



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MECANISMO DE REPRESIÓN DEL RECEPTOR DE
ANDRÓGENOS MEDIADO POR EL CORREPRESOR
PHB2: COMPETENCIA CON COACTIVADORES DE
LA FAMILIA p160.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALEJANDRA GONZÁLEZ QUIRINO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx; 2016



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.

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Familia de Receptores nucleares	3
1.2 Receptor de andrógenos	3
1.3 Estructura del Receptor de Andrógenos (AR)	3
1.4 Andrógenos.....	8
1.5 Mecanismo de acción del AR	10
1.6 Correguladores	11
1.7 Cáncer de próstata	17
1.8 Terapia endócrina	18
1.9 Resistencia a la terapia endocrina	21
2. ANTECEDENTES	25
2.1 Prohibitina 2.....	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO GENERAL	27
5.1 Objetivos específicos.....	27
6. MÉTODOS	28
6.1 Diseño experimental	28
6.2 Cultivo celular	28
6.3 Plásmidos y transfecciones.....	29
6.4 Western blot	31
6.5 Ensayo de luciferasa.....	31
6.6 Ensayo de β -galactosidasa	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Sobre-expresión de proteínas de interés	33
7.2 Efecto de PHB-2, SRC-1 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR	33
7.3 Efecto de la coexpresión de PHB2 y SRC-1 sobre la actividad transcripcional del AR	33
7.4 Efecto de la coexpresión de PHB2 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR	36
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	44
10. REFERENCIAS	45

RESUMEN

Los andrógenos son reguladores clave de la diferenciación sexual masculina, participando en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos reproductivos. Así mismo, se sabe que tienen un papel muy importante en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. La testosterona y la dehidrotestosterona median sus efectos al unirse al receptor de andrógenos (AR). El AR es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Al interactuar con un ligando agonista, el AR dimeriza y se transloca al núcleo en donde, se une a secuencias específicas en el DNA e interactúa con componentes de la maquinaria basal de transcripción y con proteínas correguladoras. Los correguladores son componentes esenciales en la regulación transcripcional que funcionalmente pueden agruparse en coactivadores, si regulan positivamente la actividad transcripcional o en correpresores si la regulación es negativa.

Prohibitina 2 (PHB2), es una proteína de 37 KDa que en trabajos previos del laboratorio, fue caracterizada como un correpresor del AR. Se ha reportado que uno de los mecanismos por los que PHB2 puede reprimir la actividad del Receptor de Estrógenos es a través de la competencia con el coactivador de receptores esteroides 1 (SRC-1), miembro de la familia de coactivadores p160, la cual incluye también al factor intermediario de la transcripción 2 (TIF-2) y a la secuencia amplificada en cáncer de mama-1 (AIB1). Estas proteínas promueven la actividad transcripcional inducida por ligando de diversos receptores nucleares como el de andrógenos, progesterona, estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea y ácido retinoico X.

En objetivo de este trabajo es determinar si el efecto correpresor de PHB2 sobre la actividad transcripcional del AR está mediado por la competencia con proteínas coactivadoras de la familia p160. Para ello se realizaron ensayos de actividad transcripcional con reporteros de luciferasa tanto en líneas celulares de cáncer de próstata como en células HeLa, cotransfectando concentraciones distintas de PHB-2 y SRC-1 ó de PHB2 y TIF-2, en presencia o ausencia de dehidrotestosterona (DHT). En estos ensayos se demostró que en presencia de PHB2 la actividad transcripcional del AR se reduce aun cuando los coactivadores SRC-1 y TIF-2 se encuentran sobreexpresados. Por lo tanto, demuestran que uno de los mecanismos que median el efecto inhibitorio de PHB2 radica en la competencia con proteínas coactivadoras de la familia p160.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares (NR del inglés *nuclear receptors*) se agrupan en una súper familia de proteínas que actúan como factores de transcripción promotor específicos; se acoplan a elementos regulatorios en el DNA en respuesta a su unión a ligandos hidrofóbicos y tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. (Owen G. y Zelent A. 2000; Pardee L. y Necakov A. 2011).

De acuerdo con análisis filogenéticos, los NR pueden dividirse en tres grupos:

Tipo I (receptores clásicos o esteroides), incluye a los receptores de progesterona (PR), andrógenos (AR), estrógenos (ER), mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR).

Tipo II (receptores no esteroides), formado por el receptor de ácido retinoico todo-trans (RAR), el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR), el receptor de la hormona tiroidea (TR) y el receptor de vitamina D (VDR).

Tipo III (receptores huérfanos), en este grupo se ubican los receptores cuyos ligandos no han sido identificados. (Nikolenko J. y Krasnov A. 2007)

En humanos se han identificado 48 genes que codifican para NR, los cuales están involucrados en casi todos los procesos fisiológicos y tienen un papel importante en la regulación del metabolismo, la diferenciación, crecimiento, homeostasis celular e inflamación (Carlberg C. y Molnár F. 2014)

1.2. RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El gen del receptor de andrógenos (AR) se localiza en el cromosoma X y codifica para una proteína de 110 kDa y 919 aminoácidos (Migeon B. 1981; Chang C, et al; 1988). Se expresa ubicuamente en los órganos humanos, principalmente en los órganos reproductivos, el músculo esquelético, el hígado y el sistema nervioso central. Los tejidos que no muestran expresión del AR son el bazo y la médula ósea (Mujib M. et al. 2004).

El AR media las acciones fisiológicas de los andrógenos, los cuales están involucrados en la diferenciación sexual masculina, en el desarrollo y el mantenimiento de los tejidos reproductivos (Dalton J. y Gao W. 2010).

1.3. ESTRUCTURA DEL AR

El AR está formado por dominios funcionales que permiten la dimerización del receptor, su unión al DNA, y el contacto vía cofactores con la maquinaria basal de transcripción. Los ocho exones que codifican al AR corresponden a los siguientes dominios:

Exón 1: Dominio amino terminal (NTD *N-terminal domain*)

Exones 2 y 3: Dominio de unión al DNA (DBD *DNA binding domain*)

Exones 4 - 8: Dominio de unión a ligando (LBD *ligand binding domain*)

Además contiene una región bisagra (H *Hinge*) localizada entre el DBD y el LBD, dos regiones de transactivación (AF1 y AF2 *Activation functions*) y señales de localización nuclear (NLS *nuclear localization signals*) (Figura 1).

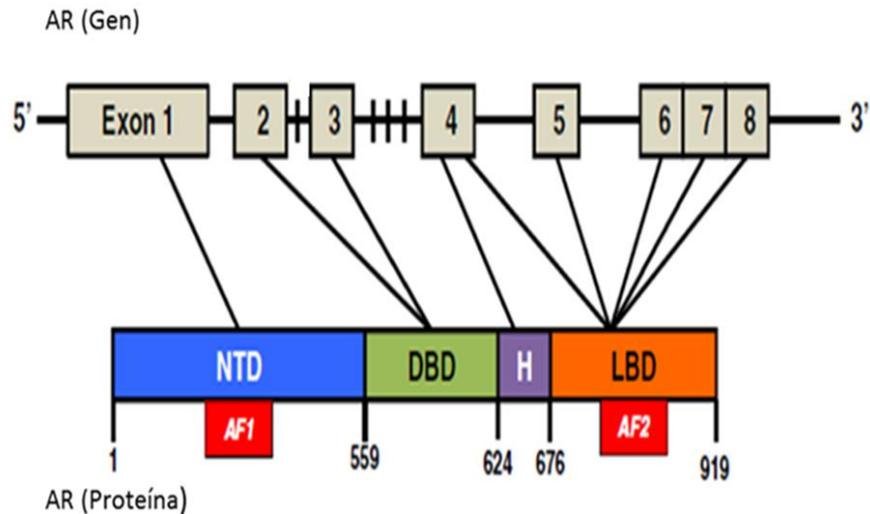


Figura 1. Estructura del Receptor de Andrógenos. El gen del AR está compuesto por ocho exones. El exón 1 codifica para el NTD que contiene la función de activación AF1, los exones 2 y 3 corresponden al DBD. El exón 4 codifica la región bisagra, la cual presenta una señal de localización nuclear y junto con los exones 5, 6, 7 y 8 componen al LBD en donde se encuentra la función de activación AF2 (Dalton J. y Gao W. 2010).

1.3.1. DOMINIO AMINO TERMINAL

Esta región es la más variable entre los miembros de la familia de NR, el dominio amino-terminal (NTD) del AR presenta menos del 25% de identidad respecto a otros receptores de hormonas esteroides, mientras que tiene un 77% de identidad con el AR de ratón. Esta divergencia sugiere que esta región en el AR pudo haberse adquirido más recientemente durante el proceso evolutivo. Por otro lado, se sabe que en algunos casos las diferencias observadas en las isoformas del receptor, generadas a partir de un único gen, por splicing alternativo o por el uso de promotores alternativos, se localizan en este dominio (Thornton J. y Kelley D. 1998; Owen G. y Zelent A. 2000; Aranda A. y Pascual A. 2001, Dalton J. y Gao W. 2010).

El AR posee una función de activación independiente de ligando llamada AF1, la cual se encuentra en su extremo amino-terminal y actúa como el principal dominio de activación del receptor. Distintos estudios han identificado las regiones importantes para la actividad del dominio AF1, entre ellos, los residuos 101-370 y 360-485 que reciben el nombre de unidades de transactivación 1 (Tau-1) y 5 (Tau-5) respectivamente, las cuales favorecen la unión de los factores de transcripción basal y el reclutamiento de coactivadores (Kumar R. y Litwack G. 2009).

Se ha demostrado que la región que rodea a Tau-1 adquiere una conformación más plegada cuando interactúa con proteínas de la familia de coactivadores p160, por lo que

se propone que este cambio conformacional es la forma activa de AF1. Las mutaciones que interfieren con este cambio estructural disminuyen la actividad del receptor e impiden su interacción con la maquinaria basal de transcripción (Betney R. y McEwan I. 2003; McEwan I. et al., 2007). Tau-5 es el principal sitio de interacción con coactivadores de la familia p160 y se ha visto que esta interacción se promueve cuando este dominio es blanco de fosforilaciones, resultando en una súper-activación del receptor (Alen P. et al. 1999; Christiaens V. et al. 2002; Metzger E. et al. 2003).

El NTD contiene un motivo FxxLF (aa 23-27) que regula la interacción entre los extremos amino y carboxilo-terminal del receptor. Esta interacción es importante para la activación del AR ya que estabiliza la unión del receptor con sus ligandos. Por lo tanto, mutaciones en este motivo afectan la transactivación del AR y cambian la cinética de unión de los ligandos (Lavery D. y McEwan I. 2006; Kumar R. y Litwack G. 2009). Igualmente, se ha observado que algunas proteínas que interactúan con el AR como los coactivadores ARA54 y ARA70 contienen motivos similares al FxxLF que promueven su unión al receptor en la región C-terminal (He et al. 2002; Heinlein y Chang 2002).

Así mismo, las modificaciones post-transduccionales (PTM) pueden modular la actividad de los receptores nucleares. Se ha reportado que las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) fosforilan la serina 514 del AR promoviendo la transcripción de sus genes blanco, igualmente, la fosforilación en los residuos 213 y 791 por la vía del fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) se asocia con un aumento en la supervivencia celular. El AR es blanco de otras PTM, como la ubiquitinación, acetilación y sumoilación, ésta última lleva a cabo la represión del receptor y parece estar relacionada con la especificidad a ciertos promotores y al tipo celular (Poukka H. et al. 2000; Nishida T. y Yasuda H. 2002; Datta K. y Tindall D. 2013).

1.3.2. DOMINIO DE UNIÓN A DNA

Este dominio es el más conservado entre la súper familia de NR y se caracteriza por conferirle al receptor la habilidad de reconocer secuencias específicas en sus genes blanco. El DBD está compuesto por dos motivos de dedos de zinc (ZF) ricos en cisteínas, dos α -hélices y una extensión carboxilo-terminal (CTE) (Aranda A. y Pascual A. 2001).

Los dedos de zinc de los NR se pliegan uno sobre otro formando una estructura compacta interdependiente unida a dos α -hélices, la primera de ellas se localiza en el tercer residuo de cisteína del ZF-1 y contiene una secuencia consenso llamada caja P, que le permite reconocer los elementos de respuesta a hormonas en los genes blanco y hacer contacto con el surco mayor del DNA (Luisi B. et al; 1991, Lee J. et al., 1994, Helsen C. et al; 2012). El ZF-2, está unido a la segunda α -hélice, la cual se encuentra formando un ángulo recto con la caja P ayudando a mantener la estructura nuclear del DBD. Existe también, otra secuencia consenso, la caja D, necesaria para la dimerización del receptor. (Kumar R. y Thompson G. 1999, Haelens A. et al; 2007).

La CTE del AR abarca los aminoácidos 624-661, que corresponden al extremo carboxilo terminal de la estructura nuclear del DBD y a la parte de la región bisagra adyacente a

este dominio (Melvin S, et al. 2004). Se ha propuesto que la CTE juega un papel crucial en el reconocimiento específico de los elementos de respuesta a hormonas. Esta región puede establecer contactos con el surco menor del DNA estabilizando la unión del receptor y la selección de los elementos de respuesta, proporcionando gran afinidad y especificidad a los NR (Helsen C. et al. 2012).

Para poder llevar a cabo su actividad transcripcional, el AR debe unirse a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) que son secuencias localizadas río arriba o río abajo del sitio de inicio de la transcripción de sus genes blanco, se organizan como repeticiones invertidas de dos motivos 5'-AGAACA-3' separados por tres nucleótidos. (Aranda A. y Pascual A. 2001, Dalton J. and Gao W. 2010). Se ha identificado también, un subtipo de ARE llamados ARE selectivos que a diferencia de los ARE clásicos, contienen los dos motivos 5'-AGAACA-3' organizados como repeticiones directas (Schoenmakers E. et al., 1999). Diversos estudios demuestran que la CTE es necesaria para promover la unión del AR en los ARE selectivos (Haelens A. et al., 2003, Helsen C. et al. 2012).

1.3.3. DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO

El LBD es un dominio funcionalmente complejo que posee subregiones implicadas en la unión a ligando, regulación transcripcional e interacción con proteínas de choque térmico (Owen G. y Zelent A., 2000, Aranda A. y Pascual A. 2001).

El LBD del AR está compuesto por once α -hélices y dos giros β que están dispuestos en tres capas antiparalelas en un arreglo tipo sandwich. Las hélices H1 y H3 forman una de las capas, mientras que la H4, H5, H8, H9 y el primer giro β forman la capa central de la estructura. Las hélices H6, H7, H10 y H11 constituyen la tercera capa (Dalton J. and Gao W. 2010).

La unión del ligando se lleva a cabo en la cavidad de unión a ligando (LBP) la cual es principalmente hidrofóbica y está formada por las hélices H5, el extremo amino-terminal de la H3, el extremo carboxilo-terminal de la H10 y H11. Tras la unión de un ligando agonista se induce un cambio conformacional que hace que el LBD se compacte, la H12 se reposiciona y asegura la unión del ligando. Al final del extremo carboxilo-terminal del LBD se forma el segundo giro β que estabiliza la conformación de la H12.

El cambio conformacional inducido por ligandos agonistas en el LBD permite la formación de una región AF2 transcripcionalmente activa, que proporciona una superficie hidrofóbica para la interacción con coactivadores que contienen motivos ricos en leucina LxxLL. En esta conformación, el reposicionamiento de la H12 a través de la LBP constituye una parte crucial para la activación transcripcional. En contraste, la unión de un ligando antagonista reposiciona la H12 de una manera alternativa y como resultado, el LBD recluta correpresores, lo cual conlleva a la represión transcripcional de los genes blanco (Heldring N. et al., 2007).

La región AF-2 del AR, a diferencia de otros receptores nucleares, es capaz de unir cadenas laterales aromáticas como la del motivo FxxLF del NTD. En un análisis detallado

se demostró que la que la superficie hidrofóbica de AF-2 está rodeada de aminoácidos cargados como la lisina 520 y glutamato 897 que favorecen estas uniones (Dubink H. et al., 2004, Claessens F. et al., 2008).

1.3.4. REGIÓN BISAGRA

Esta región puede ser definida como el fragmento entre la última α -hélice del dominio de unión al DNA y la primera α -hélice del dominio de unión a ligando, forma un puente flexible entre estos dos dominios que favorece los cambios conformacionales necesarios para la activación del receptor. Se sabe que la secuencia de la región bisagra se encuentra poco conservada entre los receptores esteroides, sin embargo, en todos ellos contiene una señal de localización nuclear (NLS) (Claessens F. et al., 2008).

Se han propuesto varios mecanismos por los que ésta región puede modular la actividad del receptor. Por ejemplo, las acetil-transferasas de histonas pueden interactuar con la región bisagra y pueden coactivar al AR. Así mismo, CBP/p300, p/CAF y Tip60 pueden acetilar los residuos de lisina 630, 632 y 633 que forman un motivo KLKK en la región bisagra. Se ha observado que la inhibición de esta acetilación evita la activación del receptor por DHT, incrementa la unión del correceptor NCoR y disminuye el efecto coactivador de SRC-1 (Fu M. et al. 2000, Fu M. et al. 2004, Coffey K. y Robson C., 2012).

Por otro lado, la fosforilación de la serina 650 está involucrada en la regulación de la translocación del receptor al núcleo, la mutación de ésta serina provoca una reducción de la actividad del receptor. Igualmente, esta región posee una secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina llamada PEST que se ha asociado con la degradación de proteínas (Kang H. et al., 2002; Lin C. et al., 2002).

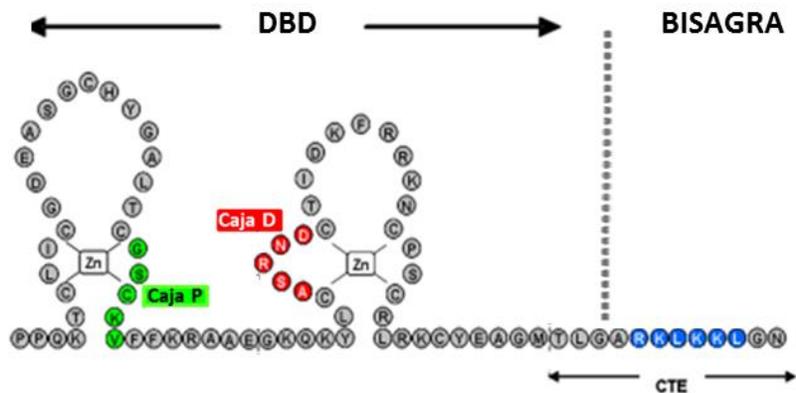


Figura 2. Estructura del DBD. Se utilizó el código de aminoácidos de una sola letra para representar el DBD del receptor de andrógenos. En verde se muestran los residuos que conforman la caja P del primer dedo de zinc y en rojo está la caja D del segundo dedo de zinc. Las flechas indican la extensión carboxilo terminal (CTE), que está involucrada en la unión y especificidad del AR con el DNA e incluye residuos del DBD y de la región bisagra. La señal de localización nuclear se muestra en azul. (Modificado de Claessens F. et al; 2008)

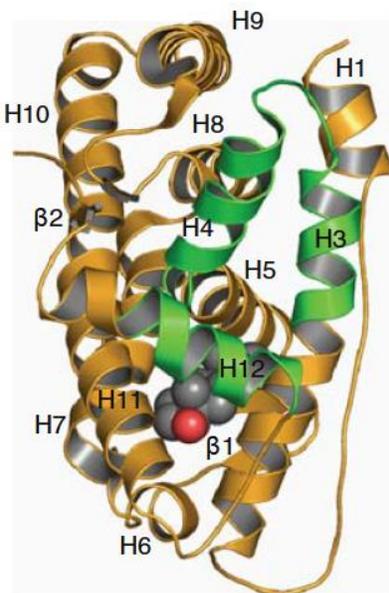


Figura 3. Estructura del LBD. Se muestra la estructura tridimensional del LBD del AR unido a un ligando agonista (DHT). Las hélices que conforman la función de activación (AF2) se encuentran marcados en verde. (Dalton J. y Gao W. 2010)

1.4. ANDRÓGENOS

1.4.1. Síntesis

Los ligandos naturales que se unen predominantemente al AR y regulan su actividad son la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT). La testosterona es el principal andrógeno circulante en el hombre, aproximadamente el 95% de su síntesis se lleva a cabo en las células de Leydig de los testículos y está regulada por la hormona luteinizante (LH) (Datta K. y Tindall D. 2013).

Inicialmente la LH se une a su receptor de membrana en las células de Leydig y estimula la actividad de la adenilato ciclasa incrementando los niveles del adenosin monofosfato cíclico (cAMP). El cAMP activa a la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) cuya señalización promueve la transferencia del colesterol hacia la membrana interna de la mitocondria en donde es convertido a pregnenolona. Esta reacción es un paso limitante en la esteroidogénesis y es catalizada por la enzima CYP11A1 en conjunto con proteínas específicas de la membrana interna de la mitocondria. Posteriormente, la pregnenolona sale de la mitocondria hacia el retículo endoplásmico liso en donde va a ser convertida a progesterona por la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, después, es transformada en androstendiona por acción de la 17α -hidroxilasa/C17-20 liasa. Finalmente, la androstendiona es metabolizada a testosterona por la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3. Adicionalmente, de un 5-20% de la testosterona circulante es

sintetizada por las glándulas adrenales (Davison S. y Bell R. 2006; Svechnikov K. et al. 2010).

En el suero la testosterona forma complejos con proteínas como la albumina, globulinas de unión a hormonas sexuales (SHBG), y globulinas unidas a corticoesteroides, por lo que no es fácil encontrarla en su forma libre. Sólo entre el 2-3% de la testosterona en circulación está disponible para actuar en los tejidos blanco de los andrógenos. En la próstata, la testosterona pasa a las células por difusión pasiva y es convertida en dihidrotestosterona por las 5α -reductasas. En comparación con la testosterona, la DHT tiene una afinidad más alta por el AR y se disocia más lentamente del receptor (Taplin M. y Ho S. 2001). Así mismo, la degradación del AR es dos veces más alta en presencia de testosterona comparada con DHT (Zhou Z. et. al. 1995).

1.4.2. Acciones fisiológicas

Los andrógenos son los principales esteroides sexuales en el hombre, son los responsables del desarrollo del fenotipo masculino durante la embriogénesis y de la maduración sexual durante la pubertad. En la edad adulta, los andrógenos son esenciales para el mantenimiento de la función reproductiva. Además, los andrógenos actúan sobre una amplia variedad de tejidos, incluyendo piel, hueso, músculo y tejido adiposo (Heemers H. y Tindall D. 2007)

El metabolismo de la testosterona es tejido-específico y tiene tres modos de acción. Puede actuar a través del AR en tejidos donde la 5α -reductasa no se expresa, ser reducido a DHT por la 5α -reductasa antes de unirse al AR (5-10%) o ser aromatizada a estradiol y actuar a través del receptor de estrógenos (0.2%) (Oettel M. 2003).

La formación de DHT es la vía natural para los tejidos DHT-dependientes como la próstata y la vesícula seminal, ya que amplifica la actividad androgénica de la testosterona. La DHT es un agonista más potente del AR que la testosterona, se une con mayor afinidad al receptor y tiene un potencial de activación de 2-10 veces más alto que la testosterona en tejidos responsivos a andrógenos. La testosterona actúa en los tejidos independientes de DHT como el músculo esquelético, donde la 5α -reductasa no es expresada o se expresa a niveles muy bajos. De esta manera, regula el crecimiento del músculo, la formación de hueso, la distribución del tejido graso y la función sexual. Por otro lado, los estrógenos juegan un papel importante en regular procesos metabólicos, cognición, enfermedades cardiovasculares, funciones sexuales y el recambio óseo en hombres (Quigley C. et al., 1995, Dalton J. y Gao W. 2010).

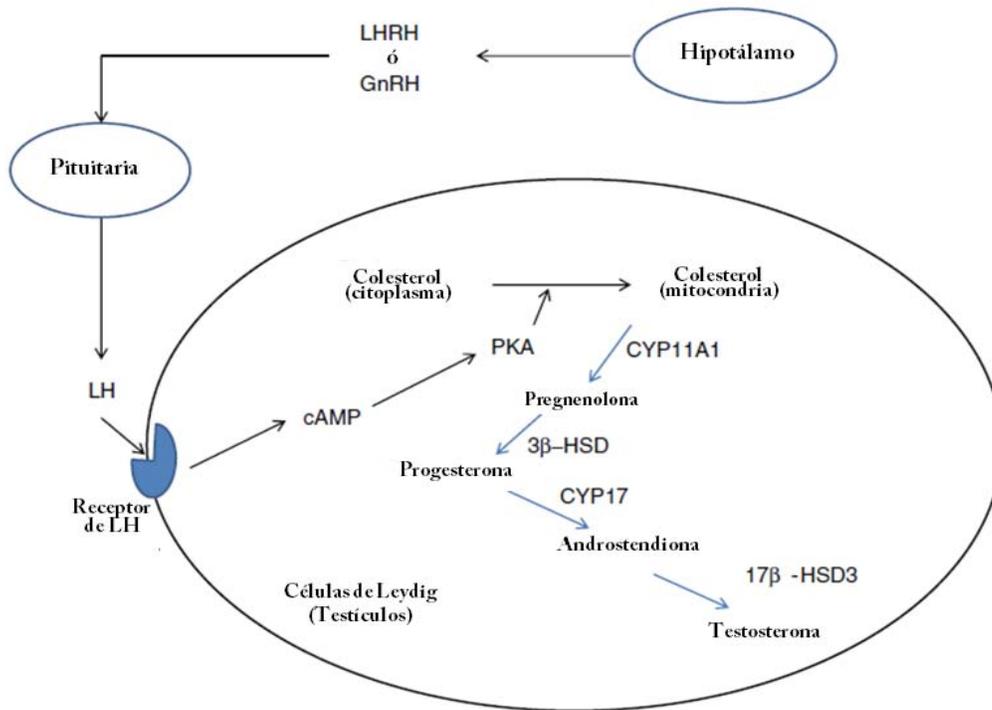


Figura 4. Biosíntesis de la Testosterona.
 Modificado de Datta K. y Tindall D. 2013

1.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE AR

1.5.1. Mecanismo clásico

En ausencia de ligando los receptores esteroides permanecen en el citoplasma formando un complejo con diversas proteínas, entre las cuales están las proteínas de choque térmico (hsp), hsp90, hsp70 y hsp56. Las hsp mantienen al receptor en una conformación óptima para su unión a ligando por lo que son esenciales para una activación eficiente del receptor (Smith D. y Tort D. 1993, MacLean H. et al., 1997).

La entrada de ligandos agonistas a la célula y su unión al receptor causa un cambio conformacional que rompe la unión con las proteínas de choque térmico (Jenster G, et al. 1993). Ésta disociación permite que queden expuestos los motivos de dimerización y la señal de localización nuclear, permitiendo que el receptor sea translocado al núcleo (Gobinet J. et al. 2002).

En el núcleo, el receptor forma un homodímero que interactúa con secuencias cortas de DNA llamadas elementos de respuesta a andrógenos (ARE) que están localizadas en las regiones promotoras de sus genes blanco. El cambio conformacional inducido por el ligando también causa que el LBD forme una plataforma de unión para proteínas accesorias con actividades enzimáticas que promueven la descompactación de la

cromatina, permitiendo que la maquinaria basal de transcripción acceda a las regiones promotoras e inicie la transcripción génica. Estas proteínas se conocen como corre reguladores (Aranda A. y Pascual A. 2001, Orphanides G. y Reinberg D. 2002).

Las acciones genómicas del AR, por lo tanto, están ampliamente reguladas por su unión a los corre reguladores, los cuales pueden interactuar con el AR vía el NTD y el LBD. Así mismo, el reclutamiento de cofactores específicos está modulado por los cambios conformacionales del AR inducidos por su unión al ligando así como por modificaciones post-traduccionales de los dominios del receptor (Dalton J. y Gao W. 2010).

1.5.2. Mecanismo independiente de ligando.

Diversas moléculas como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o citocinas como la Interleucina-6 (IL-6) pueden activar a los NR aún en ausencia de sus ligandos. A partir de estas observaciones se ha establecido que las vías de señalización celular pueden modificar la actividad de los NR, Nazareth L. y Weigel N. 1996; Ueda T. et al. 2002; Simoncini T. y Genazzani A. 2003).

En el AR las vías de señalización activadas por factores de crecimiento promueven su fosforilación, particularmente la vía de las MAPKs y de PI3K/AKT que fosforilan a la serina 514 y 210, respectivamente, regulan positivamente la actividad transcripcional del AR (Yeh S. et al. 1999; Lin H. et al. 2001; Kang H. 2001).

Los mecanismos descritos para esta regulación positiva involucran el reclutamiento de coactivadores que funcionan como remodeladores de la cromatina e incrementan el posicionamiento de la maquinaria de transcripción basal, modulando así, la transcripción de los genes blanco aún en ausencia de hormonas. Así mismo, la fosforilación puede sensibilizar al AR a niveles bajos de andrógenos o a esteroides alternativos (Yeh S. et al. 1999; Rochette-Egly C. 2003).

1.6. CORREGULADORES

La transcripción génica es un proceso dinámico y altamente coordinado que, además de los factores de transcripción y de la maquinaria basal transcripcional, involucra a una serie de proteínas con funciones diversas conocidas como corre reguladores. Los corre reguladores son componentes esenciales en la regulación transcripcional. Estas proteínas no son capaces de unirse al DNA directamente pero interactúan de manera indirecta a través de su unión con los factores de transcripción. (Lee J. et al. 2000).

Los corre reguladores pueden actuar como puentes entre los factores de transcripción y la maquinaria transcripcional o pueden llevar a cabo funciones enzimáticas como la acetilación, metilación y ubiquitinación. Funcionalmente, los corre reguladores pueden agruparse en coactivadores si promueven la actividad transcripcional o en corre presores si la inhiben. Para promover una apropiada regulación génica, los corre reguladores actúan formando complejos proteicos compuestos de combinaciones específicas de proteínas. La variación en la composición de estos complejos determina la magnitud y amplitud de la

respuesta transcripcional y depende del contexto celular y del tipo de promotor (Lonard D. y O'malley B. 2007; Battaglia S. et al. 2010).

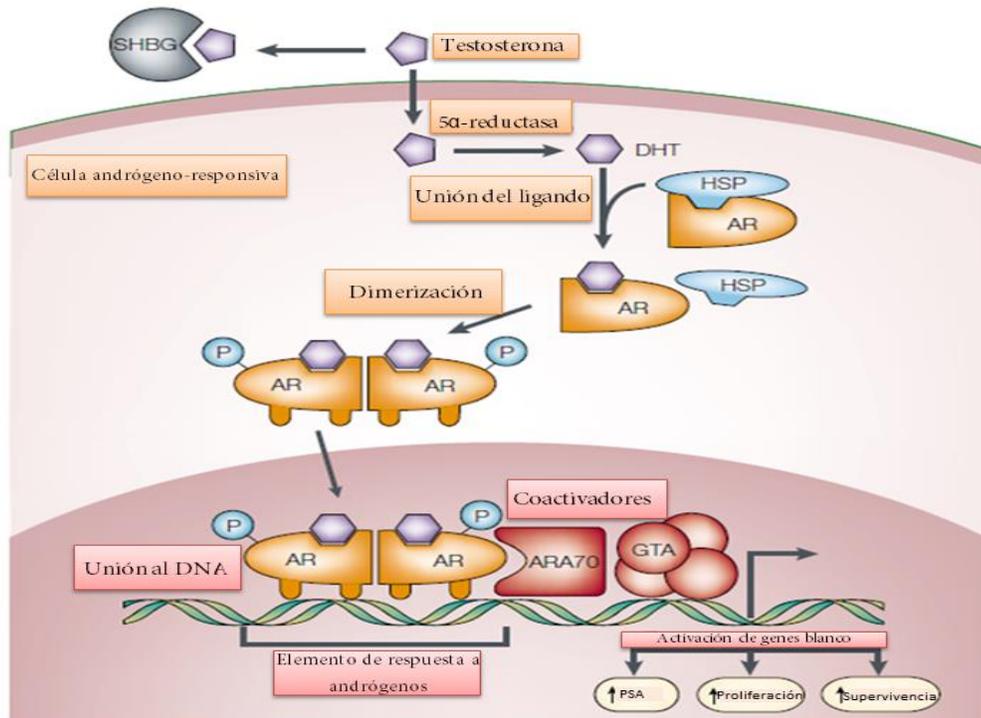


Figura 5. Mecanismo cl3sico de se1alizaci3n del Receptor de Andr6genos.
 Modificado de Feldman B. y Feldman D. 2001.

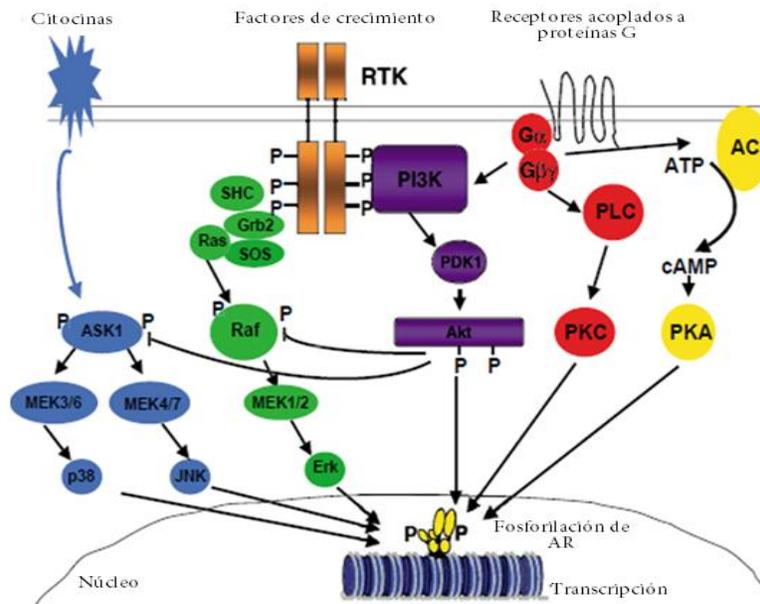


Figura 6. Mecanismo de acci3n del Receptor de Andr6genos independiente de ligando.
 Modificado de Rochette-Egly C. 2003.

Además de su papel en la regulación del inicio de la transcripción y en la remodelación de la cromatina, se ha establecido que los corre reguladores están involucrados en otros procesos celulares como la elongación de las cadenas de RNA, en el splicing y traducción del RNA mensajero y en la terminación de la respuesta transcripcional (Manavathi B. et al. 2014).

1.6.1. COACTIVADORES

La formación y activación del complejo de pre-iniciación de la transcripción depende en gran medida del reclutamiento secuencial de coactivadores. Los coactivadores son proteínas que interactúan con los factores de transcripción, como el AR en presencia de ligandos agonistas, y promueven su actividad transcripcional.

La interacción de los coactivadores con el AR ocurre a través del LBD y el NTD. En el primer caso, la unión de ligandos agonistas al receptor promueve un cambio conformacional en el AR que reposiciona la hélice 12 del LBD creando una superficie cargada que interactúa con motivos LXXLL que se encuentran en los coactivadores. Para el NTD, diferentes sitios de este dominio están involucrados en interacciones proteína-proteína con coactivadores y se sabe que muchos de ellos ocurren en la región Tau-1 (Van de Wijngaart D. et al. 2011).

Los coactivadores estimulan la transcripción génica a través de varios mecanismos:

- 1) Promueven la interacción entre los factores de transcripción y la maquinaria basal de transcripción al reclutar complejos como TRAP/DRIP que interactúan con la maquinaria transcripcional.
- 2) Inducen la remodelación local de la cromatina al interactuar con complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes como SWI/SNF.
- 3) Tienen actividades enzimáticas que inducen modificaciones post-traduccionales de las histonas, principalmente de acetil transferasas de histonas (HATs). La acetilación de las histonas en sitios específicos induce el relajamiento local de la cromatina y se correlaciona con activación transcripcional.
- 4) Actúan como proteínas de andamiaje para reclutar y/o estabilizar remodeladores de la cromatina u otros coactivadores (Jenuwein T. y Allis C. 2001; Wolf I. et al. 2008).

Familia p160-SRC

La familia de coactivadores p160 está compuesta por tres proteínas de 160 kDa, incluye al coactivador de receptores esteroides 1 (SRC-1), al factor intermediario de la transcripción 2 (TIF-2) también conocido como GRIP-1 o SRC-2 y al coactivador de receptores esteroides 3 (SRC-3) cuyos nombres alternativos son p/CIP, RAC3, ACTR, AIB1 y TRAMP1. SRC-1 y SRC-3 tienen actividad de HATs, mientras que para TIF-2 no se ha reportado. Estas proteínas actúan como coactivadores de diversos NR, entre ellos, el AR, PR, AR, GR y PPAR (Johnson A. y O'Malley B. 2012)

Los miembros de esta familia tienen el 50-55% de identidad en su secuencia y varios dominios estructurales conservados. La región más conservada es la porción amino-

terminal, que contiene un motivo bHLH (basic hélix-loop-helix) y un motivo PAS (Per/Arnt/Sim). Este sitio es importante para la interacción de los coactivadores p160 con otras proteínas, contiene una señal de localización nuclear y es esencial para su degradación dependiente del proteosoma, la cual permite el intercambio cíclico de los corre reguladores (Kim J. y Stallcup M. 2008)

La región central contiene un dominio de interacción con receptores nucleares (NRID) en donde se encuentran tres dominios LXXLL o cajas NR que son esenciales para la interacción con los NR. Las secuencias que flanquean a estos dominios estabilizan la interacción de las cajas NR con los receptores y promueven la selectividad y afinidad de estas interacciones. En el extremo carboxilo, estas proteínas contienen dos dominios de activación: AD1 y AD2. Estos dominios reclutan a coactivadores secundarios, AD1 es capaz de unirse a p300/CBP que tiene actividad de HAT, mientras que AD2 interactúa con los coactivadores CARM1 y PRMT1 que actúan como metil transferasas de histonas. De esta manera, las proteínas p160 median la formación de complejos coactivadores que promueven la modificación covalente de las histonas y la apertura de la cromatina. (Chang C. et al. 1999; Li C. et al. 2007).

Los coactivadores p160 fueron originalmente identificados como proteínas que interactúan con la región AF-2 de los NR, posteriormente se observó que pueden interactuar también con AF-1. Para el AR, la interacción con las proteínas p160 difiere de otros receptores esteroides. Se sabe que estos coactivadores pueden unirse al AF-2 del AR pero que su interacción es más débil, comparada con el AF-2 del ER y GR. Así mismo, la unión del AR con SRC-1 y TIF-2 no requiere de motivos LXXLL intactos, mientras que para mantener la interacción, otros receptores necesitan que al menos uno de estos motivos esté presente. (Voegel J. et al. 1996; Bevan C. et al. 1999).

Debido a la baja afinidad de los coactivadores p160 por el AF-2 del AR, AF-1 es el sitio principal de interacción, específicamente, se unen a Tau-5. La región de los coactivadores p160 que interactúa con AF-1 ha sido identificada en el segmento carboxilo entre AD1 y AD2. Experimentalmente se ha demostrado que la mutación de este sitio inhibe la actividad de AF-1 pero mantiene un AF-2 activo. Por el contrario, cuando hay una delección del motivo LXXLL, se conserva la actividad de AF-1. Estos resultados sugieren que AF-1 y AF-2 pueden interactuar simultáneamente con sitios distintos de los coactivadores p160 (Alen P. et al. 1999).

1.6.2. CORREPRESORES

Los correpresores son proteínas que interactúan con los NR y regulan negativamente su actividad transcripcional. Para la mayoría de los receptores esteroides los correpresores son reclutados en presencia de ligandos antagonistas. Sin embargo, para algunos receptores como RAR y TR, los correpresores pueden ser reclutados en ausencia de ligando. Al igual que los coactivadores, los correpresores tienen una secuencia consenso que les permite unirse a la región AF2 de los NR llamada caja CoRNR que consiste de un motivo LXXXI/LXXXIL donde L es leucina, I es isoleucina y X es cualquier aminoácido. Así mismo los correpresores pueden unirse al NTD (Chmelar R. et al. 2006).

Algunos de los mecanismos por los cuales los correpresores reprimen la actividad del AR son los siguientes:

- 1) Pueden inhibir la unión del AR al DNA.
- 2) Reducen la translocación del AR al núcleo.
- 3) Reclutan desacetilasas de histonas (HDACs) que modifican la estructura de la cromatina y reprimen la transcripción.
- 4) Inhiben la interacción de los coactivadores con el AR.
- 5) Pueden interferir en la interacción de los extremos carboxilo terminal- amino terminal del AR, se sabe que esta interacción es necesaria para la completa activación del AR.
- 6) Reclutan a otros corre reguladores. (Wang L. et al. 2004).

De los corre reguladores del AR que se han identificado, las proteínas NCoR y SMRT son los correpresores del AR mejor estudiados.

NCoR y SMRT

El correpresor de receptores nucleares (NCoR) y el silenciador mediador de los receptores hormonales tiroideo y retinoico (SMRT) inicialmente fueron identificados como correpresores de RAR y TR y se demostró que interactuaban con estos receptores en ausencia de ligando. En el caso del AR no se ha observado interacción en ausencia de ligando y se sabe que el reclutamiento de NCoR y SMRT se lleva a cabo en presencia de ligandos antagonistas como el acetato de ciproterona o flutamida (Shang Y. et al. 2002).

NCoR y SMRT son proteínas de 270 kDa que tienen dominios homólogos. En su extremo carboxilo-terminal contienen tres (NCoR) o dos (SMRT) dominios de interacción (ID) en donde se encuentran las cajas CoRNR que median las interacciones con los NR. Debido al grado de similitud de las cajas CoRNR y las cajas NR, ambos motivos pueden interactuar con los mismos residuos del LBD, por lo que, los cambios conformacionales de la hélice 12 inducidos por la unión de ligandos agonistas o antagonistas van a determinar la preferencia de la unión con proteínas correpresoras o coactivadoras. En general los ligandos agonistas forman una región cargada que estabiliza la unión de los coactivadores, de manera opuesta, los ligandos antagonistas promueven la unión de los correpresores inhibiendo estéricamente la interacción de los coactivadores (Wong M. et al. 2014).

El mecanismo represor de NCoR y SMRT involucra su interacción con proteínas como TBL1, TBLR1, GPS2 y desacetilasas de histonas de clase 1 (HDAC1, HDAC2) y clase 2 (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7). Estas interacciones forman complejos de gran tamaño (1.6-2 MDa) y se llevan a cabo en sitios denominados dominios de represión (RD1, RD2 y RD3) que se encuentran en el extremo N-terminal de NCoR y SMRT (Jones P. et al. 2001; Yoon H. et al. et al. 2003).

Así mismo, en el dominio N-terminal existen dos motivos SANT localizados entre RD1 y RD2. El primer motivo SANT se denomina dominio de activación de desacetilasa (DAD) y se une directamente a HDAC3. La unión a DAD es crítica para iniciar la actividad enzimática de HDAC3. El segundo motivo SANT funciona como un dominio de interacción con histonas, que al unirse a histonas no acetiladas impide la actividad de las HATs. De esta manera los dos motivos SANT cooperan para promover la desacetilación de histonas y la represión transcripcional (Aasland R. et al. 1996; Ishizuka T. y Lazar M. 2005).

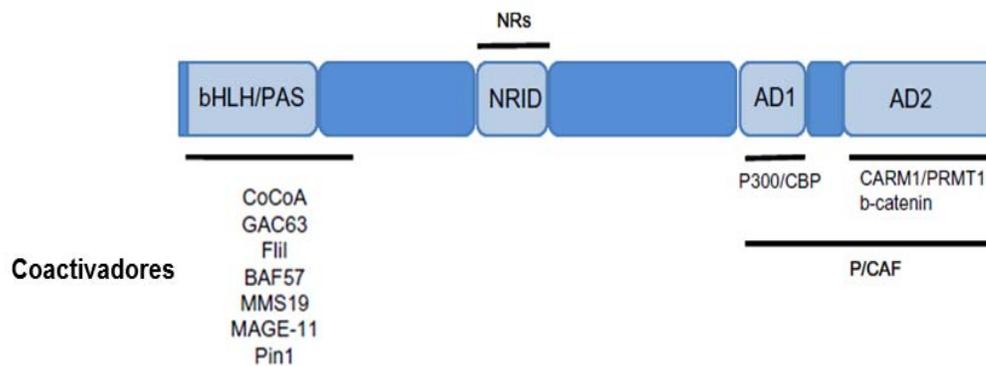


Figura 7. Estructura de los coactivadores p160. Se muestran los dominios de interacción con NR (NRID), los dominios de activación (AD1, AD2), el dominio bHLH/PAS y algunos coactivadores secundarios que interactúan con las proteínas p160 (Johnson A, O'Malley B. 2012).

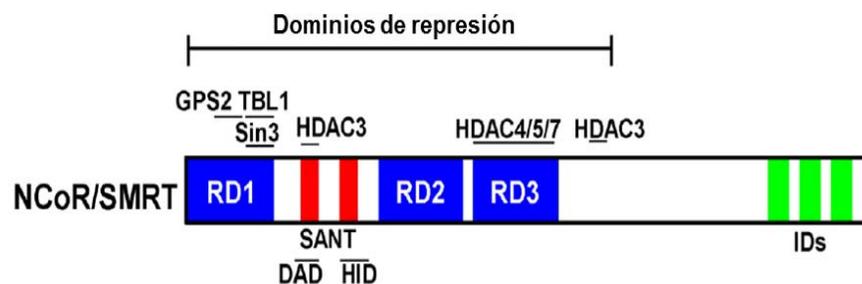


Figura 8. Estructura de los correpresores NCoR y SMRT. En verde están representados los dominios de interacción (ID), los dominios de represión (RD1, RD2 y RD3), y los sitios de interacción con proteínas de los complejos correpresores. (Modificado de Wong M. et al. 2014).

1.7. CANCER DE PRÓSTATA

A nivel mundial el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad por neoplasias malignas en hombres, mientras que en nuestro país es la neoplasia de mayor incidencia y mortalidad (GLOBOCAN 2012).

La próstata es un órgano pequeño que forma parte del tracto reproductor masculino, está situado debajo de la vejiga urinaria y rodea la porción proximal de la uretra. Tomando como punto de referencia la uretra, la próstata puede dividirse en cuatro zonas: la periférica, la central, la de transición y la anterior (Selman S. 2011).

La zona periférica abarca aproximadamente el 70% de la masa prostática, es una región susceptible a la inflamación y es en donde surgen la mayor parte de los carcinomas. Por otro lado, la zona de transición ocupa el 5% del volumen de la próstata y es donde se desarrolla la hiperplasia prostática benigna, aunque en esta zona también pueden presentarse carcinomas (De Marzo A. et al. 2007).

El carcinoma prostático se desarrolla en el epitelio de la próstata, el cual está organizado en una bicapa de células basales, luminales y algunas células neuroendocrinas. Las células luminales son andrógeno dependientes, expresan al AR y producen el antígeno prostático específico (PSA). El tipo celular basal no produce PSA, expresan marcadores como queratinas basales e integrinas. Por otro lado, las células neuroendocrinas son independientes de andrógenos y se ha visto que en el cáncer de próstata estas células se acumulan en el tejido basal (De Marzo A. et al. 2007; Sander B. y Miranti C. 2013).

Similar a lo que ocurre en otros tipos de cáncer, las células cancerosas derivadas del tejido prostático se caracterizan por poseer un conjunto de alteraciones genéticas y epigenéticas que conllevan a la desregulación del ciclo celular y a alteraciones en los procesos de muerte celular programada. Así, se conocen los oncogenes y los genes supresores de tumores que comúnmente se encuentran alterados en el cáncer de próstata (Taylor B. et al. 2010), sin embargo, las causas que originan estas alteraciones no están completamente establecidas.

A partir del estudio de esta enfermedad se han determinado factores de riesgo que contribuyen a su desarrollo, entre ellos se encuentran la edad avanzada, la raza, factores dietéticos como el alto consumo de grasas y, en algunos casos se han identificado alteraciones genéticas que se relacionan con una predisposición hereditaria. Así mismo, se sabe que los factores hormonales se encuentran ampliamente relacionados con la carcinogénesis prostática, en este sentido, el AR es un factor muy importante en el origen y progresión del cáncer de próstata.

1.7.1. EL CANCER DE PRÓSTATA (CaP) Y LOS ANDRÓGENOS

El desarrollo y crecimiento de la próstata es dependiente de andrógenos, necesita además, una estimulación hormonal permanente para su mantenimiento y función en el adulto. Al igual que el tejido sano, los tumores prostáticos mantienen esta dependencia hormonal en etapas iniciales (Shen H. y Coetzee G. 2005).

El papel de los andrógenos en la patogénesis del CaP quedó establecido en 1941 con el trabajo de Huggins y Hodges, aún cuando el AR no estaba identificado. Ellos observaron una regresión tumoral en respuesta a la castración, así mismo, encontraron que la administración de testosterona incrementaba el crecimiento de la próstata en animales modelo. Dado lo anterior, diversos estudios han tratado de identificar las alteraciones en el AR y en su señalización que contribuyen al desarrollo de esta neoplasia.

Las acciones ejercidas por el AR en el CaP primario son una mezcla de sus efectos normales en el tejido prostático (como la síntesis de PSA y la regulación del metabolismo lipídico) y de la adquisición de acciones novedosas que promueven el crecimiento celular. Aunque algunos de estos efectos son conocidos, la mayoría de las nuevas actividades del AR que favorecen el inicio de la neoplasia no están completamente establecidas (Green S. et al., 2012; Ayesha A. et al., 2013).

A partir de estudios epidemiológicos se han identificado asociaciones entre el tamaño de las regiones repetidas CAG en el exón 1 del gen del AR y el riesgo de desarrollar cáncer. Estas secuencias usualmente varían en un número de 10 a 35 repeticiones y codifican extensiones de poliglutamina en el dominio de transactivación AF1 del receptor. Regiones cortas se asocian con un mayor riesgo de enfermedad, agresividad del tumor y recurrencia. Experimentalmente, la delección de las repeticiones CAG resulta en un AR mucho más activo que el wild-type (Giovannucci E. et al; 1997, Nam R. et al; 2000).

Así mismo, existen alteraciones genéticas en el AR que afectan su actividad y se relacionan con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer, sin embargo, estas mutaciones son muy raras en pacientes con CaP primario y en algunos casos el significado funcional de estas mutaciones es desconocido. La mayoría de las mutaciones encontradas en el AR se han encontrado en tumores con estadios avanzados y después de tratamiento, por lo que se piensa que se originan como resultado del uso de terapias de ablación hormonal (Marcelli M. et al, 2000; Buchanan G. et al., 2001).

Se ha reportado que más del 50% del CaP presenta fusiones entre el promotor de TMPRSS2, un gen regulado por andrógenos, y porciones de la región codificante de los factores de transcripción ETS. Se ha observado que el tratamiento con DHT en células epiteliales normales induce la colocalización de TMPRSS2 y ERG (miembro de la familia ETS) estudiado por FISH, esta fusión resulta en el incremento en la expresión de genes asociados con invasividad. Por el contrario, cuando estas proteínas son silenciadas, hay una reducción en el crecimiento celular. En la próstata normal no se han encontrado proteínas de fusión mientras que en las neoplasias intraepiteliales prostáticas se presentan en un 15% y en mayor proporción en CaP primario (Tomlins S. et al., 2005; Tu J. et al., 2007; Li C. et al., 2009; Zhang S. et al., 2010).

1.8. TERAPIA ENDOCRINA

Debido a la importancia de los andrógenos en el CaP, la terapia de privación androgénica (ADT) permanece como el tratamiento estándar para los pacientes con esta enfermedad. La ADT es frecuentemente utilizada como tratamiento primario del CaP localmente

avanzado y metastásico. También es usado como terapia adyuvante en combinación con cirugía o radioterapia (Chen F. y Zhao X; 2013).

La base de la ADT consiste en privar a las células cancerosas de andrógenos, eliminar su unión al AR y su señalización celular, con este propósito, el primer método utilizado para reducir la producción de testosterona fue la orquiectomía bilateral o castración quirúrgica con la cual se reducen los niveles de testosterona en suero a 50 ng/dL, sin embargo, actualmente se sugiere que niveles de testosterona en suero de 20 ng/dL son más apropiados para definir la castración (Scherr D. et al., 2003).

En este sentido, algunos de los fármacos utilizados en la ADT incluyen a agonistas del receptor de estrógenos, agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH), inhibidores de enzimas esteroideogénicas y el uso de antiandrógenos (Tammela T. 2012).

Agonistas del receptor de estrógenos. A través de un mecanismo de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-pituitaria inhiben la secreción de la GnRH, reduciendo los niveles de testosterona. Estas moléculas surgieron como el primer método de castración reversible con el uso del dietil-etil-estrol (DES), un estrógeno sintético que fue ampliamente utilizado pero que, debido a sus efectos secundarios dejó de emplearse.

Agonistas de la GnRH. La GnRH interactúa con sus receptores en las células gonadotrópicas de la pituitaria anterior estimulando la síntesis y liberación de las gonadotropinas. La GnRH es liberada de manera pulsátil evitando la desensibilización de los receptores y mandando una señal para que los andrógenos sean producidos de manera continua. Cuando los pacientes son tratados con agonistas de ésta hormona se produce una estimulación continua de la pituitaria que induce cambios regulatorios. Hay una desensibilización del receptor, y se reduce la liberación de gonadotropinas, con lo cual se inhibe la producción de testosterona en los testículos (Conn P. y Crowley W. 1994; Tieva A. et al., 2003).

Antagonistas de la GnRH. Estas moléculas impiden que la GnRH se una a sus receptores y bloquean la liberación de la hormona luteinizante la cual media la síntesis de los andrógenos. El uso de estos fármacos permite que los niveles de testosterona en suero disminuyan de manera más rápida que con el uso de agonistas de la GnRH, ofreciendo un mayor beneficio (Steinberg M. 2009).

Inhibidores de CYP17 (Citocromo P450). Con el fin de reducir la síntesis de andrógenos se han utilizado compuestos como el acetato de abiraterona, un inhibidor selectivo de la enzima CYP17A1 (17 α -hidroxilasa/C17,20-liasa), la cual cataliza las reacciones que producen a los precursores hormonales 17OH-pregnenolona y 17OH-progesterona. Inhibe también la reacción de síntesis de la dehidroepiandrosterona y la androstendiona reduciendo los niveles de testosterona a <1 ng/dL. Este compuesto es un inhibidor potente e irreversible y ha sido utilizado en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración (Yap T. et al. 2008).

Antiandrógenos. Estos compuestos compiten con los andrógenos endógenos por la unión al AR e inducen cambios conformacionales que inhiben su actividad. De acuerdo a su estructura química existen dos clases de antiandrógenos: esteroides y no esteroides.

Algunos de los compuestos esteroides como RU-486, el acetato de ciproterona (CPA) y la espirolactona son moléculas no específicas para el AR y por lo tanto, pueden activar a los receptores de glucocorticoides, progesterona y mineralocorticoides. Estos agentes actúan también como agonistas parciales del AR (Chen Y. et al. 2009).

El CPA fue el primer antiandrógeno probado a nivel clínico e inhibe competitivamente la unión de la testosterona y la DHT al AR. Debido a que tiene acciones progestrogénicas también puede unirse al receptor de progesterona en la pituitaria e inhibir la liberación de la hormona luteinizante y la producción de testosterona en los testículos por lo que, algunos de sus efectos secundarios son similares a los de la castración (Haendler B. y Cleve A. 2012; Tammela T. 2012).

Los antiandrógenos no esteroides como la bicalutamida, flutamida, y la nilutamida son los principales antiandrógenos utilizados en la clínica. Fueron desarrollados para evitar los efectos no específicos de los antiandrógenos esteroides. Estas moléculas no presentan una interacción significativa con otros receptores nucleares por lo que son considerados como antagonistas puros del AR y presentan un menor grado de hepatotoxicidad que los fármacos esteroides (Chen Y. et al. 2009).

La bicalutamida es el compuesto mayormente utilizado clínicamente, presenta una afinidad más alta por el AR comparada con la flutamida. Este fármaco tiene una vida media de una semana y suele administrarse sólo una dosis diaria por lo que sus efectos secundarios son menores a los de otros antiandrógenos. La bicalutamida impide la transactivación del receptor al unirse a su LBD e inhibir su interacción con coactivadores, además, promueve el reclutamiento de correpresores. Se ha visto también que el tratamiento con bicalutamida resulta en una disminución temporal de la expresión del AR (Ahmed A. et al. 2014).

Se ha observado que en ciertas condiciones celulares, antiandrógenos como la bicalutamida, CPA o flutamida pueden perder sus actividades antagónicas y actuar como agonistas. Dado lo anterior, se han buscado moléculas denominadas antiandrógenos de tercera generación cuya característica principal sea la retención de sus propiedades antagonistas y la pérdida de actividades agonistas. Uno de los compuestos sintetizados con este fin es la enzalutamida (Chen Y. et al. 2009).

La enzalutamida se une al AR con una afinidad ocho veces mayor que la bicalutamida, actúa como antagonista del AR silvestre y de los mutantes T877A y W741C. En líneas celulares que sobre-expresan al AR, la enzalutamida inhibe la transcripción mediada por el receptor y el crecimiento celular, mientras que la bicalutamida no. En cuanto a su mecanismo de acción, diversos estudios realizados en líneas celulares que sobre-expresan al AR han demostrado que la unión de la enzalutamida al AR inhibe su translocación al núcleo, su unión al DNA y el reclutamiento de coactivadores. Así mismo,

se observó que en estas líneas, el receptor unido a la bicalutamida es capaz de unirse al DNA y reclutar coactivadores. Por lo tanto, se ha propuesto que la enzalutamida puede considerarse como un verdadero antagonista del AR que no presenta propiedades de agonista parcial (Tran C. et al. 2009; Green S. et al. 2012).

1.9. RESISTENCIA A LA TERAPIA ENDOCRINA

Para la mayoría de los pacientes, la terapia endocrina resulta efectiva y genera una regresión tumoral. Sin embargo, después de un tiempo los tumores desarrollan resistencia a la terapia y eventualmente el cáncer de próstata emerge con tumores más agresivos, promoviendo el desarrollo de metástasis en un 33% de los pacientes. Este fenómeno anteriormente había sido descrito como cáncer de próstata hormono-refractario o independiente de andrógenos. Debido que el AR aún se conserva en este estado de la enfermedad y mantiene un papel importante en la resistencia, estos términos han sido sustituidos por el de cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) (Mitsiades N. 2013).

La resistencia en el CaP se debe principalmente a que la señalización del AR se mantiene aún en niveles bajos de andrógenos circulantes. Los mecanismos moleculares implicados en la reactivación del AR son complejos y heterogéneos, algunos de ellos se describen a continuación.

Síntesis *de novo* de andrógenos

Diversos estudios han demostrado que las células tumorales de pacientes con CRPC pueden sintetizar DHT *de novo* a partir de andrógenos adrenales o del colesterol. Varios grupos han reportado que en comparación con pacientes de cáncer de próstata primario o de tejido prostático normal, en el CRPC existe un incremento en la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos, incluyendo a la CYP17A1, HSD3B1, HSD17B3, CYP19A1 y UGT2B1 (Mitsiades N. et al. 2012).

Se ha reportado también, que existe una disminución en la expresión de enzimas que promueven la conversión de la testosterona en un andrógeno menos activo como la androstendiona. Adicionalmente, Lee y colaboradores han encontrado que un incremento en la síntesis de colesterol, a través de la disminución de ABCA1, se asocia con un aumento en la agresividad del CaP. Estudios in vivo en un modelo de CRCP derivado de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP, la cual es dependiente de andrógenos, mostró que enzimas involucradas en la síntesis del colesterol se encuentran sobre-expresadas (Leon C. et al. 2010; Lee B. et al. 2013; Dillard P. et al. 2008).

Colectivamente estos datos implican que además de la ADT, es necesario disminuir los niveles de precursores androgénicos para reducir la esteroidogénesis intratumoral.

Incremento en la expresión del AR

Se ha reportado la amplificación del número de copias del AR en tumores resistentes a la castración con una frecuencia aproximada del 20-30% de los pacientes. Así mismo, se ha

observado que la sobreexpresión del receptor se presenta también en tumores sin amplificación génica, debido a un aumento en la tasa de la transcripción del gen del AR y a un incremento en la estabilidad de la proteína como consecuencia de modificaciones post-traduccionales (Datta K. y Tindall D. 2013).

Se han identificado proteínas que promueven la estabilización del AR, entre ellas el transductor de señales y activador de la transcripción 5 (Stat5), las cinasas dependientes de ciclinas (cdk) 1 y 5, además de proteínas de unión a RNA como HuA, CP1 y CP2 que se unen al RNA mensajero del AR y afectan su estabilidad (Yeap B. et al. 2002; Chen. S. et al. 2006; Thomas C. et al. 2011)

Los efectos del aumento en la expresión del AR se han estudiado en la línea celular LNCaP en donde la sobreexpresión inducida del receptor las sensibiliza a andrógenos residuales, restaurando la expresión de genes regulados por andrógenos y convierte a la bicalutamida en un agonista del receptor (Chen C. et al., 2004).

De manera interesante, los tumores que sobreexpresan al AR después de la ADT responden mejor a una segunda línea de terapia con antiandrógenos y castración química que los tumores sin amplificación (Palmberg C. et al. 1997).

Mutaciones del AR

En el cáncer de próstata primario las mutaciones en el AR se presentan a bajas frecuencias mientras que en el CRCP los reportes de mutaciones están entre un 20-50% de los tumores. Las mutaciones en el LBD son las más comunes, seguidas por las del NTD y son escasas en el DBD (Gottlieb B. et al. 2012)

Las mutaciones en el LBD están asociadas a cambios en la especificidad del receptor por los ligandos. Un ejemplo de lo anterior ocurre en la línea celular LNCaP, en donde una mutación puntual (T877A) altera radicalmente la especificidad del receptor, promoviendo el crecimiento celular *in vitro* en respuesta a antiandrógenos como la flutamida y a esteroides no androgénicos como los estrógenos y la progesterona. La mutación H874Y del LBD, encontrada en la línea celular 22Rv1 y en muestras de tumores resistentes, afecta indirectamente la especificidad por los ligandos y está relacionada principalmente con un aumento en la interacción del receptor con coactivadores de la familia p160. Otras mutaciones identificadas en muestras de pacientes con CRPC han sido asociadas con una reducción en la afinidad por los andrógenos y una mayor respuesta del receptor a los glucocorticoides y andrógenos adrenales (Sack J. et al. 2001; Yoshida T. et al. 2005; Duff J. y McEwan I. 2005).

En el NTD la mutación W435L se ha identificado en muestras tumorales después del tratamiento con antagonistas del AR. Esta mutación afecta la interacción del receptor con proteínas correguladoras y promueve la activación independiente de andrógenos. De manera similar, existen estudios realizados en ratones que expresan la variante E231G del AR que altera el NTD y causa un rápido desarrollo de neoplasias al modificar la

interacción del receptor con correguladores (Han G. et al. 2005; Steinkamp M. et al. 2009).

Por lo tanto, los estudios sobre las mutaciones en el AR sugieren que estas mutaciones proveen una ventaja de supervivencia a las células de cáncer de próstata y promueven la resistencia a antiandrógenos.

Correguladores

El AR regula la transcripción génica a través del reclutamiento de complejos correguladores que pueden promover o reprimir la transcripción. Dentro del estudio del cáncer de próstata existen diversos reportes que muestran que el incremento en la expresión de algunos de estos correguladores se correlaciona con la progresión de la enfermedad.

Particularmente, la sobreexpresión de coactivadores se asocia con la resistencia a la terapia endocrina. Experimentalmente, se ha determinado que el aumento en la expresión de coactivadores incrementa la actividad del AR en respuesta a niveles bajos de andrógenos y amplía la especificidad por el ligando (Shafi A. et al. 2013).

En el caso de la familia de coactivadores p160 los estudios demuestran que los niveles de SRC-1 son elevados en el CRPC lo cual facilita la activación del AR por andrógenos adrenales y potencia la estimulación del receptor en concentraciones bajas de andrógenos. Por otro lado, SRC-1 es un sustrato de la vía de MAPK y a través de su fosforilación promueve la activación independiente de ligando del AR mediada por la IL-6 (Ueda T. et al. 2002).

Se ha encontrado que en el 11% de los casos de cáncer de próstata, el coactivador TIF-2 está amplificado o sobre-expresado por lo que se sugiere que actúa como un oncogén. TIF-2 está implicado en la activación independiente de ligando del AR en respuesta al factor de crecimiento epidermal. Igualmente, disminuye el efecto antagonista de la bicalutamida en presencia de IL-6. En el caso de SRC-3 su expresión es elevada en el cáncer de próstata de alto grado y potencia los efectos del factor de crecimiento similar a la insulina y de la vía AKT (Yan J. et al. 2006; Feng, S. et al. 2009).

Otros coactivadores como p300, CBP, Tip60, BAG-1L, ARA54 y ARA70 están altamente expresados en tejidos de tumores de CRCP y se asocian con la activación del AR. Contrariamente, complejos correpresores como N-CoR y SMRT también han sido evaluados y su disminución se relaciona con la progresión de la enfermedad. Así, la alteración de la tasa de coactivadores/correpresores juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la terapia (Heinlein C. y Chang C. 2002; Heemers H. y Tindall D. 2007).

Interacción con vías de transducción de señales

La activación de vías de transducción de señales intracelulares promueven la actividad independiente de ligando de los NRs. En el CRPC la activación independiente de ligando

del AR está relacionada con modificaciones post-traduccionales del receptor, que afectan su estabilidad, localización y su interacción con otras proteínas. Existe evidencia de que algunas vías de señalización son más activas en el cáncer de próstata y en el CRPC comparado con tejido prostático normal. De esta manera, se ha encontrado que en tejidos de tumores resistentes, la fosforilación del AR aumenta después de la ADT (Egan A. et al. 2014).

En el CaP, la fosforilación del AR está mediada principalmente por la activación de la vía de las MAPKs y de PI3K/AKT que son reguladas por factores de crecimiento y citocinas. En diversos estudios se ha propuesto que dentro de las moléculas implicadas en el desarrollo del CRPC se encuentran el factor de crecimiento epidermal humano (Her2/neu), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento transformante (TGF β), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y la interleucina 6 (IL-6) (Datta K. y Tindall D. 2013).

Así mismo, el incremento en la actividad de las MAPKs en pacientes con CRPC se ha relacionado con un aumento en la expresión de receptores de cinasas de tirosina como Her2/neu. Igualmente, se ha reportado que los niveles en suero de moléculas como la IL-6 aumentan significativamente en pacientes con resistencia a la terapia, comparado con pacientes en etapas tempranas de la enfermedad. Por lo tanto, el mantenimiento de la señalización del AR en ausencia de andrógenos, puede deberse a la activación de las vías de transducción de señales que modifican post-traduccionamente al AR y promueven su actividad. (Drachenberg D. et al. 1999, Gioeli D. y Paschal B. 2012)

Los mecanismos descritos para explicar la resistencia a la terapia endocrina son altamente diversos y complejos. La evidencia sugiere que posiblemente estos mecanismos no sean mutuamente excluyentes y que varios de ellos estén actuando simultáneamente en el desarrollo CRCP promoviendo la actividad el AR de manera sinérgica.

2. ANTECEDENTES

2.1. PROHIBITINA 2

El gen que codifica a la proteína Prohibitina 2 (PHB2) también conocida como BAP37 (proteína asociada al receptor de células B) o REA (represor de la actividad de estrógenos) se localiza en el cromosoma 12p.13, se compone de 10 exones y codifica una proteína de 37 KDa. PHB2 y Prohibitina 1 son proteínas altamente relacionadas que forman parte de una familia de proteínas conservadas que incluye a las proteínas de membrana plasmática de *Escherichia coli* (HflKC), estomatinas, flotilinas, proteínas de defensa de plantas y a proteínas del receptor de insulina humano (HIR) (Mishra S. et al. 2006).

PHB2 está compuesta de un dominio N-terminal transmembranal que consiste de una alfa-hélice de anclaje a la membrana, un dominio conservado llamado PHB o SPFH (estomatina/prohibitina/flotilina/HflKC) que es común en proteínas de andamiaje, y en su extremo C-terminal contiene un dominio coiled-coil que está involucrado en interacciones proteína-proteína. Adicionalmente, presenta un péptido señal y una señal de localización nuclear en los residuos 1-36 y 86-89, respectivamente. También tiene un motivo LXXLL, considerado como un dominio de interacción con receptores nucleares (RID, receptor interaction domain) (Chowdhury I. et al. 2013).

Se ha demostrado que PHB1 y PHB2 pueden localizarse en el núcleo celular y que tienen un papel importante en la regulación de la transcripción génica, particularmente en la modulación transcripcional mediada por hormonas. PHB1 ha sido asociado a la represión transcripcional del ER y AR, mientras que algunos reportes sugieren que PHB2 sólo reprime la actividad del ER (Montano M. et al. 1999, Delage-Mourroux R. et al, 2000; Wang S. et al. 2004).

Mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras, PHB2 fue inicialmente identificada como una proteína que interactuaba con un dominante negativo del ER. Estudios posteriores demostraron que PHB2 inhibía la actividad del ER a través de distintos mecanismos: 1) promueve la interacción del ER con anti-estrógenos; 2) compite con coactivadores como SRC-1, inhibiendo su efecto coactivador de manera dosis dependiente; 3) modifica la estructura de la cromatina al reclutar HDACs (Montano M. et al. 1999; Gurevich I. et al. 2007)

Para identificar proteínas que interactuaran con el AR, previamente, en el laboratorio se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando al AR completo en presencia de flutamida, y se tamizó una genoteca de cáncer de próstata recurrente. A partir de este ensayo se identificó a PHB2 como una proteína que interactuaba con el AR y se realizó su caracterización como posible corregulador de este receptor.

Mediante ensayos de actividad transcripcional con reporteros de luciferasa se determinó que la sobreexpresión de PHB2 en líneas celulares de cáncer de próstata inhibe la actividad transcripcional del AR de manera dosis dependiente, sugiriendo que esta

proteína actúa como un correpresor de AR. Adicionalmente, para verificar la interacción de PHB2 y AR se realizaron ensayos de Co-inmunoprecipitación y GST-pulldown y se observó que PHB2 interactúa principalmente con la región N-terminal del AR (Rivas-Torres, en proceso).

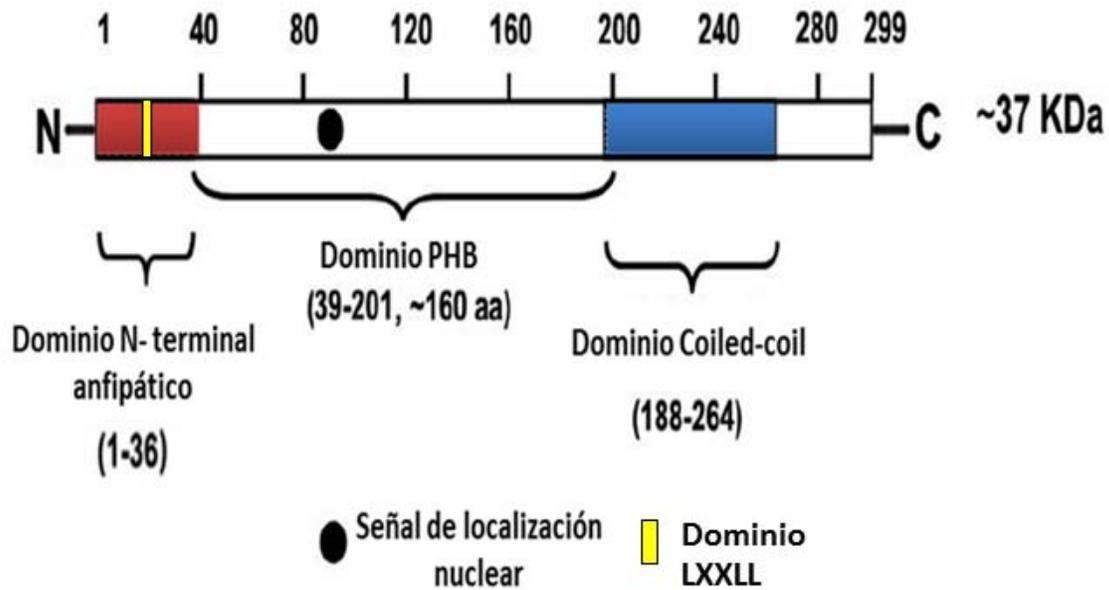


Figura 9. Dominios estructurales de PHB2. (Modificado de Chowdhury I, et al. 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el tratamiento del cáncer de próstata está enfocado en el uso de terapias endocrinas que tienen como objetivo inhibir la señalización del AR. Debido a que la actividad del AR está altamente regulada por su interacción con proteínas correguladoras, se ha propuesto que el desequilibrio en los niveles de coactivadores y correpresores es uno de los mecanismos que confieren resistencia a la terapia endocrina. Por lo tanto, el estudio de la interacción entre los correguladores y su efecto sobre la actividad de los receptores nucleares es de suma importancia para entender los mecanismos involucrados en la regulación transcripcional mediada por los receptores de hormonas esteroides.

4. HIPÓTESIS

PHB2 compite con los coactivadores SRC-1 y TIF-2, modulando el efecto de estas proteínas sobre la actividad transcripcional del AR.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe competencia entre PHB2 y los coactivadores TIF-2 y SRC-1.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de la coexpresión de PHB2 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos, en presencia y ausencia de ligando agonista.

Determinar el efecto de la coexpresión de PHB2 y SRC-1 sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos, en presencia y ausencia de ligando agonista.

6. MÉTODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para poder evaluar si PHB2 compite con los coactivadores SRC-1 y TIF2 por la unión al AR, inicialmente se evaluó la expresión y actividad de estos correguladores mediante Western blot y ensayos de actividad transcripcional con reporteros de luciferasa. Así mismo, los ensayos de luciferasa permitieron verificar que el tratamiento hormonal incrementa la actividad de luciferasa indicando que el AR es funcional y está siendo activado por hormonas. Una vez comprobado lo anterior se planteó el siguiente experimento para evaluar la competencia entre los correguladores.

En diferentes líneas celulares se transfectaron los reporteros MMTV-luc, β -galactosidasa y el plásmido de expresión de AR dependiendo de si las células expresan o no al receptor. Con la finalidad de establecer la competencia entre los correguladores se transfectaron distintas concentraciones de PHB2 y los coactivadores (Tablas 1-3). Debido a que, de existir competencia, esperaríamos que los niveles de actividad transcripcional del AR se vieran modificados en función de la cantidad de los correguladores presentes en las células. Este ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones:

1. En células HeLa, transfectando AR y concentraciones distintas de PHB2 y SRC1.
2. En células HeLa, transfectando AR y concentraciones distintas de PHB2 y TIF2.
3. En células de cáncer de próstata 22RV1 AR positivas, transfectando concentraciones distintas de PHB2 y TIF2.
4. En células de cáncer de próstata LnCaP AR positivas, transfectando concentraciones distintas de PHB2 y TIF2.
5. En células de cáncer de próstata PC3 AR negativas, transfectando AR y concentraciones distintas de PHB2 y TIF2.
6. En células HeLa, transfectando AR y concentraciones distintas de PBX3 y TIF2.

En todas las condiciones, se realizó el tratamiento con vehículo (etanol) y dehidrotestosterona (DHT) 1nM durante 48 horas. Los experimentos se hicieron por triplicado y se realizaron tres repeticiones biológicas.

Para todos los experimentos se realizó un análisis de varianza ANOVA y un análisis de Bonferroni. Se determinó que existía una diferencia significativa con una $p < 0.05$.

6.2. Cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares HeLa (cáncer de cérvix) y COS-7 (riñón de mono verde con una transfección estable del antígeno T) en medio DMEM suplementado con 5% de FBS (suero fetal bovino). Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de próstata 22Rv1 y LNCaP que son AR positivas, cultivadas en medio RPMI suplementado con 8% FBS y la línea celular PC3, AR negativa, en medio DMEM-F12 con 10% FBS. Todos los medios se suplementaron con 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.3. Plásmidos y transfecciones.

Se utilizaron vectores de expresión con las secuencias codificantes de las proteínas PHB2 (clonado en el vector pCMV5) SRC-1 y TIF-2 (clonados en el vector pSG5).

En los ensayos de actividad transcripcional se utilizó un gen reportero de luciferasa regulado por el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) que contiene elementos de respuesta a andrógenos, además de un plásmido de expresión constitutiva de β -galactosidasa para determinar la eficiencia de la transfección y normalizar los resultados.

Para evaluar la expresión de los plásmidos de PHB2, TIF-2 y SRC-1 se realizaron transfecciones transitorias como se describe a continuación. Previo a la transfección, las células COS-7 se tripsinizan y se siembran 400,000 células por pozo en placas de 6 pozos. Al siguiente día, se cambia el medio a DMEM sin rojo fenol con 3% de FBS, en este caso se transfectaron 0.25, 0.5, 1, 3 y 5 μ g de cada plásmido utilizando Lipofectamina 2000 en relación 2:1 (Lipofectamina:DNA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Se utilizó la línea celular HeLa para determinar que los correguladores utilizados estuvieran funcionando correctamente, para esto se sembraron 50,000 células por pozo en placas de 24 pozos. Al día siguiente se cambió el medio a DMEM sin rojo fenol con 3% de FBS tratado con carbón activado y dextrán, para eliminar las hormonas que contiene el FBS. Se transfectaron 250 ng del reportero MMTV-luc, 10 ng del plásmido de β -galactosidasa y concentraciones crecientes de los correguladores (100, 200, 300, y 400 ng), como control negativo se utilizaron los vectores vacíos pSG5 y pCMV5.

6.3.1. Coexpresión de PHB2 y SRC-1

Para evaluar el efecto de PHB2 sobre la actividad transcripcional del AR cuando se cotransfecta con SRC-1 se realizaron los ensayos de luciferasa en células HeLa bajo las siguientes condiciones:

Tabla 1. Condiciones de transfección para los ensayos de competencia entre PHB2 y SRC-1

Línea celular	MMTV-luc	β -gal	Receptor (AR)	PHB2	SRC-1	Vector vacío
HeLa	250 ng	10 ng	50 ng	100 ng	300 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	200 ng	200 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	300 ng	100 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	400 ng	-	-
	250 ng	10 ng	50 ng	-	400 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	-	-	200 ng

6.3.2. Coexpresión de PHB2 y TIF-2

Para evaluar el efecto de la competencia entre PHB2 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR se realizaron ensayos de luciferasa de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de transfección para los ensayos de competencia entre PHB2 y TIF-2.

Línea celular	MMTV-luc	β -gal	Receptor (AR)	PHB2	TIF-2	Vector vacío
22Rv1 y LNCaP	250 ng	10 ng	-	100 ng	300 ng	-
	250 ng	10 ng	-	200 ng	200 ng	-
	250 ng	10 ng	-	300 ng	100 ng	-
	250 ng	10 ng	-	400 ng	-	-
	250 ng	10 ng	-	-	400 ng	-
	250 ng	10 ng	-	-	-	200 ng
HeLa y PC3	250 ng	10 ng	50 ng	100 ng	300 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	200 ng	200 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	300 ng	100 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	400 ng	-	-
	250 ng	10 ng	50 ng	-	400 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	-	-	200 ng

Debido a que en las líneas celulares 22Rv1 y LNCaP la toxicidad de la Lipofectamina 2000 era muy alta, los experimentos en estas células se realizaron utilizando el reactivo FuGENE (Promega) en relación 1:1.5 (DNA:FuGENE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3.3. Coexpresión de PBX3 y TIF-2

Para determinar que el efecto de la coexpresión de PHB2 y TIF-2 en la regulación de la actividad del AR es específico, se siguió el mismo protocolo experimental utilizando la proteína PBX3 (Tabla 3). De acuerdo con estudios previos en el laboratorio se ha demostrado que PBX3 actúa como un correpresor del AR por lo que resulta interesante determinar si esta proteína puede competir con TIF-2 de manera similar a PHB2.

Tabla 3. Condiciones de transfección para los ensayos de competencia entre PBX3 y TIF-2

Línea celular	MMTV-luc	β -gal	Receptor (AR)	PBX3	TIF-2	Vector vacío
HeLa	250 ng	10 ng	50 ng	100 ng	300 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	200 ng	200 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	300 ng	100 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	400 ng	-	-
	250 ng	10 ng	50 ng	-	400 ng	-
	250 ng	10 ng	50 ng	-	-	200 ng

6.4. Western blot

Para determinar que los plásmidos que contienen las secuencias codificantes de las proteínas PHB2, TIF-2, SRC-1 y PBX3 se expresaban correctamente se transfectaron 0.25, 0.5, 1, 3 y 5 µg de cada uno en células COS-7. Tras 48 horas de incubación, se aspiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente, se agregaron 60 µl de Buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 0.5%, y EDTA 1 mM), las células se colectaron, se sonicaron brevemente y se centrifugaron a 12,000 rpm (revoluciones por minuto) a 4°C durante 10 minutos. Finalmente se colectó el sobrenadante que contiene las proteínas totales.

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit DC Protein Assays (BIO-RAD) y se cargaron 50 µg de proteínas totales en un gel desnaturizante de acrilamida al 10%. La electroforesis se dejó correr durante 3 horas a 90 mV. El gel se transfirió a una membrana de PVDF en una cámara semi-húmeda a 25 mV durante 30 minutos.

Las membranas se bloquearon en una solución de Buffer salino Tris con Tween-20 al 1% (TBS-T) y 5% de leche en polvo en agitación durante una hora. Posteriormente, se lavaron brevemente con TBS-T para eliminar el exceso de leche y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios:

Tabla 4. Anticuerpos utilizados y condiciones de incubación para el Western blot de las proteínas de interés

Proteína	Número de catalogo	Anticuerpo primario (Incubación)	Anticuerpo secundario (Incubación)
PHB2	sc-46464	1:5000 Toda la noche	Anti-goat 1:10,000 por 1 hora
SRC-1	sc-8995	1:5000 Toda la noche	Anti-rabbit 1:10,000 por 1 hora
TIF-2	sc-8996	1:2000 48 horas	Anti-rabbit 1:10,000 por 1 hora
PBX3	sc-891	1:5000 Toda la noche	Anti-rabbit 1:10,000 por 1 hora

Anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology.

Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 10 minutos. Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5. Ensayo de luciferasa

Las células fueron transfectadas como se indica en las tablas 1, 2 y 3. Al día siguiente, el medio de cultivo se cambió a medio DMEM o RPMI sin rojo fenol suplementado con 3% de FBS tratado con carbón activado más hormona (DHT 1nM) o con vehículo (etanol), las células se mantuvieron en este tratamiento por 48 horas reemplazando el medio cada 24

horas. Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio de cultivo y se lisaron las células agregando a cada pozo 50 μ l de buffer de lisis (KH_2PO_4 100 mM, K_2HPO_4 100 mM, Tritón X-100 0.2%, DTT 1 mM).

Para las lecturas de la actividad de luciferasa se tomaron 30 μ l de los lisados anteriores y se transfirieron a tubos de luminómetro. Se agregaron 100 μ l de Buffer de reacción de luciferasa (Glicil-glicina 25 mM, MgCl_2 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0.5 mg/mL) a cada tubo y se colocaron en el luminómetro (Monolight 3010 luminometer de Pharmingen) en donde se inyectaban 25 μ l de luciferina (1 mM) y se leían las muestras durante 20 segundos.

6.6. Ensayo de β -galactosidasa

Para determinar la actividad de β -galactosidasa se utilizaron los lisados celulares usados en las lecturas de luciferasa. Para ello, se agregaron 100 μ l de buffer de reacción de β -galactosidasa (NaH_2PO_4 100 mM, Na_2HPO_4 100 mM, MgCl_2 1mM, Galactón 1X) a cada tubo y se incubaron en oscuridad durante una hora. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de solución aceleradora (Solución Tropix Emerald al 10% en NaOH 0.2N) y se leyeron en el luminómetro durante 5 segundos.

Finalmente, los resultados fueron obtenidos al dividir las unidades relativas de luz (URL) obtenidas de la actividad de luciferasa entre las URL de las lecturas de β -galactosidasa, de cada tubo. Estos ensayos se realizaron por triplicado y se hicieron tres repeticiones de cada uno.

7. RESULTADOS

7.1. Sobre-expresión de proteínas de interés.

Se realizaron transfecciones transitorias de los plásmidos con las secuencias codificantes de las proteínas de interés en células COS-7 para verificar su expresión mediante western blot. Como se muestra en la Figura 10, Se puede observar que conforme se incrementan las concentraciones de plásmido transfectado, hay una mayor expresión de TIF-2, SRC-1, PHB2 y PBX3.

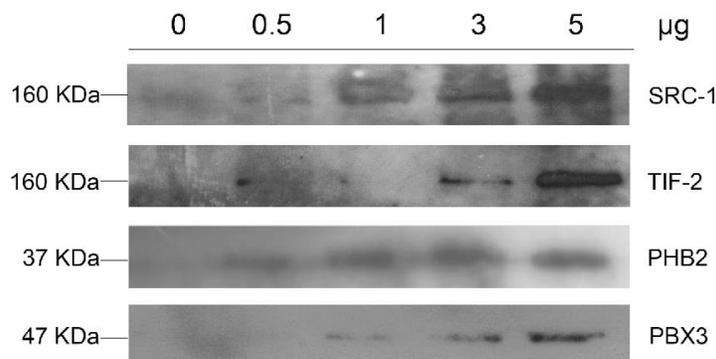


Figura 10. Sobreexpresión de las proteínas de interés en células COS-7. Se muestra el western blot de TIF-2, PHB2, SRC-1 y PBX-3, se puede observar que la expresión de las proteínas aumenta de acuerdo a la cantidad de plásmido transfectado.

7.2. Efecto de PHB2, SRC-1 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR.

Después de verificar la expresión de los plásmidos, se realizaron ensayos de luciferasa en células HeLa para determinar el efecto de los correguladores PHB2, SRC-1 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR, en presencia y ausencia de DHT. De acuerdo con lo que se esperaba, SRC-1 y TIF-2 aumentan significativamente ($p < 0.01$) la actividad transcripcional del AR en presencia de DHT, por lo tanto, al regular positivamente la actividad transcripcional del receptor, SRC-1 y TIF-2 actúan como coactivadores del AR. Contrariamente, PHB2 actúa como un correpresor del AR al regular negativamente la actividad transcripcional. Se puede observar que su efecto es dependiente de la concentración de plásmido transfectado y que la reducción de la actividad es significativa ($p < 0.01$) (Figura 11).

7.3. Efecto de la coexpresión de PHB2 y SRC-1 sobre la actividad transcripcional del AR

En estudios anteriores se demostró que PHB2 interactúa con el ER α e inhibe su actividad transcripcional en presencia de estradiol. Así mismo, se determinó que la sobreexpresión de PHB2 inhibe el efecto del coactivador SRC-1, lo cual explicaría su papel como correpresor del ER α (Montano M. et al. 1999).

Debido a que PHB2 actúa también como un correpresor del AR, queríamos evaluar si uno de los mecanismos por los cuales PHB2 inhibe la actividad transcripcional de AR es a través de la competencia con coactivadores. Para ello, se realizaron ensayos de actividad transcripcional con reporteros de luciferasa en células HeLa, transfectando diferentes concentraciones de PHB2 y SRC-1. Para estos experimentos, las concentraciones de los plásmidos se eligieron de manera que, en todos los casos, la cantidad de DNA transfectado fuera la misma.

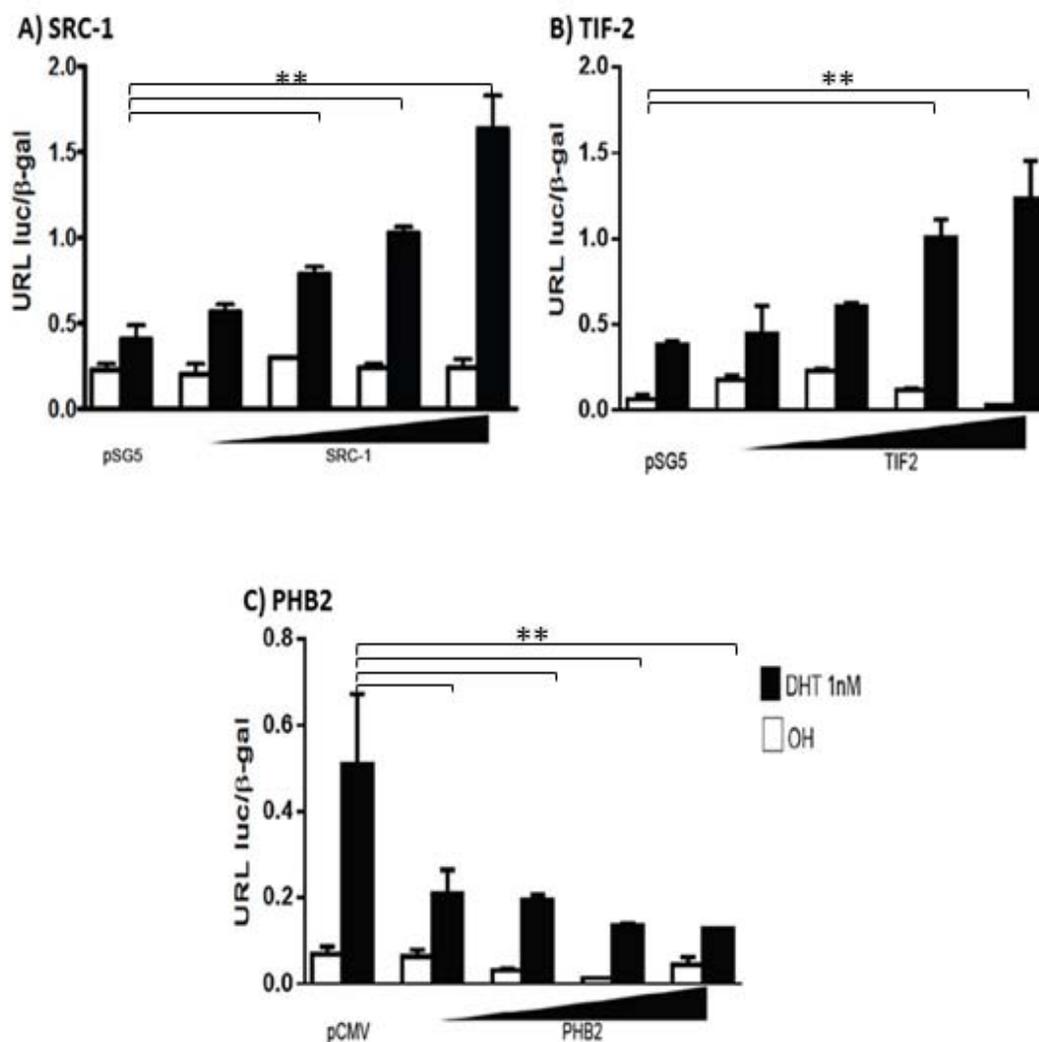


Figura 11. Efecto de SRC-1, TIF-2 y PHB2 sobre la actividad transcripcional del AR.

Ensayos de luciferasa realizados en células HeLa, transfectando concentraciones crecientes de los plásmidos de expresión. A) SRC-1 y B) TIF-2 se observa que a mayores concentraciones de plásmido transfectado hay un aumento en la actividad de luciferasa en presencia de DHT. C) PHB2, se observa una disminución de la actividad transcripcional del AR dependiente de la concentración. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad de galactosidasa y se expresa como unidades relativas de luz (URL). Los datos se muestran como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$) de un experimento representativo de tres ensayos independientes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como se muestra en la figura 12, cuando las células son transfectadas con pSG5 y pCMV5 (vector vacío), el tratamiento con 1 nM de DHT incrementa la actividad de luciferasa comparada con el vehículo (OH). La sobreexpresión de PHB2 reduce significativamente ($p < 0.01$) la actividad de luciferasa comparado con el vector vacío pCMV5, mientras que la presencia de SRC-1 aumenta la actividad, comparada con pSG5 ($p < 0.01$).

Al transfectar ambos correguladores se puede observar que aun cuando se sobre-expresa SRC-1, la presencia de PHB2 reduce la actividad transcripcional del AR comparado con la actividad observada en presencia de SRC-1 individualmente. Así mismo, cuando se compara con el control de plásmido vacío, la coexpresión de estos correguladores reduce significativamente la actividad transcripcional del AR inducida por DHT. Lo anterior sugiere que la presencia de PHB2 inhibe el efecto coactivador de SRC-1.

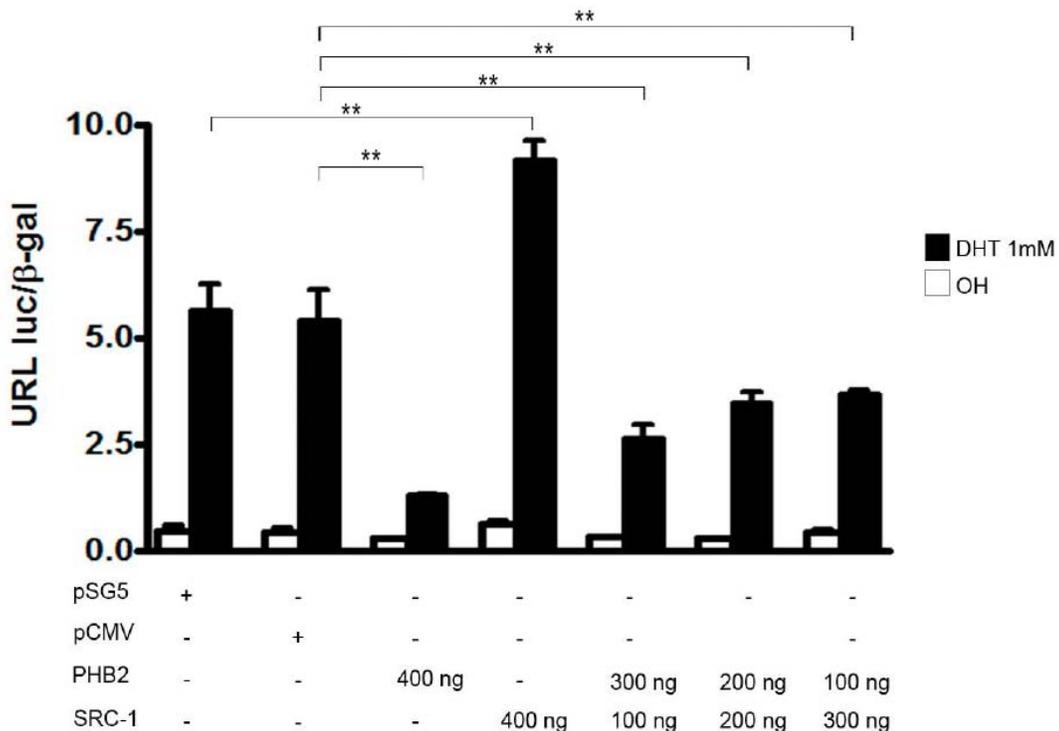


Figura 12. Efecto de la coexpresión de PHB2 y SRC-1 sobre la actividad transcripcional del AR en células HeLa. Se indican las concentraciones de los plásmidos transfectados. Las lecturas de luciferasa y β -galactosidasa se realizaron después de 48 horas de tratamiento hormonal. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad de galactosidasa y se expresa como unidades relativas de luz (URL). Los datos se muestran como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$) de un experimento representativo de tres ensayos independientes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

7.4. Efecto de la coexpresión de PHB2 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR

Para determinar si al igual que con SRC-1, la sobreexpresión del correpresor PHB2 modifica el efecto TIF2, se realizaron ensayos de luciferasa coexpresando estos correguladores en la línea celular HeLa. La actividad de luciferasa mostró que la sobreexpresión de PHB2 reduce el efecto de TIF-2 (Figura 13). Se puede observar que al aumentar la concentración de TIF-2 y reducir PHB2 el efecto inhibitorio del correpresor disminuye, mientras que cuando PHB2 se encuentra a mayor concentración hay mayor inhibición de la actividad transcripcional del receptor. En este ensayo no se observa una diferencia significativa entre la actividad inducida por DHT en los controles de plásmido vacío y las combinaciones de TIF-2 y PHB2. Sin embargo, se pueden observar diferencias significativas cuando se compara la actividad observada en las combinaciones y la actividad inducida por TIF-2 individualmente. Por lo tanto, los resultados sugieren que la actividad de TIF-2 puede ser inhibida por la presencia de PHB2 y debido a que este efecto está regulado por la concentración de PHB2 transfectado, es probable estas proteínas estén compitiendo por la unión al AR.

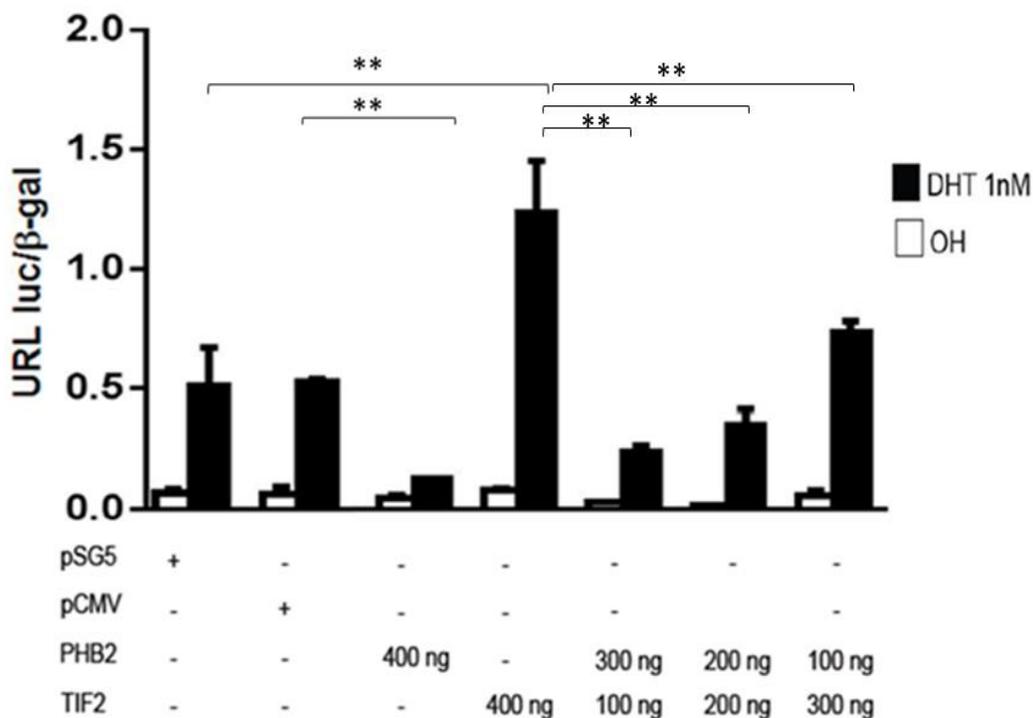
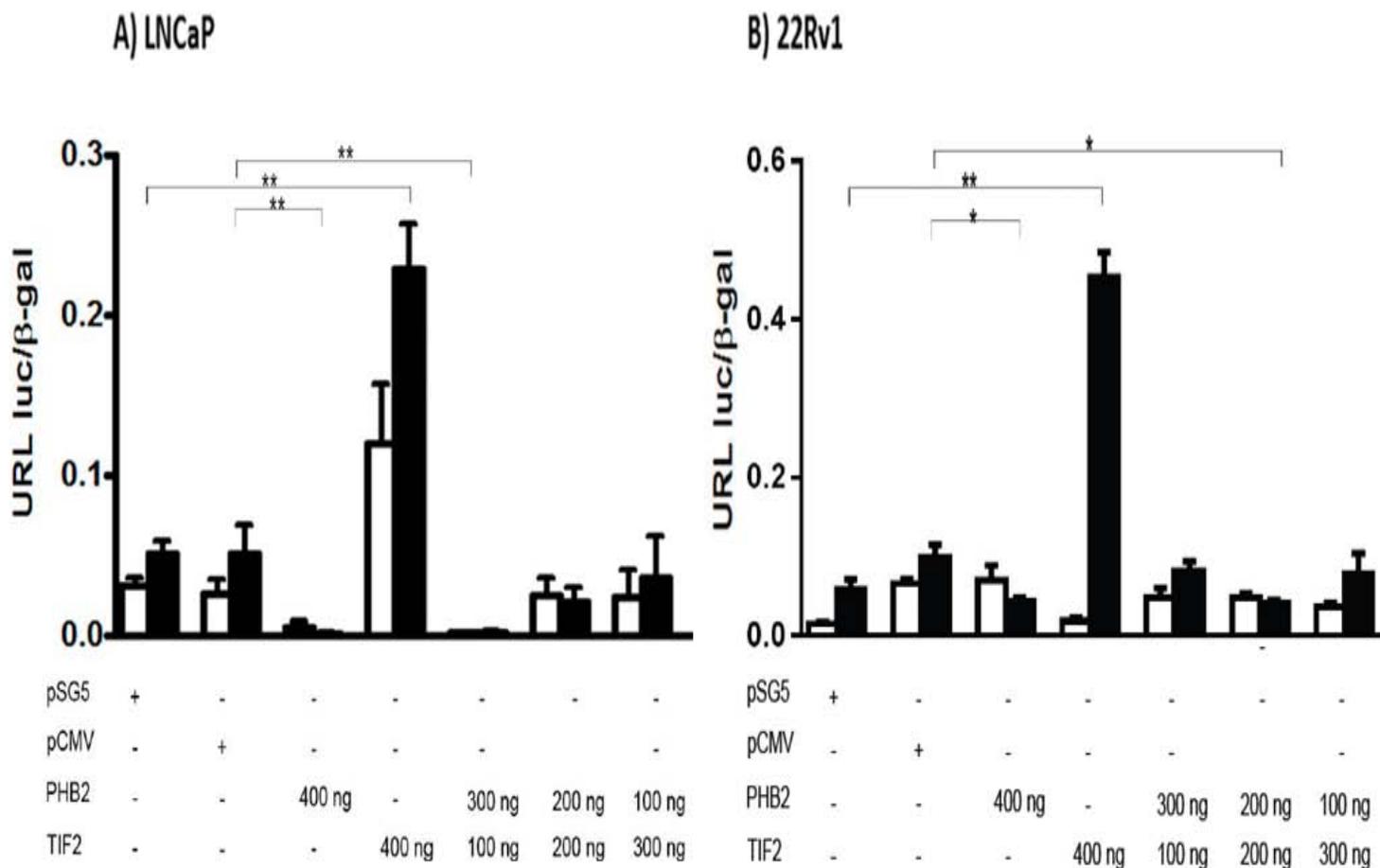


Figura 13. Efecto de la co-expresión de PHB2 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR en células HeLa. Se indican las concentraciones de los plásmidos transfectados. Las lecturas de luciferasa y β -galactosidasa se realizaron después de 48 horas de tratamiento hormonal. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad de galactosidasa y se expresa como unidades relativas de luz (URL). Los datos se muestran como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$) de un experimento representativo de tres ensayos independientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Diversos estudios han descrito la importancia de TIF-2 en el cáncer de próstata. Se ha reportado que TIF-2 se encuentra amplificado o sobre-expresado en el 11% de los casos de cáncer de próstata. Así mismo, se ha observado que su expresión se incrementa con el grado de progresión de la enfermedad (Taylor B. et al., 2010). Dado lo anterior, quisimos explorar el efecto de la coexpresión de PHB2 y TIF2 en líneas celulares de cáncer de próstata, para ello, se realizaron los ensayos de luciferasa en células que expresan al AR (LNCaP y 22Rv1) y en la línea celular PC3 que es AR negativa.

Los ensayos de actividad transcripcional mostraron que en la línea celular LNCaP la sobreexpresión de PHB2 en presencia y ausencia de andrógenos reduce significativamente la actividad transcripcional del AR (Figura 14), mientras que cuando se coexpresa con TIF-2, a concentraciones altas del coactivador, no hay diferencias significativas respecto a los controles. Lo anterior indica que en presencia de PHB2, TIF-2 no modifica la actividad transcripcional del AR. En las células 22Rv1 se observa el mismo efecto que en las células LNCaP. Para la línea celular PC3, podemos ver (al comparar con los controles) que cuando PHB2 se cotransfecta con TIF-2, la actividad de luciferasa se reduce significativamente.



C) PC3

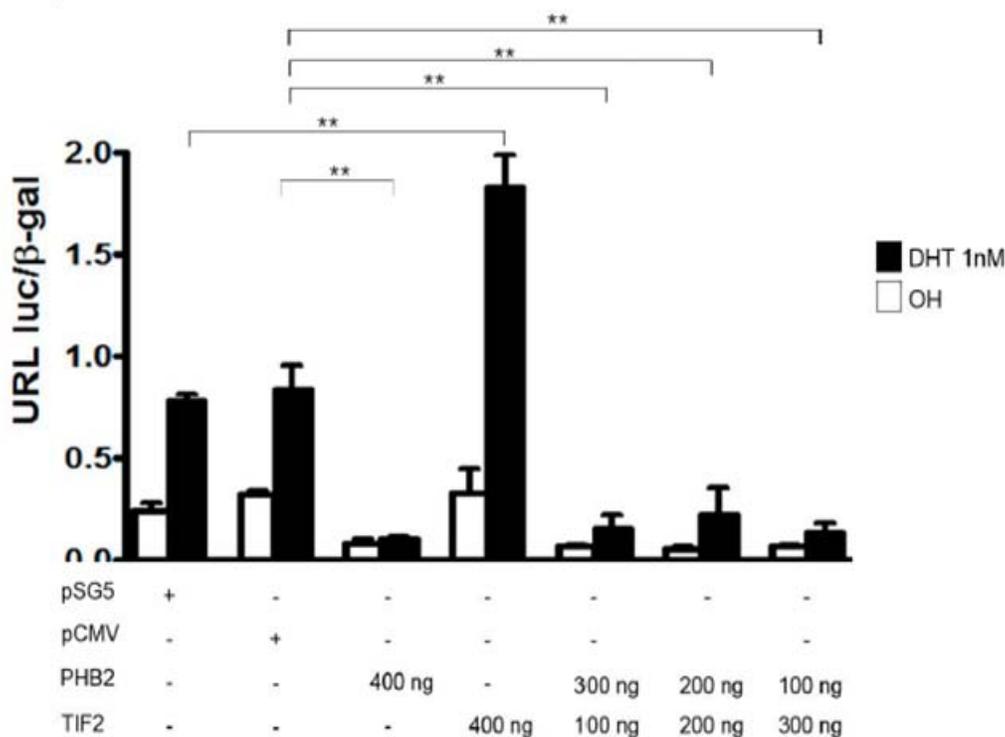


Figura 14. Efecto de la coexpresión de PHB2 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR en líneas celulares de cáncer de próstata. A) LNCaP y B) 22Rv1 células receptor de andrógenos positivas. C) PC3, células receptor de andrógenos negativa transfectadas con el plásmido pCMV-AR. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad de galactosidasa y se expresa como unidades relativas de luz (URL). Los datos se muestran como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$) de un experimento representativo de tres ensayos independientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Por otro lado, cuando TIF-2 se encuentra a una concentración mayor que PHB2 la actividad transcripcional del AR nuevamente se ve reducida, lo cual difiere de lo observado en las células HeLa, en donde la actividad de luciferasa se incrementa al aumentar la concentración de TIF2. Por lo tanto, estos resultados podrían indicar que aun cuando estas líneas son AR negativa, al inducir la expresión del receptor, el efecto de concentraciones altas de TIF-2 en la actividad del AR es regulado de manera distinta en ambas líneas, lo cual podría estar relacionado con el contexto celular.

Los experimentos anteriores mostraron que la sobreexpresión de PHB2 inhibe el efecto del coactivador TIF-2, por lo tanto, con el fin de determinar si este efecto es específico para este correpressor, se realizó un ensayo de luciferasa siguiendo el protocolo de los ensayos anteriores, pero utilizando al correpressor PBX3. PBX3 (Pre-B-cell leukemia homeobox 3) es un factor de transcripción con homeodominios, miembro de la familia de

proteínas TALE que forman dímeros con proteínas HOX. Esta proteína se ha asociado con el crecimiento y progresión de diversos tumores y se sabe que en el cáncer de próstata hay una mayor expresión de PBX3 en el tejido neoplásico comparado con el tejido normal (Ramberg H, et al. 2011). Al igual que PHB2, PBX3 se identificó en el laboratorio como una proteína que interactúa con el AR, mediante el ensayo de doble híbrido en levaduras. En estudios posteriores se confirmó la interacción de PBX3 con el AR y se demostró que la sobreexpresión de PBX3 inhibe la actividad transcripcional del AR (Rivas-Torres, en proceso).

En el ensayo de luciferasa se observa que al sobreexpresar a PBX3 en células HeLa se inhibe la actividad transcripcional del AR comparado con el control (Figura 15), mientras que la presencia de TIF-2 incrementa la actividad. En presencia de TIF2 y de PBX3 se observa que aun a concentraciones altas de PBX3 (300 ng) y bajas de TIF2 (100 ng) la actividad de luciferasa es significativamente mayor a la de los controles. Así mismo, cuando se compara la actividad transcripcional inducida por TIF-2 de manera individual y las combinaciones de TIF-2 y PBX3 no se observan diferencias significativas, por lo que podemos concluir que PBX3 no inhibe el efecto de TIF-2. Por lo tanto, la competencia entre PHB2 y TIF-2 es un mecanismo de regulación de la actividad del AR específico para PHB2.

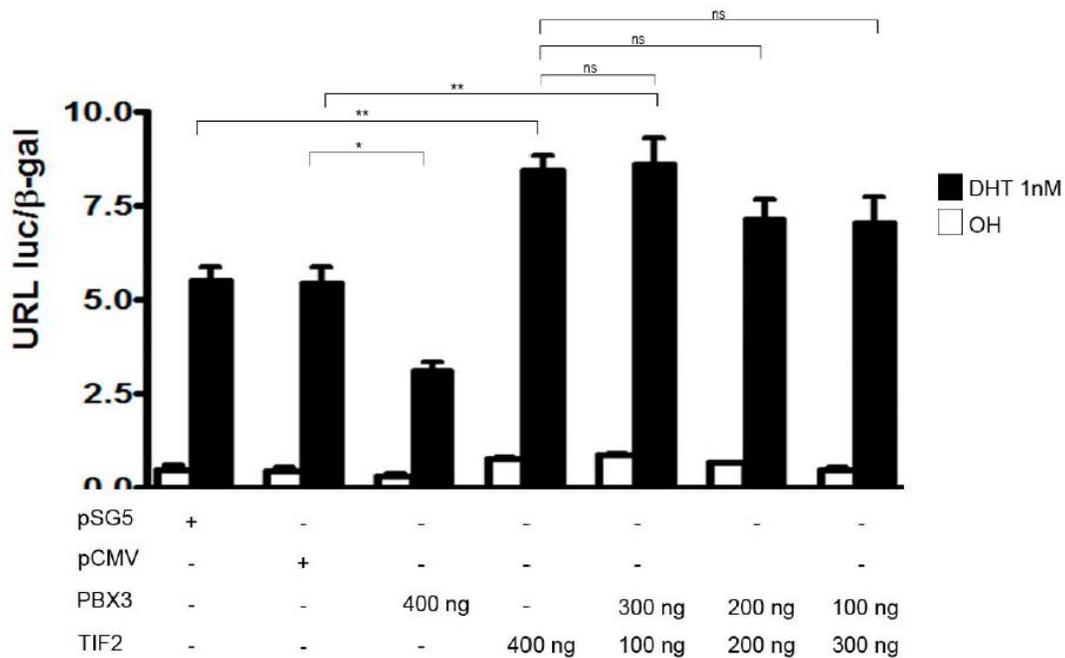


Figura 15. Efecto de la coexpresión de PBX-3 y TIF-2 sobre la actividad transcripcional del AR en células HeLa. PBX3 actúa como un correpresor del AR. Se observa que a concentraciones altas de PBX3, este correpresor no reduce el efecto del coactivador TIF2. La actividad de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad de galactosidasa y se expresa como unidades relativas de luz (URL). Los datos se muestran como el promedio \pm la desviación estándar (n=3) de un experimento representativo de tres ensayos independientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

DISCUSIÓN

El desarrollo y supervivencia de los organismos eucariontes requiere de mecanismos de regulación adecuados para la correcta expresión de sus genes. A pesar de que la célula tiene distintos niveles de regulación de la expresión de proteínas, el mecanismo principal que determina que genes van a ser o no expresados es el inicio de la transcripción. Por lo tanto, la transcripción génica es un proceso altamente coordinado en el que además de los factores de transcripción y la maquinaria basal transcripcional participan diversas proteínas que forman complejos dinámicos. El AR es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y es el encargado de mediar las acciones fisiológicas de los andrógenos.

Diversos estudios han demostrado que la expresión del AR en el tejido prostático puede ser detectada tanto en las células pre-malignas como en células de carcinoma primario, metastásico y de cáncer de próstata resistente a la castración, lo cual indica que este receptor participa en todas las etapas del CaP. Así mismo, se sabe que la expresión de los genes blanco del AR está ampliamente regulada por la interacción del receptor con proteínas correguladoras, los cambios en la expresión, localización, y activación de los correguladores contribuyen al desarrollo y progresión tumoral, al alterar la actividad del AR. Por lo tanto, el conocimiento acerca de los mecanismos de acción y asociaciones de correguladores es importante para determinar cómo, al regular la transactivación del AR, los correguladores pueden contribuir a la patogénesis del cáncer (Heinlein C. y Chang C. 2002).

En los últimos años, se ha incrementado considerablemente el número de correguladores identificados, y su estudio ha permitido establecer los diversos mecanismos por los cuales estas proteínas llevan a cabo su actividad. Al identificar a un nuevo corregulador resulta necesario investigar el mecanismo por el cual regula la actividad transcripcional de los NR, para lograr así, un mejor entendimiento de la regulación transcripcional mediada por los receptores de hormonas esteroides.

Trabajos previos del laboratorio permitieron la identificación de PHB2 como una proteína que interactúa con el AR a través de su dominio amino terminal. Así mismo, los ensayos de actividad transcripcional demostraron que PHB2 es capaz de inhibir la actividad transcripcional del AR en presencia de DHT. A la fecha, PHB2 sólo se ha identificado como un correpressor del ER que interactúa con su dominio de unión a ligando en presencia de estradiol. Por lo tanto, su estudio como corregulador de los NRs se ha enfocado en este receptor y en tejidos blanco de los estrógenos, especialmente en la glándula mamaria.

El papel de PHB2 en la regulación de la transcripción génica inducida por estrógenos se demostró inicialmente en un trabajo de Montano y colaboradores en el cual, mediante ensayos de actividad transcripcional, determinaron que PHB2 regula negativamente la actividad transcripcional de ER α y ER β . Al evaluar el efecto de PHB2 sobre otros receptores esteroides, entre ellos AR, observaron que la sobreexpresión de PHB2 no

afectaba su transactivación. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, nosotros encontramos que PHB2 afecta la actividad del AR, como se muestra en la figura 11, la sobreexpresión de PHB2 inhibe significativamente ($p < 0.01$) la actividad transcripcional del AR de manera concentración dependiente. Estos resultados contrastantes probablemente pueden deberse a diferencias experimentales entre los ensayos de actividad transcripcional descritos en el trabajo de Montano y los nuestros. Así mismo, existe una proteína relacionada estructuralmente a PHB2 y con un 47% de similitud, llamada Prohibitina 1 (PHB1) que ya ha sido identificada como correpresor del AR y que además es regulada por andrógenos, lo cual podría apoyar estos resultados (Gamble S. 2006)

Por tanto, derivado de su estudio como coregulador del ER, se ha descrito que PHB2 puede reprimir la actividad de este receptor al reclutar a las desacetilasas de histonas HDAC1 y HDAC5 (Kurtev V. et al., 2004). Igualmente, se ha reportado un segundo mecanismo en donde PHB2 reprime la actividad del ER α al competir con coactivadores dependientes de ligando como SRC-1 (Montano M. et al. 1999).

Inicialmente, mediante ensayos de luciferasa verificamos que tanto SRC-1 como TIF2 regulan de manera positiva la actividad del AR. En la figura 11, podemos ver que en presencia de DHT la sobreexpresión de ambos coactivadores incrementa la actividad del AR de manera dependiente de la concentración de plásmido transfectedo. Posteriormente para evaluar la competencia entre PHB2 y SRC-1, se realizaron ensayos de luciferasa transfectedo al AR junto con ambos coreguladores en células HeLa. Los resultados mostraron que PHB2 puede inhibir el efecto coactivador de SRC-1. Por lo tanto, demuestran que el mecanismo de competencia entre PHB2 y SRC-1, descrito para el ER α , puede ser aplicado también para el AR.

Posteriormente, quisimos evaluar si este mecanismo de competencia ocurre también con TIF-2, que es el miembro de la familia de coactivadores p160 más relacionado estructuralmente con SRC-1. Los ensayos de luciferasa realizados, coexpresando a PHB2 y TIF-2, mostraron que al igual que con SRC-1, PHB2 logra inhibir el efecto de TIF-2. Así mismo, podemos ver que en ambos casos el grado de actividad del receptor está determinado por las concentraciones de coreguladores transfectedos, de manera que, al aumentar la concentración de coactivadores y disminuyendo la del correpresor se reduce el efecto represor de PHB2. Por lo tanto, estos datos nos indican que existe algún tipo de competencia entre estos coreguladores. Adicionalmente, pudimos comprobar que el efecto inhibitorio de PHB2 sobre la actividad de TIF-2 ocurre en líneas celulares de cáncer de próstata AR positivas (LNCaP y 22Rv1) y negativas (PC3).

Se han descrito diversos ejemplos de competencia entre correpresores y coactivadores. En este contexto se sabe que la proteína SHP (Short Heterodimer Partner) funciona como un correpresor del AR que interactúa con el NTD, pero que también puede unirse al LBD a través de un motivo LXXLL, por lo que puede inhibir la unión del receptor con TIF-2 y FHL-2. Por otro lado, Ciclina D1 puede unirse a la región bisagra del AR y reducir su actividad transcripcional al interrumpir su interacción con el coactivador P/CAF. Así mismo, existen

otros mecanismos de competencia indirecta que no requieren que los correguladores compitan directamente por los sitios de unión al receptor, tal es el caso de SHARP, un correpresor del ER α . SHARP se une al mRNA del coactivador SRA e inhibe su traducción y como consecuencia afecta la actividad transcripcional del ER α .

Aunque nuestros resultados muestran que existe competencia entre PHB2 y los coactivadores SRC-1 y TIF-2 nuestros experimentos no nos permiten determinar si esta competencia es directa o indirecta. Se sabe que SRC-1 y TIF-2 pueden unirse a los dominios de activación transcripcional AF-1 y AF-2 de los NR, en el caso del AR la unión se da preferencialmente en AF-1, pero también existe interacción en AF-2. A partir de los ensayos de interacción entre PHB2 y AR realizados en el laboratorio se ha demostrado que estas proteínas interactúan principalmente a través del dominio NTD del AR, el cual contiene a AF-1, esto nos llevaría a pensar que PHB2 puede estar compitiendo con SRC-1 y TIF-2 por la unión a AF-1. Por lo tanto, para determinar si la sobreexpresión de un correpresor que también se une a la región NTD de AR es capaz de reprimir el efecto coactivador de TIF-2 se realizó un ensayo de luciferasa coexpresando a TIF-2 y a PBX3, otro correpresor estudiado en el laboratorio. Con este ensayo pudimos observar que a concentraciones altas de PBX3, este correpresor no logra reducir el efecto coactivador de TIF-2. Por lo tanto, aun cuando los dos correpresores se unen al mismo dominio del AR, solo PHB2 es capaz de inhibir el efecto de TIF-2, demostrando que la inhibición de la actividad transcripcional de AR no se debe únicamente al hecho de que exista una mayor expresión de correpresores que de coactivadores, sino que se trata de un mecanismo de competencia específico entre PHB2 y TIF-2.

Así mismo, el hecho de que PHB2 presente una secuencia LXXLL al igual que SRC-1 y TIF-2 indica que estos correguladores podrían competir de manera directa por la unión a la región AF-2 del LBD. De acuerdo con nuestros resultados el efecto inhibitorio de PHB2 sobre la actividad de estos coactivadores sugiere que probablemente PHB2 se une al AR con una mayor afinidad que TIF-2 o SRC-1, por lo que de ser cierta esta hipótesis se esperaría que PHB2 interactuara fuertemente con el dominio de unión a ligando. Sin embargo, en ensayos anteriores del laboratorio se ha visto que PHB2 interactúa débilmente con el LBD del AR por lo tanto, es poco probable que la competencia sea directa. Aunado a esto, en diversos estudios se ha establecido que el LBD del AR tiene mayor afinidad por motivos FXXLF que por motivos LXXLL por lo que se favorece la interacción entre los extremos amino y carboxilo-terminal del AR en lugar de la interacción con correguladores con motivos LXXLL (Lavery D. y McEwan I. 2006; Kumar R. y Litwack G. 2009).

Sin embargo, se requiere de más experimentos para determinar las regiones mínimas de interacción entre AR y los correpresores PHB2 y PBX3 ya que posiblemente están ocupando distintos sitios de interacción con el receptor. De tal manera que los sitios de interacción entre TIF-2 y AR probablemente se sobrelapen con los de PHB2 pero no con los de PBX3, lo cual explicaría que PBX3 no compita con TIF-2. Por otro lado, es necesario evaluar la afinidad de la interacción de los correguladores con AR ya que esto determinaría la preferencia del receptor por estas proteínas.

De manera clásica, el mecanismo de acción de los NR propone que los cambios conformacionales que sufren los receptores en presencia de un ligando agonista son distintos a los que se producen con un ligando antagonista. Por consecuencia, promueven que en presencia de un ligando agonista el receptor sea más afín a interactuar con proteínas coactivadoras, mientras que con un ligando antagonista se favorece la interacción con los correpresores. Sin embargo, nuestros resultados muestran que al igual que con el ER, PHB2 es un correpresor que puede interactuar con AR en presencia de un ligando agonista. Este mecanismo ha sido descrito para la proteína LCoR (correpresor dependiente de ligando) la cual se caracteriza por ejercer una función correpresora cuando AR se encuentra unido a un ligando agonista (Asim M, et al. 2011; Grivas P, et al. 2012). Por lo tanto, ya que en este trabajo encontramos que la competencia entre PHB2 y los coactivadores SRC-1 y TIF-2 se lleva a cabo en presencia de un ligando agonista y debido a que la preferencia de los NR por correpresores o coactivadores está determinada por los cambios conformacionales que sufre el receptor al unirse a sus ligandos, sería de gran interés evaluar si la competencia entre PHB2 y los coactivadores SRC-1 y TIF-2 se lleva a cabo en presencia de un ligando antagonista.

El balance dinámico entre coactivadores y correpresores se propone como un mecanismo de regulación transcripcional en el que, la liberación de los correpresores y la unión de coactivadores marca el inicio de un nuevo ciclo de transcripción. Es por ello que estudiar los mecanismos por los cuales los correguladores interactúan entre sí para formar grandes complejos regulatorios es de gran importancia para determinar los niveles de expresión génica. Debido al papel que AR tiene en la patogénesis del cáncer de próstata es de vital importancia determinar el efecto de los correguladores sobre su actividad. En este sentido, este trabajo propone un mecanismo en el cual un correpresor es capaz de inhibir el efecto de dos coactivadores, modificando la actividad transcripcional del AR mediada por un ligando agonista. Finalmente, considerando que en muestras tumorales se ha observado una mayor expresión de SRC-1 y TIF-2 comparado con el tejido sano, los resultados mostrados en este trabajo resultan relevantes, ya que nos indican que PHB2 puede ser una proteína clave para determinar la eficiencia de la terapia endocrina en tumores que sobreexpresan a estos coactivadores. De esta manera, la evaluación de la expresión de correguladores en los tumores puede contribuir a optimizar el tratamiento para el cáncer de próstata y de otros tipos de cáncer hormono-regulados.

9. CONCLUSIONES

- PHB2 inhibe la actividad transcripcional de AR en presencia de un ligando agonista, actuando como un correpresor dependiente de ligando.
- PHB2 disminuye el efecto coactivador de SRC-1, demostrando que el mecanismo de competencia entre PHB2 y SRC-1 descrito para el ER α se puede aplicar también para AR.
- De manera novedosa, en líneas celulares de cáncer de próstata dependientes e independientes de andrógenos, se determinó que existe competencia entre PHB2 y TIF-2 otro miembro de la familia de coactivadores p160.
- A diferencia de PHB2, el correpresor PBX3 no es capaz de inhibir el efecto coactivador de TIF-2.

10. REFERENCIAS

- Ahmed A, Ali S, Sarkar F. 2014. Advances in Androgen Receptor Targeted Therapy for Prostate Cancer. *Cell Physiol*; 229(3)
- Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. 1999. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription *Mol Cell Biol* 19, 6085-97.
- Aranda A, Pascual A. 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* Vol. 81, No. 3.
- Asim M, Hafeez B, Siddiqui I, Gerlach C, Patz M, Mukhtar H, Baniahmad A. 2011. Ligand-dependent corepressor acts as a novel Androgen Receptor corepressor, inhibits prostate cancer growth, and is functionally inactivated by the Src Protein Kinase. *J Biol Chem*. 286(43): 37108–37117.
- Asland R, Stewart AF and Gibson T. 1996. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci*; 21: 87-88.
- Battaglia S, Maguire O, Campbell M. 2010. Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *International Journal of Cancer*. 126, 2511–2519
- Betney R, McEwan I. 2003. Role of conserved hydrophobic amino acids in androgen receptor AF-1 function. *J Mol Endocrinol* 31, 427-39.
- Bevan C, Hoare S, Claessens F, Heery D, Parker M. 1999. The AF-1 and AF-2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* 19:8383–8392
- Buchanan G, Greenberg N, Scher H, Harris J, Marshall V, Tilley W. 2001. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 7, 1273–1281.
- Carlberg C, Molnár F, 2014. Switching Genes on and off: The Example of Nuclear Receptors. In *Mechanisms of Gene Regulation Ed.* Springer Science
- Chang C, Kokontis J, Liao S. 1988. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*;240:324–6.
- Chang C, Norris J, Gron H, Paige A, Hamilton P, Kenan D, Fowlkes D, McDonnell D. 1999. Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors α and β . *Mol Cell Biol* 19, 8226-39.
- Chen C, Welsbie D, Tran C, Baek S, Chen R, Vessella R. 2004. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10, 33–39.
- Chen F, Zhao X. 2013. Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies. *Iran Red Cres Med J*. 15(4):279-84.

- Chen S, Xu Y, Yuan X, Bublely G, Balk S. 2006. Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15969–15974
- Chena Y, Clegga N, Scherb H. 2009. Antiandrogens and androgen depleting therapies in prostate cancer: novel agents for an established target. *Lancet Oncol*; 10(10): 981–991
- Chmelar R, Buchanan G, Need E, Tilley W, Greenberg N. 2006. Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int. J. Cancer*: 120, 719–733
- Chowdhury I, Thompson¹ W, Thomas K. 2013. Prohibitins Role in Cellular Survival through Ras-Raf-MEK-Erk Pathway. *Journal of Cellular Physiology*.
- Christiaens V, Bevan C, Callewaert L, Haelens A, Verrijdt G, Rombauts, W. and Claessens, F. 2002. Characterization of the two coactivator-interacting surfaces of the androgen receptor and their relative role in transcriptional control. *J Biol Chem* 277, 49230-7.
- Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. 2001. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, 23-30.
- Coffey K, Robson C. 2012. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *Journal of Endocrinology* 215, 221–237
- Dalton J, Gao W. 2010. Androgen Receptor. Bunce C.M, Campbell M.J (eds). *Nuclear Receptors, Proteins and Cell Regulation* 8, 143–182. *Springer Science Business Media* B.V. 2010
- Datta K, Tindall D. 2013. Endocrine Mechanisms, Androgen Receptor and Carcinogenesis, and Hormone Escape. A. Tewari (ed). *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. *Springer-Verlag London* 2013.
- Davison S, Bell R. 2006. Androgen physiology. *Semin Reprod Med*; 24(2):71–7
- Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. 2000. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem*; 275: 35848–56.
- De Marzo A, Platz E, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake C, Nakai Y, Isaacs W, Nelson W. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* (4):256-69.
- Dillard P, Lin M, Khan S. 2008. Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. *Mol Cell Endocrinol*;295:115–20.
- Drachenberg D, Elgamal A, Rowbotham R, Peterson M, Murphy G. 1999. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 41, 127–133.

Dubbink H, Hersmus R, Verma C, Van der Korput H, Berrevoets C, Van Tol J, Ziel-van der Made A, Brinkmann A, Pike A, Trapman J. 2004 Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18,2132-50.

Duff, J, McEwan I. 2005. Mutation of histidine 874 in the androgen receptor ligand-binding domain leads to promiscuous ligand activation and altered p160 coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 19, 2943–2954

Egan A, Yan D, Haitao Z, Yanfeng Q, Steven P, Balk, Oliver S. 2014. Castration-resistant prostate cancer: Adaptive responses in the androgen Axis. *Cancer Treatment Reviews* 40, 426–433

Feng S, Tang Q, Sun M, Chun J, Evans C, Gao A. 2009. Interleukin-6 increases prostate cancer cells resistance to bicalutamide via TIF2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8, 665–671.

Frank S, Miranti C. 2013. Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Frontiers in oncology*, 3:273.

Fu M, Rao M, Wu K, Wang C, Zhang X, Hessien M, Yeung Y, Gioeli D, Weber M, Pestell R. 2004. The androgen receptor acetylation site regulates cAMP and AKT but not ERK-induced activity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 29436–29449.

Fu M, Wang C, Reutens A, Wang J, Angeletti R, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantaggiati M, Pestell R. 2000. p300 and p300/cAMP response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 20853–20860

Garcia E, Laudet V, Robinson-Rechavi M. 2003. Nuclear receptors are markers of animal genome evolution. *J. Struct. Func. Genom.* 3, 177–184.

Gioeli D, Paschal BM. 2012. Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*;352(1–2):70–8.

Giovannucci E, Stampfer M, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens C, Kanto V. 1997. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3320–3323.

Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch. 2002. Molecular action of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology* 198 15-24

Gottlieb B, Beitel L, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. 2012. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 33, 887–894.

Green S, Mostaghel E, Nelson P. 2012. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 360, 3–13.

Grivas P, Papavassiliou A. 2012. Transcriptional corepressors in cancer. Emerging targets for therapeutic intervention. *Cancer*. 15;119 (6):1120-8.

Gurevich I, Flores AM, Aneskievich BJ. 2007. Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol*;223(3):288-98.

Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F. 2007. The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 67, 4514–4523.

Haelens A, Verrijdt G, Callewaert L, Christiaens V, Schauwaers K, Peeters B, Rombauts, W, Claessens F. 2003. DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation. *Biochem. J.* 369, 141–151

Haendler B, Cleve A. 2012. Recent developments in antiandrogens and selective androgen receptor modulators. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 352, 79–91

Han G, Buchanan G, Ittmann M, Harris J, Yu X, Demayo F, Tilley W, Greenberg N. 2005. Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1151–1156.

Hannelore V. Heemers, Tindall D. 2007. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocrine Reviews* 28(7):778–808

He B, Mingos J, Lee L, Wilson E. 2002. The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators. *J Biol Chem* 277, 10226-35.

Heemers H, Tindall D. 2007. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*,28(7):778–808

Heinlein C, Chang C. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23, 175-200.

Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren, D, Claessens F. 2012. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol. Cell Endocrinol.* 348, 411–417

Ishizuka T, Lazar M. 2005. The nuclear receptor corepressor deacetylase activating domain is essential for repression by thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*; 19: 1443-1451.

Jenster G, Trapman J, Brinkmann A. 1993. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 293:761-768.

Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074–1080.

Johnson A, O'Malley B. 2012. Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: Critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348 (2012) 430–439

Jones P, Sachs L, Rouse N, Wade P, Shi Y. 2001. Multiple N-CoR complexes contain distinct histone deacetylases. *J Biol Chem*; 276: 8807-8811.

Kang H, Lin H, Hu Y, Yeh S, Huang K, Chang C. 2001. From transforming growth factor-beta signaling to androgen action: identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(6):3018-23.

Kim, J.H., Stallcup, M.R., 2008. P160 Coactivators: Critical Mediators of Transcriptional Activation by Nuclear Receptors. World Scientific Publishing, Singapore.

Kumar R, Litwack G. 2009. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids*; 74(12): 877–883

Lavery D, McEwan I. 2006. The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics. *Biochem Soc Trans*;34:1054–7.

Lee B, Taylor M, Robinet P, Smith J. 2013. Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Res*;73:1211–8.

Lee J, Cheong J, Lee Y, Na S, Lee S. 2000. Dissecting the molecular mechanism of nuclear receptor action: transcription coactivators and corepressors. *Exp Mol Med*. 32(2):53-60.

Leon C, Locke J, Adomat H, Etinger S, Twiddy A, Neumann R. 2010. Alterations in cholesterol regulation contribute to the production of intratumoral androgens during progression to castration-resistant prostate cancer in a mouse xenograft model. *Prostate* 70, 390–400.

Li C, Wu R, Amazit L, Tsai S, Tsai M, O'Malley B. 2007. Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. *Mol. Cell. Biol*. 27, 1296–1308.

Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju B, Ohgi K. 2009. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* 139, 1069–1083.

Lin H, Yeh S, Kang H, Chang C. 2001. Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(13):7200-5.

Lonard D, O'malley B. 2007. Nuclear receptor coregulators: judges, juries and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27, 691-700.

Luisi B, Otwinowski X, Freedman L, Yamamoto K, Sigler P. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA *Nature*, 352: 497–505.

MacLean H, Warne G, Zajac J. 1997. Localization of Functional Domains in the Androgen Receptor. *Steroid Biochem Molec Biol* Vol. 62, No. 4, pp. 233-242

Manavathi B, Venkata S, Samanthapudi, Narasimha V, Gajulapalli R. 2014. Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development *Front Cell Dev Biol*.12;2:34

Marcelli M, Ittmann M, Mariani S. 2000. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60:944-949.

McEwan I, Lavery D, Fischer K, Watt K. 2007. Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors *Nucl Recept Signal* Vol.5.

Melvin V, Harrell C, Adelman J, Kraus W, Churchill M, Edwards D. 2004. The Role of the C-terminal Extension (CTE) of the Estrogen Receptor and DNA Binding Domain in DNA Binding and Interaction with HMGB. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 15, pp. 14763–14771.

Metzger E, Muller J, Ferrari S, Buettner R, Schule R. 2003. A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *Embo J* 22, 270-80.

Migeon B, Brown T, Axelman J, Migeon C. 1981. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6339–6343

Mishra S, Murphy L, Murphy L. J. 2006. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 10, No 2, pp. 353-363.

Mitsiades N. 2013. A Road Map to Comprehensive Androgen Receptor Axis Targeting for Castration-Resistant Prostate Cancer. *American Association for Cancer Research* (15):4599-605

Montano M, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. 1999. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6947–52.

Mujib R, Miyamoto H, Chang C. 2004 Androgen Receptor Coregulators in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Clin Cancer Res*;10:2208-2219

Nam R, Elhaji Y, Krahn M. 2000. Significance of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene in prostate cancer progression. *J Urol* 164:567-572, 2000.

Nazareth L, Weigel N. 1996. Activation androgen of the human receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 19900–19907.

Nikolenko J, Krasnov A. 2007. Nuclear Receptors: Structure and Mechanisms of Action. *Russian Journal Of Genetics.* Vol. 43 No. 3.

Nishida T. and Yasuda H. 2002. PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 41311–41317.

Oettel M. 2003. Testosterone metabolism, dose-response relationships and receptor polymorphisms: selected pharmacological/toxicological considerations on benefits versus risks of testosterone therapy in men. *Aging Male* 6, 230–256

Orphanides G, Reinberg D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439- 451.

Owen G, Zelent A. 2000. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 57

Palmberg C, Koivisto P, Hyytinen E, Isola J, Visakorpi T, Kallioniemi O. 1997. Androgen receptor gene amplification in a recurrent prostate cancer after monotherapy with the nonsteroidal potent antiandrogen Casodex (bicalutamide) with a subsequent favorable response to maximal androgen blockade. *Eur Urol* 31, 216–219.

Pardee K, Necakov S. 2011. Nuclear Receptors: Small Molecule Sensors that Coordinate Growth, Metabolism and Reproduction. T.R. Hughes (ed). *A Handbook of Transcription Factors, Subcellular Biochemistry 52*. Springer Science Business Media B.V. 2011.

Poukka H, Karvonen U, Janne O, Palvimo J. 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14145–14150

Quigley C, Debellis A, Marschke K, Elawady M, Wilson E, French F. 1995. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews* 16, 271- 321.

Ramberg H, Alshbib A, Berge V, Svindland A, Taskén KA. 2011. Regulation of PBX3 expression by androgen and Let-7d in prostate cancer. *Mol Cancer*; 10:50

Rochette-Egly C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signaling pathways through phosphorylation. *Cellular Signalling* 15. 355–366

Sack, J, Kish K, Wang C, Attar R, Kiefer S, An Y. 2001. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4904–4909.

Scher H, Beer C, Higano C. 2010. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1–2 study. *Lancet* 375, 1437–1446.

Scherr D, Swindle P, Scardino P. 2003. National comprehensive cancer network guidelines for the management of prostate cancer. *Urology* 61 (Suppl. 2A), 14–24.

Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F. 1999. Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem. J.* 341: 515–521

Selman S. 2011. The McNeal Prostate: a review. *Urology* 78(6): 1224-1228.

Shafi A, Yen A, Weigel N. 2013. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 140, 223–238.

Shang, Y., Myers, M., Brown, M., 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell.* 9, 601–610.

Shen H, Coetzee G. 2005. The Androgen Receptor: Unlocking the Secrets of Its Unique Transactivation Domain. *Vitamins and Hormones*, Volume 71,301-19.

Simoncini T, Genazzani A.2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 148, 281-292

- Smith D, Tort D. 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Molecular Endocrinology* 7, 4-11.
- Steinberg M. 2009. Degarelix: A Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist for the Management of Prostate Cancer. *Clinical Therapeutics, Volume 31, Part 2*. 2312-2331
- Steinkamp M, O'Mahony O, Brogley M, Rehman H, Lapensee E, Dhanasekaran S, Hofer M, Kuefer R, Chinnaiyan A, Rubin M, Pienta K, Robins D. 2009. Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res*;69:4434-42.
- Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J. 2010. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *J Biomed Biotechnol*. 684504
- Tammela T. 2012. Endocrine prevention and treatment of prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 360, 59-67
- Taplin M, Ho S. 2001. Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer Vol. 86(8):3467-77
- Taylor B, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver B. 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer
- Thomas C, Zoubeidi A, Kuruma H, Fazli L, Lamoureux F, Beraldi E, Monia B, MacLeod A, Thuroff J, Gleave M. 2011. Transcription factor stat5 knockdown enhances androgen receptor degradation and delays castration-resistant prostate cancer progression *in vivo*. *Mol Cancer Ther*; 10, 347-359.
- Thornton J, Kelley D. 1998. Evolution of the androgen receptor: structure-function implications. *Bioessays* 20: 860-869 *Cancer Cell* 18(1):11-22.
- Tomlins S, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson B, 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10, 177-188.
- Tran C, Ouk S, Clegg N. 2009. Development of a second generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324, 787-790.
- Tu J, Rohan S, Kao J, Kitabayashi N, Mathew S, Chen Y. 2007. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: Frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 20, 921-928.
- Ueda T, Mawji N, Bruchofsky N, Sadar M. 2002 Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277 38087-38094.
- Van de Wijngaert D, Dubbink H, Van Royen M, Trapman J, Jenster G. 2012. Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding Groove. *Molecular and Cellular Endocrinology* 352, 57-69

Voegel J, Heine M, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. 1996. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 15:3667–3675

Wang L, Hsu C, Chang C. 2005. Androgen receptor corepressors: an overview.

The Prostate 63:117-130

Wang S, Zhang B, Faller DV. 2004. BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists. *EMBO J*; 23: 2293-303.

Wolf I, Heitzer M, Grubish M, DeFranco D. 2008. Coactivators and Nuclear Receptor Transactivation. *Journal of Cellular Biochemistry* 104:1580–1586

Wong M, Guo C, Zhang J. 2014. Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *Am J Clin Exp Urol*;2(3):169-187.

Yan J, Yu C, Ozen M, Ittmann M, Tsai S, Tsai M. 2006. Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway. *Cancer Research*, 66, 11039–11046.

Yap T, Carden C, Attard G, de Bono J. 2008. Targeting CYP17: established and novel approaches in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*; 8 : 449 – 57.

Yeap B, Voon D, Vivian J, McCulloch R, Thomson A, Giles K, Czyzyk-Krzeska M, Furneaux H, Wilce M, Wilce J. 2002. Novel binding of hur and poly(c)-binding protein to a conserved uc-rich motif within the 3'-untranslated region of the androgen receptor messenger rna. *J. Biol. Chem.* 277, 27183–27192.

Yeh S, Lin H, Kang H, Thin T, Lin M, Chang C. 1999. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Acad Sci USA*; 96:5458–63.

Yoon H, Chan D, Huang Z, Li J, Fondell J, Qin J, Wong J. 2003. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J*; 22: 1336-1346.

Yoshida T, Kinoshita H, Segawa T, Nakamura E, Inoue T, Shimizu Y. 2005. Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgendependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res* 65, 9611–9666

Zhang S, Pavlovitz B, Tull J, Wang Y, Deng F, Fuller C. 2010. Detection of TMPRSS2 gene deletions and translocations in carcinoma, intraepithelial neoplasia, and normal epithelium of the prostate by direct fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 19, 151–156.

Zhou Z, Lane M, Kemppainen J, French, Wilson E. 1995. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Molecular Endocrinology* 9: 208-218.