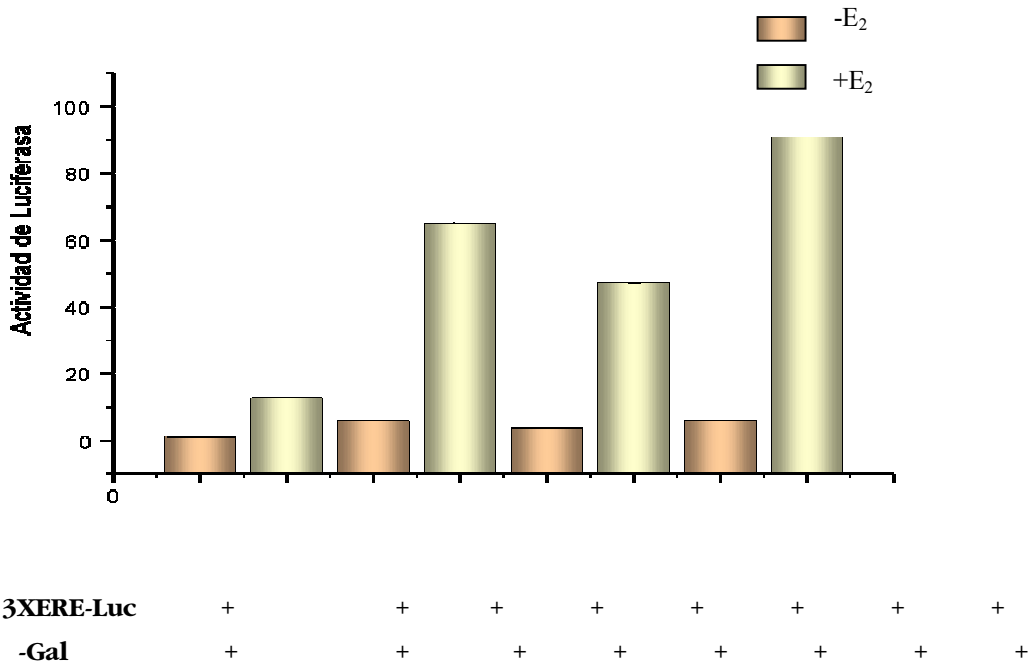


| | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
| hER (µg) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| DRAL (µg) | - | - | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | 1.0 |

Figura 10. Evaluación de DRAL sobre la transactivación mediada por el ER Para determinar el efecto de DRAL sobre el ER se realizó la cotransfección del vector que expresa DRAL en concentraciones crecientes, junto con el ER .

4.4 Cotransfección de DRAL y SRC1.

Como es evidente, la regulación de la transcripción es llevada a cabo por un conjunto de proteínas capaces de asociarse entre sí mismas formando complejos los cuales reclutan a otros con diferentes propiedades que les permiten ejercer un control en la transcripción. Por tal motivo, al identificar que DRAL actúa como un coactivador del ER de la misma manera que SRC-1, se sugirió que ambas proteínas pueden encontrarse formando un complejo capaz de producir un incremento en la actividad transcripcional del ER o bien, el hecho de que DRAL y SRC-1 interactúen de manera específica con la región AF-1 y AF-2 del ER respectivamente, la coactivación transcripcional puede ser llevada a cabo por medio de un sinergismo observado entre estas dos regiones mediado por ambas proteínas, por lo que la expresión simultánea de DRAL con SRC-1 nos permitió conocer la manera en como ambas proteínas al encontrarse al mismo tiempo en las células, son capaces de modificar la actividad transcripcional del ER . Figura 11

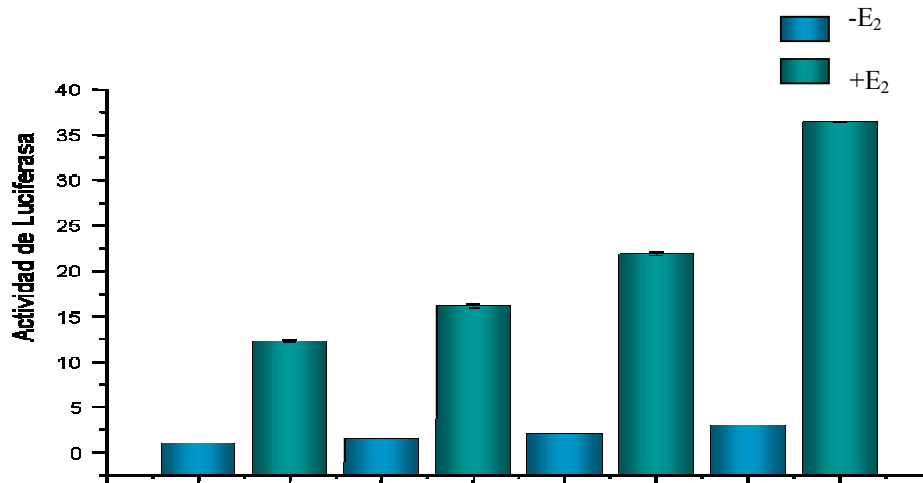


| | | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| hER (µg) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| DRAL (µg) | - | - | - | 0.5 | 0.5 | - | - | 0.5 | 0.5 |
| SRC1 (µg) | - | - | - | - | - | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

Figura 11. Cotransfeccion de DRAL y SRC1. Las células HepG2 fueron cotransfectadas con los vectores de expresión de DRAL y SRC1 para comparar el efecto de cada una de ellas y para observar el efecto de ambas cuando están expresadas al mismo tiempo en las células.

4.5 Curva de concentraciones de E3K

Además del posible sinergismo entre las regiones AF-1 y AF-2 del ER mediado por las proteínas DRAL y SRC-1, la formación de un complejo conformado por DRAL y otras proteínas unidas a la región AF-1 del ER podría estar ocurriendo durante la regulación transcripcional del ER. Otra de las proteínas identificada en el laboratorio capaz de reconocer específicamente la región AF-1 del ER es la proteína E3K la cual en estudios anteriores mostró del mismo modo que DRAL, comportarse como un coactivador del ER por tal motivo, se decidió estudiar el efecto producido por ambas proteínas juntas sobre la actividad del ER. Inicialmente, se realizó una curva de concentraciones con la proteína ER para comparara el efecto de esta con el producido por DRAL sobre el ER así como determinar la concentración optima capaz de producir una buena activación del ER. La figura, 12, nos muestra como el incremento en la concentración de E3K desde 250, 500 y 1000ng nos resulta en un aumento en la actividad transcripcional de ER de 1.4, 2, y 3 veces respectivamente como ya había sido reportado anteriormente.

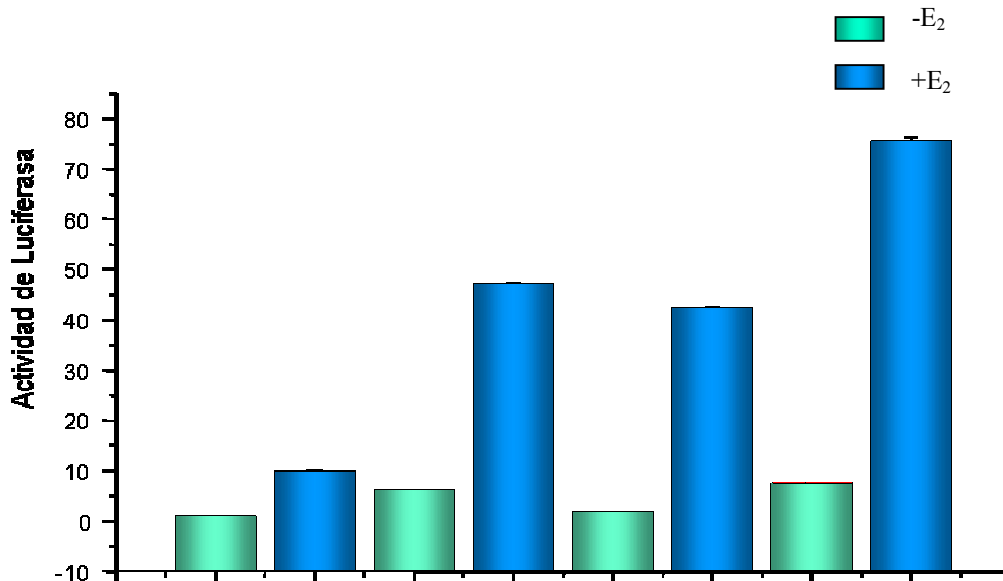


| | | | | | | | | |
|---|-----------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| + | 3XERE-Luc | + | + | + | + | + | + | + |
| | -Gal | + | + | + | + | + | + | + |
| | hER (µg) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| | E3K (µg) | - | - | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 1.0 |

Figura 12. Curva de concentraciones de E3K. La actividad de otro coactivador del ER fue determinada mediante ensayos de transfección, en donde se introdujo el vector de E3K en células HepG2 en concentraciones crecientes

4.6 Efecto de DRAL y E3K sobre la actividad del ER

Una vez corroborado el papel de coactivador de E3K, el plásmido con la secuencia codificante para esta proteína, fue contranfectado con el plásmido codificante para DRAL junto con el reportero 3XERELuc. El efecto de cada proteína individualmente expresada en la célula, es mostrado en la figura 13, DRAL incrementó la actividad del ER 4.7 veces con respecto a la basal, mientras que E3K la incrementó 4 veces; cuando ambas proteínas son expresadas en la célula, observamos un incremento de 7.5 veces equivalente a un valor aproximado al de las sumatorias del efecto individual ejercido por cada proteína.



| | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 3XERE-Luc | + | + | + | + | + | + | + | + |
| -Gal | + | + | + | + | + | + | + | + |
| hER (μg) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| DRAL (μg) | - | - | 0.5 | 0.5 | - | - | 0.5 | 0.5 |
| E3K (μg) | - | - | - | - | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

Figura 13. Efecto de DRAL y E3K sobre la actividad del ER . El efecto producido por las Proteínas DRAL y E3K cuando se coexpresan en las células fue determinado mediante ensayos de transfección transitoria

Capítulo V

5. DISCUSION

El ER , es un factor transcripcional capaz de regular el nivel de expresión de un diverso número de genes que responden a la hormona estrógeno de una manera precisa, selectiva de tejidos y controlada temporalmente. La activación transcripcional efectuada por el ER , puede ser aumentada o reprimida por medio

de la interacción con factores reguladores los cuales, pueden funcionar ya sea de una manera positiva (coactivadores), o negativa (corepresores). Estos correguladores se encuentran formando parte de grandes complejos que pueden ser reclutados por el ER cuando este se ha unido a su ligando permitiendo una regulación precisa de los efectos biológicos del receptor sobre la expresión de genes.

Hasta la fecha se han identificado un diverso número de proteínas capaces de interactuar con el ER tales como las de la familia p160 como son SRC-1, GRIP1 y ACTR; además de estas existen algunas otras que aumentan la actividad del ER de manera indirecta al unirse a estas proteínas (CBP/p300). Muchos de estos correguladores contienen una actividad intrínseca de acetilasas de histonas lo que permite la remodelación de la cromatina en los promotores de genes blanco. [Muller *et al.*, 2000].

El reclutamiento de coactivadores y corepresores se encuentra principalmente mediado por el dominio de función de activación AF-2 localizado en la región carboxilo terminal en el LBD. Las primeras proteínas identificadas capaces de interactuar con el ER, demostraron requerir del dominio AF-2 intacto para llevar a cabo esta interacción y así incrementar la actividad del ER en presencia de estrógeno.

Sin embargo, además de los correguladores que modifican la actividad del ER mediante su interacción con el dominio AF-2, se ha demostrado que la región AF-1 es capaz de reclutar algunas proteínas cuya función aun permanece desconocida; por tal motivo, nuestro laboratorio se centró en el interés de la identificación de estos correguladores así como la caracterización de su función al interactuar con la región AF-1 del ER.

Para identificar proteínas que interactúan con la región AF-1, y posteriormente determinar como estas modifican la actividad del ER mediante la unión a esta región, en el Laboratorio del Dr. Alfonso León Del Río, se realizó el sistema del doble híbrido en levadura. Un alto porcentaje de interacciones proteína – proteína son identificadas mediante este ensayo; sin embargo, pueden existir problemas de falsos positivos durante la prueba, por tal motivo se realizó un segundo ensayo a las

clonas que resultaron positivas en el doble híbrido para descartar falsos positivos y una vez realizado esto, seis proteínas fueron encontradas capaces de interactuar de manera específica con la región AF-1 del ER . Sin embargo el hecho de que el ensayo nos permita identificar a las proteínas que interactúan con la región AF-1 del ER , esto no nos proporciona información acerca de la función que estas proteínas se encuentran ejerciendo sobre este receptor. Por esta razón decidí utilizar una prueba funcional que me permitiera evaluar el papel de una de las proteínas identificadas mediante el sistema del doble híbrido en levadura, conocida como DRAL la cuál, ya ha sido previamente caracterizada como un coactivador del AR; sin embargo, el papel de DRAL sobre la función del ER se desconocía hasta la realización de este trabajo.

El ensayo de transfección transitoria, es una prueba a partir de la cuál podemos evaluar la actividad transcripcional de una proteína de manera indirecta al medir la actividad de un gen reportero cuya transcripción, dependa de la proteína a evaluar, por esta razón, consideré que este ensayo, me permitiría determinar la función que tiene DRAL sobre el ER .

Inicialmente, para probar la funcionalidad del sistema a utilizar se realizó el primer ensayo en el cuál, las células HepG2, fueron transfectadas con cantidades crecientes del ER , en base a los resultados obtenidos, inicialmente observamos que las células que fueron estimuladas con la hormona estradiol, mostraron un incremento en la actividad del ER de un 120% sobre la actividad observada en células no estimuladas con la hormona. Este resultado, nos indica que el sistema de transfección transitoria es adecuado para estudiar cambios en la actividad del ER así como también, nos corrobora el dato de que el ER es un activador de la transcripción dependiente de hormona al observar que la actividad transcripcional se ve incrementada cuando el ER es introducido a las células en concentraciones crecientes y las células son estimuladas con estradiol.

Como se mencionó anteriormente, existen proteínas que ya han sido caracterizadas como corre reguladores del ER a través de su unión con la región AF-2. Hasta el momento, la proteína SRC-1 ha demostrado comportarse como uno de los coactivadores más potentes del ER ; por tal motivo, se decidió corroborar el efecto

de este corregulador sobre la actividad del ER mediante nuestro sistema de transfección transitoria. Como podemos observar, cuando SRC-1 es cotransfectada junto con el ER , la actividad del receptor incrementa en una manera proporcional a la concentración de SRC-1 alcanzando un incremento de hasta un 300% con respecto a las células transfectadas únicamente con el ER lo cuál, concuerda con el dato previamente establecido acerca del efecto de SRC-1 sobre el ER y simultáneamente nos indica que nuestro modelo experimental utilizado, nos permite determinar el efecto de proteínas que interactúan con el ER , sobre la actividad del mismo.

La proteína DRAL, fue una de las proteínas identificadas mediante el ensayo de doble híbrido en levadura, capaz de reconocer de manera específica, la región AF-1 del ER . Esta proteína además de sus múltiples funciones en distintos tejidos, se ha caracterizado que funciona como corregulador de varios factores transcripcionales, por lo que consideramos la posibilidad de que DRAL, se encintrara regulando la actividad transcripcional del ER mediante su unión al dominio AF-1.

Por esta razón, para determinar si la asociación del dominio AF-1 con DRAL es capaz de modificar la actividad transcripcional del ER , y una vez demostrada la capacidad de nuestro sistema para determinar el efecto de proteínas correguladoras sobre la actividad del ER , se transfectaron concentraciones crecientes del vector que dirige la expresión de DRAL, junto con una concentración optima determinada en la curva de ER , del vector que expresa ER , en células HepG2, obteniendo como resultado que las células transfectadas con DRAL y estimuladas con estradiol, mostraron un incremento en la actividad transcripcional del ER conforme se aumentó la concentración de DRAL lo cuál, indica que DRAL es capaz de modificar la actividad transcripcional del ER de una manera positiva. En base a esto, podemos decir que DRAL es un coactivador del ER a través de su unión con el dominio AF-1.

Hasta la fecha se sabe, que las regiones AF-1 y AF2 del ER , funcionan de manera individual dependiendo del contexto celular y tisular; además de esto, también se conoce, que en algunos otros tejidos ambas funciones de activación se encuentran

actuando de manera sinérgica, incrementando la actividad transcripcional del ER . Por tal motivo, el hecho de que se hayan identificado proteínas capaces de reconocer la región AF-1 del ER , nos indica que estas proteínas podrían encontrarse mediando el sinergismo entre ambos dominios. El identificar a DRAL como un coactivador del ER , sugiere que esta proteína pudiera ser una de las proteínas que participa en la mediación de este sinergismo junto con la unión de otras proteínas correguladoras y así, producir un incremento en la actividad del ER .

La importancia de determinar la capacidad que tienen los coactivadores de aumentar la actividad transcripcional del ER es relevante ya que como sabemos, la mayoría de tumores de mama en mujeres posmenopáusicas son positivos para el ER , lo que significa que una sobre expresión de alguno de estos coactivadores, podría asociarse con el desarrollo del tumor o bien, ser utilizado como un marcador de daño tumoral. Por esta razón me interesó comparar el efecto ejercido por DRAL sobre la actividad del ER , contra el ejercido por uno de los coactivadores ya reportados para el ER , SRC-1.

Como podemos observar en la figura, DRAL es capaz de incrementar la actividad del ER 150% más que el coactivador SRC-1 lo cuál indica que cuando DRAL se une a la región AF-1 , el efecto coactivador ejercido sobre el ER es de la misma magnitud e inclusive mayor que el de uno de los coactivadores que había sido considerado ser de los más potentes para el ER . Como se mencionó anteriormente, la regulación de la transcripción, está dada no solo por una proteína de manera individual, sino que, es llevada a cabo por un conjunto de proteínas capaces de acomplejarse entre sí para ya sea estimular o reprimir la actividad del ER . Por tal motivo, decidí averiguar la posibilidad de que DRAL funcione formando a su vez un complejo con los coactivadores que son reclutados en la región AF-2 y de este modo incrementar aun más la actividad transcripcional del ER . En base a esto, decidí realizar un ensayo de transfección transitoria en el cual tanto el coactivador SRC-1 junto con DRAL fueran coexpresados en células HepG2 y de este modo determinar como afectan ambos coactivadores la actividad del ER . Los resultados obtenidos muestran que el incremento producido en la actividad transcripcional, no es un incremento significativo, por lo que probablemente DRAL no intervenga en la actividad ejercida por SRC-1 ni viceversa.

Una de las proteínas encontradas en el laboratorio capaz de interactuar con la región AF-1 del ER mediante el ensayo del doble híbrido, fue la proteína E3K la cuál, del mismo modo que DRAL ha mostrado comportarse como un coactivador del ER . Retomando lo anterior acerca de que los reguladores de los receptores hormonales trabajan formando parte de un complejo compuesto por varios polipéptidos que en conjunto son capaces de aumentar la actividad transcripcional de los receptores hormonales, lo siguiente que se investigó, fue el efecto producido cuando DRAL y la proteína E3K se expresan simultáneamente. Como podemos observar, una comparación inicial acerca del efecto individual de cada una de estas proteínas sobre la actividad del ER , nos muestra que DRAL y E3K tienen un efecto similar sobre la actividad transcripcional y una vez que ambas son cotransfectadas en las células, una sumatoria del efecto individual de cada una de ellas es observado. Lo que nos indica que no actúan de manera sinérgica y cada una de ellas ejerce su actividad sobre el ER de manera individual.

Estos resultados nos presentan una información inicial acerca del papel de DRAL en la actividad del ER lo que es el comienzo de la búsqueda de un mecanismo que nos permita en parte, proponer a DRAL como un factor celular que pueda ser utilizado como un marcador de riesgo para el diagnóstico de cáncer de mama estudiando así el mecanismo por el cuál, esta proteína lleva a cabo su actividad y como algún cambio en su expresión se pueda relacionar con el desarrollo de la neoplasia.

Capítulo VI

6. PERSPECTIVA.

El descubrimiento de proteínas capaces de interactuar con la región AF-1 del ER es un avance para el conocimiento del mecanismo de acción de este receptor hormonal, lo que lleva a la identificación de la función de cada uno de estos factores. DRAL, fue una de las proteínas identificada capaz de interactuar con este dominio; por tal motivo la identificación de la función que esta proteína ejerce al encontrarse interactuando con el ER fue de gran relevancia ya que se encontró que DRAL actúa como un coactivador del ER permitiendo así la entrada a una búsqueda de un nuevo mecanismo por el cuál el ER lleve a cabo su función. La identificación de DRAL como un coactivador del ER sienta las bases para un estudio a largo plazo de la búsqueda de utilizar a esta proteína como un marcador útil en el diagnóstico o bien, como un posible blanco terapéutico.

Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren que la caracterización de DRAL como un coactivador del ER es un dato de gran utilidad para entender las bases moleculares del cáncer de mama ya que probablemente este cofactor se encuentre involucrado en la aparición y crecimiento de tumores en glándula mamaria.

Capítulo VII

7. CONCLUSIONES

DRAL se encuentra regulando de manera positiva la actividad del ER .

La magnitud del efecto de esta proteína sobre la actividad del ER , es aún mayor que la del ya conocido coactivador SRC-1 lo que nos lleva a decir que DRAL ejerce un papel muy importante en la regulación del ER .

DRAL y E3K, ejercen un mecanismo diferente a través del cuál incrementan la actividad del ER .

La interacción entre DRAL con algunas otras proteínas, pueden estar formando un puente de anclaje entre las regiones AF-1 y AF-2, permitiendo así, llevar a cabo el sinergismo entre ambos dominios.

Capítulo VIII

8. BIBLIOGRAFIA

Ali. S, Metzger. D, Bornert. J-M, Chambon. P. *Modulation of Transcriptional Activation by Ligand Dependent Phosphorylation of the Human Oestrogen Receptor A/B Region*. The EMBO Journal. 1993. Vol 12. p 1153-1160.

Amaar. Y. G, Thompson. G. R, Linkhart. T. A, Chen. S. T, Baylink. D. J, Mohan. S. *Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 5 (IGFBP-5) Interacts with a Four and a Half LIM Protein 2 (FHL2)*. Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol 277. No. 14. p 12053-12060.

Aranda. A, Pascual. A. *Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression*. Physiological Reviews. 2001. Vol 81. No. 3.

Benecke. A, Chambon. P, Gronemeyer. H. *Synergy between Estrogen Receptor Activation Functions AF1 and AF2 Mediated by Transcription Intermediary Factor TIF2*. EMBO reports. 2000. Vol 1. No 2. p 151-157.

Berry. M, Metzger. D, Chambon. P. *Role of the Two Activating Domains of the Oestrogen Receptor in the Cell-type and Promoter-context Dependent Agonistic Activity of the Anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen*. The EMBO Journal. 1990. Vol 9. p 2811-2818.

Castles. C. G, Oesterreich. S, Hansen. R, Fuqua. S. A. *Auto-regulation of the Estrogen Receptor Promoter*. J Steroid Biochem Mol Biol. 1997. Vol 62. No. 2-3. p 155-63.

Chan. K.K, Tsui S. K, Lee. S. M, Luk. S.C, Liew. C. C, Fung. K. P, Waye. M. M, Lee. C. Y. *Molecular Cloning and Characterization of FHL2, a Novel LIM Domain Protein Preferentially Expressed in Human Heart*. Gene. 1998. Vol 210. No. 2. p 345-350.

Chen. D, Riedl. T, Washbrook. E, Pace. P. E, Coombes. R.C, Egly. J-M, Ali. S. *Activation of Estrogen Receptor α by S118 Phosphorylation Involves a Ligand – Dependent Interaction with TFIID and Participation of CDK7*. Molecular Cell. 2000. Vol 6. p 127-137.

Couse. J. F, Lindzey. J, Grandien. K, Gustafsson. J. A, Korach. K. S. *Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-type and ER α -knockout Mouse*. Endocrinology. 1997. Vol 138. p 4613-4621.

Deblois. G, Giguere. V. *Ligand – independent Coactivation of ER α AF-1 by Steroid Receptor RNA Activator (SRA) via MAPK Activation*. J. of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2003. Vol 85. p 123-131.

Delaunay. F, Pettersson. K, Tujague. M, Gustafsson. J-A. *Functional Differences between the Amino – Terminal Domains of Estrogen Receptors α and β* . Molecular Pharmacology. 2000. Vol 58. p 584-590.

- Emmerson. B. M. *Specificity of Gene Regulation*. Cell. 2002. Vol 109. p 267-270.
- Giamarchi. C, Chailleux. C, Calligé. M, Rochaix. P, Trouche. D, Richard-Foy. H. *Two Antiestrogens Affect Differently Chromatin Remodeling of Trefoil Factor 1 (pS2) Gene and the Fate of Estrogen Receptor in MCF7 Cells*. Biochemica et Biophysica Acta. 2002. p 12-20.
- Girault. I, Bieche. I, Lidereau. R. *Role of Estrogen Receptor a Transcriptional Coregulators in Tamoxifen Resistance in Breast Cancer*. The European Menopause Journal. 2006. Vol 54. 342-351.
- Gustafsson. J-A., Warner. M. *Estrogen Receptor β in the Breast: Role in Estrogen Responsiveness and Development of Breast Cancer*. J. of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2000. Vol 74. p 245-248.
- Hall. J.M, Couse. J. F, Korach. K. s. *The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling*. Journal of Biological Chemistry. 2001. Vol 276. No. 40. p 36869-36872.
- Ishibashi. O, Yamagishi. T, Hanada. K, Kawashima. H. *Tamoxifen Agonism and Estrogen Antagonismo f c-fos Gene Promoter Activity through Non – Consensus – Responsive Elements in MC3T3-E1 Osteoblasts*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001. Vol 289. p 705-711.
- Johannessen. M, Muller. S, Hansen. T, Moens. U, Ghelue. M. V. *The Multifunctional Roles of the Four – and – a – Half – LIM – Only Protein FHL2*. Cell. Mol. Life. Sci. 2006. Vol 63. p 268-264.
- Katzenellengogen. B. S. *Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways*. Biology of Reproduction. 1996. Vol 54. p 287-293.
- Klinge. C. M. *Estrogen Receptor Interaction with Estrogen Response Elements*. Nucleic Acid Research. 2001. Vol 29. No 14. p 2905-2919.
- Klinge. C. M, Jernigan. S. C, Risinger. K. E. *The Agonist Activity of Tamoxifen Is Inhibited by the Short Heterodimer Partner Orphan Nuclear Receptor in Human Endometrial Cancer Cells*. Endocrinology. 2002. Vol 143. No 3. p 853-867.
- Kumar. R, Wang. R-A, Barner. C. J. *Coregulators and Chromatin Remodeling in Transcriptional Control*. Molecular Carcinogenesis. 2004. Vol 41. p 221-230.
- Lee. T. I, Young. R. A. *Transcription of Eukaryotic. Protein – Coding Genes*. Annu. Rev. Genet. 2000. Vol 34. p 77-137.
- Liu. H, Lee. E-S, De Los Reyes. A, Zapf. J. W, Jordan. V. C. *Silencing and Reactivation of the Selective Estrogen Receptor Modulator – Estrogen Receptor a Complex*. Cncer Research. 2001. Vol 61. p 3632-3639.
- Mangelsdorf. D. J, Thummel. C, Beato. M, Herrlich. P, Schutz. G, Umesono. K, Blumberg. B, Kastner. P, Mark. M, Chambon. P, Evans. R. M. *The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decadde*. Cell. 1995. Vol 83. p 835-839.

Marcantonio. D, Chalifour. L. E, Alaoui-Jamali. M. A, Alpert. L, Huynh. H. T. Cloning and Characterization of a Novel Gene That is Regulated by Estrogen and is Associated with Mammary Gland Carcinogenesis. *Endocrinology*. 2001. Vol 142. No. 6.

Maston. G.A, Evans. S.K, Green. M.R. *Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genomic*. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2006. Vol 7. p 29-59.

Mcdonell. D. P, Norris. J. D. *Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor*. *Science*. 2002. Vol 296.

Mckenna. N. J, Lanz. R. B, O'Malley. B. W. *Nuclear Receptor Coregulators: Celular and Molecular Biology*. *Endocrine Reviews*. 1999. Vol 20. No 3. p 321-344.

Mckenna. N. J, O'Malley. B. W. *Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators*. *Cell*. 2002. Vol 108. p 465-474.

Merot. Y, Metivier. R, Penot. G, Manu. D, Saligaut. C, Gannon. F, Pakdel. F, Kah. O, Flouriot. G. R. *The Relative Contribution Exerted by AF-1 and AF-2 Transactivation Functions in Estrogen Receptor Alpha Transcriptional Activity Depends Upon the Differentiation Stage of the Cell*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol 279. No. 25. p 26184-26191.

Morlon. A, Sassone-Corsi. P. *The LIM-Only Protein FHL2 is a Serum-Inducible Transcriptional Coactivator of AP-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. Vol 100. No. 7. p 3977-3982.

Muller. J. M, Isele. U, Metzger. E, Rempel. A, Moser. M, Pscherer. A, Breyer. T, Holubarsch. C, Buettner. R, Schule. R. *FHL2, a Novel Tissue-Specific Coactivator of the Androgen Receptor*. *The EMBO Journal*. 2000. Vol.19. No. 3. p 359-369.

Naar. A. M, Lemon. B. D, Tjian. R. *Transcriptional Coactivator Complexes*. *Annu. Rev. Biochem*. 2001. Vol 70. p 475-501.

Nagy. L, Schwabe. J. W. R. *Mechanism of the Nuclear Receptor Molecular Switch*. *TRENDS in Biochemical Science*. 2004. Vol 29. No. 6.

Nettles. K. W, Greene. G. L. *Ligand Control of Coregulator Recruitment to Nuclear Receptors*. *Annu. Rev. Physiol*. 2005. Vol 67. p 309-333.

Pelletier. G, El-Alfy. M. *Immunocytochemical Localization of Estrogen Receptors Alpha and Beta in the Human Reproductive Organs*. *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000. Vol 85. No. 12. p 4835-4840.

Renaud. J. P, Rochel. N, Ruff. M, Vivat. V, Chambon. P, Gronemeyer. H. *Crystal Structure of the RAR- Ligand – Binding Domain Bound to All-Trans Retinoid Acid*. *Nature*. 1995. Vol 378. p 681-689.

Renaud. J. P, Moras. D. *Structural Studies on Nuclear Receptor*. *Cell. Mol. Life. Sci*. 2000. Vol 57. p 1748-1769

Russo. I. H, Russo. J. *Role of Hormones in Mammary Cancer Initiation and Progression*. J. of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 1998. Vol 3. No 1.

Samson. T, Smyth. N, Janetzky. S, Wendler. O, Muller. J. M, Schule. R, von der Mark. H, von der Mark. K, Wixler. V. *The LIM-Only Proteins FHL2 and FHL3 Interact with Alpha- and Beta-Subunits of the Muscle Alpha7beta1 Integrin Receptor*. Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol 279. No. 27. p 28641-28652.

Scholl. F. A, McLoughlin. P, Ehler. E, de Giovanni. C, Schafer. B. W. *DRAL is a p53-Responsive Gene Whose Four and a Half LIM Domain Protein Product Induces Apoptosis*. Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol 151. No. 3. p 495-506.

Shao. D, Lazar. M. A. *Modulating Nuclear Receptor Function: May the Phos Be with You*. Journal of Clinical Investigation. 1999. Vol 103. No. 12. p 1617-1618.

Van de Vijver. M. J, Nusse. R. *The Molecular Biology of Breast Cancer*. Biochim Biophys Acta. 1991. Vol 107. No. 2. p 33-50.

Villard. J. *Transcription Regulation and Human Diseases*. Swiss. Med. Wkly. 2004. vol 134. p 571-579.

Warnmark. A, Treuter. E, Wrigth. A. P. H, Gustafsson. J-A. *Activation Function 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation*. Molecular Endocrinology. 2003. Vol 17. No 10. p 1901-1909.

Watanabe. T, Inoue. S, Ogawa. S, Ishii. Y, Hiroi. H, Ikeda. K, Orimo. A, Muramatsu. M. *Agonistic Effect of Tamoxifen is Dependent on Cell Type, ERE – Promoter Context, and Estrogen Receptor Subtype: Functional Difference between Estrogen Receptors α and β* . Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997. Vol 236. p 140-145.

Webb. P, Nguyen. P, Shinsako. J, Anderson. C, Feng. W, Nguyen. M. P, Chen. D, Huang. S. M, Subramanian. S, McKinerney. E, Katzenellenbogen. B. S, Stallcup. M. R, Kushner. P.J. *Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins*. Molecular Endocrinology. 1998. Vol 12. No. 10. p 1605-1618.

Webb. P, Nguyen. P, Valentine. C, Lopez. G. N, Kwok. G. R, McKinerney. E, Katzenellenbogen. B. S, Enmark. E, Gustafsson. J-A, Nilsson. S, Kushner. P. J. *The Estrogen Receptor Enhances AP-1 Activity by Two Distinct Mechanisms with Different Requirements for Receptor Transactivation Functions*. Molecular Endocrinology. 1999. Vol 13. No. 10.

Wray. G. A, Hahn. M. W, Abouheif. E, Balhoff. J. P, Pizer. M, Rockman. M. V, Romano. L. A. *The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes*. Molecular Biology and Evolution. 2003. Vol 20. No. 9. p 1377-1419.