



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE E3KARP COMO CORREGULADOR
DE RECEPTORES NUCLEARES NO ESTEROIDES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

MAGDALENA RIOS ROMERO



DIRECTOR DE TESIS: Dra. ELIZABETH
LANGLEY McCARRON

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mis padres. Por darme su amor y paciencia incondicional y por mostrarme sin miedos que el camino del conocimiento es el más fascinante que se pueda transitar, aunque también sea el más complicado. Por enseñarme que nunca hay que rendirse y que con esfuerzo todo es posible. Gracias por ser mi inspiración.

A mi hermanito Camilo, un pequeño ser humano que me ha dado mil lecciones increíbles y que ha llenado de luz nuestras vidas. Por interrumpirme entre juegos y risas mientras escribía esta tesis.

A mi familia, que siempre me ha apoyado y me ha cuidado en esta senda que decidí tomar. Gracias por tenerme en su corazón cada día.

A mi amado Iván, que me ha devuelto la felicidad. Gracias por ser el amor de mi vida.

A los hermanos que el Arquitecto me ha regalado y que sin importar las circunstancias o la opinión de las personas, serán siempre una gran bendición para mí. Gracias Ama, Daniel y Lalo por ser los compañeros que siempre deseé tener.

A mi tutora Elizabeth Langley, que me abrió las puertas de su laboratorio y me entrenó con paciencia, pero sobre todo, que me contagió una gran pasión por este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Yamilet, Noemí, Miguel y, más recientemente, Alejandra. Gracias por su infinita paciencia y por escuchar mis locuras todo el día.

Para Carlos Hesselbart (Q.E.P.D), alias “Carlitos”. Siempre te recordaremos con mucho amor y con una gran sonrisa en la cara... ¡Que siga la fiesta!

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias, por ser parte crucial de mi formación académica y personal. Por ser mi hogar.

Al INCAN, en cuyas instalaciones se llevó a cabo este trabajo, por ser escenario de distintos eventos que han marcado mi vida de manera profunda.

INDICE

Resumen.....	1
1.Introducción.....	3
1.1 Receptores nucleares.....	3
1.2Receptores nucleares no esteroides.....	4
1.2.1 Ligandos de RAR y RXR.....	6
1.2.1.2 Ácido retinoico todo- <i>trans</i> y 9- <i>cis</i> ácido retinoico.....	6
1.2.1.3 Importancia biológica y farmacológica de los retinoides.....	8
a) Desarrollo embrionario.....	8
b) Vista.....	8
c) Piel.....	9
d) Papel en enfermedades.....	9
1.3 Estructura de RAR y RXR.....	10
1.3.1 Dominio amino-terminal.....	11
1.3.2 Dominio de unión a DNA.....	12
1.3.3 Región de bisagra.....	13
1.3.4 Dominio de unión a ligando.....	13
1.3.5 Dominio carboxilo-terminal.....	15
1.4 Mecanismos de acción de los receptores nucleares no esteroides.....	15
1.4.1 Genes blanco.....	18
1.5 Correguladores.....	20
1.5.1 Coactivadores.....	20
a)p160/SRC.....	21
b)p300/CBP.....	22
c)PGC-1.....	23

d)NSD-1.....	24
e)TRAP220.....	24
f)CARM-1.....	24
1.5.2 Correpresores.....	25
a) N-CoR y SMRT.....	25
1.5.2.1 Correpresores que se unen al dominio amino-terminal de RAR.....	26
a)Vinexina β	26
b)Acinus-S.....	26
2. Antecedentes.....	27
3. Objetivo general.....	29
3.1 Objetivos específicos.....	29
4. Hipótesis.....	30
5. Metodología.....	30
5.1 Líneas celulares y cultivo celular.....	30
5.2 Plásmidos y transfecciones transitorias.....	30
5.2.1 Efecto de E3KARP sobre la expresión de luciferasa regulada por RAR y RXR en un promotor sintético tipo DR-5 en dos líneas celulares.....	33
5.2.2 Efecto de SRC-1 y PINX-1 sobre la expresión de luciferasa en un promotor sintético tipo DR-5.....	33
5.2.3 Efecto de RAR α sobre la expresión de luciferasa en el promotor de <i>HAL</i> con elementos tipo DR-1.....	34
5.2.4 Efecto de E3KARP sobre la expresión de luciferasa en el promotor de <i>HAL</i> con elementos tipo DR-1.....	34
5.2.5 Efecto de SRC-1 y PINX-1 sobre la expresión de luciferasa en el promotor de <i>HAL</i> con elementos tipo DR-1.....	34
5.3 Ensayos de luciferasa y β galactosidasa.....	35
5.3.1 Ensayos de actividad de luciferasa.....	36

5.3.2 Ensayo de actividad de β -galactosidasa.....	36
5.4 Co-inmunoprecipitación.....	37
5.5 Western blot.....	39
5.6 Reutilización de la membrana.....	40
6. Resultados.....	41
6.1 Sobre-expresión de E3KARP: Western blot.....	41
6.2 Interacción <i>in vivo</i> : Ensayos de Co-inmunoprecipitación.....	41
6.3 Influencia de E3KARP sobre la expresión de un gen reportero sintético de luciferasa regulado por los receptores de ácido retinoico.....	43
6.3.1 Determinación de la concentración de ATRA a utilizar.....	43
6.3.2 Efecto de E3KARP sobre la expresión de luciferasa regulada por RAR α y RXR α en un promotor sintético tipo DR-5.....	45
6.3.3 Efecto de SRC-1 y PINX-1 sobre la expresión de luciferasa regulada por RAR α y RXR α en un promotor sintético tipo DR-5.....	47
6.4 Influencia de RAR α y E3KARP sobre la expresión de un reportero de luciferasa regulado por el promotor del gen de la histidasa hepática (<i>HAL</i>).....	48
6.4.1 Efecto de E3KARP sobre la expresión de luciferasa en el promotor de <i>HAL</i> con elementos DR-1.....	50
6.4.2 Efecto de SRC-1 y PINX-1 sobre la expresión de luciferasa en el promotor de <i>HAL</i> con elementos tipo DR-1.....	53
7. Discusión.....	54
8. Conclusiones.....	61
9. Referencias.....	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La súper-familia de receptores nucleares.....	3
Figura 2. Precursor metabólico y ligandos naturales de los receptores no-esteroides RAR y RXR.....	5
Figura 3. Metabolismo de los retinoides en las células.....	7
Figura 4. Estructura general de los receptores nucleares.....	11
Figura 5 . Estructura del dominio de unión a ligando (LBD) en respuesta a la unión de un ligando agonista.....	14
Figura 6. Mecanismo general de acción de RAR y RXR.....	17
Figura 7. Estructura del promotor del gen <i>HAL</i>	19
Figura 8. Estructura de un miembro de la familia p160/SRC (SRC-1).....	22
Figura 9. Estructura de la familia de correpresores N-CoR SMRT.....	26
Figura 10. Estructura de la familia de proteínas NHERF.....	28
Figura 11. Sobre-expresión de E3KARP en células Hek 293 T.....	41
Figura 12. E3KARP interactúa con RAR α y RXR α <i>in vivo</i> en células Hek 293 T.....	42
Figura 13. Curva de concentración de ATRA en células CV-1.....	44
Figura 14. E3KARP incrementa la transcripción de luciferasa (promotor DR-5) cuando se transfecta a concentraciones crecientes en células CV-1.....	45
Figura 15. E3KARP aumenta la transcripción mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor sintético tipo DR-5 en células HeLa.....	46
Figura 16 . Efecto de E3KARP, SRC-1 y PINX-1 en la actividad transcripcional mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor tipo DR-5, en la línea celular HeLa.....	48

Figura 17. RAR α incrementa la expresión de luciferasa en el contexto del promotor natural tipo DR-1 en células CV-1.....	49
Figura 18. La sobre-expresión de E3KARP promueve la disminución de la transcripción mediada por RAR y RXR en el contexto del promotor natural (<i>HAL</i>) tipo DR-1 en la línea celular CV-1.....	51
Figura 19. E3KARP activa la expresión de luciferasa mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor natural tipo DR-1 (<i>HAL</i>) en la línea celular HeLa.....	52
Figura 20 . Efecto de E3KARP, SRC-1 y PINX-1 en la actividad transcripcional mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor natural tipo DR-1, en células HeLa.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de elementos de respuesta para los receptores nucleares no esteroides.....	18
Tabla 2. Diseño experimental de las transfecciones transitorias a las células CV-1 y HeLa.....	32
Tabla 3. Diseño experimental de la co-inmunoprecipitación de RAR α y RXR α	37

ABREVIATURAS

ADH	Alcohol-deshidrogenasa
AF-1.....	Dominio de transactivación 1
AF-2.....	Dominio de transactivación 2
AP-1	Proteína activadora 1
APL	Leucemia promielocítica aguda
AR	Receptor de andrógenos
β-AR	Receptor β-adrenérgico
ATRA	Ácido retinoico <i>todo-trans</i>
CARM-1	Metil transferasa de argininas asociada a coactivadores 1
CBP	Proteína de unión a CREB
CFTR	Regulador transmembranal de fibrosis quística
ChIP...	Co-inmunoprecipitación de cromatina
CRBP-I	Proteína de unión a retinol celular tipo I
CRBP-II	Proteína de unión a retinol celular tipo II
CREB	Elemento de respuesta de unión a c-AMP
DBD	Dominio de unión a DNA
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DR-1	Repetición directa con 1 nucleótido espaciador
DR-5	Repetición directa con 5 nucleótidos espaciadores
E3KARP	Proteína reguladora de la cinasa A de NHE3
ER	Receptor de estrógenos
GR	Receptor de glucocorticoides
HAL	Histidasa hepática
HAT	Acetiltransferasa de histonas

HDAC	Desacetilasa de histonas
HNF-1	Factor hepático nuclear 1
HOX	Homeoproteína
LBD.....	Dominio de unión a ligando
LXXLL	Secuencia de interacción de coactivadores con NR
MAPK.....	Proteína cinasa activada por mitógenos
MR	Receptor de mineralocorticoides
N-CoR	Correpresor de receptores nucleares
NHE3	Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ 3
NHERF	Factor regulador del intercambiador de Sodio/Hidrógeno NHE
NGFI.....	Factor- inducido de crecimiento nervioso
NLS	Señal de localización nuclear
NR	Receptor nuclear
NSD-1	Proteína de unión a receptores nucleares con dominio SET
P2Y1	Receptor purinérgico
PCAF	Factor asociado a p300/CBP
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDZ	Dominio de interacción proteína-proteína
PGC-1	Proteína coactivadora de receptores activados por proliferadores peroxisomales 1
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PINX-1	Proteína 1 de interacción con PIN2
PLC- β3	Fosfolipasa C-β3
PML	Proteína de leucemia promielocítica
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PR	Receptor de progesterona
RA	Ácido retinoico

RAR	Receptor de ácido retinoico
RARE	Elemento de respuesta a ácido retinoico
RID	Dominio de interacción con receptores nucleares
RBP	Proteína de unión a retinol
RNA	Ácido ribonucleico
RPE65	Isomerasa retinoide 65 del epitelio del pigmento retinoide
qRT-PCR inversa	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa
RXR	Receptor X retinoico
SH3	Dominio de homología 3 a Src
SF-1	Factor estereidogénico 1
SMRT	Silenciador mediador de los receptores hormonales retinoico y tiroideo
Sp-1	Proteína de especificidad 1
SRC-1	Coactivador de receptores nucleares esteroides 1
SRY	Factor de determinación de testículo ligado al cromosoma Y
STAT6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
STRA6	Estimulado por ácido retinoico 6
TFIIH	Factor de transcripción II H
TR	Receptor de hormona tiroidea
TRAP220	Proteína asociada al receptor tiroideo 220
URL	Unidad relativa de luz
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D

RESUMEN

Los miembros de la súper-familia de receptores nucleares (NR) son factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco y llevan a cabo su función a través de su interacción con un ligando específico. Se divide en tres grupos: los NR esteroides, los NR no-esteroides y los receptores huérfanos. Dentro de la categoría de NR no-esteroides, se encuentran el receptor de ácido retinoico (RAR) y el receptor X retinoico (RXR), factores involucrados en la regulación de la proliferación, diferenciación y metabolismo celular.

La modulación de la expresión génica mediada por RAR y RXR requiere del reclutamiento de proteínas accesorias llamadas correguladores, que son capaces de incrementar (coactivadores) o disminuir (correpresores) la transcripción de dichos genes.

En estudios previos, E3KARP, una proteína de andamiaje con dominios PDZ que se une al intercambiador iónico NHE3, fue caracterizada como un coactivador general de receptores nucleares esteroides en células de mamífero; sin embargo, no se conoce nada acerca de los efectos de esta proteína sobre otros miembros de la súper-familia, motivo de estudio de este proyecto.

Se determinó que E3KARP interactúa in vivo con RAR y RXR en células de mamífero en presencia y ausencia de ATRA. E3KARP aumenta la expresión de luciferasa mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor sintético del tipo DR-5, mientras que disminuye la actividad transcripcional de dichos receptores en el contexto de un promotor natural del tipo DR-1, sugiriendo que es un corregulador modulado por el contexto del promotor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Receptores Nucleares

Los miembros de la súper-familia de receptores nucleares (NR) son factores de transcripción que llevan a cabo su función a través de su interacción con un ligando específico. Se divide en tres grupos (Figura 1): el grupo I incluye los receptores a hormonas esteroides dentro de los cuales se encuentran los receptores de estrógenos (ER α y β), el receptor de progesterona (PR), el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor de mineralocorticoides (MR) y el receptor de andrógenos (AR). En el grupo II se encuentran los receptores nucleares no-esteroides, como el receptor de ácido retinoico (RAR $\alpha/\beta/\gamma$ y RXR $\alpha/\beta/\gamma$), el receptor de vitamina D (VDR) y el receptor de hormona tiroidea (TR α/β). El grupo III incluye a los receptores llamados huérfanos, debido a que no se conocen sus ligandos, como el factor 1 esteroideogénico (SF-1) y el receptor del factor- inducido de crecimiento nervioso (NGFI) (Germain *et al.*, 2003).

	Receptores nucleares esteroides	Receptores nucleares no-esteroides	Receptores nucleares huérfanos
Ligandos	Hormonas lipídicas esteroides	Hormonas lipídicas no-esteroides	Desconocidos
	ER α,β PR AR GR MR	RXR α,β,γ PPAR α,β,γ LXR α,β FXR PXR/SXR CAR RAR α,β,γ TR α,β VDR EcR	SF-1 LRH-1 DAX-1 SHP TLX PNR NGFI-B α,β,γ ROR α,β,γ RVR α,β,γ GCNF TR 2,4 HNF-4 COUP-TF α,β,γ

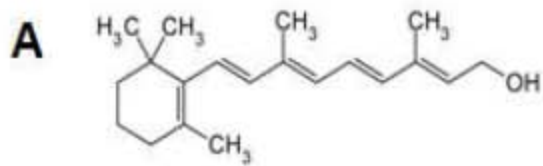
Figura 1. La superfamilia de receptores nucleares. Se muestran algunos miembros representativos de cada clase de receptores y se mencionan los ligandos que se unen a ellos.

1.2. Receptores Nucleares No-Esteroides.

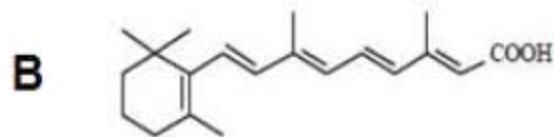
Los receptores nucleares no-esteroides o receptores clase II son una familia de factores de transcripción activados por ligandos hormonales derivados de moléculas orgánicas, como vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos (Altucci *et al.*, 2007).

Dentro de la clase de receptores nucleares no-esteroides, se encuentran el Receptor de Ácido Retinoico (RAR) y el Receptor X Retinoico (RXR). Se han descrito tres tipos de receptores retinoicos, llamados RAR α , RAR β , y RAR γ , y tres tipos de receptores X retinoicos, RXR α , RXR β y RXR γ , que son codificados por genes separados (Okuno *et al.*, 2004). RAR y RXR son reguladores maestros de una variedad de procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario y la homeostasis de órganos. A nivel celular, los receptores ejercen su función a través de la interacción con múltiples proteínas moduladoras de la transcripción, como el factor de transcripción II H (TFIIH) y vías de señalización como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), lo cual resulta en la regulación transcripcional de genes que controlan la proliferación, diferenciación, sobrevivencia y muerte celular (Bastien *et al.*, 2000; Bruck *et al.*, 2009).

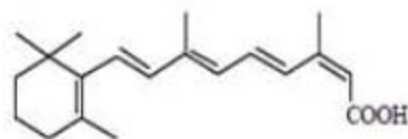
La mayoría de los receptores nucleares no-esteroides, incluyendo RAR, se encuentran en el núcleo de manera constitutiva y se asocian con RXR. RAR y RXR se unen a sus elementos de respuesta sobre el DNA y actúan como activadores o represores de la transcripción de genes blanco dependiendo de la unión del ligando (Wei, 2003).



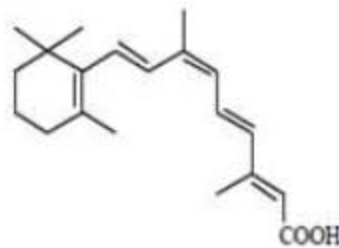
Retinol (Vitamina A).



Ácido retinoico *todo-trans* (ATRA).



13-*cis* Ácido retinoico (13-*cis*-RA).



9-*cis* Ácido retinoico (9-*cis*-RA).

Figura 2 . Precursor metabólico y ligandos naturales de los receptores no-esteroides RAR y RXR.
 (A) Estructura química del retinol, precursor metabólico del ácido retinoico. (B) Estructura química de los derivados del retinol. Modificado de Marill et al., 2003

1.2.1 Ligandos de RAR y RXR

1.2.1.2 Ácido retinoico todo-*trans* y 9-*cis* ácido retinoico.

Para que los receptores RAR y RXR realicen sus funciones de regulación transcripcional, deben unirse a ligandos agonistas. El ácido retinoico todo-*trans* (ATRA) es el ligando agonista natural de RAR, mientras que el isómero 9-*cis* ácido retinoico (9-*cis* RA) es el ligando de RXR. ATRA y 9-*cis* RA son parte de un grupo de moléculas denominadas retinoides (Villaroya, *et al.*, 1999) (figura 2).

Los retinoides son metabolitos derivados del retinol (o vitamina A), que tienen un papel importante en procesos fisiológicos como la diferenciación, proliferación y reproducción, entre otros (Marill, 2003). El retinol se ingiere como parte de la dieta y después de ser absorbido por el intestino, circula por el torrente sanguíneo unido a la proteína de unión a retinol (RBP) (Noy, 2000). La entrada del retinol a las células es mediada por una proteína membranal llamada STRA6 (estimulada por ácido retinoico 6) y después se une a alguna de las dos isoformas de la proteína celular de unión a retinol (CRBP-I y CRBP-II) (Kawaguchi, 2011). El retinol se convierte en retinil-aldehído y después a ATRA por medio de dos pasos de oxidación. Las alcohol-deshidrogenasas (ADH) y las deshidrogenasas de cadena corta (SHR) catalizan la primera reacción de oxidación, en la que el retinol se convierte en retinaldehído todo-*trans*. El paso siguiente es catalizado por las retinaldehído deshidrogenasas, que como producto de reacción generan ATRA (Perlmann, 2002). Miembros de la súper-familia citocromo P 450 (como Cyp26) median la hidroxilación de ATRA para producir metabolitos como el 4-oxo-ácido retinoico o el 4-hidroxi-ácido retinoico, mientras que algunas isomerasas convierten al ATRA en 9-*cis* RA o 13-*cis* ácido retinoico (13-*cis* RA) (Noy, 2000; Marill, 2003) (figura 3). Las enzimas necesarias para llevar a cabo estas conversiones (deshidrogenasas, Cyp26, entre otras), se expresan principalmente en hepatocitos, por lo que se cree que la producción *in vivo* de estos

metabolitos se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque también se ha observado que ocurre en adipocitos (Lansink, *et al.*, 1997; Villarroya *et al.*, 1999). Se ha demostrado, además, que las células HepG2 y COS-1 pueden realizar la isomerización de ATRA a 9-*cis* RA, al menos de manera parcial (Urbach y Rando, 1994)

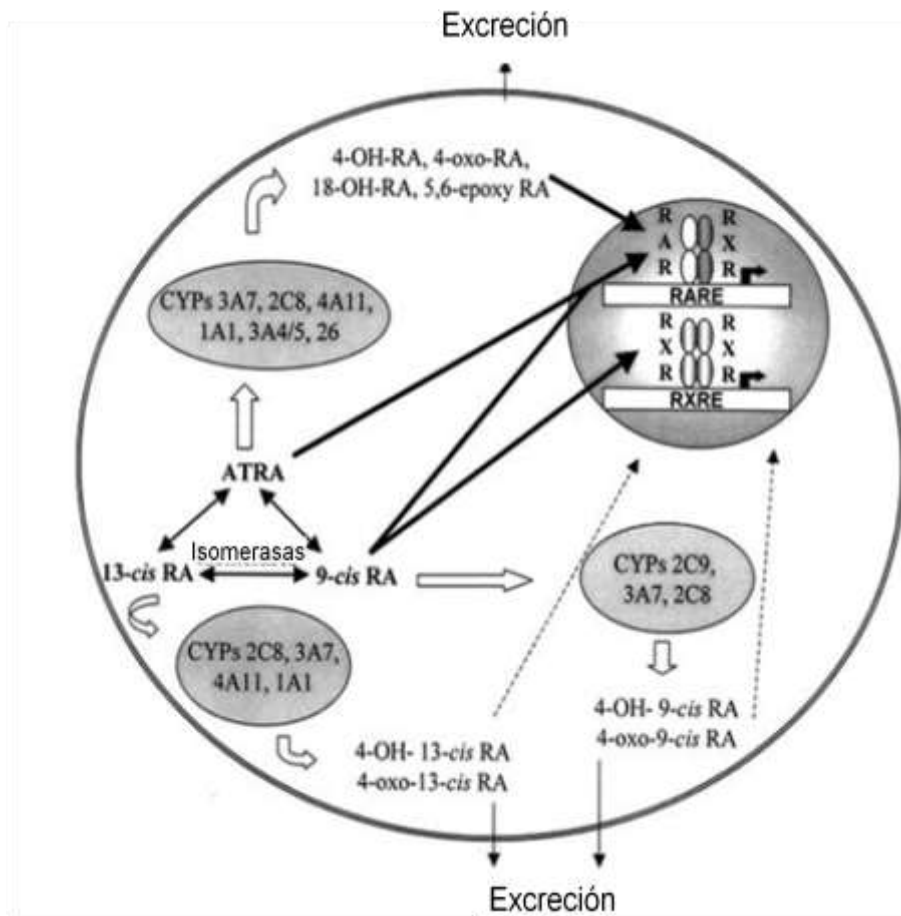


Figura 3. Metabolismo de los retinoides en las células. Modificado de Marill, 2003.

1.2.1.3 Importancia biológica y farmacológica de los retinoides.

Los retinoides participan en múltiples procesos en el desarrollo embrionario y en la fisiología de órganos como el ojo, la piel y médula ósea, entre otros. En la siguiente sección se describen algunas de las funciones de los retinoides en el organismo, así como su uso en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

a) Desarrollo embrionario

Los retinoides funcionan como factores diferenciadores y morfógenos durante el desarrollo embrionario. Entre sus funciones se encuentran la regulación del desarrollo del eje antero-posterior por medio de la modulación de la expresión de los genes HOX, el control del crecimiento y patrón del romboencéfalo y médula espinal y la generación de neuronas motoras que inervan extremidades. El ácido retinoico también controla la morfogénesis y diferenciación del corazón y está involucrado en el desarrollo de órganos como el pulmón, los riñones y el páncreas (Niederreither y Dollé, 2008).

b) Vista

Los retinoides juegan un papel muy importante en el proceso de captación de luz en el ojo de los vertebrados. Como ya se ha mencionado con anterioridad, la vitamina A es el precursor metabólico de los retinoides. La vitamina A se ingiere en los alimentos y después se metaboliza hasta obtener distintas moléculas, como el retinol. Este metabolito viaja por el torrente sanguíneo unido a la proteína RBP y es liberada en las células. La captación de retinol al interior de las células es mediada por STRA6 e involucra la esterificación del retinol, para formar retinil éster. Estas moléculas son luego oxidadas a cromóforo-22, en un mecanismo que involucra a la isomerasa retinoide 65 del epitelio del pigmento retinoide (RPE65) (von Lintig, *et al.*, 2010).

c) Piel

Los retinoides funcionan como factores estimuladores de la proliferación de queratinocitos en la epidermis, generando un mayor grosor de esta capa de la piel. Además, los retinoides promueven la diferenciación de estas células al inducir la expresión de queratinas en estas células (Torma, 2011).

d) Papel en enfermedades

Los retinoides se utilizan para tratar una variedad de enfermedades dermatológicas y de la vista. Se propone su uso como tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, por ser un potente factor de diferenciación celular y por sus propiedades anti-oxidantes (Lee, *et al.*, 2009). Se ha propuesto que los retinoides que son poderosos agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos en distintos tipos de cáncer por sus efectos sobre la diferenciación, anti-proliferativos, pro-apoptóticos y anti-oxidantes. La alteración en la expresión de los RAR y RXR está asociada a la transformación maligna en tejidos primarios y líneas celulares. La adición de retinoides inhibe la carcinogénesis en modelos animales de tumores de la piel, cavidad bucal, pulmón, vejiga, ovario, mama y próstata. En humanos, el tratamiento con retinoides induce la diferenciación de células mieloides y previene el cáncer de pulmón, hígado y mama (Bushue y Wan, 2010).

El uso clínico más eficaz de los retinoides en enfermedades, es en el tratamiento de una forma relativamente rara de leucemia, denominada leucemia promielocítica aguda (APL), que se da en un 5-15% de todos los pacientes de leucemia. Las células malignas presentan un arresto en el estado promielocítico, lo cual resulta en una acumulación de células promielocíticas malignas en la médula ósea (Okuno, *et al.*, 2004).

Las células promielocíticas malignas contienen una translocación recíproca característica (t(15:17) (q22;q11-21)), cuyo punto de ruptura ocurre en el gen de $RAR\alpha$. La translocación genera una proteína quimérica entre $RAR\alpha$ y la proteína de leucemia promielocítica (PML). Ya que la translocación es recíproca, se generan dos productos génicos diferentes: $RAR\alpha$ -PML y PML- $RAR\alpha$. Se cree que PML- $RAR\alpha$ puede funcionar como un receptor dominante negativo, interfiriendo con la señalización normal del ácido retinoico, RAR, RXR, PML y sus combinaciones, y por lo tanto reduce la sensibilidad de las células APL al ATRA (Kastner, *et al.*, 1992).

El uso de ATRA en los pacientes con APL ha mejorado significativamente el pronóstico clínico de esta enfermedad, produciendo a una remisión completa del tumor en casi el 90% de los pacientes. Esto resulta en una supervivencia de los pacientes del 75%, a largo plazo. El tratamiento con ATRA en APL induce una diferenciación de las células promielocíticas a neutrófilos maduros y normales (Huang, 1988).

1.3 Estructura de RAR y RXR

RAR y RXR presentan una estructura general (Figura 4) que comprende cinco regiones modulares: La región A/B o dominio amino-terminal.

La región C o dominio de unión al DNA.

La región D o de bisagra.

La región E o dominio de unión a ligando.

La región F o dominio carboxilo-terminal.

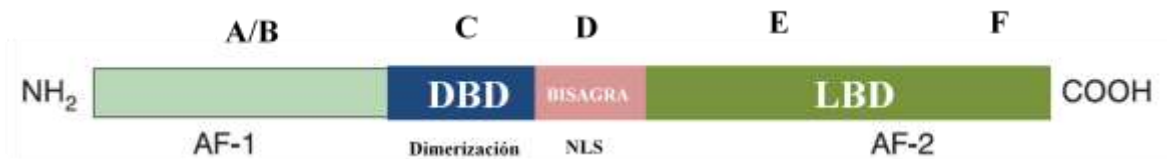


Figura 4. Estructura general de los receptores nucleares. Su estructura presenta tres dominios y una región que funciona como bisagra entre el DBD y el LBD. Además, presenta regiones de dimerización, señales de localización nuclear (NLS) y de activación.

1.3.1 Dominio amino-terminal

Este dominio se caracteriza por ser el más variable en secuencia y longitud entre los miembros de la súper-familia de NRs y por su flexibilidad desde el punto de vista estructural (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Aranda y Pascual, 2001; McEwan y Nardulli, 2009). Al parecer, esta plasticidad es funcionalmente importante, ya que se ha relacionado con interacciones proteína-proteína y modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones y sumoilaciones en residuos clave que afectan la actividad transcripcional de los receptores (McEwan y Nardulli, 2009).

Los receptores RAR y RXR poseen un dominio de transactivación independiente de ligando (AF-1) en la región amino-terminal. Se ha demostrado que el dominio AF-1 es blanco de fosforilaciones por p38 MAPK y la cinasa activada por ciclinas 7 (cdk7) en ciertos residuos; p38 fosforila la Serina 77 (S77) en RAR γ y cdk7 fosforila a S77, S70 y S79 en RAR α , RAR β y RAR γ , respectivamente. Estas modificaciones incrementan la actividad transcripcional de RAR (Bour *et al.*, 2005; Bruck *et al.*, 2009; Rochette-Egly y Germain, 2009).

1.3.2 Dominio de unión a DNA

Este dominio es el más conservado de la súper-familia de NR y consta de dos dedos de zinc, dos hélices alfa y una extensión carboxilo terminal. Cada dedo de zinc está constituido por un átomo de Zn^{2+} unido a cuatro residuos de cisteína (Beato y Klug, 2000).

El dominio de unión al DNA (DBD) es el encargado de conferir el reconocimiento en secuencias de DNA específicas, ya que contiene elementos altamente conservados llamados cajas P, D, T y A. La caja P es un motivo que consta de unos pocos aminoácidos localizados en el primer dedo de zinc del DBD. La caja P define la especificidad con la que el receptor reconoce al elemento de respuesta (Beato y Klug, 2000; Rochette-Egly y Germain 2009). La caja D es un motivo que se encuentra en el segundo dedo de zinc y forma la interfase de dimerización entre DBDs, mientras que las cajas T y A definen los contactos entre el esqueleto del DNA y los residuos que flanquean la secuencia consenso (Germain *et al.*, 2003).

Las dos alfa hélices forman un ángulo recto entre sí para constituir el núcleo del DBD, que se pliega en un solo dominio globular. La hélice 1 reconoce el surco mayor del DNA y contiene tanto al primer dedo de zinc como la caja P. La hélice 2 incluye la región COOH- y el segundo dedo de zinc, junto con la caja D (Lee *et al.*, 1993).

Para que los receptores se unan al DNA y lleven a cabo la regulación de la expresión génica, deben reconocer ciertas secuencias en los promotores, llamadas elementos de respuesta (Bastien y Rochette-Egly, 2004). Los elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs) son secuencias consenso en el DNA reconocidas específicamente por los heterodímeros RAR-RXR y constituyen una interfase de interacción directa entre el DNA y estas proteínas (Mangelsdorf y Evans, 1995). Los RAREs consisten en repeticiones hexaméricas directas de la secuencia consenso 5-PuGGTCA (Pu = A ó G) separadas por

una región espaciadora de 1,2 ó 5 nucleótidos (DR-1, DR-2, DR-5, respectivamente). A través de su DBD RAR se une como un heterodímero orientado de forma asimétrica con su compañero de dimerización RXR sobre los RARE (Rochette-Egly, 2009).

1.3.3 Región de bisagra

Esta región funciona como un gozne entre el DBD y el LBD que facilita los cambios conformacionales del DBD y el LBD al minimizar los impedimentos estéricos. De igual manera, se ha demostrado que esta región contiene señales de localización nuclear (Germain *et al.*, 2003).

1.3.4 Dominio de unión a ligando (LBD)

La estructura del LBD de RAR y RXR (figura 5) consta de 12 alfa hélices conservadas y un giro beta antiparalelo, situado entre la hélice 5 y la hélice 6. Las hélices 1 a la 11 se encuentran plegadas en tres capas paralelas helicoidales, adoptando una conformación tipo “sándwich” con las hélices 1, 2 y 3 por un lado y las hélices 6, 7 y 10 por el otro (Bourguet *et al.*, 1998).

El LBD es un dominio funcionalmente complejo que contiene la cavidad de unión a ligando con características hidrofóbicas, un dominio de dimerización y el dominio de transactivación dependiente de ligando 2 (AF-2) (Moras y Gronemeyer, 1998).

Cavidad de unión a ligando. Esta estructura posee numerosos aminoácidos hidrofóbicos contenidos en las hélices 3, 5, 11 y el giro beta. La forma y tamaño de la cavidad coincide con las del ligando, lo cual incrementa los contactos hidrofóbicos y contribuye a la selectividad del ligando (Klaholz, *et. al.*, 2000).

Dominio de dimerización. Esta región está conformada por residuos en la hélice 7, 9, 10 y 11, así como las horquillas 8-9 y 9-10. Las hélices 9 y 10 contribuyen en un 75% a la

superficie de dimerización y constituyen el núcleo de la interfase de hetero-dimerización del complejo RAR-RXR (Bourguet *et al.*, 2000).

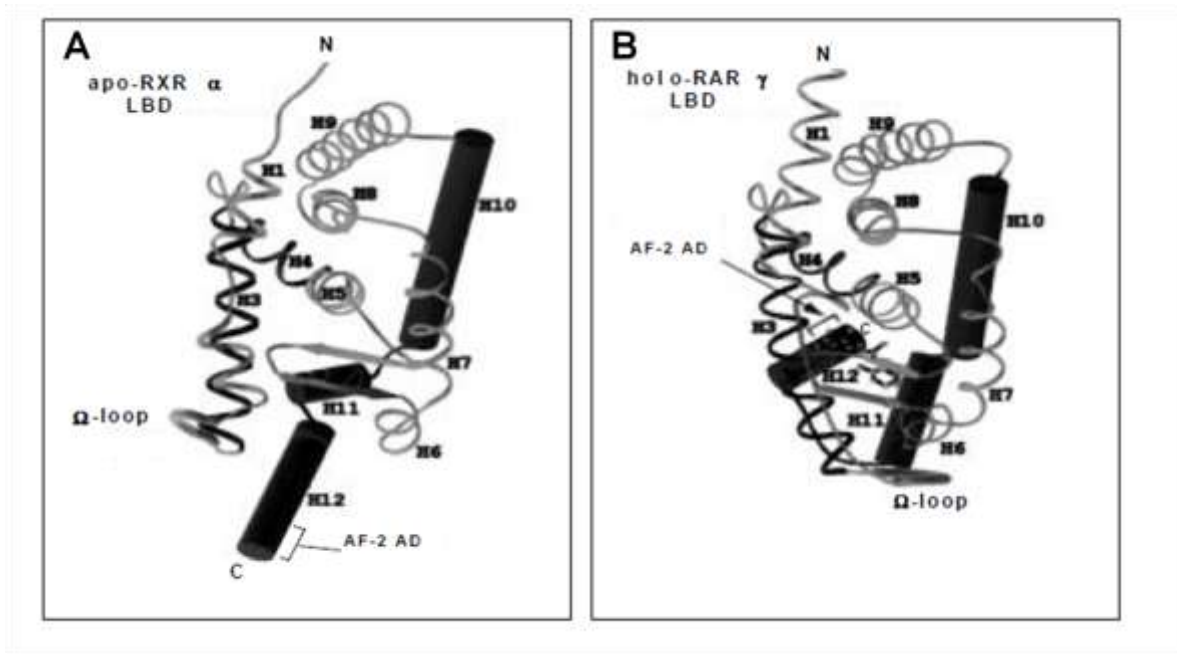


Figura 5 . Estructura del dominio de unión a ligando (LBD) en respuesta a la unión de un ligando agonista. (A) Dominio LBD del receptor RXR α en ausencia de ligando (apo-conformación). (B) Dominio LBD de RAR α en presencia de un ligando agonista (holo-conformación). Modificado de Gronemeyer y Miturski, 2001.

Dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2) o hélice 12. La hélice 12 es la más flexible y la encargada de estabilizar la unión del ligando dentro de la cavidad hidrofóbica, así como de proporcionar una superficie de contacto con proteínas correguladoras. En ausencia de ligando, la hélice 12 se encuentra en una posición abierta con respecto a la cavidad hidrofóbica, generando una conformación llamada apo-LBD. La unión de un ligando agonista provoca un reposicionamiento de la hélice 12, que cierra la cavidad y estabiliza la interacción del LBD con la hormona. Esta conformación recibe el nombre de holo-LBD (Moras y Gronemeyer, 1998) (figura 5).

La hélice 12 por sí misma no es suficiente para funcionar como un dominio de transactivación, sin embargo constituye, en su modo activo, parte de la superficie de activación junto con otras estructuras del LBD, y en su conjunto, definen al dominio AF-2 (Warnmark *et al.*, 2003).

1.3.5 Dominio carboxilo-terminal

En el RAR, es una pequeña región que se encuentra en la posición carboxilo-terminal con respecto a la hélice 12, sin embargo, está ausente en RXR. Este dominio es muy variable en tamaño y secuencia entre los subtipos de RAR, aunque su estructura tridimensional no ha sido descrita. Se ha reportado la existencia de residuos blanco de fosforilaciones y se ha sugerido que en ausencia de ligando, estabilizan a la hélice 12 en una conformación abierta, lo cual promueve la interacción del receptor con correpresores (McEwan y Nardulli, 2009).

1.4 Mecanismos de acción de los receptores nucleares no-esteroides

Los receptores nucleares no-esteroides se encuentran en el núcleo celular formando, generalmente, complejos heterodiméricos con RXR. Sin embargo, se ha reportado la existencia de homodímeros de RXR o monómeros del factor hepático nuclear 4- α (HNF4- α), que constituyen la excepción a esta generalidad (González, 2008; Lefebvre, 2001).

En ausencia de hormona, el RAR y su compañero de dimerización, RXR, se encuentran unidos de manera constitutiva a elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs) en los promotores de sus genes blancos. Los heterodímeros RAR-RXR reclutan proteínas correpresoras, las cuales regulan negativamente la transcripción al generar cambios en la

estructura de la cromatina, como la compactación del DNA o la modificación covalente de las histonas nucleosomales (Lazar, 2003).

En presencia de hormona, los receptores sufren una serie de cambios estructurales en el LBD. En particular, la hélice 12 se reposiciona a una conformación cerrada, lo cual genera una superficie de contacto para proteínas coactivadoras. Éstas regulan positivamente la expresión de genes blanco a través de la remodelación de la cromatina y el reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal (Hsia *et al.*, 2010) (figura 6).

Como ya se ha mencionado anteriormente, RAR y RXR se unen a elementos de respuesta específicos. El RARE clásico, que fue caracterizado en el promotor del gen *RAR β*, consiste en dos repeticiones directas (DR) del motivo perfecto PuGTTCA con una región espaciadora de 5 pares de bases (DR-5). Existen otros dos tipos de elementos de respuesta, que varían dependiendo del número de nucleótidos espaciadores entre las DR, llamados DR-1 y DR-2. Los elementos de respuesta tipo DR-1 y DR-2 funcionan como RAREs perfectos, y se encuentran en los promotores de genes como la proteína de unión a retinol celular tipo II (*CRBP-II*) y la homeoproteína 1-b (*HOXB-1*) (Gronemeyer y Miturski, 2001). Los receptores no-esteroides PPAR, VDR y TR también se unen a elementos de respuesta similares a los RAREs y se ha demostrado que algunos miembros del grupo II pueden interactuar con elementos canónicos para otro complejo de receptores (Tabla 1) (Germain, 2003).

En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que en los elementos de respuesta tipo DR-2 y DR-5, RXR ocupa el motivo hexamérico 5', mientras que RAR se une al motivo 3' (5'-RXR-RAR-3').

Represión

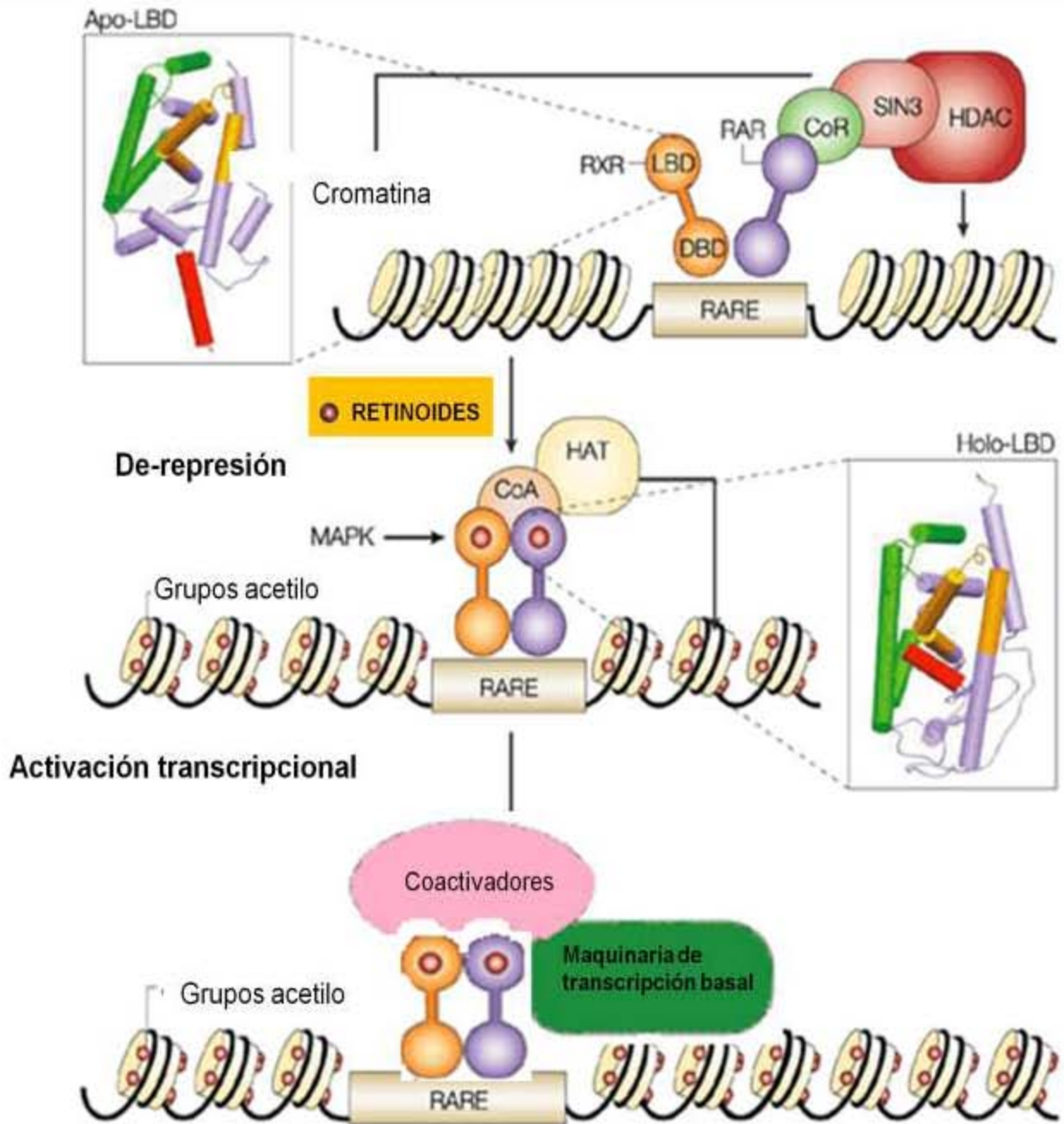


Figura 6. Mecanismo general de acción de RAR y RXR. HDAC=proteínas desacetilasas de histonas. CoR=Correpresores. RARE=elemento de respuesta a ácido retinoico. MAPK= cinasas activadas por mitógenos. Modificado de: Rochette-Egly, 2009.

En cambio, en los elementos DR-1, la polaridad es revertida, siendo RAR el que se une río arriba y RXR río abajo (5'-RAR-RXR-3'), modificando la actividad del heterodímero de activador a represor de genes blanco en presencia de ácido retinoico (Rochette-Egly, 2009).

Tabla 1. Tipos de elementos de respuesta para los receptores nucleares no-esteroides.

Número de nucleótidos espaciadores	Nombre	Acrónimo	Complejo de receptores.
1	DR-1	RXRE, PPARE	RXR-RXR, PPAR-RXR, RAR-RXR.
2	DR-2	RARE	RAR-RXR
3	DR-3	VDRE	VDR-RXR
4	DR-4	TRE	TR-RXR
5	DR-5	RARE	RAR-RXR

(Modificado de Gronemeyer y Miturski, 2001).

1.4.1 Genes blanco

Existe una gran diversidad de genes que están sujetos a la regulación transcripcional mediada por RAR-RXR. Algunos de los más estudiados son el gen *RARβ*, la familia de genes *HOX*, *CYP26A1* y el gen de la proteína celular de unión a ácido retinoico II (*CRABP II*) (Rochette-Egly, 2009). Una de las técnicas que se usan para identificar posibles genes blanco de RAR-RXR y otros receptores nucleares, es el análisis *in silico*, que predice sitios de unión putativos para NR en los promotores. Anteriormente, se reportó la existencia de un RARE tipo DR-1 dentro del promotor del gen de la histidasa

hepática (*HAL*) (Alemán, *et al.*, 2008). En la siguiente sección se describirán las funciones ya caracterizadas de este gen y su producto proteico.

El gen *HAL* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12, entre las posiciones 22 and 24.1 (Taylor *et al.*, 1991). Su promotor contiene elementos de respuesta para GR, CREB, Sp-1, HNF-1, c-Myc, el factor nuclear activador de la cadena kappa de las células B (NFκB), entre otros (Alemán *et al.*, 2005, Sanguedolce *et al.*, 1997) (figura 7). Un estudio reciente muestra que el promotor de *HAL* contiene elementos de respuesta tipo DR-1 y que PPAR-α regula negativamente la actividad transcripcional de este promotor en presencia de un ligando agonista y del coactivador PGC-1α (Alemán *et al.*, 2008).

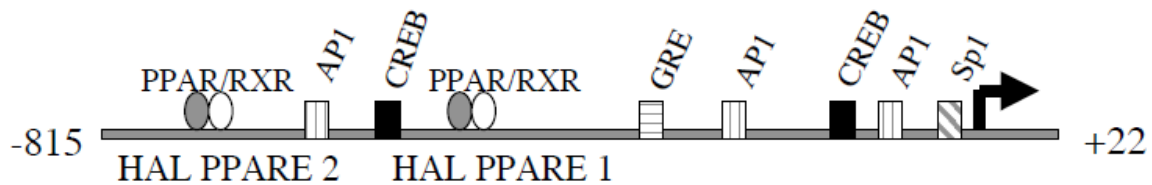


Figura 7. Estructura del promotor del gen HAL. Se muestran los sitios de unión para los factores de transcripción AP1, Sp1, CREB, así como los elementos de respuesta tipo DR-1 (PPARE) y el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). Tomado de Alemán, 2008.

Además, se ha demostrado que la expresión del gen *HAL* está regulada positivamente por la concentración de proteínas de la dieta, glucagon y estrógenos, mientras que es modulada negativamente por ATRA (Torres *et al.*, 1998; Alemán *et al.*, 2005; Eckhart *et al.*, 2008).

El producto proteico del gen *HAL* es la histidasa hepática. Esta enzima citosólica cataliza la primera reacción del metabolismo de la histidina, la desaminación de la L-histidina en

ácido urocaínico. En el hígado, el ácido urocaínico es metabolizado hasta obtener ácido glutámico, mientras que en la piel el ácido urocaínico se acumula en las células y genera fotoprotección contra los rayos UV (Gibbs y Norval, 2011; Barresi *et al.*, 2011).

1.5 Correguladores

La modulación de la expresión génica mediada por los receptores nucleares no-esteroides requiere del reclutamiento de proteínas accesorias llamadas correguladores, que son capaces de incrementar o disminuir la transcripción de dichos genes. Los correguladores se dividen en dos grupos principales: los factores que regulan de manera positiva la transcripción se denominan coactivadores, mientras que aquellos que realizan una actividad inhibitoria sobre los promotores se llaman correpresores (McKenna y O'Malley, 2002).

1.5.1 Coactivadores

Los coactivadores son moléculas que interactúan con los factores de transcripción, como RAR y RXR, e incrementan los niveles de transcripción de éstos a través de diferentes mecanismos, como la remodelación de la cromatina y el reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal.

Como ya se mencionó con anterioridad, RAR y RXR contienen diferentes dominios de interacción con sus coactivadores, como AF-1 y AF-2, entre otros. De igual manera, los coactivadores contienen regiones específicas de interacción con los receptores nucleares.

Existen distintas interfases de unión entre los coactivadores y receptores. El modelo mejor caracterizado involucra a un motivo específico en los coactivadores, denominado caja de Receptores Nucleares (RN). Esta caja consta de la secuencia consenso LXXLL, en donde

L es el aminoácido leucina y X es cualquier aminoácido. Se ha demostrado que este motivo es necesario para la interacción del coactivador con la región AF-2 de los receptores nucleares activados por ligando.

Para la interacción de coactivadores con la región AF-1, se ha descrito un modelo bifásico de interacción que describe los contactos electrostáticos y rápidos seguidos de una unión lenta y prolongada por medio de residuos hidrofóbicos. Cabe mencionar que este modelo no toma en cuenta la existencia de una secuencia consenso como en el caso de la caja NR, sino que propone que la interacción es dependiente del plegamiento y estructura de ambas proteínas.

Se han caracterizado numerosos coactivadores, sin embargo, se describirán algunas de las familias más representativas para los receptores nucleares no-esteroides RAR y RXR.

a) p160/SRC

La familia del coactivador de receptores esteroides (p160/SRC) está conformada por tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí y que tienen un peso molecular aproximado de 160 kDa, llamadas SRC-1, SRC-2 y SRC-3 (figura 8). Existen numerosos reportes en los que se ha caracterizado la actividad y función de estas moléculas y actualmente se acepta que son coactivadores generales de los receptores nucleares esteroides y no-esteroides, incluidos RAR y RXR (Leo y Chen, 2000; Wei, 2003).

Los coactivadores SRC contienen un dominio bHLH (*basic hélix-loop-hélix*) en la región amino-terminal, que es necesaria para la localización nuclear de estos factores y es la más conservada entre los miembros de la familia. Cercanos a esta región, se encuentran dos dominios de tipo PAS (A y B), que funcionan como mediadores de interacciones proteína-proteína. Recientemente, se ha demostrado que PAS-B reconoce y se une a motivos LXXLL en otros factores de transcripción, como STAT6 y que además es un

mediador de la dimerización entre distintos miembros de la familia SRC (Lodrini *et al.*, 2008).

En la parte central de estas proteínas, se encuentra un dominio de interacción con receptores nucleares (RID), a través del cual pueden unirse a la región AF-2 de los receptores. El RID contiene tres motivos LXXLL. Adicionalmente, SRC-1 posee otro motivo LXXLL en la región distal del dominio carboxilo, el cual es importante para la activación total de RAR y otros receptores (McInerney *et al.*,1998).

En la región carboxilo-terminal, estos coactivadores poseen un dominio de acetiltransferasa de histonas (HAT). La acetilación en residuos específicos de las histonas induce una des-compactación local de la cromatina y facilita el reclutamiento de factores de transcripción específicos y la maquinaria basal de transcripción (Wolf *et al.*, 2008). En esta misma región, se encuentra el dominio de activación, formado por tres motivos LXXLL y que sirven como una plataforma de interacción con otros coactivadores, como la familia p300/CBP (Proteína de unión a CREB) y la metil transferasa de argininas asociada a coactivadores 1 (CARM-1) (Yao *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999).

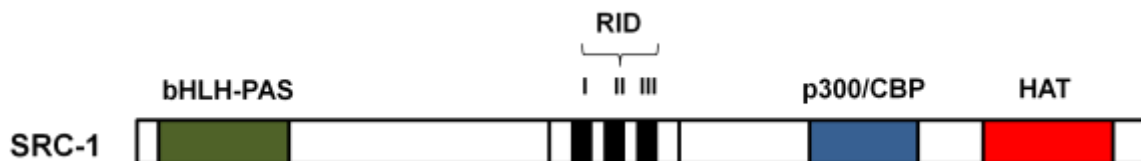


Figura 8. Estructura de un miembro de la familia p160/SRC (SRC-1). Se muestran los dominios bHLH y las regiones PAS (verde), los tres motivos LXXLL interacción con receptores nucleares (negro), dentro del dominio RID (blanco) y el dominio de acetil-transferasa de histonas (rojo). En azul, se muestra la región de interacción con coactivadores de la familia p300/CBP. Basado en Wei, 2003.

b) p300/CBP

p300 es una proteína de 300 kDa que fue caracterizada por primera vez como un blanco celular de la proteína adenoviral E1A, mientras que CBP fue identificada gracias a su asociación con el dominio de transactivación del factor de transcripción CREB y por la mediación de la actividad de éste en respuesta a c-AMP. Debido a sus propiedades intercambiables, en muchos aspectos se considera que p300 y CBP son homólogos funcionales (Wei, 2003).

Esta familia se caracteriza por tener dominios discretos que son los responsables de diversas funciones: poseen un bromodominio, un dominio HAT, un dominio de unión a SRC-1 y en la región N-terminal contiene un dominio LXXLL de interacción con receptores. Se ha propuesto que p300/CBP coordina múltiples vías de señalización y funciona como una plataforma de unión para distintas moléculas (Giordano *et al.*, 1999).

p300/CBP incrementan la actividad transcripcional mediada por RAR y su inducción es necesaria para una respuesta normal a ATRA en células epiteliales de cáncer de mama (Dietze *et al.*, 2003)

c) PGC-1

La proteína coactivadora de receptores activados por proliferadores peroxisomales 1 (PGC-1) fue aislada por primera vez como un coactivador para PPAR γ involucrado en la termogénesis del tejido adiposo. Posteriormente, se demostró que PGC-1 es también una proteína coactivadora de otros receptores nucleares esteroideos y no-esteroideos, como ER, GR, T3R y RAR-RXR y que interacciona con éstos a través del motivo canónico LXXLL de una manera dependiente de ligando (Tcherepanova *et al.*, 2000; Delerive *et al.*, 2002).

Se ha sugerido que PGC-1 tiene un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos que involucran a receptores nucleares unidos de manera obligatoria a RXR (Wei, 2003).

d) NSD1

Esta proteína fue aislada en experimentos de doble híbrido en levaduras y se encontró que posee distintos dominios, incluyendo un dominio SET con actividad de metiltransferasa de lisinas de histonas y múltiples dedos PHD, motivos asociados a proteínas remodeladoras de la cromatina (Huang *et al.*, 1998). Se ha descrito su asociación con las formas holo- y apo- del LBD de RAR y RXR. Además, se ha caracterizado un dominio de represión y otro de activación en esta proteína, lo cual podría definir una nueva clase de correguladores bifuncionales (Kurotaki *et al.*, 2001).

e) TRAP220

La proteína asociada al receptor tiroideo 220 fue originalmente identificada formando complejos inmuno-purificados en células tratadas con hormona tiroidea, y después se demostró que interactúa con receptores nucleares, incluyendo RAR y RXR. TRAP220 contiene múltiples motivos LXXLL que median su interacción con los LBD de los receptores (Yuan *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2000).

f) CARM1

Se ha demostrado que CARM1 metila nucleosomas y potencia la actividad transcripcional de RAR y RXR. Sin embargo, se ha reportado que CARM1 metila a p300/CBP, bloqueando la interacción con CREB e inhibiendo la actividad transcripcional. Por lo tanto, es posible que CARM 1 funcione como coactivador de receptores nucleares, pero sea un correpresor de otros factores de transcripción (Xu *et al.*, 2001).

1.5.2 Correpresores

Los correpresores son proteínas accesorias que se unen a los receptores nucleares como RAR y RXR y regulan negativamente la transcripción de sus genes blanco. En la siguiente sección, se describirán los correpresores de RAR-RXR más caracterizados hasta la fecha.

a) N-CoR y SMRT.

El correpresor de receptores nucleares (N-CoR) es una proteína de 270 kDa que fue identificada gracias a su asociación con los receptores RAR y TR en ausencia de ligando (Horlein *et al.*, 1995).

N-CoR posee dos dominios de interacción con receptores nucleares en la región carboxilo-terminal y tres dominios asociados a la represión transcripcional en la región amino-terminal (Lazar, 2003)

Al mismo tiempo, se clonó una proteína relacionada con N-CoR, llamada silenciador mediador de los receptores hormonales retinoico y tiroideo (SMRT) (figura 9). SMRT posee una estructura similar a N-CoR, con dos regiones de interacción con receptores nucleares en la porción carboxilo-terminal y las regiones de represión en el dominio amino-terminal (Hsia, 2010).

La actividad silenciadora de N-CoR y SMRT se atribuye a dos mecanismos principales. El primero involucra la interacción directa de estos correpresores con la proteína mSin3, que a su vez recluta a complejos de desacetilasas de histonas (HDAC), generando una compactación local de la cromatina e inhibición de la transcripción (Nagy *et al.*, 1997). El segundo mecanismo involucra la interacción directa de N-CoR y SMRT con las HDAC.

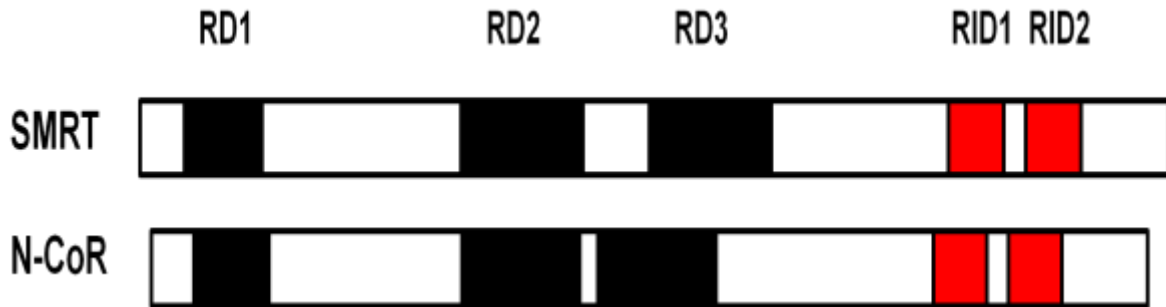


Figura 9. Estructura de la familia de correpresores N-CoR SMRT. Se muestran los tres dominios asociados a la represión transcripcional (negro) y los dominios de interacción con receptores nucleares, en rojo. Basado en Wei, 2003.

1.5.2.1 Correpresores que se unen al dominio amino-terminal de RAR.

a) Vinexina β

Un estudio realizado por Bour y colaboradores (2005), ha demostrado que RAR γ interactúa con una proteína llamada vinexina β , a través de su dominio amino-terminal. Vinexina β es una proteína adaptadora de unión al citoesqueleto de actina y se encuentra, además, presente en el núcleo. Esta proteína no posee actividad enzimática intrínseca y tiene tres dominios de homología 3 a Src (SH3). Uno de estos dominios, próximo al dominio carboxilo terminal, está involucrado en la unión con RAR γ . Vinexina β funciona como un correpresor de RAR γ , y se ha postulado que interactúa con otras proteínas a través de sus dominios SH3 para mantener al receptor en un estado inactivo.

b) Acinus-S.

Acinus-S es una proteína nuclear que participa en la condensación de la cromatina y procesamiento del RNA mensajero. Recientemente se ha caracterizado su unión a RAR

en el dominio amino-terminal y la inhibición de su actividad transcripcional (Vucetic *et al.*, 2008).

2 ANTECEDENTES

En estudios anteriores, se identificaron y aislaron fragmentos de proteínas que interaccionan con el dominio amino del receptor de estrógenos alfa (ER α). Estos datos fueron obtenidos a partir de la técnica del doble híbrido en levaduras utilizando como carnada el dominio amino del receptor de ER α (aminoácidos 1-180) para tamizar una genoteca de la línea celular de cáncer de cérvix HeLa.

Al realizar la búsqueda de las secuencias en bases de datos, se encontró que uno de los factores correspondía al segundo dominio PDZ (dominio de interacción proteína-proteína) de E3KARP (NHERF2, SIP1, TKA1), proteína relacionada con la regulación del intercambiador de Na⁺/H⁺ ubicado en la membrana de borde de cepillo intestinal y renal, NHE3 (Yun *et al.*, 1997). Originalmente, E3KARP fue reportado como un gen que codifica una proteína de 451 aminoácidos y un peso molecular estimado de 50 kDa, sin embargo, una corrección posterior señala que E3KARP es un gen que codifica una proteína de 337 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 34 kDa. Posee dos dominios PDZ de interacción proteína (Donowitz *et al.*, 2005).

E3KARP/NHERF-2 es un miembro de la familia de factores reguladores del intercambiador de Sodio/Hidrógeno NHE (NHERF). Esta familia está constituida por cuatro proteínas de andamiaje, llamadas NHERF-1, NHERF-2 (E3KARP), NHERF-3 y NHERF-4. Los miembros de la familia poseen de dos a cuatro dominios PDZ, que medían las interacciones proteína-proteína. Adicionalmente, NHERF-1 y E3KARP poseen dominios de unión a ezrina/radixina/moesina (ERM), lo cual proporciona un vínculo directo con el citoesqueleto de actina (Donowitz, *et al.*, 2005) (figura 10).

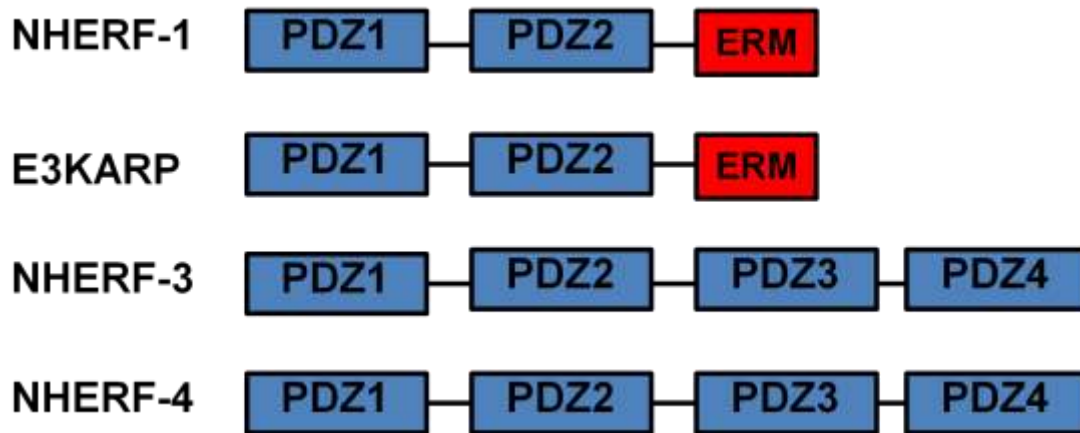


Figura 10. Estructura de la familia de proteínas NHERF. Se muestran los dominios PDZ (azul) y el dominio de interacción con la familia ezrina, radixina y moesina (ERM), en rojo. Basado en Donowitz, 2005.

E3KARP fue originalmente caracterizado como un factor que interactúa con el intercambiador NHE3 por medio de ensayos de doble híbrido (Yun *et al.*, 1998). Posteriormente, se demostró que E3KARP activa al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (Jung-Kang, 2004). Otros estudios han mostrado que E3KARP se une al regulador transmembranal de fibrosis quística (CFTR), al receptor purinérgico (P2Y1) y al receptor β -adrenérgico (β -AR) (Hall *et al.*, 1998a; Hall *et al.*, 1998b).

E3KARP interactúa además con proteínas citosólicas como la fosfolipasa C- β 3 (PLC- β 3) (Sun, *et al.*, 2001) y proteínas nucleares como el factor de determinación de testículo ligado al cromosoma Y (SRY) y el activador transcripcional con dominios PDZ (TAZ) (Poulat, *et al.*, 1996; Kanai *et al.*, 2000).

Para corroborar que existía una interacción directa entre E3KARP y los receptores nucleares esteroides se realizó la interacción *in vitro* de E3KARP [35 S] y de los dominios carboxilo y amino de AR, ER α y PR fusionados con glutatión S-transferasa (GST). Se

observó que *E3KARP* interactúa con la región amino de estos receptores, y en menor intensidad con la región carboxilo en ausencia de la hormona correspondiente; sin embargo, ésta última interacción desaparece o se debilita en presencia de hormona.

Para determinar si *E3KARP* era capaz de modular la actividad transcripcional de $ER\alpha$ y otros receptores esteroides, en nuestro laboratorio se realizaron ensayos con genes reportero de luciferasa dependientes de los receptores ER, AR, PR o GR. Se observó que *E3KARP* es un coactivador de estos receptores nucleares, aumentando varias veces su actividad transcripcional en comparación con el control (Sánchez Alcántara, 2003).

3 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el papel de *E3KARP* como posible corregulador en la actividad transcripcional mediada por los receptores nucleares no esteroides $RAR\alpha$ y $RXR\alpha$.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la existencia de una interacción entre *E3KARP* y los receptores nucleares $RAR\alpha$ y/o $RXR\alpha$, *in vivo*.
- Determinar el efecto de *E3KARP* en la modulación de los niveles de transcripción mediados por $RAR\alpha$ - $RXR\alpha$ sobre un reportero sintético en células de mamífero.
- Evaluar el efecto de *E3KARP* en la regulación transcripcional mediada por $RAR\alpha$ - $RXR\alpha$ en un gen reportero regulado por el promotor del gen de la histidasa hepática en células de mamífero.

4 HIPÓTESIS

- Conociendo que existen un gran número de correguladores que se comparten entre distintos miembros de la superfamilia de receptores nucleares y siendo E3KARP un coactivador de receptores nucleares esteroides, entonces puede incrementar la actividad transcripcional de algunos receptores nucleares no esteroides como RAR y RXR.

5 METODOLOGÍA

5.1 Líneas celulares y cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares CV-1 (derivadas de riñón de mono verde africano), HeLa (cáncer de cérvix) y HEK 293T (células embrionarias de riñón, con una transfección estable del antígeno T). Los medios de cultivo utilizados fueron: DMEM con 5% de suero fetal bovino para las líneas CV-1 y HeLa, mientras que para la línea HEK 293T se utilizó RPMI con 8% de suero fetal bovino. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera aire/CO₂ de 95%/5% y se tripsinizaron cada tres a cuatro días.

5.2 Plásmidos y transfecciones transitorias.

Para evaluar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional mediada por RAR α -RXR α , se realizaron transfecciones transitorias a las líneas celulares CV-1 y HeLa.

Se utilizaron vectores de expresión derivados del plásmido pCMX (Addgene™), con un promotor CMV, a los que se les insertaron las secuencias codificantes de RAR α (Receptor de Ácido Retinoico alfa humano) y RXR α (Receptor X retinoico alfa humano) (Ambos

plásmidos donados por el Dr. Ronald Evans (Howard Hughes Medical Institute). Además se utilizó un plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen™), también con un promotor de CMV, al que se insertó la secuencia codificante de E3KARP.

Para evaluar el efecto sobre la actividad, se usaron dos plásmidos que contienen genes reporteros de luciferasa, llamados pGL3-RARE-luc (donado por el Dr. Ronald Evans) y HAL C- luc (donado por la Dra. Gabriela Alemán, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán).

pGL3-RARE-luc es un reportero sintético de luciferasa, derivado del plásmido pGL3 (Promega™), al cual se le insertaron tres elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE) del tipo DR-5.

HAL C-luc es un reportero de luciferasa derivado del plásmido pGL3 (Promega™) con el promotor del gen de la histidasa hepática (*HAL*), que contiene dos elementos de respuesta a receptores de proliferadores peroxisomales (PPAREs) del tipo DR-1. Además, contiene sitios de reconocimiento para otros receptores nucleares y factores de transcripción, como el GR, el elemento de respuesta de unión a c-AMP (CREB), la proteína activadora 1 (AP1) y la proteína de especificidad 1 (Sp1).

Para determinar la eficiencia de la transfección, se introdujo un plásmido de expresión constitutiva psv- β -galactosidasa para normalizar.

El día previo a la transfección, se tripsinizan las células y se siembran 6×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos (1.9 cm^2), para que en 24 horas tengan una confluencia de cerca del 90%. Se adiciona medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 3% de FBS. Al siguiente día, se realiza la transfección utilizando Lipotectamine 2000 (Invitrogen), en una proporción 2:1 de Lipofectamina:DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En general, se probaron dos genes reporteros con sitios de interacción para RAR-RXR, en dos líneas celulares, en presencia y ausencia de los receptores. Esto funciona como control para determinar la actividad basal del reportero y compararla con su actividad al sobreexpresar los receptores, en presencia y ausencia del ligando ATRA. Inicialmente se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de ligando (100 nM, 500 nM y 1 μ M) para determinar la concentración óptima que mostrara la mejor actividad transcripcional.

Adicionalmente, se repiten los experimentos en presencia de diversas concentraciones de nuestro corregulador a evaluar, E3KARP y se compara con coactivadores conocidos, previamente, como lo es SRC-1.

El diseño de las transfecciones fue como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño experimental de las transfecciones transitorias a las células CV-1 y HeLa. Las concentraciones denotan la cantidad de plásmido transfectada por pozo en cajas de 24 pozos.

Receptor 50 ng	Receptor 50 ng	Reportero luciferasa 250 ng	Coactivador 0-200 ng	Proteína a evaluar 0-200 ng	Reportero normalización 20 ng
		RARE-luc			β -galactosidasa
		RARE-luc		E3KARP	β -galactosidasa
		RARE-luc	SRC-1		β -galactosidasa
RAR α	RXR α	RARE-luc			β -galactosidasa
RAR α	RXR α	RARE-luc		E3KARP	β -galactosidasa
RAR α	RXR α	RARE-luc	SRC-1		β -galactosidasa
		HAL C-luc			β -galactosidasa
		HAL C-luc		E3KARP	β -galactosidasa
		HAL C-luc	SRC-1		β -galactosidasa
RAR α	RXR α	HAL C-luc			β -galactosidasa
RAR α	RXR α	HAL C-luc		E3KARP	β -galactosidasa
RAR α	RXR α	HAL C-luc	SRC-1		β -galactosidasa

En cada experimento, se variaron las condiciones generales mencionadas arriba, debido a la necesidad de demostrar mecanismos distintos. A continuación, se describen las condiciones especiales que se utilizaron en dichos experimentos.

5.2.1 EFECTO DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR RAR Y RXR EN UN PROMOTOR SINTÉTICO TIPO DR-5 EN DOS LÍNEAS CELULARES.

Para determinar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional de RAR α /RXR α , se utilizó un gen reportero de luciferasa bajo un promotor sintético DR-5 (RARE-luc) en presencia y ausencia de ATRA (1 μ M). Se utilizaron concentraciones crecientes de E3KARP (50, 100 y 200 ng). Se determinó la concentración ideal del corregulador y fue la que se utilizó para los siguientes ensayos. Estos experimentos fueron realizados en la línea celular CV-1.

Para confirmar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional de los receptores, se realizaron ensayos en la línea celular HeLa, en donde se utilizó el reportero RARE-luc, E3KARP (200 ng) y plásmido vacío a 200 ng.

5.2.2 EFECTO DE SRC-1 Y PINX-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA EN UN PROMOTOR SINTÉTICO TIPO DR-5.

Para mostrar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional mediada por RAR α y RXR α , en comparación con otros correguladores, se realizaron experimentos en células HeLa. Se transfectó el reportero RARE-luc, ambos receptores y E3KARP, SRC-1 ó PINX-1 (200 ng). Además, se transfectó plásmido vacío como control negativo. Todas las condiciones fueron ensayadas en presencia o ausencia de ATRA (1 μ M).

5.2.3 EFECTO DE RAR α SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA EN EL PROMOTOR DE HAL CON ELEMENTOS TIPO DR-1.

Inicialmente decidimos determinar si el promotor de *HAL* (*HAL C-luc*) sería un buen promotor natural para observar los efectos de E3KARP sobre la actividad transcripcional de RAR/RXR, ya que tiene elementos de respuesta tipo DR-1, y responde a varios factores de transcripción, incluyendo a PPAR α -RXR. Utilizamos concentraciones crecientes de RAR α (0, 50, 100 y 200 ng), para demostrar que éste tuviera un efecto transcripcional sobre el promotor en presencia y ausencia de ATRA. RXR fue transfectado a una concentración de 50 ng.

5.2.4 EFECTO DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LUCIFERASA EN EL PROMOTOR DE HAL CON ELEMENTOS TIPO DR-1.

Una vez demostrado el papel de RAR α sobre el promotor del gen *HAL*, se determinó el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional de los receptores en este contexto. Se utilizaron concentraciones crecientes de E3KARP (100, 200 y 300 ng), RAR α (200 ng) RXR α (50 ng), y *HAL C-luc*. Como control negativo, se transfectó plásmido vacío a concentraciones crecientes y como control positivo, se utilizó SRC-1 a las mismas concentraciones (100, 200 y 300 ng). Se incluyó además, un control sin transfectar y otro control en el que se transfectaron solamente los reporteros *HAL C-luc* y β galactosidasa. Todas las condiciones fueron ensayadas en ausencia o presencia de ATRA (1 μ M), en células CV-1.

5.2.5 EFECTO DE SRC-1 Y PINX-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA EN EL PROMOTOR DE HAL CON ELEMENTOS TIPO DR-1.

Para comparar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional de RAR α -RXR α y otros correguladores en el contexto del promotor *HAL C-luc*, se realizaon ensayos en

células HeLa. Se transfectaron los plásmidos RAR α , RXR α y HAL C-luc. Además, se introdujeron E3KARP, SRC-1 ó PINX-1. Se utilizó un plásmido vacío como control negativo. Todas las condiciones fueron ensayadas en ausencia o presencia de ATRA (1 μ M).

En todos los ensayos, al siguiente día de la transfección, se desecha el medio de cultivo y se adiciona medio fresco sin suero o al 0.2% de FBS tratado con carbón activado y dextrán. Se añade al medio el vehículo (Dimetil sulfóxido, DMSO) (1:1000), que se utiliza como control negativo, o ATRA (1 μ M), para evaluar el efecto del tratamiento hormonal sobre la actividad transcripcional de RAR α -RXR α . Estos tratamientos se hicieron por triplicado. El tratamiento hormonal y con DMSO fue repetido a las 24 horas y pasadas 48 horas se cosecharon las células para realizar ensayos de luciferasa y β galactosidasa.

5.3 Ensayos de luciferasa y β galactosidasa

Para determinar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional mediada por RAR α -RXR α en los dos reporteros, se realizaron ensayos de actividad de la enzima luciferasa. Esta proteína cataliza la oxidación del pigmento luciferina en una reacción que tiene como resultado la liberación de luz, que es detectada por un luminómetro como Unidades Relativas de Luz (URL).

Para normalizar la transfección, se realizaron ensayos de actividad de la enzima β -galactosidasa dentro de el mismo tubo, que lleva a cabo la oxidación de su sustrato Galactón™, que es una molécula basada en los 1,2-dioxetanos. La β -galactosidasa deglicosila a esta molécula y después de un cambio en el pH de la muestra, el sustrato emite luz que es detectada por un luminómetro.

Se lisaron las células siguiendo la siguiente metodología: se aspiró el medio de cultivo y se agregaron 50 μL de buffer de lisis 1X (NaH_2PO_4 100 mM, Na_2HPO_4 100 mM, Tritón X-100 0.2% pH 7.8). Se agregó 1 mM de ditioneitol (DTT) al momento de la preparación.

5.3.1 Ensayos de actividad de luciferasa.

Se tomaron 30 μL de lisado y se transfirieron a una cubeta para luminómetro, una por cada pozo. Se agregaron 100 μL de buffer de reacción (glicilglicina 25 mM, MgCl_2 , 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0.5 mg/mL, pH 7.8) de manera manual y 30 μL de luciferina mediante el inyector del luminómetro. Se configuró el luminómetro para realizar la lectura de la actividad de la luciferasa durante 20 segundos.

5.3.2 Ensayo de actividad de β -galactosidasa.

Se agregaron 100 μL de solución de reacción (NaH_2PO_4 100 mM, Na_2HPO_4 100 mM, MgCl_2 1 mM, Galactón 1X, pH 8) al lisado utilizado para el ensayo de luciferasa. Se incubó la reacción en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Pasado el periodo de incubación, se agregaron 100 μL de solución aceleradora (Solución aceleradora TROPIX EMERALD™ al 10% en NaOH 0.2 N) de forma manual. Se ajustó el luminómetro para realizar la lectura de actividad durante 5 segundos.

Los datos fueron normalizados obteniendo el cociente URL luciferasa/ URL β -galactosidasa. La inducción fue calculada con el cociente de los valores registrados en presencia de ATRA y aquellos obtenidos en presencia de vehículo.

5.4 Co-inmunoprecipitación

Para determinar la interacción de los receptores RAR α y RXR α con E3KARP *in vivo*, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Se sembraron 2X10⁶ células de la línea HEK 293T en placas de 10 cm (59 cm² de área).

Tabla 3. Diseño experimental de la co-inmunoprecipitación de RAR α -RXR α y E3KARP.

Placas con células Hek 293 T	Plásmido transfectado	ATRA (10 μ M)	Inmunoprecipitación	Western Blot	Reutilización de membrana
1	pcDNA3.1 (6 μ g)	(-)	α E3KARP	α E3KARP	
2	pcDNA E3KARP (6 μ g)	(-)	α IgG	α E3KARP	
3	pcDNA E3KARP (6 μ g)	(-)	α E3KARP	α E3KARP	
4	RAR α + RXR α (3 μ g c/u)	(-)	α RAR	α RAR	α RXR
5	RAR α + RXR α (3 μ g c/u)	(-)	α RXR	α RXR	α RAR
6,7	RAR α + RXR α + E3KARP (3 μ g de c/u de los receptores + 6 μ g E3KARP)	(-)/+	α E3KARP	α RAR	
8,9	RAR α + RXR α + E3KARP (3 μ g de c/u de los receptores + 6 μ g E3KARP)	(-)/+	α E3KARP	α RXR	
10,11	RAR α + RXR α + E3KARP (3 μ g de c/u de los receptores + 6 μ g E3KARP)	(-)/+	α RAR	α E3KARP	
12,13	RAR α + RXR α + E3KARP (3 μ g de c/u de los receptores + 6 μ g E3KARP)	(-)/+	α RXR	α E3KARP	
14, 15	-	(-)/+	α E3KARP	α E3KARP	

El día siguiente, se realizaron transfecciones transitorias con los plásmidos, RAR α , RXR α (3 μ g c/u), pcDNA3.1-E3KARP (6 μ g) y pcDNA3.1 (6 μ g) .

Las transfecciones, inmunoprecipitación y western blot fueron realizados según el diseño mostrado en la Tabla 3.

Al siguiente día de la transfección, se cambió el medio a las células y se les trató con 10 μ M de ATRA o DMSO. Se incubaron durante 24 horas con estos tratamientos y después fueron lavadas dos veces con 5 mL de PBS 1X frío. Se agregó 1 mL de PBS 1X frío a cada placa y se mantuvieron en hielo a partir de este momento. Se realizó un raspado de la monocapa celular y después fueron transferidas a tubos Eppendorf™ de 1.67 mL.

Se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm a 4 °C por un minuto y se aspiró el sobrenadante. Se añadieron 500 μ L de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% NP40; 10% glicerol) en presencia o ausencia de ATRA (10 μ M) y se homogeneizaron. Se incubaron por 30 minutos a 4 °C en agitación suave y posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se tomó una alícuota de 80 μ L del sobrenadante de cada muestra y fue guardado a -80 °C. Las muestras fueron transferidas a tubos eppendorf™ con perlas de sefarosa 4B (Sigma™) para preclarificar el extracto y se incubaron en agitación lenta por 30 minutos a 4°C. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 2 minutos a 4 °C y se agregaron anticuerpos policlonales (3 μ g) purificados de suero de cabra (anti-E3KARP) ó conejo (anti-RAR α y RXR α) ó un anticuerpo inespecifico IgG (Santa Cruz Biotechnologies™), según lo mostrado en la tabla 3. Se incubaron los anticuerpos durante 3 horas a 4°C en agitación suave y después se añadieron 60 μ L de Proteína A sefarosa (si el anticuerpo fue producido en conejo) o proteína G sefarosa (producido en ratón o cabra), según correspondiera a la muestra. Se dejó incubando toda la noche. Al siguiente día, se

centrifugaron las muestras a 3,000 rpm por 2 minutos a 4 °C y posteriormente se realizaron seis lavados con buffer de lisis con inhibidores de proteasas en presencia o ausencia de ATRA (10 μ M). Entre cada lavado, se centrifugaron las muestras a 3,000 rpm por 1 minuto a 4 °C.

Se añadieron 50 μ L de buffer de carga para proteínas 1X y se homogeneizaron las muestras. Se hirvieron durante 8 minutos y se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf™ nuevos. Se guardaron las muestras a -80°C.

5.5 *Western blot.*

Para verificar que los plásmidos con las secuencias codificantes de RAR α , RXR α y E3KARP se sobre-expresan al transfectarlos transitoriamente en células Hek 293 T, se realizaron ensayos de western blot introduciendo diferentes concentraciones de los vectores de expresión antes mencionados.

Para el caso de los receptores RAR α y RXR α , se transfectaron 3 μ g de DNA a las células Hek 293T en presencia y ausencia de ATRA (10 μ M). Para el caso de E3KARP, se transfectaron cinco concentraciones de plásmido: 1 μ g, 3 μ g, 5 μ g y 10 μ g.

Al día siguiente de la transfección, se adicionaron 200 μ L de buffer de lisis (Tris 0.5 M pH 6.8; Glicerol; SDS 10%, azul de bromofenol 0.1%; β -mercaptoetanol 1%) a cada pozo y se guardaron a -80 °C hasta el día siguiente.

Las muestras obtenidas en el procedimiento anterior fueron descongeladas sobre hielo y cargadas en un gel de acrilamida al 10%. Se corrieron 40 μ L de cada muestra a 100 mV durante dos horas. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (BioRad™) durante toda la noche a 12 mV y a 4 °C.

Al siguiente día, se lavó la membrana con TBS-T (TBS 1X, Tween™ 20 0.1%) durante 5 minutos. Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante 1 hora en una solución de leche con polvo. La membrana se lavó con TBS-T tres veces y se incubó durante una hora con una dilución 1:5000, hecha en TBS-T, de los anticuerpos RAR α , RXR (purificados en suero de conejo) o E3KARP (purificado en suero de conejo) (Santa Cruz Biotechnologies™), según lo mostrado por la tabla 3. Se dejó incubando toda la noche a 4°C. Después, se realizaron tres lavados con TBS-T de 5 minutos cada uno y se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (dilución 1:10,000) (Santa Cruz Biotechnologies™) y se incubó durante tres horas a 4 °C. Se realizaron tres lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno.

Después, se reveló la membrana. Se preparó la solución de revelado, utilizando el kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences™): se mezclaron 250 μ L de Solución A y 25 μ L de solución B y se dejaron incubando por 5 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, se humedeció la membrana con esta mezcla y se introdujo en un cassette, envuelta en plástico delgado. Se dejó incubando 5 minutos. Dentro de un cuarto oscuro, se extrajo una placa de revelado (Amersham Hyperfilm™ ECL) y se colocó sobre la membrana envuelta en plástico. Se dejó exponiendo durante 2, 5 o 10 minutos, según fuera necesario. Después, la placa se sumergió en solución reveladora (Kodak™GBX) hasta observar las bandas de interés, inmediatamente se transfirió a un recipiente con agua y después se sumergió en solución fijadora (Kodak™GBX). La membrana fue almacenada en TBS a 4 °C.

5.6 Reutilización de la membrana

Se sumergió la membrana en buffer de reutilización (100mM de β -mercaptoetanol; 2% SDS; 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7). Se incubó por 60 minutos en agitación lenta y se lavó 2

veces en TBS-T 1X a temperatura ambiente. Después se bloqueó la membrana en leche en polvo al 5% disuelta en TBS-T y se continuó con el resto del protocolo de western blot.

6. RESULTADOS.

6.1 SOBRE-EXPRESIÓN DE E3KARP: WESTERN BLOT.

Inicialmente, verificamos la expresión de nuestra proteína de interés mediante western blot. Como observamos en la figura 11, la proteína E3KARP se sobre-expresa al transfectar transitoriamente el plásmido que contiene su secuencia codificante, siendo más evidente conforme aumenta la concentración de DNA introducido.

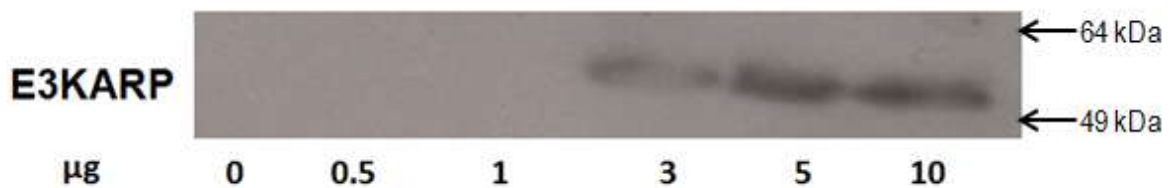


Figura 11. Sobre-expresión de E3KARP en células Hek 293T. Se muestra el Western blot obtenido a partir de la transfección del plásmido de expresión con la secuencia codificante de E3KARP a concentraciones crecientes.

6.2 INTERACCIÓN *IN VIVO*: ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN.

Para demostrar que E3KARP interactúa con los receptores RAR α y RXR α , se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células Hek 293T, como se describe en la sección de metodología.

En la figura 12 se muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes. A partir del patrón observado en la placa de revelado, se desprende que la proteína E3KARP se expresa en células HEK 293T de manera endógena y que la transfección transitoria del vector vacío pcDNA 3.1 (6 µg) no afecta esta expresión. En segundo lugar, se observa que la proteína E3KARP y las proteínas RAR α y RXR α se sobre-expresan al transfectar transitoriamente los plásmidos que contienen la secuencia codificante de estos productos proteicos

Se observa que el anticuerpo contra E3KARP es capaz de precipitar a los receptores RAR α y RXR α *in vivo* en presencia y ausencia de ATRA. Lo que indica que las tres proteínas se encuentran en el mismo complejo proteico.

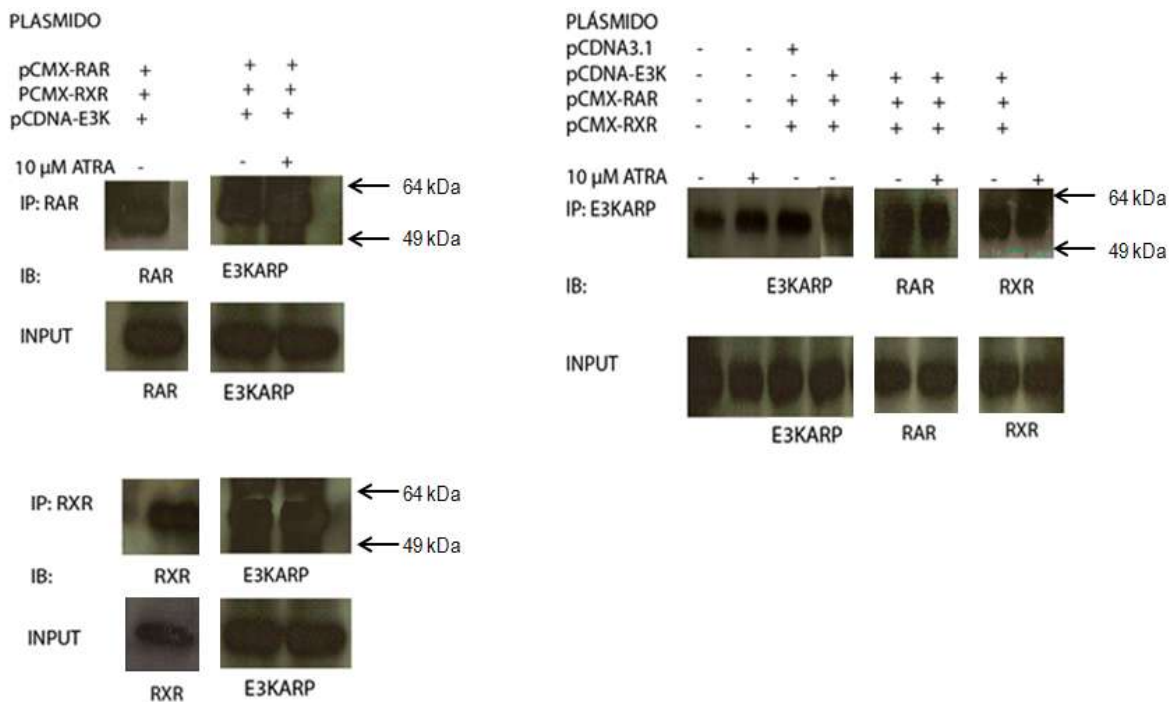


Figura 12. E3KARP interactúa con RAR α y RXR α *in vivo* en células Hek 293T.

6.3 INFLUENCIA DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE UN GEN REPORTERO SINTÉTICO DE LUCIFERASA REGULADO POR LOS RECEPTORES DE ÁCIDO RETINOICO.

Para evaluar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional mediada por RAR α y RXR α , se realizaron transfecciones transitorias de estos tres genes en las líneas celulares CV-1 y HeLa. Para medir los niveles de activación, se co-transfectó como reportero el gen de luciferasa, llamado RARE-luc. La expresión de luciferasa se encuentra regulada por un promotor cuya actividad es dependiente de los receptores RAR α y RXR α , ya que contiene un RARE del tipo DR-5.

Para analizar la eficiencia de la transfección y normalizar los datos obtenidos, se transfectó un reportero de β -galactosidasa, el cual se expresa de forma constitutiva en células de mamífero mediante un promotor de citomegalovirus.

Las células fueron tratadas con el ligando agonista ATRA o con el vehículo DMSO. Los resultados mostrados son un experimento representativo, ya que todos los ensayos se repitieron por lo menos tres veces.

6.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ATRA A UTILIZAR

Varios grupos han reportado que el ATRA puede activar a RAR α y RXR α , sin embargo se reportan al menos tres concentraciones distintas: 100 nM, 500 nM y 1 μ M (Klein, *et al.*, 2000; Farboud *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2010). Se realizaron experimentos para determinar la concentración más adecuada de activación de los receptores en nuestro sistema, por este ligando agonista. Se transfectó el reportero RARE-luc, y ambos receptores y las células fueron tratadas con 100 nM, 500 nM y 1 μ M de ATRA o con DMSO, como

vehículo. Como se observa en la figura 13, la activación inducida por 1 μM de ATRA es la más fuerte, por lo que todos los experimentos posteriores se realizaron utilizando esta concentración.

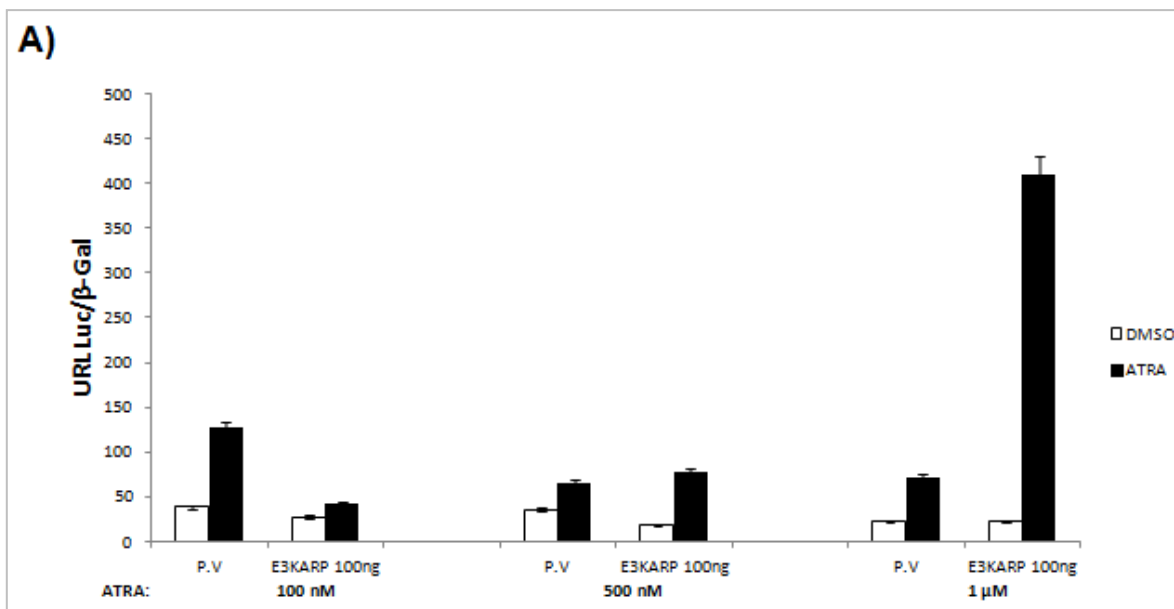


Figura 13. Curva de concentración de ATRA en células CV-1. (A) Se muestran los valores de unidades relativas de luz de luciferasa (URL) normalizadas con las unidades relativas de luz (URL) de β -galactosidasa. Cada muestra fue tratada con DMSO o con 100 nM, 500 nM ó 1 μM de ATRA

6.3.2 EFECTO DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR RAR α Y RXR α EN UN PROMOTOR SINTÉTICO TIPO DR-5.

Se ha mostrado con anterioridad que E3KARP es un coactivador de los receptores nucleares esteroides ER, AR, PR y GR (Sánchez-Alcántara, 2003). Habiendo ejemplos de coactivadores que se comparten entre los miembros de la súper-familia, como SRC-1, se evaluaron diferentes concentraciones de E3KARP para determinar si puede incrementar los niveles de transcripción del heterodímero de RAR α -RXR α en un promotor sintético.

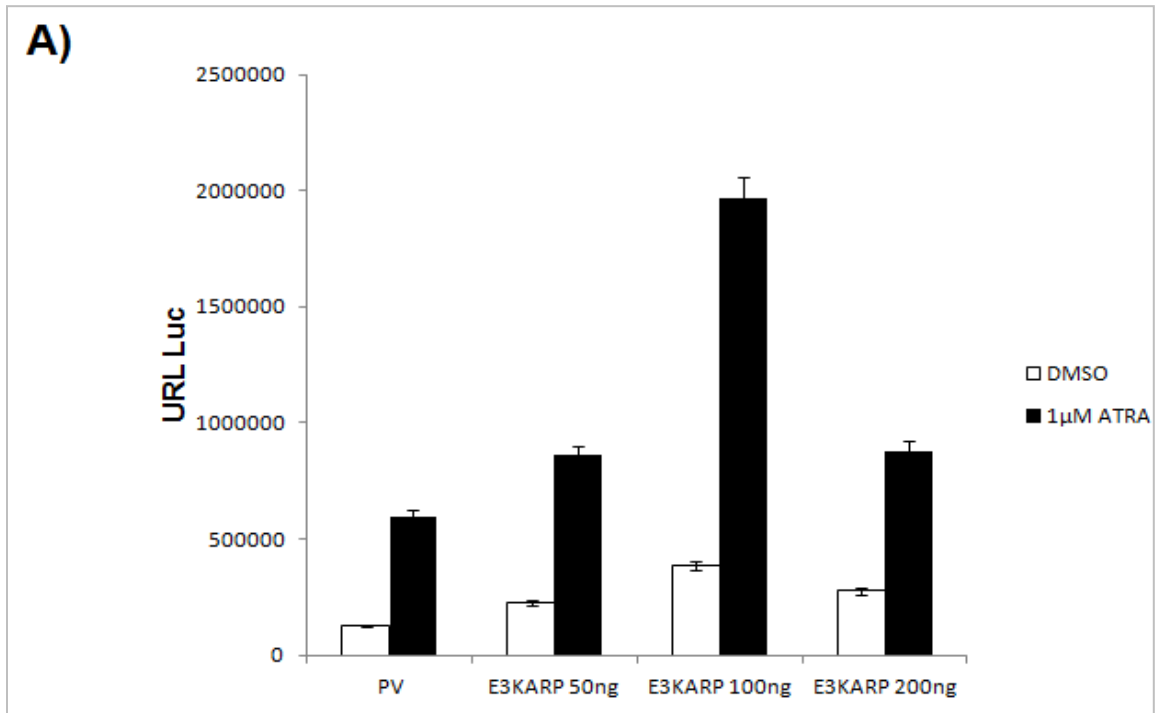


Figura 14. E3KARP incrementa la transcripción de luciferasa (promotor DR-5) cuando se transfecta a concentraciones crecientes en células CV-1. (A) Se muestran los valores de unidades relativas de luz de luciferasa. Cada muestra fue tratada con DMSO o con 1µM de ATRA.

Para demostrar tal efecto, se realizaron experimentos de activación transcripcional del reportero RARE-luc mediada por RAR α -RXR α en las células CV-1 en presencia y ausencia de su ligando ATRA y transfectando concentraciones crecientes de E3KARP (50, 100 y 200 ng). El control P.V. (plásmido vacío), corresponde al efecto de los receptores sobre el promotor en ausencia de la sobre-expresión de proteínas accesorias.

Bajo estas condiciones, se observó un incremento ligero en actividad transcripcional al transfectar E3KARP (50 ng) comparado con el plásmido vacío. Al transfectar 100 ng de plásmido, la actividad basal y en presencia de hormona aumenta tres veces con respecto al control. Se observó que al transfectar concentraciones mayores de E3KARP (200 ng),

la actividad basal y en presencia de hormona disminuye (figura 14), siendo comparable al control.

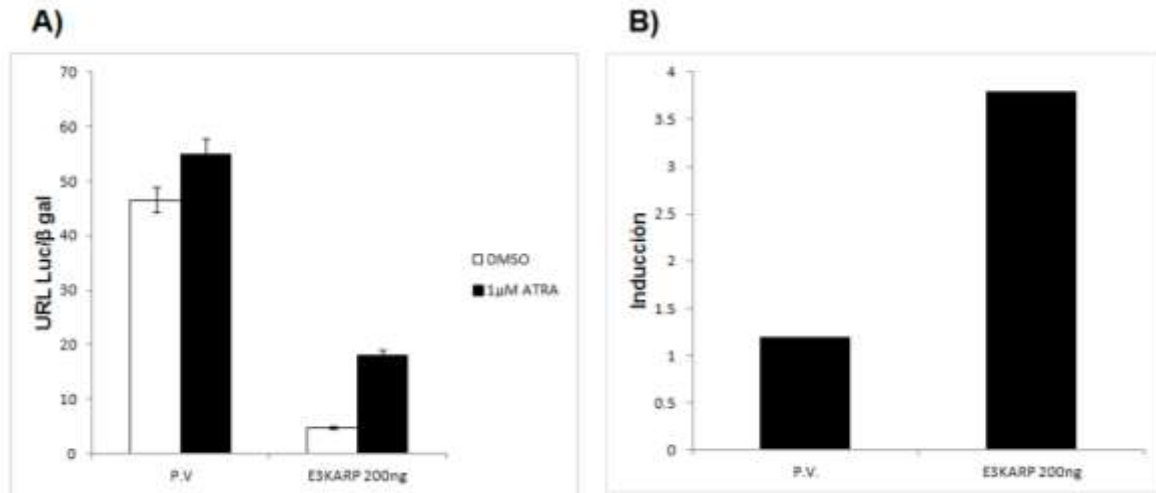


Figura 15. E3KARP aumenta la transcripción mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor sintético tipo DR-5 en células HeLa. (A) Se muestran las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa normalizadas con los valores de las unidades de luz (URL) de β-galactosidasa. Las células se trataron con DMSO o con 1 μM de ATRA. (B) Se muestran los valores de la inducción (cociente entre la actividad en presencia de hormona y en ausencia de hormona) en cada condición.

Para confirmar estos resultados, se llevaron a cabo experimentos de activación transcripcional mediada por RAR-RXR en células HeLa, en presencia y ausencia de ATRA y en presencia y ausencia de E3KARP (200 ng) (figura 15). Para estos ensayos, se calculó la inducción, que es el cociente entre la actividad transcripcional en presencia de hormona y la actividad en ausencia de ésta. Se utilizó el control negativo plásmido vacío a 200 ng. Se observó un incremento de 3 veces en la inducción al sobre-expresar E3KARP, comparado con el plásmido vacío.

Los resultados anteriores sugieren que E3KARP es un coactivador de RAR α y RXR α en el contexto de un promotor sintético del tipo DR-5.

6.3.3 EFECTO DE SRC-1 Y PINX-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA REGULADA POR RAR α Y RXR α EN UN PROMOTOR SINTÉTICO TIPO DR-5.

Con el fin de evaluar más detalladamente la actividad transcripcional de RAR α y RXR α sobre el reportero RARE-luc, se midió la expresión de luciferasa al transfectar SRC-1, que ya ha sido caracterizado como un coactivador de RAR α . Adicionalmente, se transfectó PINX-1, que es un correpresor de ER α (datos sin publicar).

Se observó que al transfectar E3KARP, se incrementa 2.4 veces la actividad transcripcional de RAR α y RXR α . El mismo efecto se observa en el caso de SRC-1, ya que la inducción aumenta 2.8 veces. PINX-1 muestra un efecto de activación sobre la expresión de luciferasa, tanto en presencia como en ausencia de hormona (ver figura 16).

Es importante notar que E3KARP aumenta la expresión de la luciferasa en niveles comparables a los del coactivador SRC-1, por lo que estos resultados apoyan la hipótesis de que E3KARP es un coactivador de RAR α y RXR α . A partir de estos experimentos no es posible deducir que papel podría tener PINX-1 en la regulación mediada por RAR α y RXR α . Se requieren más experimentos para clarificar este fenómeno.

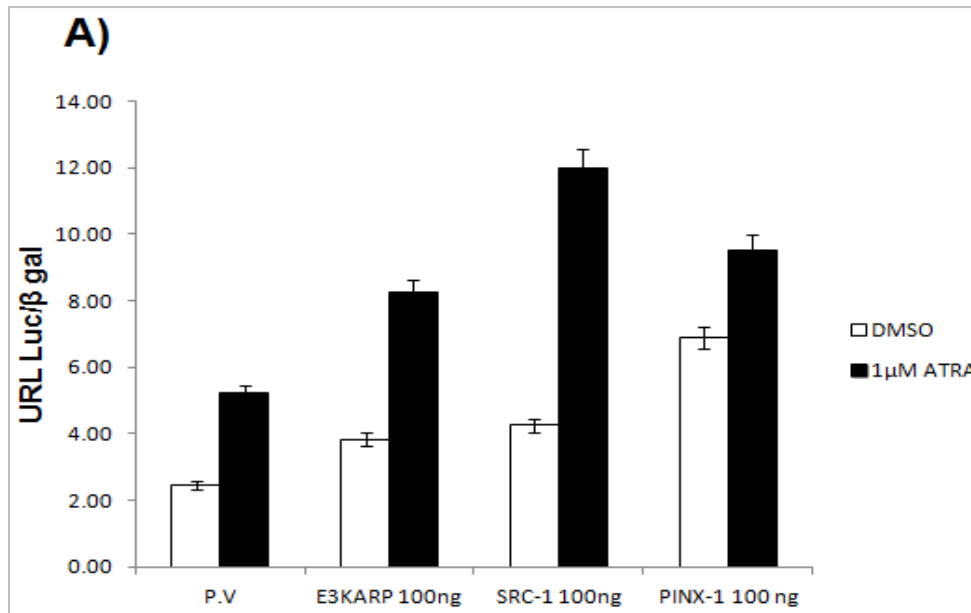


Figura 16. Efecto de E3KARP, SRC-1 y PINX-1 en la actividad transcripcional mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor tipo DR-5, en la línea celular HeLa. (A) Se muestran las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa normalizadas con los valores de las unidades de luz (URL) de β- galactosidasa. Las muestras fueron tratadas con DMSO o con 1 μM de ATRA.

6.4 INFLUENCIA DE RAR α y E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE UN REPORTERO DE LUCIFERASA REGULADO POR EL PROMOTOR DEL GEN DE LA HISTIDASA HEPÁTICA (*HAL*).

Anteriormente, se había reportado que el receptor que PPAR α regula negativamente la actividad transcripcional del promotor del gen *HAL* en presencia de un ligando agonista y del coactivador PGC-1 α , mientras que GR lo regula positivamente en presencia de su ligando agonista (Alemán *et al.*, 2008). Análisis *in silico* mostraron que esta región regulatoria contiene múltiples sitios de unión para diversos factores de transcripción, como GR, PPAR α y CREB, entre otros. (Alemán *et al.*, 2008). Además, un estudio anterior demuestra que ATRA modula negativamente la expresión de *HAL* en queratinocitos

(Eckhart *et al.*, 2008). Por lo tanto, se hizo necesario caracterizar si RAR α y RXR α regulan de manera directa este promotor.

Para evaluar esta posibilidad, y demostrar que los efectos mostrados en la expresión de la luciferasa eran debidos a la regulación de transcripcional mediada por RAR α , se realizaron curvas en las que se transfectó RAR α a concentraciones crecientes. Como control negativo, se introdujo a la célula solamente el reportero, lo que constituye la actividad basal del promotor en ausencia de la sobreexpresión de receptores retinoicos.

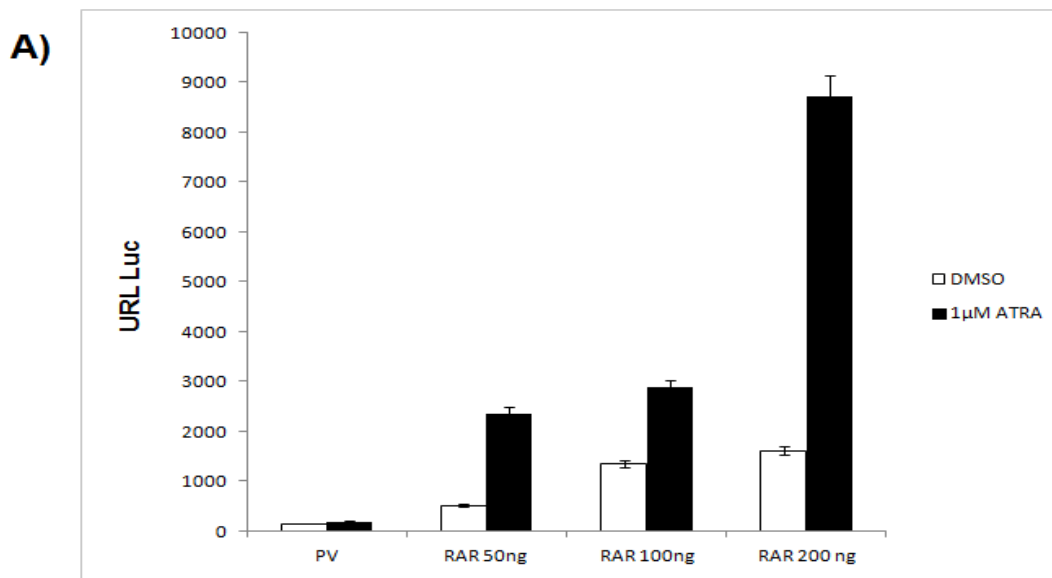


Figura 17. RAR α incrementa la expresión de luciferasa en el contexto del promotor natural tipo DR-1 en células CV-1. (A) Se muestran los valores de unidades relativas de luz de luciferasa. Cada muestra fue tratada con DMSO o con 1 μ M de ATRA.

Se observó que en esta línea celular no hay activación del promotor de HAL en ausencia de transfección con RAR/RXR aún en presencia de ATRA. Al transfectar RAR/RXR, se observó un incremento de 3.6 veces en la actividad al transfectar RAR α a una concentración de 50 ng comparado con el control negativo, un aumento de 1.7 veces a la

concentración de 100 ng de plásmido transfectado y un aumento de 4 veces al transfectar 200 ng de RAR α (figura 17).

Por lo tanto, sugerimos que RAR α , en presencia de ATRA es capaz de regular positivamente la expresión de *HAL* en células de mamífero.

6.4.1 EFECTO DE E3KARP SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA EN EL PROMOTOR DE HAL CON ELEMENTOS TIPO DR-1.

Una vez que se demostró que RAR α regula la expresión de luciferasa con el promotor del gen *HAL* en células CV-1, se realizaron experimentos para dilucidar el papel de E3KARP en esta modulación.

En estos ensayos, se transfectaron ambos receptores en presencia de E3KARP o SRC-1 en concentraciones crecientes y en presencia o ausencia de ATRA (1 μ M) y se calculó la inducción, como ya se había mencionado anteriormente. Como se esperaba, se observó un efecto positivo sobre la actividad transcripcional del promotor del gen *HAL* al sobre-expresar los receptores, sin importar la cantidad de plásmido vacío transfectado. El tratamiento con ATRA generó inducciones muy similares en estas condiciones, siendo éstas de 7, 6.5 y 5.6 veces, por lo que se confirman los resultados de experimentos anteriores y además se descarta que la transfección en sí misma altere los datos obtenidos.

Al transfectar SRC-1, se observa un incremento en la actividad transcripcional mediada por RAR α y RXR α , aumentando 26 veces con respecto al control sin hormona. Es importante mencionar que SRC-1 fue transfectado a las mismas concentraciones que

E3KARP y el control P.V, y que en todos los casos la actividad transcripcional aumentó conforme a la concentración de plásmido (datos no mostrados).

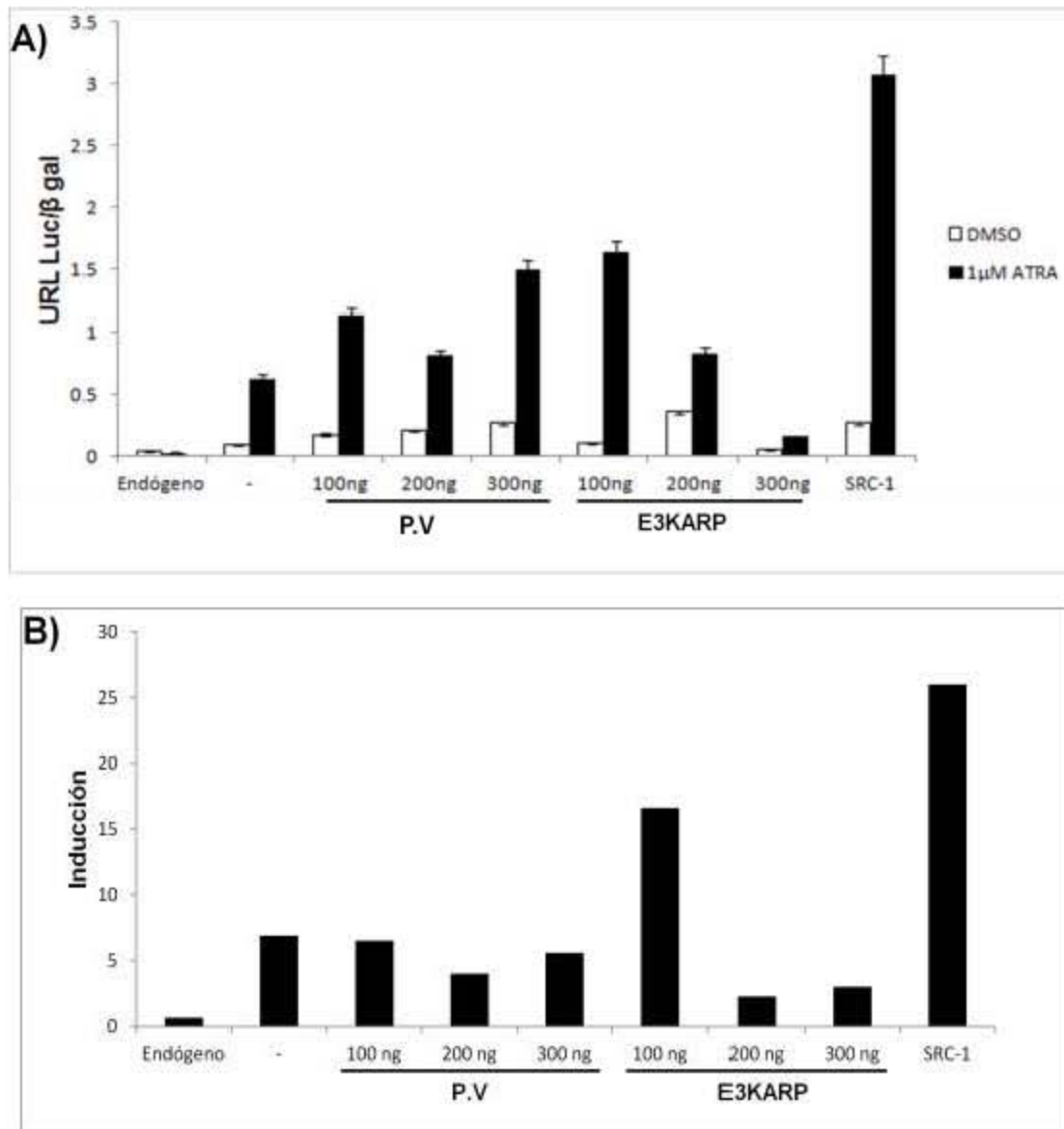


Figura 18. La sobre-expresión de E3KARP promueve la disminución de la transcripción mediada por RAR y RXR en el contexto del promotor natural (HAL) tipo DR-1 en la línea celular CV-1. (A) Se muestran las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa normalizadas con los valores de las unidades de luz (URL) de β -galactosidasa. Las células se trataron con DMSO o con 1 μ M de ATRA. **(B)** Se muestran los valores de la inducción (cociente entre la actividad en presencia de hormona y en ausencia de hormona) en cada condición.

Sorprendentemente, al introducir E3KARP, se observa una disminución de la actividad transcripcional que depende de la concentración de plásmido transfectado, reduciendo la inducción de 16 veces a 2 veces y 3 veces. Si comparamos estas inducciones con su correspondiente control negativo (inducción con plásmido vacío), observamos que disminuye casi tres veces con respecto a éste.

Por lo tanto, aun cuando a bajas concentraciones la sobre-expresión de E3KARP parece activar a este promotor, a mayores concentraciones promueve la inhibición del promotor natural tipo DR-1 del gen *HAL*, en este contexto celular, a diferencia de lo que sucede con un promotor sintético DR-5 (figura 18).

Con el fin de confirmar el efecto de E3KARP sobre la actividad transcripcional mediada por RAR α -RXR α en este promotor, se realizaron ensayos en otro contexto celular (células HeLa). Se transfectaron ambos receptores, el reportero *HAL* C-luc y E3KARP (200 ng) o el control plásmido vacío. Sorprendentemente, se observó que la transfección de E3KARP aumenta 7.6 veces la actividad transcripcional sobre el promotor de *HAL*, en comparación con el plásmido vacío (figura 19). Estos resultados sugieren que el efecto de E3KARP en la regulación transcripcional mediada por RAR α -RXR α en este promotor podría ser dependiente del contexto celular y/o de la disponibilidad de correguladores en cada tipo celular.

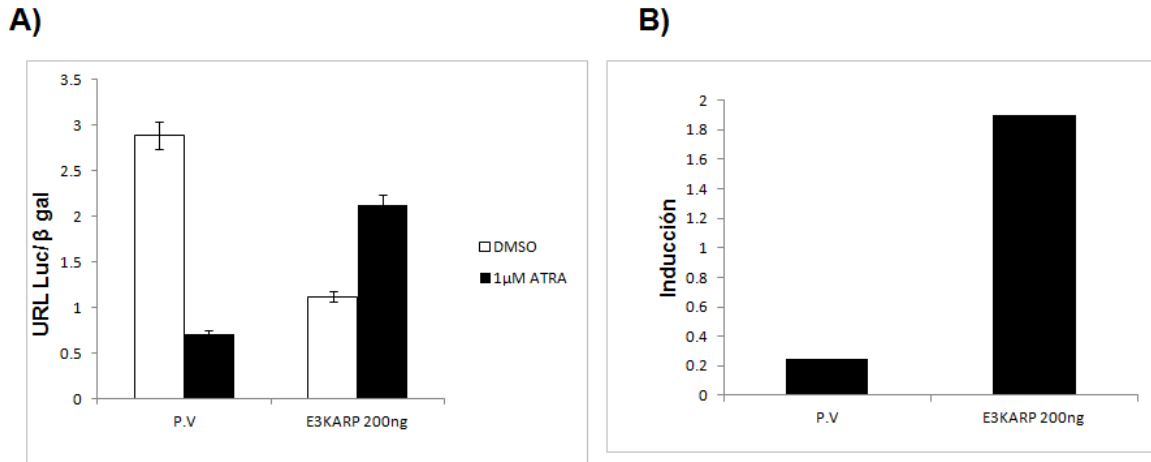


Figura 19. E3KARP activa la expresión de luciferasa mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor natural tipo DR-1 (HAL) en la línea celular HeLa. (A) Se muestran las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa normalizadas con los valores de las unidades de luz (URL) de β-galactosidasa. Las células se trataron con DMSO o con 1 μM de ATRA. (B) Se muestran los valores de la inducción (cociente entre la actividad en presencia de hormona y en ausencia de hormona) en cada condición.

6.4.2 EFECTO DE SRC-1 Y PINX-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LUCIFERASA EN EL PROMOTOR DE HAL CON ELEMENTOS TIPO DR-1.

Para caracterizar el papel de distintos correguladores en la actividad transcripcional mediada por RARα y RXRα en el contexto de este promotor, se midió la expresión de la luciferasa bajo las mismas condiciones que se describen en la sección de metodología. El control negativo utilizado fue el vector vacío a una concentración de 100 ng. Las células utilizadas fueron HeLa.

Al transfectar E3KARP, se observó un ligero incremento en la actividad comparada con el control plásmido vacío, mientras que SRC-1 aumentó 6 veces esta actividad. PINX-1 disminuyó la actividad, de manera comparable al control negativo (figura 20). Por lo tanto, E3KARP parece promover la activación transcripcional de este promotor en este

contexto celular y PINX-1 promueve la inhibición de este promotor, en comparación con el control.

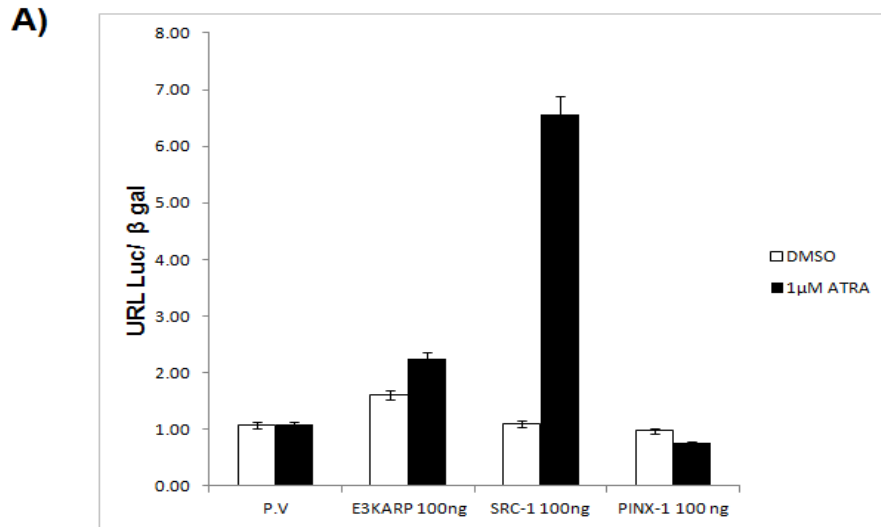


Figura 20. Efecto de E3KARP, SRC-1 y PINX-1 en la actividad transcripcional mediada por RAR y RXR en el contexto de un promotor natural tipo DR-1, en células HeLa. (A) Se muestran las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa normalizadas con los valores de las unidades de luz (URL) de β-galactosidasa. Las muestras fueron tratadas con DMSO o con 1 μM de ATRA.

7 DISCUSIÓN

La identificación de nuevos correguladores y la caracterización de los mecanismos asociados a la regulación génica en células transformadas es relevante para obtener una comprensión más detallada de la biología del cáncer y la validación de mejores blancos terapéuticos para este conjunto de enfermedades.

En los últimos años, se han identificado y caracterizado un gran número de correguladores que se unen a distintos miembros de la súper-familia de receptores nucleares, ya sean del grupo de receptores esteroides o no-esteroides. Estas

interacciones pueden tener efectos positivos o negativos sobre la actividad del receptor nuclear. Varios de estos correguladores actúan sobre receptores de tipo I y tipo II, de la misma manera, por ejemplo: SRC-1, un coactivador general de receptores nucleares esteroides y no-esteroides, incluyendo RAR α ; CBP, un coactivador de ER α , AR, PR y RAR α (Heery, *et al.*, 1997); PGC1- α , un coactivador de PPAR γ , RXR α , HNF-4 α , ER α y GR (Puigserver *et al.*, 1999; Knutti *et al.*, 2000; Tcherepanova *et al.*, 2000; Delerive, *et al.*, 2002; Bhalla *et al.*, 2004), y los correpresores N-CoR y SMRT, que inhiben la transcripción mediada por los receptores nucleares esteroides y no-esteroides (Wei, 2003).

En la primera parte de este trabajo, se demostró que E3KARP interactúa con RAR α y RXR α *in vivo* en células de mamífero por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación, mostrando por primera vez que E3KARP se une a receptores nucleares no-esteroides. Los resultados muestran que este corregulador se encuentra en el mismo complejo con el heterodímero RAR α -RXR α , tanto en presencia como ausencia de un ligando agonista, como ya se ha demostrado previamente con otros coactivadores, como PCAF y NSD-1 (Blanco *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998). Estos resultados no muestran si la unión entre los receptores y E3KARP es directa o indirecta, ni determinan qué residuos de estas proteínas son relevantes para esta interacción. Estos puntos deberán analizarse en futuros estudios y se requerirán más experimentos para determinar los detalles de estas interacciones. Sin embargo, se conoce que E3KARP interactúa preferentemente con la región amino-terminal de los receptores esteroides estudiados anteriormente por nuestro grupo, por lo que es probable que la interacción se lleve a cabo en este dominio.

Por definición, un coactivador incrementa la actividad transcripcional de un factor de transcripción. Para realizar esta determinación, se utilizó un reportero que contiene elementos de respuesta canónicos DR-5 y observamos que E3KARP es un coactivador del heterodímero RAR α -RXR α en este contexto, en dos líneas celulares de mamífero. El

arreglo específico y número de nucleótidos espaciadores entre ambas mitades de la secuencia RARE determinan la selectividad de la unión a cada elemento de respuesta, la polaridad de la unión del heterodímero a estas secuencias y la regulación transcripcional mediada por los receptores. En elementos de respuesta tipo DR-5 o DR-2, el compañero de dimerización RXR de un heterodímero RAR-RXR ocupa la mitad 5'. Este arreglo particular o "polaridad del heterodímero", promueve cambios conformacionales en RAR que tienen como resultado la disociación de correpresores, después de la unión a ligando. Además, estos cambios conformacionales facilitan la unión de coactivadores al heterodímero y por lo tanto, la activación de la transcripción del gen blanco (Sanguedolce *et al.*, 1997).

Nosotros sugerimos que E3KARP, además de ser por sí mismo un coactivador, puede funcionar como plataforma de unión a otros coactivadores en el contexto de un promotor tipo DR-5, ya que se le considera proteína de andamiaje en varios contextos, tanto nucleares como citoplasmáticos y no parece poseer una actividad enzimática intrínseca (Weinman *et al.*, 1995; Shenolikar *et al.*, 2001). Es necesario probar esta hipótesis en estudios posteriores, realizando ensayos de coimmunoprecipitación de cromatina, en donde se evaluara la presencia de coactivadores y correpresores conocidos, en el promotor de *HAL* (DR-1) y *RAR β* (DR-5).

Después de haber comprobado que RAR tenía actividad positiva sobre el promotor de *HAL*, en presencia de ATRA, quisimos determinar el efecto de E3KARP sobre este promotor complejo que contiene sitios de tipo DR-1. Esto fue interesante ya que Eckhart *et al.* (2005) habían observado la inhibición de *HAL* en queratinocitos después del tratamiento con ATRA. Sin embargo, se observó que al sobre-exresar RAR en presencia de ATRA, había un incremento en la actividad del promotor en dos líneas

celulares, sugiriendo que la actividad de este promotor puede ser dependiente del contexto celular.

Se demostró además que E3KARP regula negativamente la activación transcripcional del promotor natural de la histidasa hepática (*HAL*), en presencia de ATRA, en la línea celular CV-1. Este efecto es dependiente de la concentración de plásmido transfectado. En un estudio previo, se había demostrado que PPAR α regula negativamente la actividad transcripcional de este promotor en presencia de un ligando agonista y del coactivador PGC-1 α (Alemán *et al.*, 2008). Como en el caso de los promotores tipo DR-5, anteriormente se ha reportado que el arreglo y número de los nucleótidos espaciadores de ambas mitades del elemento de respuesta es relevante en la modulación de la actividad de los heterodímeros RAR y RXR. En los RARE tipo DR-1, la polaridad de los receptores se invierte, por lo que RAR se encuentra en la posición 5'. En algunos casos, cuando esto sucede, la unión de un ligando agonista no provoca la disociación de los correpresores, resultando en la inhibición de la expresión del gen blanco (Sanguedolce *et al.*, 1997). Sin embargo, existen ejemplos en la literatura que sugieren la participación de otros factores en este mecanismo.

Se ha reportado la existencia de RARE tipo DR-1 activos, en los que RAR-RXR regulan positivamente la expresión génica. Durand y colaboradores (1992), reportaron este efecto en el gen *CRABPII* en líneas celulares de carcinoma embrionario (P19). Otro estudio muestra que RAR β y RXR modulan positivamente la expresión del gen murino *Ssm*, que igualmente contiene sitios DR-1 en su promotor (Han, *et al.*, 2007). Los autores del primer estudio explican estos resultados por medio de un modelo en el que no existe un único patrón de reconocimiento por parte de los heterodímeros RAR-RXR sobre el DNA, mientras que los autores del segundo reporte sugieren que la disponibilidad de las distintas isoformas de los receptores en cada contexto celular, podrían regular el efecto en

la expresión génica en este tipo de elementos de respuesta. Al ser una proteína de andamiaje, es posible que el efecto que observamos con E3KARP a altas concentraciones se podría deber al reclutamiento de proteínas represoras al promotor o tener un efecto a nivel citoplasmático donde este involucrado en retener proteínas en el citoplasma o modificar el comportamiento de algunas vías de señalización.

Nosotros observamos que E3KARP aumentó la actividad transcripcional mediada por RAR α -RXR α sobre el promotor de *HAL* en células HeLa. Este incremento puede explicarse de dos maneras. La primera se basa en el hecho de que este promotor natural contiene múltiples sitios de reconocimiento para otros factores de transcripción, además de los RARE tipo DR-1: posee un GRE, tres sitios de unión para Ap1, dos sitios de unión para CREB y un sitio específico para Sp1 (Alemán *et al.*, 2008). Cualquiera de las proteínas antes mencionadas puede explicar la modulación positiva de la transcripción en el contexto de este promotor natural. Nosotros sugerimos que estas observaciones podrían representar un efecto positivo de E3KARP sobre el GR endógeno que expresan las células HeLa, ya que anteriormente se ha demostrado que E3KARP es un coactivador de este receptor y de otros receptores nucleares esteroides (Sánchez-Alcántara, 2003). En futuros estudios, será necesario realizar ensayos de actividad transcripcional transfectando el reportero *HAL*, GR y E3KARP en presencia y ausencia de hormona, para saber si GR y E3KARP regulan este promotor. Es importante mencionar que la línea celular CV-1 no expresa de manera endógena GR o algún otro receptor nuclear esteroide, lo cual refuerza nuestra explicación sobre los distintos efectos de E3KARP en la transcripción del reportero con un promotor natural tipo DR-1 observados entre ambas líneas celulares. Aunque esta explicación sea correcta, no se puede descartar la participación del heterodímero RAR α -RXR α en el mecanismo, ya que en estos experimentos la adición de ATRA provoca una inducción de la expresión del gen

reportero. Es posible que múltiples factores se encuentren regulando la actividad transcripcional en este promotor y que E3KARP pueda mediar la unión a distintos receptores nucleares y/o factores de transcripción en células HeLa. Además, es posible que estos mecanismos dependan de la disponibilidad de correguladores en contextos celulares distintos, como otros autores ya han sugerido anteriormente para el caso de los RARE tipo DR-1 (Han, *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el modelo de cambios en la polaridad en los distintos contextos del promotor, ya sea del tipo DR-1 o del tipo DR-5, explican parcialmente los efectos opuestos sobre la actividad transcripcional de los receptores. Se comprobó que RAR, por sí solo, regula positivamente la expresión del reportero *HAL* en respuesta al tratamiento con ATRA y que la sobre-expresión de E3KARP disminuye la actividad transcripcional en este contexto. Este efecto inhibitorio es dependiente de la cantidad de plásmido transfectado. Nosotros explicamos estos resultados por medio de un mecanismo en el que el heterodímero RAR α -RXR α se encuentre reclutando coactivadores y que, por lo tanto, se esté promoviendo la transcripción del gen reportero. Al transfectar E3KARP en concentraciones crecientes, se regula negativamente esta expresión, por lo que sugerimos que E3KARP promueve la inhibición de la transcripción de *HAL* en células CV-1. Proponemos un modelo en el que RAR α -RXR α modula a los promotores con RARE tipo DR-1 a dos niveles: a nivel de arreglo y espaciamiento del RARE (contexto del promotor) y a nivel de correguladores y/o factores de transcripción reclutados por los receptores. En estudios posteriores, estos mecanismos deberán dilucidarse por medio de la construcción de vectores con RAREs mutados y por ensayos de co-inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en donde se detectara si E3KARP se encuentra interactuando con los dos tipos de promotores (DR-1 y DR-5) y si existen cambios sobre las proteínas ancladas dependientes del contexto del promotor y/o del contexto celular.

Con estos experimentos, podremos saber si ambos niveles de regulación son importantes para determinar la promoción o inhibición de la expresión de genes.

Bajo este mismo modelo, E3KARP puede funcionar como una plataforma de unión a distintas moléculas, ya que reclutaría a otros coactivadores en el contexto de un promotor tipo DR-5, mientras que facilitaría la unión de correpresores o bloquearía la unión de coactivadores en el contexto de un promotor tipo DR-1. En el primer caso, el resultado es una modulación positiva de la actividad transcripcional de RAR α -RXR α y en el segundo caso, una regulación negativa. Sin embargo, se conoce que E3KARP interactúa con varios receptores nucleares diferentes y varias otras proteínas citoplasmáticas y nucleares, por lo que este mecanismo de inhibición podría ser mediado por interacción con otras proteínas y no directamente a nivel del promotor. Para determinar si E3KARP realmente funciona como un correpresor en este contexto, se tendrán que realizar más estudios, en donde se sobre-expresara y silenciara E3KARP, se tratara a las células con ATRA y después se determinara el número de copias del RNA mensajero del gen *HAL* por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR).

Los datos obtenidos con el promotor natural tipo DR-1 del gen *HAL* arrojan otra perspectiva interesante. Un estudio anterior demostró que la expresión del gen *HAL* es regulada negativamente por el tratamiento con ATRA (1 μ M) en queratinocitos (Eckhart *et al.*, 2008). Se ha caracterizado la función del producto proteico de *HAL*, la histidasa hepática, que es la de metabolizar la L-histidina y convertirla en ácido urocaínico. En el hígado, el ácido urocaínico es metabolizado hasta obtener ácido glutámico, mientras que en la piel este producto se acumula en las células y las protege contra los rayos UV (Barresi *et al.*, 2011). En este estudio, demostramos por primera vez que RAR α y RXR α son mediadores en la regulación de este gen y que además, E3KARP está involucrado en

este mecanismo de manera dosis-dependiente, en células CV-1. Tomando en cuenta todas las evidencias anteriores, sería importante analizar el papel de los receptores nucleares RAR α y RXR α y la proteína E3KARP en la regulación transcripcional del gen *HAL* y el efecto que tendría en el metabolismo de histidina y/o en la fotoprotección contra rayos UV.

Los datos muestran que PINX-1 funciona como un correpresor de RAR-RXR en ambos promotores y en las dos líneas celulares utilizadas. Estos resultados corresponden con estudios anteriores, en los que se demostró que PINX-1 es un correpresor de ER α . Sin embargo, es necesario caracterizar que PINX-1 es un correpresor de RAR y RXR por medio de estudios de qRT-PCR y ChIP.

En este trabajo, se utilizó SRC-1 como un control positivo para llevar a cabo los experimentos, ya que es un coactivador bien caracterizado de RAR α -RXR α . Nosotros confirmamos este efecto positivo en la transcripción para ambos promotores y consideramos que SRC-1 es una proteína coactivadora con actividad de acetilasa de histonas que no es regulada por el contexto del promotor. Por el contrario, nosotros sugerimos que E3KARP es un corregulador que sí es modulado por el contexto del promotor y que, debido a que es considerada como una proteína de andamiaje, coordina la unión de múltiples factores que generan distintos efectos en la expresión.

Otra de las perspectivas sugeridas a partir de este trabajo, es la caracterización de las proteínas que son reclutadas en cada promotor. Como ya se ha mencionado antes, nosotros sugerimos que el contexto celular y del promotor y el reclutamiento diferencial de correguladores y/o factores de transcripción mediado por los receptores y E3KARP podría ser uno de los mecanismos que expliquen los efectos contrarios en la expresión regulada por los dos tipos de promotores. Conocer qué actores participan en estos procesos

celulares y qué importancia tiene el contexto del promotor en la regulación de la expresión de genes son puntos clave a investigar en el futuro.

8 CONCLUSIONES

A partir del trabajo de caracterización de E3KARP como corregulador de receptores retinoicos en dos promotores distintos, y de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que, en primer lugar, E3KARP interactúa con RAR α y RXR α *in vivo* en presencia y ausencia del ligando agonista ATRA en células de mamífero, siendo la primera vez que se demuestra que E3KARP se une a receptores nucleares no esteroides.

Se demostró que E3KARP incrementa los niveles de transcripción mediados por RAR α y RXR α en el contexto de un promotor sintético tipo DR-5, de manera comparable al efecto que tiene SRC-1 en este promotor, por lo que sugerimos que E3KARP es un coactivador de RAR α y RXR α en este contexto.

Se comprobó que RAR α y su compañero de dimerización RXR α , por sí mismos aumentan los niveles de transcripción en el promotor natural tipo DR-1 del gen *HAL*, en presencia de ATRA y que la sobre-expresión de E3KARP disminuye la actividad transcripcional mediada por los receptores en este contexto, en células CV-1, por lo que sugerimos que RAR modula positivamente al gen *HAL* y que E3KARP está involucrado en la inhibición directa o indirecta de este gen.

Sorprendentemente, se observó que E3KARP aumenta los niveles de transcripción mediados por RAR α y RXR α en el contexto del promotor natural del gen *HAL* en células HeLa, sugiriendo que esta regulación podría depender del contexto celular. Nosotros sugerimos que la regulación de la transcripción en este promotor natural se da a nivel del

elemento de respuesta específico y del reclutamiento diferencial de correguladores por parte de los receptores y proteínas de andamiaje como E3KARP. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos que determinen las proteínas que son reclutadas en ambos promotores y qué papel puede tener E3KARP como plataforma de unión a múltiples moléculas. Deben realizarse, asimismo, estudios en donde se establezca el papel de RAR α , RXR α y E3KARP en el metabolismo de la histidina y/o fotoprotección contra los rayos UV.

PINX-1 se comporta como un corregulador que aumenta o disminuye la actividad de RAR α y RXR α , dependiendo del promotor, sin embargo, deben realizarse más experimentos para confirmar estos resultados.

PERSPECTIVAS

1. Determinar si la interacción entre RAR RXR y E3KARP se realiza de forma directa o indirecta, e identificar los residuos que medían esta interacción.
2. Dilucidar el mecanismo mediante el cual E3KARP regula la actividad transcripcional de RAR y RXR e identificar qué proteínas son reclutadas en ambos promotores, del tipo DR-1 y del tipo DR-5.
3. Confirmar que E3KARP es un corregulador cuyo efecto sobre RAR y RXR depende del contexto del promotor.
4. Caracterizar a PINX-1 como un correpresor de RAR y RXR.
5. Evaluar el papel de RAR y RXR y la proteína E3KARP en la regulación transcripcional del gen *HAL* y el efecto que podría tener en el metabolismo de la histidina y fotoprotección contra rayos UV.

6. Determinar el papel de E3KARP en procesos celulares como diferenciación y apoptosis.

9 REFERENCIAS

Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H.(2007). RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease *Nature Reviews. Drug Discovery* (10): 793-810.

Aranda A, Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews* 81:1269-1304.

Barresi C, Stremnitzer C, Mlitz V, Kezic S, Kammeyer A, Ghannadan M , Posa-Markaryan K, Selden C, Tschachler E, Eckhart L. (2011). Increased Sensitivity of Histidinemic Mice to UVB Radiation Suggests a Crucial Role of Endogenous Urocanic Acid in Photoprotection. *Journal of Investigative Dermatology* 131: 188–194.

Bastien J, Rochette-Egly C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16.

Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly JM, Chambon P, Rochette-Egly C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor α and phosphorylates its AF-1-activating domain through *cdk7* *Journal of Biological Chemistry* 275: 21896-21904.

Bhalla S, Ozalp C, Fang S, Xiang L, Kemper JK .(2004). Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *Journal of Biological Chemistry* :279, 45139-45147.

Blanco JCG, Minucci S, Lu J. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes and Development* 12: 1638-1651.

Bour G, Gaillard E, Bruck N, Lalevée S, Plassat JL, Busso D, Samama JP, Rochette-Egly C.(2005). Cyclin H binding to the RARalpha activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(46):16608-16613.

Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Molecular Cell* 5: 289-298.

Bruck N., Vitoux D., Ferry C., Duong V., Bauer A., de The H, Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR alpha to target promoters. *EMBO Journal* 28: 34-47.

Bushue N, Wan YJ.(2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Advanced drug delivery reviews* 62(13):1285-1298.

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

Delerive P, Wu Y, Burris TP, Chin WW, Suen CS. (2002). PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277: 3913–3917.

Dietze EC, Troch MM, Bowie ML, Yee L, Bean GR, Seewaldt VL. (2003). CBP/p300 induction is required for retinoic acid sensitivity in human mammary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 302(4): 841-848.

Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Tse CM, Li X. (2005). NHERF family and NHE3 regulation. *Journal of Physiology* 567: 3-11.

Durand B, Saunders M, Leroy P, Leid M, Chambon P.(1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 71(1):73-85.

Eckhart L, Schmidt M, Mildner M, Mlitz V, Abtin A, Ballaun C, Fischer H, Mrass P, Tschachler E. (2008). Histidase expression in human epidermal keratinocytes: regulation by differentiation status and *all-trans* retinoic acid. *Journal of dermatological science* 50 (3): 209-215

Farboud B, Hauksdottir H, Wu Y, Privalsky ML. (2003). Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Molecular and cellular biology*: 23(8):2844-2858.

Germain P, Altucci L, Bourguet W, Rochette-Egly C, Gronemeyer H. (2003). Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling. *Pure and Applied Chemistry*, 1619-1664.

Gibbs NK, Norval M. (2011). Urocanic Acid in the Skin: A Mixed Blessing?. *Journal of Investigative Dermatology* 131: 14-17

Giordano A, Avantaggiati ML. (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *Journal of Cell Physiology* 181: 218–230.

González FJ. (2008). Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α -mediated transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 23 (1): 2–7.

Han K, Song H, Moon I, Augustin R, Moley K, Rogers M, Lim H. (2007) .Utilization of DR1 as true RARE in regulating the *Ssm*, a novel retinoic acid-target gene in the mouse testis. *Journal of Endocrinology* 192(3):539-551

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*: 387, 733-736.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B. (1995). Ligand independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor. *Nature* 377: 397–404.

Huang EY, Zhang J, Miska EA, Guenther MG, Kouzarides T, Lazar MA. (2000). Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes and Development* 14: 45–54.

Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ, Wang ZY.(1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72(2):567-572.

Huang N, vom Baur E, Garnier JM, Lerouge T, Vonesch JL, *et al.* (1998). Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators. *EMBO Journal* 17: 3398–3412.

Jung Kang Y, Su Jeon E, Jin Lee H, Oh YS, Suh PG, Sup Jung J, Donowitz M, Ho Kim J. (2004). NHERF2 increases platelet-derived growth factor-induced proliferation through PI-3-kinase/Akt-, ERK-, and Src family kinase-dependent pathway. *Cell signalling* 16: 791-800.

Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, Hisaminato A, Fujiwara T, Ito Y, Cantley LC, Yaffe MB. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO Journal*. 19: 6778-6791.

Kastner P, Perez A, Lutz Y, Rochette-Egly C, Gaub MP, Durand B, Lanotte M, Berger R, Chambon P.(1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO Journal* 11(2):629-642.

Kawaguchi R, Yu J, Ter-Stepanian M, Zhong M, Cheng G, Yuan Q, Jin M, Travis GH, Ong D, Sun H. (2011). Receptor-Mediated Cellular Uptake Mechanism That Couples to Intracellular Storage. *ACS Chemical Biology* 6(10):1041- 1051.

Klaholz BP, Mitschler A, Moras D. (2000). Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor *Journal of Molecular Biology* 302: 155-170.

Klein ES, Wang JW, Khalifa B, Gavigan SA, Chandraratna RA.(2000). Recruitment of nuclear receptor corepressor and coactivator to the retinoic acid receptor by retinoid ligands. Influence of DNA-heterodimer interactions. *Journal of Biological Chemistry* 275(25): 19401-19408.

Knutti D, Kaul A and Kralli A. (2000). A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Molecular and Cellular Biology*: 20, 2411-2422.

Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Nikawa N, Matsumoto N. (2001). Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* 279:197–204.

Lansink M, van Bennekum AM, Blaner WS, Kooistra T. (1997). Differences in metabolism and isomerization of all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid between human endothelial cells and hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 247(2):596-604.

Lazar MA. (2003). Nuclear receptor corepressors. *Nuclear Receptor Signalling* 1:e001.

Lee HP, Casadesus G, Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, Gustaw-Rothenberg K, Lerner A.(2009). All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert review in neurotherapeutics* 9(11):1615-1621.

Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM. (1993). Structure of the retinoid X receptor DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260: 1117-1121.

Lefebvre P. (2001). Molecular basis for designing selective modulators of retinoic acid receptor transcriptional activities. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* 2: 153-164.

Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current Drug Metabolism*. 4: 1-10.

Mangelsdorf DJ, Evans R. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-850.

McEwan IJ, Nardulli AM. (2009). Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors. *Nuclear Receptor Signalling* 7, e011.

Moras D, Gronemeyer H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell biology* 10(3):384-391.

Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89(3):373-380.

Niederreither K, Dollé P.(2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature Reviews Genetics* 9(7):541-53.

Noy, N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochemical Journal* 348: 481-495.

Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Muto Y, Friedman SL, Moriwaki H.(2004). Retinoids in cancer chemoprevention. *Current cancer drug targets* 4(3):285-298.

Perlmann, T. (2002). Retinoid metabolism: a balancing act. *Nature Genetics* 31: 84-88.

Poulat F, de Santa Barbara P, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B, Berta P (1997). The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *Journal of Biological Chemistry* 272: 7167-172.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368-1371.

Ren Y, Behre E, Ren Z, Zhang J, Wang Q, Fondell JD. Specific structural motifs determine TRAP220 interactions with nuclear hormone receptors.(2000). *Molecular Cell Biology* 20(15):5433-5446.

Rochette-Egly C., Germain P. (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nuclear Receptor Signalling* 7: 1-18.

Saito Y, Okamura M, Nakajima S, Hayakawa K, Huang T, Yao J, Kitamura M. (2010). Suppression of nephrin expression by TNF-alpha via interfering with the cAMP-retinoic acid receptor pathway. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 298(6):F1436-444.

Sánchez-Alcántara, E. (2003). Caracterización de E3KARP y MAZ como correguladores de receptores de hormonas esteroides. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Suh PG, Hwang JI, Ryu SH, Donowitz M, Kim JH. (2001). The roles of PDZ-containing proteins in PLC-beta-mediated signaling. *Biochemical and Biophysical Research Community* 28:1-7.

Sanguedolce MV, Leblanc BP, Betz JL, Stunnenberg HG. (1997).The promoter context is a decisive factor in establishing selective responsiveness to nuclear class II receptors. *EMBO Journal* 16: 2861–2873.

Shenolikar S, Weinman EJ. (2001). NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 280(3):F389-F395.

Taylor RG, García-Heras J, Sadler SJ, Lafreniere RG, Willard HF, Ledbetter DH, McInnes RR.(1991). Localization of histidase to human chromosome region 12q22-24.1 and mouse chromosome region 10C2-D1. *Cytogenetics and cell genetics* 56:178-181.

Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, McDonnell DP. (2000). Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *Journal of Biological Chemistry* 275:16302–16308.

Torma H. (2011). Regulation of keratin expression by retinoids. *Dermatoendocrinology* 3(3): 136–140.

Urbach J, Rando RR. (1994). Isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. *The Biochemical Journal* 299: 459-465.

Villarroya F, Giralt M, Iglesias R. (1999). Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders* 23:1-6.

von Lintig J, Kiser PD, Golczak M, Palczewski K.(2010). The biochemical and structural basis for trans-to-cis isomerization of retinoids in the chemistry of vision. *Trends in biochemical sciences* 35(7):400-410.

Vucetic Z, Zhang Z, Zhao J, Wang F, Soprano KJ, Soprano DR.(2008). Acinus-S' represses retinoic acid receptor (RAR)-regulated gene expression through interaction with the B domains of RARs. *Molecular cell biology* 28(8):2549-2558.

Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology* 17(10):1901-1909.

Wei LN. (2003). Retinoid receptors and their coregulators. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43:47-72.

Weinman EJ, Steplock D, Shenolikar S.(1995). Characterization of a protein co-factor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Journal of Clinical Investigation* 95: 2143–2149.

Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM.(2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294(5551):2507-11.

Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 10626–10631.

Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. (1998) .The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex

interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(14):7939-7944.

Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A. (1998). NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na¹/H¹ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *Journal of Biological Chemistry* 273: 25856–25863.

Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, Donowitz M. (1997). cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(7): 3010–3015.

.