



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Estudio de las Exportinas CRT y CRM-1 en células derivadas
de cáncer de mama RE α - y RE α +**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA :

SANDOVAL HERNÁNDEZ JOSÉ ANTONIO

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,
UNAM**

ASESOR INTERNO:

M. EN C. EDGAR IVÁN TORRES CORIORILES



Ciudad de Mexico, Agosto, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **SANDOVAL HERNÁNDEZ JOSÉ ANTONIO**, con número de cuenta **309326744**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **28 de agosto de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

VOCAL Dra. ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ*

SECRETARIO M. en C. EDGAR IVÁN TORRES CORIORILES

SUPLENTE Dr. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

SUPLENTE M. en C. ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Estudio de las Exportinas CRT y CRM-1 en células derivadas de cáncer de mama REα- y REα+.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 14 de junio de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se desarrolló en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Programa de Investigación de Cáncer de Mama, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México en el laboratorio C-138 de la **Dra. Angeles Concepción Tecalco Cruz**, con los apoyos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, **UNAM-DGAPA-PAPIIT** No. **IA200916** y por el No. **IA201618**. Y como asesor interno al **M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles** de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, agradeciendo a la UNAM, al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Se reconocen las valiosas observaciones y correcciones del jurado asignado conformado por:

PRESIDENTE	M. en C. Reynalda Roldan Pérez
VOCAL	Dra. Angeles C. Tecalco Cruz
SECRETARIO	M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles
SUPLENTE	Dr. Rodrigo Anibal Mateos Nava
SUPLENTE	M. en C. Ana Roció Rivera Martínez

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.
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.
Dra. Bibiana Ortega Domínguez	Facultad de Química, UNAM.

DEDICATORIAS

A mi madre y padre gracias por el apoyo y confianza brindada estos años, para así poder alcanzar las metas que me he propuesto y seguir adelante en mi vida.

A mi hermana por ser una buena amiga y brindarme también su apoyo en las diferentes etapas de mi vida.

A mis amigos y compañeros de la carrera de biología por los buenos momentos que se pasaron a lo largo de la carrera.

A la Dra. Ángeles Tecalco por todo el apoyo, confianza y oportunidades que me ha brindando para seguir creciendo tanto académicamente y profesionalmente.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Exportacion nuclear de los RNs.....	8
2.2 Las exportinas CRM-1 y CRT.....	11
2.3 Exportación nuclear en cáncer.....	12
2.4El transporte desde núcleo a citoplasma del RE α y PR.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos particulares.....	17
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
7. MATERIAL Y MÉTODO.....	19
7.1 Modelo de estudio.....	19
7.2 Western Blot.....	20
7.3 Fraccionamiento subcelular.....	22
7.4 Inmunoprecipitación.....	23
7.5 Inmunofluorescencia.....	24
7.6 Minipred.....	25

7.7 Transfección.....	27
7.8 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de CRM-1 y CRT.....	27
7.9 Análisis estadístico y densitometría.....	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Expresión de CRM-1 y CRT en tejido mamario normal y cáncer de mama.....	29
8.2 Expresión de CRM-1 Y CRT en cáncer de mama RE α + y RE α -.....	30
8.3 Abundancia de las proteínas CRM-1 y CRT en células derivadas de cáncer de mama RE α + y RE α -.....	30
8.4 Distribución subcelular de las exportinas CRM-1 y CRT en las células MCF-7 y MDA-MB-231.....	32
8.5 Análisis de la asociación de las exportinas CRM-1 y CRT.....	33
8.6 Análisis de asociación endógena de las exportinas CRM-1 y CRT.....	35
8.7 Análisis del receptor nuclear PR, como blanco de la exportina CRT..	36
9. DISCUSIÓN.....	39
10. CONCLUSIONES.....	44
11. PERSPECTIVAS.....	44
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
13. ANEXO.....	51
13.1 Coautoría en el artículo " <i>Differential expression and molecular interactions of chromosome región maintenance 1 and calreticulin exportins in breast cáncer cells</i> ".....	52

ABREVIATURAS

AR Receptor de andrógenos

CM Cáncer de mama

CRM-1 Mantenimiento de la región cromosómica 1

CRT Calreticulina

DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol

DBD Dominio de unión al ADN

FGF Factor de crecimiento de fibroblastos

GR Receptor de glucocorticoides

HER2 Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

IP Inmunoprecipitación

LBD Dominio de unión al ligando

LRH1 Proteína homóloga del receptor hepático 1

LXR Receptor de hígado X

NES Secuencia de exportación nuclear

NGFI-B Factor B Inducido por NGF

PBS Buffer de fosfato salino

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PKI Proteína inhibidora de cinasa

PPAR α Receptor activado por el proliferador de peroxisoma α

PPAR β Receptor activado por el proliferador de peroxisoma β

PPAR γ Receptor activado por el proliferador de peroxisoma γ

PR Receptor de progesterona

RE α Receptor de estrógeno α

RIPA Radioinmunoprecipitación

RNs Receptores nucleares

RXR α Receptor de retinoides X α

RXR β Receptor de retinoides X β

RXR γ Receptor de retinoides X γ

TBS-T Solución salina-tris amortiguadora Tween

TGF Factor transformador del crecimiento

TR α Receptor de hormona tiroidea α

TR β Receptor de hormona tiroidea β

SFB Suero fetal bovino

VDR Receptor de vitamina D

VD Vitamina D

WB Western blot

RESUMEN

CRM-1 (Chromosome region maintenance 1) y CRT (Calreticulina) son dos proteínas que actúan como exportinas para algunos receptores nucleares, además de tener otras funciones críticas para la homeostasis celular. En varios tipos de cáncer, CRM-1 y CRT se encuentran sobreexpresadas sugiriendo un desequilibrio en sus funciones. Sin embargo, la regulación de CRM-1 y CRT como sus implicaciones biológicas, no son completamente conocidas. En este estudio evaluamos a CRM-1 y CRT en el cáncer de mama que expresa al receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) denominado $RE\alpha+$ y en cáncer de mama que no expresa al receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) nombrado también $RE\alpha-$. Se observó una sobreexpresión de *CRM-1* y *CRT* en tumores mamarios, además los niveles de ARNm y proteína de CRM-1 y CRT fueron más elevados en el cáncer de mama $RE\alpha-$ en comparación al $RE\alpha+$. Además, ambas proteínas se distribuyeron tanto en el citoplasma y núcleo en los dos tipos de cáncer. Es importante destacar la identificación de nuevas interacciones de estas exportinas. La primera fue la de CRM-1 con CRT y esta interacción pueda ser necesaria para el transporte de ciertas proteínas. La segunda encontrada es PR en específico con su isoforma A que interacciona con CRT y no con CRM-1, receptor nuclear relevante en el cáncer de mama. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que los niveles de expresión para *CRM-1* y *CRT*, la interacción entre estas exportinas puede ser un elemento importante en el transporte de núcleo a citoplasma de moléculas. Además CRT podría mediar específicamente la exportación de la isoforma A de PR. La desregulación de estos elementos puede tener implicaciones en la progresión del cáncer de mama.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es un grave problema de salud a nivel mundial, y en México es la primera causa de muerte por neoplasias en las mujeres (INEGI 2015). Lo que se sabe del CM es que los estrógenos pueden actuar como carcinógenos, además se ha reportado que en CM se secretan factores de crecimiento entre ellos el TGF, FGF, PDGF que podrían estar activando vías específicas para la síntesis de proteínas responsables del crecimiento y proliferación de las células tumorales, igualmente supresores de tumores como p53 y pRb se han visto mutados alrededor del 30% de los casos de CM, también que el 50 al 85% de pacientes con mutaciones en el gen supresor *BRCA1* desarrollan este cáncer y el oncogén *c-myc* se ha visto incrementado en un 15 a 25% de los pacientes con CM y este oncogén puede ser activado por el RE α (Hernández 2016).

En el 70% de todos los casos de CM se caracterizan por tener alta expresión y actividad del receptor de estrógeno alfa (RE α), el cual es un miembro de la familia de los receptores nucleares (RNs) que clásicamente tienen función de factores de transcripción, su estructura está conformada por un dominio de unión al ligando (LBD) que reconoce a la hormona estradiol, un dominio de unión al ADN (DBD), y dos dominios de función de activación AF-1 y AF-2 localizados en los extremos N- y C-terminal del RE α , encargados del reclutamiento de proteínas correguladoras (Figura 1A) (Olesfsky 2001, Huang *et al* 2010, Roshan-Morini *et al* 2014, Tecalco-Cruz 2018).

La estructura del RE α , le permite desencadenar una vía de señalización genómica, que inicia cuando el ligando se une al receptor, induciendo un cambio

conformacional que favorece su translocación al núcleo, su unión a secuencias específicas del ADN y el reclutamiento de correguladores para llevar a cabo la transcripción de genes, muchos de ellos asociados al desarrollo de tumores mamarios (Bai y Gust 2009). Las terapias endócrinas incluyen el uso de antiestrógenos como el Tamoxifeno y el Fulvestrant que inhiben la actividad del RE α e inducen su degradación, respectivamente, sin embargo, un problema común es la resistencia a estos tratamientos, y los mecanismos implicados no son del todo claros (Chang 2012, Tecalco-Cruz y Ramirez-Jarquín 2017).

El RE α puede localizarse fuera del núcleo celular, tanto asociado a la membrana plasmática después de la modificación postraduccional palmitoilación, asociado con receptores transmembranales o con diferentes proteínas en el citoplasma. Como resultado, el RE α puede mediar varias cascadas de señalización que implican la activación de cinasas, la participación de segundos mensajeros y la activación de otros factores de transcripción, constituyendo vías de señalización no genómicas que han sido relacionadas con la resistencia a las terapias endócrinas (Tecalco-Cruz *et al* 2017). De este modo, la distribución del RE α en el núcleo y citoplasma resulta crítica en el control de sus funciones.

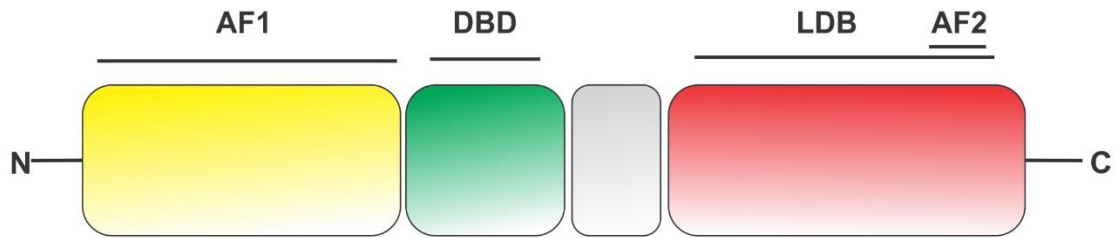
La presencia y ausencia de este RN igualmente es utilizado para una clasificación general del CM ya que como se mencionó el 70% de los casos de CM presentan al RE α y se les denomina RE α + y al 30% restante de le denomina RE α - al no expresar al RE α (Lumachi *et al* 2013).

Por otra parte, cerca del 60% de los tipos de CM RE α +, expresan al receptor de progesterona (PR) de igual manera, y se ha propuesto que la expresión de PR en

estos tipos de cáncer es un indicador positivo de respuesta a las terapias endócrinas (Dunnwald *et al* 2007, Honma *et al* 2014). Se ha reportado que PR tiene tres distintas isoformas, además de ser blanco de modificaciones postraduccionales como fosforilación, y muchas de estas fosforilaciones son específicas para cada isoforma realizadas por diferentes cinasas y así teniendo diferentes funciones entre las isoformas (Figura 1B) (Hagan *et al* 2012).

Además, hay que resaltar que a pesar de que el RE α es importante para la mayor parte de los casos de CM, el 30% de los casos carecen de la expresión de este receptor, y dentro de este grupo se encuentra el cáncer triple negativo, por no expresar al RE α , PR y un receptor transmembranal de nombre HER2, por lo que no se cuentan con tratamientos endocrinos eficientes para este tipo de cáncer, que se caracteriza por ser altamente metastásico. Recientemente se ha reportado la desregulación de otros RNs en CM tanto RE α + y RE α - los cuales podrían estar implicados en el desarrollo tumoral y sensibilidad a las terapias (Lin *et al* 2015). De este modo, diversos RNs podrían ser funcionalmente importantes en CM y su actividad podría ser modulada por su distribución subcelular, en adición a otros mecanismos.

A) Estructura de RE α



B) Estructura de PR

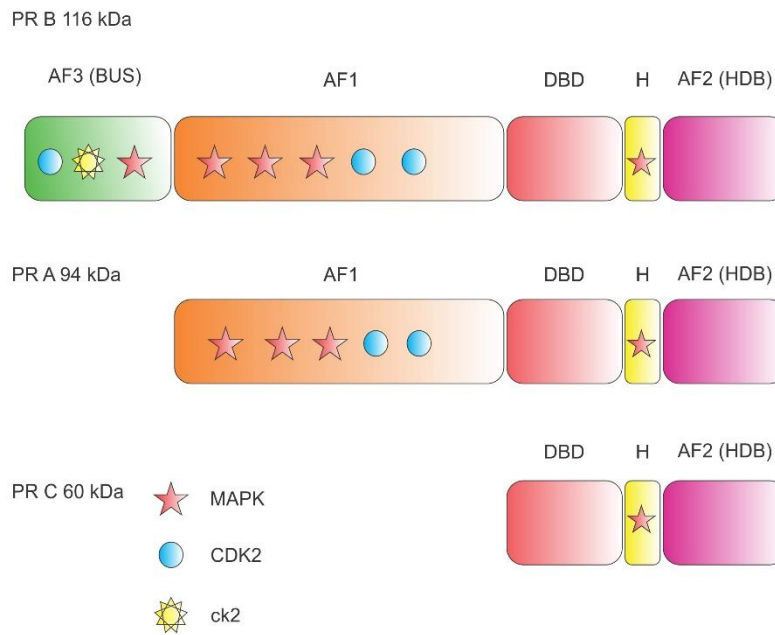


Figura 1. A) Estructura del RE α , mostrando los dominós DBD y LBD, AF-1 en el extremo N-terminal y AF-2 en el extremo C-terminal. B) Esquema de isoformas de PR A, PR B y PR C. Cada isoforma muestra las cinasas que las fosforilan y la región donde ocurre esta modificación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Exportación nuclear de los RNs.

Los mecanismos que se conocen hasta ahora para la regulación de las RNs son: La expresión de estos, modificaciones postraduccionales, su estabilidad a nivel de proteína, reclutamiento de corre reguladores y su transporte de núcleo a citoplasma siendo este último el menos estudiado (Ortega-Domínguez *et al* 2015).

La exportación de los RNs desde el núcleo al citoplasma es un mecanismo de modulación de las funciones nucleares y extranucleares de los RNs (Ortega-Domínguez *et al* 2015, Tecalco-Cruz 2018). El proceso de exportación nuclear requiere de las proteínas denominadas **exportinas**, las cuales se unen a secuencias ricas en leucinas conocidas como **secuencias de exportación nuclear** (NES), que están presentes en las proteínas a transportar. La unión de la exportina, a la proteína a transportar y a RanGTP forma un complejo de transporte, que es liberado fuera del núcleo tras la hidrólisis de RanGTP a RanGDP y una vez terminado este proceso, el complejo se disocia (El-Tanani *et al* 2016, Tecalco-Cruz *et al* 2017).

Para los RNs se ha reportado que el DBD y LBD contienen secuencias ricas en leucinas que tienen función de NES en el transporte núcleo-citoplasma de estos receptores (Black *et al* 2001, Xu *et al* 2012). Las principales exportinas reportadas solamente para algunos de los RNs son **CRM-1** (chromosome region maintenance 1) y **Calreticulin/CRT** (calcium binding protein localized to the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum membranes) (Figura 2). A pesar de ello, estas

exportinas no están relacionadas ni en secuencia ni en estructura. Además, unos cuantos RNs son transportados específicamente por alguna de estas exportinas, mientras que algunos otros ocupan a ambas exportinas (Figura 2), y los mecanismos implicados no son del todo claros de todos los RNs (Figura 3) (Tecalco-Cruz 2018).

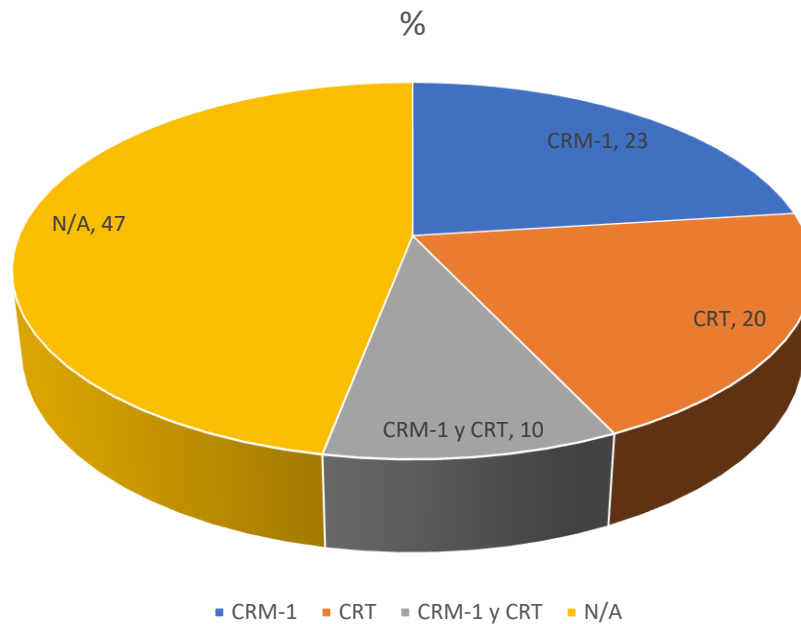


Figura 2. Grafica de RNs exportados por CRM-1, CRT o ambos. En humano se han reportado 48 genes que codifican para RNs. El 23% de estos RN son exportados por CRM-1, el 20% por CRT el 10% podría ocupar diferencialmente ambas, mientras que para el 47% hasta ahora se desconocen sus mecanismos de exportación nuclear.

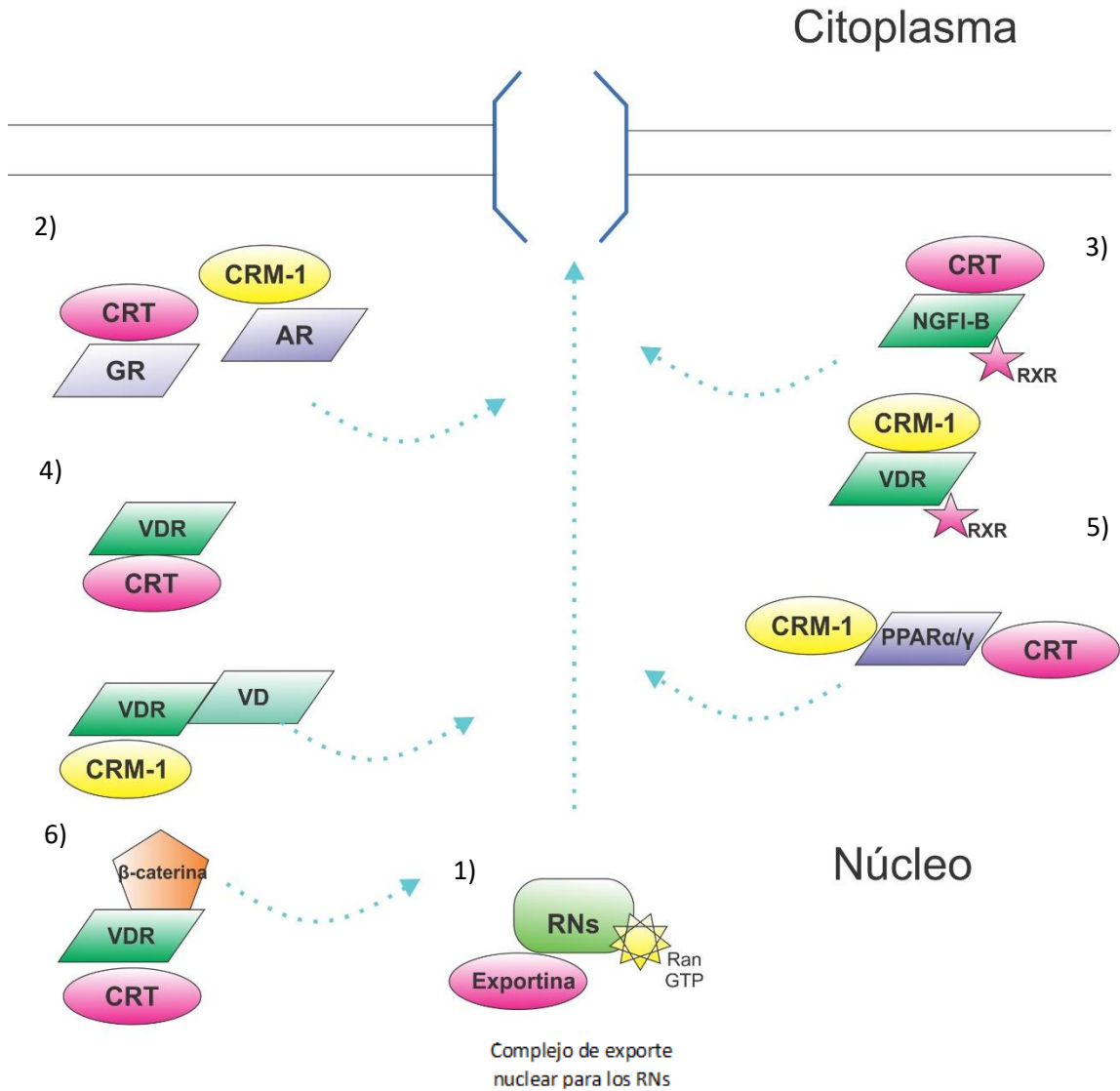


Figura 3. Mecanismos para la exportación nuclear de RNs.

1. Elementos para la exportación nuclear. Un complejo trimérico es formado por Ran-GTP, la exportina y el RNs.
2. Algunos RNs son exportados por CRT y algunos otros por CRM-1.
3. Heterodímeros de RNs con RXR pueden usar diferentes exportinas.
4. La presencia o ausencia del ligando, modificaciones postraduccionales, proteínas adaptadoras e interacciones proteína-proteína específicas pueden regular la exportación nuclear de los RNs en contextos celulares específicos.
5. CRT y CRM-1 podrían usarse alternativamente o cooperativamente para la exportación nuclear de algunos RNs específicos.
6. Los RNs pueden ser excluidos del núcleo junto con otros factores de transcripción.

2.2 Las exportinas CRM-1 y CRT

CRM-1 nombrada igualmente XPO1, y es una proteína de 112 kDa con diversas funciones además de ser una exportina para los RNs, que incluyen el mantener organizada la estructura del cromosoma, la exportación de ARN codificantes y no codificantes, diversos factores de transcripción y otras proteínas (Popa *et al* 2002, Hutten y Kehlenbach 2007, Okamura *et al* 2015), la biogénesis de microRNAs, la unión a la cromatina y la regulación de la expresión génica (Ortega-Domínguez *et al* 2015, Oka *et al* 2016, Martínez *et al* 2017).

En cambio, CRT es una proteína de 49 kDa, que se ha reportado localizada en el retículo endoplásmico, núcleo, citoplasma, y superficie celular, tiene diversas funciones como modular las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, adhesión celular, regulación en estabilidad de ARNm (Eggleton y Michalak 2003, Gold *et al* 2010, Lu *et al* 2015, Ortega-Domínguez *et al* 2015,) La función como exportina de CRT fue inicialmente descrita para la proteína (protein kinase inhibitor) PKI formando el complejo trimérico PKI/CRT/RanGTP en un mecanismo similar al descrito previamente (Holaska *et al* 2001). Posteriormente, se ha reportado que CRT es una exportina para otros RNs que incluyen a GR, LXR, VDR, LRH1, RXR α , RXR β , RXR γ , TR α , TR β , PPAR α , PPAR β , PPAR γ (Tecalco-Cruz 2018).

Por lo tanto, CRM-1 y CRT son proteínas multifuncionales, con una participación central en el transporte núcleo-citoplasma de proteínas, entre ellas RNs.

2.3 Exportación nuclear en cáncer

Lo que se sabe del transporte nuclear en el contexto de cáncer hasta la fecha es muy limitado. Se ha reportado que en una condición normal el transporte de p53, p21, pRb que son supresores de tumores, FOXO un factor de transcripción, hace que estas proteínas se encuentren tanto en núcleo y citoplasma, pero en células de cáncer el transporte se ve afectado provocando una acumulación en el citoplasma de estas moléculas, y para verificar que el transporte nuclear es la posible causa de esta alteración en el transporte en cáncer, se aplicaron inhibidores de CRM-1, (que es una proteína importante en el transporte nuclear) en una condición de cáncer y se observó que las proteínas que se concentraban en el citoplasma ahora se localizaban en el núcleo igualmente, así sugiriendo que en el cáncer el transporte nuclear puede estar alterado y como consecuencia la acumulación de proteínas importantes en el citoplasma y ser este un posible factor para el desarrollo del cáncer (Gravina *et al* 2014) .

Y se ha observado que la expresión de las exportinas CRM-1 y CRT en algunos tipos de cáncer es más elevada con respecto a tejido normal como en el cáncer de colon, cáncer de estómago (Shintani *et al* 2016), cáncer de pulmón (Van Der Watt *et al* 2015), y en CM se sugiere que también se encuentran una mayor expresión de estas exportinas, pero estudios profundos sobre esto no se han realizado.

2.4 El transporte desde núcleo a citoplasma del RE α y PR

Adicionando a lo ya mencionado se ha reportado que el transporte del RE α de núcleo-citoplasma depende de CRM-1 (Lombardi *et al* 2008).

Mientras que de acuerdo con lo reportado PR también se puede expresar en el de cáncer de mama RE α + regulando procesos de proliferación y supervivencia celular del tejido mamario (Hagan *et al* 2012), pero de manera interesante, la expresión de PR en cáncer de mama RE α + también se ha propuesto con un factor positivo en la sensibilidad a la terapia endócrina y mayor tiempo de vida para las pacientes con esta enfermedad (Honma *et al* 2014).

Un estudio indica que su exportación nuclear es independiente de CRM-1, debido a que al utilizar el tratamiento con Leptomicina B, un inhibidor de CRM-1, no se afectaba la salida del núcleo de PR (Tyagi *et al* 1998). Otro trabajo sugiere que la inhibición de la fosforilación de PR por MAPK y de CRM-1 por leptomicina, inducen un incremento de la estabilidad de PR en el núcleo celular (Qiu *et al* 2003).

.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

CRM-1 y CRT son las principales exportinas asociadas al transporte desde el núcleo al citoplasma de los RNs, los cuales funcionan como reguladores de la transcripción, pero también como mediadores de vías de señalización fuera del núcleo. El 70% de los casos de CM conocidos como RE α +, tienen una alta expresión y mayor actividad del RE α , mientras que el 30% restante de los tipos de cáncer de mama denominados RE α -, no expresan al RE α y pueden presentar la desregulación en la expresión y actividad de otros RNs (Lin *et al* 2015). Por lo tanto, en estos contextos patológicos, el transporte núcleo-citoplasma de algunos RNs por CRM-1 y CRT resulta crítico ya que en el cáncer este mecanismo puede estar alterado.

A pesar de que la expresión de ambas exportinas es elevada en distintos tipos de cáncer, en comparación con una condición normal, no ha sido completamente estudiada la expresión y la abundancia de estas exportinas en células derivadas de tumores mamarios RE α - con respecto a las células derivadas de tumores mamarios RE α +, no se conocen otras determinantes moleculares que pudieran afectar su expresión o su función. Esto es importante dado que las células derivadas de cáncer de mama RE α + tienen diferencias entre las RE α -, las RE α + pueden ser responsivas a terapias endócrinas y son menos agresivas. En contraste, las células derivadas de cáncer de mama RE α - tienen una mayor capacidad de migración y no son responsivas a los tratamientos endócrinos. Y al tener varias diferencias entre las RE α + y RE α - podría ser que también los niveles de las exportinas sean distintos en estos tipos de cáncer.

Por tanto, los mecanismos que controlan el transporte núcleo-citoplasma molecular de oncoproteínas, supresores de tumores y otras proteínas importantes como los RNs, podrían estar diferencialmente modulado en células derivadas de cáncer de mama RE α - y RE α +, y en estos procesos las exportinas CRM-1 y CRT son dos participantes centrales. En consecuencia, la regulación de su expresión, de la función y de las interacciones proteína-proteína de estas exportinas, podrían ser cruciales en el contexto de cáncer de mama.

Consiguientemente, este estudio permitirá explorar y analizar las diferencias en la expresión, abundancia de CRM-1 y CRT, así como sus posibles implicaciones en el transporte núcleo-citoplasma de RNs como interacciones de puedan tener las exportinas en células de cáncer de mama RE α - y RE α +

Por lo tanto, nuestras preguntas de interés son:

- ¿Cómo es la expresión, abundancia y distribución subcelular de las exportinas CRM-1 y CRT en células derivadas de tumores mamarios RE α - y RE α +
- ¿Podrían ambas exportinas interactuar para funcionar cooperativamente?
- ¿PR que es importante en cáncer de mama podrían estar asociados a estas exportinas, en particular a CRT?

4. HIPÓTESIS

La expresión, abundancia y distribución subcelular de las exportinas CRM-1 y CRT podría ser diferente en células derivadas de cáncer de mama RE α - y RE α + ya que estos tipos de cáncer tienen varias diferencias entre ellas y los niveles de las exportinas puede ser otra de ellas.

Además, como se ha sugerido que CRM-1 y CRT podrían actuar cooperativamente es posible que interactúen y ser parte de un complejo para la exportación nuclear de RNs.

Adicionalmente, PR, un RN importante en cáncer de mama, podría estar asociada a la exportina CRT al ser una de las exportinas más importantes, ya que si ha visto que es independiente de CRM-1 para su salida del núcleo y CRT podría ser la exportina que interactúe con él para su exporte del núcleo al citoplasma.

5. OBJETIVOS

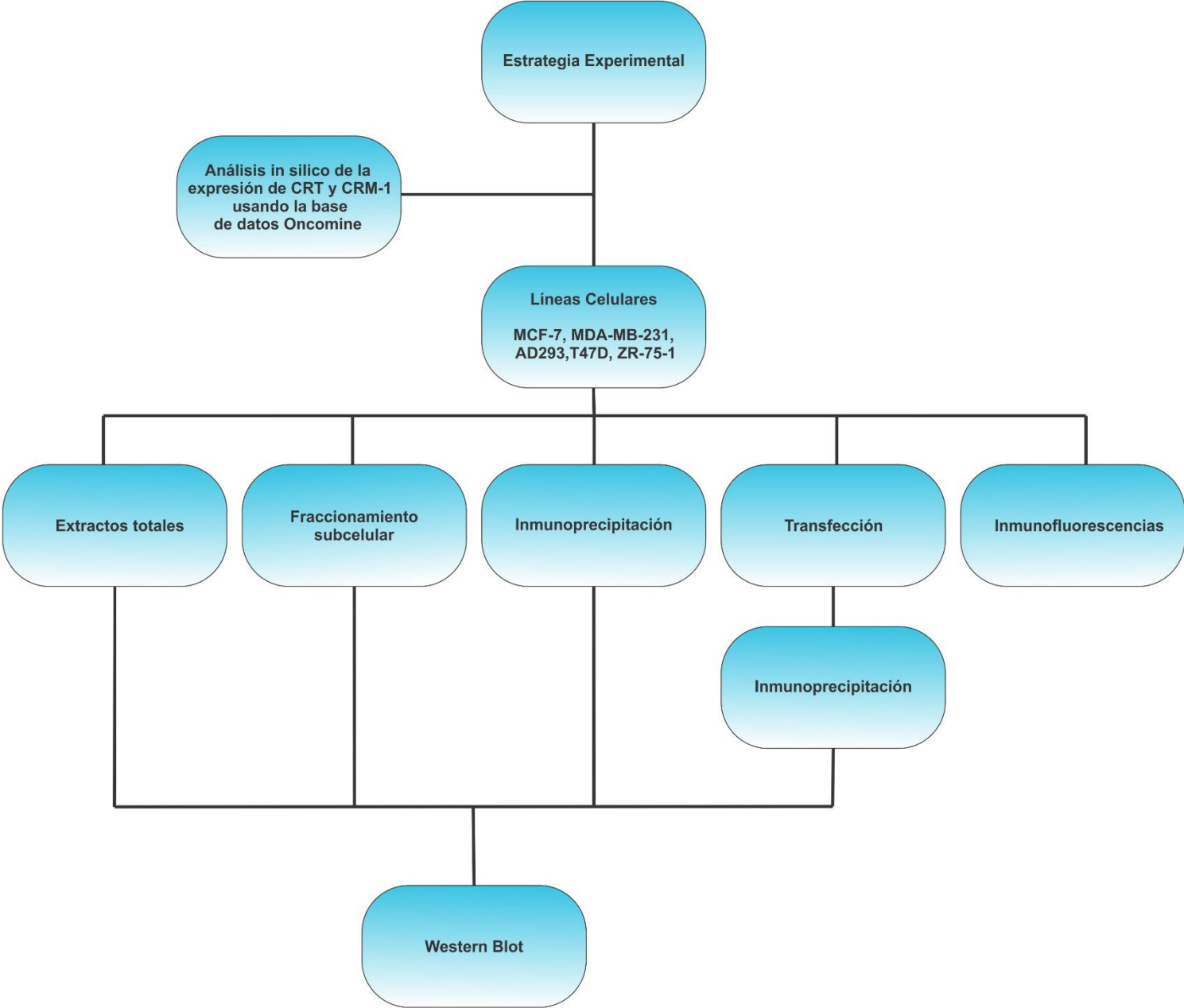
5.1 Objetivo general

Determinar la expresión, abundancia, distribución y asociaciones de CRM-1 y CRT en células derivadas de cáncer de mama RE α - y RE α +

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de CRM-1 y CRT en tumores mamarios RE α - y RE α + con ensayos bioinformáticos con la base de datos *Oncomine*.
2. Determinar la abundancia y distribución subcelular de CRM-1 y CRT en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 por medio de extractos totales y fraccionamiento subcelular evaluados por Western Blot y ensayo de inmunofluorescencia.
3. Analizar la asociación entre las exportinas CRM-1 y CRT por el ensayo de Inmunoprecipitación en líneas celulares AD293, MCF-7 y MDA-MB-231.
4. Evaluar a PR como un posible RN asociado a la exportina CRT por medio de Inmunoprecipitación en líneas celulares T47D y ZR-75-1.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Modelo de Estudio

Se usaron las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1, T47D y AD293 en estado de confluencia de alrededor del 90% de las cajas con medio de cultivo y cada experimento se hizo por triplicado. Las células MCF-7 son una línea de adenocarcinoma derivada de glándula mamaria en proceso metastásico. Esta línea conserva varias características de epitelio mamario diferenciado incluyendo la capacidad de responder a la hormona estradiol a través de la expresión del RE α y expresa a PR (Holliday y Speirs, 2011). En cuanto a la MDA-MB-231 es una línea celular de adenocarcinoma derivado de un derrame pleural, esta línea es triple negativo al no expresar el RE α , PR y al receptor transmembranal HER2. Las AD293 son células embrionarias de riñón humano inmortalizadas y que son un modelo adecuado para transfectar y observar interacciones entre proteínas como se describe más adelante. Las ZR-75-1 y T47D son células derivadas de carcinoma de mama RE α + que expresan en mayor cantidad a PR que las MCF-7. Todas las células fueron cultivadas en medio DMEM al 10% de SFB con antibióticos a 37 °C / 5% de CO₂. Y los anticuerpos primarios anti-CRM-1 (H-300, sc-5595), anti-CRT (H-170, sc-11398) anti-tubulina (B7, sc-5286), así como los anticuerpos secundarios anti-ratón (sc2005) y anti-conejo (sc-2004) conjugados con peroxidasa de rábano picante se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU), el anti-lamina B1 (D4Q4Z) se obtuvo de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.), el anti-Flag (M2, F3165) de Sigma-Aldrich y los secundarios para los ensayos de inmunofluorescencia Alexa Fluor 647 anti-mouse (ab150107) y

Alexa Fluor 488 anti-conejo (ab150073) se obtuvieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido).

7.2 Western Blot

Con el propósito de observar y analizar la abundancia de las proteínas CRM-1 y CRT en las diferentes líneas celulares de CM, se realizó la técnica de Western Blot (WB).

El WB es una técnica utilizada para el estudio de proteínas. Esta permite la detección de proteínas específicas dentro de una muestra biológica por medio de la utilización de un anticuerpo primario que reconoce y se une a un epítipo de la proteína de interés y a través de un anticuerpo secundario unido a una peroxidasa que actúa sobre su sustrato específico generando una señal luminiscente, proporcional a la abundancia de la proteína.

Para realizar esta técnica, se obtuvieron extractos de proteínas totales de las células MCF-7 y MDA-MB-231 usando la solución amortiguadora de lisis TNTE 0.5% (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 5 mM EDTA) con Inhibidores de proteasas. A 50-100 μ g del extracto se le añadió solución Laemmli 6x y posteriormente, las muestras se calentaron a 100 °C por 4 min. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Este gel de bis/acrilamida permite la separación de proteínas de acuerdo con su peso en condiciones desnaturizantes. En primer lugar, las proteínas cargadas negativamente mediante la acción del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) son sometidas a un campo eléctrico y migran al electrodo positivo; debido a que el SDS

igual a la carga negativa de todas las proteínas, estas migran en función de su peso molecular. La concentración del gel de poliacrilamida fue de 7.5%, para visualizar nuestras proteínas de interés que oscilan de 40 a 150 kDa.

Luego del corrimiento de las muestras, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de Polivinildifluoruro (PVDF). Esta membrana es un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo que la hibridación con el anticuerpo se pueda llevar a cabo, la transferencia se realizó a 100 voltios por 80 min. La membrana fue bloqueada durante 1 hora con leche descremada al 5% diluida en TBS-T (TBS 10X 100 mL, Tween-20 1 mL, volumen final 1L)(TBS 10X Tris-base 200mM, NaCl 1.37 M, HCl 1N 38 mM, pH 7.6) para disminuir las uniones inespecíficas, transcurrido el tiempo de bloqueo se incubó con el anticuerpo primario anti-CRM-1 (1:1000), anti-CRT (1:3000), anti-PR (1:1000) (producidos en conejo) o anti-Flag (1:2000) (producido en ratón) en TBS-T, durante toda la noche. Al siguiente día se retiró el anticuerpo primario y se realizó un lavado a la membrana con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) anti-conejo o anti-ratón (1:10,000) dependiendo del primario usado por 1 hora, terminada la incubación se realizaron 3 lavados de 2 min con TBS-T a la membrana y se prosiguió al revelado en un cuarto oscuro, utilizando los reactivos de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) o Immobilon Western HRP Substrate (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) y detectando la señal en placas radiográficas.

7.3 Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular es una técnica que nos permite estudiar un compartimento celular en específico para investigar allí las proteínas de interés. En nuestro estudio es importante separar la fracción nuclear de la citoplasmática y evaluar la distribución subcelular de CRM-1 y CRT basales.

Primero se realizaron cultivos de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231, T47D, ZR-75-1, después se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS frío, a continuación, se retiró el PBS y con ayuda de una solución amortiguadora de homogenización (Sacarosa 250 mM, Imidazol 3 mM) con inhibidores de proteasas se recolectaron las células, esta solución amortiguadora permite que las células se despeguen de la caja de cultivo y mantener condiciones óptimas para la célula. Las células obtenidas se pasaron 15 veces por una aguja de 22G, este homogenizado se centrifugo a 3,400 rpm 10 min a 4 °C hasta formar una pastilla en el fondo del tubo (fracción nuclear), se tomó el sobrenadante (fracción citoplasmática) y se colocó en otro eppendorf, con solución amortiguadora RIPA (Tris-HCl, NaCl, EDTA/ ácido desoxicólico 0.5%, NP-40 1%, dodecilsulfato de sodio 0.1%) se llevó a cabo la lisis de la fracción nuclear y citoplasmática, cada fracción se incubó a 4 °C por 45 min, terminado el tiempo se centrifugo a 14,000 rpm por 5 min a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante de cada fracción, después a 100 µg de estas fracciones lisadas citoplasmáticas y nucleares fueron usadas para la detección de CRM-1, CRT, PR mediante WB.

7.4 Inmunoprecipitación

Esta técnica nos permite buscar interacciones entre proteínas. Se obtuvieron extractos totales, citoplasmáticos y nucleares de la línea celular MCF7, MDA MB-231, ZR-75-1 y T47D como se describió previamente. Una vez obtenido los extractos, se añadió 2 μ L del anticuerpo anti-CRT, a los eppendorf que contenían los extractos correspondientes y se dejaron incubando a 4 °C toda la noche, al día siguiente a cada muestra se le agrego 90 μ L de proteína G(A)-sefariosa, y se dejó incubando durante una hora y media a 4 °C, pasado el tiempo se centrifugo a 14,000 rpm por 10 segundos, se desechó el sobrenadante, y la pastilla (proteína G) que se formó se le realizaron 3 lavados con 1 mL de solución amortiguadora TNTE 0.1% (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X100, 5 mM EDTA) frio, entre cada lavado se centrifugo a 14,000 rpm y el sobrenadante era desechado. Terminado los lavados de la muestra y con ayuda de una punta colibrí se retiró todo el exceso de líquido, una vez seca la pastilla se le agrego 25 μ L de Laemmli 2X , se calentó a 100 °C por 4 min para desnaturalizar por completo a las proteínas, y después se utilizó la técnica de WB como se describió previamente, al haber inmonuprecipitado a CRT usando su anticuerpo específico, y usar el anticuerpo primario anti-CRM-1, anti-Flag o Anti-PR (1:1000) en el WB se observó si existía una interacción entre CRT y CRM-1, Flag-CRM-1 o PR, la incubación del secundario fue anti-conejo o anti-ratón (1:10,000) dependiendo del primario y el revelado se realizó como se describió previamente.

7.5 Inmunofluorescencias

Esta técnica nos permite ver presencia y distribución de proteínas. Para realizar la técnica primero se preparó una caja de 6 pozos con cubreobjetos tratados con polilisina en estos se sembraron las células que se utilizaron en la técnica. La elaboración de la caja con los cubreobjetos tratados con polilisina fue que en cada pozo se colocó un cubreobjetos a estos se les realizó 3 lavados con 1 mL de alcohol etílico, después un lavado con 1 mL de PBS estéril, posteriormente se agregó 1 mL de polilisina a cada pozo con cubreobjetos por 10 min, pasado los 10 min se retiró la polilisina y se lavaron con 1 mL de PBS estéril y se dejó a luz UV por 30 min. Una vez preparada la caja, en cada uno de los pozos se sembraron las células y se dejaron crecer, cuando las células saturaron los cubreobjetos, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS, después de los lavados se fijaron con Paraformaldehído (PFA) al 4% por 8 min, terminada la fijación las células fueron lavadas 3 veces con PBS, posteriormente se permeabilizaron con Tritón-100X al 0.1% por 5 min y así los anticuerpos podrán ingresar a las células, una vez permeabilizadas las células se bloquearon con albumina al 10% por 1 hora para evitar inespecificidad en los anticuerpos, terminado el bloqueo se agregó el anticuerpo primario (anti-CRM-1 y Anti-Flag 1:100) y se dejaron incubando toda la noche a 4 °C, al día siguiente se lavaron las células con PBS tres veces de 5 min cada lavado, y después se colocó el anticuerpo secundario (anti-conejo y anti-ratón 1:750, correspondiente para cada anticuerpo primario) que tiene un fluoróforo en ellos y se dejaron incubando por 1 hora en oscuridad, los siguientes pasos se realizaron en oscuridad, pasada la hora se lavaron con PBS 3 veces de 5 min cada

lavado, por último, se colocaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con DAPI para montarlos, ya montados los cubreobjetos se cubrieron de la luz y fueron observadas al microscopio.

7.6 Minipred

Este procedimiento se realizó con el fin de obtener plásmidos para las exportinas CRM-1 y CRT (Flag-CRM-1 y Flag-CRT) empleados en los experimentos de interacción proteína-proteína. Primero, dichos plásmidos fueron transformados en las bacterias competentes DH5 α mediante choque térmico. Para esto en un tubo eppendorf se agregaron 50 μ L de bacterias competentes y 50 μ L de solución amortiguadora KCM y se agregó el plásmido (Flag-CRT o Flag-CRM-1) incubándose 30 min en hielo. A continuación, se realizó el choque térmico a 42 °C por 2 min, colocando el tubo inmediatamente después en hielo. Se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó la muestra a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó la muestra a 2,000 rpm se desechó el sobrenadante, y en 100 μ L de medio con la pastilla resuspendida se sembraron en una caja Petri con medio LB agar con kanamicina y se incubaron toda la noche a 37 °C, para así asegurarse que solo crecerán bacterias con el plásmido ya que este es resistente a este antibiótico. Posteriormente se seleccionó a una de las colonias y se sembró en un matraz con medio LB (500 mL) y se dejó incubando a 37 °C. Con este cultivo se llevó a cabo el Minipred para la purificación de los plásmidos de las exportinas CRM-1 y CRT.

Para el Minipred se concentraron las bacterias mediante centrifugación (6000 rpm por 7 min). La pastilla se trató con los amortiguadores P1 con ARN asa para resuspender la pastilla, después con el P2 se agitó por inversión y se incubó por 5

min para la lisis alcalina, y finalmente con el P3 para la neutralización también con agitación por inversión incubándose 15 min. en hielo, para su posterior centrifugación.

A una columna del kit Miniprep (Qiagen) para purificar el ADN se le agregó el sobrenadante del centrifugado anterior. La columna previamente se equilibró con 4 mL de QBT (solución amortiguadora de equilibrio). Después de que toda la muestra paso por la columna se agregó 4 ml de QC (solución amortiguadora de lavado) 3 veces para lavar la columna. Finalmente se agregaron 4 ml de solución amortiguadora de elución y se adicionó a la muestra recuperada 3.5 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 12,000 rpm por 40 min recuperando el ADN pastilla. La pastilla que se formó después del centrifugado se lavó con alcohol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 10 min. se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla y por último se agregó a la pastilla agua de grado molecular.

Para asegurarse de que el ADN fue purificado correctamente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (preparado con 0.5 g de agarosa, 50 mL de TAE (40mM Tris, 20 mM acetato, 1mM EDTA) y un 1µl de colorante), en el gel se cargaron las muestras de los plásmidos que se mezclaron con solución amortiguadora de corrida y agua de grado molecular, la electroforesis se realizó a 75 voltios, una vez terminada el gel se observó en un transiluminador de luz UV. El análisis del gel, así como su cuantificación, confirmó que la purificación se llevó correctamente y la calidad del plásmido para ser usado en los experimentos de transfección es la adecuada y así los experimentos de transfección se pudieron realizar de la mejor manera.

7.7 Transfección

De los plásmidos obtenidos del Minipred se usaron para realizar la transfección de Flag-CRM-1 o Flag-CRT, ya que esta técnica nos permite hacer que haya una expresión de proteínas deseadas (CRM-1 y CRT) dentro de la línea celular AD293 para poder observar con la ayuda de la inmunoprecipitación si hay alguna interacción entre estas proteínas, y distinguirla de las proteínas endógenas. En un tubo A se adicionaron 500 μ L de medio sin suero con el ADN (3 μ g del plásmido de Flag-CRM-1 o Flag-CRT) y en otro tubo B se colocó 15 μ L de lipofectamina 2000 con 500 μ L de medio sin suero. Se realizó la mezcla de A con B, se resuspendió suavemente y se dejó reposar por 15 min. Posteriormente la mezcla se adicionó a la caja de células correspondiente. Tras 4 horas de incubación se cambió el medio y se esperaron 48 horas para el procesamiento de las células para la realización de inmunoprecipitación y WB.

7.8 Análisis *in silico* de la expresión de CRM-1 y CRT

Para observar si la expresión de las exportinas CRM-1 y CRT se encuentran desreguladas en los tipos de cáncer RE α + y RE α -, se buscó con la ayuda de la base de datos Oncomine que proporciona información de la expresión de estas proteínas de tumores de pacientes de cáncer de mama RE α + y RE α -.

Para ello dentro de la base de datos Oncomine se utilizó el conjunto de datos (TCGA) para comparar la expresión de CRM-1 y CRT en tejido normal y tumores de cáncer de mama, y después comparar la expresión de CRM-1 y CRT dentro de los diferentes tipos de cáncer RE α + y RE α -.

7.9 Análisis estadístico y densitometría

El análisis estadístico nos permitió ver si en los ensayos *in silico* de la expresión de CRM-1 y CRT, hay diferencia estadísticamente de la expresión de CRM-1 y CRT en tejido normal con respecto a tumores de cáncer de mama, y entre los tipos de cáncer RE α + con respecto a RE α -, para este análisis se usó el programa estadístico GraphPad Prism en su versión 7.04.

La densitometría nos ayudó a analizar de manera cuantitativa la abundancia de CRM-1 y CRT en las células derivadas de cáncer de mama RE α + (MCF-7) y RE α - (MDA-MB-231) y su análisis estadístico de la abundancia de las exportinas se realizó empleando el mismo programa estadístico ya mencionado (la cuantificación es respecto a las células MCF-7, tomando en cuenta que se compararon los datos con respecto a la cantidad de la proteína total de las células MCF-7).

8. RESULTADOS

8.1 Expresión de *CRM-1* y *CRT* en tejido mamario normal y cáncer de mama

Con el objetivo de evaluar y comparar la expresión de *CRM-1* y *CRT* en tumores mamarios con respecto al tejido mamario normal, se realizó un análisis *in silico* utilizando la base de datos *Oncomine*. Esta base proporciona datos reunidos de tumores mamarios analizados de diferentes pacientes para el estudio de la expresión de genes. Para evaluar los niveles de expresión de *CRM-1* y *CRT* en tejidos mamarios normales y tumores de cáncer de mama, se empleó uno de los conjuntos de datos más amplios disponibles en *Oncomine* (TCGA). Al hacer la comparación de los niveles de expresión del ARNm se identificó que la expresión de *CRM-1* y *CRT* en cáncer de mama invasivo desarrollado en los ductos mamarios, es más elevada en comparación con el tejido mamario normal, y esta diferencia es estadísticamente significativa (Figura 4A y 4B).

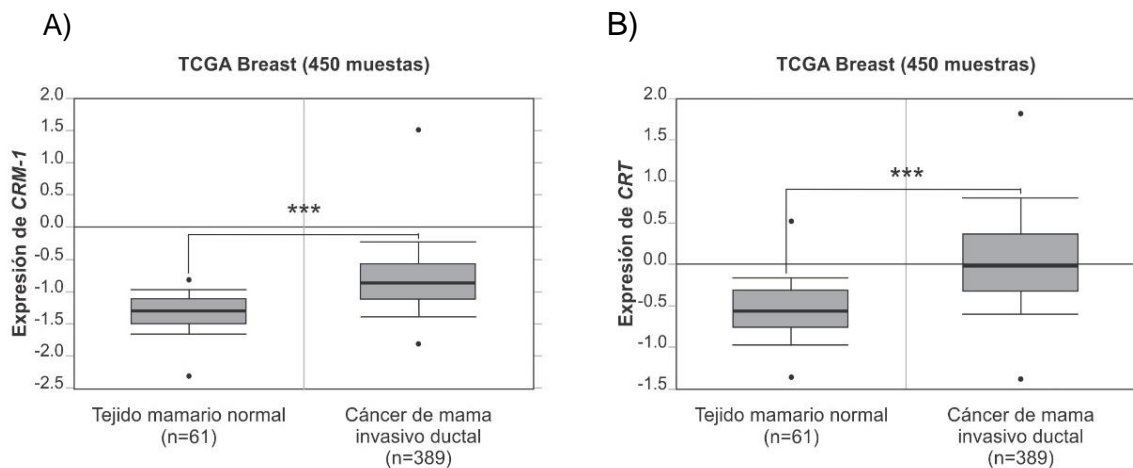


Figura 4. A) Niveles de expresión de *CRM-1* en tejido mamario normal y cáncer de mama invasivo ductal. B) Niveles de expresión de *CRT* en tejido mamario normal y cáncer de mama invasivo ductal.

8.2 Expresión de *CRM-1* Y *CRT* en cáncer de mama RE α + y RE α -

Debido a la sobreexpresión del ARNm de *CRM-1* y *CRT* en cáncer de mama, se analizó *in silico* si en los tipos de cáncer RE α + y el RE α - podría haber alguna diferencia en la expresión de estas exportinas. Se utilizó nuevamente la base de datos *Oncomine* y el conjunto de datos (TCGA), y se analizaron los niveles de expresión de *CRM-1* y *CRT* en tumores mamarios clasificados como RE α - y RE α +. De este modo, se determinó que los niveles de expresión de *CRM-1* y *CRT* fueron mayores en los tumores RE α - que en los tumores mamarios RE α + (Figura 5A y 5B).

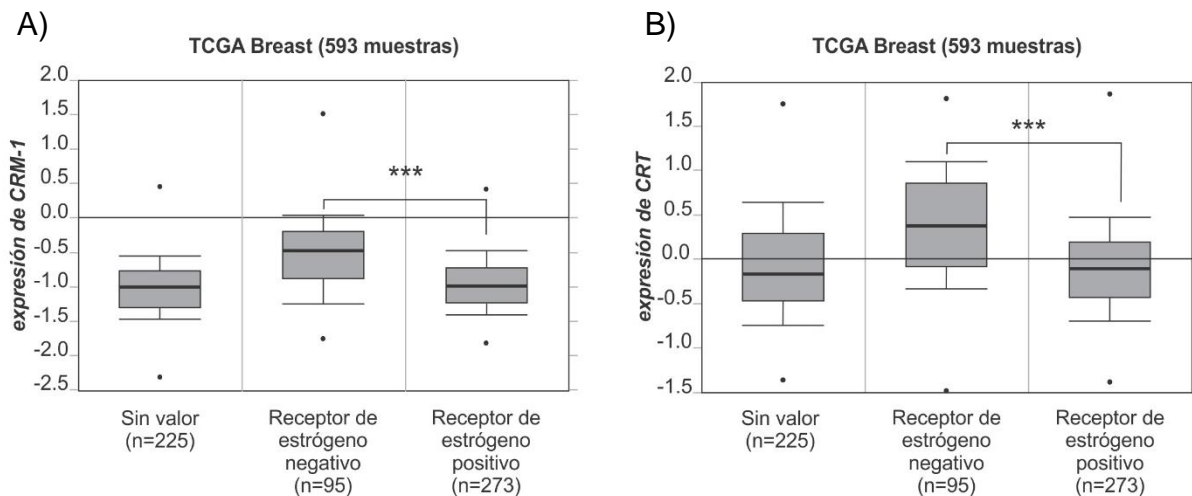


Figura 5. A) Niveles de expresión de *CRM-1* en cáncer de mama RE α - y RE α +. B) Niveles de expresión de *CRT* en cáncer de mama RE α - y RE α +

8.3 Abundancia de las proteínas CRM-1 y CRT en células derivadas de cáncer de mama RE α + y RE α -

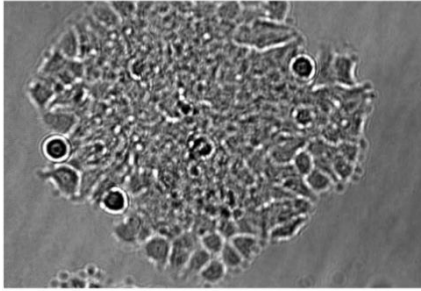
Dado que los niveles de la expresión del *CRM-1* y *CRT* se encontraron sobreexpresados en tumores de cáncer de mama con respecto al tejido normal, y que dentro de los casos de cáncer de mama la expresión de *CRM-1* y *CRT* es mayor en los tumores mamarios RE α - que en los RE α +, se utilizaron líneas celulares

derivadas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 para evaluar si esta diferencia también se encuentra a nivel de proteína. Las células MCF-7 provienen de tumores mamarios RE α +, mientras que las células MDA-MB-231 se derivan de células de cáncer de mama triple negativo, por no expresar al RE α , PR y HER2, las cuales son altamente metastásicas.

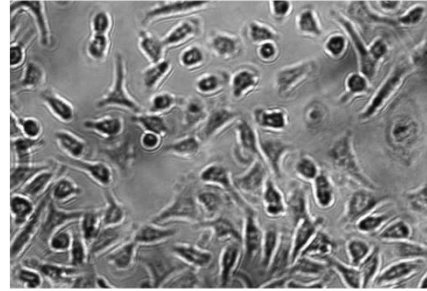
En la figura 6 se aprecia la morfología que tienen las células MCF-7 y MDA-MB-231. Las células MCF-7 presentan una morfología epitelial, observándose agrupadas en colonias. Por otro lado, las células MDA-MB-231 su morfología es de tipo mesenquimal y no forman colonias (Figura 6A y 6B).

Considerando lo anteriormente descrito, se ocuparon estas líneas celulares como modelo de células derivadas de cáncer de mama RE α - y RE α + para analizar la abundancia de las exportinas CRM-1 y CRT. Para ello se utilizaron extractos totales de estas células, y mediante la técnica de WB utilizando anticuerpos específicos se detectaron a las proteínas CRM-1 y CRT, así como a la tubulina, como control de carga. Los resultados mostraron que los niveles de las exportinas CRM-1 y CRT son más elevados en las células MDA-MB-231, con respecto a las MCF-7 (Figura 6C), y la densitometría mostro que la diferencia en la abundancia de las exportinas entre las MCF-7 y MDA-MB-231 es estadísticamente significativo (Figura 6D). Estos resultados sugieren que células derivadas de tumores RE α - presentan mayor abundancia de ambas exportinas que las células derivadas de tumores RE α +

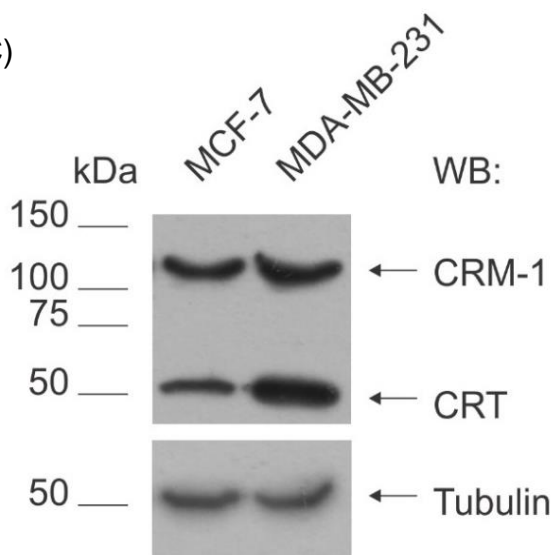
A)



B)



C)



D)

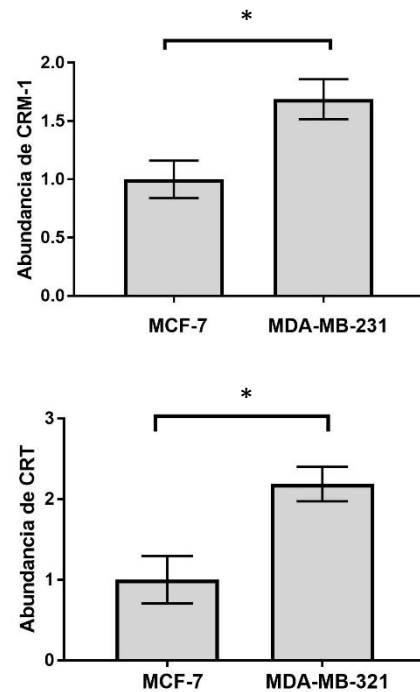


Figura 6. A) Imagen de la morfología de las células MCF-7. B) Imagen de la morfología de las células MDA-MB-231. C) Abundancia de CRM-1 y CRT en células MCF-7 y MD-MB-231 detectado por WB, D) Densitometría de abundancia de CRM-1 y CRT de MCF-7 y MDA-MB-231 (la cuantificación es respecto a las células MCF-7).

8.4 Distribución subcelular de las exportinas CRM-1 y CRT en las células MCF-7 y MDA-MB-231

Considerando que los niveles de las exportinas fueron diferentes entre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se realizó el fraccionamiento subcelular para observar la distribución de CRM-1 y CRT dentro del compartimiento nuclear y

citoplasmático de estas células. Los resultados obtenidos mostraron que tanto en MCF-7 y MDA-MB-231, las exportinas se encontraban en ambos compartimientos celulares. La tubulina se empleó de control de carga para la fracción citoplasmática y la lámina para el control de carga para la fracción nuclear (figura 7A y 7B).

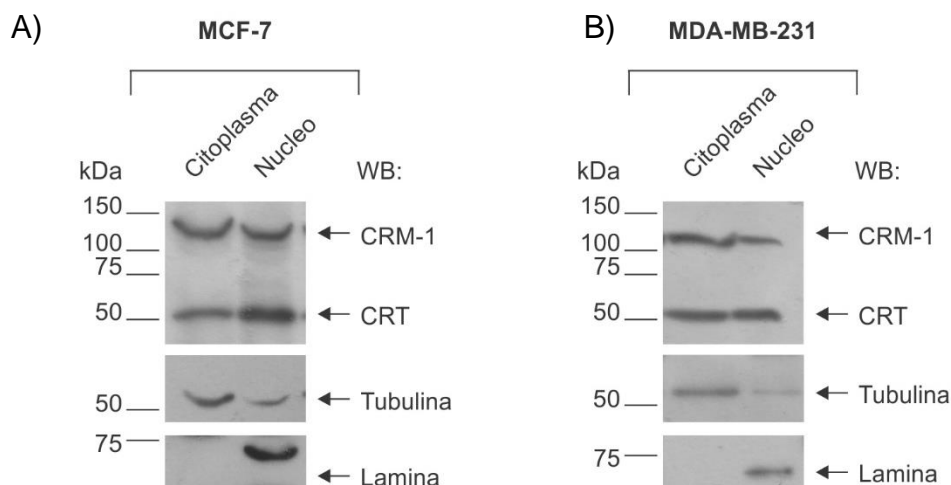


Figura 7. A) Fraccionamiento subcelular de abundancia de CRM-1 y CRT en células MCF-7 detectado por WB. B) Fraccionamiento subcelular de abundancia de CRM-1 y CRT en células MDA-MB-231 detectado por WB.

8.5 Análisis de la asociación de las exportinas CRM-1 y CRT

Una vez que se observó que los niveles de CRM-1 y CRT se encontraban incrementados en las células derivadas de cáncer de mama, y principalmente en el tipo RE α - y que también se encontraban tanto en núcleo-citoplasma, se buscaron posibles interacciones que podrían tener estas proteínas, y que podrían ser importantes dentro del contexto de CM, y en el proceso de la exportación nuclear.

La primera interacción que se planteó fue la de CRM-1 y CRT debido a que la interacción de estas exportinas podría ser necesaria para el transporte nuclear de moléculas específicas, entre ellas, RNs.

Primero se estudió esta posible asociación de CRM-1 y CRT en un sistema transfectado con Flag-CRM1 en las células AD293 (que provienen de células embrionarias de riñón humano). Se empleó la inmunoprecipitación (IP) contra CRT endógena y el WB contra Flag-CRM-1 para ver si esta interacción ocurría cuando ambas proteínas estaban presentes. Como se observa en la figura 8A, Flag-CRM-1 se detectó en la condición donde se transfectó, mientras CRT endógeno se detectó en ambas condiciones. Además, únicamente se observó una banda que corresponde a Flag-CRM-1, en el inmunoprecipitado endógeno contra CRT proveniente de los extractos celulares transfectados. Por lo tanto, este resultado demostró la interacción entre las exportinas Flag-CRM-1 y CRT (Figura 8A).

Subsecuente a la demostración de la interacción que ocurre entre las exportinas CRM-1 y CRT, se realizó una inmunofluorescencia en donde se transfectó a Flag-CRT, y se analizó la localización de la exportina CRM-1 y Flag-CRT. Como resultado, se detectó que la localización de CRM-1 y Flag-CRT se da en ambos compartimientos celulares, sin embargo, ambas proteínas se detectan colocalizadas principalmente en la periferia nuclear y citoplasma (Figura 8B), sugiriendo que estos compartimientos CRT y CRM-1 podrían interactuar para mediar el transporte núcleo-citoplasma de proteínas blanco en común.

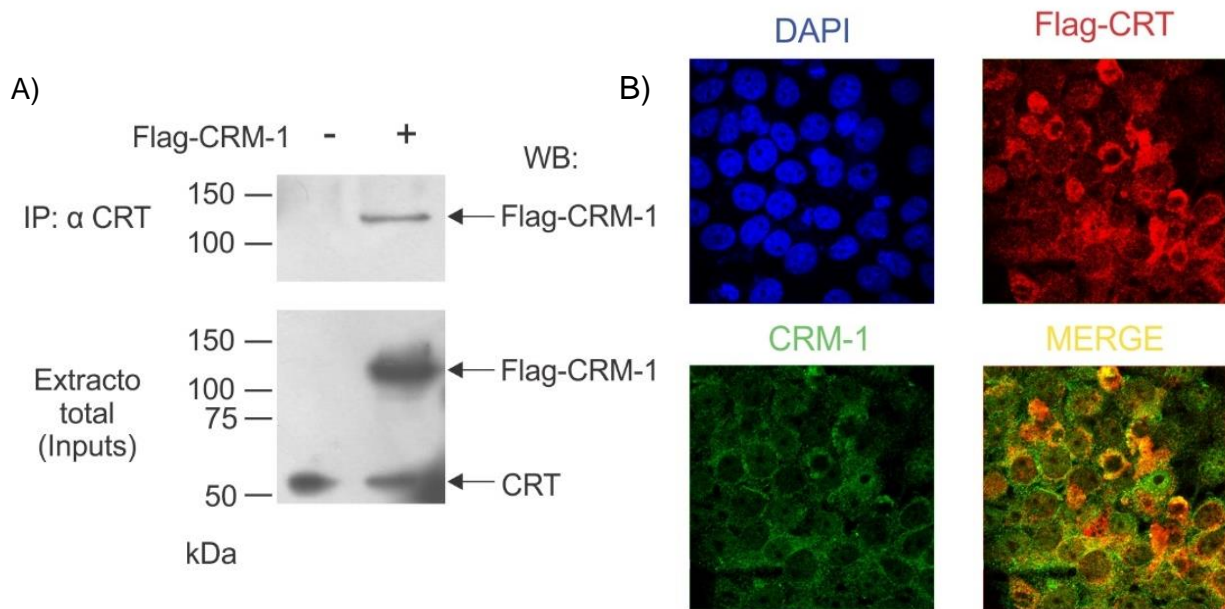


Figura 8. A) Interacción de Flag-CRM-1 y CRT en las células AD293. IP contra CRT y WB contra Flag-CRM-1. B) Colocalización de Flag-CRT y CRM-1 detectada por inmunofluorescencia.

8.6 Análisis de asociación endógena de las exportinas CRM-1 y CRT

Posteriormente, a la determinación de esta interacción entre las exportinas CRM-1 y CRT en un sistema transfectado, se realizó la IP contra CRT y WB contra CRM-1 endógena usando las células AD293. De acuerdo con los controles empleados de IgG y Mock, se demostró que esta interacción entre las proteínas CRM-1 y CRT es específica y también ocurre de manera endógena en estas células (Figura 9A).

Al observar la interacción entre CRM-1 y CRT en una línea celular proveniente de tejido normal de riñón, se analizó la interacción endógena en células de cáncer de mama tanto RE α - y RE α +, utilizando extractos totales (Input) de las células MCF-7 y MDA-MB-231. Se realizó la IP contra CRT y WB contra CRM-1, en ambos casos con sus respectivos controles IgG y mock para confirmar la especificidad de la

interacción, los extractos totales (Input) sirvieron para corroborar la presencia de la proteína CRM-1. En ambos casos los controles nos muestran que no hay bandas inespecíficas y los extractos totales muestran la presencia de CRM-1, mientras que el IP contra CRT indica la interacción de ambas exportinas en las células MCF-7 y MDA-MB-231 (Figura 9B y 9C).

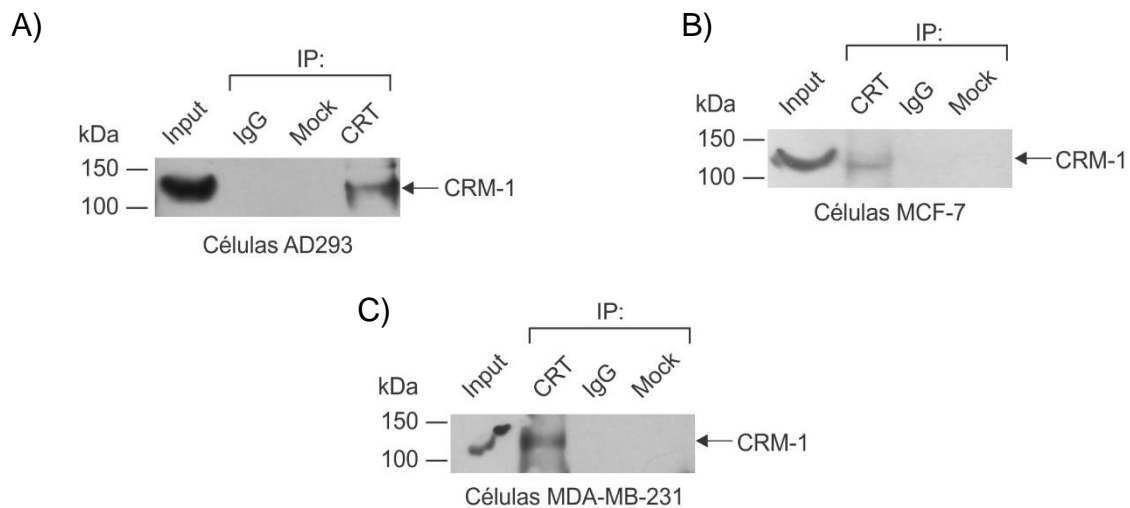


Figura 9. A) Interacción endógena de CRM-1 y CRT en células AD293 detectada por IP contra CRT y WB contra CRM-1. B) Interacción endógena de CRM-1 y CRT en células MCF-7 detectada por IP contra CRT y WB contra CRM-1. C) Interacción endógena de CRM-1 y CRT en células MDA-MB-231 detectada por IP contra CRT y WB contra CRM-1.

8.7 Análisis del receptor nuclear PR, como blanco de la exportina CRT

Una vez que se demostró la asociación de las exportinas CRT y CRM-1, se decidió evaluar un posible blanco de algunas de estas en específico CRT, uno de los posibles blancos que se plantearon para evaluar fue PR por lo descrito anteriormente. Altos niveles de PR son detectados en las células derivadas de cáncer de mama RE α +, T47D y ZR-75-1 en comparación con las MCF-7 (Sweeney E.E. *et al* 2012). Por tal motivo se eligieron estos tipos celulares para los siguientes experimentos.

De acuerdo con lo descrito, se utilizaron los extractos totales sin y con estímulo de 100 nM de progesterona (P4) obtenidos de las células T47D y ZR-75-1 para la detección de PR por medio de WB, así como la interacción de este receptor con la exportina CRT. A través del WB de los extractos totales de estas células, se detectó que nuestro anticuerpo solo reconoció a las isoformas A y B de PR, siendo más abundante la isoforma B (Figura 10A y 10B). Cuando ambos tipos de células fueron estimuladas con P4 durante 2h se observa una disminución de PRA y PRB (Figura 11A y 11B). Estos resultados sugieren que P4 induce la degradación de las isoformas de PR como previamente se ha reportado (Hagan *et al* 2012, Lange *et al* 2000).

Al realizar el ensayo de IP contra CRT y WB contra PR para ver si ocurría la interacción entre estas proteínas, se observó que en ambos tipos celulares ocurre la interacción entre PR y la exportina CRT. Remarcablemente se detectó que esta interacción ocurrió con la isoforma A, pero no con la B, y dicha interacción disminuyó con el estímulo de P4 (Figura 10A y 10B).

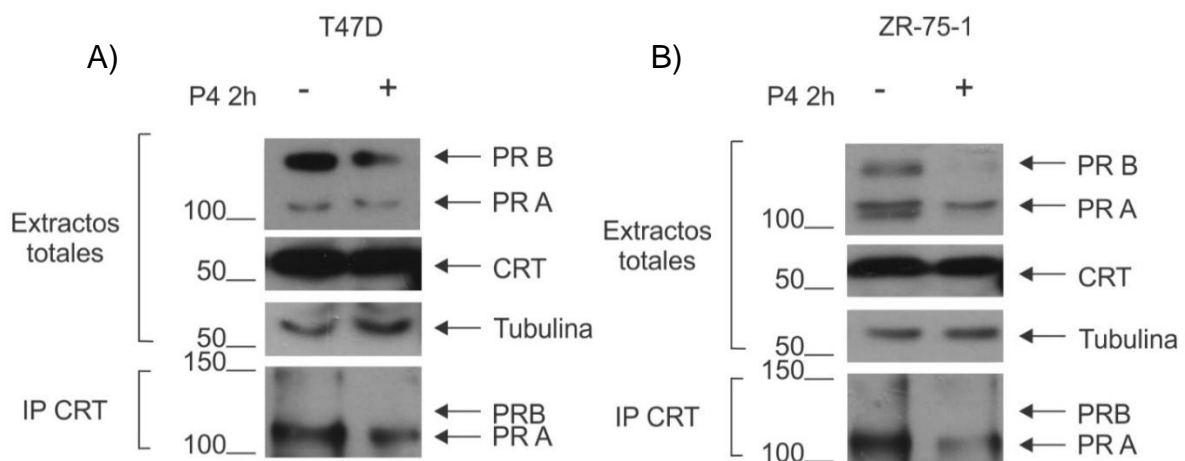


Figura 10. A) WB contra PR y CRT en células T47D con y sin estímulo de P4 y IP contra CRT y WB contra PR. B) WB contra PR y CRT en células ZR-75-1 con y sin estímulo de P4 y IP contra CRT y WB contra PR.

Para finalizar el estudio de esta interacción, se realizó un fraccionamiento subcelular. Para analizar la distribución de las isoformas de PR y la interacción de CRT y PRA en los compartimientos núcleo-citoplasma de las células T47D tratadas con P4 se realizó un fraccionamiento subcelular y IP contra CRT y WB contra PR. Ambas isoformas de PR se encuentran en ambos compartimientos, pero son más abundante en el núcleo celular (Figura 11). Además, se detectó la interacción entre CRT y PRA específicamente en ambos compartimientos celulares (Figura 11).

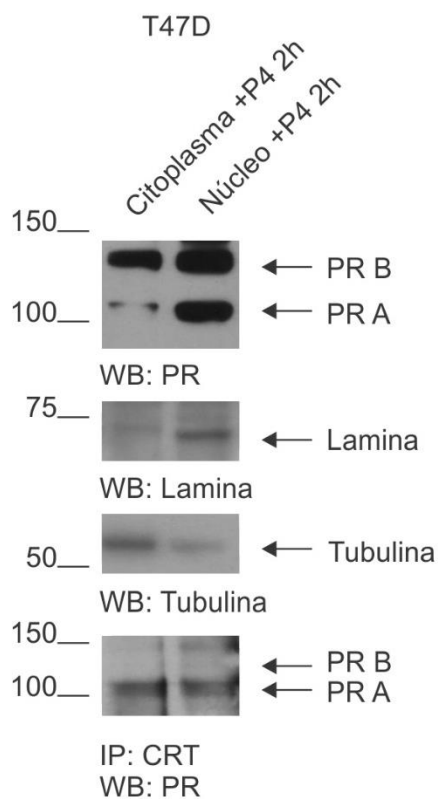


Figura 11. WB contra PR de extractos citoplasmáticos y nucleares de las células T47D estimuladas con P4. IP contra CRT y WB contra PR.

9. DISCUSIÓN

La exportación nuclear es un mecanismo para la regulación de la actividad de diversas moléculas, como ARNs, supresores tumorales y factores de transcripción, dentro de los cuales, destacan los RNs en el contexto de cáncer de mama (Ortega-Domínguez 2015 *et al*, Tecalco-Cruz 2018). Hasta el momento las principales proteínas con función de exportinas reportadas para algunos de los RNs son CRM-1 y CRT, pero los detalles de su mecanismo y su relevancia en cáncer de mama no son completamente conocidos (Tecalco-Cruz 2018).

Es importante notar, que adicionalmente, CRM-1 facilita la exportación de ARN codificantes y no codificantes, factores de transcripción, RNs y otras proteínas, (Popa *et al* 2002, Okamura *et al* 2015), además de participar en la biogénesis de microRNAs y estar involucrado en la unión a la cromatina y en la regulación de la expresión génica (Ortega-Domínguez *et al* 2015, Oka *et al* 2016, Martínez *et al* 2017). En cambio, para CRT se ha identificado a PKI, algunos RNs, y se ha propuesto a la proteína Tax como blanco de exportación (Holaska *et al* 2001, Alefantis *et al* 2007 Oka *et al* 2016, Tecalco-Cruz 2018). CRT también modula las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, la adhesión celular y la estabilidad de ARNm (Eggleton y Michalak 2003, Ortega-Domínguez 2015, Gold *et al* 2010). Con estos datos es posible entender la importancia que tiene el profundizar en los estudios de la regulación de los niveles de CRT y CRM-1, y sus múltiples mecanismos de acción, entre ellos, los mecanismos de exportación para los RNs, los cuales modulan la disponibilidad y las funciones nucleares y extranucleares de los RNs, teniendo repercusiones en los eventos fisiopatológicos en los que participan.

En el cáncer de mama se ha observado que la expresión y actividad de varios RNs están desreguladas (Lin *et al*/2015) (Tecalco-Cruz 2018). Por ejemplo, alrededor del 70% del cáncer de mama presenta una alta actividad del RE α , que dentro del núcleo regula la expresión génica que promueve el desarrollo de tumores, mientras que fuera del núcleo la señalización de este receptor parece estar asociada a la resistencia a las terapias endocrinas (Kudo *et al* 1998, Tecalco-Cruz *et al* 2017). Similarmente, los mecanismos de exclusión nuclear para otros RNs podrían ser también importante en esta enfermedad. Uno de los pasos iniciales para empezar a entender mejor el proceso de exportación de los RNs, es caracterizar el estado de las exportinas involucradas, CRM-1 y CRT, en células de cáncer RE α + y RE α -.

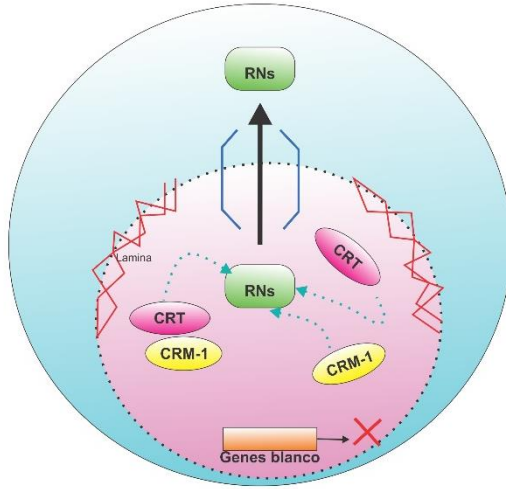
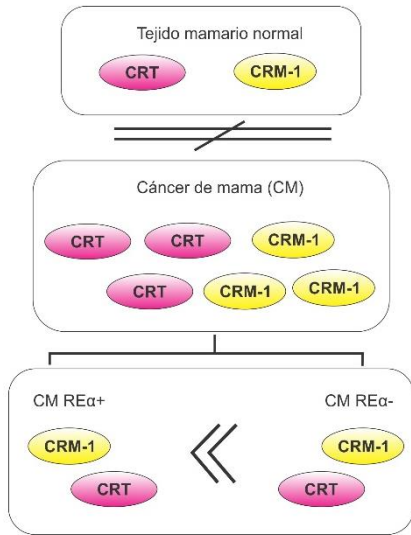
Este proyecto demostró que tanto la expresión de *CRM-1* y *CRT* se encuentran más elevadas en cáncer de mama que en el tejido mamario normal, sugiriendo que CRM-1 y CRT podrían ser potenciales biomarcadores para este tipo de cáncer.

De manera interesante, la expresión y abundancia de estas proteínas se encuentran más elevadas en las de células de cáncer de mama RE α - que en las células RE α +, distribuidas en ambos casos tanto en núcleo como citoplasma. Estos resultados sugieren que el transporte núcleo-citoplasma puede ser diferente en las células derivadas de tumores mamarios que son RE α + con respecto a los que son RE α -. La exclusión fuera del núcleo de factores de transcripción y supresores de tumores podría ser mayor en tumores mamarios RE α - que en los RE α +. Consecuentemente, la incrementada localización extranuclear de algunas proteínas podría estar asociado con el fenotipo más agresivo del cáncer de mama RE α - con respecto al RE α + (Figura 12A).

Las interacciones que puedan tener CRM-1 y CRT podrían tener un papel sustancial en la exportación nuclear en el contexto de cáncer de mama. Una de las interacciones que se propuso, consistió en la asociación que podría existir entre dichas exportinas. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de CRM-1 y CRT se encontró la interacción *in vivo* entre estas exportinas, lo que sugiere que ambas proteínas podrían formar un complejo de exporte nuclear para promover el transporte núcleo-citoplasma de algunas moléculas en específico, en adición a que resulta relevante que ambas exportinas puedan llevar acabo alguna función en conjunto o tener una regulación entre ellas. En un estudio previo *in vitro* usando el ensayo de pull-down se reportó que el receptor de la hormona tiroidea fue exportado por la interacción CRM-1-CRT (Grespin M.E. *et al* 2008). Esto nos puede sugerir que CRM-1 y CRT pueden estar trabajando conjuntamente para llevar el exporte de ciertas proteínas que pueden ser importantes en el desarrollo del cáncer de mama u otras enfermedades. No obstante, la interacción endógena que se detectó de CRM-1 y CRT fue débil, esto nos sugiere que para que esta interacción se pueda llevar acabo, ciertos factores como estímulos, condiciones, o un ambiente celular específico podrían ser necesarios para favorecer la formación de la interacción, teniendo un comportamiento muy dinámico para la exportación de sus proteínas blancas (Figura 12A). Además, en conjunto estos datos, sugieren que algunos RNs podrían ser excluidos del núcleo mediante CRT o CRM-1, y que muchos otros podrían necesitar la interacción de ambas, promoviendo una eficiente salida desde el núcleo al citoplasma.

Por otro lado, PR es otro RNs que se asocia con RE α , y su presencia se relaciona con una mejor respuesta a las terapias endócrinas y mayor tiempo de vida en las pacientes con cáncer de mama (Honma *et al* 2014). Además, se ha reportado que, en respuesta a su ligando, PR es fosforilado en la S294, y es degradado vía el sistema ubiquitina-proteosoma (Lange *et al* 2000). Interesantemente, en este escenario, CRT se asocia específicamente con la isoforma A de PR, tanto en núcleo como en citoplasma, y esta interacción disminuye con el estímulo de P4, por lo que la fosforilación podría ser un factor importante para esta interacción. De este modo, con este trabajo se demostró una nueva interacción entre PRA y la exportina CRT. Dicha interacción podría ser funcionalmente relevante para el transporte núcleo-citoplasma de PRA, y que este mecanismo podría estar ligado a la fosforilación de PRA y su estabilidad, para regular sus funciones y su abundancia nuclear. Así, las isoformas de los RNs, como en el caso de PR que CRT es específico para PR A, podría ser un factor importante en la exportación nuclear dependiente de CRM-1 y CRT (12B).

A)



B)

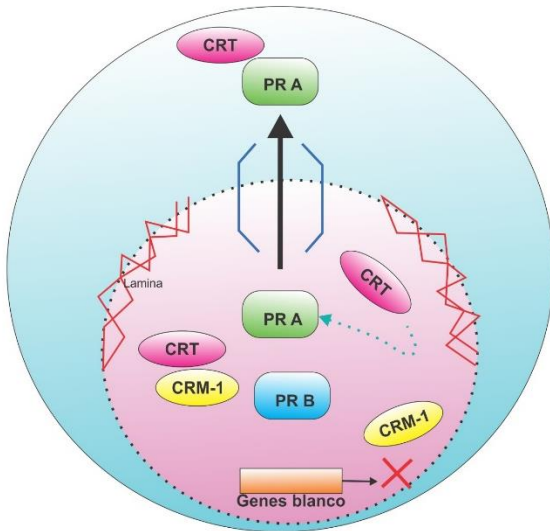


Figura 12. Modelos propuestos.

- A) La expresión de las exportinas *CRT* y *CRM-1* está incrementada en cáncer de mama, principalmente en los tipos ER α -, en los cuales el transporte desde núcleo a citoplasma de RNs y supresores tumorales podría estar más incrementado que en el cáncer de mama ER α +. Los mecanismos de exportación nuclear para los RNs podrían llevarse por tres vías, una dependiente de CRT, otra de CRM-1, y alternativamente otra vía dependiente de ambas exportinas.
- B) PR es un RN cuya presencia es un buen pronóstico para los casos de cáncer de mama ER α +. La isoforma A de este receptor se asocia a CRT, por lo que esta interacción podría ser relevante en la exportación nuclear específica de este receptor.

10. CONCLUSIONES

La expresión y abundancia de CRM-1 y CRT son diferentes entre el cáncer de mama RE α + y RE α -, siendo más elevados en el RE α -, la expresión de estas exportinas podría ser un biomarcador para esta enfermedad al ser más elevados que en una condición normal. Además, ambas exportinas se encuentran en ambos compartimientos celulares en células de cáncer de mama RE α + y RE α -, y pueden asociarse formando un complejo de exportación posiblemente para blancos específicos. Adicionalmente, PR un RNs con importantes implicaciones en cáncer de mama RE α + se asocia con CRT, pero lo hace de manera específica a su isoforma A.

11. PERSPECTIVAS

Demostrar los mecanismos moleculares y la relevancia funcional de la interacción de CRT con PRA en cáncer de mama.

Identificar RNs blanco de exportación para CRT y/o CRM-1 y sus implicaciones en el desarrollo tumoral y en la respuesta a las terapias endócrinas.

Estudiar las implicaciones de estos mecanismos en la respuesta a los tratamientos con inhibidores de CRM-1 que están siendo evaluados en la fase clínica.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alefantis T. Flaig K.E. Wigdahl B. Jain P. 2007. Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 61(4). 194-200.
- Bai Z. Gust R. 2009. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*. 342 (3).133-149.
- Black B.E. Holaska J.M. Rastinejad F. Paschal B.M. 2001. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Current Biology*. 11(12). 1749-1758.
- Chang M. 2012. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomolecules & Therapeutics*. 20(3). 256-267.
- Dunnwald L.K. Rossing M.A. Li C.I. 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 9(1). 1-10.
- Eggleton P. Michalak M. 2003. *Calreticulin*. 2^a edition Plenum Publishers Boston USA. 193-204.
- El-Tanani M. Dakir E. Raynor B. 2016. Mechanisms of nuclear export in cancer and resistance to chemotherapy. 8(3).
- Gravina G.L. Senapedis W. McCauley D. Baloglu E. Shacham S. Festuccia C. 2014. Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 7(1). 85-94.
- Grespin M.E. Bonamy G.M. Roggero V.R. Cameron N.G. Adam L.E. Atchison A.P. Fratto V.M. Allison L.S. 2008. Thyroid hormone receptor alpha1 follows

a cooperative CRM1/calreticulin-mediated nuclear export pathway. *The Journal Biological Chemistry*. 283(37). 25576-25588.

- Gold L.I. Eggleton P. Sweetwyne M.T. Van Duyn L.B. Greives M.R. Naylor S.M. Michalak M. Murphy-Ullrich J.E. 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*. 24(3). 665-683.
- Hagan C. Daniel A.R. Dressing G. E. Lange C.A. 2012 Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 357(1-2). 43-49.
- Hernández D.E. 2016. Biología del cancer de mama, *Revista Venezolana de Oncología*. 28(3). 188-200.
- Holaska J.M. Black B.E. Love D.C. Hanover J.A. Leszyk J. Paschal B.M. 2001. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *The Journal of Cell Biology*. 152(1). 127-140.
- Holliday D.L. Speirs V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*. 13(4). 215-222.
- Honma N. Horii R. Iwase T. Saji S. Younes M. Ito Y. Akiyama F. 2014. Proportion of estrogen or progesterone receptor expressing cells in breast cancers and response to endocrine therapy. *The Breast*. 23(6). 754-762.
- Huang P. Chandra V. Rastinejad F. 2010. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: Insights into physiology and therapeutics. *Annual Review of Physiology*. (72). 247-272.

- Hutten S. Kehlenbach R.H. 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in cell biology*. 17(4). 193-201.
- INEGI. 2015. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. Aguascalientes. INEGI. 1-15.
- Kudo N. Wolff B. Sekimoto T. Schreiner E.P. Yoneda Y. Yanagida M. Horinouchi S. Yoshida M. 1998. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Experimental Cell Research*. 242(2). 540-547.
- Lange C.A. Shen T. Horwitz K.B. 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(3). 1032-1037.
- Lin.M.L. Patel H. Remenyi J. Banerji C.R.S. Lai C.F. Periyasamy M. Ylenia Lombardo I, Busonero C. Ottaviani S. Passey A. Quinlan P.R. Purdie C.A. Jordan L.B. Thompson A.M. Finn R.S. Rueda O.M. Caldas C. Gil J. Coombes R.C. Fuller-Pace F.V. Teschendorff A.E. Buluwela L. Ali S. 2015. Expression profiling of nuclear receptors in breast cancer identifies TLX as a mediator of growth and invasion in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 6(25). 21685-21703.
- Lombardi M. Castoria G. Migliaccio A. Barone M.V. Di Stasio R. Ciociola A. Bottero D. Yamaguchi H. Appella E. Auricchio F. 2008. Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *The Journal of the Cell Biology*. 182(2). 327-340.

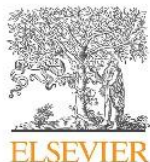
- Lumachi F. Brunello A. Maruzzo M. Basso U. Basso S.M.M. 2013. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 20(5). 596-604.
- Lu Y.C. Weng W.C. Lee H. 2015. Functional roles of calreticulin in cancer biology. *BioMed Research International*. 2015.
- Oka M. Mura S. Yamada K. Sangel P. Hirata S. Maehara K. Kawakami K. Tachibana T. Ohkawa Y. Kimura H. Yoneda Y. 2016. Chromatin-prebound CRM-1 Recruits Nup98-HoxA9 Fusion to Induce Aberrant of Hox cluster gene. *eLife*. 5. 1-21.
- Okamura M. Inose H. Masuda S. 2015. RNA export through the NPC in eukaryotes. *Genes (Basel)*. 6(1). 124-149.
- Olesfsky J.M. 2001. Nuclear receptor minireview series. *Journal of Biological Chemistry*. 276(40). 36863-36864.
- Ortega-Domínguez B. Herrera Martínez. M. Tecalco-Cruz A.C. 2015. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 18(2).131-143.
- Martínez I. Hayes K.E. Barr J.A. Harold A.D. Xie M. Bukhari S.I.A. Vasudevan S. Steitz J.A. DiMaio D. 2017. An Exportin 1 dependent micro RNA biogénesis pathway during human cell quiescence. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(25). E4961-E4970.

- Popa I. Harris M.E. Donello J.E. Thomas J. Hope T.J. 2002. CRM-1 Dependent Function of a *cis*-Acting RNA Export Element. *Molecular and Cellular Biology*. 22(7). 2057-2067.
- Qiu M. Olsen A. Faivre E. Horwitz K.B. Lange C.A. 2003. Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Molecular Endocrinology*. 17(4). 628-642.
- Roshan-Morini M. Hsing M. Butler M.S. Cherkasov A. Rennie P.S. 2014. Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treatment Reviews*. 40(10).1137-1152.
- Shintani M. Tashiro A. Sangawa A. Yamao N. Kamoshida S. 2016. Expression of chromosomal regional maintenance protein-1 may be associated with subcellular survivin expression in human gastric and colorectal carcinoma. *Oncology Letters*. 12(6). 4630-4634.
- Sweeney E.E. McDaniel R.E. Maximov P.Y. Fan P. Jordan V.C. 2012. Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitation. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 9(2). 143-163.
- Tecalco-Cruz A.C. 2018. Molecular pathways involved in the transport of nuclear receptors from the nucleus to cytoplasm. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 178. 36-44.
- Tecalco-Cruz A.C., Perez-Alvarado I.A., Ramirez-Jarquín J.O., Rocha-Zavaleta L., 2017. Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *Cellular Signalling*, 34. 121-132.

- Tecalco-Cruz A.C., Ramirez-Jarquín J.O. 2017. Mechanisms that Increase stability of estrogen receptor alpha in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*. 17(1). 1-10.
- Tyagi R.K. Amazit L. Lescop P. Milgrom E. Guiochon-Mantel A. 1998. Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and Ran Guanosine Triphosphate. *Molecular Endocrinology*. 12(11). 1684-1695.
- Van Der Watt P.J. Zemanay W. Govender D. Hendricks D.T. Parker M.I. Leaner V.D. 2014. Elevated expression of the nuclear export protein, Crm1 (exportin 1), associates with human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*. 32(2). 730-738.
- Xu D. Farmer A. Collett G. Grishin N.V. Chook Yuh Min. 2012. Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Molecular Biology of the Cell*. 23(18). 3677-3693.

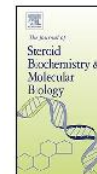
13. ANEXO

13.1 Coautoría en el artículo *"Differential expression and molecular interactions of chromosome region maintenance 1 and calreticulin exportins in breast cancer cells"*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Differential expression and molecular interactions of chromosome region maintenance 1 and calreticulin exportins in breast cancer cells

Eduardo Cruz-Ramos¹, Antonio Sandoval-Hernández¹, Angeles C. Tecalco-Cruz*

Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal, México D.F. 04510, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Chromosome region maintenance 1
Calreticulin
Nucleo-cytoplasmic transport
Exportins
Breast cancer
Estrogen receptor alpha

ABSTRACT

Chromosome region maintenance 1 (CRM-1) and calreticulin (CALR) are two proteins that act as exportins for some nuclear receptors, in addition to other critical functions for cellular homeostasis. In several cancer types, CRM-1 and CALR are upregulated suggesting an imbalance in their functions. However, the regulation of CRM-1 and CALR, and their biological implications, are not completely known. Here, we evaluated the interplay between the levels of CRM-1 and CALR, and estrogen receptor alpha (ER α) status, in breast cancer cells. CRM-1 and CALR were upregulated in mammary tumors relative to normal mammary tissue. Furthermore, the mRNA and protein levels of CRM-1 and CALR were higher in breast cancer cells lacking ER α , in comparison with those that express ER α . Additionally, both proteins were distributed in the nucleus and cytoplasm in the two cell types. Importantly, we identified novel interactions for these exportins. First, we showed an interaction between CRM-1 and CALR, and then we identified that SUN1 and SUN2, two proteins localized in the nuclear envelop, were able to interact specifically with CRM-1, but not CALR. Interestingly, *SUN1* and *SUN2* expression seemed to be decreased in breast cancer, thereby affecting the interactions of these proteins with CRM-1, and possibly its actions as an exportin. Thus, our data suggest that expression levels for CRM-1 and CALR, the interaction between these exportins, and specific interactions of SUN1 and SUN2 with CRM-1 but not CALR, may be central elements in nucleo-cytoplasmic transport. Furthermore, deregulation of these elements may have serious implications in the progression of breast and other types of cancer.

1. Introduction

Chromosome region maintenance 1 (CRM-1) and calreticulin (CALR), are the main exportins associated with nucleo-cytoplasmic transport for nuclear receptors (NRs). The sequence and structure of CRM-1 are not related to CALR, and their function as exportins seems to be specific for each NR and cell context because nuclear export for certain NRs is promoted by CRM-1 or CALR and, in some special cases, by both exportins [1–3].

CRM-1 (also named exportin 1 or XPO1) recognizes the nuclear export signal (NES) of proteins and interacts with the RanGTP protein, forming the target protein/CRM-1/RanGTP complex in order to export target proteins out of the nucleus. When CRM-1 interacts with nucleoporins, RanGTP is hydrolyzed to RanGDP facilitating the process of nuclear export [4–6]. Some NRs, including estrogen receptor alpha (ER α), mineralocorticoid receptor, androgen receptor, and orphan receptors such as nerve growth factor 1B and nuclear receptor related 1

protein, have been reported to be exported by CRM-1. However, CRM-1 exportin also mediates the nuclear export of many other transcription factors and RNAs [2,5–10]. Additionally, CRM-1 binds to chromatin, is associated with the modulation of gene transcription, and is involved in microRNA biogenesis [11–13].

Leptomycin B is an inhibitor of CRM-1 by binding covalently to cysteine 528 residue of CRM-1, inhibiting its binding to the NES of its target proteins, and subsequently avoiding CRM-1-dependent nuclear export [14–16]. Interestingly, novel CRM-1 inhibitors that have lower toxicity than leptomycin B, such as CBS9106 and selinexor, have been studied in preclinical trials for the treatment of several cancer types with promising results. As a consequence, these inhibitors continue to be investigated intensely [15–18].

CALR is a protein distributed in the endoplasmic reticulum, cytoplasm, nucleus, and on the cellular surface. Some of its multiple functions are the regulation of intracellular calcium concentrations, its activity as a chaperone in protein folding, and its activity as an exportin

* Corresponding author.

E-mail address: atecalco@iibiomedicas.unam.mx (A.C. Tecalco-Cruz).

¹ The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.003>

Received 10 February 2018; Received in revised form 29 June 2018; Accepted 4 July 2018
0960-0760/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Cruz-Ramos, E., Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.003>

[19–23]. Initially, CALR was described as an exportin for protein kinase inhibitor (PKI), forming a trimeric PKI/CALR/RanGTP complex in a similar manner to the nuclear export mechanism used by CRM-1. Later, CALR was proposed as an exportin of the TAX protein and some NRs, such as the glucocorticoid receptor, liver X receptor, vitamin D receptor, and liver receptor homologous protein 1. Additionally, CRM-1 and CALR appear to act in cooperative or alternative manners for the nuclear export of some NRs such as thyroid hormone receptor α/β and peroxisome proliferator activated receptor α/β , respectively [1–3,19,24–28]. Therefore, CRM-1 and CALR are relevant multi-functional proteins with a central role in the nuclear export of NRs.

Although the expression of *CRM-1* and *CALR* is commonly upregulated in several cancer types including breast cancers [20,29–33], other molecular determinants that could affect their functions are not known. Here, we evaluated the expression, abundance, and subcellular distribution of CRM-1 and CALR in ER α + and ER α - breast cancer cells, and determined new interactions for these two exportins. The results suggest that the regulation of CRM-1 and CALR may be critical and differ in ER α - and ER α + breast cancer, and in normal mammary tissue.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines, reagents, and antibodies

MDA-MB-231 (human breast cancer ER α -/PR-/HER2-), MCF-7 (human breast cancer ER α +), and AD293 (human embryonic kidney) cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin/streptomycin) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), AMRESCO-VWR (Solon, OH, USA), and Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Anti-CRM-1 (H-300, sc-5595), anti-CALR (H-170, sc-11398), and anti- α -tubulin (B7, sc-5286) primary antibodies, as well as anti-mouse (sc-2005) and anti-rabbit (sc-2004) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The anti-lamin B1 antibody (D4Q4Z) was obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-GFP from Clontech (Mountain View, CA, USA) (full-length 632592), and anti-Flag (M2, F3165) from Sigma-Aldrich. Secondary Alexa Fluor 647 anti-mouse (ab150107) and Alexa Fluor 488 anti-rabbit (ab150073) antibodies were obtained from Abcam (Cambridge, UK).

2.2. Subcellular fractionation and total cell extracts

For obtaining nuclear and cytoplasmic fractions, a protocol described previously was used [34]. First, cells were homogenized in homogenization buffer (250 mM sucrose, 3 mM imidazole, and protease and phosphatase inhibitors) and then passed through a 22-gauge needle 12 times for MCF-7 cells or 15 times for MDA-MB-231 cells. Cells were centrifuged at 3400 rpm for 10 min to separate the cytoplasmic fraction from the pellet (nuclear fraction). Radioimmunoprecipitation (RIPA) lysis buffer (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0.5% deoxycholic acid, 1% NP-40, and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) was used for lysis at 4 °C for 45 min.

For total cell extracts, RIPA or TNTE (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1 mM EDTA) lysis buffer was used with protease and phosphatase inhibitors. The Bradford method was used for protein quantification. About 100 μ g of protein were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for immunoblotting. Primary antibodies dilutions used were 1:1000 for anti-Flag, and 1:3000 for anti-CRM-1, anti-CALR, anti-Tubulin, anti-Lamina and anti-GFP. Secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit were used 1:10,000. Proteins were detected with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific) or Immobilon Western HRP Substrate (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Experiments were performed in triplicate and representative images are shown.

2.3. Co-immunoprecipitation assays

Cells were lysed with RIPA or TNTE lysis buffer as described above. Proteins were immunoprecipitated with specific anti-CALR (Santa Cruz Biotechnology) or anti-GFP (Clontech) antibodies (using 0.6 μ g of each antibody). The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE followed by immunoblotting with specific primary antibodies. The experiments were performed in triplicate and representative images are shown.

2.4. Transient transfections

Flag-hCRM1 was a gift from Xin Wang (Addgene plasmid #17647) [35]. The Flag-CALR plasmid was a gift from Dr. Martha Robles Flores (Facultad de Medicina, UNAM) [36], and the GFP-SUN1 and GFP-SUN2 constructs were gifts from Dr. Kyle J. Roux (Sanford Children's Health Research Center, Sanford Research, Sioux Falls, SD, USA) [37]. Cells were seeded, grown to 70% confluence, and transiently transfected with plasmid DNA using the Lipofectamine 2000 method according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.5. Immunofluorescence assay

Glass coverslips were coated with poly-L-lysine in six-well culture plates in which the cells were seeded. Cells were fixed for 10 min at room temperature using 4% paraformaldehyde, then permeabilized for 10 min at 4 °C with 0.1% Triton-X100 and blocked with 10% horse serum in phosphate-buffered saline for 1 h at room temperature. Fixed cells were incubated overnight with anti-CRM-1 or anti-CALR (1:100) antibodies, followed by three washes, then incubation with the secondary antibody (1:750) for 1 h in the dark. The slides were prepared using ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific), and studied using confocal laser microscopy imaging, and Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) for the analysis.

2.6. Bioinformatics

For evaluating the expression levels of *CRM-1* and *CALR* between normal tissue and mammary ER α + and ER α - tumors from patients, the cancer microarray database *Oncomine* (www.oncomine.org) was consulted. From *Oncomine*, the data sets selected were The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Curtis, which encompass a large number of patients.

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Densitometry for WB and co-localization percentage were performed using Fiji-ImageJ. Statistical analysis were performed with two-tailed unpaired Student's *t*-test using GraphPad Prism 5 software. Results were expressed as significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

3. Results

3.1. CRM-1 and CALR are upregulated mainly in ER α - breast cancer

To investigate the expression of *CRM-1* and *CALR* mRNA in human mammary tumors, we analyzed the *Oncomine* database and selected datasets with larger numbers of patients: the TCGA and Curtis data sets. These analyses showed that mRNA levels for *CRM-1* and *CALR* were significantly higher in mammary tumors than in normal mammary tissue (Fig. 1A, B). Then, we explored whether the levels of *CRM-1* and *CALR* mRNA were affected by the status of ER α in mammary tumors. According to the TCGA data set, *CRM-1* and *CALR* mRNA levels were elevated in ER α - mammary tumors in comparison with ER α + tumors (Fig. 1C, D). The Curtis data set showed that the expression of both

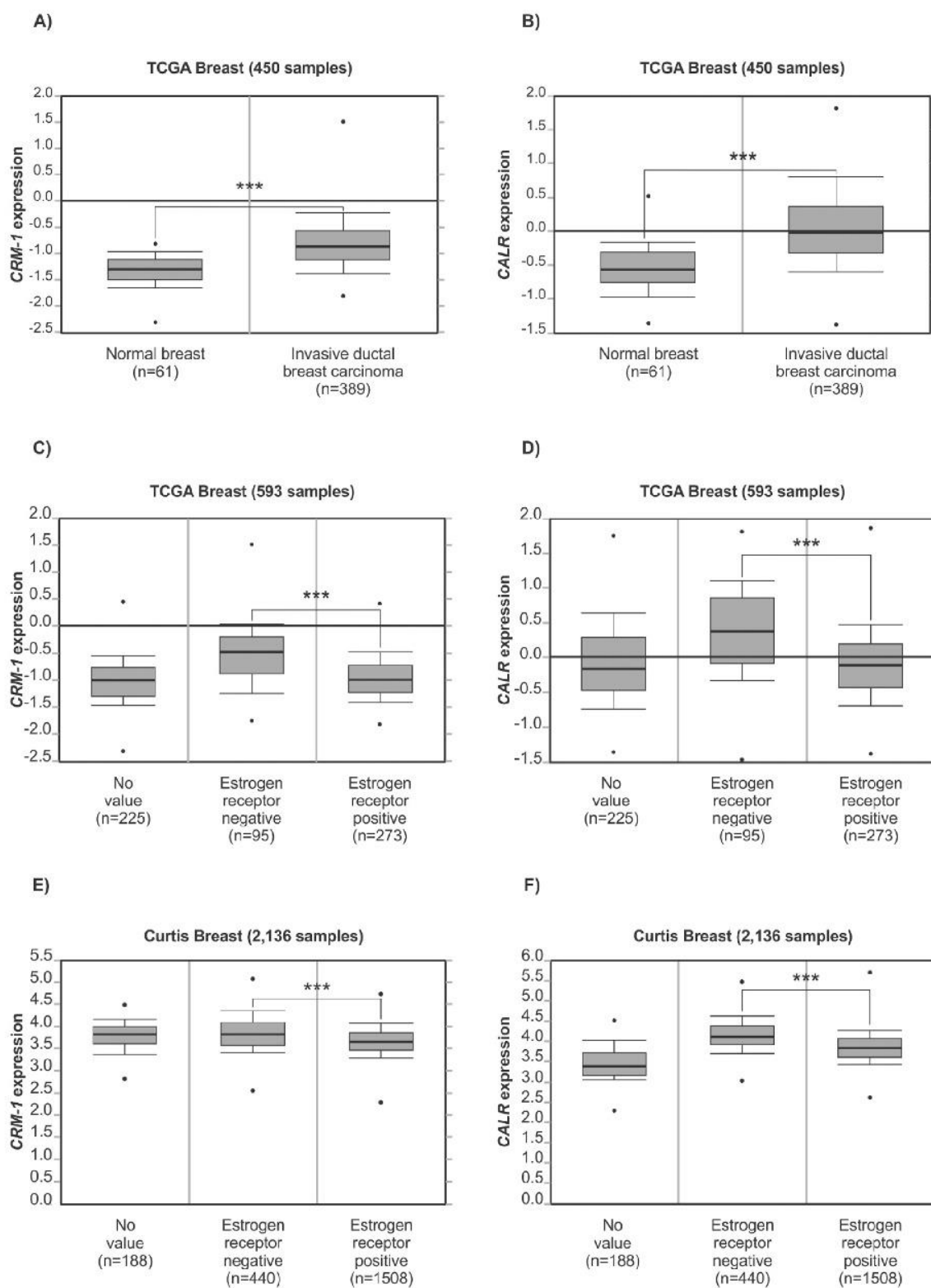


Fig. 1. Chromosome region maintenance 1 (*CRM-1*) and calreticulin (*CALR*) expression in mammary tumors and normal mammary tissue. (A, B) Analysis of *CRM-1* and *CALR* mRNA expression levels in normal mammary tissue and mammary tumors of patients. (C-F) *CRM-1* and *CALR* mRNA expression levels in ER α - and ER α + mammary tumors from breast cancer patients. The analyses used the TCGA (A-D) or Curtis (E and F) data sets. It was considered as significant a *p*-value < 0.001 (***).

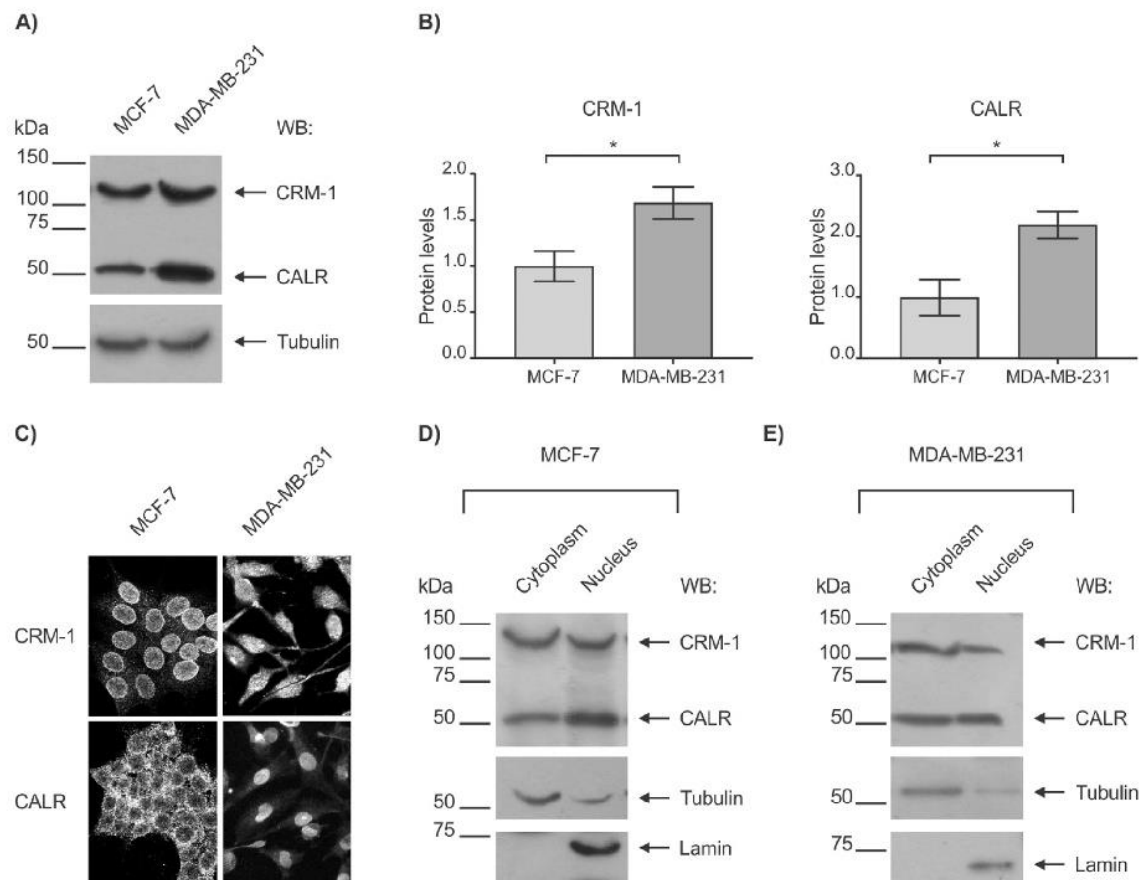


Fig. 2. Levels of chromosome region maintenance 1 (CRM-1) and calreticulin (CALR) proteins and their subcellular distribution in ER α + and ER α - breast cancer cells.

(A) CRM-1 and CALR protein levels were detected by western blot (WB) in total protein extracts from MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (B) Densitometry analysis is shown in the graphics. Results were expressed as significant when $p < 0.05$ (*). (C) CRM-1 and CALR localization was evaluated by immunofluorescence. (D, E) The distribution of CRM-1 and CALR was also evaluated in the nuclear and cytoplasmic fractions from (D) MCF-7 and (E) MDA-MB-231 cells.

exportins was moderately higher in ER α - than ER α + breast carcinomas (Fig. 1E, F).

Based on these results, we decided to investigate the abundance and distribution of CRM-1 and CALR in both breast cancer types using the breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines which are ER α + and ER α -, respectively. Total extracts from these cells were used to perform immunoblot assays to detect endogenous CRM-1 and CALR proteins, with tubulin as the control. The results showed that the total levels of both proteins were significantly enhanced in MDA-MB-231 compared with MCF-7 cells (Fig. 2A and B).

The distribution of CRM-1 and CALR to the cytoplasm and nucleus was observed in MDA-MB-231 and MCF-7 cells through immunofluorescence assays using antibodies specific for these proteins (Fig. 2C). We also analyzed the subcellular distribution of CRM-1 and CALR by immunoblotting subcellular fractions of breast cancer cells using the detection of lamina as the control of the nuclear fraction, and tubulin as the control for the cytoplasmic fraction. Both proteins were present outside and inside the nucleus (Fig. 2D, E).

Together, these results indicate the potential of using CRM-1 and CALR as biomarkers in breast cancer cells and suggest that participation of these exportins is critical in the molecular transport that may be enhanced mainly in ER α - breast cancer cells.

3.2. The CALR protein associates with CRM-1

Our data suggested differential regulation in ER α - and ER α + breast cancer cells. Thus, we investigated new protein-protein interactions for CRM-1 and CALR that could be potentially relevant in the context of breast cancer. Because both CRM-1 and CALR have a common function as exportins, we evaluated the possible interaction between both proteins (Fig. 3).

Our first strategy was the exogenous expression of Flag-CRM-1 in AD293 cells, which have a high transfection efficiency. We immunoprecipitated endogenous CALR and performed an immunoblot to detect Flag-CRM-1 using an antibody specific for Flag. This revealed a band indicating the interaction between CALR and CRM-1 only when Flag-CRM-1 was transfected. While endogenous CALR was detected in both conditions, Flag-CRM-1 was detected exclusively when it was transfected, validating the specificity of the interaction between CALR and Flag-CRM-1 *in vivo* (Fig. 3A). Similarly, MCF-7 breast cancer cells were transfected with Flag-CRM-1, and an immunoprecipitation assay for CALR was performed with an immunoblot for Flag-CRM-1. The result confirmed a specific interaction between Flag-CRM-1 exportin and endogenous CALR in breast cancer cells (Fig. 3B). We also detected a weak endogenous interaction between CRM-1 and CALR proteins in AD293 cells (Fig. 3C), suggesting that this interaction may also be important in other cellular contexts. Subsequently, we used total protein extracts from MCF-7 and MDA-MB-231 cells to immunoprecipitate

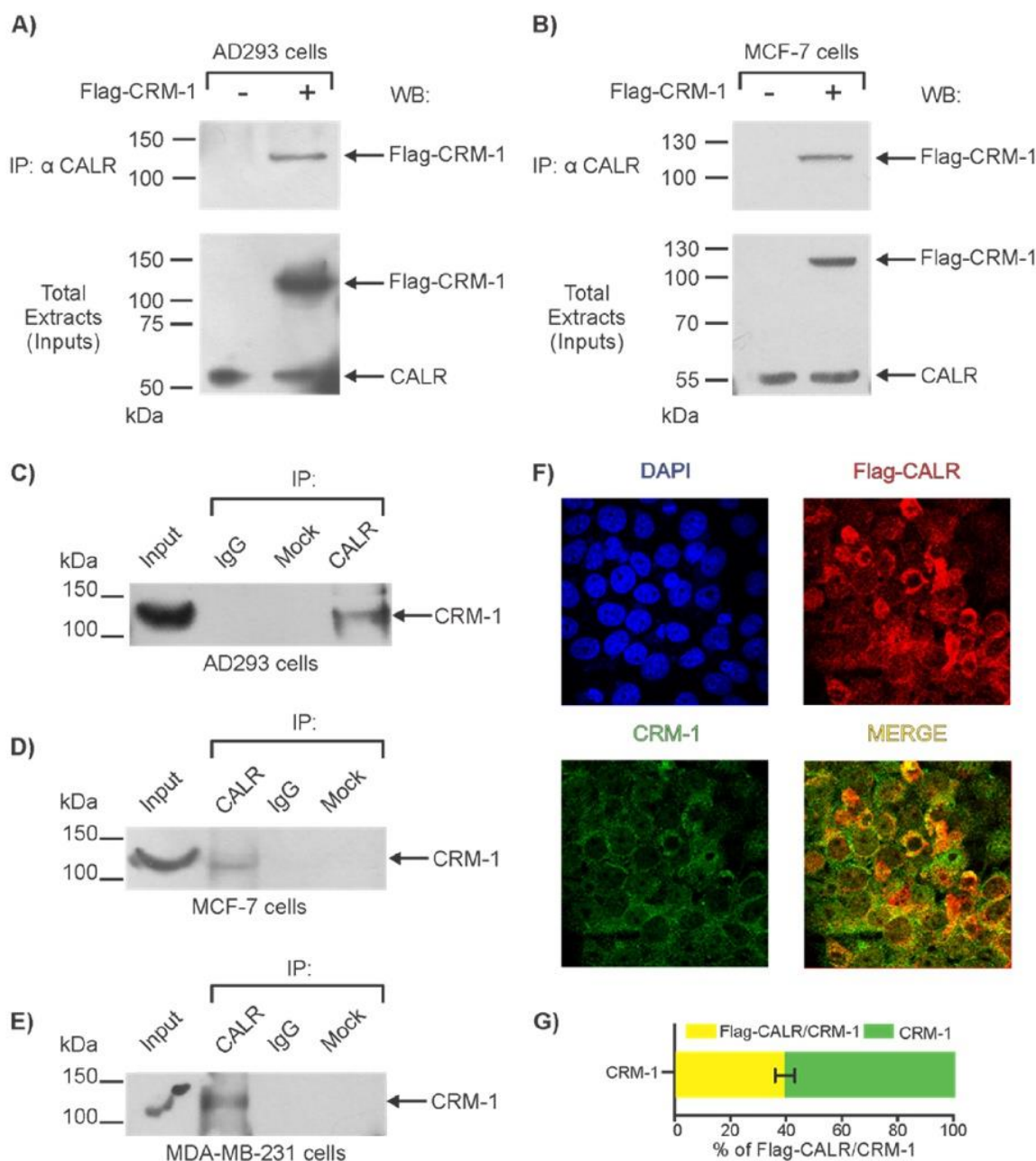


Fig. 3. Chromosome region maintenance 1 (CRM-1) exportin interacts with the calreticulin (CALR) protein.

(A) Total extracts from control or Flag-CRM-1-expressing AD293 cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with an anti-CALR antibody, followed by western blotting (WB) with anti-Flag. (B) Total extracts from control or Flag-CRM-1-expressing MCF-7 cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with an anti-CALR antibody, followed by WB with anti-Flag. Total extracts from (C) AD293, (D) MCF-7, and (E) MDA-MB-231 cells were subjected to IP with an anti-CALR antibody, followed by WB with anti-CRM-1. (F) Co-localization of Flag-CALR with CRM-1 in MCF-7 cells was evaluated by immunofluorescence. (G) Co-localization percentage analysis for these exportins.

endogenous CALR protein followed by immunoblots against CRM-1. We observed that these proteins were also associated endogenously in both breast cancer cells types (Fig. 3D, E). In all cases, the mock and IgG controls indicated a specific interaction between CRM-1 and CALR at basal levels. Immunofluorescence assays indicated that CALR and CRM-1 co-localized (39.6% of co-localization) mainly in the nuclear periphery and in the cytoplasm of MCF-7 cells (Fig. 3F and G). Therefore, CRM-1 and CALR proteins can associate, and together may collaborate to perform functions in common in the nucleo-cytoplasmic transport.

Moreover, formation of this CRM-1/CALR complex may be increased by certain factors, stimuli, or specific contexts.

3.3. *SUN2* and *SUN1*, two candidate proteins for association with CRM-1 and CALR

CRM-1 and CALR play critical roles in the export of some molecules out of the nucleus. In this process, the nuclear envelop and its composition are important not only as a barrier that separate the nucleus

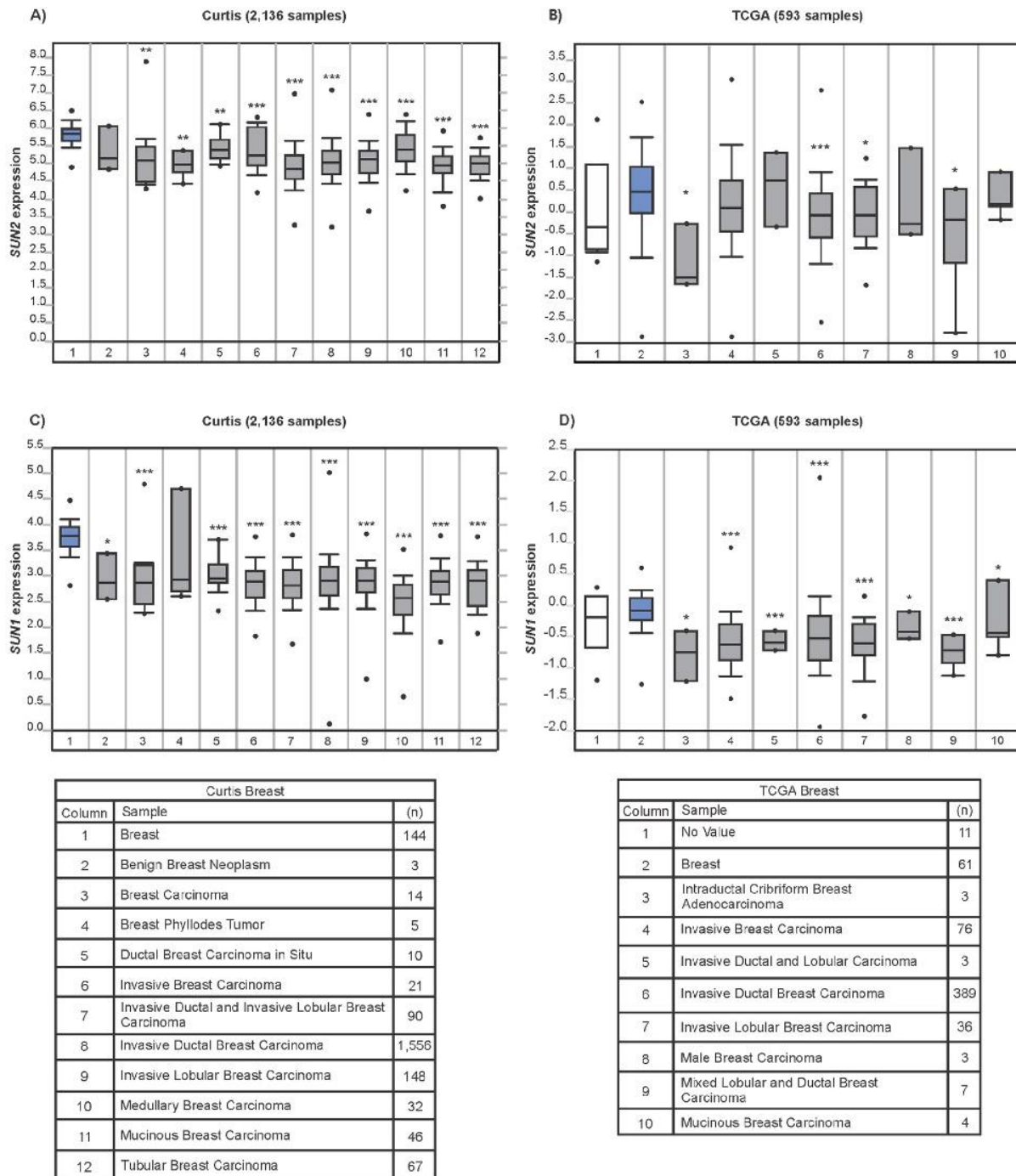


Fig. 4. *SUN2* and *SUN1* expression in breast cancer.

(A and B) *SUN2* mRNA expression level in normal mammary tissue and in several breast cancer types. (C and D) *SUN1* mRNA expression level in mammary tumors of patients with distinct breast cancer types and normal mammary tissue. Analyses were performed using the Curtis and TCGA data set as it is indicated in the figure. Results were expressed as significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

from cytoplasm, but also as a regulatory system than connects the cytoplasmic and nuclear molecular events. The nuclear envelop is formed by the interior and exterior nuclear membranes. These membranes are separated by a perinuclear space, and several nuclear pores are embedded in the nuclear envelop. The *SUN1* and *SUN2* proteins are localized in the perinuclear space, which maintains an interaction with nesprins (proteins of the exterior nuclear membrane), and lamin and

chromatin that are associated with the interior nuclear membrane. This allows the *SUN1* and *SUN2* proteins to facilitate binding of the interior and exterior nuclear membranes of the nuclear envelop. For this reason, the *SUN1/2* and nesprin proteins are part of the linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex (LINC) [38,39].

To determine whether these nuclear envelop proteins were associated with CRM-1 and CALR exportins, we performed an *in silico*

analysis of *SUN2* and *SUN1* expression in mammary tumors and normal mammary tissue. For this, we used the *OncoPrint* consortium, particularly the Curtis (2136 samples) and TCGA data set (593 samples). Remarkably, the expression of both *SUN2* and *SUN1* mRNA was decreased in mammary tumors in comparison with normal mammary tissue (Fig. 4A–D). *SUN2* expression was significantly lower in all breast cancers respect to normal tissue in Curtis data set (Fig. 4A). Instead, *SUN2* expression was significantly reduced in invasive ductal and/or lobular carcinomas in TCGA data set, and this is important because approximately 80% of all breast cancers are invasive ductal carcinomas (Fig. 4B).

Similarly, *SUN1* expression was significantly lower in all breast cancer types, except in breast phyllode tumors (that represent less than 0.5% of all breast cancers) in comparison with normal mammary tissue (Fig. 4C and D). Hence, the *SUN1* and *SUN2* expression is commonly altered in breast cancer. These results suggest that deregulation in the expression and abundance of nuclear envelop proteins may directly affect the composition of the nuclear envelop, and consequently the molecular processes (such as nuclear export of proteins) associated to this cellular organelle in breast cancer cells.

3.4. The nuclear envelop proteins, *SUN2* and *SUN1*, interact with *CRM-1* but not *CALR*

To begin to study the possible relationship between *SUN1/2* nuclear envelop proteins and the *CRM-1* and *CALR* exportins, several assays were performed in AD293 cells (Fig. 5A–F). First, we probed the sub-cellular localization of *SUN1* and *SUN2*. Constructs containing cDNA for *SUN2* or *SUN1* in a plasmid with the GFP tag were transfected and immunofluorescence assays were performed. As expected, both *SUN1* and *SUN2* were localized in the nuclear envelop (Fig. 5A, B).

Next, we investigated whether the *SUN2* protein had the ability to interact with *CRM-1* and/or *CALR* exportins. We transfected GFP-*SUN2* with Flag-*CRM-1* or Flag-*CALR* in AD293 cells, and performed the immunoprecipitation assay using the anti-GFP antibody, and the immunoblot using the anti-Flag antibody. GFP-*SUN2* was associated with Flag-*CRM-1*, but no band was detected for the interaction between GFP-*SUN2* and Flag-*CALR*. The expression of exportins was detected exclusively in the condition where they were transfected, showing the specificity of the interaction between GFP-*SUN2* and Flag-*CRM-1*. Hence, we demonstrated that the *SUN2* protein interacts with *CRM-1* but not *CALR* exportin (Fig. 5C).

Following the same experimental strategy, we probed whether *SUN1* could associate to *CRM-1* and *CALR*. Our results indicated that *SUN1* co-immunoprecipitated with Flag-*CRM-1* but not with Flag-*CALR* (Fig. 5D). By an immunofluorescence assay, we verified that a portion of Flag-*CRM-1* co-localized with GFP-*SUN2* and GFP-*SUN1* in the nuclear envelop. Intriguingly, 88% and 66.4% of GFP-*SUN2* and GFP-*SUN1* protein, respectively, co-localized with Flag-*CRM-1* in the nuclear envelop (Fig. 5E and F). Thus, we identified two new specific interactions for *CRM-1*, but not for *CALR*, with proteins of the nuclear envelop that are part of the LINC complex. These interactions may be critical in normal mammary tissue for nuclear morphology, nucleo-cytoplasmic transport, and in the nuclear envelop protein-dependent communication between the nucleus and cytoplasm. Importantly, these interactions, and their molecular implications, may be lost in breast cancer cells.

4. Discussion

Nuclear export of some tumor suppressors is affected in several types of cancer [4,40,41]. *CRM-1* is an exportin for several different molecules (e.g., RNAs and proteins), and *CALR* is an exportin for some proteins such as PKI and Tax. In addition, *CRM-1* and *CALR* have other actions that are relevant in cellular physiology [13,24,25]. Importantly, *CRM-1* and *CALR* are the main exportins related to the exit from the

nucleus of several members of the NRs superfamily [2]. From this perspective, evaluating the regulation and interactions of these exportins is fundamental, but there are currently only limited studies available.

In breast cancer, several NRs function as transcription factors as well as mediators of signaling pathways out of the nucleus. A relevant NR in this pathology is ER α , which promotes the development of mammary tumors when it is localized in the nucleus. In contrast, ER α signaling out of the nucleus seems to be associated with endocrine resistance, indicating that the mechanisms for nuclear export for this receptor are key in the progression of breast cancer [2,42,43].

Most breast cancers are ER α +, whereas nearly 30% of mammary tumors lack this receptor and present with the deregulation of other NRs [44,45]. Hence, the nuclear export of some NRs is crucial in breast cancer cells. Characterization of the exportins, *CRM-1* and *CALR*, is an initial step to understand the nuclear export of NRs. We investigated the levels of expression, abundance, distribution, and interactions of these exportins in ER α + and ER α - breast cancer cells. We found that the expression of both *CRM-1* and *CALR* was higher in mammary tumors than normal mammary tissue, suggesting the potential value of *CRM-1* and *CALR* as biomarkers for breast cancer. Interestingly, ER α - mammary tumors presented with higher expression levels of these exportins than ER α + tumors. This suggests that *CRM-1*- and *CALR*-dependent nucleo-cytoplasmic transport may differ between ER α + and ER α - mammary tumors. As a result, several tumor suppressors and NRs with anti-tumor activity may be excluded from the nucleus by *CRM-1* and *CALR* in ER α - breast cancer cells. Furthermore, *CRM-1* and *CALR* were present in the nucleus and cytoplasm. Thus, their upregulation could promote additional functions in breast cancer cells.

It is clear that interactions between *CRM-1* and *CALR* play a central role in their functions or regulation, including as proteins for nuclear export. Here, we showed interactions that are potential candidates in the regulation of *CRM-1* and *CALR*. Identification of the interaction *in vivo* by co-immunoprecipitation assays between *CRM-1* and *CALR* was interesting because it suggested the formation of a nuclear export complex containing both exportins (Fig. 6). The interaction between *CRM-1* and *CALR* can also explain a functional cooperation between these proteins. A previous *in vitro* study using a pull-down assay showed that the thyroid hormone nuclear receptor was exported by *CRM-1* via its interaction with *CALR* [1].

It has been proposed that peroxisome proliferator activated receptors are principally exported *via* *CALR*, while *CRM-1* acts as an alternate exportin in specific contexts or conditions [3]. This indicates that *CRM-1* and *CALR* may act together through a common pathway or mechanism. Together, *CRM-1* and *CALR* may play a transcendental role in the nuclear export of molecules involved in some pathophysiologicals. However, the weak endogenous interaction that we detected between these exportins suggests that certain factors, stimuli, conditions, or specific environments may promote the formation of the *CRM-1/CALR* complex, and that the interaction of *CRM-1* with *CALR* may be highly dynamic for the nuclear export of specific target proteins.

Importantly, we have shown the association of *CRM-1* with nuclear envelop proteins. Previously, it was reported that some LINC complex components were lost in breast cancer, and that *SUN1* associated with nuclear pore complexes [37,46]. In the current study, we identified new interactions for *CRM-1*, but not *CALR*, with the nuclear envelop proteins *SUN2* and *SUN1*. This is important because: 1) The *SUN1* and *SUN2* proteins are part of the LINC complex, which is relevant in nuclear morphology and activity, and allows linking between the nuclear and cytoplasmic processes. Hence, *CRM-1* may also participate as a regulator in other molecular events modulated by the *SUN* proteins. 2) The interaction between *SUN* proteins and *CRM-1* strongly suggests that these proteins are emergent elements in the molecular transport system from nucleus to cytoplasm. 3) *SUN1* and *SUN2* expression appears to be decreased in breast cancer (Fig. 6). Thus, the loss of these interactions (*CRM-1*, *SUN1*, and *SUN2*) may have critical consequences

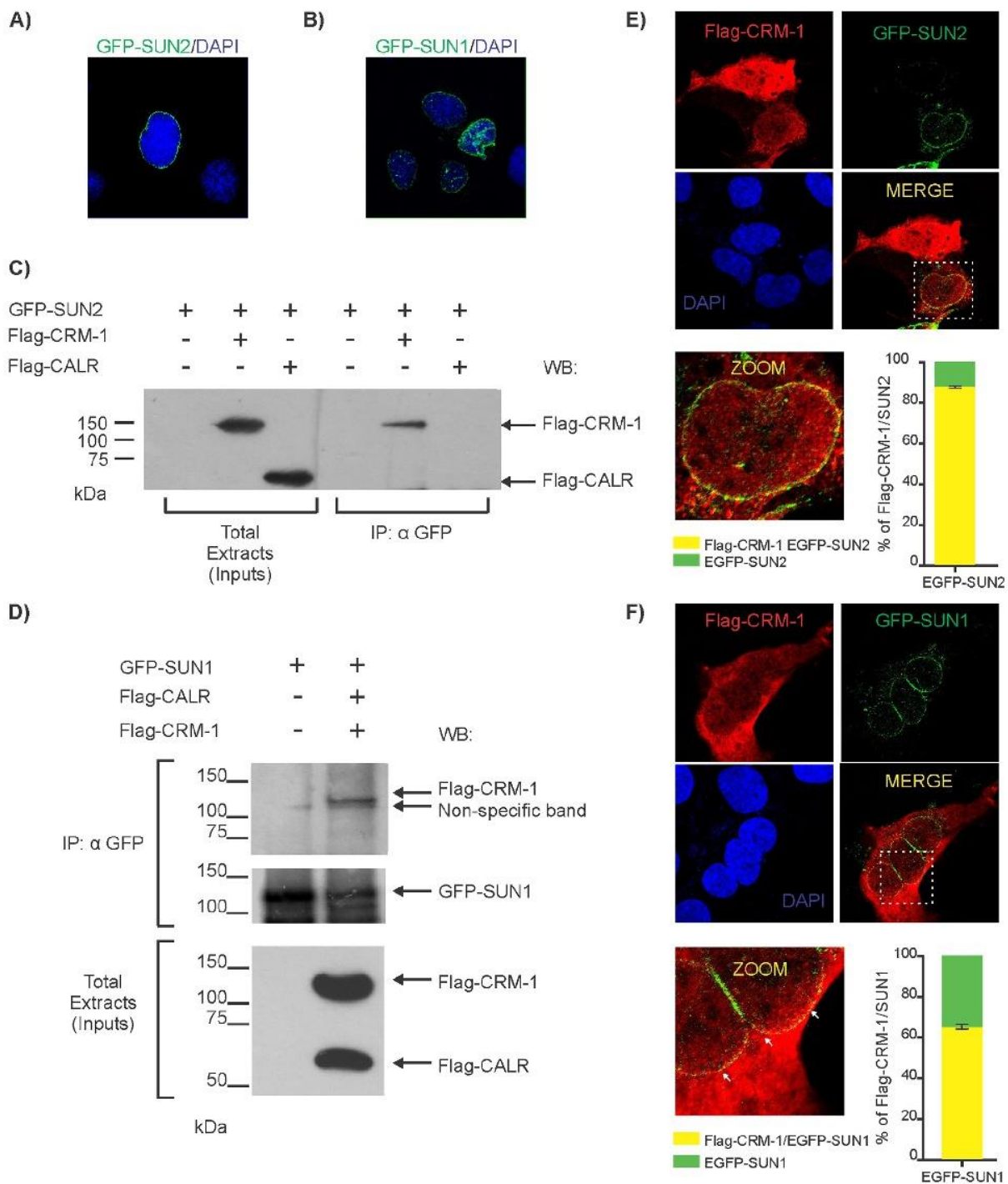


Fig. 5. Interaction between SUN proteins and chromosome region maintenance 1 (CRM-1).

(A) GFP-SUN2 or (B) GFP-SUN1 were expressed in AD293 cells. The distribution of the GFP signal was analyzed by immunofluorescence. (C) Total extracts from control or GFP-SUN2-expressing AD293 cells, with or without Flag-CALR or Flag-CRM-1 expression, were subjected to immunoprecipitation (IP) with an anti-GFP antibody, followed by WB with anti-Flag to detect Flag-CRM-1 and/or anti-CALR. (D) Total extracts from control or GFP-SUN1-expressing AD293 cells, with or without Flag-CALR and Flag-CRM-1 expression, were subjected to IP with an anti-GFP antibody, followed by WB with anti-Flag and anti-GFP. (E) Co-localization of GFP-SUN2 and (F) GFP-SUN1 with Flag-CRM-1 was evaluated by immunofluorescence. Co-localization percentage analysis was performed for SUN1 and SUN2 with CRM-1.

in this type of cancer. 4) The regulation of nucleo-cytoplasmic transport by CALR is apparently unrelated to the SUN1 and SUN2 proteins. Accordingly, several molecular pathways may drive the specificity of nuclear export mediated by CRM-1 and CALR.

Recently, the generation of new CRM-1 inhibitors has provoked positive expectations about their therapeutic potential [16,18,40]. Therefore, it is important to consider that these inhibitors block the binding of CRM-1 to the NES of target proteins, and may also affect the

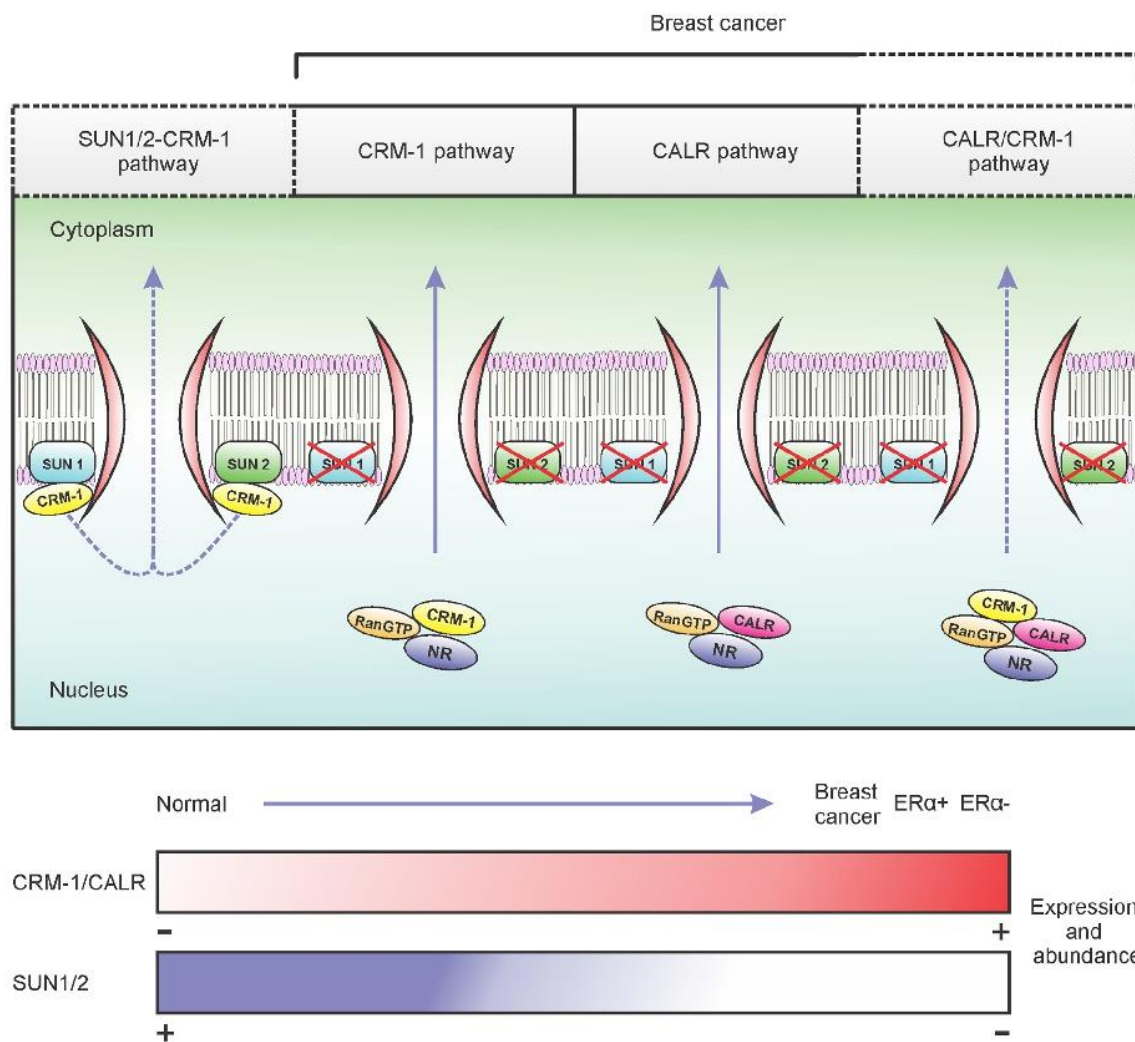


Fig. 6. Proposed model.

Chromosome region maintenance 1 (CRM-1) and *calreticulin (CALR)* expression is upregulated mainly in ER α - breast cancer. In contrast, *SUN1* and *SUN2* expression is decreased in breast cancer (bottom panel). *SUN1* and *SUN2* appear to be elements in the nuclear export mechanism because they interact with CRM-1 exportin, but not with CALR. Deregulation of exportins and *SUN1/2* expression suggests that molecular transport is affected in breast cancer compared to the normal condition, and that it differs in ER α - and ER α + tumors. In addition to the CRM-1- and CALR-dependent pathways, CRM-1 is associated with CALR, and together they may regulate the nucleo-cytoplasmic transport of some nuclear receptors (NRs), inhibiting their actions as transcription regulators (top panel). Several factors may modulate the CRM-1 and CALR interaction, and their cooperative function in breast cancer cells. Solid lines represent reported nuclear export pathways. Dashed lines represent suggested mechanisms for nuclear export by CRM-1, CALR and *SUN1/2*.

interactions of CRM-1 with its protein partners, including its functional association with CALR. Likewise, the composition of the nuclear envelope may affect the cellular response to treatment with these inhibitors.

5. Conclusions

CRM-1 and *CALR* are upregulated in breast cancer cells, particularly those that are ER α -. In this context, the interaction between CRM-1 and CALR seems to modulate the nuclear export of NRs. The interaction between the *SUN 1* and *2* nuclear envelope proteins with CRM-1 may play a fundamental role in nucleo-cytoplasmic transport in normal mammary tissue. On these bases, decreased *SUN1* and *SUN2* expression will lead to alterations in the interactions with CRM-1, and in molecular transport in breast cancer. Additional studies are necessary to clarify the functionality of these interactions and their molecular implications when using CRM-1 inhibitors as treatments for several cancer types,

particularly breast cancer.

Funding

This work was supported by the DGAPA-UNAM (grant numbers PAPIIT-IA200916).

Acknowledgements

We thank Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín for his technical support and comments on the manuscript. We also thank Dr. Miguel Tapia Rodríguez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad de Microscopia, UNAM) for his help in analyzing the immunofluorescence data. We appreciate the kind gifts from Dr. Kyle J. Roux Sanford (Children's Health Research Center, Sanford Research) and Dr. Martha Robles Flores (Facultad de Medicina, UNAM) of the plasmids used in this work. E.C-R is student of Programa de Posgrado en Ciencias

Bioquímicas, UNAM, and is recipient of a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

References

- [1] M.E. Grespin, G.M. Bonamy, V.R. Roggero, N.G. Cameron, L.E. Adam, A.P. Atchison, V.M. Fratto, L.A. Allison, Thyroid hormone receptor alpha1 follows a cooperative CRM1/calreticulin-mediated nuclear export pathway, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 25576–25588.
- [2] A.C. Tecalco-Cruz, Molecular pathways involved in the transport of nuclear receptors from the nucleus to cytoplasm, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 178 (2017) 36–44.
- [3] T. Umemoto, Y. Fujiki, Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPARalpha and PPARgamma, *Genes Cells* 17 (2012) 576–596.
- [4] M. El-Tanani, H. Dakir el, B. Raynor, R. Morgan, Mechanisms of nuclear export in cancer and resistance to chemotherapy, *Cancers* 8 (2016).
- [5] S. Hutten, R.H. Kehlenbach, CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 193–201.
- [6] L.F. Pemberton, B.M. Paschal, Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export, *Traffic* 6 (2005) 187–198.
- [7] S.K. Browne, J.R. Roesser, S.Z. Zhu, G.D. Ginder, Differential IFN-gamma stimulation of HLA-A gene expression through CRM-1-dependent nuclear RNA export, *J. Immunol.* 177 (2006) 8612–8619.
- [8] G. Castoria, P. Giovannelli, M. Lombardi, C. De Rosa, T. Giraldi, A. de Falco, M.V. Barone, C. Abbondanza, A. Migliaccio, F. Auricchio, Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells, *Oncogene* 31 (2012) 4868–4877.
- [9] M. Lombardi, G. Castoria, A. Migliaccio, M.V. Barone, R. Di Stasio, A. Ciociola, D. Bottero, H. Yamaguchi, E. Appella, F. Auricchio, Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells, *J. Cell Biol.* 182 (2008) 327–340.
- [10] I. Popa, M.E. Harris, J.E. Donello, T.J. Hope, CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2057–2067.
- [11] A.E. Conway, J.M. Haldeman, D.S. Wechsler, C.P. Lavau, A critical role for CRM1 in regulating HOXA gene transcription in CALM-AF10 leukemias, *Leukemia* 29 (2015) 423–432.
- [12] I. Martínez, K.E. Hayes, J.A. Barr, A.D. Harold, M. Xie, S.I.A. Bukhari, S. Vasudevan, J.A. Steitz, D. DiMaio, An Exportin-1-dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E4961–E4970.
- [13] M. Oka, S. Mura, K. Yamada, P. Sangel, S. Hirata, K. Maehara, K. Kawakami, T. Tachibana, Y. Ohkawa, H. Kimura, Y. Yoneda, Chromatin-precursor Crm1 recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes, *eLife* 5 (2016) e09540.
- [14] N. Kudo, B. Wolff, T. Sekimoto, E.P. Schreiner, Y. Yoneda, M. Yanagida, S. Horinouchi, M. Yoshida, Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1, *Exp. Cell Res.* 242 (1998) 540–547.
- [15] W.T. Senapedis, E. Baloglu, Y. Landesman, Clinical translation of nuclear export inhibitors in cancer, *Semin. Cancer Biol.* 27 (2014) 74–86.
- [16] Q. Sun, X. Chen, Q. Zhou, E. Burstein, S. Yang, D. Jia, Inhibiting cancer cell hallmark features through nuclear export inhibition, *Signal Transduct. Target. Ther.* 1 (2016) 16010.
- [17] A.S. Azmi, I. Muqbil, J. Wu, A. Aboukameel, W. Senapedis, E. Baloglu, A. Bollig-Fischer, G. Dyson, M. Kauffman, Y. Landesman, S. Shacham, P.A. Philip, R.M. Mohammad, Targeting the nuclear export protein XPO1/CRM1 reverses epithelial to mesenchymal transition, *Sci. Rep.* 5 (2015) 16077.
- [18] Y. Cheng, M.P. Holloway, K. Nguyen, D. McCauley, Y. Landesman, M.G. Kauffman, S. Shacham, R.A. Altura, XPO1 (CRM1) inhibition represses STAT3 activation to drive a survivin-dependent oncogenic switch in triple-negative breast cancer, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 675–686.
- [19] K. Burns, E.A. Atkinson, R.C. Bleackley, M. Michalak, Calreticulin: from Ca²⁺ binding to control of gene expression, *Trends Cell Biol.* 4 (1994) 152–154.
- [20] Y.C. Lu, W.C. Weng, H. Lee, Functional roles of calreticulin in cancer biology, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015) 526524.
- [21] M. Michalak, E.F. Corbett, N. Mesaeli, K. Nakamura, M. Opas, Calreticulin: one protein, one gene, many functions, *Biochem. J.* 344 (Pt. 2) (1999) 281–292.
- [22] M. Michalak, R.E. Milner, K. Burns, M. Opas, Calreticulin, *Biochem. J.* 285 (Pt 3) (1992) 681–692.
- [23] M. Michalak, J.M. Robert Parker, M. Opas, Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum, *Cell Calcium* 32 (2002) 269–278.
- [24] T. Alefantis, K.E. Flaig, B. Wigdahl, P. Jain, Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion, *Biomed. Pharmacother.* 61 (2007) 194–200.
- [25] J.M. Holaska, B.E. Black, D.C. Love, J.A. Hanover, J. Leszyk, B.M. Paschal, Calreticulin Is a receptor for nuclear export, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 127–140.
- [26] J.M. Holaska, B.M. Paschal, A cytosolic activity distinct from crm1 mediates nuclear export of protein kinase inhibitor in permeabilized cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 14739–14744.
- [27] K. Nakamura, A. Zuppini, S. Armaudeau, J. Lynch, I. Ahsan, R. Krause, S. Papp, H. De Smedt, J.B. Parys, W. Muller-Esterl, D.P. Lew, K.H. Krause, N. Demaurex, M. Opas, M. Michalak, Functional specialization of calreticulin domains, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 961–972.
- [28] A. Sela-Brown, J. Russell, N.J. Koszewski, M. Michalak, T. Naveh-Manly, J. Silver, Calreticulin inhibits vitamin D's action on the PTH gene in vitro and may prevent vitamin D's effect in vivo in hypocalcemic rats, *Mol. Endocrinol.* 12 (1998) 1193–1200.
- [29] M. Kabbage, M. Trimeche, S. Bergaoui, P. Hammann, L. Kuhn, B. Hamrita, H. ben Nasr, A. Chaieb, L. Chouchane, K. Chahed, Calreticulin expression in infiltrating ductal breast carcinomas: relationships with disease progression and humoral immune responses, *Tumour Biol.* 34 (2013) 1177–1188.
- [30] Z.M. Lwin, C. Guo, A. Salim, G.W. Yip, F.T. Chew, J. Nan, A.A. Thike, P.H. Tan, B.H. Bay, Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma, *Mod. Pathol.* 23 (2010) 1559–1566.
- [31] S. Prathyman, S. Sellappa, S. Joseph, K.S. Keyan, Enhanced calreticulin expression triggers apoptosis in the MCF-7 cell line, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 11 (2010) 1133–1136.
- [32] B.S. Ramesh, E. Giorgakis, V. Lopez-Davila, A.K. Dashtarzheneha, M. Loizidou, Detection of cell surface calreticulin as a potential cancer biomarker using near-infrared emitting gold nanoclusters, *Nanotechnology* 27 (2016) 285101.
- [33] M. Zamanian, A. Veerakumarasivam, S. Abdullah, R. Rosli, Calreticulin and cancer, *Pathol. Oncol. Res.* 19 (2013) 149–154.
- [34] A.C. Tecalco Cruz, K. Mejia-Barreto, Cell type-dependent regulation of free ISG15 levels and ISGylation, *J. Cell Commun. Signal.* 11 (2017) 127–135.
- [35] W. Wang, A. Budhu, M. Forgues, X.W. Wang, Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 823–830.
- [36] M. Cristina Castaneda-Patlan, R. Razo-Paredes, R. Carrisoza-Gaytan, L. Gonzalez-Mariscal, M. Robles-Flores, Protein kinase C is involved in the regulation of several calreticulin posttranslational modifications, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010) 120–131.
- [37] Q. Liu, N. Pante, T. Misteli, M. Elsagga, M. Crisp, D. Hodzic, B. Burke, K.J. Roux, Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes, *J. Cell Biol.* 178 (2007) 785–798.
- [38] D.I. Kim, K.C. Birendra, K.J. Roux, Making the LINC: SUN and KASH protein interactions, *Biol. Chem.* 396 (2015) 295–310.
- [39] K.L. Wilson, J.M. Berk, The nuclear envelope at a glance, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 1973–1978.
- [40] G.L. Gravina, W. Senapedis, D. McCauley, E. Baloglu, S. Shacham, C. Festuccia, Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer, *J. Hematol. Oncol.* 7 (2014) 85.
- [41] R. Hill, B. Cautain, N. de Pedro, W. Link, Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy, *Oncotarget* 5 (2014) 11–28.
- [42] A.C. Tecalco-Cruz, I.A. Perez-Alvarado, J.O. Ramirez-Jarquín, L. Rocha-Zavaleta, Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *Cell Signal.* 34 (2017) 121–132.
- [43] A.C. Tecalco-Cruz, J.O. Ramirez-Jarquín, Mechanisms that increase stability of estrogen receptor alpha in breast cancer, *Clin. Breast Cancer* 17 (2017) 1–10.
- [44] V.N. Gajulapalli, V.L. Malisetty, S.K. Chitta, B. Manavathi, Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? *Biosci. Rep.* (2016) 36.
- [45] M.L. Lin, H. Patel, J. Remenyi, C.R. Banerji, C.F. Lai, M. Periyasamy, Y. Lombardo, C. Busonero, S. Ottaviani, A. Passey, P.R. Quinlan, C.A. Purdie, L.B. Jordan, A.M. Thompson, R.S. Finn, O.M. Rueda, C. Caldas, J. Gil, R.C. Coombes, F.V. Fuller-Pace, A.E. Teschendorff, L. Buluwela, S. Ali, Expression profiling of nuclear receptors in breast cancer identifies TLX as a mediator of growth and invasion in triple-negative breast cancer, *Oncotarget* 6 (2015) 21685–21703.
- [46] A. Matsumoto, M. Hieda, Y. Yokoyama, Y. Nishioka, K. Yoshidome, M. Tsujimoto, N. Matsuura, Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer, *Cancer Med.* 4 (2015) 1547–1557.