



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Estudio molecular de los genes *BCAS2* y *PINX1 (LPTS)*, como correguladores del Receptor de Estrógenos alfa, en líneas celulares de cáncer de mama**

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIA YAMILET NORIEGA REYES

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Elizabeth Langley McCarron  
Instituto Nacional de Cancerología

COMITÉ TUTORAL

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo  
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. José Moreno Rodríguez  
Hospital Juárez de México

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE, 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.

Éste estudio se realizó bajo la dirección del Dra. Elizabeth Langley McCarron, en el Laboratorio de Cáncer Hormono-regulado del Instituto Nacional de Cancerología.

El comité tutorial estuvo integrado por la Dra. Elizabeth Langley McCarron (Instituto Nacional de Cancerología), el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo (Instituto Nacional de Cancerología) y el Dr. José Moreno Rodríguez (Hospital Juárez de México).

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología y con el apoyo de CONACyT 33831-M y 182189, también se recibió apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA/PAPITT IN222908.

Durante la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto Nacional de Cancerología y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por ofrecer el apoyo e infraestructura necesaria para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca proporcionada para mis estudios doctorales, así como por financiar mi estancia en el Instituto de Biología Molecular Barcelona IBMB-CSIC.

Agradezco a mi tutor la Dra., Elizabeth Langley McCarron, por aceptarme como alumna de doctorado y haber estado en cada paso de mi formación, brindándome su continuo apoyo, así como confianza y experiencia.

Agradezco también a los miembros de mi Comité Tutorial: El Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y el Dr. José Moreno Rodríguez, por todo su apoyo y consejos durante este proceso.

Agradezco a los miembros de mi Jurado de Examen de Grado: La Dra. Marcela Lizano Soberón, la Dra. Elizabeth Langley McCarron, el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, la Dra. Martha Robles Flores y el Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes por sus valiosos comentarios que ayudaron a enriquecer y mejorar la presente tesis.

Agradezco al Dr. Albert Jordan, Científico Titular CSISC, Líder del grupo "Chromatin regulation of human and viral gene expression" Instituto de Biología Molecular Barcelona IBMB-CSIC, por haberme recibido y apoyado en la estancia que realice en su laboratorio, ya que gracias a su intervención y experiencia, se pudo llevar a cabo parte de esta tesis.

Agradezco a la Dra., Noemi Baranda Avila y al Dr., Luis Fernando Oñate Ocaña, por su intervención en la parte bioestadística de este trabajo.

Agradezco al Dr. Primitivo Olivera González, por haber donado un acervo de líneas celulares primarias de diferentes estadios de cáncer de mama.

En forma especial, agradezco a mi compañero y amigo Miguel Ángel Rivas Torres, por su ayuda y apoyo durante todo este proceso, ya que sin él hubiera sido más complicada la realización de esta tesis.

## **ABSTRACT**

Estrogen receptor alpha (ER alpha) has an established role in breast cancer biology. Transcriptional activation by ER alpha is a complex and multistep process, and is influenced by coactivator and corepressor proteins. In this work is describing two coregulators of ER alpha. BCAS2 is capable of increasing ER $\alpha$  transcriptional activity to a degree similar to that achieved by SRC-1 in breast cancer cell lines and that this effect specifically targets AF-1 transcriptional activity. GST pull-down assays show direct interaction between BCAS2 and the ER $\alpha$  N-terminus. Additionally, ChIP assays show that this interaction is carried out on the E<sub>2</sub> regulated promoters. Furthermore, BCAS2 presents a positive effect on the proliferation of the breast cancer cell line MCF7 in presence of E<sub>2</sub>. Additionally, we confirmed that BCAS2 is a coactivator of AR and PR. Enhanced expression of BCAS2 regulates the expression of genes that play a role in breast cancer tumorigenesis. On the other hand, we demonstrate a role for PINX1 as a corepressor of ER $\alpha$ . PINX1 represses AF-1 transcriptional activity, as well as AF-2 activity in the presence of E<sub>2</sub>. ChIP assays verified that the interaction between ER alpha and PINX1 occurs on the E<sub>2</sub> regulated promoters. PINX1 also interacts with the androgen and progesterone receptors. However, we demonstrate that PINX1 is a coactivator of these receptors by luciferase assays, as well as increasing DHT induced proliferation of prostate cancer cell lines. Enhanced expression of PINX1 also deregulates the expression of a number of genes that have a role in cell growth and proliferation in breast cancer cell lines.

## **RESUMEN**

El receptor de estrógenos alfa (ER alfa) tiene un papel establecido en la biología del cáncer de mama. La activación transcripcional por ER alfa es un proceso complejo y de múltiples pasos, y está influenciado por proteínas coactivadoras y correpressoras. En este trabajo se describen dos correguladores de ER alfa. BCAS2 es capaz de aumentar la actividad transcripcional de ER alfa en un grado similar al observado con SRC-1 en líneas celulares de cáncer de mama. Además, BCAS2 aumenta específicamente la actividad transcripcional de AF-1, esto se demostró a través de ensayos pull-down-GST, que muestran la interacción directa entre BCAS2 y la región N-terminal de ER alfa. Los ensayos de ChIP muestran que esta interacción se lleva a cabo en promotores regulados por E<sub>2</sub>. Adicionalmente, BCAS2 presenta un efecto positivo sobre la proliferación de la línea celular MCF7 en presencia de E<sub>2</sub>. Se confirmó que BCAS2 es un coactivador de AR y se demostró que podría ser un nuevo coactivador de PR, pero las interacciones entre el receptor de la hormona y coactivador, se desconocen aún. La sobre expresión de BCAS2, regula la expresión de genes que tienen un papel en la tumorigénesis del cáncer de mama. Por otro lado, describimos una interacción de la proteína PINX1 con ER $\alpha$  y se demuestra un papel de PINX1 como correpresor de ER $\alpha$ . PINX1 reprimió la actividad transcripcional de AF-1, así como la actividad AF-2 en presencia de E<sub>2</sub>. Los ensayos de ChIP, verificaron la interacción entre ER alfa y PINX1, y que esta se produce en promotores regulados por E<sub>2</sub>. PINX1 también interactúa con los receptores de andrógenos y progesterona y promueve su actividad transcripcional. Adicionalmente, incrementa la proliferación inducida por DHT de líneas celulares de cáncer de próstata. La expresión aumentada de PINX1 también desregula la expresión de un número de genes que tienen un papel en el crecimiento celular y la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.

## **ÍNDICE**

|                       | PAGINA |
|-----------------------|--------|
| I. INTRODUCCIÓN       | 1      |
| II. ANTECEDENTES      | 17     |
| III. HIPÓTESIS        | 21     |
| IV. OBJETIVOS         | 22     |
| V. MATERIAL Y METODOS | 23     |
| VI. RESULTADOS        | 32     |
| VII. DISCUSIÓN        | 59     |
| VIII. CONCLUSIONES    | 68     |
| IX. REFERENCIAS       | 69     |
| X. ANEXOS             | 80     |
| XI. ENTREGABLES       | 86     |

## **INTRODUCCIÓN**

### **Cáncer de Mama (CaMa)**

El cáncer de mama es una neoplasia maligna que tiene su origen en la proliferación acelerada e incontrolada de células que tapizan, en 90 % de los casos, el interior de los conductos que durante la lactancia llevan la leche desde los acinos glandulares, donde se produce, hasta los conductos galactóforos, situados detrás de la areola y el pezón, donde se acumula en espera de salir al exterior. El tipo de cáncer más frecuente es epitelial y se origina en la unidad ductolobulillar terminal. El carcinoma ductal infiltrante representa 85% de las neoplasias invasoras, seguido del carcinoma lobulillar infiltrante, con 5 a 10% de los casos. Las variedades más frecuentes son el carcinoma común, sólido, alveolar, tubulolobular y pleomórfico. Los tipos histopatológicos menos comunes son el micropapilar y metaplásico, los cuales implican peor pronóstico (López Mendoza y Méndez Martínez, 2008).

El cáncer de mama se ha convertido en el cáncer más diagnosticado en mujeres a nivel mundial (Jemal A, *et al.*, 2008) causando el 15% de las defunciones por cáncer maligno en mujeres. Tan solo en el año 2012 se estimaron 522 mil mujeres en el mundo, y en México el número de muertes se incrementó a 5,680, con una tasa de 14.2, convirtiéndose en la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mayores de 25 años de edad (Globocan 2012, Palacio M, *et al.*, 2009). Existen pocos reportes de las características epidemiológicas de pacientes mexicanas, Rodríguez encontró que el 45% de mujeres con carcinoma de mama eran menores de 50 años de edad, el 29% tenía entre 40 y 49 años, una década antes que la edad de inicio en mujeres de EUA. En el año 2000 la población de mujeres en riesgo de padecer cáncer de mama era de 17 millones y se espera un incremento a 29.5 millones en el año 2020 (Rodríguez C, *et al.*, 2001). Según la OMS en su reporte del Globocan 2012, el CaMa es ahora el más común de los cánceres tanto en países desarrollados como subdesarrollados con alrededor de



1.67 millones de nuevos casos estimados, un aumento mayor del 20% con respecto al 2008. En México ha alcanzado un 35.35% de los casos de cáncer reportados en mujeres, seguido del cáncer de cérvix, con el 23.28%.

## **Factores de Riesgo**

Los estudios epidemiológicos a gran escala sugieren que a mayor tiempo de exposición a estrógenos, mayor riesgo de cáncer de mama. Una menarquia temprana, una menopausia tardía, la nuliparidad y una edad tardía al primer embarazo se relacionan con un aumento en la incidencia. (Gail MH., *et al.* 1989; Rosner B y Colditz GA., 1996, Hankinson SE., *et al.*, 2004; Hildring N., *et al.*, 2007; Amir., *et al.*, 2010). La intensidad de exposición juega un papel importante: en mujeres posmenopáusicas, cuyos estrógenos provienen fundamentalmente de la aromatización en tejidos periféricos de los andrógenos suprarrenales, la obesidad se asocia a un incremento del riesgo (la aromatización de andrógenos se produce sobre todo en el tejido graso) (Huang Z., *et al.* 1997). También el uso de terapia hormonal de reemplazo aumenta el riesgo. Estas dos últimas situaciones están vinculadas a un aumento de la cantidad de estrógenos circulantes (Hankinson SE., *et al.* 1998; Romero F., *et al.* 2008; Rodríguez C. y Carpuso G., 2006). La incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad. Dicho incremento persiste tras la menopausia, pero a una velocidad 6 veces menor. Esto sugiere la importancia de la función ovárica (en cuanto a síntesis de estrógenos) en el riesgo de cáncer de mama (Winer E., *et al.* 2001)

Las hormonas esteroides juegan un papel importante en la fisiopatología de diversos tipos de cáncer. Diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* indican que, en células derivadas de cáncer de endometrio y de mama, el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) induce un incremento en la proliferación (Foster JS., *et al.*, 2001; Holinka CF., *et al.*, 1986). En ratas hembra, el tratamiento prolongado con  $E_2$  aumentó un 82% la incidencia de tumores mamarios (Singh., B *et al.*, 2011).

## Tratamiento antihormonal

Desde el trabajo de Barbara Mason *et al.* en 1983, en el que se determinó la expresión de los receptores de progesterona (PR) y estrógenos (ER) de todos los cánceres de mama incidentes entre 1976 y 1980 de la ciudad de Auckland (1,136 casos), se acepta la importancia clínica de la positividad de la expresión de ER y PR. En varios estudios se ha constatado que cuando ambos receptores son positivos, existe una supervivencia significativamente mayor que cuando son negativos, al menos en los primeros 5 años. Estos resultados han sido consistentemente y repetidamente confrontados (Hilsenbeck S. *et al.*, 1998; Costa S-D. *et al.*, 2002). Hoy se aceptan como factores de pronóstico molecular de importancia en enfermedad localizada; en enfermedad avanzada los datos son más controvertidos. Chang *et al.*, en 2003, publicaron un análisis retrospectivo con 346 pacientes en el que estudiaron la influencia de ciertos datos clínico patológicos del tumor primario en el desarrollo de la enfermedad una vez que se desarrollan las metástasis. Curiosamente, encontraron asociación positiva entre la expresión del PR (y no del ER) en el tumor primario con una evolución más benigna en la enfermedad metastásica. Sin embargo, lo que está muy claro hoy en día es el beneficio que se obtiene en todas aquellas pacientes con receptores positivos merced al bloqueo hormonal con los diferentes agentes disponibles.

Ha sido importante el desarrollo de las terapias endócrinas que están basadas en el uso de compuestos antihormonales que bloquean de forma completa o parcial la actividad del receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ), denominados moduladores del receptor de estrógenos (SERMs), como tamoxifén y raloxifén, o de compuestos que inhiban la síntesis de hormonas a nivel sistémico, como los inhibidores de aromatasa (Gustafsson JA y Warner M., 2000). El cáncer de mama  $ER\alpha$ -positivo constituye más del 60% de los cánceres en mujeres pre-menopáusicas y casi el 80% en mujeres diagnosticadas después de la menopausia, haciendo a este receptor un potente predictor de la respuesta a terapia endócrina (Heldring N., *et al.*, 2007; Jensen EV., *et al.*, 2010). La expresión

del ER $\alpha$  y PR se correlaciona con tumores de bajo grado histológico que responden favorablemente a tratamiento hormonal, sobretodo en pacientes postmenopáusicas (Callagy G., *et al.*, 2003; Lacroix M., *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar de que estas terapias han mostrado una gran eficacia, eventualmente las células tumorales muestran cierta resistencia a la terapia antihormonal, por lo que en años recientes el estudio de proteínas que previenen o median esta resistencia endócrina, ha provocado mucho interés tanto para elucidar los mecanismos de acción de las hormonas esteroides como para evaluar su aplicabilidad como marcadores de diagnóstico y pronóstico o como blancos terapéuticos para regular la actividad hormonal en varios cánceres hormono-regulados.

## **El Receptor de Estrógenos**

Los efectos biológicos del E<sub>2</sub> son mediados a través de su interacción específica con receptores ligando específicos. Actualmente, se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como receptor estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ ), los cuales están formados por una cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente (Ogawa S, *et al.*, 1998). Existe un tercero y nuevo receptor de estrógenos transmembranal (7TMR), conocido como GPR30, el cual actúa de manera independiente del ER $\alpha$  y ER $\beta$  pero que influye en la activación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), participando así en la biología del cáncer de mama (Filardo E. *et al.*, 2006). ER $\alpha$  y  $\beta$  son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (NR) que incluye todos los receptores de hormonas esteroides (SHR) como los receptores de andrógenos (AR), glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), PR y los receptores similares al receptor de estrógenos (ERR). Adicionalmente, incluyen receptores nucleares no esteroides y receptores huérfanos (Tsai M-J y O'Malley BW 1994). Los miembros de esta familia son factores de transcripción activados por ligando que comparten estructura y mecanismos de acción similares (Aranda A y Pascual A, 2001). La

relación evolutiva entre los receptores de esteroides/nucleares ha sido deducida por la alta conservación entre sus dominios de unión al DNA (DBDs) y en un menor grado por sus dominios conservados de unión al ligando (LBDs), indicando que este gran grupo de proteínas provino de una molécula común hereditaria (Ogawa *et al.*, 1998).

### **Estructura de los receptores de estrógenos**

Los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ , están conformados por seis dominios denotados de la "A" a la "F", codificados por 8-9 exones (Kuiper *et al.*, 1998). Los receptores de estrógenos, tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) muy conservado que mediante dedos de zinc, permite al receptor unirse a secuencias específicas en los promotores o a los enhancers de genes regulados por estrógeno (Kumar R y Thompson EB, 1999; White R y Parker MG, 1998; Huang P. *et al.*, 2010). Se ha observado que ER $\alpha$  interacciona con sus ERE en regiones promotoras y 3' de más de 900 genes que responden a estrógenos tanto al alta como a la baja (Klinge, 2001; Welboren *et al.*, 2007; Welboren *et al.*, 2009; Romano, *et al.*, 2010). La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a estrógenos fisiológicos como es el 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), la estrona y el estriol, que son sintetizadas a partir de andrógenos por medio de una aromatasa (Kuiper *et al.*, 1997), y a ligandos sintéticos que pueden activar ó inhibir la actividad del receptor, llamados SERMs (Moduladores Selectivos del ER). Adicionalmente, este dominio contiene una señal de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2, el cual es dependiente de ligando. La interacción con E<sub>2</sub> activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen la dimerización, localización nuclear y muy importantemente una superficie sobre la región AF-2 que promueve su interacción con coactivadores transcripcionales (Edwards, 1999; Klinge, 2000). Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra. La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia, tanto en tamaño como en secuencia de aa, y contiene una región de transactivación denominada AF-1, la

cual es ligando-independiente, y también recluta proteínas correguladoras. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente ó sinérgica dependiendo del contexto celular y del promotor (Thompson y Kumar 2003; Mérot Y., *et al.*, 2004; Zwart W., *et al.*, 2010). Adicionalmente, la región N-terminal contiene sitios de fosforilación que son regulados por una variedad de protein-cinasas (Kumar y Thompson, 2003) (ver figura 1). El papel que juega la fosforilación en la actividad de los receptores nucleares no se encuentra completamente definida, pero está involucrada en la modulación de la actividad de AF-1 y su interacción con correguladores, así como en la intercomunicación con otras vías de transducción de señales (cross-talk). Se ha observado que la fosforilación del ER está relacionada con su unión a sus elementos de respuesta a estrógenos. Todos los receptores de esteroides, incluyendo el ER $\alpha$  son fosforilados después de la unión a sus ligandos respectivos (Weigel NL., *et al.*, 1998). Adicionalmente, la fosforilación del ER puede modular la unión al ERE. En ER $\alpha$ , la fosforilación de Ser 118 y Ser 167 son de particular importancia para la transactivación mediada por AF-1. Sin embargo, se conoce poco sobre la regulación de AF-1 en ER $\beta$  (Kato S., *et al.*, 1995; Glaros, S., *et al.*, 2006).

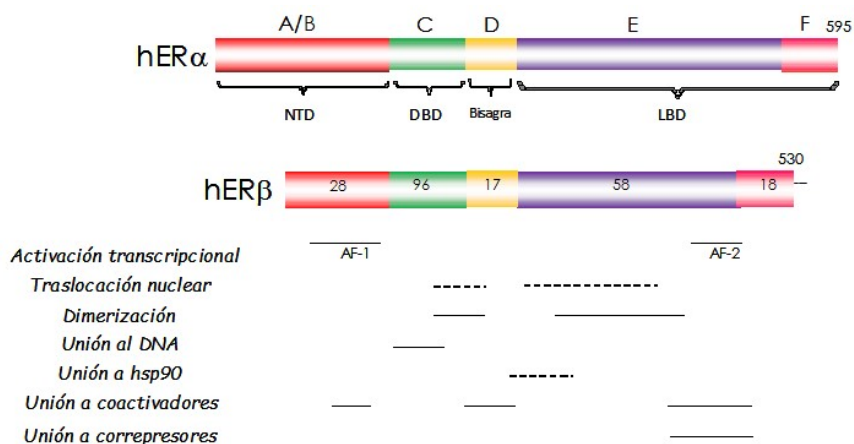


Fig. 1. Esquema de los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$  humanos. Los números dentro de cada dominio del ER $\beta$  denotan en porcentaje de homología con el ER $\alpha$ .

Aparte de los estrógenos fisiológicos, existen ligandos farmacológicos y ligandos producidos por algunas plantas que pueden tener efectos positivos o negativos sobre el ER. Los moduladores selectivos del receptor de estrógenos o SERMs pueden tener efectos positivos o negativos sobre la activación transcripcional de manera tejido- o promotor-selectiva, haciéndolos un blanco importante de estudio para tratamiento de cáncer de mama. La unión de los SERMs causa un cambio conformacional en el LBD que inhibe la actividad de AF-2, pero AF-1 puede ser funcional dependiendo del contexto celular y del promotor (Berry M., *et al.*, 1990). Así, observamos que el SERM, tamoxifén, actúa como antiestrógeno en tejido mamario, pero puede activar la transcripción mediada por ER $\alpha$  en hueso y endometrio. Los cambios conformacionales del LBD causados por la interacción con diversos ligandos determinan si la configuración es apta para la unión de coactivadores o correpresores.

### **Mecanismos de acción de ER $\alpha$**

Los mecanismos moleculares de la señalización mediada por el receptor de estrógenos se han dividido en 4 mecanismos diferentes (Hall *et al.*, 2001):

- Mecanismo clásico de activación ligando-dependiente: La unión de ligando activa al ER induciendo interacción con el DNA y activación transcripcional de genes blanco.
- Activación independiente de ligando: Varias cinasas de las redes de señalización de factores de crecimiento logran activar al ER y sus proteínas correguladoras en ausencia de ligando.
- Activación independiente de unión de ER a su elemento de respuesta: El ER unido a su ligando puede activar promotores mediante su unión a otros factores de transcripción, como AP-1, utilizando los sitios de unión a DNA de estos.
- Señalización no-genómica (ER de membrana): Activación de otras cascadas de transducción de señales por medio del receptor nuclear anclado a la membrana o del receptor transmembranal, GPR30, que actúa de manera independiente de los ER nucleares.

El mecanismo clásico de acción ligando-dependiente ha sido el más estudiado (Fig. 2). El receptor de estrógenos, en ausencia de ligando, se encuentra mayoritariamente en el núcleo, en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico como Hsp90 y Hsp70. Cuando se une a un estrógeno, el ER se activa, disociándose de las proteínas de choque térmico, y sufre varios cambios conformacionales para lograr la unión con sus elementos de respuesta sobre el DNA en las regiones regulatorias de genes blanco. Los receptores unidos al DNA reclutan a los factores basales de transcripción y la RNA polimerasa II por medio de su interacción directa o por medio de proteínas intermediarias (Edwards., 1999; Klinge., 2000; McKenna *et al.*, 2002; Rosenfeld y Glass., 2001). Los complejos ER-coactivador regulan el acceso a la cromatina y estabilizan el complejo de preiniciación transcripcional. La transcripción de muchos genes se incrementa en presencia de estradiol, sin embargo la transcripción de otros es inhibida (Frasor *et al.*, 2003). En su mayoría, los genes regulados positivamente están involucrados en proliferación y progresión del ciclo celular, mientras que aquellos que son regulados negativamente tienen que ver con apoptosis y regulación antiproliferativa. Aunque se conoce menos sobre el ER $\beta$ , tiene algunas funciones diferentes de las de ER $\alpha$  y podría tener efectos opuestos sobre la proliferación tumoral (Couse JF *et al.*, 2000; Gustafsson JA y Warner M. 2000). En ambos casos, la regulación transcripcional, promotor- y célula-específica, mediada por ER esta modulada por el reclutamiento de correguladores: coactivadores y correpresores.

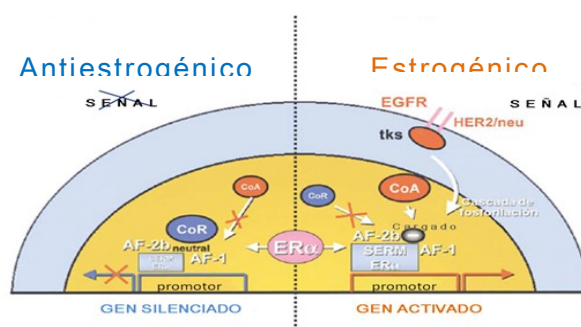


Fig. 2 Activación clásica de ER $\alpha$  (Noriega R., y Langley., 2008).

## **Tipos de receptores de estrógeno**

La acción de los estrógenos sobre la célula en su mayoría está mediada por dos subtipos de receptores de estrógenos intracelulares (ER) ER $\alpha$  y ER $\beta$ . En los seres humanos, existen tres isoformas identificadas de ER $\alpha$  (ER $\alpha$  1-3) y seis isoformas de ER $\beta$  (ER $\beta$  1-6). Se han identificado algunos efectos vasculares relacionados con estrógenos mediados por ER $\alpha$  2 y efectos extranucleares mediados por ER $\alpha$  3. Adicionalmente, se han identificado en líneas celulares de cáncer (Kampa *et al.*, 2013). En cambio, las variantes ER $\beta$  son expresados diferencialmente en varios tejidos y pueden modular la señalización de ER $\alpha$  (Ogawa *et al.*, 1998.; Matthews y Gustafsson, 2003; Ramsey *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2006). Por ejemplo, la isoforma ER $\beta$ 2 puede inhibir la transcripción dependiente de ER $\alpha$  cuando ambos receptores se expresan en la misma célula (Matthews y Gustafsson, 2003). Más allá de la información acerca de las funciones de la isoforma ER $\beta$ 2, poco se sabe de las otras isoformas de ER $\beta$ .

La acción principal de los estrógenos, directa o indirectamente, está relacionada con la regulación de la expresión génica de cientos de genes en cada tipo de célula blanco. Los estrógenos muestran efectos diferenciales en diferentes tejidos. En el útero y la glándula mamaria, los estrógenos son mitógenos fuertes, induciendo la proliferación celular en la pubertad así como durante la etapa fértil (Sismondi *et al.*, 2007).

En el hueso, los estrógenos muestran un efecto trófico, ya que favorecen la proliferación de los osteoblastos más que de osteoclastos, de modo que su acción beneficia la masa del hueso y la fuerza. En el sistema cardiovascular, los estrógenos proporcionan protección contra enfermedades cardiovasculares. En el cerebro, los receptores de estrógenos actúan tanto en el desarrollo, determinando la formación de un número de núcleos dimorfos, así como en el adulto, favoreciendo la supervivencia neuronal y estabilizando la capacidad cognoscitiva (Sismondi *et al.*, 2007).



Los dos tipos de receptores son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo el tipo de tejido, ER $\alpha$  es expresado predominantemente en tejidos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, mientras que ER $\beta$  es expresado en otros tejidos tales como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Nilsson *et al.*, 2001; Anderson., 2002; Palmieri *et al.*, 2002; Krege *et al.*, 1998; Couse *et al.*, 1999 y, Couse y Korach, 1999).

### **ER interacciona con elementos de respuesta a estrógenos (ERE)**

La mínima secuencia consenso ERE, es una repetición palindrómica invertida (IR): 5'-GGTCAnnnTGACC-3', donde n es cualquier nucleótido (Klein-Hitpass *et al.*, 1988a), y se diferencia en sólo 2 bp del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Klock *et al.*, 1987). La secuencia palindrómica de los ERE tiene un tamaño aproximado de 17pb y las secuencias flanqueantes son importantes para determinar la afinidad con la cual ER se une a estas (Klinge *et al.*, 1992; Klinge y Bambara, 1992; Klengen *et al.*, 1996; Anolik *et al.*, 1996 y Driscoll *et al.*, 1998). La mayoría de los genes que responden a estrógenos presentan secuencias imperfectas no-palindrómicas (Anolik *et al.*, 1995 y Driscoll *et al.*, 1998). Se han localizado EREs funcionales en promotores de genes como vitellogenina A1 (Walker *et al.*, 1984) y B1 (Wahli *et al.*, 1989) de *Xenopus*, otro ejemplo es el gen apo-VLDLII de pollo, o en humano genes que codifican para PS2 (Jeltsch *et al.*, 1987), oxytocina (Richard y Zingg., 1990), c-fos (Weisz y Rosales., 1990), c-myc (Weisz y Bresciani., 1988), TGF- $\alpha$  (El-Ashry *et al.*, 1996), lactoferrina (Teng *et al.*, 1992), prolactina (Berwaer *et al.*, 1994), PR (Kraus *et al.*, 1994), catepsina D (Augereau *et al.*, 1994), y complemento 3 (Norris *et al.*, 1996). ER se une a otros factores de transcripción, mejorando así la expresión génica sin unión directa al DNA. Se ha observado mecanismos por los cuales hay interacción de ER $\alpha$  y Sp1 (Krishnan *et al.*, 1994) y ER $\alpha$  y ER $\beta$  con AP-1 (Webb *et al.*, 1995 y Paech *et al.*, 1997).

## **Regulación de la transcripción génica por el receptor de estrógenos**

La iniciación de la transcripción es un acontecimiento complejo que se lleva a cabo gracias a la interacción cooperativa de múltiples factores sobre el promotor blanco. Cuando ER se une a un ERE, actúa recíprocamente con factores de transcripción de la maquinaria basal de la transcripción y con otras proteínas llamadas corre reguladores, incluyendo coactivadores, que pueden estabilizar la unión de factores de transcripción basal y promover la iniciación de la transcripción. Una vez que el complejo de iniciación está completo, la RNA polimerasa II es reclutada y la transcripción comienza (Klinge., 2000).

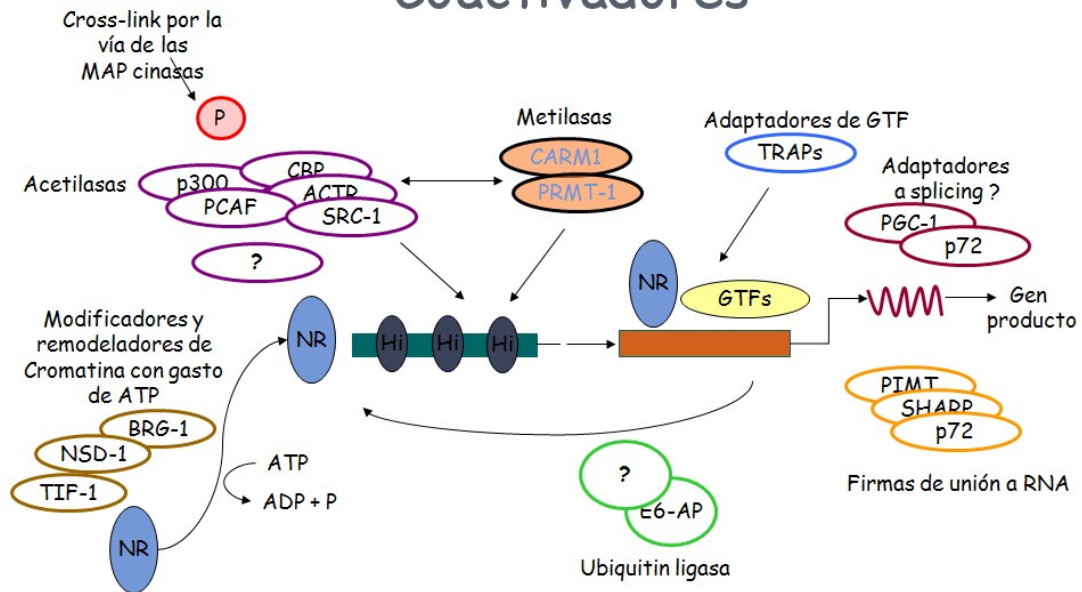
### **Correguladores**

Los corre reguladores son proteínas que interactúan con factores de transcripción y modulan su actividad positiva o negativamente, y que desde un punto de vista funcional se clasifican en dos tipos: coactivadores o corre presores.

**Coactivadores:** Son proteínas que modulan positivamente la actividad transcripcional de factores de transcripción como los NR. Los coactivadores existen en complejos multiprotéicos que se adhieren a factores de transcripción sobre el promotor, modifican cromatina y facilitan el reclutamiento de la maquinaria general de transcripción para permitir una expresión eficiente de genes blanco (McKenna NJ y O'Malley BW 2000). Gran parte de la información obtenida sobre los coactivadores del ER proviene de estudios sobre la región de activación AF-2 en el LBD. La interacción con un ligando agonista causa un cambio conformacional en el LBD que forma un surco hidrofóbico donde interactúan coactivadores que contienen un motivo de interacción  $\alpha$ -helical LxxLL (leu-x-x-leu-leu) ó caja NR (Heery DM., *et al.*, 1997). Adicionalmente, existe otro grupo de coactivadores reclutados por el dominio AF-1, de manera independiente de cajas NR (McKenna NJ y O'Malley BW 2000). Estos factores actúan de manera secuencial y/o combinatoria utilizando diferentes mecanismos para reorganizar la cromatina, reclutar y modificar a los factores basales de la transcripción, estabilizar

la maquinaria basal de transcripción, activar a la RNAPolIII y regular el recambio de proteínas sobre el promotor (Metivier R., *et al.*, 2003).

## Mecanismos de Acción de Coactivadores

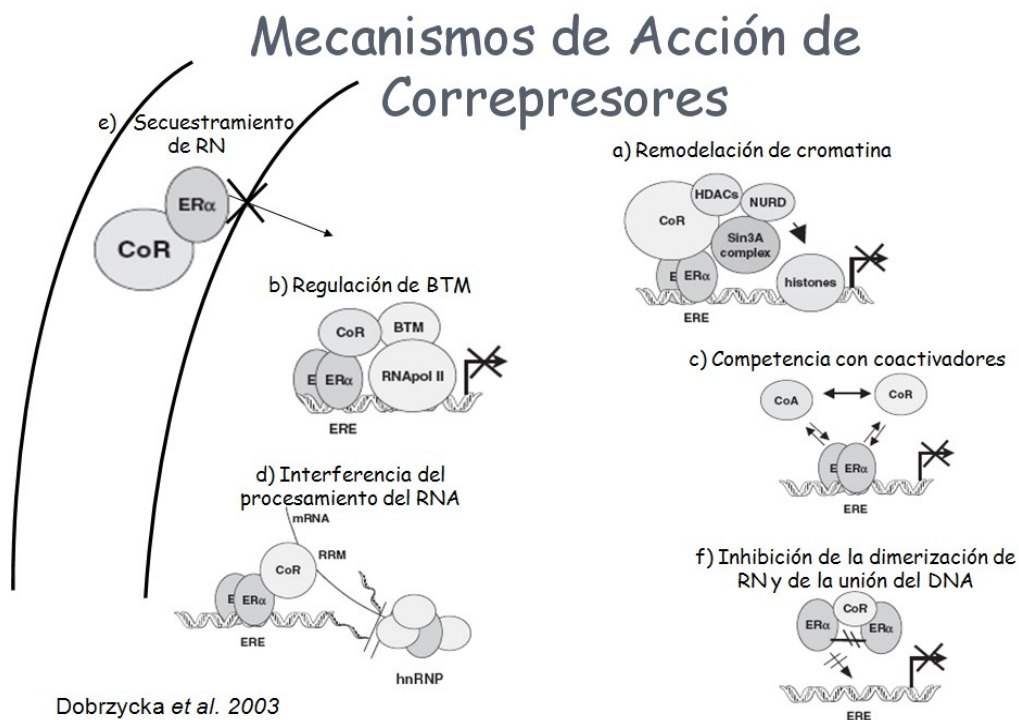


McKenna y O'Malley. 2002

Fig. 3 Mecanismos de acción de coactivadores de NR (modificado de McKenna y O'Malley 2002).

**Correpresores:** Los correpresores tienen un papel importante en la regulación negativa de la expresión de genes regulados por NR. Los correpresores, como los coactivadores, funcionan como parte de complejos multiproteicos. Estas proteínas se asocian con desacetilasas de histonas (HDAC) y las reclutan al promotor incrementando la unión del DNA al nucleosoma para inhibir la unión de factores de transcripción y así inhibir la expresión génica. Inicialmente, se encontró que se unen a NR sobre el promotor blanco en ausencia de ligando (en caso de NRs no esteroideos) o en presencia de ligandos antagonistas o SERMs (Schulman IG., *et al.*, 1996). En el caso de ER, tanto la unión de tamoxifén como la de raloxifén han mostrado reclutar correpresores en ciertas líneas celulares, induciendo la

represión de transcripción (Shang Y., *et al.*, 2000; Shi Y., *et al.* 2001; Smith CL y O'Malley BW., 2004). Adicionalmente, la inhibición selectiva de los correpresores, NcoR o SMRT, promueve la actividad agonista de tamoxifén y otros SERMs (Jepsen K., *et al.*, 2000). Sin embargo, cada vez se encuentran más proteínas correpresoras que interactúan con los receptores en presencia de ligandos agonistas, encontrándose en complejos independientes o junto con coactivadores (Fernandes I., *et al.*, 2003; Rajendran RR., *et al.*, 2003). Aparte de los correpresores que reclutan HDACs, existen proteínas que han demostrado inhibir la activación transcripcional mediante otros mecanismos entre los que se encuentra la remodelación de la cromatina, la inhibición de la unión a DNA o de la translocación nuclear de los receptores, bloqueo de la interacción entre receptores y sus coactivadores, desestabilización de la maquinaria basal de transcripción y regulación del recambio de proteínas sobre el promotor (Jepsen K., *et al.*, 2000).



Fig

4 Mecanismos de acción de correpresores de NR (modificado de Dobrzycka *et al.*, 2003)

El modelo común para explicar la regulación célula específica de la expresión de genes blanco que responden a estrógenos, sugiere la expresión diferencial entre los niveles de coactivadores y correpresores. Diferentes concentraciones de ER $\alpha$ , ER $\beta$ , y del ligando específico, regulan la transcripción del gen blanco en respuesta a estrógenos. Por análisis Northern blot se confirmó la idea de que en diferentes tejidos de rata (Misiti *et al.*, 1998) y líneas celulares (Folkers *et al.*, 1998), existe diferencia de expresión del mRNA de los coactivadores SRC-1, RIP-140, p300, y CBP, así como de los correpresores SMRT, y NCOR (McKenna *et al.*, 1999).

Adicionalmente, existen algunas proteínas con función dual que son capaces de activar o reprimir la transcripción dependiendo del receptor, del contexto celular o del promotor (Fritah A., *et al.*, 2010; Leong GM., *et al.*, 2004). Al existir en el mismo complejo, los coactivadores y correpresores aseguran la regulación apropiada de los mecanismos de transcripción dirigidos por los SHRs (Li X., *et al.*, 2002) donde existe un ensamblaje cíclico y ordenado de complejos formados por diferentes actores que promueven el inicio de la transcripción y regulan la finalización de este mismo proceso (Metivier R., *et al.*, 2003). Adicionalmente, estos mecanismos son regulados por redes de señalización río arriba (O'Malley BW y Kumar R, 2009; Han SJ., *et al.*, 2009). La concentración y actividad de los correguladores es modulada mediante modificaciones postraduccionales (fosforilación, metilación, ubiquitinación, etc.) causadas por la acción de varias vías de transducción de señales, incluyendo algunas reguladas por estrógenos (Smith CL., 1998; Zheng FF, *et al.*, 2005; Wu RC, *et al.*, 2005). Las variaciones en el reclutamiento ligando-específico de coactivadores y/o la disociación de correpresores proveen flexibilidad en la señalización de promotores regulados y probablemente regulan la especificidad de los promotores activados de manera tejido-específica (Katzenellenbogen BS y Katzenellenbogen JA, 2000). Es decir, que la activación selectiva de subgrupos de promotores para un factor transcripcional sugiere que el corregulador juega un papel crucial en "seleccionar" el subgrupo de genes que se activa en un programa biológico. Todavía faltan

datos para determinar si todos los corre reguladores poseen algún grado de selectividad por el promotor y como se lleva a cabo esta selección. Sin embargo, este fenómeno parece ser muy importante para explicar cómo algunos coactivadores solo activan un conjunto específico de genes regulados por estrógenos (Spiegelman BM y Heinrich R, 2004; Jeong KW *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2010).

Se puede pensar que cualquier desregulación de los complejos SHR/corre regulador puede causar cambios en la expresión de genes blanco causando alteraciones en la homeostasis de la célula, y redundando en fenotipos patológicos (Han SJ., *et al.*, 2009; Xu J., *et al.*, 2009). Alteraciones en la actividad o concentración de corre reguladores han sido implicadas tanto en síndromes de insensibilidad hormonal, como en el desarrollo de cáncer hormono-regulado y su progresión a cáncer insensible a terapia endocrina (O'Malley B.W., *et al.*, 2008; Xu J., *et al.*, 2009; Han SJ., *et al.*, 2009; Walsh CA *et al.*, 2012).

Uno de los problemas más importantes para el tratamiento de cáncer de mama es que, aun cuando el tratamiento con tamoxifén y otros SERMs o inhibidores de aromatasas resulta en una respuesta clínica favorable y regresión tumoral de cáncer ER positivo, después de tratamiento prolongado hasta 1/3 de las mujeres tratadas tendrán enfermedad recurrente (resistencia endocrina) dentro de los siguientes 15 años (Howell A., 2008). Existen varios mecanismos posibles para la evolución de resistencia endocrina. El ER o alguna proteína que interactúa con él, puede estar desregulado e inclinar el balance hacia la activación de ER, aún en ausencia de estrógenos o en presencia de SERMs o antagonistas puros. Se ha determinado que cambios en la proporción de coactivadores y corre presores en células de cáncer de mama están implicados en la respuesta diferencial de los ERs a un ligando agonista o antagonista y que el incremento en las concentraciones de algunos coactivadores y/o la reducción de algunos corre presores son de mal pronóstico, tanto para la terapia endocrina, como para la sobrevivencia del paciente (Shang Y., *et al.*, 2000; O'Malley B.W. y Kumar R. 2009;

Lahusen T., *et al.*, 2009). En los últimos años, las evidencias que el ER y sus correguladores están implicados en el desarrollo de cáncer de mama y otras patologías hormono-reguladas, ha provocado un gran interés de comprender la biología celular de los mecanismos regulados por los SHRs y ha resultado en nuevas propuestas para terapias basadas en la modulación de esta regulación. (O'Malley BW *et al.*, 2008; Xu J *et al.*, 2009; Han SJ *et al.*, 2009).

## **ANTECEDENTES**

En tanto se incrementa nuestro conocimiento de las funciones de los correguladores, hemos logrado dilucidar cómo estas proteínas regulan la función del ER en presencia de ligandos agonistas, antagonistas o aún en ausencia de ligando. Datos cristalográficos han demostrado que existen diferentes configuraciones del LBD de ER $\alpha$  dependiendo del ligando (Bourget W., *et al.*, 2000; Lonard DM y Smith CL. 2002) lo cual conlleva a un modelo en el cual las diferentes configuraciones de AF-2, dependiendo del ligando, así como la presencia de modificaciones covalentes (fosforilación, acetilación, etc.) efectuadas por moléculas de señalización, pueden generar diversidad en la habilidad que tiene el receptor para reclutar coactivadores de manera promotor- y célula-específica. Las configuraciones distintas del LBD de ER pueden llevar a la formación de complejos coactivadores puros, complejos mixtos de coactivadores/correpresores ó complejos correpresores. Varios estudios sugieren que perturbar la expresión de coactivadores o correpresores dentro de la célula, ya sea a nivel de su expresión o por modificaciones post-traduccionales, puede regular la respuesta a ligandos mixtos de manera promotor específica. Así, se ha visto que la sobre-expresión del coactivador SRC1 incrementa la actividad de ER $\alpha$  estimulado por tamoxifén en tejidos donde el tamoxifén exhibe actividad agonista (Smith CL y O'Malley BW 2004; Walsh CA *et al.*, 2012). Sin embargo, la capacidad de SRC1 para modular la actividad de ER $\alpha$ -tamoxifén en estas células implica que existen interacciones ER $\alpha$ -SRC1 productivas en presencia de tamoxifén. En este caso, SRC-1 ya no es capaz de interactuar con la región AF-2 de ER $\alpha$  y requiere de un AF-1 intacto para interactuar mediante la región N-terminal del ER $\alpha$ . Adicionalmente, estudios similares con varios SHRs muestran que la sobre-expresión de los correpresores NCoR y SMRT reduce la actividad agonista de ligandos moduladores (Jepsen K., *et al.*, 2000; Szapary D., *et al.*, 1999) mientras que el incrementar las proteínas coactivadoras puede elevar la actividad agonista de estos ligandos (He Y., *et al.*, 2002, Liu Z., *et al.*, 2002). Esto sugiere que una variación en la expresión de correguladores puede regular la sensibilidad de las



células blanco a hormonas esteroides y puede influenciar la habilidad de diferentes ligandos para regular la expresión génica en diferentes tipos de células (Smith CL y O'Malley BW 2004; O'Malley B.W. y Kumar R. 2009).

Basados en los estudios cristalográficos que demuestran cómo la configuración diferente del LBD en presencia de SERMs puede bloquear la interacción de correguladores con AF-2, y el hecho de que la actividad agonista del tamoxifén requiere que el ER mantenga su región AF-1 intacta, nos dimos a la tarea de buscar correguladores novedosos que interactuaran con la región N-terminal de ER $\alpha$ , donde se encuentra el dominio de transactivación AF-1. Para ello utilizamos el sistema de doble híbrido en levaduras, donde utilizamos los aminoácidos (aa) 1-180 de ER $\alpha$  como carnada, para tamizar una genoteca de la línea celular CWR22 de cáncer de próstata recurrente. Este estudio arrojó una gran variedad de proteínas que podrían interactuar con esta región del ER $\alpha$ , entre las cuales detectamos a BCAS2 y PINX1.

*BCAS2* (secuencia amplificada de cáncer de mama 2) o también conocido como *DAM1*, del cual se conocía previamente que es un coactivador de ER $\alpha$  en líneas celulares de cáncer de mama (Qi C., *et al.*, 2005 y Nagasaki *et al.*, 1999). Sin embargo, estos estudios sugerían que su interacción era con AF-2 y no AF-1. Al hacer una cartografía de alta resolución en una serie de líneas celulares MCF10, con el fin de estudiar la progresión de la malignidad de estas células, se observó que la progresión de la malignidad estuvo marcada por la ganancia de *BCAS2*, junto con otras proteínas (Worsham MJ *et al.*, 2006). *BCAS2* también se ha asociado también con la proteína supresora de tumores p53; actuando como un regulador negativo de p53, disminuyendo la transcripción de este supresor de tumores (Kuo P, *et al.*, 2009). Muy recientemente, se publicó que *BCAS2*, interactúa con AR (Receptor de Andrógenos), en una línea celular de cáncer de próstata, Kuo P. *et al.*, 2015, demostraron que *BCAS2* se expresa significativamente en CaP, y que aumenta la proliferación de este a través de la

interacción que tiene con AR, ya que BCAS2 estabiliza a este receptor tanto de manera hormono-dependiente como independiente. Existen al menos dos mecanismos para la regulación positiva de AR mediada por BCAS2; uno es dependiente de p53, ya que BCAS2 regula negativamente a este supresor de tumores, dando como resultado un aumento en la expresión del RNAm y proteína de AR; el otro es independiente de p53 a través de la inhibición de la degradación del AR por el proteasoma. BCAS2 puede formar un complejo con AR y HSP90, lo cual conlleva una estabilización del receptor y por lo tanto una inhibición por la degradación de éste por el proteasoma. A pesar de las propiedades oncogénicas de BCAS2, se ha observado en un trabajo reciente que una sobre-regulación de esta por medio de  $ERR\beta$ , esta correlacionada con la inhibición de la proliferación celular en cáncer de mama (Sengupta D., *et al.*, 2014). Por lo que no dudamos que BCAS2, pueda actuar de manera positiva o negativamente en la progresión del cáncer de mama, dependiendo de la vía en que se ve involucrada. Por todo lo anterior decidimos que a pesar que BCAS2, había sido previamente caracterizada como un coactivador de  $ER\alpha$ , es importante seguir caracterizando y vislumbrando la forma en cómo actúa en diferentes cánceres hormono-regulados.

PinX1 (de Pin2 interacting protein X1) es una proteína de 174 aa (19.1 kD) identificada inicialmente por encontrarse en el cromosoma 8p23 que frecuentemente muestra pérdida de heterocigocidad en diversos tipos de neoplasias malignas, presentándose en más del 70% de los carcinomas hepatocelulares, 60% en cáncer gástrico, 50% en cáncer de mama (Liao C., *et al.*, 2000; Kondo T., *et al.*, 2005; Buchholz TA, *et al.*, 1999), y la baja expresión de PINX1 en cánceres como glioma (Bai J., *et al.*, 2015) y carcinoma de células renales (Li H., *et al.*, 2015), resulta de mal pronóstico, como se pudo observar en el trabajo de Deng W. *et al.*, 2015, donde encontraron una correlación entre la pérdida de la expresión de esta proteína, que se presenta en un 43.4% en tejido normal colorrectal, a comparación con cáncer colorrectal en el que disminuye a un 9.6%. Adicionalmente, Se encuentra expresada en casi todos los tejidos normales estudiados; sin embargo, su expresión se encuentra muy reducida o ausente en líneas celulares. La sobre-expresión de PinX1 en líneas celulares de cáncer

hepatocelular, inhibe la proliferación, por lo cual se le sugirió un papel como posible supresor de tumor (Liao C., et al., 2003). En un modelo *in vivo* (ratón), se ha observado que PINX1, es capaz de suprimir la metástasis en cáncer de mama, a través de la inhibición de la expresión de MMP-9 y la actividad de transcripción de NF-κB (Shi M., et al., 2015).

Por otra parte, PinX1 tiene una fuerte actividad como inhibidor de la telomerasa, tanto *in vivo* como *in vitro* (Banik SS. y Counter CM., 2004; Kondo T., et al., 2005). Estudios más recientes demuestran que PINX1 se localiza en la periferia de los cromosomas y la placa exterior de los cinetocoros durante la mitosis (Li N., et al., 2009; Yuan et al., 2009). La inhibición de la expresión de PINX1 resulta en cromosomas rezagados durante la mitosis y la formación de micronúcleos durante la interfase (Yuan K., et al., 2009). De manera interesante, Cai et al. (2010) reportan que la pérdida de la expresión de PINX1 es un marcador molecular de pronóstico adverso en carcinoma epitelial de ovario y Zhou XZ et al., (2011) observan que su pérdida causa inestabilidad cromosómica. Sin embargo, los mecanismos regulatorios de PINX1 no se han elucidado completamente, y no se le ha relacionado con ninguna función en relación a la regulación transcripcional de receptores esteroides, tales como el ER, AR y PR, por lo que nos hemos enfocado al estudio de estos acontecimientos.

## **HIPÓTESIS**

BCAS2 y PINX1 interactúan con la región de transactivación AF-1 del Receptor de Estrógenos  $\alpha$ , y modulan su actividad transcripcional.

A continuación, se postulan las hipótesis para cada una de las proteínas en estudio:

- a) La proteína BCAS2 interactúa con la región AF-1 de ER $\alpha$  y modula su actividad positivamente. Se sabe que esta proteína es un coactivador de ER $\alpha$  a través de su dominio de unión a ligando (AF-2), por lo que puede tener una actividad dual sobre ER $\alpha$ , dependiendo del contexto celular, y sobre otro tipo de receptores hormonales.
- b) La proteína PINX1 interactúa directamente con la región N-terminal del ER $\alpha$  y modula negativamente su actividad transcripcional, actuando como un correpresor de la misma, determinando su efecto sobre procesos relacionados con el desarrollo de cáncer hormono-regulado.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Caracterización de los genes *BCAS2* y *PINX1*, como correguladores del receptor nuclear ER $\alpha$  y de otros receptores de hormonas esteroides de humano.

### **Objetivos particulares**

- ✓ Verificar la interacción de *BCAS2* y *PINX1* con diferentes dominios del ER $\alpha$  y ER $\beta$  *in vitro* e *in vivo*, estableciendo cuáles de estos dominios son indispensables para que se lleve a cabo dicha interacción.
- ✓ Determinar si *BCAS2* y *PINX1* pueden afectar los niveles de transcripción mediados por ER $\alpha$  en presencia y ausencia de ligandos agonistas y antagonistas, y compararlos con la actividad de SRC-1.
- ✓ Ver el efecto de las proteínas en estudio con otros receptores de hormonas esteroides, como los receptores de andrógenos y progesterona, en presencia y ausencia de sus ligandos fisiológicos y antagonistas.
- ✓ Determinar la expresión endógena de estos genes en líneas celulares de cáncer de mama en presencia o ausencia de estrógenos y determinar el efecto de la sobreexpresión e inhibición de estos genes sobre la proliferación celular en presencia y ausencia de estrógenos.
- ✓ Comprobar si las proteínas codificadas por los dos genes, interaccionan con los receptores nucleares sobre promotores blanco en el DNA.
- ✓ Ver el grado de clonogenicidad, tanto en presencia como en ausencia de las proteínas en líneas de cáncer de mama.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **Cultivo celular:**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: células derivadas de riñón de mono verde, CV-1 y COS7 que no expresan receptores a hormonas esteroides. Líneas de carcinoma de glándula mamaria humano, MCF7 (expresa el ER $\alpha$ ), MDA-MB-231 (no expresa el ER $\alpha$ ), MDA-MB-453 (no expresa el ER $\alpha$ ), T47D (expresa el ER $\alpha$  y el PR), T47D-MTLV (T47D con transfección estable de MMTV-LUC). Líneas de cáncer de próstata: LNCaP (expresa AR y ER), 22rv1 (expresa el AR) y DU145 (no expresa el AR). HepG2 de hepatocarcinoma humano y HEK293T de riñón humano. Las diferentes líneas celulares se cultivaron en Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), DMEM/F12 o RPMI 1640, según las especificaciones del ATCC, y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% para su mantenimiento. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen) al 5% y penicilina/estreptomicina. Para los ensayos realizados con tratamientos hormonales se utilizaron los mismos medios, pero sin rojo fenol, y se complementaron con FBS tratado con carbón-dextran (sFBS) para eliminar la presencia de hormonas.

### **Construcción de plásmidos.**

A partir del plásmido pACTII-BCAS2 y pACTII-PINX1, purificados de los ensayos realizados de doble-híbrido en levaduras, se construyeron los vectores de expresión en mamíferos pcDNA-BCAS2 y pcDNA-PINX1 mediante la inserción de la región codificante completa de BCAS2 y PINX1, respectivamente, digerida con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (Invitrogen). Previamente se verificó que no tuvieran estos sitios en la región codificante. En ambos casos, se insertaron los genes en los mismos sitios de restricción del vector pcDNA3.1 "A" (Clontech). Por otra parte, los vectores de expresión en bacterias pDEST17-BCAS2 y pDEST17-PINX1 (con bandera de 6x-histidinas), se generaron utilizando el sistema de

clonación de “Gateway” (Invitrogen) donde se realiza un PCR de la región codificante de BCAS2 y PINX1, respectivamente, insertando una secuencia CACC en el oligo antes del ATG de inicio. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: BCAS2; 5'-**CACC**ATGGCGGGCACAGGTTTG-3' y 5'-TGTCTAGATCAGAAGTCTTGCCGGATGTTTTTC-3' y PINX1; 5'-**CACC**ATGTCTATGCTGGCTGAACG-3' y 5'-CATCTAGATCAGACCCTGGAAGTGGAAAC-3'. En los oligos 3' se incluyeron los sitios para XbaI (3') para poder realizar digestiones posteriores. El fragmento de PCR purificado, se inserta en un vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Posteriormente, el plásmido pENTR-BCAS2 y pENTR-PINX1 se sub-clonó cada uno por recombinación homóloga al vector destino (pDEST17) de expresión en bacterias (Invitrogen).

### **Ensayos de interacción proteína-proteína (pull-down).**

Se utilizaron proteínas de fusión de los ER completos y sus regiones amino y carboxilo unidas a GST, para determinar su interacción *in vitro* con BCAS2 y PINX1. Los vectores pGEX-JDK (expresa GST), pGST-ER $\alpha$  (completo, aa 1-595), pGST-ER $\alpha$ NT (aa 1-180), pGST-ER $\alpha$ CT (aa 264-595) y sus equivalentes para ER $\beta$  pGST-ER $\beta$  (aa 1-530, completo), pGST-ER $\beta$  NT (aa 1-148), pGST-ER $\beta$  CT (aa 214-530) se expresaron en la cepa BL21 de *Escherichia coli* y se purificaron por afinidad a perlas de glutatión-sefarosa de acuerdo a las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). La traducción *in vitro* de BCAS2 y PINX1 biotinilados, se realizaron a partir de pDEST17-BCAS2 y pDEST17-PINX1 utilizando lisado de reticulocitos de conejo del kit de TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, marcando a la proteínas (BCAS2 y PINX1) con un lisil-tRNA-[biotina]. Posteriormente, se agregaron 10  $\mu$ l de las proteínas marcadas a las perlas de sefarosa unidas a cada proteína de fusión con GST y se incubaron con agitación suave a temperatura ambiente por 2 h en 500  $\mu$ l de buffer de sonicación (20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0.7 mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40, adicionado con inhibidores de

proteasas) en presencia o ausencia del ligando de ER $\alpha$ , 17 $\beta$ -Estradiol (E $_2$ ) (1x10 $^{-7}$  M). Las perlas se lavaron cinco veces con buffer de sonicación y posteriormente se eluyeron las proteínas, hirviendo durante 5 min. en 50  $\mu$ l de buffer de carga Laemmli. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE, seguido de la detección por western blot utilizando anticuerpos contra GST (GST-HRP (Invitrogen) y, para BCAS2 y PINX1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Las bandas se detectaron utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences).

### **Co-inmunoprecipitación.**

Se sembraron 1.5 x 10 $^6$  células COS7 en placas de 10 cm. 24 h después, las células se transfectaron con 3  $\mu$ g de pSG-ER $\alpha$  y 3  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA-BCAS2 y pcDNA-PINX1 con el reactivo de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 6 h. Después de la transfección, las células se trataron durante 48 h en presencia o ausencia de E $_2$  (10 nM) o TAM (100 nM). Posteriormente, las células fueron cosechadas y lisadas con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA y 1 mM DTT). Los restos celulares se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm durante 30 min. a 4 °C. El sobrenadante se pre-clarificó con proteína A/G-sefarosa (Sigma) a 4 °C durante 30 min. para eliminar interacciones inespecíficas. El lisado celular pre-clarificado se precipitó con 1  $\mu$ g de los anticuerpos monoclonales anti-ER $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology), BCAS2 o PINX1 (ABcam), según el caso, durante 3 h a 4 °C en agitación suave. Posteriormente se agregaron 60  $\mu$ L de proteína A/G-sefarosa y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por 3 min. a 4 °C y se realizaron 4 lavados con buffer de lisis en presencia o ausencia de ligando. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ L de buffer de carga para proteínas y se calentaron a 94 °C durante 5 min. para posteriormente correr las proteínas en geles de SDS-PAGE y realizar el western blot utilizando anticuerpos contra ER $\alpha$  y BCAS2 o PINX1.



## **Western Blot.**

Los extractos proteicos se calentaron a 94 °C por 5 min. y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore Co, Billerica, Massachusetts) a 20 volts toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se bloquearon por 2 h a 4 °C con una solución de leche descremada en polvo al 5 % en TBS-Tween 20. Las membranas se incubaron durante 2 h a 4 °C con los anticuerpos contra ER $\alpha$ , BCAS2 o PINX1, según el caso, en TBS-Tween (1:5,000). Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween, 3 veces por 10 min. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón (IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) en una dilución 1:10,000 por 1 h a 4 °C. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia (Amersham Biosciences, Fairfield CT).

## **Ensayos de actividad transcripcional.**

Se cultivaron  $3 \times 10^4$  células de CV-1 ó  $7 \times 10^4$  células de cáncer de mama (MCF-7, T47D-MTVL, MDA-MB 231, MDA-MB 453), HepG2, o cáncer de próstata (22Rv1 o DU145) en placas de 24 pozos por 24 h en medio sin rojo fenol con suero sFBS al 3%. Las células fueron co-transfectadas con 200 ng de plásmido reportero de luciferasa, 3xERE-Luc para receptores de estrógenos. En caso de PR, , no fue necesario transfectar el reportero, ya que se utilizaron la células T47D-MTVL estables (Truss et al., 1995), para AR se transfectó el reportero MMTV-Luc en las células de cáncer de próstata o CV-1. En los casos donde no hay expresión endógena del receptor nuclear en las células, se transfectaron 50 ng de plásmido que expresa el receptor hormonal (pSG-ER $\alpha$ , pSG-PR o pCMV-AR), de 50 a 300 ng del plásmido de expresión del corregulador (ya sea pcDNA-BCAS2, pcDNA-PINX1, pcDNA sin inserto como control negativo o con pSG-SRC-1 como control positivo de un coactivador conocido) y 10 ng del vector de expresión pCMV- $\beta$ -galactosidasa (Promega) como control de transfección. Todas las transfecciones

se realizaron con Lipofectamina 2000 durante 6 h, siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). De manera adicional, se realizaron co-transfecciones utilizando construcciones que expresen únicamente el TAF-1 (ER $\alpha$  aa 1-282) o el TAF-2 (ER $\alpha$  aa 144-595) (donados por el Dr. Donald McDonnell, Duke University, NC) (Tzukerman et al., 1994), en células HepG2 para determinar si la actividad de BCAS2 o PINX1 requiere uno o ambos sitios de activación transcripcional del ER $\alpha$ . Las células se incubaron durante 48 h en presencia o ausencia de E<sub>2</sub> o TAM, en caso de utilizar ER $\alpha$ , y P4 o DHT, si se trata de PR o AR, respectivamente. Las células se lisan con 50  $\mu$ l de buffer de lisis (Fosfato de Potasio 0.1 M, pH 7.8, 0.2 % Triton X-100, 1 mM DTT) y se toman 30  $\mu$ l para cada reacción. Se agregan 100  $\mu$ l de buffer de reacción (Glicil-glicina 25 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0.5 mg/ml), se agregan 30  $\mu$ l de Luciferina 1 mM y se lee en el luminómetro durante 20 seg. Posteriormente, en el mismo tubo se agregan 100  $\mu$ l del buffer de reacción de  $\beta$ -galactosidasa (100 mM buffer fosfatos de sodio, pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Galactón (Tropix, Bedford, MA) y se incuba durante 1 hora en la oscuridad, a temperatura ambiente. Se adicionan 100  $\mu$ l de acelerador (10% (v/v) Acelerador Tropix emerald, (Perkin Elmer), 0.2 N NaOH) y se lee durante 3 seg. en el luminómetro. Los datos se reportan como el cociente de las unidades relativas de luz (URL) de luciferasa entre URL de  $\beta$ -galactosidasa. Se realizaron por lo menos tres transfecciones independientes, por triplicado, para cada ensayo.

### **Expresión de genes endógenos.**

Para el monitoreo de la expresión endógena de los genes que responden a estrógenos, se cultivaron 5 x 10<sup>5</sup> células MCF7 por pozo en cajas de 6 pozos en DMEM/F12 sin rojo fenol suplementado con 3% sSFB durante 24 h. Las células fueron transfectadas con 3  $\mu$ g pcDNA-BCAS2 o pcDNA-PINX1, según el caso, 24 h más tarde se trataron con E<sub>2</sub> 10 nM durante 24 h. El efecto de la sobre-expresión de PINX1 sobre la expresión endógena de genes dependientes de E<sub>2</sub> se evaluó por PCR en tiempo real. El RNA total se extrajo con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la expresión de genes

conocidos blancos de estrógenos como IGFBP2, CASP8, Catepsina D, pS2, CTSD, cMYC y PR. Los cDNA se obtuvieron a partir de 100 ng de RNA total utilizando SuperScript VILO cDNA synthesis (Invitrogen) y se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos. La cuantificación de los productos génicos se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR green (Perkin Elmer) en un termociclador LightCycler 480 Master I (Roche, Indianapolis, IN). Para normalizar estos ensayos se utilizó el mRNA de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación:

| <b>Gen</b> | <b>Oligonucleótidos</b>   | <b>Tamaño del amplificado</b> |
|------------|---|-------------------------------|
| C3         | Fwd ACCAGCAGACCGTAACCATC<br>Rev GCAGCCTTGACTTCCAATTC                                  | 99                            |
| PSA        | Fwd CATCAGGAACAAAAGCGTGA<br>Rev ATATCGTAGAGCGGGTGTGG                                  | 110                           |
| IGFBP2     | Fwd CCTCAAGTCGGGTATGAAGG<br>Rev ACCTGGTCCAGTTCCTGTTG                                  | 396                           |
| CASP8      | Fwd CTTGGCCAATTTGCCTGTAT<br>Rev TCTTTGGCTTCCCTGCTAGA                                  | 183                           |
| KLK4       | Fwd AACAGACCCTTGCTCGCTAA<br>Rev GGTACAGCGGGTCATAGAGC                                  | 234                           |
| pS2        | Fwd CACCATGGAGAACAAGGTGA<br>Rev TGACACCAGGAAAACCAAA                                   | 133                           |
| PGR/ RP    | Fwd GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG<br>Rev CACCATCCCTGCCAATATCTTG                              | 227                           |
| CTSD       | Fwd: CAGAAGCTGGTGGACCAGAAC<br>Rev: TGCGGGTGACATTCAGGTAG                               | 138                           |
| cMYC       | Forward: 5'-AATGAAAAGGCCCAAGGTAGTTATCC-3'<br>Reverse: 5'-GTCGTTTCCGCAACAAGTCCTCTTC-3' | 112                           |
| GAPDH      | Fwd: CCTCAACGACCACTTTGTCA<br>Rev: CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT                                | 164                           |

### **Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (Strutt y Paro, 1999).**

Células MCF-7 se cultivaron en cajas de 10 cm en DMEM/F12 sin rojo fenol con 2% de sSFB durante 2 días previo a tratamiento con el vehículo o E<sub>2</sub> 10 nM, a diferentes tiempos. Al terminar la incubación con ligando, se realizó un entrecruzamiento de la cromatina a proteínas utilizando formaldehído al 1% a 37 °C durante 10 min. y se adicionaron 682 µL de glicina 2 M a temperatura ambiente durante 5 min. Después de lavar las células adheridas 2 veces con PBS frío y coctel de inhibidores de proteasas (Sigma) adicionado con 1 mM de DTT, se colectaron y se centrifugaron. El botón celular se procesó con el Kit Chromatin Immunoprecipitation (Upstate) siguiendo las especificaciones del fabricante. El DNA fue purificado y cuantificado. Se amplificaron 4 promotores que son regulados por estrógenos: pS2 (TFF1), E2F, WISP2 y GREB1 por PCR y PCR en tiempo real usando SYBR Green (Applied Biosystems).

Los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de ChIP son los siguientes:

| <b>Promotor</b>     | <b>Secuencia del Oligo</b>   | <b>Tamaño</b> | <b>Referencias</b>               |
|---------------------|--|---------------|----------------------------------|
| GREB1<br>ERE        | Fwd AGCAGTGAAAAAAGTGTGGCAACTGGG<br>Rev CGACCCACAGAAATGAAAAGGCAGCAAAC | 200           | Merrell KW, <i>et al.</i> , 2011 |
| pS2<br>ERE          | Fwd CCATGTTGGCCAGGCTAGTC-3'<br>Rev ACAACAGTGGCTCACGGGCT-3            | 200           | Merrell KW, <i>et al.</i> , 2011 |
| hWISP-2/CCN5<br>ERE | Fwd 5'-TGTTGTGCCTCCAGCTCCTG-3'<br>Rev 5'-GGTTTCTGGCAGGCAGATT-3       | 200           | Fritah A, <i>et al.</i> , 2006   |
| E2F1<br>ERE         | Fwd 5' - GCAAGTTGAGGATGGAAGAGGTG<br>Rev 5'- TGGGGACACGGGAACATAGG     | 200           | Louie MC <i>et al.</i> , 2010    |

### **Silenciamiento de la expresión de PINX1 o BCAS2 mediante el uso short hairpin RNA (shRNA).**

Poblaciones de Lentivirus (proporcionadas por el Dr. Jordan Vallés) se produjeron en células HEK 293T mediante la transfección con fosfato de calcio de 3 µg de las

construcciones pLKO.1-PINX1 o pLKO.1-BCAS2 o shRNA control (shRNAs; Sigma Aldrich), plásmido de empaquetamiento (pCMV  $\Delta$ R8.91), y plásmido de ensamblaje (pVSVG) (Invitrogen) en cajas de 10 cm. Los virus se cosecharon 48 h después de la transfección, el sobrenadante se filtró a través de un poro de 0.45  $\mu$ m y se mantuvieron a 4 °C. Las partículas virales se concentraron en un gradiente de sacarosa centrifugando a 26,000 rpm a 4 °C durante 1 h 30 min. El pellet con los virus se disolvió en medio y se utilizó para la infección.  $5 \times 10^6$  células MCF7 fueron infectadas con el sistema de inoculación por spin, basado en centrifugar las partículas virales con las células a 1200 rpm durante 2 h a temperatura ambiente (Wiznerowicz and Trono, 2003). Las células infectadas con los vectores pLKO.1 que expresan shRNA fueron seleccionadas con 2 mg/ml puromicina (Sigma-Aldrich) 24 h después de la infección. Se realizó western blot de las células para observar el silenciamiento de PINX1 y posteriormente fueron utilizadas para ensayos de viabilidad celular o clonogénicos.

### **Ensayos de viabilidad celular.**

Las células MCF7 o 22Rv1 se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células, respectivamente, por placa de 6 pozos en medio sin rojo fenol adicionado con 2% de sSFB durante 24 h antes de ser transfectadas con 3  $\mu$ g de pcDNA-BCAS2 o pcDNA-PINX1 (utilizando Lipofectamina 2000). La viabilidad celular se evaluó por el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT). Se realizaron 2 tipos de ensayos: 1) Las células transfectadas, y como control células sin transfectar ( $5 \times 10^3$  células/pozo) fueron sembradas en una placa de 96 pozos. Al siguiente día las células se trataron con vehículo o ligandos específicos (10 nM E<sub>2</sub> o 100 nM TAM para ER y 1 nM dihidrotestosterona (DHT) para AR) durante 8 días tomando mediciones cada 48 h. 2) Las células MCF7 ( $2 \times 10^6$  cel), se transfectaron, con 3  $\mu$ g de pcDNA-BCAS2 o pcDNA sin inserto, o pLKO.1-BCAS2 shRNA o shRNA inespecífico (shE1). En caso de PINX1, con pcDNA sin inserto o pcDNA-PINX1, o pLKO.1-PINX1 shRNA o shRNA inespecífico (shE1). Posteriormente, se dejaron durante 48 h en medio

DMEM/F12 sin suero. Las células se tripsinizaron y se sembraron diluciones seriadas 1:2 a partir de un stock de  $1 \times 10^5$  células, hasta llegar a una concentración de  $1.5 \times 10^3$  células. Durante 4 días se mantuvieron en medio con suero tratado (0.5% sSFB) en presencia y ausencia de 10 nM  $E_2$ . En ambos casos, al finalizar los tratamientos, se agregaron 10  $\mu$ L de MTT 5 mg/mL (Quick Cell Proliferation; BioVision) a las células y la reacción se incubó durante 3 h a 37 °C. El ensayo se leyó a una absorbancia de 450 nm utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific\* Multiskan\* MCC/340; 8 filtros). La sobrevivencia de las células se calculó dividiendo la absorbancia de las células transfectadas de las no transfectadas. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y como control se utilizaron células MCF7 o 22Rv1 en las mismas condiciones, transfectadas con vector vacío. La estadística se realizó por ANOVA de dos vías seguido de un análisis de Bonferroni.

### **Ensayo Clonogénico.**

Células MCF7 transfectadas con shBCAS2 o shPINX1 y no transfectadas hasta alcanzar una confluencia de 50 a 70%. Las células se tripsinizaron, se contaron y se volvieron a sembrar en placas de cultivo de 6 pozos (con 500, 1000 y 2000 células por pozo) y se incubaron durante 10 días. Se añadió medio fresco en el quinto día. En el día 10, se lavaron las células una vez con PBS. Las colonias formadas se fijaron con una solución FAA (formaldehído-alcohol-ácido acético) y se tiñeron con 2 ml de 0.5% 1,9-dimetil-azul de metileno en etanol al 50% durante 45 minutos sobre una plataforma oscilante. Las placas se enjuagaron tres veces con PBS y se dejaron secar al aire. Las colonias se contaron y se graficaron reportándose como PE, que es la relación del número de colonias con respecto a las sembradas;  $PE = (\# \text{ de colonias formadas} / \# \text{ células sembradas}) \times 100$  (Franken NA., *et al.*, 2006).

## **RESULTADOS**

### **Interacción de BCAS2 y PINX1 con ER *in vivo* e *in vitro***

La región de transactivación AF-1 en el dominio N-terminal del ER $\alpha$ , es un elemento importante en la señalización de este receptor mediada tanto por estrógenos como por antiestrógenos (Tzukerman *et al.*, 1994). Utilizando el sistema de doble híbrido en levaduras para detectar proteínas que interactuaran con esta región, obtuvimos varias secuencias candidatas, entre las cuales encontramos a BCAS2 y PINX1. Para verificar si estas proteínas o al menos alguna de ella interactuaba directamente con el ER $\alpha$ , se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* (pull-down) utilizando proteínas fusionadas a GST del gen completo (aa 1-595) y las regiones N-terminal (aa 1-180) y C-terminal (aa 264-595), por separado.

Observamos que BCAS2 interactúa con el ER $\alpha$  completo, en presencia y ausencia de E<sub>2</sub>. Esta interacción se lleva a cabo por medio de la región N-terminal (aa 1-180) de ER $\alpha$  y no a través del dominio C-terminal, aún en presencia de ligando (fig. 5A). Adicionalmente, se determinó si existía una interacción con el ER $\beta$ , y observamos que BCAS2 también es capaz de interactuar con este receptor en presencia y ausencia de E<sub>2</sub> y que esta interacción se lleva a cabo sobre la región N-terminal.

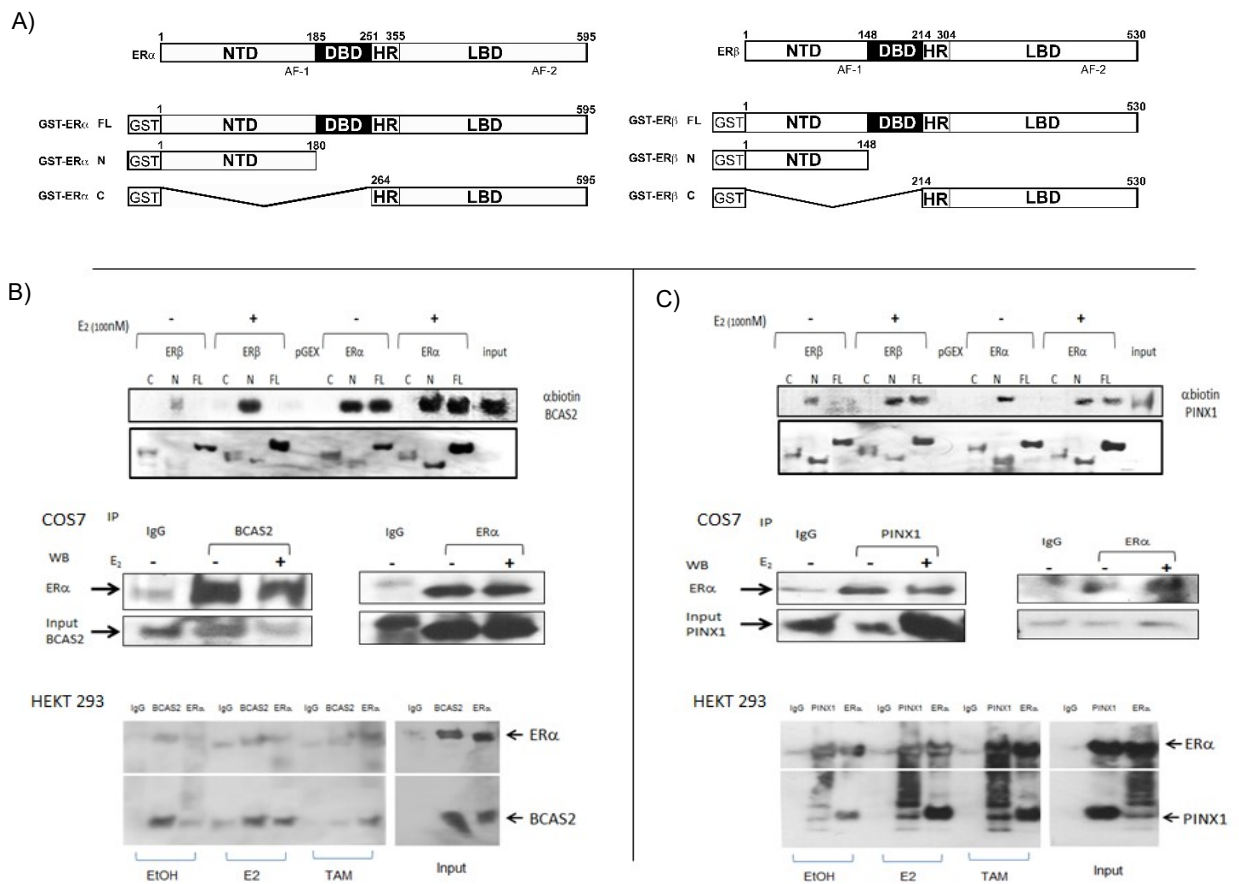
Los estudios de interacción *in vivo* se realizaron utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEKT 293 y COS7 transfectadas transitoriamente con ambas proteínas (ER $\alpha$  y BCAS o PINX1, según el caso). Utilizando anticuerpos contra el ER $\alpha$ , observamos que es posible precipitar a BCAS2, tanto en presencia de E<sub>2</sub> como en ausencia de este, y además en presencia de Tamoxifén, apoyando los resultados obtenidos con los ensayos de pull-down, lo cual indica que esta interacción es fructífera en la célula (Fig. 5B-C). Estos

resultados se repiten realizando la precipitación inversa con el anticuerpo contra BCAS2.

En el caso de PINX1 esta proteína interactúa con la proteína completa, en presencia de estradiol y no en ausencia de ligando (Fig. 5A) y particularmente, esta interacción se lleva a cabo con la región N-terminal. No hubo interacción con la región C-terminal en presencia ni ausencia de ligando. De igual manera, la interacción de PINX1 con el ER $\beta$ , fue a través de la región N-terminal.

En los ensayos de co-inmunoprecipitación, observamos que al precipitar con el anticuerpo contra ER $\alpha$ , hay interacción con PINX1 en presencia de ligando agonista y antagonista, así como en ausencia de ligando, lo mismo paso al utilizar el anticuerpo contra PINX1. Lo anterior nos hace pensar que podría jugar un papel en la regulación de la actividad del ER $\alpha$ , ya que observamos que la interacción *in vivo* de estas dos proteínas (ER $\alpha$  y PINX1) se da en ausencia y presencia de ligando (Fig. 5B-C).





**Figura 5. Interacción entre BCAS2 o PINX1 y ER in vitro e in vivo.** A) Se muestra un esquema de los fragmentos utilizados para la *interacción in vitro*. Los ensayos de Pull-down se realizan con los ER $\alpha$  y ER $\beta$  completos (FL) o sus fragmentos N- o C-terminales unidos a GST. En la figura B) se observa la interacción in vitro e in vivo de BCAS2. El panel superior muestra el western blot de BCAS2, donde se observa su retención por los fragmentos del ER unidos a GST. Abajo, reportamos la interacción in vivo, a través de una co-inmunoprecipitación tanto en células COS7, como en HEKT 293 y en presencia y ausencia de E<sub>2</sub> (10 nM) o adicionalmente con Tamoxifén (TAM) en células HEK293. La Co-IP se llevó a cabo con anticuerpo contra BCAS2 y western blot contra ER $\alpha$  y de manera inversa. C) Se observa la interacción in vitro e in vivo de PINX1. El panel superior muestra el western blot de PINX1, donde se observa su retención por los fragmentos del receptor unidos a GST. En el panel de en medio e inferior, reportamos la interacción in vivo, a través de una Co-IP en células COS7 y en HEKT 293; esta interacción se llevó a cabo en presencia y ausencia de E<sub>2</sub> (10 nM), y en las células HEKT293 también con TAM. La Co-IP se llevó a cabo con anticuerpo contra PINX1 y western blot contra ER $\alpha$  y de manera inversa. Las células

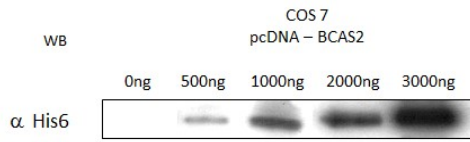
utilizadas en los ensayos de IP, fueron transfectadas, con los plásmidos de expresión para con BCAS2 o PINX1 y para ER $\alpha$ .

### **BCAS2 modula la actividad transcripcional de ER $\alpha$**

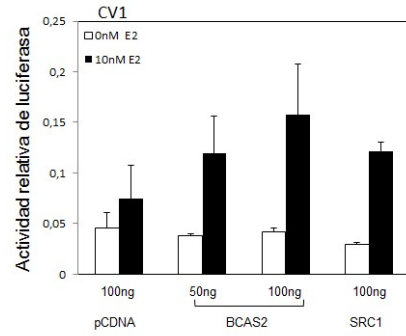
Para determinar si BCAS2 afecta la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , realizamos ensayos con un gen reportero de luciferasa regulado por EREs. Se observó que BCAS2 es capaz de incrementar la actividad transcripcional del receptor de estrógenos completo a un nivel similar o mayor al alcanzado por SRC-1 (coactivador control) en líneas celulares de cáncer de mama que expresan ER $\alpha$  (MCF7 y T47D), y que no expresan ER $\alpha$  endógenamente (MDA-MB-231 y MDA-MB-453), lo cual se puede observar en la figura 6 (C-D). Adicionalmente, utilizamos células CV-1, de riñón de mono verde, que no expresan receptores hormonales y encontramos la misma inducción transcripcional (figura 6B). Cuando se realizaron los ensayos en presencia de tamoxifén, para determinar si BCAS2 podría potenciar el efecto negativo del SERM, se observa que en células MCF7, transfectadas con BCAS2 no cambia el efecto inhibitorio de este antagonista.

Para determinar si la actividad coactivadora de BCAS2 se llevaba a cabo mediante la región de transactivación amino-terminal (AF-1) o la carboxilo-terminal (AF-2), realizamos ensayos de actividad transcripcional utilizando dominios con AF-1 y AF-2 de manera independiente. Se demuestra en la figura 7A que BCAS2 incrementa la actividad transcripcional mediada por AF-1 del ER $\alpha$ , en células HepG2 (donde AF-1 puede funcionar de manera independiente a AF-2 como se demostró en Tzukerman *et al.*, 1994.), siendo directamente proporcional el incremento de la actividad de AF1, al incremento en la concentración de BCAS2. El mismo fenómeno se observa sobre AF-2, solo en presencia de ligando (Fig. 7B). Esto se compara con la actividad del coactivador SRC-1 que potencia ambas funciones de activación transcripcional.

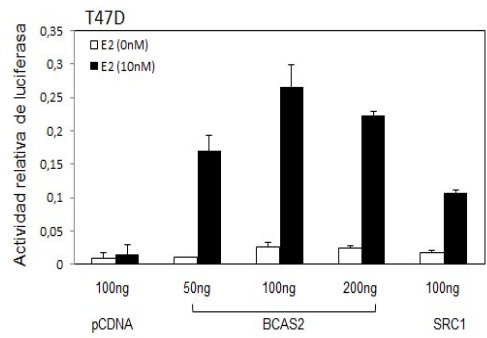
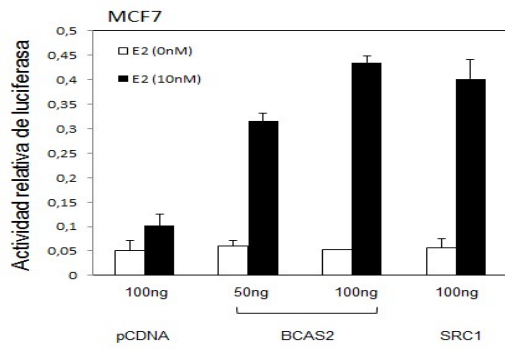
A)



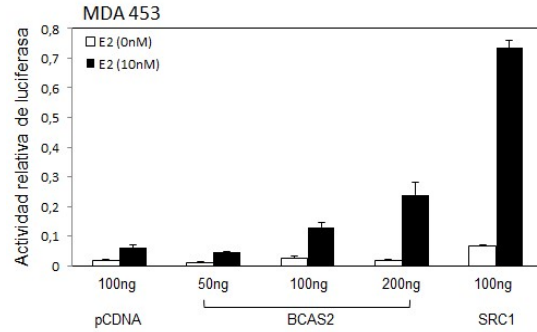
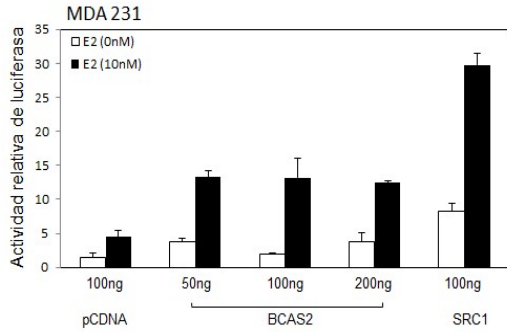
B)



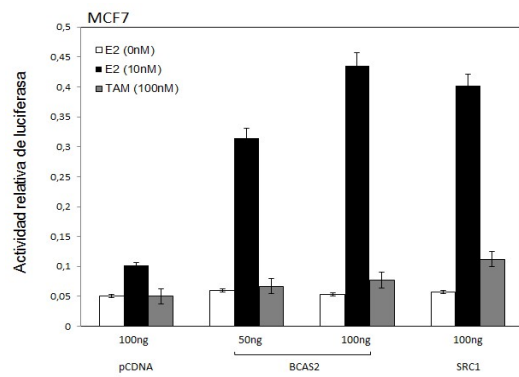
C)



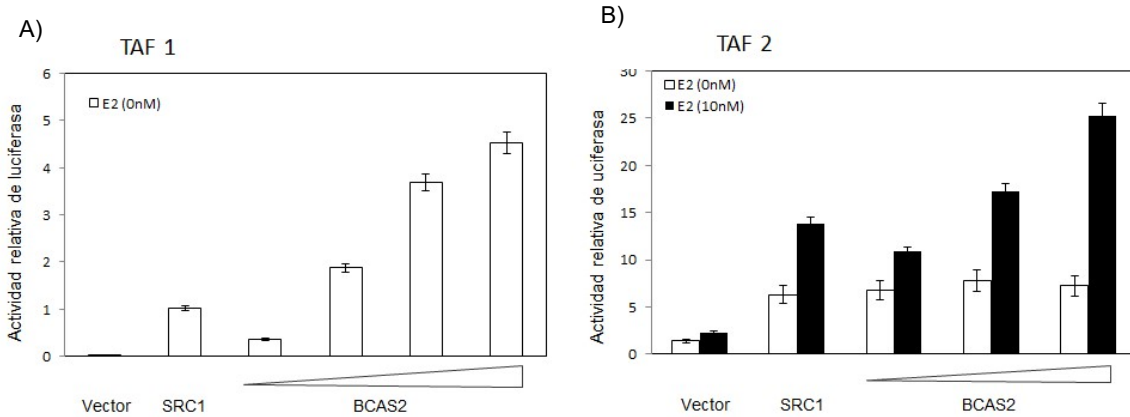
D)



E)



**Figura 6. BCAS2 incrementa la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en líneas celulares de cáncer de mama.** Ensayos de luciferasa, transfectando concentraciones crecientes de BCAS2 en presencia y ausencia de E<sub>2</sub> o Tamoxifén. Se utiliza el coactivador SRC-1 como control positivo y pcDNA3.1 como control negativo. (A) Western blot de la expresión de BCAS2 transfectado en células COS7; (B) Ensayos de transactivación en células CV-1 con 50 ng de plásmido transfectado de ER $\alpha$  y diferentes concentraciones de BCAS2, en presencia (barras negras) y ausencia (barras blancas) de E<sub>2</sub> (C) Ensayos de transactivación en células MCF7 y T47D de cáncer de mama con ER $\alpha$  endógeno. (D) Ensayos de transactivación en células MDA-MB-231 y MDA-MB-453, transfectados con 50 ng de ER $\alpha$ . E) Ensayos de transactivación en células MCF7 en presencia o en ausencia de un ligando agonista y antagonista (E<sub>2</sub> y TAM). Los datos se muestran como Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferasa sobre  $\beta$ -galactosidasa (control de transfección). Los ensayos se realizaron por triplicado y las barras de error indican SEM. Se muestra un ensayo representativo de por lo menos tres repeticiones de cada ensayo.

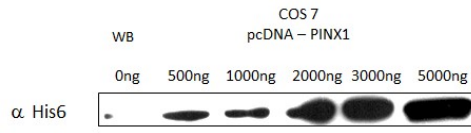


**Figura 7. Efecto de BCAS2 sobre los dominios de transactivación AF1 y AF2 del receptor ER $\alpha$  en células HepG2.** A) actividad transcripcional sobre AF-1 y B) sobre AF-2. Actividad de luciferasa en células HepG2, en donde los dos sitios de transactivación (AF1 y AF2), actúan independientemente. Se transfetaron los reporteros 3xERE-luciferasa y los vectores de expresión pCMV5, pcDNA-BCAS2 o pcDNA-SRC1, cada ensayo se realizó en ausencia o presencia de E<sub>2</sub>, dependiendo el sitio de transactivación. Los datos se muestran como Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferasa sobre  $\beta$ -galactosidasa (control de transfección). Los ensayos se realizaron por triplicado y las barras de error indican SEM. Se muestra un ensayo representativo de por lo menos tres repeticiones de cada ensayo.

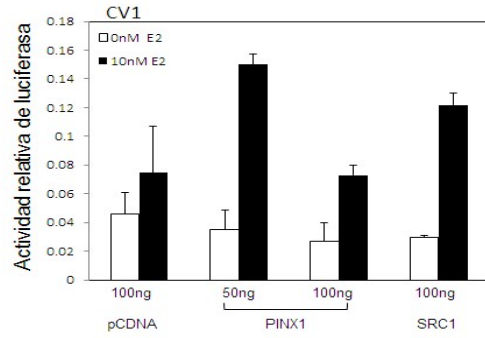
## **PINX1 reprime la actividad transcripcional de ER $\alpha$**

Para responder a la pregunta de si PINX1 era un corregulador de ER $\alpha$ , se realizaron ensayos de transactivación. Inicialmente, se utilizó la línea celular CV-1 que no expresa receptores de hormonas esteroides. Se observa en la figura 8B que aun cuando a bajas concentraciones de plásmido transfectado parece incrementar la actividad transcripcional, conforme se va incrementando la concentración de PINX1 transfectado, la actividad transcripcional del ER $\alpha$  disminuye. Adicionalmente, se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama que expresan endógenamente el ER $\alpha$  (MCF7 y T47D), Figura 8C, y aquellas que son el ER $\alpha$  negativas (MDA-MB-231 y MDA-MB-453), Figura 8D. En todas las líneas celulares se observa que al incrementar la concentración de PINX1, la actividad transcripcional del ER $\alpha$  en presencia de E<sub>2</sub> se ve abatida (Fig. 8C). Esto sugiere que PINX1 funciona como un correpresor del ER $\alpha$  en presencia de E<sub>2</sub>. Cuando se realizaron los ensayos en presencia de tamoxifén, para determinar si PINX1 podría potenciar el efecto negativo del SERM, se observa que en células MCF7, PINX1 no modifica el efecto inhibitorio de tamoxifén (Fig 8E). La figura 8F, muestra el efecto que tiene el abatir por medio de shRNA, la expresión de PINX1, sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , en células MCF7, observandose un incremento en esta actividad en presencia de E<sub>2</sub>, mas no así en ausencia del ligando o presencia del antagonista Tamoxifen. Dicho efecto es revertido cuando se sobreexpresa PINX1, teniendose como resultado el restablecer su efecto de correpresor de ER $\alpha$  en presencia de E<sub>2</sub>, lo cual se puede comparar con lo reportado en las figuras 8 C y E.

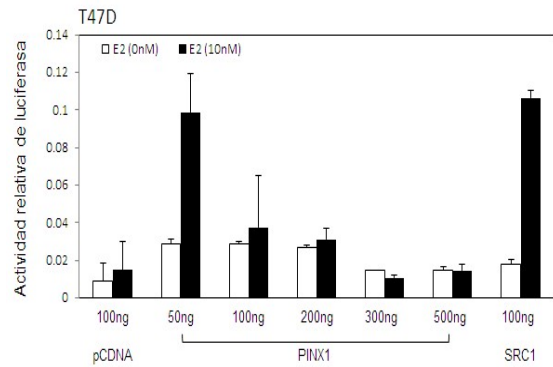
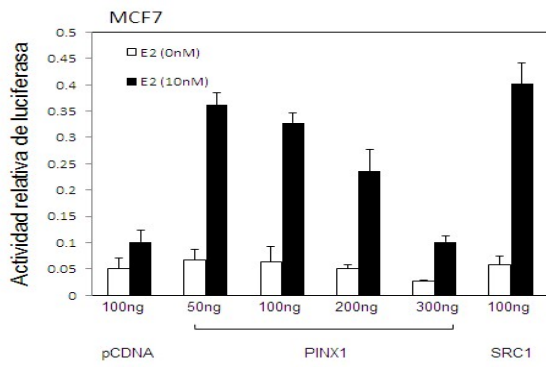
A)



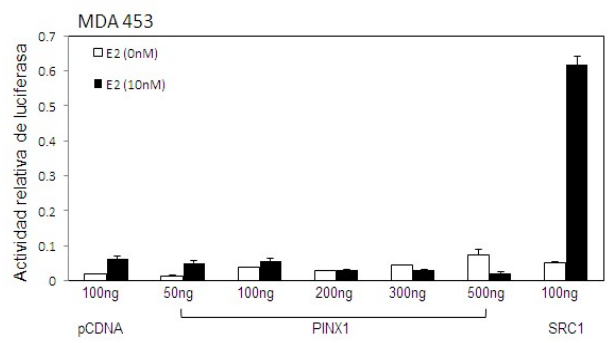
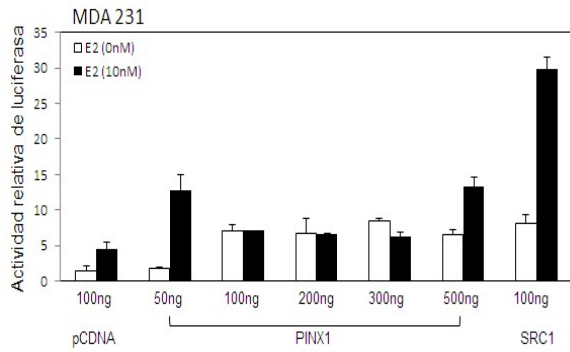
B)



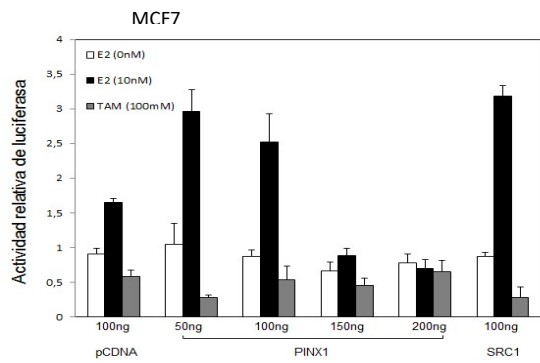
C)



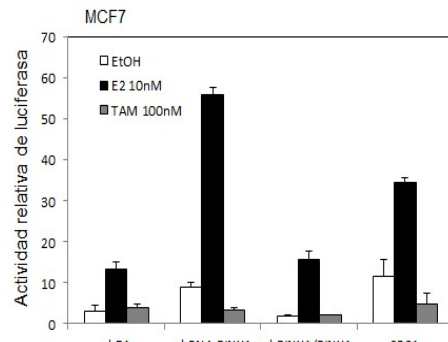
D)



E)

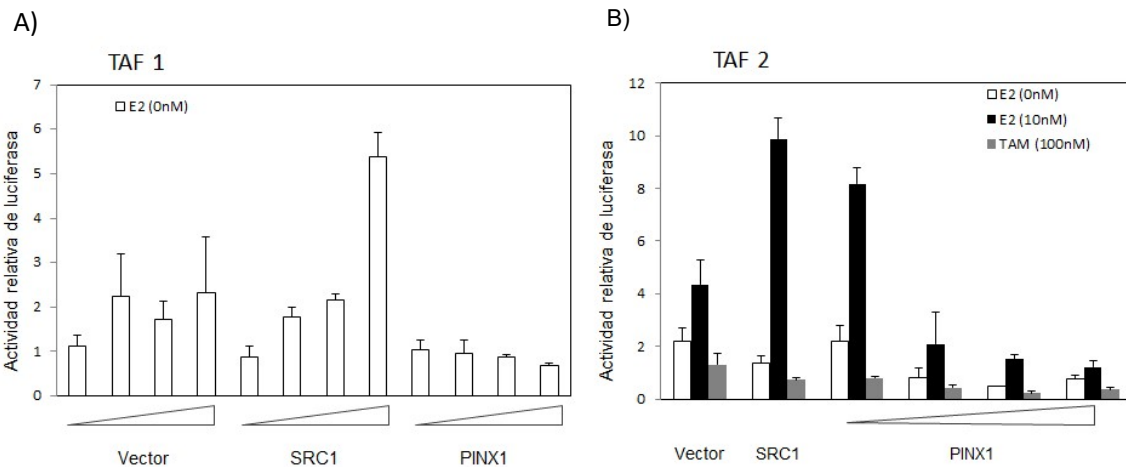


F)



**Figura 8. PINX1 inhibe la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en líneas celulares de cáncer de mama.** Se realizaron ensayos de luciferasa, transfectando concentraciones crecientes de PINX1 en presencia y ausencia de E<sub>2</sub> o tamoxifén. Se utiliza el coactivador SRC-1 como control positivo y pcDNA3.1 como control negativo. A) Western blot de la expresión de PINX1 transfectado en células COS7; B) Ensayos de transactivación en células CV-1 con 50 ng de plásmido transfectado de ER $\alpha$  y diferentes concentraciones de PINX1, en presencia (barras negras) y ausencia (barras blancas) de E<sub>2</sub>; C) Ensayos de transactivación en células MCF7 y T47D de cáncer de mama con ER $\alpha$  endógeno. D) Ensayos de transactivación en células MDA-MB-231 y MDA-MB-453, transfectadas con 50 ng de ER $\alpha$ . E) Ensayos de transactivación en células MCF7 de cáncer de mama, que expresa ER $\alpha$  en presencia y ausencia de E<sub>2</sub> y TAM (barras grises). F) En este ensayo, se transfectan células MCF7 con shE1, shPINX1, shPINX1/pcDNA-PINX1 y SRC1, todo esto con la finalidad de comprobar el papel de corepresor de PINX1, sobre la actividad de ER $\alpha$ . En todos los experimentos se muestra la actividad coactivadora de SRC-1 como control positivo. Los datos se muestran como Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferasa sobre URL de  $\beta$ -galactosidasa (control de transfección), reportándose como la media  $\pm$  SEM de un ensayo representativo llevado a cabo por lo menos tres veces por triplicado.

Para determinar si la actividad represora de PINX1 se lleva a cabo mediante la región de transactivación AF-1, realizamos ensayos de actividad transcripcional utilizando fragmentos que contienen los dominios AF-1 y AF-2 de manera independiente. Se utilizó la línea celular HepG2 porque se sabe que AF-1 tiene actividad independiente de AF-2 o sinérgica en estas células (Tzukerman MT, 1994). La figura 9 demuestra que al incrementar las concentraciones de PINX1, se inhibe tanto la actividad transcripcional mediada por AF-1, como aquella mediada por AF-2, en presencia de E<sub>2</sub> y Tamoxifén. Esto se compara con la actividad del coactivador SRC-1 que potencia ambas funciones de activación transcripcional (Fig. 9 A y B). Esto apoya lo observado en los ensayos de co-inmunoprecipitación, donde observamos interacción con la región C-terminal que aún cuando podría ser indirecta, es funcional y fructífera.



**Figura 9. Efecto de PINX1 sobre los dominios de transactivación, AF1 y AF2, del ER $\alpha$  en células HepG2.** Se determinó el efecto de concentraciones crecientes (50-400 ng) de vector vacío (pcDNA3.1), PINX1 o SRC en ausencia (barras blancas) o presencia de 10 nM de E<sub>2</sub> (barras negras) o 100 nM de TAM (barras grises) sobre las dos regiones de transactivación de ER $\alpha$  por separado. A) Ensayos de transactivación de la región N-terminal (TAF1 aa 1-282) del ER $\alpha$ . Se utiliza etanol (EtOH) como vehículo. B) Ensayos de transactivación de la región C-terminal (TAF2 aa 144-595). Los datos se muestran como Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferasa sobre  $\beta$ -galactosidasa. Los ensayos se realizaron por triplicado y las barras indican error estándar. Se muestra una gráfica representativa de por lo menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

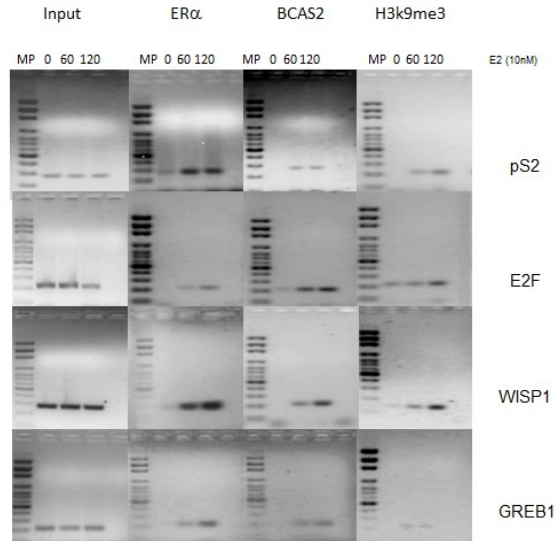
### **BCAS2, se posiciona junto con ER en diferentes promotores de genes blanco de E<sub>2</sub>**

Mediante ensayos de ChIP se determinó que BCAS2 y ER $\alpha$  se reclutan en promotores dependientes de E<sub>2</sub> como son pS2, E2F2, WISP2 y CREB1, y esta localización se va incrementando conforme pasa el tiempo de exposición a E<sub>2</sub> (10, 20, 30, 60, 120 y 180 min), tal como se muestra en la figura 10 (panel A, B y C). Con lo cual podemos concluir que la interacción de ER $\alpha$  y BCAS2, se lleva a cabo en promotores con elementos a respuesta a estrógenos y que esta interacción está influenciada directamente por el tiempo de exposición a estradiol. Se

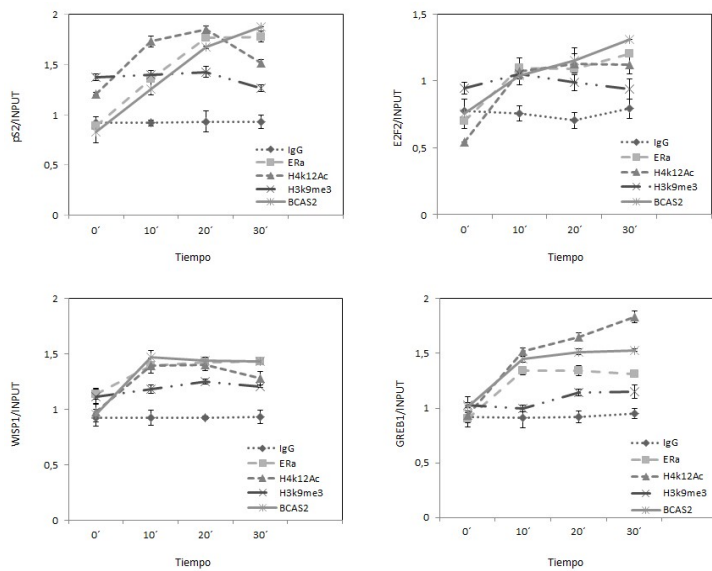


utilizaron en estos ensayos dos marcas de cromatina abierta (H3k27Ac y H4k12Ac) y una marca de comatina cerrada (H3K4me3).

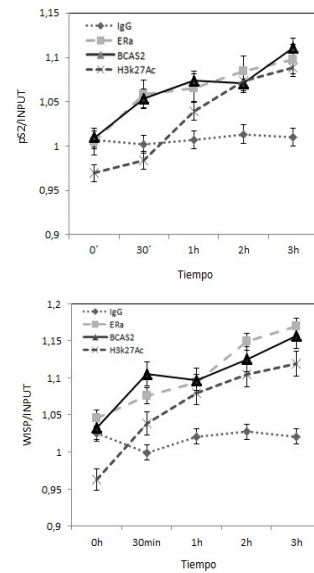
A)



B)



C)



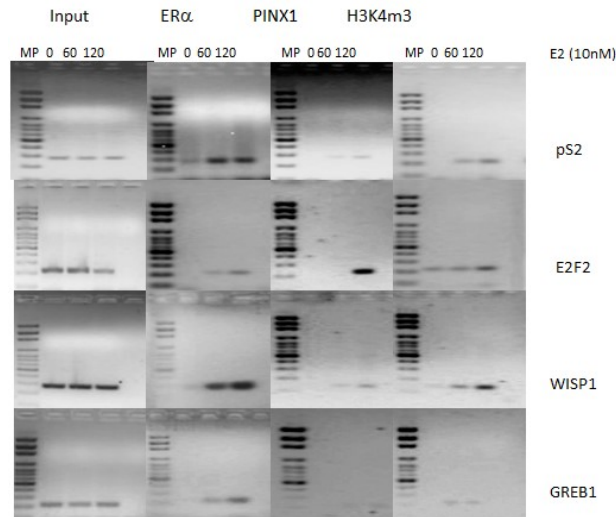
**Figura 10. BCAS2, se posiciona al mismo tiempo que ERα, sobre elementos a respuesta de estrógenos sobre promotores de genes que responden a E<sub>2</sub> (pS2, E2F2, WISP2 y CREB1).** BCAS2 endógeno se posiciona sobre estos promotores, en presencia de estradiol (100nM) en células MCF7. Los ensayos fueron realizados después de 48h en ausencia de suero y posteriormente a diferentes tiempos de tratamiento con

estradiol (0 a 180 minutos). A) Se muestran los ensayos a tiempos prolongados que fueron evidenciados por PCR de punto final y B y C) los ensayos a diferentes tiempos (0', 10', 20', 30', 1h, 2h y 3h) se detectaron por PCRqTR utilizando SYBR green en un termociclador LightCycler 480 Master I (Roche, Indianapolis, IN). Se utilizaron como marca abierta de cromatina a H3k27Ac y H4k12Ac, y como marca cerrada a H3k9m3.

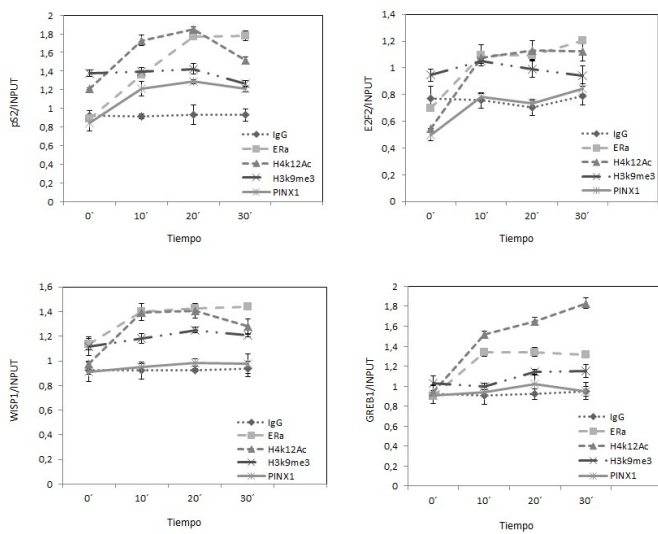
### **PINX1, se posiciona tardíamente en promotores de genes blanco en presencia de E<sub>2</sub>**

Para comprobar que los efectos de PINX1 se llevan a cabo sobre promotores de genes blanco del ER $\alpha$ , realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) a diferentes tiempos de exposición de E<sub>2</sub> (Fig 11). Estos ensayos demostraron que ER $\alpha$  y PINX1 colocalizan sobre el promotor pS2 a partir de 60 min de incubación en presencia de E<sub>2</sub>, en células MCF7. A tiempos de incubación más cortos (10, 20, 30 min), no se encontró interacción de PINX1 con los promotores blanco estudiados. Con esto comprobamos que la interacción de ER $\alpha$  y PINX1 se lleva a cabo en promotores con EREs, sin embargo, solo se lleva a cabo a tiempos prolongados de exposición de E<sub>2</sub>. Igualmente, al analizar otras secuencias promotoras que contienen ERE (E2F2, WISP2 y CREB1), se observó un nivel bajo o nulo de la proteína PINX1 a tiempos cortos (menores de 60 min), como se demuestra en la figura 11B, donde los ensayos fueron detectados por PCRqTR utilizando SYBR Green, la presencia de esta proteína se va incrementado sobre estos promotores conforme aumenta el tiempo de exposición a E<sub>2</sub> (Figura 11 A y C).

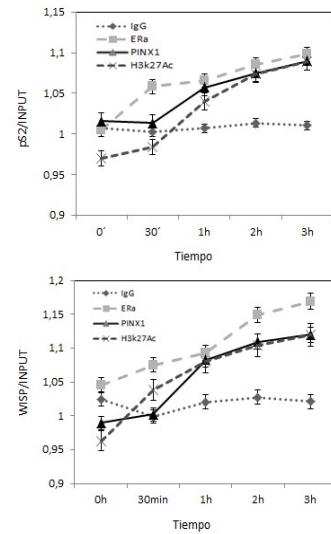
A)



B)



C)

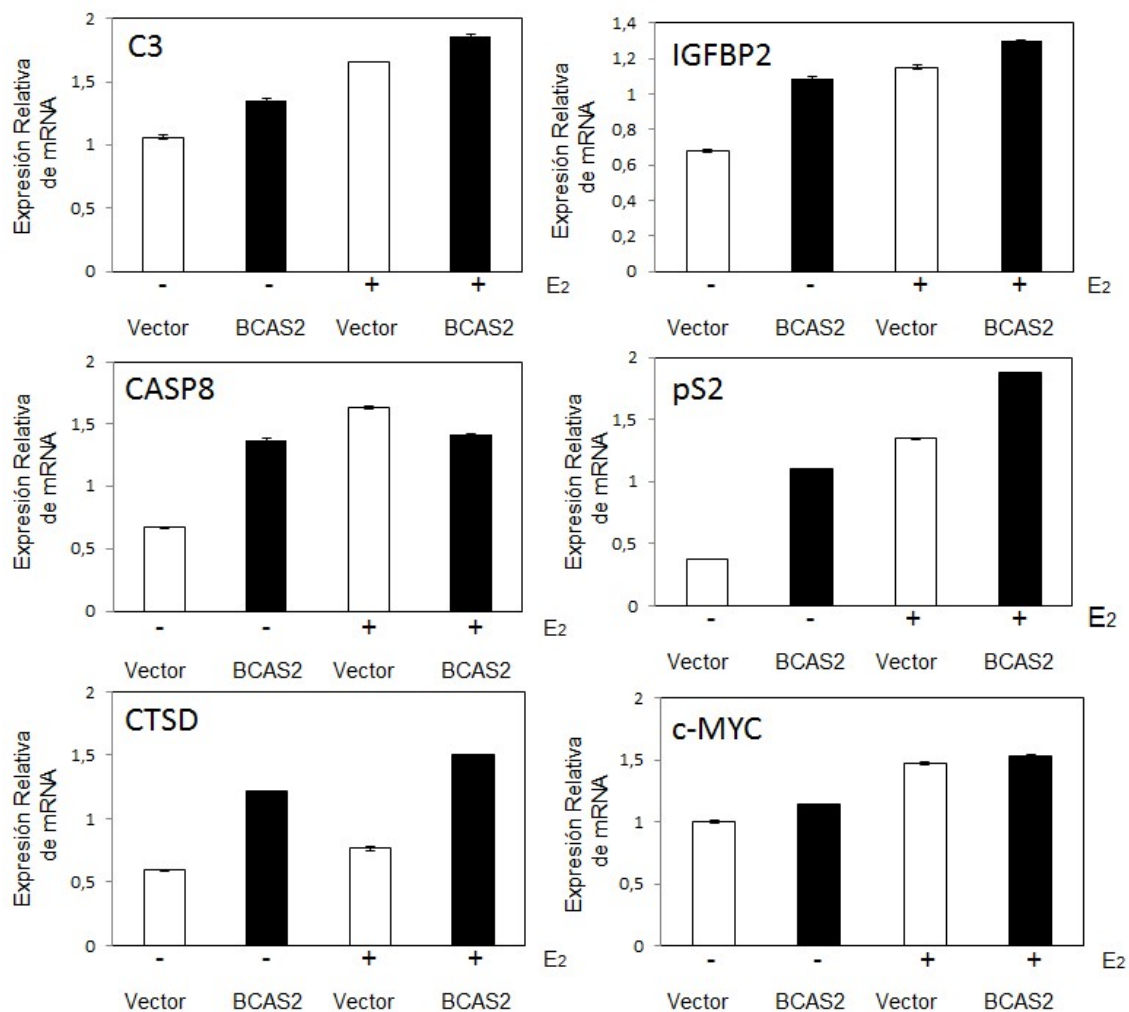


**Figura 11. PINX1, se colocaliza tardíamente con ER $\alpha$ , sobre promotores de genes que responden a E $_2$ .** Se realizaron ensayos de ChIP sobre los promotores de pS2 E2F2, WISP2 y CREB1, a tiempos largos que fueron evidenciados por PCR de punto final (0, 60 y 120 min) (A) y los ensayos a diferentes tiempos (0', 10', 20', 30', 1h, 2h y 3h) se detectaron por PCRqTR utilizando SYBR green en un termociclador LightCycler 480 Master I (Roche, Indianapolis, IN) (B y C), en presencia de estradiol (100nM) en células MCF7. Los ensayos fueron realizados después de 48h en ausencia de suero y

posteriormente a diferentes tiempos de tratamiento con estradiol. Se observa el posicionamiento de PINX1 endógeno sobre los promotores de pS2, E2F2, WISP2 y CREB1 a partir de 60 min de incubación con E<sub>2</sub> 1 mM. Las figuras muestran un ensayo representativo realizado tres veces por triplicado. Se utilizaron como marca abierta de cromatina a H3k27Ac y H4k12Ac, y como marca cerrada a H3k9m3.

### **BCAS2 tienen un efecto sobre la expresión de genes blanco de SHR**

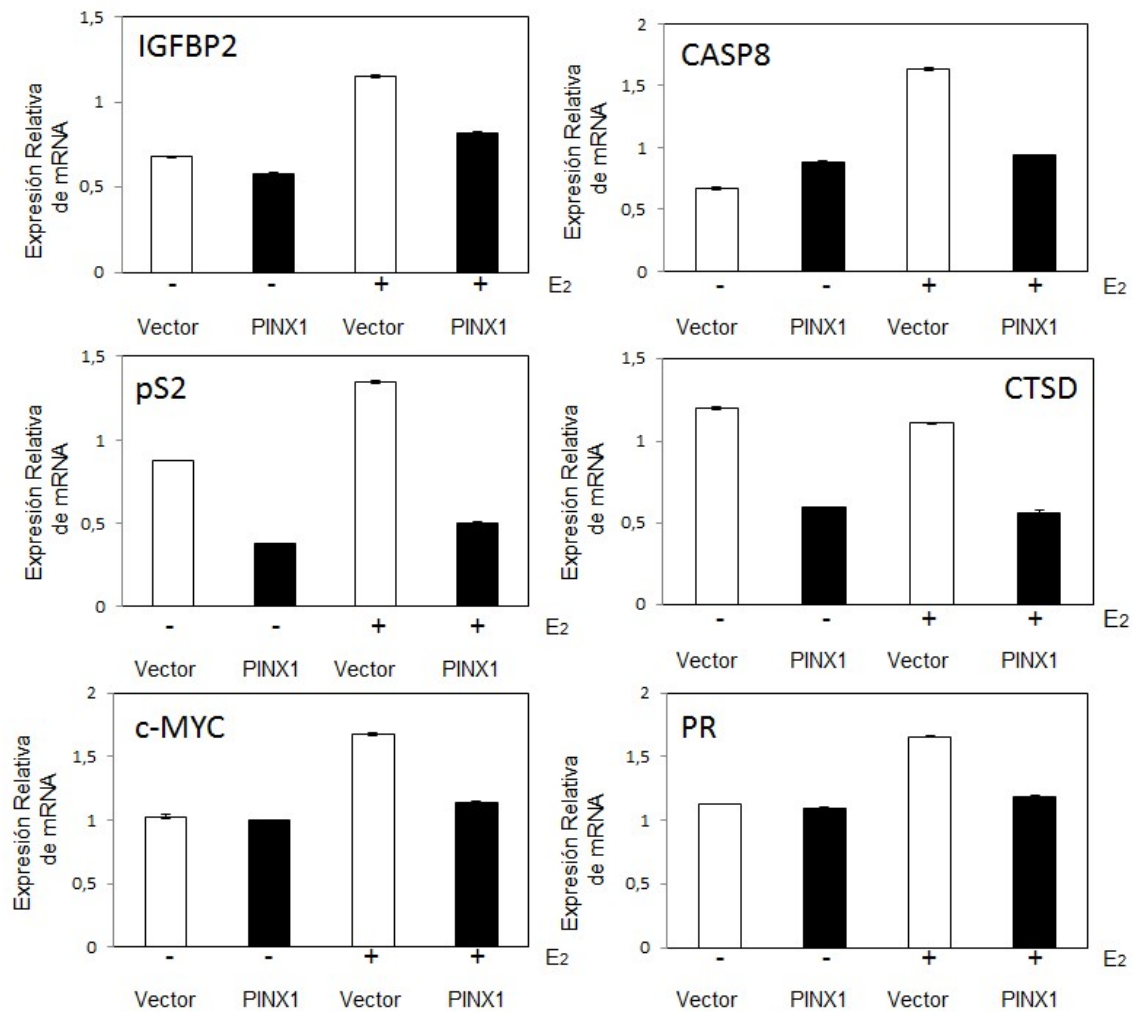
Para determinar el efecto que tiene este corregulador sobre algunos genes blanco de estradiol, se realizó RT-PCR en tiempo real. La sobre expresión de BCAS2, en ausencia y presencia de E<sub>2</sub>, afecta la expresión de algunos genes que contienen elementos de respuesta al receptor ER $\alpha$ , como se puede observar en la figura 12. Se observa que al sobreexpresar BCAS2 en células MCF7, en presencia e inclusive ausencia de E<sub>2</sub>, incrementa el transcrito de pS2, C3, IGFBP2 y CTSD, a diferencia de CASP8, que solo se ve incrementado en ausencia de E<sub>2</sub>, y MYC que prácticamente no se ve afectado. Esto nos podría indicar que BCAS2 es un coactivador de ER $\alpha$  y que su acción dependerá del promotor. Adicionalmente, se observó que al tratar a las células con ICI, un antagonista total de ER $\alpha$ , disminuyen los niveles de expresión de genes como pS2 y Catepsina D (datos no mostrados), sugiriendo que el incremento transcripcional en presencia de BCAS2 es mediado por el ER, al menos de estos genes.



**Figura 12. La sobre-expresión de BCAS2, regula la expresión de genes blanco del ER.** En éstas graficas se reporta la expresión de diferentes transcritos en presencia y ausencia de E<sub>2</sub>. La sobre-expresión de BCAS2, regula el incremento de los transcritos de genes como; C3, IGFBP2, pS2 y CTSD, en presencia de E<sub>2</sub>, en cambio para CASP8 solo hay un efecto en ausencia de esta hormona y sobre cMYC no se observa cambios. Las células MCF7 fueron transfectadas con pcDNA-BCAS2 y tratados con E<sub>2</sub> a 10 nM durante 24 h. La cuantificación de los productos génicos se realizó mediante PCR en tiempo real y se normalizaron los ensayos utilizando mRNA de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH). Se reportan unidades relativas de mRNA. Las figuras muestran un ensayo representativo realizado tres veces por duplicado.

## **La sobre-expresión de PINX1 tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de genes blanco de SHR**

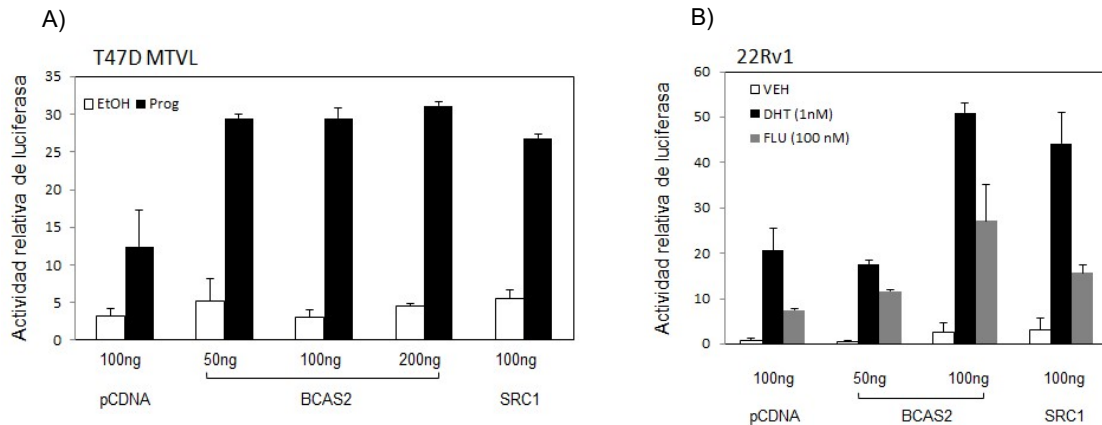
Para determinar el efecto que tiene PINX1 sobre genes blanco del ER $\alpha$ , realizamos RT-PCR en tiempo real. Se observó que al sobre-expresar PINX1, disminuye la expresión de algunos genes que responden a E<sub>2</sub>, como es el caso de IGFBP2, Caspasa 8 (CASP8), pS2, Catepsina D (CTSD), cMYC y el PR (Fig. 13). Sin embargo, la expresión de algunos otros genes regulados como C3, PSA, c-Fos y EFGR no se vió abatida en células MCF7 y T47D (datos no mostrados). Primeramente, estos datos confirman la actividad que hemos observado en los ensayos de transactivación sobre un sitio ERE sintético. Sin embargo, también sugiere que la actividad inhibitoria de PINX1 sobre ER $\alpha$  depende del contexto del promotor. De manera general, la sobre-expresión de PINX1 mantiene niveles bajos de algunos transcritos regulados por E<sub>2</sub>, que están relacionados con desarrollo, diferenciación y regulación de ciclo celular.



**Figura 13. La sobreexpresión de PINX1, regula la expresión de genes blanco del ER.** En éstas graficas se reporta la expresión de diferentes transcritos en presencia y ausencia de E<sub>2</sub>. La sobre- expresión de PINX1, regula a la baja la expresión de genes como; IGFBP2, CASP8, pS2, CTSD cMYC y PR, en presencia de E<sub>2</sub>. Las células MCF7 fueron transfectadas con pcDNA-PINX1 y tratados con E<sub>2</sub> a 10 nM durante 24 h. La cuantificación de los productos génicos se realizó mediante PCR en tiempo real y se normalizaron los ensayos utilizando mRNA de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH). Se reportan unidades relativas de mRNA. Las figuras muestran un ensayo representativo realizado tres veces por duplicado.

## Efecto de BCAS2 sobre la actividad transcripcional de AR y PR

Se sabe que gran número de correguladores actúan sobre varios receptores de hormonas esteroides, por lo que realizamos ensayos de actividad transcripcional con el PR en una línea celular de cáncer de mama, T47D MTVL (Fig. 14A) y con el AR en líneas celulares de cáncer de próstata 22Rv1 (Fig 14B) y DU145 (datos no mostrados). La sobre-expresión de BCAS2 mostró un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por ambos receptores en presencia de sus ligandos agonistas (Progesterona y DHT, respectivamente), tal como vimos con BCAS2 sobre la actividad transcripcional mediada por el ER $\alpha$  (Fig. 6). El incremento en la actividad transcripcional fue similar al que es inducido al transfectar SRC-1 a las mismas concentraciones. Adicionalmente, se realizaron experimentos sobre AR en presencia del ligando antagonista, Flutamida, encontrando que la expresión de BCAS2 no modifica la actividad inhibitoria de este ligando (Fig. 14B). Esto sugiere que BCAS2 es un coactivador de receptores hormonales, y que su efecto es igual o mayor al SRC1, que fue usado como comparativo.



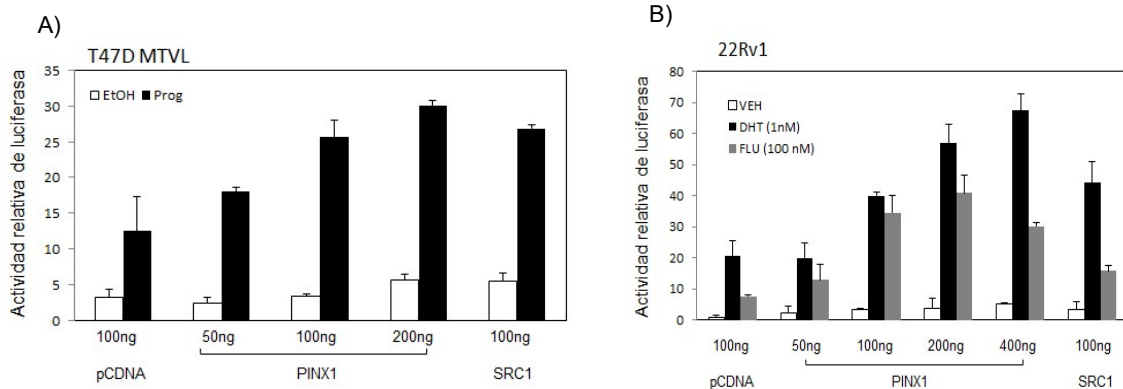
**Figura 14. Efecto del coactivador BCAS2 sobre la actividad transcripcional del PR y AR.** A) Ensayos de actividad transcripcional de PR en presencia y ausencia de progesterona 10 nM, en células T47D de cáncer de mama que expresan de manera estable un gen reportero de luciferasa con un promotor MMTV. B) Ensayos de actividad transcripcional de AR en líneas celulares de cáncer de próstata, 22Rv1 en presencia y ausencia de DHT 1 nM. Los datos se muestran como Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferasa sobre URL de  $\beta$ -galactosidasa. Los ensayos se



realizaron por triplicado y las barras indican error estándar. Se muestra un ensayo representativo de por lo menos tres repeticiones de cada ensayo por triplicado.

### **PINX1 tiene un efecto positivo sobre la actividad transcripcional de AR y PR**

Se sabe que gran número de correguladores actúan sobre varios receptores de hormonas esteroides, por lo que realizamos ensayos de actividad transcripcional con el PR en una línea celular de cáncer de mama, T47D MTVL (Fig. 15A) y con el AR en líneas celulares de cáncer de próstata 22Rv1 (Fig 15B) y DU145 (datos no mostrados). Sorprendentemente, la sobre-expresión de PINX1 mostró un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por ambos receptores en presencia de sus ligandos agonistas (Progesterona y DHT, respectivamente), contrario al efecto inhibitorio de PINX1 sobre la actividad transcripcional mediada por el ER $\alpha$  (Fig. 8). El incremento en la actividad transcripcional fue similar al que es inducido al transfectar SRC-1 a las mismas concentraciones. Adicionalmente, se realizaron experimentos sobre AR en presencia del ligando antagonista, Flutamida (Fig. 15 B), encontrando que la expresión de PINX1 modifica la actividad inhibitoria de este ligando. Esto sugiere que PINX1 puede tener un papel regulatorio diferencial dependiendo del receptor con el que se encuentre interactuando o que su efecto depende del contexto celular.

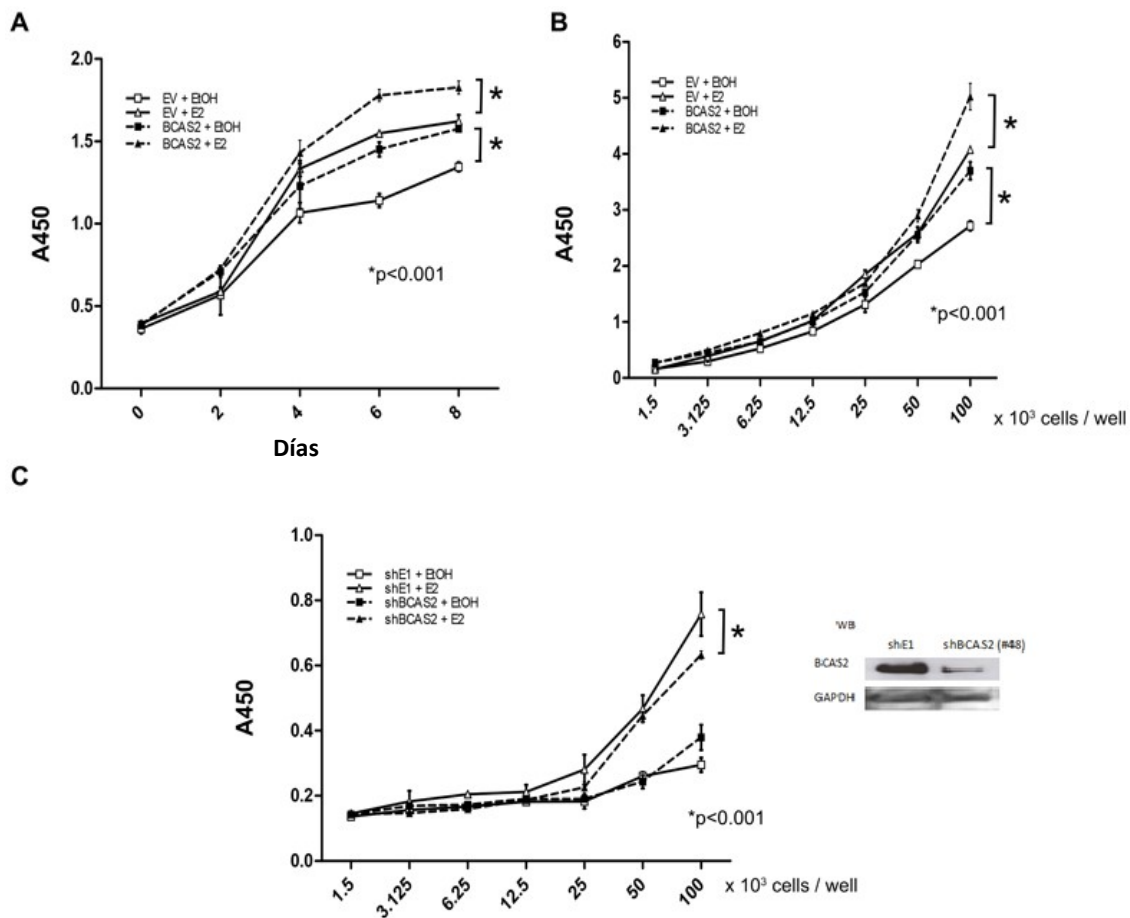


**Figura 15. Efecto de PINX1 sobre la actividad transcripcional del PR y AR.** A) Ensayos de actividad transcripcional de PR en presencia y ausencia de progesterona 10 nM, en células T47D de cáncer de mama que expresan de manera estable un gen reportero de luciferasa con un promotor MMTV. B) Ensayos de actividad transcripcional de AR en líneas celulares de cáncer de próstata, 22Rv1 en presencia y ausencia de DHT 1 nM. Los datos se muestran como Unidades Relativas de Luz (URL) de luciferasa sobre  $\beta$ -galactosidasa. Los ensayos se realizaron por triplicado y las barras indican error estándar. Se muestra un ensayo representativo de por lo menos tres repeticiones de cada ensayo por triplicado.

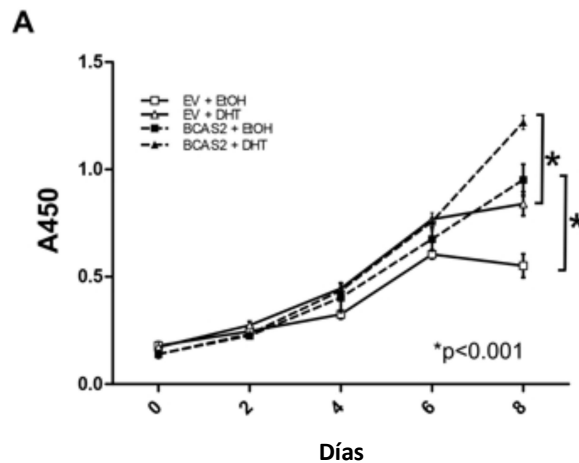
### **BCAS2 afecta la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer hormono-regulado.**

Al sobre-expresarse BCAS2 en células de cáncer de mama (MCF7), se observa un efecto positivo sobre la viabilidad celular, tanto en presencia de  $E_2$  como en ausencia de este ligando, a diferentes concentraciones celulares y tiempos de medición, como se observa en las figuras 16A y 16B. Al inhibir la expresión de BCAS2 mediante RNA de interferencia, se observa el efecto contrario, es decir, disminuye la viabilidad celular de las células MCF7, en presencia o ausencia de  $E_2$  en células MCF7 transfectadas con shRNA-BCAS2 (Fig. 16C).

Ensayos similares se realizaron en células de cáncer de próstata, para poder verificar si BCAS2 al ser un coactivador de receptores hormonales como es el caso de AR, afectaba también en células que son hormono-reguladas por este. Las células 22Rv1, se transfectaron con el plásmido pcDNA-BCAS2 y se mantuvieron en ausencia y presencia de DHT (1nM), durante el tiempo establecido en la metodología, según fuera el tipo de ensayo realizado (Figura 17 A y B). En los resultados de los dos diferentes ensayos observamos de manera similar que BCAS2, afecta la viabilidad de esta línea celular y que al paso del tiempo este efecto se ve más marcado (Fig. 17B).



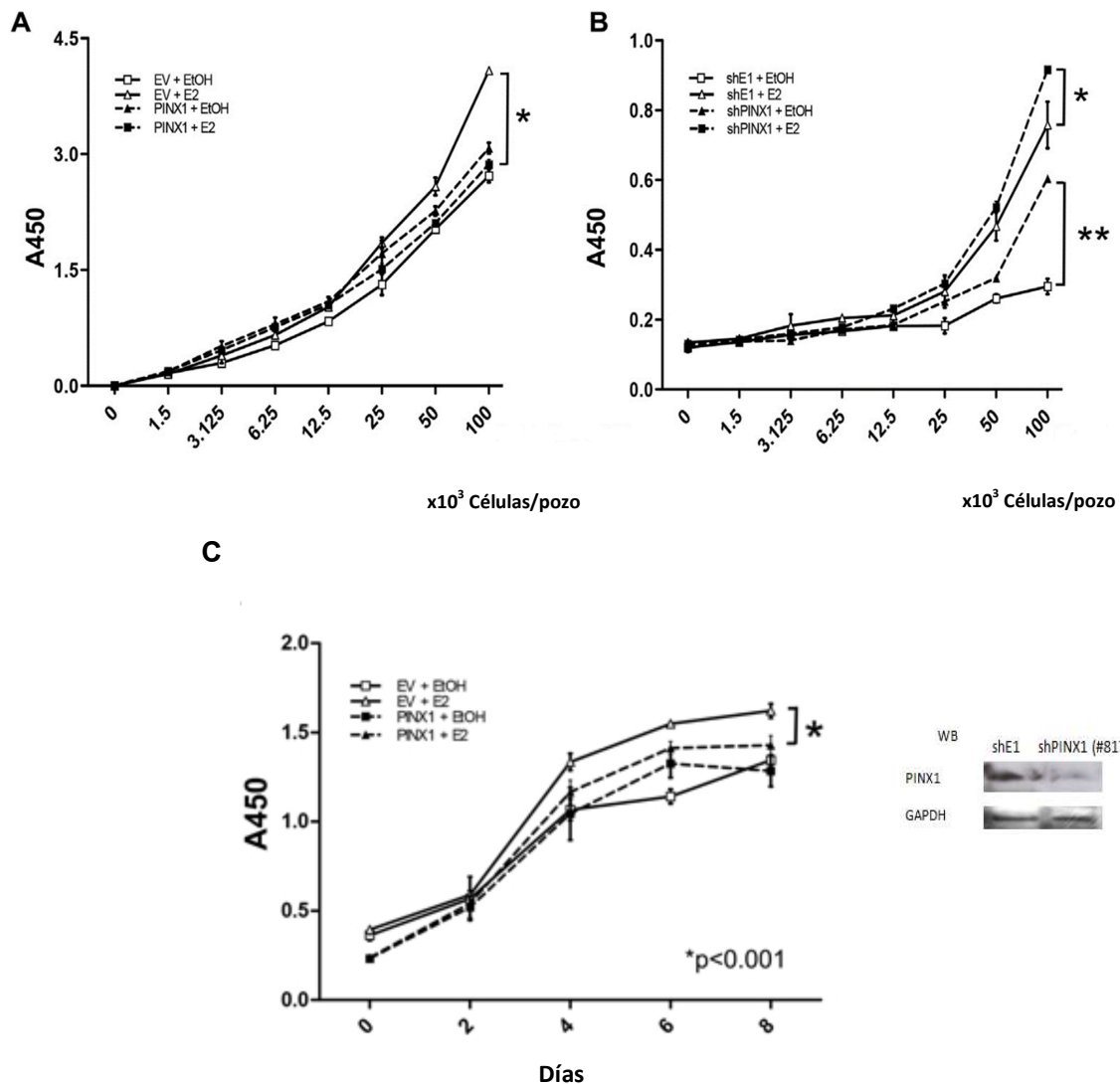
**Figura 16. La sobre-expresión de BCAS2 favorece la viabilidad celular inducida por  $E_2$  en células de cáncer de mama MCF7.** La figura A muestra viabilidad a partir de diferentes diluciones de células, después de 96 horas de crecimiento. B) Viabilidad de células MCF7 al sobre-expresar BCAS2 en función del tiempo, como un acercamiento a la proliferación celular, mostrando un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la proliferación celular entre la viabilidad en presencia y ausencia de la sobre-expresión de BCAS2. C) Se muestra un ensayo de viabilidad inhibiendo la expresión de BCAS2 mediante shRNA con un decremento estadísticamente significativo ( $* p < 0.001$ ). El silenciamiento de BCAS2 fue confirmado por western blot, usando como control un shRNA inespecífico y GAPDH como control. Los ensayos fueron realizados utilizando MTT como marcador de células vivas. Se realizaron comparaciones entre células con o sin transfectar y con o sin  $E_2$  ( $n=4$ ). Las barras de error indican SEM. La estadística se realizó mediante Análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas.



**Figura 17. BCAS2 tiene un efecto positivo sobre la viabilidad de las células de cáncer de próstata.** Se utilizaron células 22Rv1 en presencia de DHT, en relación a los diferentes tiempos de lectura (0, 2, 4, 6 y 8 días). Los ensayos fueron comparados con células sin transfectar con o sin tratamiento (n=6). La sobreexpresión BCAS2 mostró un incremento significativo en el crecimiento (\* P < 0.001), tanto en presencia como en ausencias de DHT, comparado con células no transfectadas con pcDNA-BCAS2. Las barras muestran error estándar.

### **PINX1 afecta la viabilidad celular y la clonogenicidad en líneas celulares de cáncer hormono-regulado.**

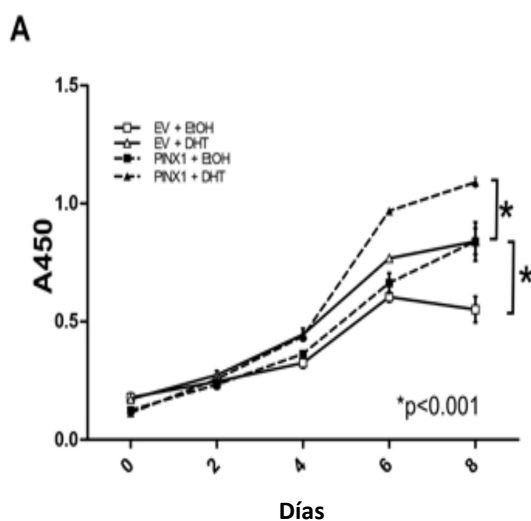
Al sobre-expresarse PINX1 en células de cáncer de mama (MCF7), se observa un efecto negativo sobre la viabilidad celular, tanto en presencia de E<sub>2</sub> como en ausencia de este ligando, a diferentes concentraciones celulares y tiempos de medición, como se observa en la figura 18A y 18B. Al inhibir la expresión de PINX1 mediante RNA de interferencia, se observa el efecto contrario, es decir, se incrementa la viabilidad celular de las células MCF7, en presencia o ausencia de E<sub>2</sub> (Fig. 18C). Dando esto un papel no solo de correpresor de ER $\alpha$  PINX1, si no de afectar el crecimiento de células hormono-reguladas.



**Figura 18. La sobre-expresión de PINX1 disminuye la viabilidad celular inducida por E<sub>2</sub> en células de cáncer de mama MCF7.** La figura A muestra viabilidad a partir de diferentes diluciones de células, después de 96 horas de crecimiento en presencia de E<sub>2</sub>, la sobreexpresión PINX1 mostró una reducción significativa en el crecimiento (\* P <0.001). B) Se muestra un ensayo de viabilidad inhibiendo la expresión de PINX1 mediante shRNA. El silenciamiento de PINX1 fue confirmado por western blot, usando como control un shRNA inespecífico y GAPDH como control. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento celular, tanto en presencia de E<sub>2</sub> (\* P <0.01) en los pozos que contienen 50x10<sup>3</sup> células/pozo o más; como en ausencia de E<sub>2</sub>, en los pocillos que contienen 25 x10<sup>3</sup> células o más (\*\* P <0.001). C) Viabilidad de células MCF7 al sobreexpresar PINX1 en función del tiempo, se observó un decremento en la proliferación celular estadísticamente significativo (\* P<0.01) entre la sobreexpresión de PINX1 y las células no

transfectadas. Los ensayos fueron realizados utilizando MTT como marcador de células vivas. Se realizaron comparaciones entre células con o sin transfectar y con o sin E<sub>2</sub> (n=4). Las barras de error indican SEM. La estadística se realizó mediante Análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas.

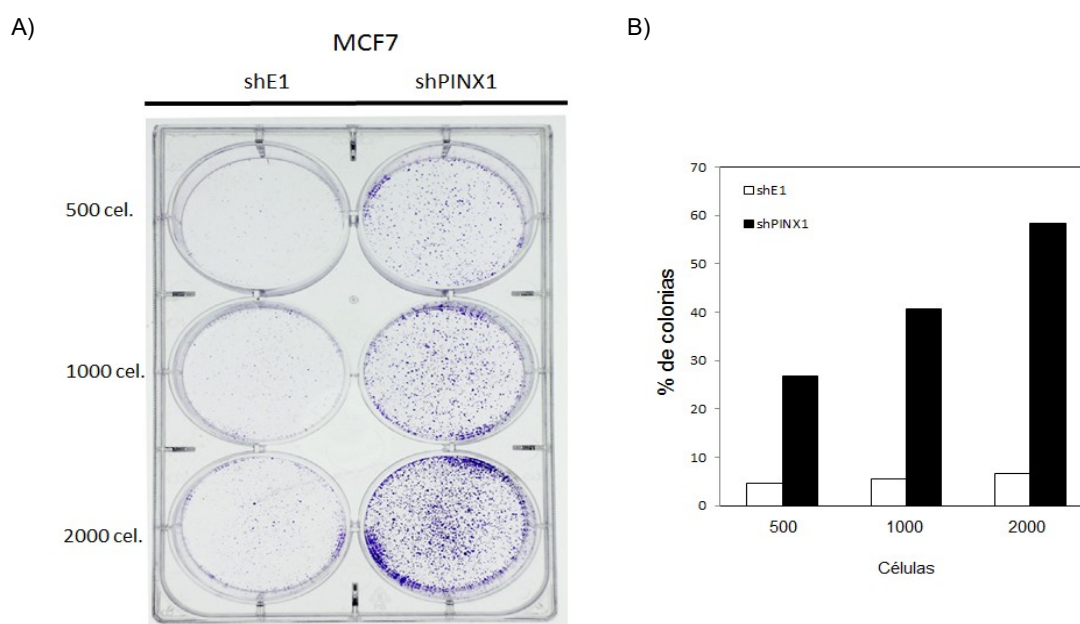
Cuando se realizaron ensayos de viabilidad con células de cáncer de próstata, en presencia y ausencia de DHT, se encontró el efecto contrario. Es decir, se incrementó la viabilidad celular en presencia de PINX1 (Fig. 19A y 19B). Adicionalmente, se observó que PINX1 promueve un incremento en viabilidad aún en ausencia de ligando, sugiriendo que su sobreexpresión podría jugar un papel en la activación de AR bajo estas condiciones.



**Figura 19. PINX1 presenta un efecto positivo sobre la viabilidad de las células de cáncer de próstata.** Se utilizaron células 22Rv1 en presencia de DHT, en relación a los diferentes tiempos de lectura (0, 2, 4, 6 y 8 días). Los ensayos fueron comparados con células sin transfectar con o sin tratamiento (n=6). La sobreexpresión PINX1 mostró un incremento significativo en el crecimiento (\* P < 0.001), tanto en presencia como en ausencias de DHT. Las barras muestran error estándar.

Para cuantificar el potencial de crecimiento a largo plazo de las células MCF7 tras abatir la expresión de PINX1, usamos un ensayo clonogénico. Se sembraron diferentes concentraciones de células en placas de cultivo de 6 pozos

a 37°C y se dejaron crecer durante 10 días. Se compararon células transfectadas con el shRNA de PINX1 o utilizando como control negativo células transfectadas con shE1. La eficiencia de formación de colonias en las células tratadas con shPINX1 presenta un potencial 4 veces mayor al de las células que se utilizaron como control comparativo (transfectadas con shE1) (Fig. 20). Adicionalmente, el tamaño de éstas es mayor en comparación a las células control. Este ensayo corrobora que PINX1, no solo se ve implicado en la proliferación celular de la línea MCF7, sino también en la capacidad que tiene ésta para formar colonias, ya que la delección de la expresión endógena de esta proteína promueve la formación de colonias y por lo tanto esto se correlaciona con malignidad o agresividad tumorigénica.



**Figura 20. La inhibición de la expresión de PINX1, presenta un efecto potenciador sobre la formación de colonias en la línea células MCF7.** A) Ensayo clonogénico en células MCF7. Se transformaron células MCF7 con shPINX1 o shE1, y posteriormente se sembraron 500, 1000 y 2000 células por pozo y las colonias se tiñeron y se contaron después de 10 días. B) Se reporta en forma de gráfica del número de colonias contadas con respecto al número de células sembradas tanto para las transformadas con shPINX1 como las shE1, en donde se observa hasta 4 veces

más la potencialidad de formar colonias cuando está abatida la expresión PINX1, en las diferentes densidades celulares que se usaron en este ensayo.

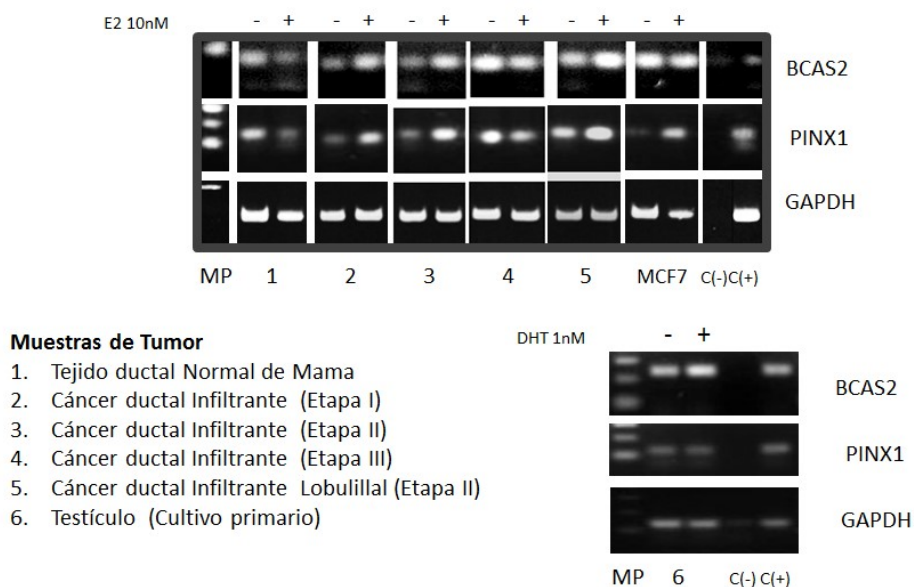
### **BCAS y PINX1, se expresan diferencialmente en líneas primarias de cáncer de mama en diferentes estadios.**

Se cuenta con un acervo de líneas celulares primarias de diferentes estadios de cáncer de mama, que fueron donadas por el Dr. Primitivo Olivera González, y a las cuales sometimos a las mismas condiciones en presencia y ausencia de  $E_2$ , por 48h y posterior extrajimos el mRNA y realizamos un RT-PCR convencional. Los resultados de estos ensayos nos demuestran, que BCAS2 es expresada en todas estas líneas primarias, tanto en presencia, como en ausencia de  $E_2$ , siendo mayor su expresión cuando en el medio está presente esta hormona, comparado al tejido ductal normal. En las células MCF7, se observa una expresión no diferencial al tratamiento y esto puede ser comparado con análisis de expresión producidos a partir de diferentes genotecas de líneas celulares de cáncer de mama (ver Anexo 2 y 3). Los análisis *in silico*, revelaron algunos motivos putativos (AP-1 y Sp-1) en la región promotora que podrían estar relacionados con su expresión (Datos mostrados en Anexo 4).

Por otro lado, al analizar los transcritos de PINX1, se observa que este gen se expresa indistintamente en las muestras de cultivos primarios que fueron tratados en presencia de  $E_2$  a diferencia cuando no se trataron con esta hormona, donde se observa una expresión menor. La expresión de este transcrito, se ve decrementado en ausencia de  $E_2$  en el caso de células estables (MCF7), y hay un aumento en presencia de esta hormona, lo que nos da una orientación hacia que la expresión de PINX1, se ve influenciada por  $E_2$ , lo que concuerda en algunas bases de datos y genotecas (datos observados en el Anexo 2 y 3), de líneas primarias y secundarias de cáncer de mama hormono regulado, tomando en cuenta que la expresión no es significativa, comparando con otros tipos de cáncer (Liao *et al.*, 2000.). El análisis *in silico*, reveló la presencia de algunos sitios putativos de unión a factores de transcripción que responden a estrógenos (AP-1 y



Sp-1), en su región promotora. Adicionalmente, sobre la secuencia de aa, localizamos un parche G y una caja tipo NR (LXXLL) (Datos mostrados en Anexo 4).



**Figura 21. Expresión diferencial de BCAS2 y PINX1, en líneas primarias de cáncer de mama de diferentes estadios.** Se reporta un ensayo de RT-PCR convencional, en líneas primarias de cáncer de mama en diferentes estadios, así como de la línea celular MCF7, transfectada (pcDNA-BCAS2 y pcDNA-PINX1) +/- hormona. El control utilizado tanto en cáncer de mama como de testículo, es el plásmido pcDNA-BCAS2 y pcDNA-PINX1, para verificar el PCR. También se hace uso de una línea primaria de testículo, que se usa como control de tejido externo. Los cultivos celulares se sembraron por duplicado en cajas de 25 cm<sup>2</sup> y se les mantuvo durante 48h en medio DMEM/F12 blanco con sFBS, con y sin E<sub>2</sub> 10nM, al término de este tiempo se extrajo el RNA total con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cDNA se obtuvieron a partir de 100 ng de RNA total utilizando SuperScript VILO cDNA synthesis (Invitrogen) y se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos para BCAS2 y PINX1. Para normalizar estos ensayos se utilizó el mRNA de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

## **DISCUSIÓN**

En los últimos años, ha ido en aumento la cantidad de trabajos reportados en relación a correguladores de receptores nucleares. Estos correguladores interactúan con factores de transcripción al unirse al DNA, jugando así un papel esencial en la acción de estos. Por otra parte, estos correguladores pueden reclutar complejos multiprotéicos que también modulan la transcripción. Los correguladores transcripcionales pueden subdividirse en coactivadores, que median la activación de genes, y correpresores, que median el silenciamiento de genes; o correguladores bifuncionales que pueden hacer las dos cosas. Este estudio tiene como objeto aportar nueva información respecto a dos correguladores que fueron identificados a través de un ensayo de doble híbrido en levaduras, donde se tamizó una genoteca de cáncer de próstata contra la región amino terminal del ER $\alpha$ . Esta búsqueda nos llevó a la identificación de dos proteínas: BCAS2 y PINX1, y por consiguiente nos dimos a la tarea de su identificación molecular.

### **BCAS2**

En una investigación anterior, BCAS2, había sido definido como coactivador de ER $\alpha$  (Qi C *et al.*, 2005). En el presente estudio, se define aún más a la molécula como coactivador de ER y de otros receptores hormonales (PR y AR). Nosotros, después de haber encontrado esta molécula a través de su interacción con la región amino terminal de ER $\alpha$ , demostramos que esta interacción se lleva a cabo de forma directa (en el caso de ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), y que la actividad observada por el grupo de Qi *et al.*, sobre la región carboxilo-terminal, se lleva a cabo de manera indirecta. Nuestros ensayos de pull-down muestran que hay interacción con ER $\alpha$  completo en presencia de E<sub>2</sub>, esto también lo comprobamos a través de Co-inmunoprecipitaciones en células COS7 y HEKT 293, en donde observamos que se une a ER $\alpha$  en ausencia y presencia de E<sub>2</sub> o Tamoxifén, y no solo en presencia de E<sub>2</sub>, como lo habían mencionado Qi y colaboradores en 2005. Realizamos ensayos de actividad transcripcional, similares a los que realizaron estos investigadores, con las regiones amino y carboxilo por separado, para ver cuál era la región necesaria para llevar la actividad coactivadora de ER $\alpha$ , pero en nuestro caso transfectamos células HepG2, donde los dominios que utilizamos que presentan AF-1 y

AF-2 actúan de manera independiente, lo cual no pasa en cualquier tipo celular, como es el caso de COS7 (Thompson *et al.*, 2003; Mérot *et al.*, 2004). Nosotros observamos que existe una relación proporcional entre el incremento de la actividad de AF-1 y el incremento de BCAS2. El mismo fenómeno se observa sobre AF-2, solo en presencia de ligando (Fig. 7B). Como control positivo para comparación utilizamos SRC-1 que potencia ambas funciones de la activación transcripcional de ER $\alpha$  (Benecke, 2000; Sheppard *et al.*, 2001; Garcia-Becerra *et al.*, 2010). Además, debido a que BCAS2 carece del motivo LXXLL típico encontrado en la mayoría de correguladores de los receptores nucleares (Heery. *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2012), especulamos que la interacción ocurre a través de un motivo hasta ahora no identificado (He y Wilson 2003; Kim *et al.*, 2003; Lonard *et al.*, 2007).

Los coactivadores se caracterizan por potencializar la actividad transcripcional, en este caso de los receptores hormonales. Nosotros realizamos varios ensayos de transactivación de ER $\alpha$ , para confirmar lo que ya se había reportado en trabajos anteriores (Qi, *et al.*, 2005 y Kuo *et al.* 2009), pero llevándolo a cabo en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, tanto en aquellas que expresan o no endógenamente el receptor de estrógenos, obteniendo como resultado la misma tendencia en todos los casos, un aumento en la activación transcripcional del receptor. Esto reafirma que esta proteína participa en la regulación estrogénica, llevando a la pregunta, ¿BCAS2, es capaz de afectar la actividad transcripcional de otros receptores hormonales?, así que, también realizamos transfecciones transitorias en células de cáncer de próstata y una línea de cáncer de mama que expresa al RP y contiene un promotor MMTVLuc, que responde a Progesterona. Los resultados fueron afirmativos, ya que BCAS2, resulto funcionar también como coactivador de AR, en líneas de cáncer de próstata (no todos los datos se muestran) y PR, tanto en presencia como en ausencia de sus ligandos agonistas y antagonistas (Fig. 6 y 14), y en ambos casos se observó un aumento en esta actividad transcripcional de los receptores, mayor o similar a la que tiene SRC1 sobre estos receptores, en presencia de su ligando agonista. Esto se reportó muy recientemente por (Kuo, *et al.*, 2015) que proponen a BCAS2 como un estabilizador de AR), pero es la primera vez que se demuestra que es un coactivador de AR y PR. Sin embargo, es importante demostrar si esta interacción es directa o a través de otras proteínas.

Se demostró que la sobreexpresión de BCAS2 estimula la expresión de genes estrógeno-regulados como C3, IGF2BP2, pS2 y CTSD, tanto en presencia como en ausencia de E<sub>2</sub>, y no como se observa con el gen CASP8, que solo se ve afectado al sobre expresar a BCAS2, en ausencia de E<sub>2</sub>. La elección de estos genes blancos fue basada en la presencia de ERE, en sus promotores, así como su papel fisiológico en la generación y progresión del cáncer de mama (Jeltsch *et al.*, 1987; Weisz y Bresciani., 1988; Augereau *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1997; Liu J, *et al.*, 2007; Peters *et al.* 2009). Esto sugiere que BCAS2 es un importante regulador de genes inducidos por E<sub>2</sub> en células de mama, a través de ER. Para saber si esta interacción se llevaba a cabo sobre promotores naturales, realizamos ensayos de ChIP, observando que al menos en los promotores de los genes pS2, E2F2, WISP2 y CREB1, se posicionan tanto el receptor ER $\alpha$ , como BCAS2 a los primeros 10 minutos y que esto se va incrementando al tiempo de exposición con E<sub>2</sub>. El reclutamiento en promotores con ERE, se ha estudiado de manera sistemática, resultado de la observación de varios trabajos, en donde se comprueba el reclutamiento inicial de coactivadores junto con otras proteínas que incrementan la actividad transcripcional de ER (Perissi *et al.*, 2004, Zwart. *et al.*, 2011, Foulds *et al.*, 2013), por lo que podemos contribuir con este trabajo, que BCAS2, es una de esas proteínas reclutadas en un corto lapso de tiempo, junto con ER $\alpha$ . Este proceso fue realizado en estado de cromatina laxa, lo cual fue monitoreado utilizando una marca de cromatina abierta, la cual también fue aumentando a lo largo del lapso de tiempo establecido.

Ensayos de transfección transitoria demostraron que la sobreexpresión de BCAS2 produjo un aumento significativo en la transactivación de ER $\alpha$  y la proliferación mediada por estrógenos en todas las líneas celulares ensayadas. En contraste, el knockdown con shRNA redujo la proliferación mediada por estrógenos en la línea celular MCF7. También realizamos ensayos de proliferación mediados por andrógenos en dos líneas de cáncer de próstata, aquí se reportan los resultados obtenidos en la línea celular 22Rv1, las cuales aumentaban su proliferación en presencia de DHT y esto se aumenta más al sobreexpresar a BCAS2, de manera estadísticamente significativa.

En varios trabajos se ha demostrado que BCAS2 se encuentra amplificado y se sobreexpresa en tumores de mama (Nagasak., *et al.*, 1999; Worsham *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2014) y que esto podría influir en la resistencia de tamoxifén, como sucede con otros coactivadores (Schiff *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2009; Nagalingam *et al.*, 2012; Redmond *et al.*, 2015), y por lo tanto la sobreexpresión de BCAS2 impactaría en el entorno fisiológico de las células de mama dependientes de estrógenos. En este estudio, mostramos que al sobreexpresar BCAS2, la proliferación y la expresión de algunos genes se incrementan aún en ausencia de ligando, lo cual podría apoyar esta teoría. Sin embargo, esta es una hipótesis que aún necesita ser apoyada por una investigación independiente más profunda. Ensayos de RT-PCR, fueron realizados a partir de diferentes cultivos primarios de biopsias de cáncer de mama de diferentes estadios y orígenes, dando como resultado una sobre expresión del transcripto de BCAS2, tanto en ausencia como en presencia de E2, siendo mayor en esta última condición, comparada con tejido normal (Fig 21, carril 1). No se observó una variación significativa entre las diferentes muestras y etapas de cáncer de mama, por lo que es necesario incrementar el número de muestras, para poder asegurar que no hay una diferencia. Estos resultados confirman la importancia fisiológica de BCAS2 y confirman el claro papel que juega sobre la actividad de ER y sobre otros receptores hormonales, como AR y PR.

### **PINX1**

La identificación y caracterización de correguladores que modulan la actividad del ER $\alpha$ , es un paso crucial en el entendimiento, no solo de los mecanismos que controlan la expresión de genes estrógeno-regulados, sino de los mecanismos que controlan la progresión del cáncer de mama. En este estudio, hemos identificado una función novedosa para PINX1 como un correpresor del ER $\alpha$ . Siendo una proteína que se ha caracterizado previamente como un inhibidor de la telomerasa (Banik y Contra, 2004; Cheung *et al.*, 2012), PINX1 se ha propuesto como supresor de tumores en una serie de tumores epiteliales, incluyendo hepáticos (Liao *et al.*, 2000.), mama (Shi *et al.*, 2014a), esófago (Zuo *et al.*, 2013), próstata (Shi *et al.*, 2014b), etc.

Se utilizaron varios métodos para confirmar la interacción de PINX1 con ER $\alpha$ . Nuestros datos demuestran que PINX1 interactúa directamente con ER $\alpha$  en presencia de E $_2$ , y que esta interacción se realiza exclusivamente vía la región N-terminal. Adicionalmente, los resultados de nuestros ensayos de interacción *in vitro* demuestran que interactúa con el mismo dominio del ER $\beta$ . Esto nos sugirió que podría tener un efecto sobre otros receptores de hormonas esteroides, aún cuando la región N-terminal muestra la mayor variabilidad entre miembros de la superfamilia de RN. En general, no se tiene un conocimiento claro sobre motivos de interacción de correguladores con las regiones N-terminales de los SHR, sino que se ha propuesto que estas interacciones dependen de la configuración tridimensional de las proteínas que pudieran ser similares entre los diversos receptores, aún cuando las secuencias sean muy divergentes. Sin embargo, el hecho de que los ensayos de CoIP muestran la interacción adicional en ausencia de ligando o la presencia de TAM sugieren que dentro de un contexto celular, la interacción puede ser promovida o estabilizada bajo estas circunstancias, permitiendo a PINX1 tener un impacto de la actividad del receptor. Esto podría ser a través de aportaciones de otras proteínas correguladoras o de modificaciones post-traduccionales.

Nuestros resultados evidencian que PINX1 tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional del ER $\alpha$ . Los ensayos de transactivación, tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en líneas heterólogas, muestran una clara inhibición de la actividad transcripcional mediada por este receptor, lo cual se refleja en una disminución en el RNA mensajero de varios genes regulados por E $_2$ , como son pS2, PR, c-Myc, CTSD y Caspasa 8. Curiosamente, la expresión del RNAm de dos de estos genes, pS2 y CTSD, también se inhibió en ausencia de ligando. Esto sugiere que la configuración específica del promotor del receptor o sus interacciones con otros correguladores puede modular la unión PINX1 y la actividad en ausencia de E $_2$ . Adicionalmente, observamos que la inhibición de la transactivación mediada por ER $\alpha$ , no sólo se lleva a cabo mediante la región que contiene AF-1, sino que también afecta la transactivación mediada por AF-2 en presencia de ligando. Los datos sugieren que además de interactuar directamente con la región N-terminal, PINX1 es capaz de modular indirectamente a AF-2, probablemente reclutado por medio de otros correguladores. Se sabe que las funciones de transactivación AF-1 y AF-2 pueden actuar de manera independiente o sinérgica, dependiendo del contexto celular y del promotor. Existen varios coactivadores, como

SRC-1 y TIF2, que actúan sobre ambas regiones de transactivación y promueven el sinergismo entre estas regiones (Benecke, 2000). Sin embargo, parece que la inhibición de la función dependiente de ligando AF-2 puede ser indirecta, ya que no observamos una interacción directa de PINX1 con el dominio de unión a ligando *in vitro*.

Adicionalmente, se muestra que PINX1 ha sido reclutado sobre los promotores de genes blanco después de 1 h de tratamiento con  $E_2$ , lo que sugiere que puede estar involucrado en la interrupción de la actividad de algunos corre reguladores en promotores blanco o en la finalización de la transcripción de genes previamente activados. Un número de complejos corre presores se han visto implicados en el silenciamiento de actividades, uniéndose en tiempos similares durante el ciclo de la transcripción, tales como aquellos en el complejo NuRD, que recluta HDACs al promotor diana, o un complejo SWI / SNF-HDAC (Perissi *et al.*, 2010; Merrell *et al.*, 2011; Metivier *et al.*, 2003). Bajo este esquema, la inactivación de estas moléculas puede llevar a la sobreexpresión de genes hormono-regulados involucrados en crecimiento y proliferación, mientras que su sobreexpresión inhibiría este crecimiento. El mecanismo mediante el cual PINX1 inhibe la actividad del  $ER\alpha$ , no se ha dilucidado, sin embargo, este pudiera ser un mecanismo de acción de PINX1 que será necesario investigar. El mecanismo directo a través del cual PINX1 ejerce su efecto represivo está relacionado a la unión de este con  $ER\alpha$ ; por lo tanto, será importante determinar qué otras proteínas son reclutadas con PINX1 a los promotores de blanco, y cómo interactúa con otros coactivadores y corre presores en el complejo. La inactivación de estas moléculas represivas, como se ha encontrado en muchos tumores de mama, podría dar lugar a la sobreexpresión de genes regulados por estrógenos implicados en el crecimiento y la proliferación, mientras que su sobreexpresión daría lugar a la inhibición del crecimiento.

Al estudiar los efectos de PINX1 sobre la actividad transcripcional de otros receptores hormonales, encontramos que PINX1 regula positivamente la actividad del PR y AR. Esto sugiere que es un corre regulador diferencial de receptores de hormonas esteroides, siendo corre presor del  $ER\alpha$  y coactivador de AR y PR. Este efecto se confirmó en los estudios de proliferación celular andrógeno-regulada en células de cáncer de próstata, donde observamos que la sobreexpresión de PINX1 incrementa la proliferación

en presencia de DHT. Conforme ha incrementado nuestro conocimiento sobre los correguladores de receptores nucleares, se ha hecho más importante el estudiar el contexto celular de sus actividades. Como ejemplo, se ha reportado que la proteína SMILE inhibe al ER $\alpha$  de manera dependiente del contexto celular (Xie, 2008) y es un correpresor del receptor de glucocorticoides (GR) y HNF4, pero utiliza mecanismos distintos para la represión de estos receptores nucleares (Xie, 2009). Adicionalmente, es un coactivador del factor de transcripción ATF. Por otra parte, Peterson *et al.*, encontraron que el correpresor SMRT, pero no NCoR, puede incrementar la actividad transcripcional del ER $\alpha$  en presencia de E<sub>2</sub>, mientras que potencia el efecto inhibitorio de tamoxifén, dependiendo del contexto celular. Este es un papel completamente novedoso e inesperado de SMRT cuyo mecanismo no está completamente dilucidado.

Otros correguladores bifuncionales que pueden actuar tanto como coactivadores como correpresores de NRs también se han reportado recientemente, y los ejemplos incluyen una proteína de dedos de zinc de ratón, un regulador de la apoptosis y detención del ciclo celular (ZAC1) (Huang y Stallcup, 2000); proteína que interactúa con Ski (SKIP) (Leong *et al.*, 2004); y RIP140 (Augereau *et al.*, 2006). La evidencia sugiere que no sólo es importante el intercambio de coactivadores y correpresores en los promotores (Perissi *et al.*, 2004), si no que pueden coexistir dos tipos de proteínas en el mismo complejo junto con el receptor (McKenna y O'Malley, 2002). En este sentido, se ha observado una interacción entre NCoR y SRC-3, donde NCoR facilita el reclutamiento del coactivador al receptor de hormona tiroidea en ausencia de ligando, esencialmente formando un complejo activador (Li X *et al.*, 2002). Además, SMRT y SRC-3 pueden formar un complejo trimérico con ER $\alpha$  unido a E<sub>2</sub>, para activar genes regulados por este receptor (Karmakar *et al.*, 2010). Esto sugiere que el contexto celular y el complejo proteico asociado al receptor juegan un papel crítico en el resultado funcional.

El papel que PINX1 podría tener en cáncer de mama se comenzó a dilucidar mediante ensayos de viabilidad celular donde observamos que la sobreexpresión de PINX1 inhibe la proliferación celular estrógeno-regulada de células MCF-7, mientras que su inactivación, mediante shRNA, incrementa significativamente la proliferación de éstas células, mediante la influencia que tiene al incrementar la actividad transcripcional de ER $\alpha$



como se observa en la figura 8F. Adicionalmente, la inhibición de PINX1 promueve la formación de colonias, lo cual sugiere que su expresión podría ser de buen pronóstico para la agresividad y malignidad de tumores mamarios. Esto se apoya en el hecho de que varios grupos han observado que los niveles de PINX1 se encuentran reducidos en tumores y líneas celulares de mama (Zhou *et al.*, 2011) tumores gástricos (Kondo, *et al.*, 2005) y de hígado (Liao *et al.*, 2000). Esta inhibición de PINX1 en tumores de mama, no solo promueve la inhibición de la telomerasa y la inestabilidad cromosómica (Zhou *et al.*, 2011), sino que nuestros datos sugieren que también está involucrado en promover el crecimiento hormono-regulado. Esto es apoyado por la evidencia recientemente publicada por Shi *et al.*, (2014a) donde muestran que la sobreexpresión de PINX1 inhibe el crecimiento y clonogenicidad de las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-549 (Shi *et al.*, 2014a).

Demostramos que la supresión de PINX1 por shRNA, incrementa la formación de colonias en células MCF7, lo que sugiere que la expresión de PINX1 puede ser un marcador de menor agresividad del tumor de mama y de malignidad. Esto ha sido apoyado por una serie de documentos que muestran que los niveles de PINX1 se reducen en los tumores y líneas celulares de cáncer de mama (Zhou *et al.*, 2011) y los tumores gástricos (Wang *et al.*, 2010). Parece que las acciones de PINX1 son muy variadas. En el cáncer de mama, no sólo puede promover la inhibición de la actividad de la telomerasa, sino también la inestabilidad cromosómica (Zhou *et al.*, 2011). Por otra parte, Wang y colaboradores, sugirieron que PINX1 inhibe la actividad de la telomerasa en células de cáncer gástrico, tanto de forma directa, como a través de la inducción de la vía Mad1 / c-Myc (Wang *et al.*, 2010). Esto es consistente con nuestros hallazgos que PINX1 inhibe la expresión de c-Myc ER $\alpha$  dependiente. En otro trabajo se demostró que en carcinoma urotelial, PINX1 regula la proliferación de estas células a través de modular la expresión de p16 y ciclina D1. Los datos mostraron regulación a la baja de la ciclina D1 cuando PINX1 está sobre expresado, sabiéndose previamente que este es un gen diana de la activación transcripcional de ER $\alpha$  (Liu *et al.*, 2013), lo que concuerda con los hallazgos hechos por nuestro grupo. En resumen, se describe un mecanismo diferente y novedoso por el cual PINX1 puede actuar como un supresor de tumores en las células de cáncer de mama ER $\alpha$  positivas. Es probable que la baja expresión de PINX1 en tumores de mama no sólo afecte a la activación de la telomerasa, sino que también puede afectar

indirectamente la proliferación, debido a que no regularía negativamente la expresión de genes blancos dependientes de estrógeno que regulen esta propiedad de las células tumorigénicas. La inhibición de PINX1 puede ser, en parte, responsable del desarrollo y / o la progresión de cáncer de mama humano.

La complejidad y a la vez la sutileza en cómo se lleva a cabo la transcripción de genes, no se puede ver de una forma plana y en papel, ya que es un sistema interactivo, donde se ven involucrados factores internos como externos en diferentes contextos tanto celulares, como circunstanciales. Al tomar una pequeña imagen de este proceso dinámico de la transcripción de genes que responden a hormonas sexuales y ubicarnos en el papel que pueden tener trascendentalmente los coactivadores y correpresores, nos damos cuenta que la regulación ingeniosa y aguda de estos factores, provocan cambios importantes en la transcripción de genes blancos y por lo tanto hasta un cambio fenotípico, como puede ocurrir en un proceso cancerígeno, es decir, el cáncer al ser un proceso de malignidad multifactorial, puede ser influenciado, por la presencia o ausencia de este tipo de proteínas correguladoras, que pueden interaccionar directa o indirectamente con los receptores hormonales, los cuales están involucrados como factores en el proceso de malignidad en cánceres hormono-regulados en sus primeras etapas., Debe existir un equilibrio entre coactivadores y correpresores en el proceso transcripcional, para evitar efectos secundarios, como puede ser la desregulación del crecimiento. Este trabajo tiene la finalidad de dar a conocer dos de los muchos correguladores de los receptores hormonales, y tratando de exhortar a que se tomen en cuenta en un futuro no muy lejano para seguimiento en etapas primarias de cáncer y en algún momento como auxiliares en el diagnóstico.

## **CONCLUSIONES**

BCAS2, ha sido estudiado como un corregulador de receptores hormonales (ER y AR), pero no había quedado muy claro de cómo ocurría esta interacción, por lo que nos dimos a la tarea de estudiar dichas interacciones y observamos que esta proteína coactivadora se une a ER $\alpha$  y ER $\beta$  a través de su región amino y que el incremento sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , es incluso mayor en muchos casos que el que presenta SRC-1, en diferentes líneas celulares. Adicionalmente incrementa la actividad de AR y promueve la proliferación celular dependiente de andrógenos. Siendo este trabajo una contribución al papel que juega BCAS2 sobre ER y AR, y aunado a esto una nueva propuesta como un coactivador sobre la actividad transcripcional de PR, lo cual abriría un nuevo panorama para estudiar esta posible interacción en un futuro.

Hemos encontrado un papel novedoso para PINX1 como un corregulador diferencial de receptores de hormonas esteroides, funcionando como un correpresor de ER $\alpha$  que inhibe la proliferación estrógeno-regulada en células de cáncer de mama y como un coactivador de AR y PR, incrementando la proliferación andrógeno regulada de células de cáncer de próstata. Va a ser muy interesante dilucidar los mecanismos mediante los cuales ejerce esta actividad y como se correlacionan con la proliferación celular y su posible papel como gen supresor de tumores. Aunado a su función como inhibidor de la telomerasa y el hecho de que su expresión se encuentra reprimida en varios tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama, se hace importante estudiar más a fondo sus mecanismos de acción y su regulación ya que su activación podría ser una herramienta poderosa para utilizarse como agente terapéutico dual en contra el cáncer de mama.

## REFERENCIAS

- Amir E, Freedman OC, Seruga B y Evans DG. (2010) Assessing women at high risk of breast cancer: a review of risk assessment models, *J. Natl. Cancer Inst.* 102:680–691.
- Augereau P, Miralles F, Cavallès V, Gaudalet C, Parker M, Rochefort H. (1994) Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Mol Endocrinol.* 8(6):693-703.
- Augereau P, Badia E, Carascossa S, Castet A, Fritsch S, Harmand PO, et al., (2006). The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl. Recept Signal* 30, 4:e024.
- Aranda A y Pascual A (2001) Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Rev* 81 (3):1269-1304.
- Bai J, Chen YS, Mei PJ, Liu QH, Du Y, Zheng JN. (2015). PinX1 is up-regulated and associated with poor patients' survival in gliomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 1;8(6):6952-9.
- Banik SS y Counter CM. (2004) Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *J Biol Chem.* 279(50):51745-48.
- Benecke A, Chambon P y Gronemeyer H. (2000) Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.* 1(2):151-157.
- Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9:2811–2812
- Buchholz TA, Weil MM, Story MD, Strom EA, Brock WA, McNeese MD. (1999). Tumor suppressor genes and breast cancer. *Radiat Oncol Investig.* 7(2):55-65.
- Cai MY, Zhang B, Yang GF, Rao HL, Rao ZY, Wu QL, Guan XY, Kung HF, Zeng YX, Xie D. (2010) Decreased expression of PinX1 protein is correlated with tumor development and is a new independent poor prognostic factor in ovarian carcinoma. *Cancer Sci.* 101(6): 1543-1546.
- Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C (2003) Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagnostic Molecular Pathology* 12:27–34.
- Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. (2003) Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 97(3):545-553.
- Cheung DH, Kung HF, Huang J., Shaw PC, (2012) PinX1 is involved in telomerase recruitment and regulates telomerase function by mediating its localization. *FEBS Lett.* 586, 3166e3171.

- Costa S-D, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M (2002) Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer-results of the analysis of 670 patients with 11 years follow-up. *Eur J Cancer* 38(10):1329-1334.
- Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. (2000) Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5):287-96.
- Deng W, Jiao N, Li N, Wan X, Luo S, Zhang Y. (2015). Decreased expression of PinX1 protein predicts poor prognosis of colorectal cancer patients receiving 5-FU adjuvant chemotherapy. *Biomed Pharmacother.* 73:1-5.
- Dobrzycka KM, Townson SM, Jiang S y Oesterreich S (2003) Estrogen receptor corepressors – a role in human breast cancer? *Endoc Relat cancer* 10:517-536.
- Fan JD, Wagner BL, McDonnell DP. (1996) Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol.* 10(12):1605-16. Erratum in: *Mol Endocrinol* 1997 Mar;11(3):341.
- Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N, Mader S, Han VKM, Yang X-J, White JH (2003) Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and –independent mechanisms. *Mol Cell.* 11:139–150.
- Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. (2006) Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 12:6359-6366.
- Foster JS, Henley DC, Bukovsky A, Seth P, Wimalasena J (2001) Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: Regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Mol Cell Biol.* 21:794-810.
- Foulds CE, Feng Q, Ding C, Bailey S, Hunsaker TL, Malovannaya A, Hamilton RA, Gates LA, Zhang Z, Li C, Chan D, Bajaj A, Callaway CG, Edwards DP, Lonard DM, Tsai SY, Tsai MJ, Qin J, O'Malley BW. (2013) Proteomic analysis of coregulators bound to ER $\alpha$  on DNA and nucleosomes reveals coregulator dynamics. *Mol Cell.* 51(2):185-99.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.*; 1(5):2315-9.
- Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. (2003) Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 144(10):4562-74.

- Fritah A, Redeuilh G, Sabbah M. (2006) Molecular cloning and characterization of the human WISP-2/CCN5 gene promoter reveal its upregulation by oestrogens. *J Endocrinol.* 191(3):613-24.
- Fritah A, Christian M, Parker MG. (2010) The metabolic coregulator RIP140: an update. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(3):E335-40.
- Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill J.J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81(24):1879-1886.
- García-Becerra R, Berno V, Ordaz-Rosado D, Sharp ZD, Cooney AJ, Mancini MA, Larrea F (2010) Ligand-induced large-scale chromatin dynamics as a biosensor for the detection of estrogen receptor subtype selective ligands. *Gene.* 458(1-2):37-44.
- Glaros S, Atanaskova N, Zhao C, Skafar DF, Reddy KB (2006). Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen. *Mol Endocrinol.* 20(5):996-1008.
- Globocan 2008 y 2012. International Agency for Research on Cancer. <http://www-dep.iarc.fr>.
- Gustafsson JA y Warner M. (2000) Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5):245-8.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol Chem* 276(40):36869-36872.
- Han SJ, Lonard DM, O'Malley BW. (2009) Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications, *Trends Endocrinol. Metab.* 20:8–15.
- Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Colditz GA, Hunter DJ, Spiegelman D, Barbieri RL, Speizer FE. (1998) Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 90(17):1292-1299,
- Hankinson SE, Colditz GA y Willett WC (2004) Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res.* 6:213–218.
- He Y, Szapary D, Simons Jr SS (2002) Modulation of induction properties of glucocorticoid receptor-agonist and -antagonist complexes by coactivators involves binding to receptors but is independent of ability of coactivators to augment transactivation. *J Biol Chem* 277:49256–49266.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 387 (6634):733-6.

- Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J, Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A. (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, *Physiol. Rev.* 87:905–931.
- Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Morr CA, Chamness CC, Osborne CK, Clark GM (1998) Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52(1):227-237.
- Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurbide E (1986) Responses to estradiol in human endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa) *J Steroid Biochem.* 24:85-89.
- Howell A (2008) The endocrine prevention of breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 22(4):615-23.
- Huang SM, Stallcup MR. (2000). Mouse Zac1, a transcriptional coactivator and repressor for nuclear receptors. *Mol. Cell Biol.* 20, 1855e1867.
- Huang P., Chandra V, Rastinejad F. (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics, *Annu. Rev. Physiol.* 72:247–272.
- Jeltsch JM, Roberts M, Schatz C, Garnier JM, Brown AM, Chambon P. (1987) Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. *Nucleic Acids Res.* 15(4):1401-14.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray TC, Thun MJ (2008) Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 58:71-96.
- Jensen E.V., Jacobson H.I., Walf A.A., Frye C.A., (2010) Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches, *Physiol. Behav.* 99; 151–162.
- Jeong KW, Chodankar R, Purcell DJ, Bittencourt D, Stallcup MR. (2012) Gene-Specific Patterns of Coregulator Requirements by Estrogen Receptor- $\alpha$  in Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol.* 26(6):955-966.
- Jepsen K, Hermanson O, Onami TM, Gleiberman AS, Lunyak V, McEvelly RJ, Kurokawa R, Kumar V, Liu F, Seto E, Hedrick SM, Mandel G, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG (2000) Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 102:753–763.
- Kampa M, Pelekanou V, Notas G, Stathopoulos EN y Castanas E (2013) The estrogen receptor: two or more molecules, multiple variants, diverse localizations, signaling and functions. Are we undergoing a paradigm-shift as regards their significance in breast cancer? *Hormones* 12(1):69-85.
- Karmakar S, Gao T, Pace MC, Oesterreich S, Smith CL. (2010) Cooperative activation of cyclin D1 and progesterone receptor gene expression by the SRC-3 coactivator and SMRT corepressor. *Mol. Endocrinol.* 24, 1187e1202.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. (1995). Activation of

the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 270(5241):1491-94.

- Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2(5):335-44.
- Kim K, Thu N, Saville B, Safe S. (2003) Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. May;17(5):804-17.
- Kondo T, Oue N, Mitani Y, Kuniyasu H, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H, Yasui W. (2005) Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*.;24(1):157-64.
- Kumar R y Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64:310–319.
- Kumar R y Thompson EB (2003) Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions *Mol Endocrinol* 17:1-10.
- Kuo PC, Tsao YP, Chang HW, Chen PH, Huang CW, Lin ST, Weng YT, Tsai TC, Shieh SY, Chen SL. (2009). Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor. *Cancer Res*.69(23):8877-85.
- Kuo PC, Huang CW, Lee CI, Chang HW, Hsieh SW, Chung YP, Lee MS, Huang CS, Tsao LP, Tsao YP, Chen SL. (2015). BCAS2 promotes prostate cancer cells proliferation by enhancing AR mRNA transcription and protein stability. *Br J Cancer*.;112(2):391-402.
- Lacroix M, Toillon R-A, Leclercq G (2004) Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocr. Relat. Cancer* 11:497–522.
- Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, Wellstein A y Riegel AT (2009) The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 116(2): 225–237.
- Leong GM, Subramaniam N, Issa LL, Barry JB, Kino T, Driggers PH, Hayman MJ, Eisman JA, Gardiner EM. (2004) Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(4):1070-6.
- Li HL, Han L, Chen HR, Meng F, Liu QH, Pan ZQ, Bai J, Zheng JN. (2015). PinX1 serves as a potential prognostic indicator for clear cell renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis by suppressing MMP-2 via NF-κB-dependent transcription. *Oncotarget*.. [Epub ahead of print]



- Li N, Yuan K, Yan F, Huo Y, Zhu T, Liu X, Guo Z, Yao X. (2009). PinX1 is recruited to the mitotic chromosome periphery by Nucleolin and facilitates chromosome congression. *Biochem Biophys Res Commun.* ;384(1):76-81.
- Li X, Kimbrel EA, Kenan DJ, McDonnell DP. (2002) Direct Interactions between corepressors and coactivators permit the integration of nuclear receptor-mediated repression and activation. *Mol Endocrinol.* 16:1482-91.
- Liao C, Zhao M, Song H, Uchida K, Yokoyama KK, Li T. (2000) Identification of the gene for a novel liver-related putative tumor suppressor at a high-frequency loss of heterozygosity region of chromosome 8p23 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 32: 721-727.
- Liao C, Zhao MJ, Zhao J, Song H, Pineau P, Marchio A, Dejean A, Tiollais P, Wang HY, Li TP. (2003) Mutation analysis of novel human liver-related putative tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003 9(1):89-93.
- Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (2002) Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7940–7944.
- Liu J, Li J, Sidell N. (2007) Modulation by phenylacetate of early estrogen-mediated events in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* Feb;59(2):217-25.
- Liu JY, Qian D, He LR, Li YH, Liao YJ, Mai SJ, et al. (2013). PinX1 suppresses bladder urothelial carcinoma cell proliferation via the inhibition of telomerase activity and p16/cyclin D1 pathway. *Mol. Cancer* 12, 148.
- Lonard DM y Smith CL. (2002) Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. *Steroids.* 67(1):15-24.
- Lonard DM, Lanz RB, O'Malley BW. (2007) Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocr Rev.* 28(5):575-87.
- López Mendoza L, Méndez Martínez M A. (2008) Detección oportuna de CaMa en la consulta externa (clínica de mama) del Hospital Regional General Ignacio Zaragoza. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 13(Supl 2):45-49.
- Louie MC, McClellan A, Siewit C, Kawabata L. (2010) Estrogen receptor regulates E2F1 expression to mediate tamoxifen resistance. *Mol Cancer Res.* 8(3):343-52.
- Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG. (1983) Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res* 43(6):2985-2990.
- McKenna NJ y O'Malley BW (2002) Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell* 108:465–474.
- Mérot Y, Métivier R, Penot G, Manu D, Saligaut C, Gannon F, Pakdel F, Kah O, Flouriot G. (2004). The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2

transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem.*;279(25):26184-91.

- Merrell KW, Crofts JD, Smith RL, Sin JH, Kmetzsch KE, Merrell A, Miguel RO, Candelaria NR, Lin CY (2011) Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncogene*. 30(13):1608-14.
- Nagalingam A, Tighiouart M, Ryden L, Joseph L, Landberg G, Saxena NK, Sharma D. (2012) Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis*. 33(4):918-30.
- Nagasaki K, Maass N, Manabe T, Hanzawa H, Tsukada T, Kikuchi K, Yamaguchi K. (1999). Identification of a novel gene, DAM1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett.*;140(1-2):219-26.
- Nguyen HD, Phan TT, Carraz M, Brunsveld L. (2012) Estrogen receptor  $\alpha/\beta$ -cofactor motif interactions; interplay of tyrosine 537/488 phosphorylation and LXXLL motifs. *Mol Biosyst*. 8(12):3134-41.
- Noriega-Reyes MY, Langley McCarron E. (2008) Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerologia* 3:29-40.
- O'Malley B.W., Qin J., Lanz R.B. (2008) Cracking the coregulator codes, *Curr. Opin. Cell Biol*. 20:310–315.
- O'Malley B.W., Kumar R. (2009) Nuclear receptor coregulators in cancer biology, *Cancer Res*. 69:8217–8222.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimao A. (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243:122-126.
- Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. (2009). Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Mex.*;51(supl 2):S208-S219.
- Perissi, V., A. Aggarwal, C. K. Glass, D. W. Rose, and M. G. Rosenfeld. (2004) A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116:511–526.
- Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG. (2010) Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat. Rev. Genet*. 11, 109e123.
- Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, Jindal S, Segara D, Jia L, Moore NL, Henshall SM, Birrell SN, Coetzee GA, Sutherland RL, Butler LM, Tilley WD. (2009) Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res*. Aug 1;69(15):6131-40.

- Peterson TJ, Karmakar S, Pace MC, Gao T, y Smith CL. (2007) The Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor (SMRT) Corepressor Is Required for Full Estrogen Receptor a Transcriptional Activity. *Mol Cell Biol.* 27(17): 5933–5948.
- Qi C, Zhu YT, Chang J, Yeldandi AV, Rao MS, Zhu YJ. (2005). Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2. *Biochem Biophys Res Commun.*;328(2):393-8.
- Rajendran RR, Nye AC, Frasor J, Balsara RD, Martini PGV, Katzenellenbogen BS. (2003) Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97) *J Biol Chem* 278:4628–4638.
- Redmond AM, Byrne C, Bane FT, Brown GD, Tibbitts P, O'Brien K, Hill AD, Carroll JS, Young LS. (2015) Genomic interaction between ER and HMGB2 identifies DDX18 as a novel driver of endocrine resistance in breast cancer cells. *Oncogene.* 34(29):3871-80.
- Rodríguez-Cuevas S, Carpuso-García M. (2006) Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obstet Max* 74 (11):585-593.
- Romero-Figueroa MS, Santillán-Arreygue L, Olvera-Hernández PC, Morales-Sánchez MA, Ramírez-Mendiola VL. (2008) Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex*; 76 (11):667-672.
- Romano A, Adriaens M, Kuenen S, Delvoux B, Dunselman G, Evelo C y Groothuis P (2010) Identification of novel ER- $\alpha$  target genes in breast cancer cells: Gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17 $\beta$ -estradiol and tamoxifen. *Mol Cell Endocrinol* 314:90-100.
- Rosner B, Colditz GA. (1996) Nurses' health study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 88(6):359-364.
- Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. (2003) Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res.* 9(1 Pt 2):447S-54S.
- Schulman IG, Juguilon H, Evans RM (1996) Activation and repression by nuclear hormone receptors: hormone modulates an equilibrium between active and repressive states. *Mol Cell Biol* 16: 3807–3813.
- Sengupta D, Bhargava DK, Dixit A, Sahoo BS, Biswas S, Biswas G, Mishra SK. (2014). ERR $\beta$  signaling through FST and BCAS2 inhibits cellular proliferation in breast cancer cells. *Br J Cancer.*;110(8).
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843–852.
- Sheppard HM, Harries JC, Hussain S, Bevan C, Heery DM. (2001) Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1. *Mol Cell Biol.* 21(1):39-50.

- Shi Y, Downes M, Xie W, Kao HY, Ordentlich P, Tsai C-C, Hon M, Evans RM (2001) Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev* 15:1140–1151.
- Shi R, Zhou JY, Zhou H, Zhao Z, Liang SH, Zheng WL, et al., 2014a. The role of PinX1 in growth control of breast cancer cells and its potential molecular mechanisms by mRNA and lncRNA expression profiles screening. *Biomed. Res. Int.* 2014, 978984.
- Shi R, Zhao Z, Zhou H, Wei M, Ma WL, Zhou JY, et al., 2014b. Reduced expression of PinX1 correlates to progressive features in patients with prostate cancer. *Cancer Cell Int.* 14, 46.
- Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, Pan Z, Bai J, Zheng J. (2015). PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- $\kappa$ B/MMP-9 signaling pathway. *Mol Cancer.* 14:66.
- Singh B, Bhat NK, Bhat HK (2011) Partial inhibition of estrogen-induced mammary carcinogenesis in rats by tamoxifen: balance between oxidant stress and estrogen responsiveness. *PLoS One.* 6(9):e25125.
- Smith, CL (1998) Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signalling pathways. *Biol. Reprod.* 58, 627–632.
- Smith CL y O'Malley BW (2004) Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators *Endocrine Reviews* 25(1):45–71.
- Spiegelman BM y Heinrich R (2004) Biological Control through Regulated Transcriptional Coactivators *Cell*, 119:157–167.
- Strutt H, Paro R. (1999) Mapping DNA target sites of chromatin proteins in vivo by formaldehyde crosslinking. *Methods Mol Biol.* 119:455-67.
- Szapary D, Huang Y, Simons Jr SS (1999) Opposing effects of corepressor and coactivators in determining the dose-response curve of agonists, and residual agonist activity of antagonists, for glucocorticoid receptor-regulated gene expression. *Mol Endocrinol* 13:2108–2121.
- Thompson EB, Kumar R. (2003). DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function. *Biochem Biophys Res Commun.*;306(1):1-4.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Hache, R.J., Beato, M., 1995. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* 14, 1737e1751.
- Tsai M-J y O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 63:451–486.
- Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP (1994) Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8:21–30.

- Walsh CA, Qin L, Tien JC, Young LS y Xu J (2012) The Function of Steroid Receptor Coactivator-1 in Normal Tissues and Cancer. *Int J Biol Sci* 8(4):470-485.
- Wang HB, Wang XW, Zhou G, Wang WQ, Sun YG, Yang SM, et al., (2010). PinX1 inhibits telomerase activity in gastric cancer cells through Mad1/c-Myc pathway. *J. Gastrointest. Surg.* 14, 1227e1234.
- Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. (1998); *J Mol Med* 76:469-479.
- Weisz A, Bresciani F. (1988) Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol.* 2(9):816-24.
- Weisz A, Rosales R.(1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 18(17):5097-106.
- White R y Parker MG (1998) Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocr-Relat Cancer* 5:1-14.
- Winer E, Morrow M, Osborne CK, Harris JR. Risk Factors For Breast Cancer. : *Cancer Principles & Practice of Oncology.* DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1653-1654.
- Wiznerowicz, M., Trono, D., 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.* 77, 8957-8961.
- Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Miller F, Tiwari N, van Spaendonk R, Wolman SR. (2006). High-resolution mapping of molecular events associated with immortalization, transformation, and progression to breast cancer in the MCF10 model. *Breast Cancer Res Treat.* 96(2):177-86.
- Wu RC, Smith CL, O'Malley BW. (2005) Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr. Rev.* 26(3):393-9.
- Xie YB, Lee OH, Nedumaran B, Seong HA, Lee KM, Ha H, Lee IK, Yun Y y Choi HS. (2008) SMILE, a new orphan nuclear receptor SHP interacting protein, regulates SHP-repressed estrogen receptor transactivation. *Biochem. J.*, 416, 463–473.
- Xie Y-B, Nedumaran B. y Choi HS (2009) Molecular characterization of SMILE as a novel corepressor of nuclear receptors. *Nuc Ac Res* 37(12):4100-15.
- Xu J., Wu R.C., O'Malley B.W. (2009) Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family, *Nat. Rev. Cancer* 9:615-630.
- Yuan, K., Li, N., Jiang, K., Zhu, T., Huo, Y., Wang, C., Lu, J., Shaw, A., Thomas, K., Zhang, J., Mann, D., Liao, J., Jin, C., Yao, X., 2009. PinX1 is a novel microtubule binding protein essential for accurate chromosome segregation. *J. Biol. Chem.* 284, 23072–23082.

- Zhao W, Zhang Q, Kang X, Jin S, Lou C. (2009) AIB1 is required for the acquisition of epithelial growth factor receptor-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 380(3):699-704.
- Zheng FF, Wu RC, Smith CL, O'Malley BW. (2005) Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* 25(18):8273-84.
- Zhou XZ, Huang P, Shi R, Lee TH, Lu G, Zhang Z, Bronson R y Lu KP. (2011) The telomerase inhibitor PinX1 is a major haploinsufficient tumor suppressor essential for chromosome stability in mice. *J Clin Invest.* 121(4):1266–1282.
- Zuo J, Wang DH, Zhang YJ, Liu L, Liu FL, Liu W. (2013) Expression and mechanism of PinX1 and telomerase activity in the carcinogenesis of esophageal epithelial cells. *Oncol. Rep.* 30, 1823e1831.
- Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci.* 123(Pt 8):1253-61.
- Zwart W, Theodorou V, Kok M, Canisius S, Linn S, Carroll JS. (2011) Oestrogen receptor-co-factor-chromatin specificity in the transcriptional regulation of breast cancer. *The EMBO journal.* 30:4764–76.

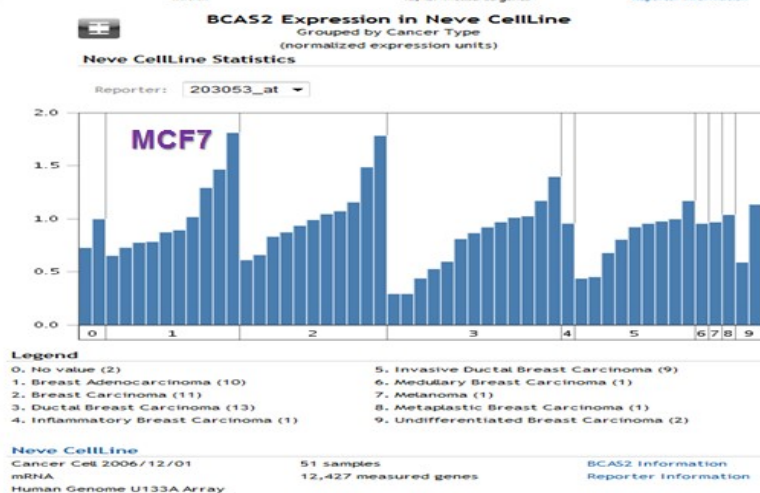
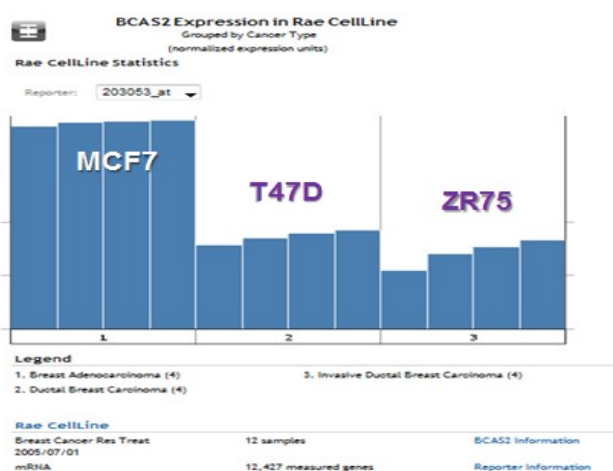
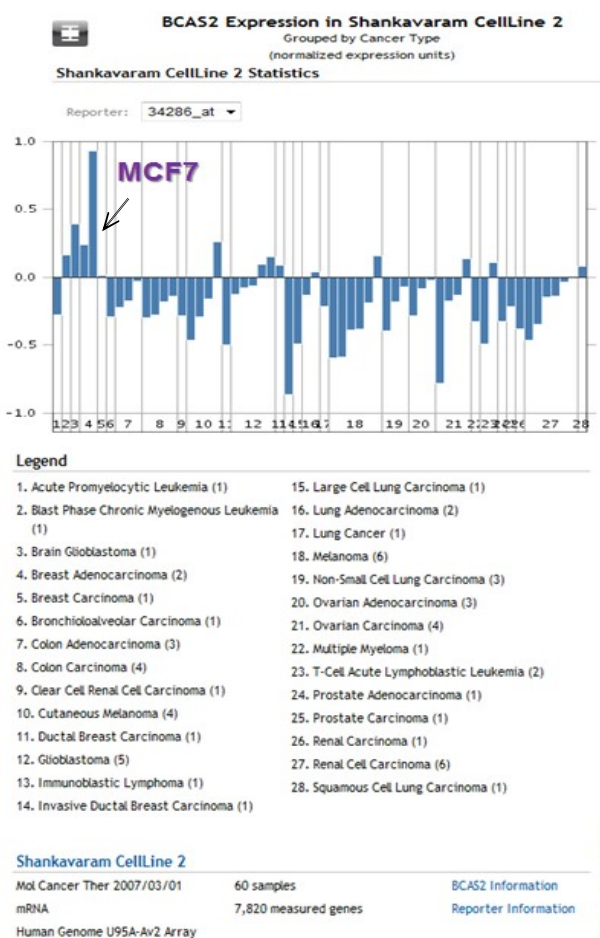
## ANEXOS

### ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES BCAS2 Y PINX1 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

| mRNA  | Línea celular | Tratamiento E2 y/o TAM |     |      |                    |
|-------|---------------|------------------------|-----|------|--------------------|
|       |               | 0nM                    | 1nM | 10nM | E2(1nM)/TAM(100nM) |
| BCAS2 | MCF7          | ++                     | ++  | ++   | -                  |
| BCAS2 | T47D          | +                      | +   | ++   | -                  |
| BCAS2 | MDA-MB-231    | ++                     | ++  | +++  | -                  |
| BCAS2 | HeLa          | ++                     | ++  | +    | NA                 |
| PINX1 | MCF7          | -                      | -   | ++   | -                  |
| PINX1 | T47D          | -                      | -   | -    | -                  |
| PINX1 | MDA-MB-231    | -                      | -   | -    | -                  |
| PINX1 | HeLa          | -                      | ++  | +    | NA                 |
|       |               | Tratamiento DHT        |     |      |                    |
|       |               | 0nM                    | 1nM | 10nM |                    |
| BCAS2 | PC3           | +                      | NA  | +++  |                    |
| BACS2 | 22RV1         | +                      | NA  | +    |                    |
| BCAS2 | LNCaP         | ++++                   | ++  | -    |                    |
| PINX1 | PC3           | -                      | -   | -    |                    |
| PINX1 | 22RV1         | -                      | -   | -    |                    |
| PINX1 | LNCaP         | +++                    | ++  | +    |                    |

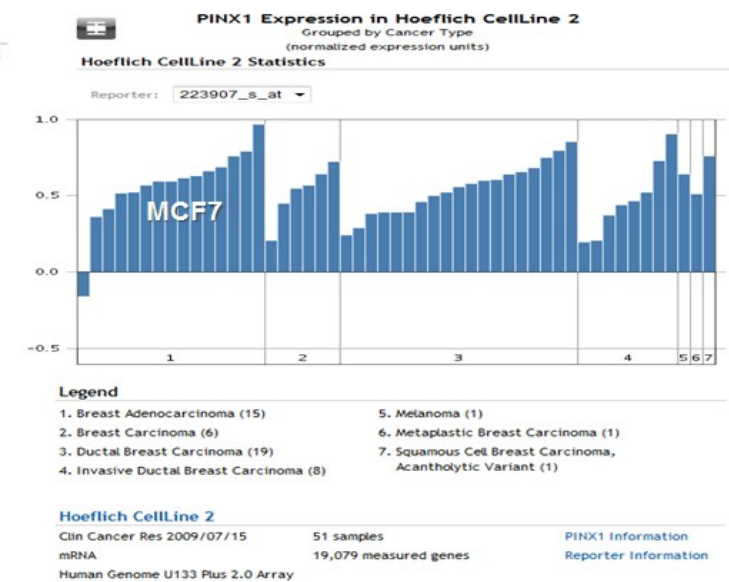
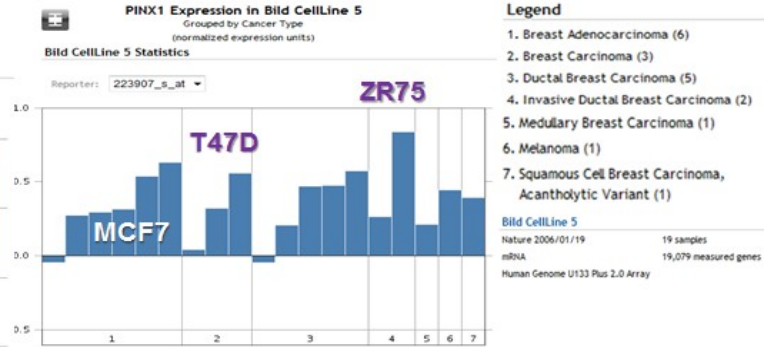
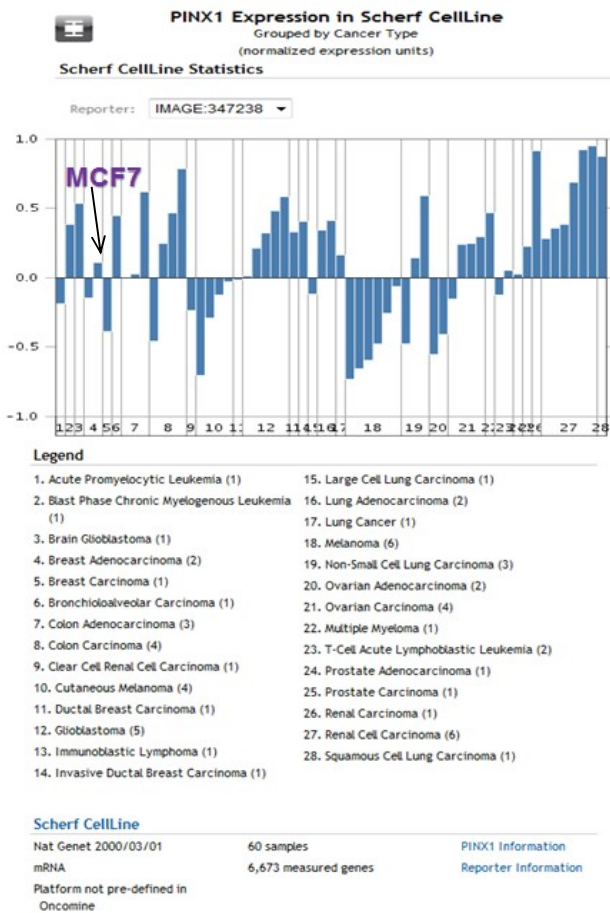
NA = No analizado

**ANEXO 1.** Se realizaron los ensayos utilizando un RT-PCR convencional y corriendo los productos por PAGE, los resultados fueron analizados con el programa SigmaPlot versión 9.

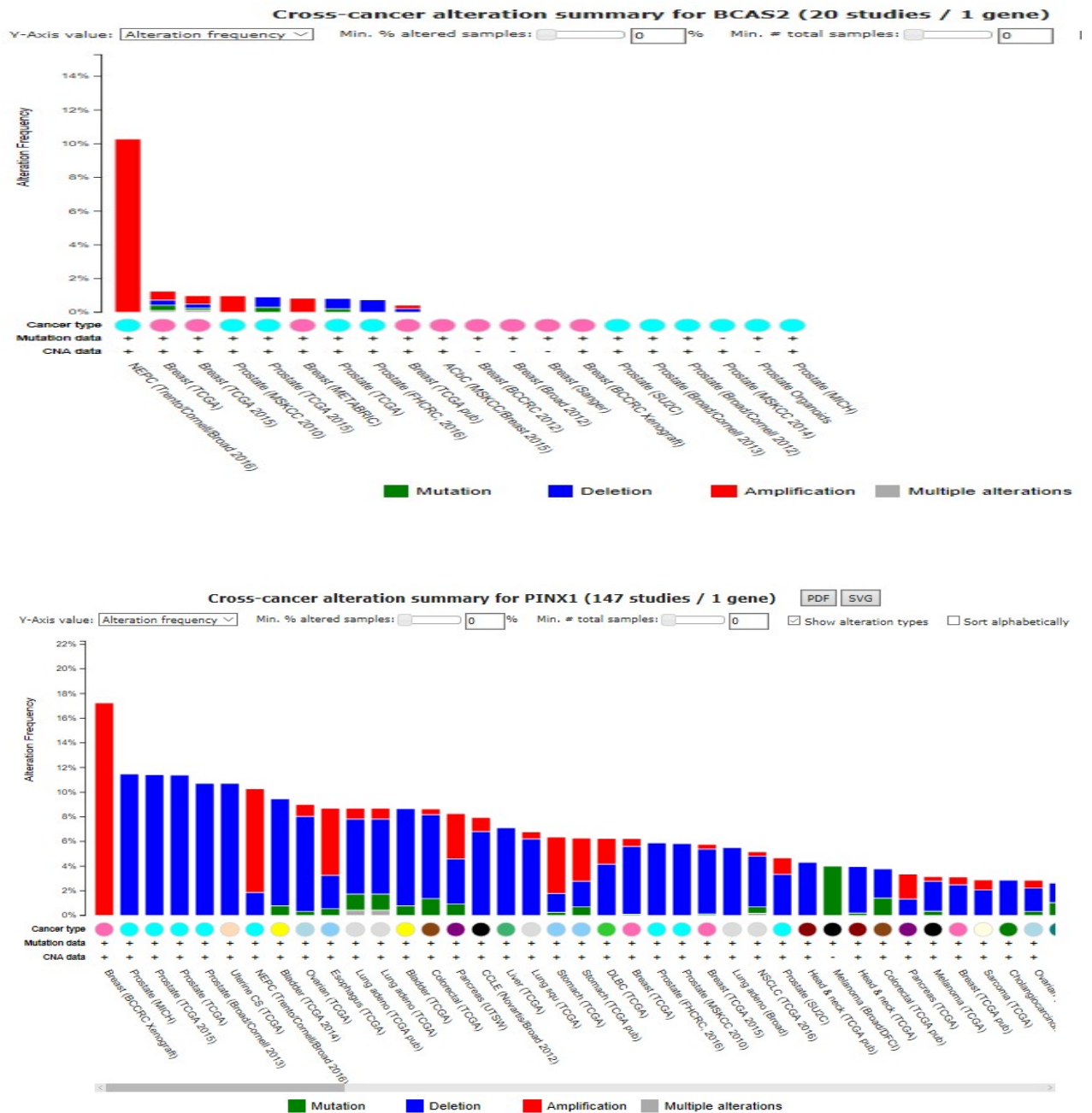


**ANEXO 2.** Análisis in silico de la expresión de BCAS2, en tres diferentes genotecas de líneas celulares estables de cáncer de mama, usando el sitio <https://www.oncomine.org>





**ANEXO 2.** Análisis in silico de la expresión de PINX1, en tres diferentes genotecas de líneas celulares estables de cáncer de mama, usando el sitio <https://www.oncoPrint.org>

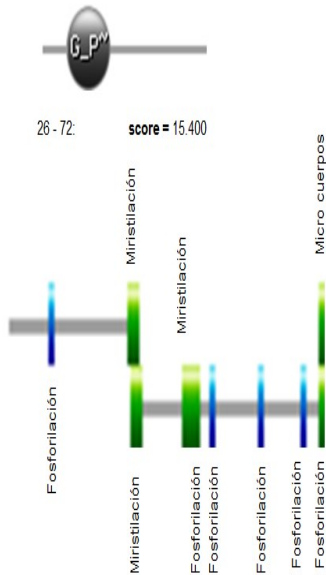


**ANEXO 3.** Análisis in silico de la frecuencia de alteraciones en diversas genotecas de cáncer de mama y próstata de BCAS2 y PINX1, usando el sitio <http://www.cbioportal.org>; Se observa que en la mayoría de los estudios, hay una amplificación de BCAS2 y una delección de PINX1.



## Secuencia de nucleótidos y aminoácidos:

### PINX1 (Hs.490991)



```

1  ATGTCTATGCTGCTGTAAGTCTGCGGCAAGCAGAAAGTGGGCTGTAATCTCAGAACACT
1  M S M L A E R R R K Q K W A V D P Q N T
61  60CTG66AGTAATGACGATTCGCAAGTTT66CCAG66GATGCTAG66ATG66G66T66TCT
21  A W S N D D S K F G Q R M L E K M G W S
121 AA66AA6666TTT6666CTC666AG66CAG66ATCATATTA66TTCA66T6
41  K G K G L S A Q E Q G A T D H I K V Q V
181 AAAATAACACACTG66ACTG66AG66TACCATCAATATG66AG66CACTG66ATTG66CAT
61  K N N H L S L S A T T I N N E D N W I A H
241 CAG66ATGATTTTAA66CTG66G66CACTG66ACACTG66CATG66G66AA66CAG66A
81  Q D D F N Q L L A E L L N T C H G Q E T T
301 6ATTCCTG66CAG66AA66AA66AAATCTTTT66CCTG66AG66AA66TCC66AAATCTCC
101 D S S D K K E K K S F S L E E K S K I S
361 AAAAACG66TTC66ACTATATG66AAATTC66AAA6666G66ATG66TCC66CTCC66ACTG66A
121 K N R V H Y M K F T K G R C Q S L H S R
421 66AG66G66AA66CAG66A66CAG66G66TTC66CAG66ATG66TTC66CAG66G66AT
141 6 E R N H D N Q R L H H P S V L C Q A D
481 66CAG66CTG66AA66AA66CAG66CAG66TTC66G66TTC66G66TTC66G66TTC66
161 6 S T E E Q A P G S S S R V *
    
```

Cromosoma: 8; Localización: 8p23

525pb = 174aa

## Análisis de 600pb río arriba del gen PINX1

```

ACCITTCGCTTGTGTAAGGCAATCCCATTAATTTAAAGAGGTAACATTTTCC -651
MZF1
CCACAACACTATTTTGTGTGGGGTCCCACAAAAAACCGATAGATAGCAGAC -601
GATA-2 GATA-3 Pbx-1
CTATCTTCGATATCTATCTACTATCTATCTATCAICTATCTAICTATCT -551
Pbx-1 SRY
ATTATCTATCATCCATTTGTTTTAICTATCTCAGAAAGCAGAGTAGGGT -501
ACGAGGAAGAGATGGGACATTACAATGCAAAAGTCCCTCCCTCCAGCCAAG -451
MZF1
TTTTCAAACTCCTTGTCCATACAACATCCATGACCCCTAAGTTCCAGCTCT -401
p300 SRY USF
TTACACATTTCTTTTCCCCGTGAGGCTGAGCTGCTTGAGGGCAGGTCAG -351
TCITTCACACTACCCTTCTTGCCGGCACCTAGGGCTTCTGATGGAGACCC -301
USF
TACAGGTAATCCAGTGAGCTTATGCTCCGCGGACAGACCGCCAGGCGG -251
p300
GCTTTACTCACATCAATAGCTTAGTACGCACACTCCCTCTAGCCAAATGAG -201
CGAATACGIACTCCTTCTCCACCTCCCGCAGGGCGGCCACCGCCCTC -151
MZF1 Sp1
AGTCCCTCTTCTCCCGTCACTCCCAAGTTGCCCGCCCTGCTCCGCC -101
CRE-BP CREB
CCCTCGCCCGCGGTGCTCGAGGAGCGAGTCGCGCGCTACTGACGTCACC -51
AGCACGCGCCCGTCCGCTG66CTCCGCGG66GAGG66TACGCACGTC -1
Sp1 AP-1
CTGATTCTCCTGGAGTCTCCAGCCCGCCCAAGTGGCCGAGTCAACCAGGT 49
GATA-2
CCAGAGGCGGCGGTATCACAGGCTCTCCGACATGCTATGCTGGCTGAAC 99
GTGAGTGTGGAAGCGGAGGCCCGACCCAGCGCGTGTGGTGAAGATGCCG 149
CREB p300
GGTGACGCGCACCGGACGCCCGGAGTGGCTGGAGCTCGGGTGGCCGGCGC 199
GATA-2 MZF1
GCCTGGCGCATGGGATCGGGGACCGGGGAGCCGAGCCCGGCTCTGATTG 249
TCCTGCTCGCCGAGAGTCCCCGAAAGTTGGCCGAGGTCGCTAGTGA 299
    
```

**ANEXO 4.** Análisis in silico de la secuencia de aminoácidos y nucleótidos del gen PINX1; se utilizó el programa Antheprot 2.0 y Bioedit, para la secuencia de aa, donde se puede observar algunos sitios de miristilación y fosforilación de esta proteína, el análisis in silico, mostro un parche de glicinas, que puede aportar a la proteína de un sitio de interacción con otras proteínas. También este análisis mostro una caja NR (LxxLL), pero invertido, lo que podría ser el sitio de unión a los receptores hormonales como ER, AR y PR. Para el análisis de la secuencia promotora del gen PINX1, se utilizó el programa Gene2Promoter, se tomó una secuencia de 600pb nucleotídicas, río abajo del ATG, encontrándose varios sitios de unión a factores de transcripción que responden a hormonas, como AP-1 y Sp1.





## Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors



Maria Yamilet Noriega-Reyes<sup>a,c</sup>, Miguel Angel Rivas-Torres<sup>a,c</sup>,  
Luis Fernando Oñate-Ocaña<sup>b</sup>, Albert Jordan Vallés<sup>d</sup>, Noemi Baranda-Avila<sup>a</sup>,  
Elizabeth Langley<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico D.F., Mexico

<sup>c</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

<sup>d</sup> Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Catalunya, España

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 February 2015

Received in revised form

10 July 2015

Accepted 11 July 2015

Available online 15 July 2015

## Keywords:

Estrogen receptor

Breast cancer

PINX1

Corepressors and transcriptional regulation

## ABSTRACT

Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) has an established role in breast cancer biology. Transcriptional activation by ER $\alpha$  is a multistep process influenced by coactivator and corepressor proteins. This work shows that Pin2 interacting protein 1 (PINX1) interacts with the N-terminal domain of ER $\alpha$  and functions as a corepressor of ER $\alpha$ . Furthermore, it represses both AF-1 and AF-2 transcriptional activities. Chromatin immunoprecipitation assays verified that the interaction between ER $\alpha$  and PINX1 occurs on E<sub>2</sub> regulated promoters and enhanced expression of PINX1 deregulates the expression of a number of genes that have a role in cell growth and proliferation in breast cancer. PINX1 overexpression decreases estrogen mediated proliferation of breast cancer cell lines, while its depletion shows the opposite effect. Taken together, these data show a novel molecular mechanism for PINX1 as an attenuator of estrogen receptor activity in breast cancer cell lines, furthering its role as a tumor suppressor gene in breast cancer.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The estrogen receptor (ER) is a ligand activated transcription factor that modulates expression of genes involved in embryonic development, reproduction, metabolism and cell death (Osborne et al., 2001). Estrogens, such as 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), are potent activators of both ER subtypes, ER $\alpha$  (ESR1) and ER $\beta$  (ESR2), and are known to play a critical role in the development and progression of breast cancer (Jordan, 1995; Shao and Brown, 2004). ERs have a modular structure, consisting of an N-terminal domain containing a ligand independent transcriptional activation function (AF-1), a central conserved DNA binding domain (DBD), a hinge region, and a C-terminal ligand binding domain (LBD) containing the ligand-dependent transcriptional activation function (AF-2) (Gronemeyer, 1991; Trukentman et al., 1994). The transcriptional activity of ERs is not only regulated by hormones but is also affected by several regulatory proteins which can be coactivators or corepressors (Shang et al., 2000; Smith et al., 1997; Xu et al., 1999).

Estrogen binding to these receptors causes conformational changes in the LBD that allow them to interact with coregulator proteins, most commonly through the AF-2 domain, but also through the AF-1 domain (Moras and Gronemeyer, 1998). Generally, coactivators do not bind DNA directly, but are recruited to target promoters through interaction with transcription factors. Coactivators are usually recruited in the presence of agonist ligands and enhance transcription through several mechanisms, including chromatin remodeling, Histone acetyltransferase (HAT) activity, methyltransferase activity, recruitment and activation of the basal transcriptional machinery, etc. (Chakravarti et al., 1996; Dasgupta et al., 2014; Green and Carroll, 2007; Rosenfeld and Glass, 2001). Corepressors have opposite enzymatic activities and switch off gene transcription, maintaining genes in a silenced state or turning off active transcription. For example, the corepressors, nuclear receptor corepressor (NCoR) and silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) (Dubrzycka et al., 2003; Perissi et al., 2010; Smith and O'Malley, 2004) have been widely characterized and implicated in the transcriptional silencing of many steroidal and non-steroidal nuclear receptors in the absence of ligand or in the presence of ligand antagonists, such as Tamoxifen (TAM) (Smith et al., 1997; McKenna and O'Malley, 2000). Most corepressor proteins repress target gene transcription by recruiting

\* Corresponding author. Laboratorio de Cáncer Hormonalmente Regulado, Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando 22, Tlalpan 14080, Mexico D.F., Mexico.  
E-mail address: [langley@inccan.com](mailto:langley@inccan.com) (E. Langley).