



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Localización subcelular y dinámica de la interacción de la proteína
TTP con el ER α en células de cáncer de mama**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN CARLOS GONZÁLEZ FRAGOSO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANGELES C. TECALCO CRUZ

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018



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.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y admiración a mis padres Norma Lucia Fragoso Romo y Pablo Isaac Martínez Martínez por su confianza, apoyo y paciencia brindada durante todo este tiempo y por las enseñanzas y lecciones de vida que me han guiado a ser lo que deseo y por el amor que me han profesado para ser mejor hombre, hijo, hermano, pareja y estudiante.

A mis hermanos Gerardo Fragoso Romo y Selene Fragoso Romo por confiar en su hermano mayor, por la ayuda incondicional en todo momento y por los inolvidables momentos que compartimos al crecer juntos, porque también aprendí mucho de ustedes.

Por enseñarme a no renunciar a mis sueños a mi compañera de vida y de viajes Mariana Nair Pérez Ramírez por mostrarme que ser libre y auténtico de corazón y mente te lleva a lo más sublime de la vida, por su amor que me ayudó a sanar, su confianza en mis decisiones, por su apoyo en los momentos complicados, por mostrarme que la vida es mejor compartida y por su Mawchidad que hacen de ella una mujer única que necesita el mundo.

A mis amigos José Antonio Moreno Velázquez, José Miguel Rocha Ángeles y Govanni Reyes Martínez por compartir experiencias, consejos y juegos desde iniciada nuestra educación secundaria.

A la Doctora Angeles C. Tecalco Cruz por la ayuda y asesoría constante durante este proceso en su laboratorio, por la confianza y paciencia depositadas en mí todo este tiempo aún con las adversidades y por los consejos y apoyo que me brindó denotando así la gran persona y profesionalista que es.

Al Dr. Alfonso León del Río por la oportunidad en su laboratorio, su apoyo y consejos que han contribuido a concluir mi formación universitaria.

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Angeles Concepción Tecalco Cruz**, en el laboratorio C-138 (Laboratorio de la Dra. Angeles C. Tecalco Cruz) y en el laboratorio B-046 (Laboratorio el Dr. Alfonso León del Río), ambos del Programa de Investigación de Cáncer de Mama y del departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce a la **Dra. Angeles C. Tecalco Cruz** por su asesoría en la realización de este proyecto, así como al **Dr. Alfonso León del Río** por permitir el desarrollo experimental en su laboratorio.

Se reconocen los valiosos comentarios, observaciones y correcciones del jurado asignado conformado por:

PRESIDENTE	Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín
VOCAL	M. en C. Diana Grisel Ríos López
SECRETARIO	Dra. Angeles C. Tecalco Cruz
SUPLENTE	Dr. Jonatan Barrera Chimal
SUPLENTE	M. en C. Bibiana Ortega Domínguez

Se reconoce el apoyo y la asesoría técnica otorgada por:

Dr. Miguel Tapia Rodríguez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
MVZ Claudia Rivera Cerecedo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
M en C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
MVZ Héctor Malagón Rivero	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Biol. Marcela Sosa Garrocho	Instituto de Fisiología Celular UNAM.
Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Ma. Cristina Castañeda Patlán	Facultad de Medicina, UNAM.
M en C. Patricia Salazar Sandoval	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se agradece a los miembros del taller del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, el **Ing. Aurey Galván Lobato** y el **Ing. Manuel Ortíz Benavides** por su colaboración en el mantenimiento de algunos equipos empleados.

Investigación apoyada por el Programa **UNAM-DGAPA-PAPIIT** No. **IA200916** y por el No. **IA201618**.

I. Índice

II. Lista de abreviaturas.....	1
III. Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
1.1 Receptor de estrógenos y la vía de señalización estrogénica.....	4
1.2 Regulación de la actividad del receptor de estrógenos por correguladores.....	7
2. Antecedentes.....	8
2.1 Tristetraprolina (TTP).....	8
2.2 TTP como un correpressor del receptor de estrógenos.....	11
3. Planteamiento del problema.....	11
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivos.....	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos particulares.....	12
6. Estrategia experimental.....	13
7. Material y Métodos.....	13
7.1 Plataformas bioinformáticas.....	13
7.2 Línea celular.....	14
7.3 Obtención de proteínas por extractos totales y fraccionamiento subcelular.....	15
7.4 Inmunoprecipitación de proteínas (IP).....	16
7.5 Detección de proteínas por Western Blot.....	17
8. Resultados	18
8.1 Predicción de la localización subcelular de TTP.....	18
8.2 TTP se localiza en el citoplasma y núcleo de las células MCF-7.....	19
8.3 El estradiol no afecta la localización subcelular de TTP.....	20
8.4 TTP se asocia con el receptor de estrógenos alfa.....	21
8.5 La asociación de TTP con el ER α ocurre en el núcleo de las células MCF-7.....	22

8.6	La asociación de TTP en el ER α disminuye en el núcleo de las MCF-7 en presencia de E2.....	23
8.7	La presencia de E2 disminuye la asociación de TTP con el ER α	24
9.	Discusión de resultados.....	25
10.	Conclusiones y perspectivas.....	28
11.	Referencias.....	29

I. LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR: Región 3' no traducible

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF-1: Función de activación 1

AF-2: Función de activación 2

AREs: Elementos ricos en adenosina/uridina

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

C- : Grupo carboxilo terminal

CARM1: Proteína con actividad de metiltransferasas de argininas 1 asociadas a coactivadores

COX-2: Ciclooxygenasa 2

c-Rel: Protocogena de la proteína celular de reticuloendoteliosis

DBD: Dominio de unión al ADN

E1: Estrona

E2: Estrógeno

E3: Estriol

EREs: Elementos de respuesta a Estrógenos

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares

ER α : Receptor de estrógenos alfa

ESLpred: Por sus siglas en inglés eucariotic protein subcelular localization prediction

FKBP52: Proteína 52 unida a inmunofilina FK

HATs: Acetilinasas de histonas

HDACs: Desacetilinasas de histonas

HEK293: Células embrionarias de riñón humanas 293

HSP90: Proteína de choque térmico 90

hTTP: Tristetraprolina humana

IL-12: Interleucina 12

IP: Inmunoprecipitación

LBD: Dominio de unión al ligando
MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno
MCF-7: por sus siglas en inglés Michigan Cancer Foundation 7
N- : Grupo amino terminal
NcoR: Correpresor de receptores nucleares
NF-kB: Factor nuclear kappa B
NLS: Señal de localización nuclear
Nup214: Nucleoporina 214
p65: Proteína 65
PBPN1: Proteína nuclear 1 de unión a Poli(A)
PRMT1: Proteína con actividad de metiltransferasa de argininas 1
PSORT: Herramienta de predicción de localización subcelular
PVDF: Polifluoruro de vinilideno
RNs: Receptores nucleares
SMRT: Mediador del silenciamiento del Receptor Retinoide y del Receptor de Hormona Tiroidea
Src/c-Src: Proteína cinasa de tirosinas
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TTP: Tristetraprolina
ZFP36: Por sus siglas en inglés zinc finger print 36

II. RESUMEN

El receptor de estrógenos alfa (ER α) es un factor transcripcional activado por ligando y para regular su activación y función se asocia a proteínas que promueven (coactivadores) o reprimen su función (correpresores). Una proteína recientemente identificada como correpresora del ER α es la tristetraprolina (TTP). La mayor parte de los estudios realizados sobre la TTP han sido enfocados principalmente a sus funciones y su ubicación en el citoplasma en distintos contextos celulares, sin embargo, muy pocas investigaciones han dilucidado su localización y función en el núcleo celular. A través de fraccionamiento subcelular, ensayos de inmunoprecipitación y western blot en este trabajo se determinó que la TTP se localiza más abundantemente en el núcleo de las células derivadas de cáncer de mama MCF-7 que en el citoplasma y que de manera endógena existe una fuerte asociación entre la TTP y el ER α en el mismo compartimento subcelular, no obstante, en presencia del estradiol (E2) dicha interacción es alterada y reducida en un curso temporal de 0 a 4 horas. Los resultados sugieren que la localización subcelular y la dinámica de interacción de la TTP con el ER α en presencia y ausencia de E2, podrían otorgar las bases para comprender mejor el mecanismo molecular de la TTP como correpresor en éste contexto celular.

Localización subcelular y dinámica de la interacción de la proteína TTP con el ER α en células de cáncer de mama

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Receptor de estrógenos y la vía de señalización estrogénica.

El receptor de estrógenos alfa (ER α) es un factor transcripcional activado por ligando perteneciente a la familia de los receptores nucleares (RNs), posee un peso de 65 kDa y está constituido por 565 aminoácidos¹. Al igual que otros RNs, el ER α posee una estructura multidominio, la cual está conformada desde el dominio A/B ubicado en la N-terminal hasta el dominio F presente en la región C-terminal (Fig. A). Los dominios mejor caracterizados tanto funcional como estructuralmente son la región C que alberga al dominio de unión al ADN (DBD) y la región E que contiene al dominio de unión al ligando (LBD) y al dominio de transactivación AF-2. Por otra parte, el dominio D ubicada entre el DBD y el LBD funciona como un péptido enlace (también denominado “bisagra”), mientras que el dominio F es una extensión hasta la región C-terminal del LBD². Además, el dominio A/B contiene al dominio de transactivación AF-1 importante para la actividad transcripcional del receptor de estrógenos³.

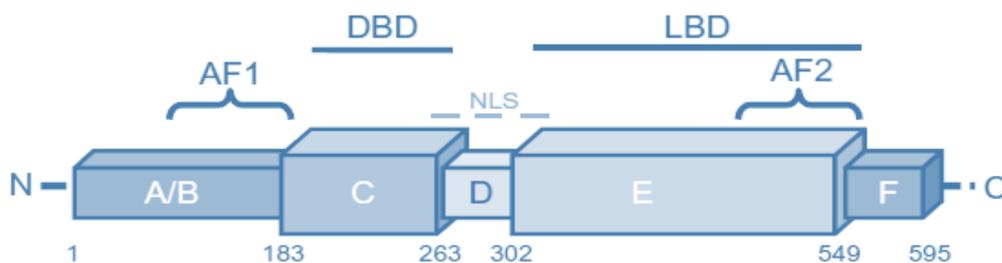


Figura A. Representación de la estructura del ER α . El receptor de estrógenos alfa está conformado de 5 distintos dominios mostrados por las letras A/B a la F, cada dominio se encuentra definido por sus aminoácidos respectivos (números inferiores) y en la parte superior se encuentran las regiones localizadas en cada dominio (siglas en inglés). La letra N representa al amino inicial y C al carboxilo terminal. (Modificada de Kerdivel G, 2013).

El dominio DBD se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc, la secuencia del primer dedo de zinc determina la especificidad de unión a los llamados elementos de respuesta a estrógenos (ERE), que son regiones en el ADN de mayor afinidad para que el ER α inicie la transcripción y cuya secuencia es AGGTCANNNTGACCT, mientras que la estructura del segundo dedo de zinc presenta una red de carga positiva y promueve la dimerización de las dos moléculas del DBD. El LBD es un dominio globular que alberga el sitio de unión al ligando hormonal, una interfaz de dimerización y una función de interacción con coactivadores y corepresores^{3,4}. El AF-1 localizado en la región A/B media un potencial constitutivo de activación y es responsable de la activación promotora específica transcripcional independiente de la presencia de un ligando. Por otra parte, el AF-2 localizado en la región E promueve una activación transcripcional específica dependiente del ligando. Tanto el dominio AF-1 como el AF-2 son autónomos en sus regiones y sinérgicos uno con el otro en algunos casos⁴.

Como se mencionó anteriormente, el ER α es un factor de transcripción inducible por ligando, dicha estimulación promueve la transcripción de genes responsivos al ER α los cuales presentan ERE en su secuencia promotora.

La vía básica de activación del ER α sigue una línea de transcripción regulada por el estradiol (E2) denominada vía de señalización estrogénica, la cual inicia con la unión del ligando al ER α . Unido al estradiol, el ER α se activa a través de un proceso que implica su disociación de proteínas chaperonas, cambios conformacionales, dimerización y la unión a los ERE de sus genes blanco (Fig. B). En el estado inactivo, el ER α permanece como un heterocomplejo conformado por la proteína de choque térmico 90 (HSP90) y la proteína 52 unida a inmunofilina FK (FKBP52). La HSP90 se une directamente al LBD del ER α para formar un complejo poco estable el cual es estabilizado por FKBP52 a través de una unión directa con HSP90 y una interacción electrostática con la señal de localización nuclear (NLS) presente en el final de la C-terminal del DBD del ER α . Este complejo del ER α inactivo se mantiene continuamente en recambio entre el núcleo y el citoplasma. En condiciones basales el E2 se difunde a través de la membrana plasmática donde puede unirse al LBD del ER α tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, una vez formado

el complejo ligando-receptor éste se homodimeriza en el núcleo, la HSP90 y FKBP52 se disocian dando como resultado la forma activa del receptor⁵.

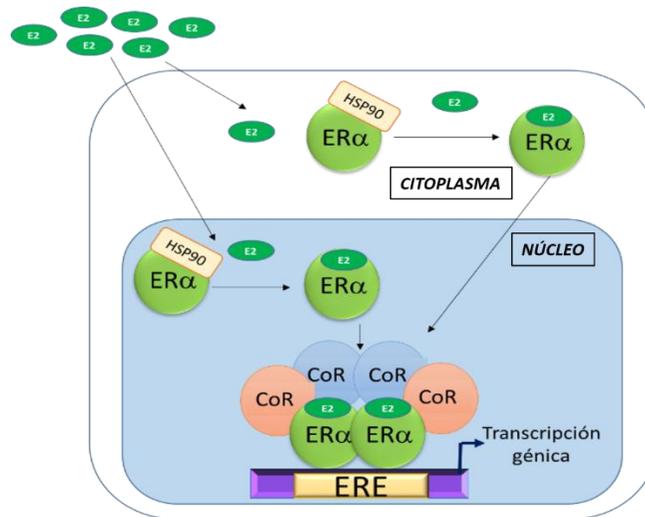


Figura B. Vía de señalización estrogénica dependiente de ligando. La vía básica de activación del ERα sigue una línea de transcripción regulada por el E2 denominada vía de señalización estrogénica, la cual inicia con la unión del ligando al ERα que se activa a través de un proceso que implica su disociación de proteínas chaperonas, cambios conformacionales, dimerización y su posterior unión a los EREs de sus genes blanco en el ADN.

Tal composición y estructuración de las proteínas asociadas al receptor promueve que el ensamble y desensamble del complejo del ERα sea altamente dinámico y la variación en la expresión de genes entre distintos tejidos bajo diferentes condiciones o contextos celulares puedan afectar por completo la composición final del complejo de regulación del ERα. Para ser activado y llevar a cabo su función como factor transcripcional el ERα se une principalmente al E2 y en menor cantidad a la estrona (E1) y el estriol (E3), pertenecientes a la familia de las hormonas esteroideas sexuales estrogénicas; dichas moléculas presentan un amplio espectro de funciones fisiológicas que van desde la regulación del ciclo menstrual y reproducción hasta la modulación de la densidad ósea, función cerebral y movilización del colesterol⁶. Dentro de éste grupo el estrógeno intracelular predominante es el E2 el cual presenta un destacado papel fisiológico al mediar la maduración, proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación, metabolismo, homeostasis y funcionamiento cerebral además de influir en el crecimiento y

desarrollo del cáncer de mama^{7,8} del cual se mencionarán algunos aspectos importantes.

En lo que refiere a su expresión en condiciones normales, el ER α está expresado en el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, tracto urogenital, en hígado, hueso y glándula mamaria, su regulación está en función principalmente de la concentración endógena de E2. La modulación del ER α está implicada en el desarrollo y regulación de la homeostasis reproductiva, cardiovascular y ósea además controla varios aspectos de la función cognitiva⁹.

Numerosos estudios han demostrado la relación de los estrógenos con el desarrollo y/o progresión de distintos tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, endometrio, ovario, próstata, pulmón y colón^{8,9,10}. El efecto pro-oncogénico de los estrógenos es mediado principalmente por la activación del ER α sobre sus genes blanco que promueve la proliferación celular o disminuye la apoptosis de las células cancerígenas^{9,10}.

1.2 Regulación de la actividad del receptor de estrógenos por coreguladores.

Para regular su activación y función, el ER α se asocia a proteínas o complejos proteicos que promueven o reprimen su función, para ejercer dicha regulación de su actividad transcripcional el complejo ER α -E2 requiere reclutar diversas proteínas o complejos denominados coreguladores transcripcionales, muchos de los cuales poseen distintas actividades enzimáticas que modifican la estructura de la cromatina o interactúan directamente con la maquinaria transcripcional, por una parte se encuentran los denominados “coactivadores” que aumentan la actividad transcripcional del receptor al descondensar la cromatina mediante el reclutamiento de acetilasas de histonas (HAT) realizando modificaciones postraduccionales en las proteínas histonas, permitiendo de esta forma la entrada de la maquinaria transcripcional a las regiones promotoras de sus genes blanco iniciando así su transcripción, por otra parte están los “correpresores” proteínas o complejos proteicos que inducen la compactación de la cromatina reclutando desacetilasas de histonas (HDAC) impidiendo que se lleve a cabo la expresión genética lo cual se

traduce en un efecto represivo sobre el ER α a través de estos complejos¹¹, es decir, regulan negativamente la transcripción.

Se ha demostrado que más de 300 proteínas interactúan con uno o más miembros de la familia de receptores nucleares y muchas de estas también interactúan con el ER α ¹¹. La familia de las proteínas p160 (o SRC) incluye tres miembros distintos pero homológamente relacionados (SRC 1, 2 y 3) y son los coreguladores mejor caracterizados del ER α . Las SRC facilitan un ambiente transcripcionalmente permisible a través del directo y/o indirecto reclutamiento de otros coactivadores que poseen actividad de remodelación de la cromatina y modificación de histonas. Además presentan una intrínseca pero débil actividad de acetiltransferasa de histonas (HAT) y median la activación transcripcional al acetilar directamente residuos conservados de lisina sobre las histonas y posiblemente sobre otros coreguladores y/o factores de transcripción, reclutando coactivadores secundarios incluyendo coactivadores asociados a la arginina metiltransferasa 1 (CARM1) y a la proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1) que metila histonas, interactuando con distintos complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP e interactuando y estabilizando el factor de unión a la transcripción basal¹². Por otro lado los correpresores mejor caracterizados son las proteínas NcoR y SMRT, relacionadas estructuralmente entre sí, que son reclutadas por el ER α hacia el promotor de sus genes blanco en presencia de antagonistas tales como el tamoxifen¹². Contrario a los coactivadores, los correpresores promueven la compactación de la cromatina para inhibir la transcripción de genes. Unido a los ERE y en cooperación con los coactivadores, el ER α forma un complejo de pre-iniciación de la transcripción en el cual, la RNA polimerasa II es reclutada al sitio de inicio y comienza el proceso de transcripción de los genes blanco¹³.

2. ANTECEDENTES

2.1 TTP

Conformada por 332 aminoácidos, la tristetraprolina (TTP) es un miembro de la familia prototípica de las fosfoproteínas de dominios en paralelo de dedos de zinc del tipo Cys-Cys-Cys-His, también conocida como Nup475, Tis11 y G0S24, posee

un peso de 34 kDa y tres repeticiones ricas en tetrámeros de prolina. La proteína TTP es producto del gen *ZFP36* de respuesta inmediata y su expresión es inducida por estímulos como el suero, insulina, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios¹⁴. Como proteína la TTP se encuentra en todos los tipos celulares, no obstante, es expresada altamente en monocitos activados y linfocitos T, mientras que a nivel de ARN mensajero (ARNm) está ampliamente distribuido entre distintos tipos de tejidos siendo los de mayores niveles de expresión en el hígado, nódulos linfáticos y timo¹⁵. En el citoplasma celular, la TTP se une mediante sus dedos de zinc a los elementos conservados ricos en adenosina/uridina (AREs) donde reconoce la secuencia mínima de unión (UUAUUUAUU) dentro de la región 3' no traducible (3'UTR) de los ARNs mensajeros que presenta una alta tasa de recambio (por ejemplo los de citocinas, factores de crecimiento y proto-oncogenes) tal acción regula la expresión post-transcripcional al promover la deadenilación y degradación en sentido 3' a 5' de estos ARNm mediante el reclutamiento de distintas proteínas involucradas en este proceso^{16,17}. Entre los ARNm regulados por la TTP en el citoplasma se encuentran el del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el del factor de estimulación de colonias granulocitos-macrófagos, el de la interleucina 2, la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la óxido nítrico sintasa inducible y el del factor nuclear kappa B (NF- κ B) entre otros ARNm de proteínas involucradas en las vías pro-inflamatorias. La TTP puede también auto-regular su expresión al interactuar con AREs en la región 3' UTR de su ARNm¹⁸.

Otra de las funciones de la TTP en el citoplasma independiente de su actividad regulatoria de ARNm se reportó en fibroblastos de embrión de ratón donde atenúa la actividad del factor transcripcional NF- κ B, en parte, debido a una interferencia sobre el mecanismo de importe nuclear de la subunidad p65 impidiendo así su ensamblaje y posterior función como factor de transcripción¹⁹, en esta misma línea se ha reportado que el efecto inhibitorio de la TTP en la producción de IL-12 (interleucina 12) es mediado a través del bloqueo en la translocación nuclear de NF- κ B particularmente de las proteínas p65 y c-Rel²⁰.

Respecto a la localización subcelular de la TTP un estudio señala que la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK) regula la localización subcelular y la estabilidad de TTP; al inhibir la vía p38 MAPK se genera una rápida

defosforilación en los residuos de serina 52 y 178 de la TTP relocalizándola del citoplasma al núcleo y provocando su degradación vía proteosomal 20S/26S. Por otra parte una constante actividad de la vía de la p38 MAPK mantiene la fosforilación, localización citoplasmática y estabilidad de TTP que depende de la cinasa *río abajo* MK2, además, la vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) sinergiza con la vía p38 MAPK para regular tanto la estabilidad como la localización de la TTP²¹. La defosforilación de TTP promueve su degradación lo que conlleva a la pérdida de un potente factor desestabilizador de ARNm e inhibidor de la expresión de muchos mediadores inflamatorios. En células humanas embrionarias de riñón tanto transfectadas con hTTP (human TTP) como de forma endógena la localización de esta proteína y su unión a la región 3' UTR del ARNm del TNF- α es específicamente citoplasmática²².

Actualmente la mayor parte de los estudios realizados en esta proteína se han enfocado y basado en sus funciones citoplasmáticas, por lo cual son muy pocas las investigaciones que analizan y establecen el papel de la TTP en el núcleo celular. Un estudio reciente sugiere que esta proteína regula negativamente la señalización de NF- κ B inhibiendo la expresión genética dependiente de este factor transcripcional a través de la interacción con la subunidad p65 de NF- κ B y asociándose con HDAC 1, 3 y 7 *in vivo* en el núcleo de macrófagos murinos, lo cual contribuye a reprimir la transcripción de genes inflamatorios, funcionando de esta forma como un correpresor al modular la actividad transcripcional de p65/NF- κ B²³. En lo que respecta a su localización y asociación con proteínas nucleares un ensayo de doble híbrido identificó la interacción entre la TTP y la nucleoporina CAN/Nup214 que ocurre también de forma endógena y es dependiente de los dedos de zinc de la TTP; el estudio demostró que la TTP es incapaz de asociarse con Nup214 al generar una mutación en la región de los dedos zinc, además, la TTP presentó una localización subcelular alterada al hallarse en el núcleo comparada con la tristetraprolina endógena que se localiza en el citoplasma sugiriendo así que la interacción con Nup214 contribuye a la regulación de la localización subcelular de la TTP²⁴. Finalmente, Yu-Lun Su y colaboradores determinaron en el núcleo de células embrionarias de riñón humanas (HEK293T) mediante mutantes y ensayos de co-inmunoprecipitación que la TTP interactúa a través de sus dedos de zinc con

la proteína nuclear 1 de unión a poli(A) (PBPN1) tal asociación impide la función de PBPN1 la cual consiste en promover la poliadenilación en la región 3' de ARNm, inhibiendo de esta forma la síntesis de colas de poli(A) regulando la expresión de ARNm que contienen AREs en el compartimento nuclear²⁶.

2.2 TTP como un correpresor del receptor de estrógenos

Un estudio reciente identificó a la TTP como una nueva proteína asociada a la región AF-1 del ER α , los autores describen que la expresión de la TTP en células MCF-7 de cáncer de mama reprime la transactivación de ER α reduciendo la proliferación de las células MCF-7 y su habilidad para formar tumores en un modelo murino. También se demostró que la actividad transcripcional de la TTP es mediada a través del reclutamiento e interacción con desacetilasas de histonas (HDAC), en particular con la HDAC1 en la región promotora de los genes blanco del ER α , adicionalmente la expresión de la TTP disminuyó la actividad del coactivador de SRC-1 sugiriendo que el intercambio entre la TTP y otros coactivadores pueden tener un importante papel en la transactivación del ER α . En conjunto los resultados de este estudio indican que la TTP actúa como un correpresor del ER α y sugiere que esta proteína puede ser un factor de contribución en el desarrollo de tumores dependientes de E2 en cáncer de mama²⁶.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Distintos estudios demuestran que en diferentes contextos celulares la TTP es una proteína implicada en el proceso de degradación de ARNm en el citoplasma, además, recientes trabajos indican que dicha proteína puede funcionar como un correpresor transcripcional. Sin embargo, la localización e interacción con factores transcripcionales dentro del núcleo celular no ha sido demostrada. Es por ello que en este proyecto se propone evaluar la localización subcelular de la TTP en células derivadas de cáncer de mama y estudiar si la interacción con el ER α ocurre en el núcleo, en el citoplasma o ambos y si es modulada por la presencia del E2.

De manera general, este análisis sugeriría que las funciones de la TTP dependen de su localización subcelular, actuando como un inductor de la degradación de ARNm en el citoplasma y como una proteína reguladora del proceso de transcripción en el núcleo. De forma particular, dado que la TTP se une e inhibe la actividad del ER α , es posible que el E2 favorezca la disociación de estas dos proteínas dentro del núcleo celular para inducir la expresión de genes implicados en la proliferación de células de cáncer de mama, por lo que este estudio resulta una base importante para determinar la dinámica de interacción entre la TTP y el ER α . Por lo tanto, con este proyecto será posible demostrar que el efecto regulador de la TTP sobre la actividad del ER α , previamente observado, es dependiente de su localización e interacción con el ER α dentro del compartimento nuclear, e independiente de sus funciones citoplasmáticas; y más adelante, los resultados de este proyecto serán la pauta para entender la importancia de estudiar los mecanismos que modulan la localización subcelular de la TTP y otros correguladores del ER α y su relevancia en células de cáncer de mama.

4. HIPÓTESIS

Si la TTP es un correpresor del ER α entonces la interacción de estas proteínas podría ocurrir en el compartimento nuclear y el E2 podría promover su disociación en células derivadas de cáncer de mama.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer el efecto del estradiol sobre la localización subcelular de la TTP y su asociación con el ER α en células derivadas de cáncer de mama.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la localización subcelular de la TTP en células derivadas de cáncer de mama.

2. Estudiar la abundancia y localización subcelular de la TTP en células tratadas con estradiol.
3. Establecer la dinámica de unión de la TTP y el ER α en respuesta a estradiol.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para estudiar la localización subcelular de la proteína la TTP se emplearon tres plataformas bioinformáticas que predicen la distribución en los compartimentos celulares de una proteína de acuerdo a su composición y a sus características fisicoquímicas. Además, se utilizó la técnica de fraccionamiento subcelular para la obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas y nucleares y su posterior análisis por western blot. Además, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación y western blot para el estudio de la interacción del ER α y la TTP. El tratamiento llevado a cabo será con la hormona E2 por diferentes tiempos. La interacción de la TTP y el ER α se evaluó en un contexto de cáncer de mama, por lo que se usaron como modelo las células MCF-7 derivadas de este tipo de cáncer y que expresan al ER α y a la proteína TTP. La metodología se describe a continuación.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Plataformas bioinformáticas

Se emplearon los siguientes programas de predicción de localización subcelular de proteínas:

1. **PSORT** (<http://www.genscript.com/psort.html>)
2. **PSORT II** (<http://psort.hgc.jp/form2.html>)
3. **ESLpred** (<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/submit.html>)

PSORT utiliza secuencias de péptidos señal conocidos para analizar y predecir en que compartimento subcelular es más probable que la secuencia que se ingrese se pueda localizar, por otra parte, ESLpred se basa en el análisis de la composición de la proteína y sus propiedades físico-químicas para predecir su localización.

Para el análisis, se utilizó la siguiente secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína TTP:

```
MANRYTMDLTAIYESLLSLSPDVPVPSDHGGTESSPGWGSSGPWLSLSPSDSSPSGVTSRLPGRSTSLVEG  
RSCGWVPPPPGFAPLAPRLGPELSPSPTSPTATSTTPSRYKTELCRTFSESGRCRYGAKCQFAHGLGELR  
QANRHPKYKTELCHKFYLQGRCPYGSRCHFIHNPSEDLAAPGHPPVLRQSI SF SGLPSGRRTSPPPPGLA  
GPSLSSSSFSPPSSPPPPGDLPLSPSAFSAAPGTPLARRDPTPVCCPSCRRATPISVWGPLGGLVRTPSV  
QSLGSDPD EYASSGSSSLGSDSPVFEAGVFAPPQVAAPRRLPIFNRI SVSE
```

Reportada con el número de acceso NP_003398, correspondiente a la proteína TTP de humano de 332 aa.

7.2 Línea celular

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular derivada de cáncer de mama MCF-7, a través de la activación (descongelamiento) de un criovial se realizó el periodo de mantenimiento y se cultivó hasta obtener la confluencia del 90% de las células MCF-7 en cajas de 150 mm. Se sembraron retirando el medio DMEM en condiciones estériles, enjuagando con 5 mL de PBS, se les colocó 2 mL de tripsina y se dejaron incubando a 37°C durante 2 minutos. Se procedió a desprender la monocapa de células inclinando ligeramente la placa de cultivo y adicionando 9.5 mL de medio con 10% de suero fetal bovino y antibiótico PKS (DMEM/10% FBS+PKS). Se homogeneizó mediante re-suspensión con pipeta desechable estéril de 10 mL y se sembraron 2 mL de la suspensión celular por cada placa p100 (5 placas) con 8 mL de medio DMEM/10% BFS+PKS previamente atemperado, finalmente se colocaron en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 80-90%.

Obtenida la confluencia del 90%, 4 placas de cultivo fueron destinadas al experimento, primero se desechó el medio de crecimiento y se enjuagaron con 5 mL de PBS mismo que se desechó inmediatamente, enseguida se colocó a cada placa 10 mL de medio DMEM blanco sin FBS para ayunar a las células, finalmente se adicionó directamente a cada placa 10 ml de medio DMEM con 1 µL del stock 10

mM de E2 para obtener una concentración final de 1 μ M y se colocaron a 37°C, 5% CO₂. Los tiempos de la estimulación fueron 0.75, 2, 4 horas y basal para comparar los cambios con la concentración endógena (0 h). Concluidos los periodos las placas se retiraron de la incubadora para llevar a cabo la obtención de proteínas.

7.3 Obtención de proteínas por extractos totales y fraccionamiento subcelular

Las placas de cultivo se colocaron sobre hielo, inmediatamente se desechó el medio de cultivo de cada placa con pipeta Pasteur de vidrio conectada al vacío y se colocaron 5 mL de PBS frío para enjuagar las células y eliminar el medio de cultivo restante. Posteriormente se desechó el PBS y se colocó 1 mL de buffer de homogeneización por placa durante 1 minuto cubriendo toda la superficie. Finalizado el minuto se inclinó cada placa y se retiró la monocapa de células con espátula deslizando la mayor cantidad de células hacia la parte inferior donde se concentró el buffer. Sin retirar del hielo, 1 mL de la suspensión celular de cada placa fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml rotulado según la condición basal o los tiempos de estimulación. El homogenizado se pasó 10 veces a través de una jeringa con una aguja de calibre 22 sobre el hielo. Finalmente cada tubo eppendorf se centrifugó a 3,400 rpm durante 10 minutos a 4°C; concluido el periodo se retiraron los tubos de la microcentrifuga y se observó la formación de un pellet en el fondo de cada tubo el cual corresponde a la fracción nuclear y un sobrenadante correspondiente a la fracción citoplasmática. Todos los tubos se colocaron en hielo y enseguida se transfirió cada sobrenadante a tubos eppendorf de 1.5 ml rotulados según su respectiva condición. Posteriormente se le colocó a cada fracción nuclear 1 mL de solución de lisis RIPA 1X y a la fracción del citoplasma 250 μ L de RIPA 5X, se homogenizaron con vortex y posteriormente se colocaron en agitación por inversión a 4°C por 60 minutos. Concluido el periodo de agitación los tubos se centrifugaron a 13, 200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se retiraron y se observó la formación de un pellet nuevamente en las fracciones nucleares no así para los citoplasmas. Después cada sobrenadante de las fracciones nucleares (los cuales contienen las proteínas nucleares) fueron transferidos a nuevos tubos eppendorf de 1.5 ml correctamente rotulados mientras que los citoplasmas se mantuvieron en los

tubos originales colocados en todo momento sobre hielo. Finalmente para cada fracción subcelular de todas las condiciones se obtuvieron los *input* (que representa el 10% del total del extracto), se separaron en tubos eppendorf de 1.5ml correctamente rotulados y se les agregó la solución Laemmli 6X. Posteriormente estos extractos se utilizaron para proceder a la co-inmunoprecipitación de las proteínas.

Para la obtención de extractos totales de proteínas de MCF-7 de cada condición se procedió de la misma forma que en el fraccionamiento subcelular pero en lugar de buffer de homogeneización se adicionó a cada tubo 1 mL de TNTE 0.5% y 25 μ L de inhibidor de proteasas y se procedió directamente para lisar en agitación por inversión a 4°C. Finalmente los lisados resultantes se emplearon para la obtención de inputs y para proceder a la inmunoprecipitación de proteínas.

7.4 Inmunoprecipitación de proteínas (IP)

Los extractos totales y fracciones subcelulares (~1 mg proteína) se utilizaron para los ensayos de inmunoprecipitación. Para ello, se les agregó 1.5 μ L de anticuerpos específicos primarios para las proteínas TTP (α -TTP) y ER α (α -ER α) a 400 μ L de cada condición de los extractos totales y las fracciones subcelulares y se colocaron en agitación por inversión a 4°C durante toda la noche. Luego de la agitación todos los tubos eppendorf se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 segundos (s) hasta observar la formación de un pellet, se retiró el sobrenadante con pipeta estéril al vacío, evitando succionar el pellet, se agregó 1 mL de TNTE 0.1% y se agitó por inversión manualmente varias veces para enjuagar, enseguida se centrifugo nuevamente a 14,000 rpm durante 10 s y se repitió el lavado del pellet dos veces más. Después del último lavado se desechó mediante aspirado al vacío la mayor cantidad posible de sobrenadante sin afectar el pellet de agarosa. Posteriormente se centrifugaron los tubos 10 s a 14,000 rpm y por último se retiró con una punta colibrí el sobrenadante restante hasta dejar sólo el pellet de agarosa.

Por último se adicionaron 30 μ L de Laemmli 2X a cada tubo eppendorf, se hirvieron en baño seco, previamente preparado, por 4 minutos y se dejaron enfriar a

temperatura ambiente. Todos los tubos procesados se almacenaron a -20 °C para proceder con la técnica de western blot al día siguiente.

7.5 Detección de proteínas por western blot

Todos los tubos procesados fueron centrifugados durante 5 s a 14, 000 rpm para concentrar las proteínas, la cámara de electroforesis se preparó colocando los cristales con los geles de poliacrilamida al 10% previamente preparados y vertiendo buffer de corrida 1X hasta el límite de los cristales que contienen los geles, cubriendo en su totalidad los pozos. La disposición de las muestras en cada gel se realizó según el esquema de cada experimento colocando el marcador de peso molecular bicolor de 10-250 kDa, previamente descongelado, al inicio de cada corrida y dispensando en cada pozo del gel 30 µL de cada muestra. Cada corrida se realizó a una intensidad de 70 volts (70V) para alinear las muestras en la fase concentradora de los geles y posteriormente a 85V en la fase separadora. La corrida se detuvo cuando el colorante abandonó completamente los geles y se procedió a realizar la transferencia de las proteínas.

Los cristales con los geles de poliacrilamida se retiraron de la cámara de electroforesis, se separaron cuidadosamente manteniendo el cristal de menor tamaño al frente y se retiró la fase concentradora quedando sólo la fase separadora con las proteínas separadas los cuales se colocaron en buffer frío de transferencia 1X para mantenerlos hidratados, posteriormente, sin alterar la dirección y posición original del gel, éste se colocó dentro del *cassette-sandwich* preparado previamente en contacto con la membrana de PVDF 0.45 µm. Al inicio del procedimiento se etiquetó cada membrana para catalogarlas.

Los *cassette-sandwich* se presionaron fuertemente y se cuadraron para sellarse correctamente, inmediatamente se colocaron en la cámara de transferencia húmeda preparada previamente a temperatura de 4°C y se le agregó buffer de transferencia 1X hasta cubrir completamente el borde superior de los *cassettes*. Finalmente se aplicó una intensidad de 100 V durante 80 minutos para llevar a cabo la transferencia de las proteínas. Concluido el periodo se retiraron las membranas de PVDF de los *cassettes* y se procedió al bloqueo de las mismas iniciando con un

enjuague por 10s con TBS-T el cual fue desechado y se añadió inmediatamente 25 mL de solución de leche previamente preparada, por último las membranas se mantuvieron en agitación durante 60 minutos. Finalizado el lapso se desechó la solución láctea y se realizó un enjuague por 5 minutos con TBS-T a TA retirado al concluir el periodo, enseguida se colocaron 8 mL de los anticuerpos primarios (Ab's 1°) previamente preparados contra ER α o TTP a una dilución de 1:1,000 ambos y se dejaron en agitación constante toda la noche a una temperatura de 4°C.

Al día siguiente se retiraron los Ab's 1° de las membranas y éstas se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos con TBS-T, inmediatamente se colocaron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Ab's 2°) en dilución 1:10,000 ambos (α -conejo para α -ER α y α -ratón para α -TTP) y se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos, terminado este tiempo, las membranas se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos por cada enjuague con TBS-T y se procedió a realizar la técnica de revelado.

Realizado el procedimiento en cuarto oscuro, las membranas se colocaron en reactivo quimio-luminiscente WestPico (*Thermo Fisher Scientific*) de detección preparado en fresco durante 4 minutos y se expusieron a placas durante 2, 3 y 4 minutos para determinar el tiempo más apropiado en visualizar claramente las proteínas investigadas. Las placas obtenidas fueron observadas e interpretadas para el análisis de resultados.

8. RESULTADOS

8.1 Predicción de la localización subcelular de la TTP

Para estudiar la distribución subcelular de la TTP, se usaron tres diferentes programas que predicen la posible localización de una proteína considerando su composición y las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que la componen. Estos programas predicen la localización de la TTP en mitocondria, peroxisomas y vesículas del sistema secretorio, así como en citoplasma y citoesqueleto, no obstante, es posible apreciar que todos los resultados obtenidos en las bases

informáticas indican que la TTP es una proteína que se localiza preferentemente en el núcleo celular en comparación con el resto de los compartimentos subcelulares (Tabla 1).

	PSORT	PSORT II	ESLpred
Núcleo	52.2 %	65.2 %	✓
Mitocondria	30.4 %	21.7 %	–
Citoplasma	13.0 %	4.3 %	–
Citoesqueleto	–	4.3 %	–
Vesículas del sistema secretorio	4.3 %	4.3 %	–

Tabla 1. Porcentaje de predicción de la localización subcelular de la TTP otorgados por PSORT, por otra parte, ESLpred indica el sitio de mayor probabilidad de presencia de la TTP en la célula.

8.2 La TTP se localiza en el citoplasma y núcleo de las células MCF-7

Con la finalidad de determinar experimentalmente la localización subcelular de la TTP, se llevó cabo un fraccionamiento subcelular de las células MCF-7, para obtener los extractos nucleares y citoplasmáticos, y posteriormente se efectuó la inmunodetección de la proteína TTP endógena. Los resultados mostraron la presencia y localización de la TTP tanto en el citoplasma como en el núcleo, sin embargo, una mayor abundancia de esta proteína TTP se observó en la fracción nuclear (Fig.1, *panel superior*). Además el ER α también se detectó principalmente en la fracción nuclear de las células MCF-7 (Fig.1, *panel central*).

Para determinar la pureza del fraccionamiento subcelular se efectuó la inmunodetección de proteínas marcadoras propias de cada compartimento subcelular, tubulina- α se detectó principalmente en el citoplasma mientras que lámina β 1 se observó en la fracción nuclear (Fig. 1, *paneles inferiores*).

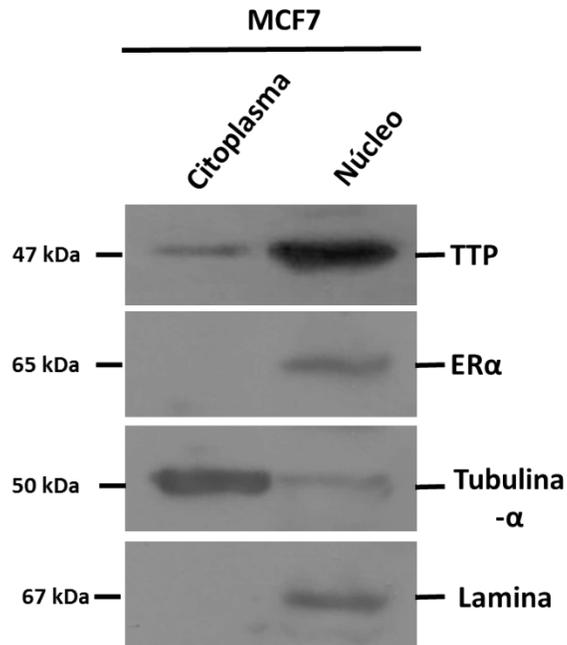


Fig. 1. Inmunodetección de la TTP, ER α , tubulina- α y lamina β 1 en fracciones subcelulares de MCF-7. En condiciones endógenas se observa una mayor abundancia de la tristetraprolina en el núcleo celular mientras que el ER α está exclusivamente en este compartimento subcelular. Tubulina- α se observa mayoritariamente en el citoplasma y lamina β 1 sólo en núcleo. n=3.

8.3 El estradiol no afecta la localización subcelular de la TTP.

Para establecer el efecto del E2 sobre la abundancia y localización de la TTP en los compartimentos subcelulares de las células MCF-7 se llevó a cabo un curso temporal de 0, 0.75, 2 y 4 horas en presencia de E2. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con E2 no afecta la localización y abundancia de la TTP en las células MCF-7 (Fig. 2, *panel superior*). Por lo tanto, mientras el ER α se localiza más en el compartimento nuclear, la proteína TTP se localiza tanto en el núcleo celular, en mayor abundancia, como en el citoplasma y dicha distribución subcelular no es afectada por el estímulo de E2.

Los controles de carga específicos para cada compartimento subcelular muestran que el fraccionamiento se realizó correctamente (Fig. 2, *paneles inferiores*).

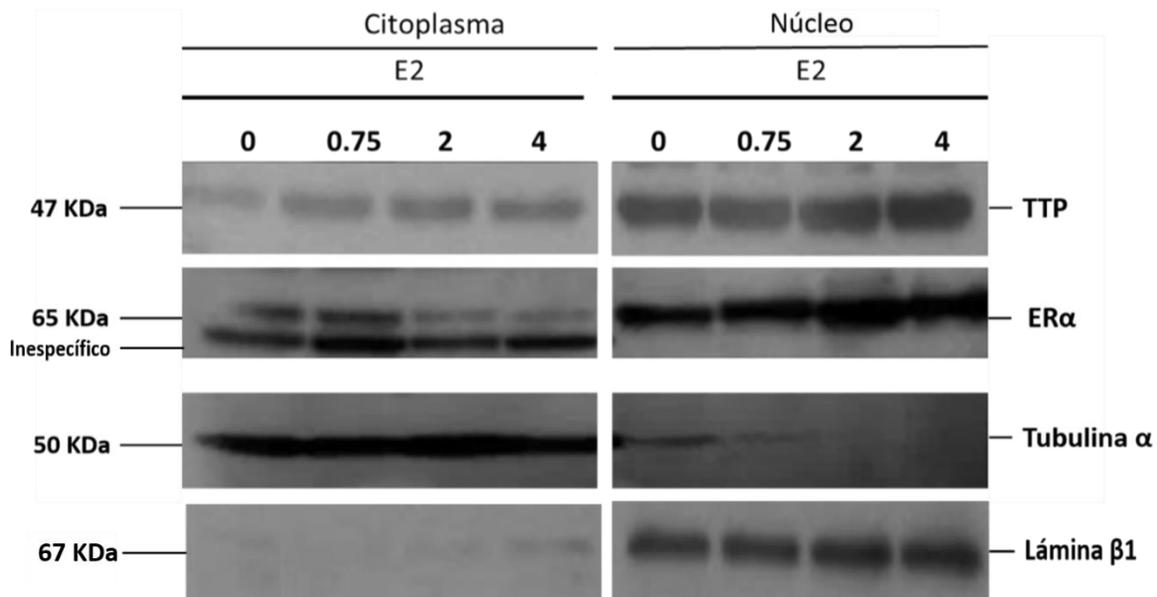


Fig. 2. Tiempos de estimulación con estradiol en las fracciones subcelulares de MCF-7. Tanto en el citoplasma como en el núcleo la TTP no mostró cambios en su localización y abundancia en presencia del E2. El ERα presenta un notable aumento en la fracción nuclear a las 2 h comparada con el endógeno mientras que en el citoplasma disminuyó a partir de las 2 h de colocado el estímulo. Lámina β1 y tubulina-α fueron detectadas en núcleo y en citoplasma respectivamente. n=3.

8.4 La TTP se asocia con el receptor de estrógenos alfa

Para corroborar la interacción entre la TTP y el ERα previamente descrita, se llevó a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación utilizando extractos totales de las células MCF-7. Para ello, la proteína TTP se inmunoprecipitó, y los complejos inmunoprecipitados se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente se realizó la inmunodetección del ERα para determinar la asociación de estas proteínas, así como la inmunodetección de la TTP para validar la inmunoprecipitación. Adicionalmente, se realizó la co-inmunoprecipitación recíproca, inmunoprecipitando a ERα y detectando a la proteína TTP. Los resultados obtenidos de ambos procedimientos muestran la asociación entre las proteínas TTP y ERα, como se indica en la figura 3. En el input de los extractos totales de MCF-7 se detectó a la TTP y el ERα lo cual indica la presencia de ambas proteínas (Fig. 3, columna izquierda).

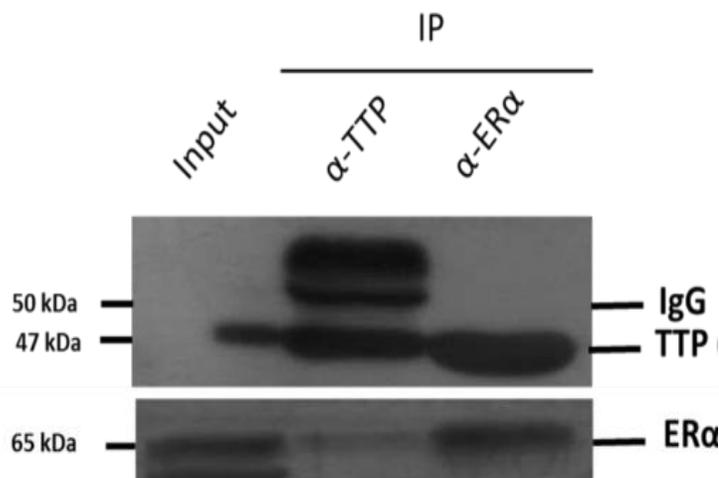


Fig. 3. Asociación endógena de la TTP con el ER α en extractos totales de MCF-7. A través del ensayo de co-inmunoprecipitación de la TTP y revelando contra ER α fue posible detectar la interacción entre ambas proteínas reforzando tal resultado mediante la co-inmunoprecipitación recíproca. La TTP y el ER α se observan en el *input* de la muestra indicando de esta forma la presencia de las dos proteínas en éste contexto celular

8.5 La asociación de la TTP con el ER α ocurre en el núcleo de las células MCF-7.

En los resultados previos se demostró la interacción de la TTP con el ER α a través de la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en extractos totales de células MCF-7 de manera endógena. Sin embargo, para determinar particularmente en que compartimento subcelular se llevaba a cabo esta asociación se realizó el fraccionamiento subcelular de MCF-7 y la inmunoprecipitación de ER α revelando contra TTP en ambas fracciones subcelulares. Los resultados obtenidos muestran que la inmunoprecipitación del ER α , favorece su detección en el citoplasma y núcleo celular, no obstante, ER α está enriquecido principalmente en el compartimento nuclear.

De manera interesante, se observó que la asociación de la TTP con el ER α ocurre mayoritariamente en el núcleo y que una muy discreta interacción entre ambas proteínas ocurre en el compartimento citoplasmático de las células MCF-7 (Figura 4, IP α -ER α /TTP).

Para cada caso, los *inputs* de los extractos proteicos del fraccionamiento subcelular muestran de forma clara la presencia de las proteínas TTP y ER α , observándose una mayor abundancia en el compartimento nuclear (*Fig. 4, Input*).

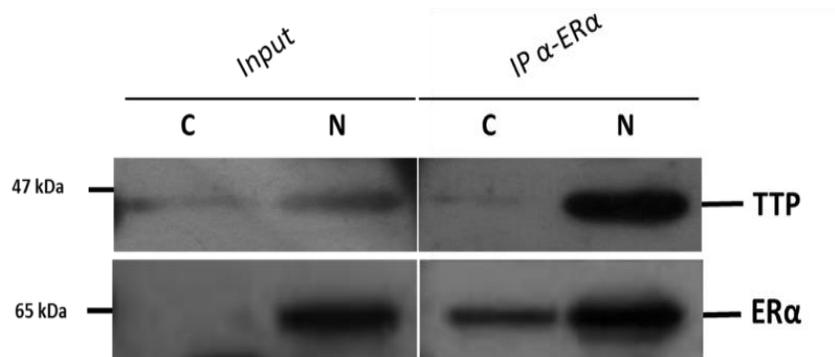


Fig. 4. La asociación de la TTP y el ER α ocurre específicamente en el núcleo (N) de las MCF-7. Mediante el fraccionamiento subcelular e inmunoprecipitando al ER α se puede observar claramente la interacción de ambas proteínas en el compartimento nuclear al revelar contra la TTP (panel superior derecho), tal interacción se manifiesta en mucha menor proporción en el citoplasma (C). El revelado contra el ER α mostró mayor abundancia en el núcleo y menor en el citoplasma (panel inferior derecho). Los inputs de cada condición (30 μ L de muestra) fueron obtenidos de extractos proteicos citoplasmáticos y nucleares de células MCF-7. n=3.

8.6 La asociación de la TTP con el ER α disminuye en el núcleo de las células MCF-7 en presencia del E2.

Con el objetivo de dilucidar la dinámica de interacción entre la TTP y el ER α en presencia del estradiol se llevó a cabo la estimulación con E2 durante 1 hora (h), posteriormente se realizó la inmunoprecipitación del ER α y se reveló contra la TTP en extractos nucleares proteicos de las células MCF-7. En un primer acercamiento para determinar dicho objetivo los resultados mostraron que la presencia del E2 disminuye discretamente la asociación entre TTP y ER α en comparación con el control que se trató únicamente con el vehículo etanol (EtOH) como se observa en la Figura 5.

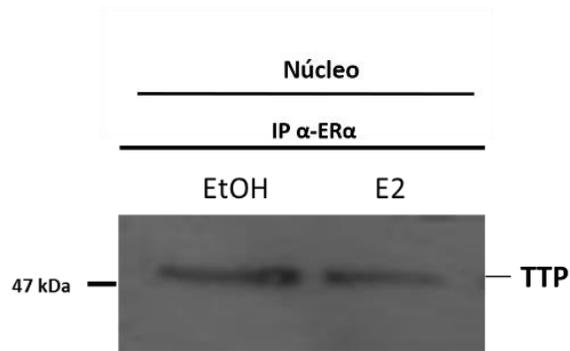


Fig. 5. La interacción entre la TTP y el ER α disminuye discretamente en presencia de E2. Comparado con la condición control se observa que al inmunoprecipitar al ER α y revelar contra TTP la banda correspondiente a la estimulación con estradiol presenta una menor intensidad. n=3.

8.7 La presencia del E2 disminuye la asociación de la TTP con el ER α

Para corroborar el efecto del E2 sobre la asociación de TTP y ER α , se llevó a cabo un curso temporal de 0, 0.75, 2 y 4 horas con el estímulo de E2 en células MCF-7. Los extractos nucleares con estos tratamientos se utilizaron para llevar a cabo la inmunoprecipitación del ER α y la posterior detección de la TTP. Los resultados indican que la asociación de la TTP con el ER α disminuye en presencia de E2 en comparación con el control (Fig. 6, IP α -ER α /TTP), y tal efecto es más evidente a las 4 horas de estimulación. La TTP fue detectada claramente en los inputs de todas las condiciones, lo cual indica la presencia de dicha proteína en una fracción de las muestras utilizadas en este experimento como lo muestra la Figura 6 (INPUT/TTP).

Por otro lado, la inmunodetección del ER α indica la eficiente inmunoprecipitación de ER α en este experimento y los resultados de los inputs del ER α revelan la presencia de la proteína en todas las condiciones determinando así que la detección en las IP's corresponden efectivamente al ER α (Fig. 6, INPUT/ER α).

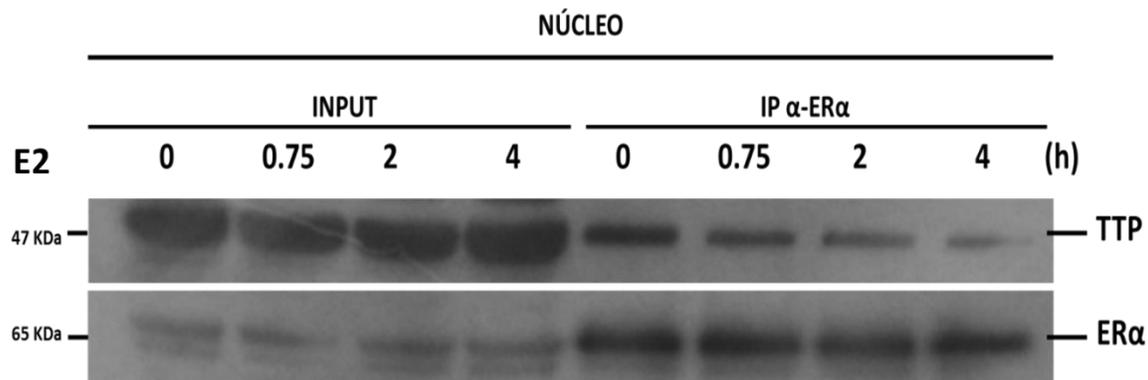


Fig. 6. La asociación de la TTP con el ER α disminuye en presencia de E2. Realizado en extractos nucleares proteicos de células MCF-7, al inmunoprecipitar al ER α y realizar el revelado contra la TTP se observa en la figura que en los tiempos 0.75, 2 y 4 horas con el estímulo de E2 la asociación entre la proteína TTP y el receptor nuclear fue menor comparada con la condición control (0 h), ER α fue constante al revelarse dicha proteína en su IP, mientras que para ambos casos los inputs mostraron la presencia tanto de TTP y ER α . n=3.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En un contexto de cáncer de mama utilizando a las células MCF-7 y mediante fraccionamiento subcelular y western blot se determinó que la localización de la TTP es de mayor abundancia en el núcleo de estas células, lo cual confirma la predicción realizada por los programas computacionales PSORT, PSORT II y ESLpred que determinan a la TTP como una proteína situada mayoritariamente en el núcleo celular. Con base a estos primeros resultados y dada la característica molecular de las células MCF-7 donde ER α se encuentra altamente expresado, se sugiere que la TTP se encuentra en mayor abundancia en el núcleo para llevar a cabo su función como un regulador negativo de la actividad del ER α impidiendo la expresión de sus genes blanco, como lo señala el estudio realizado por Barrios y colaboradores en 2014. Sin embargo, este trabajo es el primer estudio que señala la abundancia de TTP en el núcleo de las células MCF-7 y demuestra su asociación con ER α en este compartimento. No obstante, la TTP también se localizó en el citoplasma de las MCF-7 pero en menor cantidad, lo cual indica que pudiera llevar a cabo sus funciones reportadas en el citoplasma^{14,15}. Por otra parte en un contexto de cáncer de mama, tomando en cuenta los resultados de este trabajo que muestran la abundancia en el núcleo de la TTP, se sugiere que su posible función nuclear podría

radicar en reprimir la activación del ER α a través de un mecanismo molecular aún desconocido y posiblemente de otros receptores nucleares.

En presencia de E2 la localización subcelular de la TTP así como su abundancia no fueron modificadas, aunque algunos otros estímulos han demostrado su recambio en la localización subcelular como es el caso del suero fetal bovino que promueve la re-localización del núcleo celular al citoplasma en fibroblastos de ratón²¹. Con base en la teoría consultada se llegó a la suposición de que el E2 promovería la movilización de la TTP del núcleo al citoplasma de las MCF-7 para de esta forma disminuir la cantidad de la proteína en el compartimento nuclear evitando su función como correpresor del ER α , no obstante, los resultados no mostraron cambios. Por lo tanto, es aún necesario estudiar los mecanismos que inducen el transporte de la TTP del núcleo al citoplasma en células de cáncer de mama para llevar a cabo la función hasta ahora más ampliamente estudiada de la TTP que es la degradación de ARNm pro-oncológicos que codifican para proteínas que generan procesos como la inflamación, angiogénesis y metástasis promoviendo el desarrollo de la enfermedad a estados más avanzados^{27, 28}.

Por otro lado, previamente se había sugerido la interacción entre la TTP y el ER α a partir de extractos totales de las células MCF-7 mediante ensayo de co-inmunoprecipitación²⁶. En este trabajo fue posible reproducir tal resultado, y a partir de ello se establecieron las bases para comenzar a dilucidar la dinámica de interacción entre ambas proteínas en presencia de E2. De esta forma, la asociación entre TTP y ER α fue confirmada en extractos totales proteicos mediante co-inmunoprecipitación y western blot confirmando con ello que la TTP se une al receptor nuclear. Con base a la unión de ambas proteínas, revelada en extractos proteicos totales, el siguiente punto consistió en determinar en qué compartimento se llevaba a cabo esta asociación. Los resultados indican que la interacción entre la TTP y el ER α se da específicamente en el núcleo de las células MCF-7 sugiriendo así que TTP se une al ER α para realizar su función sobre la actividad nuclear del ER α . Es probable que la abundancia de la TTP en el núcleo esté relacionada directamente con su función sobre el ER α , evitando de esta manera la transcripción de los genes blanco del ER α de manera endógena para impedir la progresión de la enfermedad mediante un factor transcripcional que por naturaleza se expresa

altamente en estas células y su función está relacionada con la expresión de los genes de proliferación y evasión de apoptosis en cáncer de mama^{7,10,12}, generando fenotipos con mayor agresividad. Tal resultado no había sido reportado anteriormente en algún otro estudio, y es importante porque similarmente, la TTP podría actuar como un correpresor de otros factores de transcripción cuya actividad sea también ligada al desarrollo de cáncer de mama. Al respecto, cabe mencionar que la expresión de la TTP se ha reportado disminuida en cáncer de mama en los estados más avanzados, por lo que es probable que en estas circunstancias la regulación negativa de la actividad del ER α por la TTP esté perdida^{22, 26} por lo que los resultados obtenidos en este trabajo presentan mayor relevancia en fases de cáncer de mama tempranas donde TTP aún está presente y asociada a el ER α en el núcleo celular.

Finalmente los resultados de interacción entre proteínas en el curso temporal mostraron que la TTP y el ER α se asocian endógenamente y tal asociación se interrumpe a partir de las 0.75 y durante las 4 h de colocado el estímulo, es decir, la interacción de ambas proteínas se ve afectada conforme el curso temporal incrementa en presencia de E2 en el núcleo de las células MCF-7 (Fig. 6). Es importante señalar que dentro del microambiente tumoral en cáncer de mama el E2 es la hormona más abundante y el principal ligando del ER α ⁶, al determinar la disminución en la interacción de ambas proteínas en presencia de E2 en los resultados de este trabajo, se sugiere que algún efecto similar pueda ocurrir en un modelo *in vivo*. Posiblemente en un estado normal en el que intervengan TTP, ER α y el E2 donde existe un equilibrio metabólico celular y molecular, la intervención del E2 para regular la interacción entre TTP y ER α sea modulada, no obstante, en el contexto de cáncer de mama el E2 unido al receptor podría intervenir en la interacción con la TTP y consecuentemente impedir la función de represión de la TTP sobre el ER α como lo sugieren conclusiones obtenidas en experimentos sobre etapas tempranas de cáncer de mama^{29, 30}. Por lo tanto, los resultados presentados sugieren que el E2 interviene directamente en la activación del ER α al promover la disociación entre la TTP y el factor de transcripción nuclear.

10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque la TTP ha sido ampliamente estudiada en el citoplasma en diferentes contextos celulares sus funciones en el núcleo son aún poco estudiadas y los estudios que lo abordan son limitados. En este trabajo se determinó que la TTP presenta una localización preferentemente nuclear en células de cáncer de mama MCF-7 y que existe una interacción entre la TTP y el ER α en tal compartimento subcelular en condiciones endógenas, misma interacción que es afectada por E2 a medida que transcurre un lapso temporal, posiblemente interfiriendo con la represión de la transactivación del ER α por parte de la TTP como lo demostraron Barrios y colaboradores (2014), lo cual corrobora la hipótesis presentada y otorga las bases para investigaciones posteriores que contribuyan a un mejor entendimiento de la enfermedad desde etapas iniciales ya que en las etapas finales TTP ya no es expresada.

De este modo, una perspectiva de este trabajo es la determinación e identificación de la composición de los complejos transcripcionales conformados por ER α y TTP implicados en la represión de la actividad de este receptor en cáncer de mama.

11. REFERENCIAS

1. Bai, Z. & Gust, R. (2009). Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands. *Archiv der Pharmazie*, 342: 133–149.
2. Tecalco-Cruz, A. C. & Ramírez-Jarquín, J. O. (2017). Mechanisms that increase stability of estrogen receptor alpha in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 17(1): 1-10.
3. Anbalagan, M. & Rowan, B., G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418(3): 264-272.
4. Magnani, L. & Lupein, M. (2013). Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1): 633-641.
5. Vrtacnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrac, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Media*, 24(3): 329-42.
6. Chamkasem, A., & Toniti, W. (2015). Sequence to Structure Approach of Estrogen Receptor Alpha and Ligand Interactions. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(6): 2161-2166.
7. Chao-Yang, X., Zhi-Nong, J., Ying, Z., Jia-Jia, L. & Li-Ming, H. (2013). Estrogen Receptor alpha Roles in Breast Cancer Chemoresistance. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(7): 4049-4052.
8. Burns, K. A., & Korach, K. S. (2012). Estrogen receptors and human disease: an update. *Archives of Toxicology*, 86(10), 1491–1504.
9. Jia, M., Dahlman-Wright, K. & Gustafsson, J., A. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29(4): 557-568.
10. Kerdivel, G., Flouriot, G. & Pakdel, F. (2013). Modulation of estrogen receptor alpha activity and expression during breast cancer progression. En Kerdivel, G., Flouriot, G. and Pakdel, F., *Vitamins and Hormones*, 93:135-60. U.S.A.: Academic Press.
11. Lonard, D. M. & O'Malley, B.W. (2012). Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nature Review Endocrinology*, 8(10): 598-604.
12. Jing, L. and Yongfeng, S. (2013). Estrogen and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75: 225-240.
13. Doan, T. B., Eriksson, N. A., Graham, D., Funder, J. W., Simpson, E. R., Kuczek, E. S., Clyne, C., Leedman, P. J., Tilley, W. D., Fuller, P. J., Muscat, G. E. & Clarke, C. L. (2014). Breast cancer prognosis predicted by nuclear receptor-coregulator networks. *Molecular Oncology*. 8(5): 998-1013.
14. Blackshear, P. J. (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochemical Society Transactions*, 30(2):945–52.
15. Brooks, S., A., Connolly, J., E., Diegel, R., J., Fava, R., A. & Rigby, W., F., C. (2002). Analysis of the Function, Expression, and Subcellular Distribution of Human Tristetraprolin. *Arthritis & Rheumatism*, 46(5): 1362-1370.
16. Brewer, B. Y., Malicka, J., Blackshear, P. J. & Wilson, G. M. (2004). RNA sequence elements required for high affinity binding by the zinc finger domain of tristetraprolin: conformational changes coupled to the bipartite nature of AU-rich mRNA-destabilizing motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1):27870–7.
17. Ross, E., A., Smallie, T., Ding, Q., O'Neil, J., D., Cunliffe, H., E., Tang, T., Rosner, D., R., Klevernic, I., Morrice, N., A., Monaco, C., Cunningham, A., F., Buckley, C., D., Saklatvala, J., Dean, J., L. & Clark, A., R. (2015). Dominant Suppression of Inflammation via Targeted Mutation of the mRNA Destabilizing Protein Tristetraprolin. *The Journal of Immunology*, 195(1): 265-276.

18. Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F. C., Blackwell, T. K. & Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 23(6): 1313-24.
19. Schichl, Y., M., Resch, U., Warbinek-Hofer, R. & De Martin, R. (2009). Tristetraprolin Impairs NK-kb/p65 Nuclear Translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(43): 29571-29581.
20. Gu, L., Ning, H., Qian, X., Huang, Q., Hou, R., Almourani, R., Fu, M., Blackshear, P., J. & Liu, J. (2013). Suppression of IL.12 Production by Tristetraprolin through Blocking NF-kB Nuclear Translocation. *The Journal of Immunology*, 191(7):3922-30.
21. Brook, M., Tchen, C., R., Santalucia, T., McIlarth, J., Arthur, J., S., C., Saklatvala, J. & Clark, A., R. (2006). Posttranslational Regulation of Tristetraprolin Subcellular Localization and Protein Stability by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6): 2408-418.
22. Carrick, D., M. & Blackshear, P., J. (2007). Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family member transcripts in normal human tissues and cancer cell lines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(1): 278-285.
23. Liang, J., Lei, T., Song, Y., Yanes, N., Qi, Y., and Fu, M. (2009). RNA-destabilizing factor tristetraprolin negatively regulates NF-kappaB signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43):29383-90.
24. Carman, J., A. & Nadler, S., G. (2004). Direct association of tristetraprolin with the nucleoporin CAN/Nup214. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(1): 445-449.
25. Yu-Lung, S., Shun-Chang, W., Pei-Yu, C., Nien-Yi, L., Yu-Fang, S., Geen-Dong, C. & Ching-Jin, C. (2012). Tristetraprolin Inhibits Poly(A)-Tail Synthesis in Nuclear mRNA that Contains AU-Rich Elements by Interacting with Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1. *PLoS ONE* 7(7): e41313.
26. Barrios-García, T., Tecalco-Cruz, A., Gómez-Romero, V., Reyes-Carmona, S., Meneses-Morales, I., & León-Del-Río, A. (2014). Tristetraprolin represses estrogen receptor α transactivation in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22):15554-65.
27. Brennan, S. E., Kuwano, Y., Alkharouf, N., Blackshear, P. J., Gorospe, M. & Wilson, G. M. (2009). The mRNA-Destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Research*, 69 (12): 5168-5176.
28. Rounbehler, R. J., Fallahi, M., Yang, C., Steeves, M. A., Li, W., Doherty, J. R., Schaub, F. X., Sanduja, S., Dixon, D. A., Blackshear, P. J. & Cleveland, J. L. (2012). Tristetraprolin impairs Myc-induced lymphoma and abolishes the malignant state. *Cell*, 150(1): 563-574.