

Maestría PEDECIBA-BIOLOGÍA
Biología Celular y Molecular
2008

“Influencia de la Maquinaria de Traducción en el Plegamiento de las Proteínas:

Detección de Variantes Conformacionales del Receptor de Estrógenos alfa Humano en Sistemas de Traducción in vitro”

Sofía Horjales

Orientadora: Dra. Mónica Marín

Tribunal: Dr. Alfonso Cayota

Dra. Mónica Brauer

Dr. José Souza

Sección Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias-UdelaR



Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que de alguna manera contribuyeron con este trabajo, en particular,

A Mónica, quien me ha orientado todos estos años, y me ha permitido llevar a cabo este trabajo en su laboratorio. Por siempre estar en todo momento y por haber leído y releído la tesis....;

A Germán, que ha participado desde el comienzo en este trabajo y ha sido un gran apoyo científico y personal;

A los compañeros de la 305, por la buena onda compartida, por hacer el día a día más alegre y acompañar los pequeños avances y fracasos;

A todos los compañeros de la Sección Bioquímica, por todos los momentos vividos juntos y la constante preocupación y aliento recibidos;

A Nora Artagaveytia y Estela Román por haberse involucrado en este trabajo y por la disposición demostrada en todo momento;

A todos los compañeros del Laboratorio de Virología (CIN) del Dr. Juan Cristina, por enseñarme y facilitarme el uso del Phosphorimager;

A mi familia, amigos y a Sebastián, por haberme apoyado en todo momento

A PEDECIBA y a la CLCC por haber financiado este trabajo.

Resumen

Comprender los mecanismos moleculares que determinan el plegamiento de las proteínas *in vivo* es un gran desafío para la biología molecular. El tema tomó mayor relevancia al conocerse las dificultades en la expresión de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos y al vincularse alteraciones del plegamiento de proteínas con patologías como las enfermedades priónicas, Alzheimer, amiloidosis y otras.

Nuestra hipótesis de trabajo cocidera que el plegado de las proteínas *in vivo* es un proceso discontinuo, co-traducciona, que puede verse afectado principalmente por los componentes de la maquinaria de traducción y la cinética del proceso. Por lo tanto, cambios en estos factores podrían alterar la conformación de la proteína que es sintetizada.

El Receptor de Estrógenos alfa (ER α) pertenece a la gran familia de receptores nucleares que son factores de transcripción inducibles por ligandos. Cambios en su conformación modulan su actividad biológica. Además se ha observado que algunas de sus propiedades son tejido específicas. Como estrategia experimental para estudiar la influencia de la maquinaria de traducción sobre el plegamiento de proteínas, analizamos propiedades estructurales y funcionales del ER α humano sintetizado en distintos sistemas de traducción eucariotas. Se detectaron al menos tres conformaciones diferentes del receptor mediante proteólisis limitada y ensayos de unión al ligando. El receptor traducido *in vitro* en lisados de reticulocito de conejo fue rápidamente degradado por la proteasa produciendo mayoritariamente fragmentos de aproximadamente 34 kDa y mostró alta afinidad por el estradiol. En el sistema de traducción de germen de trigo, el receptor es digerido más lentamente. Se evidenciaron al menos tres conformaciones solubles por diferencias en el patrón de degradación y unión al ligando. Nuestros resultados muestran que diferencias en la maquinaria de traducción pueden generar conformaciones alternativas del receptor con diferentes propiedades de unión al ligando. Estudios preliminares sobre la cinética de traducción del ER α muestran pausas traduccionales diferenciales en los sistemas de expresión empleados. Estos estudios sugieren que los propios componentes de la maquinaria de traducción celular y su cinética pueden modificar las vías de plegamiento de las proteínas y la abundancia relativa de diferentes conformaciones del receptor de estrógenos.

Índice

1. Introducción	3
1.1.Plegamiento de proteínas	4
1.2 Plegamiento asistido por chaperonas moleculares	5
1.2.1 <i>Hsp70</i>	6
1.2.2 <i>Hsp60</i>	6
1.2.3 <i>Hsp90</i>	6
1.2.4 <i>DisulfuroIsomerasa de Proteínas(PDI)</i>	7
1.2.5 <i>Peptidilprolil cis/trans Isomerasa (PPI)</i>	7
1.3 Plegado de proteínas co- y/o pos-traduccional	9
1.4 El plegado del polipéptido naciente	10
1.5 Maquinaria de traducción	12
1.6 Cinética de traducción	12
1.7 Poblaciones de ARNt	14
1.8 Uso de codones	16
1.9 Hipótesis	18
1.10 El modelo de estudio: Receptor de Estrógenos α (ERα)	18
1.10.1 Estructura del ER α	19
1.10.2 Mecanismos de acción del ER α	21
1.11 Objetivos	25
2. Materiales y Métodos	26
3. Resultados	33
3.1 Capítulo I. Optimización de la expresión del ER α en sistemas acelulares.....	33
3.2 Capítulo II. Estudios Conformacionales del ER α	44
3.3 Capítulo III. ER α , mutantes sinónimos y extractos de traducción.....	55
4. Discusión	65
4.1 Expresión del ER α en sistemas de traducción acelulares.....	65
4.2 Poblaciones conformacionales del ER α	67
4.3 Maquinaria de traducción y el ER α	70
4.4 Cinética de traducción y el ER α	71
4.5 Conclusiones finales.....	73
5. Perspectivas	76
6. Referencias	78
Anexo 1. Mapa de Restricción pSG5-ER α	89
Anexo 2. Soluciones.....	91
Anexo 3. Estructura secundaria del ER α humano.....	93
Anexo 4. Estructura secundaria del extremo 5'UTR.....	96

1. Introducción

La función de las proteínas depende esencialmente de su estructura tridimensional. Comprender cómo la cadena de aminoácidos de una proteína adopta la conformación nativa es una importante asignatura de la Biología Molecular. El término conformación hace referencia al arreglo espacial de los átomos de una molécula, e incluye cualquier estado estructural que se obtenga sin romper enlaces covalentes; fundamentalmente se refiere a la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Los sistemas biológicos disponen de diversos mecanismos para asegurar el correcto plegamiento de las proteínas, así como para detectar y degradar las proteínas mal plegadas¹. A pesar de ello, ciertas patologías humanas están asociadas con eventos de plegado incorrecto de proteínas²⁻⁶. Las llamadas “enfermedades conformacionales”^{2,3,5} se caracterizan por la presencia de agregados proteicos, intra o extracelular⁶, de alguna (o varias) proteína(s) particular(es). Entre tales patologías se encuentran la enfermedad de Alzheimer, Huntington y Parkinson, la enfermedad priónica, diversas amiloidosis y la Esclerosis Lateral Amiotrófica^{5,7-10}.

Las alteraciones del plegamiento de proteínas observadas en enfermedades conformacionales así como las dificultades para producir proteínas recombinantes en sistemas heterólogos¹¹ han destacado la importancia de comprender los mecanismos involucrados en el plegamiento de las proteínas *in vivo*.

Este trabajo ha sido abordado partiendo de la hipótesis de que el plegado de las proteínas *in vivo* es un proceso discontinuo, co-traducciona, que puede verse afectado por los componentes de la maquinaria de traducción, las condiciones fisicoquímicas del ambiente celular, interacciones transitorias con otras proteínas o ligandos así como por la cinética de traducción¹². Variaciones de alguno de estos factores podrían alterar la conformación de la proteína que es sintetizada. Este trabajo intenta contribuir a la determinación del rol del contexto celular de biosíntesis y explorar como influye la maquinaria de traducción en la conformación adoptada por las proteínas.

A continuación se describirán las principales características del plegamiento de proteínas *in vivo*, y las evidencias que indican que la maquinaria y la cinética de traducción pueden afectar la conformación de proteínas.

1.1 Plegamiento de proteínas

Clásicamente el plegado de las proteínas ha sido estudiado *in vitro*, mediante experimentos de desnaturalización y renaturalización. A partir de la desnaturalización reversible de la ribonucleasa A, Anfinsen propuso que la información necesaria para el plegado de una cadena polipeptídica para alcanzar el estado nativo estaba determinada en la secuencia de aminoácidos^{13,14}. Sin embargo, se ha observado que muchas proteínas requieren de sistemas biológicos especializados que asisten su plegado¹⁵⁻²⁰.

En general, el plegado *in vivo* difiere considerablemente del plegado *in vitro* ya que las condiciones experimentales empleadas *in vitro* son muy distintas a las del medio celular²¹, caracterizado por una alta concentración de proteínas y de otras macromoléculas^{12,22,23}.

El plegamiento de una proteína dentro de la célula, en un contexto molecular complejo, ligado al proceso de biosíntesis proteica presenta características particulares:

- 1) la aparición vectorial discontinua de la cadena peptídica naciente y subsiguiente plegado vectorial disminuye la probabilidad de interacciones no-productivas y permite un plegado por etapas consecutivas^{24,25},
- 2) la isomerización de segmentos amino Terminal (Nt) parcialmente plegados de distintas cadenas polipeptídicas puede ocurrir concomitantemente con la síntesis del segmento carboxi-terminal (Ct)²⁴,
- 3) la difusión restringida y acoplamiento del péptido naciente al ribosoma, reduce el potencial agregado de los polipéptidos nacientes²⁶,
- 4) existencia de pasos limitantes, catalizados por enzimas especializadas como isomerasas de puentes disulfuro (PDI), peptidil proilil cis-trans isomerasas (PPI) o chaperonas²⁵. Por ejemplo la formación de puentes disulfuro y conformaciones correctas de los isómeros de prolinas, pueden catalizarse cotraduccionalmente por las enzimas PDI y PPI²⁴.

La Figura 1 esquematiza las vías de plegado *in vivo* e *in vitro* de una cadena polipeptídica y muestra las diferencias entre el plegado co-traduccional del polipéptido naciente unido al ribosoma²⁶, y el plegado *in vitro*, que permite que un polipéptido desplegado adopte un gran número de conformaciones al azar hasta alcanzar el estado nativo.

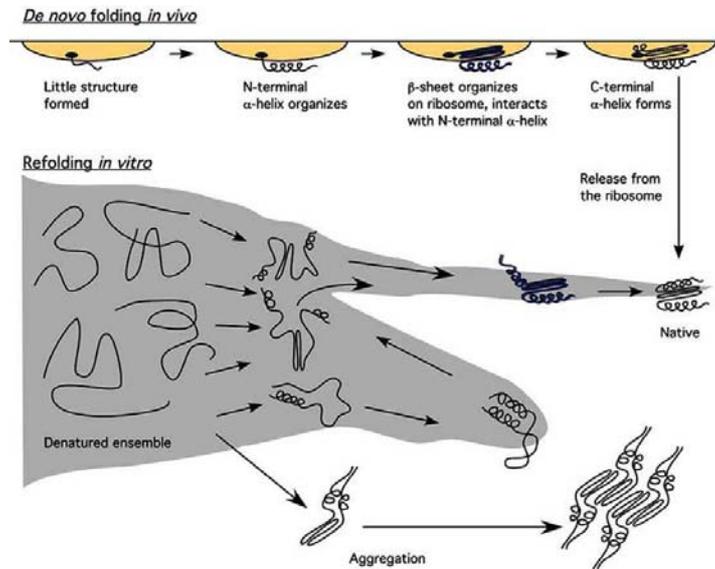


Figura 1. Modelos de plegamiento de proteínas *in vivo* vs *in vitro*. *In vivo*, la naturaleza vectorial de la síntesis proteica necesariamente limita el espacio conformacional disponible para las pequeñas cadenas nacientes. Mientras la síntesis progresa, la secuencia Nt y Ct están aisladas espacial y temporalmente posiblemente impidiendo interacciones no-nativas. En el plegado *in vitro* la cadena polipeptídica completa se estructura al azar adoptando distintas conformaciones. La interacción de los extremos Nt y Ct puede darse durante el plegado temprano llevando a conformaciones no nativas. (Extraído de Evans *et al.* 2005²⁷)

Las células disponen de maquinarias complejas que asisten el plegado de péptidos recién sintetizados y de proteínas parcialmente desnaturalizadas y evitan la formación de agregados. Esta maquinaria incluye varias familias proteicas conocidas colectivamente como “chaperonas moleculares”²³.

1.2 Plegamiento asistido por chaperonas moleculares

En la célula, varios sistemas moleculares aseguran el correcto establecimiento y mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas^{15,16,22,28-30}. En ellos están implicadas enzimas PDI, PPI y las chaperonas moleculares^{17,18,22,29,30}. Fallas de estos sistemas pueden conducir a proteínas mal plegadas. Tales proteínas son reconocidas por los sistemas de “control de calidad” celulares y marcadas para la destrucción a través de la vía ubiquitina proteasoma. Las chaperonas moleculares no sólo están involucradas en el plegado de las proteínas sino que además participan en el control de calidad³¹ e incluso en la degradación. Por tanto estos sistemas incluyen el control de calidad de proteínas en el Retículo Endoplásmico, la Respuesta a Proteínas Desplegadas-UPR³², y la vía de degradación ubiquitina/ proteosoma^{20,33,34} en el citosol. El medio celular contiene una alta concentración de moléculas que pueden afectar eventos del plegado de las proteínas incluyendo la unión de chaperonas a sus

sustratos o las propiedades de los intermediarios de plegamiento^{22,23}. La alta concentración proteica promueve la formación de interacciones inespecíficas y puede conducir a la formación de agregados o complejos aberrantes^{19,35}. Es en este contexto celular denso donde las chaperonas moleculares actúan impidiendo la formación de agregados. Mediante ciclos de asociación y disociación, promueven a que la proteína adquiera su conformación nativa, generando nuevas oportunidades de plegado¹⁹. Brevemente se describen las principales familias de chaperonas y proteínas vinculadas al plegamiento de proteínas.

1.2.1 Hsp70

Las Hsp70 constituyen una familia de ATPasas de aproximadamente 70kDa, altamente conservadas que se encuentran en casi todos los organismos y tipos celulares¹⁸. En condiciones normales, las Hsp70 cumplen funciones en el plegamiento de proteínas sintetizadas de novo, ya que se asocian a las cadenas polipeptídicas durante la elongación en los ribosomas^{18,28,36-38} y durante el tráfico intracelular a los compartimentos subcelulares^{36,39}. La actividad de las Hsp70 (Dna K) está regulada por miembros de la familia Hsp40 (DnaJ)^{18,40}.

1.2.2 Hsp60

Las Hsp60 o chaperoninas son grandes complejos proteicos cilíndricos con actividad ATPasa que forman una cavidad, un ambiente más aislado donde pueda tener lugar el plegamiento^{18,41-43}. Las chaperoninas se dividen en 2 grupos: el de GroEL que se encuentra en el citosol bacteriano, en mitocondrias y cloroplastos, y el de TCP-1 (o TriC) que se encuentra en el citosol de arqueobacterias y en eucariotas¹⁸. En *E coli*, GroEL está involucrado con el plegamiento de cerca del 10% de los péptidos recién sintetizados^{42,44}. Las Hsp70 y Hsp60 podrían actuar de forma secuencial³⁴. Así en el citoplasma eucariota, las Hsp70 y su cofactor Hsp40 podrían actuar en cooperación con TriC en forma secuencial con el péptido naciente¹⁸.

1.2.3 Hsp90

La familia hsp90 es un grupo altamente conservado de proteínas de estrés de los eucariotas. Es muy abundante representando el 1-2% de las proteínas citosólicas⁴⁵ y es esencial para la viabilidad celular, excepto en eubacterias en que es dispensable²³. La Hsp90 participa en el plegado post-traducciona l de ciertas proteínas^{18,30} y en la maduración funcional de ciertas quinasas, receptores y proteínas involucradas en la transducción de señales, control del ciclo celular y regulación de la transcripción^{37,45}. Su actividad *in vivo* depende de la asociación con un conjunto de co-chaperonas que forman un complejo multiproteico llamado foldosoma que incluye a la Hsp90 y a la proteína sustrato⁴⁶⁻⁴⁸. El plegado de proteínas mediado por las Hsp90 está regulado

por unión e hidrólisis de ATP^{48,49}. Participa en la regulación de moléculas transductoras de señal como tirosinquininas y receptores esteroideos^{23,50}.

1.2.4 Disulfuroisomerasa de Proteínas (PDI)

La PDI cataliza la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro y funciona como chaperona previniendo la agregación de sustratos desplegados⁵¹.

1.2.5 Peptidilprolil cis/trans Isomerasa (PPI)

El enlace peptídico adyacente a un prolina puede adoptar una conformación trans o cis. La conformación cis se observa en un 5-6% de las estructuras proteicas. La mayoría de los enlaces cis se ubican en superficies accesibles, o estructuras de lazos y vueltas⁵². La isomerización cis/trans de los enlaces peptidil- prolil es catalizada por las PPI^{48,49,51,52}. Las PPI son enzimas ubicuas, presentes en todos los organismos. Son enzimas cruciales en el plegado de las proteínas, sobre todo en aquellas proteínas que contienen cis-prolinas. Junto con las PDI son responsables de catalizar pasos limitantes en el plegado de proteínas.

Una vez que el péptido naciente deja el ribosoma, puede utilizar distintas vías dentro de las redes de chaperonas celulares hasta alcanzar el estado nativo⁵³. La vía utilizada va a depender de si el plegado es co- o postraducciona, y de factores que estén interaccionando con el polipéptido así como de la disponibilidad de chaperonas.

La Figura 2 muestra vías de plegado co- y postraducciona dependientes de las chaperonas en eubacterias y eucariotas. En eucariotas se identificaron diferencias entre las chaperonas que median el plegado *de novo* y las que rescatan polipéptidos "mal plegados". Mientras que las proteínas incorrectamente plegadas interaccionan con chaperonas en el citosol, las proteínas recién traducidas se pliegan en ambientes secuestrados por chaperonas que funcionan acopladas a la maquinaria traduccional⁵⁴. El plegado de proteínas recién sintetizadas se vincula a las chaperonas Hsp70 y la chaperonina TRiC/CCT, pero el replegado de proteínas desnaturalizadas por estrés o por agentes químicos está asociado a Hsp70 y Hsp90. Los intermediarios de plegado de ambos procesos también pueden ser diferentes^{23,54,55}

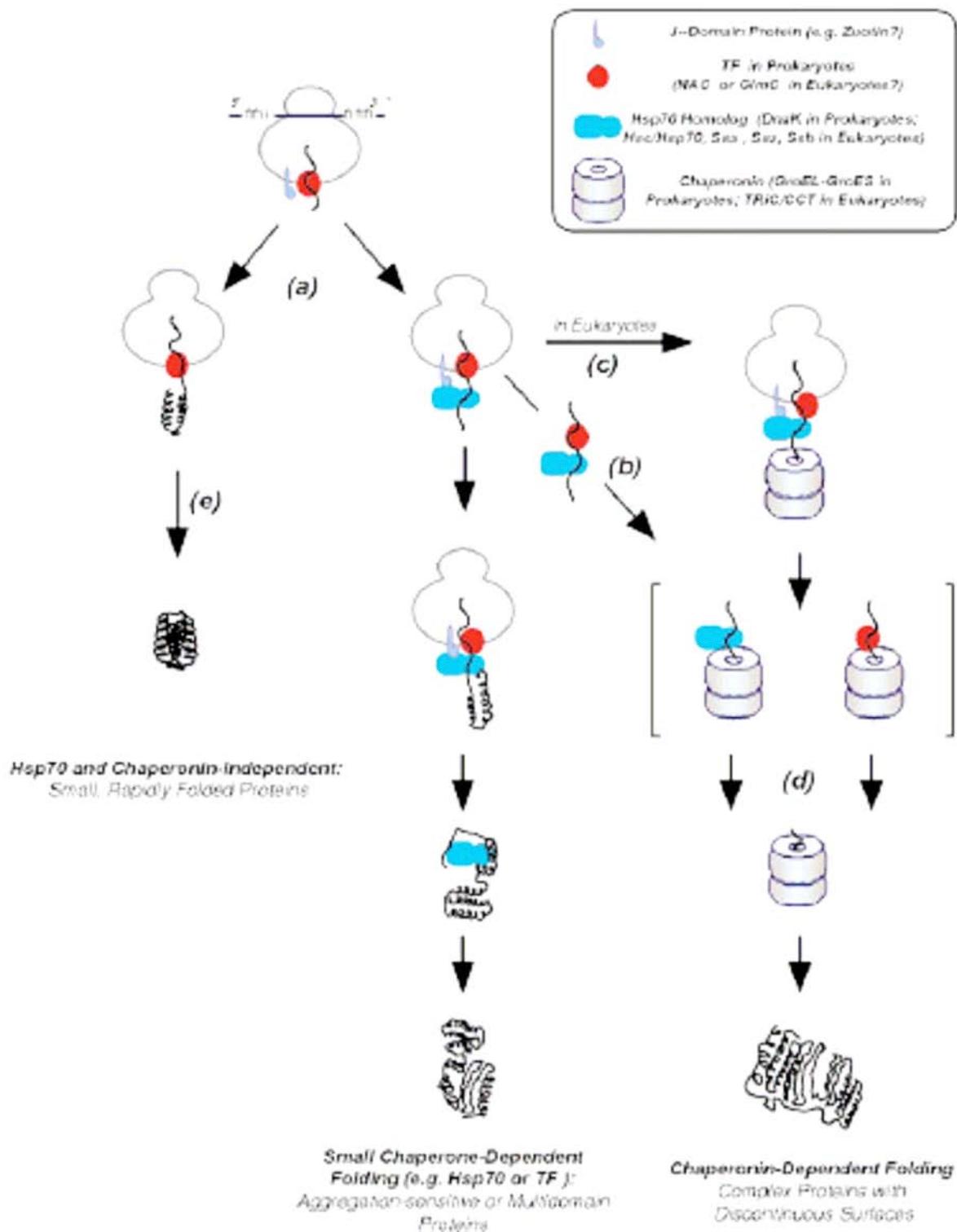


Figura 2. Esquema que representa el plegado de proteínas *de novo* en el citosol de eubacterias y de eucariotas. El plegado de dominios co-traduccionales así como la asociación co-traduccionales del complejo chaperonina con el péptido nascente es favorecida en eucariotas. Curiosamente, no se ha identificado ningún homólogo del *Tigger Factor* (TF) en eucariotas. Para simplificar no se muestran las Hsp70 ni los co-factores de la chaperonina Hsp60 ni vías de plegado alternativas dependientes de Hsp90. (Extraído de Frydman 2001²³)

Además de las características mencionadas del plegado de proteínas *in vivo*, hay que destacar que la localización celular y la modificación covalente son también factores que pueden afectar la conformación de proteínas. La existencia de diferentes compartimentos celulares - como las mitocondria, cloroplastos, retículo endoplásmico o peroxisomas en el caso de las eucariotas o el espacio periplásmico en procariotas- implica que las proteínas sean transportadas y traslocadas a través de membranas, durante o luego de su síntesis. Cada uno de estos compartimentos posee un grupo de chaperonas y proteínas especializadas que asisten el plegado del polipéptido⁵⁶. Por otro lado, existen numerosas modificaciones covalentes co- o postraduccionales que pueden sufrir las proteínas como glicosilación, metilación, acetilación, ubiquitinación entre otras. Algunas son determinantes de la estructura de las proteínas, otras juegan roles claves en la regulación de su función^{57,58}.

Cuando en una célula se producen variaciones en la conformación de una misma cadena polipeptídica, las causas pueden atribuirse a alteraciones en distintos factores que intervienen en el plegamiento. Entre estos factores podemos considerar mutaciones o alteraciones de la secuencia primaria de un gen; cambios en la cinética de traducción, diferencias en el patrón de modificaciones post-traduccionales; fallas en el sistema de "control de calidad" y degradación de proteínas; alteraciones del tráfico y localización celular y diferencias en la respuesta a estímulos del medio^{32,59,60}.

1.3 Plegado de proteínas co- y/o pos-traduccionales

La naturaleza vectorial de la síntesis proteica determina que durante la traducción (y también durante la traslocación) el extremo Nt del péptido naciente está disponible para plegarse antes que el Ct, lo que permite que el plegamiento de las proteínas comience durante o luego de su biosíntesis⁵⁶.

Dos modelos intentan explicar cómo y cuando la cadena polipeptídica comienza a estructurarse dependiendo si es co-traduccionales o post-traduccionales⁵⁶.

El modelo de plegado postraduccionales supone que el péptido naciente, es plegado una vez que se ha completado su síntesis. El plegado podría ser retrasado por la interacción con chaperonas y ocurre cuando el polipéptido es liberado del ribosoma, siendo análogo a los modelos de replegado *in vitro*^{56,61}.

El modelo de plegado co-traduccionales sostiene que la formación de la estructura secundaria y terciaria comienza durante la biosíntesis mientras el polipéptido emerge del ribosoma a través del conducto de la subunidad mayor^{56,61,62}.

Estos modelos no son mutuamente excluyentes y la vía utilizada para el plegado de una proteína puede depender específicamente de la proteína y de las condiciones de su entorno^{56,61}. El plegamiento de las proteínas co-traduccionales fue evidenciado en células eucariotas⁶¹⁻⁶⁵ y procariotas⁶⁴⁻⁶⁶. *In vivo* las proteínas suelen plegarse parcialmente durante la traducción; e incluso se ha demostrado que algunas enzimas tienen actividad unidas al ribosoma⁵⁶. La formación de dominios co-traduccionales *in vivo* facilita el plegado de proteínas grandes con múltiples dominios^{61,67,68}.

1.4 El plegado del polipéptido naciente

La síntesis vectorial del polipéptido naciente implica que la información de plegado de la proteína es transitoria e incompleta⁵⁵. El extremo Nt del péptido naciente emerge por un conducto de la subunidad mayor del ribosoma, desde el centro peptidil-transferasa (sitio P) (ver Figura 3). El conducto tiene un calibre limitado, está formado principalmente por ARN y algunas proteínas ribosomales y protege unos 30-40 aminoácidos de otros componentes celulares^{27,55}. Algunos estudios sugieren que el polipéptido que emerge del ribosoma, en el canal ya podría adoptar una estructura de α -hélice²⁴. Otras estructuras secundarias como las cadenas β y las interacciones terciarias sólo pueden formarse una vez que el polipéptido está fuera del ribosoma.

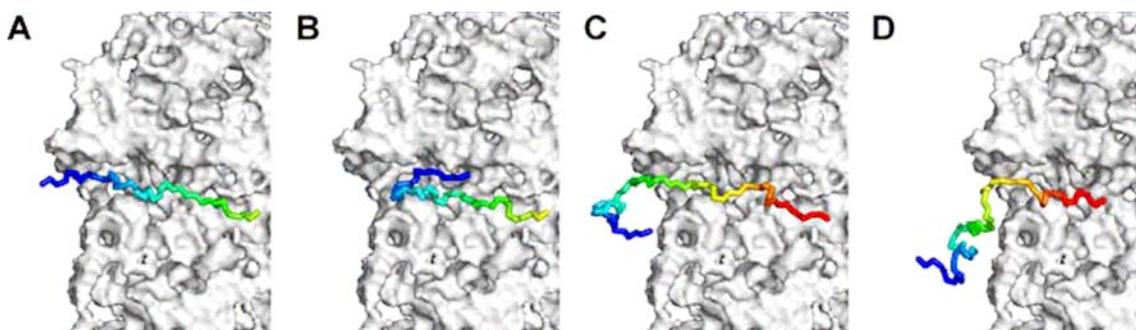


Figura 3. Modelado del plegado co-traduccionales de una proteína. La superficie en gris representa al ribosoma. El péptido naciente está coloreado de azul (Nt) a rojo (Ct). Los cuadros (A-D) representan distintos tiempos 3.6 ls, 4 ls, 6 ls, 6.04 ls. El largo de la cadena peptídica en A y B es de 40 y 44 residuos respectivamente, en C y D se representa el polipéptido completo. La figura fue preparada con PyMOL y tomada de Elcock 2006⁷⁰.

Una vez que el largo de la cadena polipeptídica excede los 40 aminoácidos⁷¹, el péptido naciente entra en contacto con los componentes del citosol, pudiendo adoptar otras conformaciones^{52,72} que depende del largo de la cadena aminoacídica y del tipo

de interacciones involucradas entre los residuos expuestos, ligados y/o con chaperonas moleculares. Se ha descrito la asociación del ribosoma con diferentes componentes que participan de los mecanismos de plegado de las proteínas; entre ellos podemos resaltar el *Trigger factor* (TF)⁷³, las Hsp70⁷⁴ y Hsp60⁷⁵. Esta proximidad espacial de las chaperonas con el péptido nascente facilitaría el plegado de la proteína durante su síntesis.

Durante la síntesis proteica se pueden formar intermediarios más o menos estables, capaces de adquirir conformaciones que lleven al estado nativo, como se esquematiza en la

Figura 4. Dichos intermediarios de plegamiento dependen del número de residuos expuestos habilitados a establecer contactos entre sí. Variaciones de la velocidad de síntesis, afectan los tiempos de interacción entre los residuos que establecen contactos, lo que podría modificar las vías de plegado^{69,76}. Cuando el plegamiento es asistido por chaperonas, la velocidad de crecimiento del péptido y salida del ribosoma puede afectar la interacción de las mismas con sus sitios blanco, llevando a que residuos hidrofóbicos puedan colapsar.

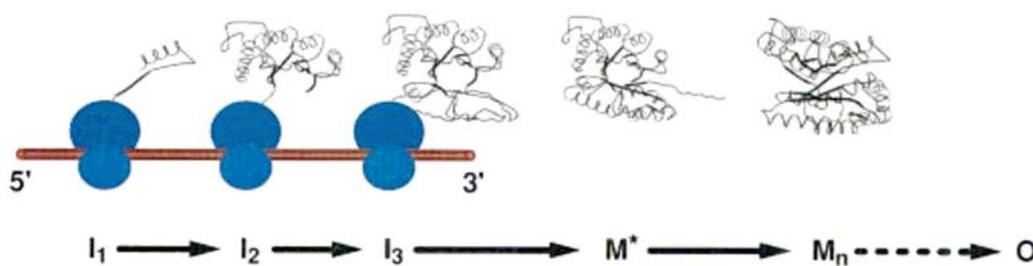


Figura 4. Esquema que describe el plegado co-traduccion de un polipéptido. Se asume que el polipéptido nascente adopta su estructura secundaria mientras es sintetizado y emerge del ribosoma. I1, el intermediario temprano, no está bien estabilizado por interacciones terciarias y está en equilibrio con múltiples conformaciones. El segundo intermediario, I2, es el dominio Nt, donde se permiten interacciones terciarias que hacen al intermediario más estable. I3, el intermediario final, comprende al polipéptido completo, antes de ser liberado del ribosoma, con el dominio Ct no totalmente empaquetado. Las chaperonas y otras enzimas pueden interaccionar con los intermediarios nascentes o con el producto completo luego de ser liberado del ribosoma, M*. El estadio final es el plegado de M* al monómero nativo Mn, que ocurre luego de la liberación del ribosoma. Dependiendo de la proteína, pueden ocurrir asociaciones de monómeros en oligómeros, O, co- o pos-traduccionalmente. El esquema fue extraído de Fedorov A.N. and Baldwin T.O.1992⁴⁷ utilizando la estructura de un homodímero de luciferasa b2 bacteriana.

1.5 Maquinaria de traducción

Generalmente se han estudiado los mecanismos mediante los cuales las proteínas adquieren su conformación sin tener en cuenta la influencia de la maquinaria de traducción. Cuando hablamos de maquinaria de traducción queremos abarcar todos los componentes implicados, directamente o indirectamente en la síntesis proteica. Entre ellos consideramos ribosomas, aminoacil-ARNt, factores de iniciación y elongación, factores auxiliares, aminacil-ARNt sintetasas, e incluso moléculas que interactúan con el péptido naciente y colaboran en su plegamiento, como las chaperonas, PPI y PDI entre otras.

Si bien para expresar una proteína recombinante se tienen en cuenta los diferentes sistemas de expresión heterólogos⁷⁷, no es usualmente reconocido el aporte de los componentes de la maquinaria de traducción a la estructura tridimensional de una proteína. En realidad, se han publicado pocos trabajos sobre la vinculación del contexto de síntesis de una proteína con su conformación.

1.6 Cinética de traducción

Al referirnos a la “cinética de traducción” queremos describir la velocidad local de traducción de cada codón. La biosíntesis proteica es un proceso discontinuo^{78,79}. El tiempo que permanece el ribosoma en cada codón del ARNm no es constante. Existen pausas durante la traducción en las cuales el ribosoma se desplaza más lentamente^{55,56,59,78,80}. Dichas pausas pueden tener relevancia durante el plegado co-traduccional de las proteínas determinando eventos de plegamiento parcial de la proteína⁷⁶ o favoreciendo interacciones con distintas moléculas²⁷.

Varios factores pueden afectar la cinética de traducción: 1) características del ARNm, como uso de codones, contexto de codones⁸¹ y la adquisición de estructuras secundarias y/o terciarias características^{76,82,83}, 2) poblaciones de ARNt presentes y su relación con el uso de codones del ARNm que está siendo traducido, 3) interacciones entre el ribosoma y el péptido naciente⁸⁴⁻⁸⁶.

El estudio de las pausas de traducción se ha realizado a través del análisis del tamaño de los péptidos nacientes aislados de fracciones polirribosómicas^{59,78,80,87} o mediante estudios de protección a ribonucleasas y análisis de las secuencias del ARNm protegidas por la presencia de los ribosomas⁸⁸⁻⁹¹ o por otros métodos de estudio *in vivo*⁸⁷.

Se han desarrollado modelos teóricos que predicen pausas de ribosomas en regiones codificadas por codones raros (codones menores) cuando dichos codones se localizan en *clusters* en el ARNm⁸⁸⁻⁹². A partir de dichos modelos se ha propuesto que el tránsito ribosomal puede ser alterado sustituyendo en el ARNm codones abundantes (codones mayores) por menores⁹² o viceversa pudiendo así afectar la estabilidad del ARNm ocultando o exponiendo sitios de corte por RNAsas^{93,94}. Algunos trabajos experimentales en *E.coli* revelaron que la sustitución de codones sinónimos en los genes *bla* y el *ompA* redujo la estabilidad del ARNm^{76,94,95}.

Recientemente se determinó experimentalmente la velocidad de traducción de un ribosoma sobre una horquilla de ARNm *in vitro*⁷⁹. Los autores de este trabajo lograron discriminar entre el tiempo que el ribosoma pasa en cada codón (estancia) y el tiempo de traslocación, lo que permitió caracterizar la dinámica de traducción paso a paso. En las condiciones experimentales del trabajo, el tiempo de traslocación promedio por codon fue inferior a 0,1 segundos mientras que en sitios de pausas transitorias de la traducción los ribosomas pueden permanecer tiempos más largos, hasta 2,8 minutos, teniendo una media de 2,2 segundos⁷⁹.

Cuando un ribosoma se detiene sobre el ARNm, puede desencadenar distintos eventos en la célula. En primer lugar, la traducción puede continuar normalmente luego de la pausa, generando el polipéptido completo⁸⁵. Alternativamente, el ribosoma puede saltar una posición y continuar la síntesis en otro codón del ARNm, generando un péptido distinto del especificado en el ARNm⁹⁶. Se ha observado que muchas veces los sitios de pausas se encuentran asociados a la interrupción de la traducción, lo que se ve reflejado en la producción de péptidos incompletos^{96,97}. En algunos casos la pausa traduccional puede desencadenar respuestas de emergencia para bloquear daños metabólicos mientras que otras tienen roles regulatorios en la célula^{96,98,99}.

La pausa ribosómica sería desencadenada en procariontes preferentemente por codones raros mientras que en eucariotes por la formación de estructuras secundarias del ARN⁹⁶.

En bacterias, los ribosomas detenidos en codones raros son rescatados por el ARNm (ARN de transferencia-mensajero) en el mecanismo de trans-traducción¹⁰⁰. El ARNm es una molécula híbrida ARNt/ARNm con un dominio tipo ARNt que es cargado con alanina. El ARNm cargado se une a ribosomas pausados en el sitio A desocupado ocupado por el ARNm molde. Luego los ribosomas interactúan preferentemente con

el ORF del ARN^m (de aproximadamente 10 codones con un codon stop) liberando el ARN^m molde^{96,98}.

En *S. cerevisiae*, la formación de estructuras secundarias del ORF promueve el NGD (no go decay) en el cual el abandono de la traducción coincide con el decaimiento del ARN^m⁹⁵. Este podría ser un mecanismo más general de regulación de la traducción.

1.7 Poblaciones de ARN^t

El conjunto de moléculas de ARN^t de una célula se conoce como “población de ARN^t”, y la proporción de cada molécula es uno de los factores determinantes en la síntesis proteica. En 1963 Ames y Hartman propusieron una teoría para la regulación de la traducción basada en el uso de codones sinónimos (que codifican un mismo aminoácido) y la disponibilidad de los ARN^t isoaceptores que los decodifican¹⁰¹. La abundancia relativa de los diferentes ARN^t isoaceptores varía en distintas especies¹⁰²⁻¹⁰⁶. Por otro lado, se han observado modificaciones en las poblaciones de ARN^t en eucariotas en procesos de diferenciación celular^{107,108}, estimulación hormonal, transformación tumoral¹⁰⁹, así como en procariontes en diferentes condiciones de cultivo celular^{100,110}.

Las poblaciones de ARN^t difieren en: 1) la concentración relativa de cada ARN^t (dada por el nivel de expresión y número de genes para cada ARN^t¹¹⁰), y 2) la proporción de ARN^t isoaceptores cargados (unidos al aminoácido correspondiente), que varía cuando el aminoácido es limitante, dependiendo de la concentración de dicho isoaceptor y de su frecuencia de uso en la síntesis proteica^{111,112}.

Además, es común que las moléculas de ARN^t sufran hipermodificaciones postranscripcionales en varias bases de la molécula. Se han descrito variaciones en el perfil de modificaciones de los ARN^t en distintos organismos¹¹³ y en algunas condiciones patológicas¹¹⁴ lo que genera otro factor de diversidad de las moléculas de ARN^t. La modificación de bases localizadas en el anticodón, o adyacentes al anticodón, del ARN^t¹¹⁴, pueden afectar la aminoacilación y el reconocimiento codón-anticodón, perturbando la función del ARN^t en la traducción^{113,115}

Los primeros estudios sobre las “poblaciones de ARN^t” se realizaron en *E.coli*. Se determinaron los niveles de expresión de proteínas en diferentes condiciones de cultivo, y se mostró que hay una correlación entre la frecuencia del uso de codones de las proteínas altamente expresadas y el contenido de ARN^t^{100,116,117}. En este organismo se lograron caracterizar 50 tipos diferentes de ARN^t y se observó una

variación de la abundancia relativa al cambiar las condiciones de crecimiento del cultivo¹¹⁰. Esta observación permitió correlacionar los codones utilizados preferentemente en genes altamente expresados con sus ARNt correspondientes^{118,119}, en lo que se profundizará mas adelante.

Los trabajos clásicos de Garel y col en el gusano de seda mostraron una “adaptación cuantitativa” de las poblaciones de ARNt¹⁰⁸. La fibroína de la seda contiene una alta proporción de tres aminoácidos: Glicina (46%), Alanina (29%) y Serina (12%) y es producida en grandes cantidades por un grupo particular de células especializadas. En estas células existe una abundancia proporcionalmente mucho mayor (con respecto a otras células del gusano) de los ARNt correspondientes a aquellos codones de Glicina, Alanina y Serina. Por lo tanto las células especializadas en producir fibroína sufrieron una adaptación fisiológica de las poblaciones de ARNt aumentando la concentración de los ARNt más utilizados. Observaciones similares, de la adaptación fisiológica de las poblaciones de ARNt se han realizado para las células del cristalino bovino que sintetizan cristalina¹²⁰ y para la síntesis de hemoglobina en reticulocitos¹²¹.

Pero, el estudio de las poblaciones de ARNt en eucariotas es complejo sobre todo en organismos multicelulares con especialización de tejidos. Recientemente, se han utilizado estrategias que emplean la técnica de microarreglos para analizar la expresión de ARNt humanos en distintos tejidos. Se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión de los distintos ARNt de forma tejido específicas, que además mostraron correlación con el uso de codones de proteínas específicas de dichos tejidos altamente expresadas¹⁰⁵.

Por otra parte, estudios *in vitro* de las variaciones que se producen en las poblaciones de ARNt durante la diferenciación del queratinocito, demostraron que estas variaciones son decisivas en el ciclo del papilomavirus bovino¹⁰⁷. Se observó que la proteína L1 del virus no se sintetiza en células Cos-1 en división, a pesar de las altas concentraciones del ARNm correspondiente. Sin embargo, el gen sintético de L1 donde se sustituyeron codones poco usados en mamíferos por codones sinónimos de uso más frecuente, se tradujo eficientemente en esas mismas células. Experimentos de traducción *in vitro* apoyan la hipótesis de que la concentración de algunas especies de ARNt es limitante en la síntesis de L1 en células Cos-1¹⁰⁷.

1.8 Uso de codones

El uso de diferentes codones sinónimos en la secuencia de un gen, no tiene consecuencias sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, pero puede tener otro tipo de efectos, entre ellos podemos mencionar:

- 1) Interferencia con sitios de splicing o sitios potenciadores de splicing (ESE)¹²²
- 2) Alteración de secuencias de reconocimiento por proteínas estabilizantes y/o desestabilizantes del ARNm¹²³
- 3) Producción de estructuras secundarias del ARNm alternativas, pudiendo ser también determinante de las pausas de traducción^{82,94} y de la regulación de la traducción
- 4) Variación de la cinética traduccional durante la síntesis proteica¹²⁴ en función de las poblaciones de ARNt presentes.

Se ha observado que las frecuencias relativas de uso de codones sinónimos varían tanto con el gen en cuestión como con la especie en estudio¹¹¹. Además, para organismos multicelulares con especialización de tejidos, cada vez hay más evidencias que sugieren que las preferencias de uso de codones pueden variar durante el desarrollo de un organismo o en los tejidos diferenciados en animales y plantas^{104,125}. Varios autores han correlacionaron el uso de codones y el contenido de ARNt en organismos unicelulares pro y eucariotas^{102,117}. Muchos explican esta correlación haciendo referencia a la optimización de la traducción, siendo los aminoacil-ARNt más abundantes para un aminoácido utilizados predominantemente en codones de genes altamente expresados^{110,118,119}. Esta idea se basa en la correlación encontrada entre las preferencias de uso de codones sinónimos en proteínas altamente expresadas en bacterias^{102,117} y levaduras¹²⁶ lo que llevó a la definición de los codones “óptimos” o “mayores” y los codones “raros” o “menores”. En *E. coli* los genes de las proteínas altamente expresadas usan codones (mayores u óptimos) que se corresponden a los ARNt más abundantes^{102,117}. En cambio, los genes de las proteínas que se expresan en bajo nivel no presentan preferencias de codones sinónimos marcadas en relación con la abundancia relativa de ARNt. En organismos multicelulares como *Drosophila* y *C. elegans* también se encontró correlación entre el sesgo en el uso de codones y el nivel de expresión génica¹²⁷⁻¹²⁹. Algunos estudios bioinformáticas recientes muestran que hay diferencias en la frecuencia de uso de codones de un grupo de genes de alta expresión y selectivamente expresados en 6 tejidos en humanos¹⁰⁴ sugiriendo la posible existencia de poblaciones de ARNt asociadas a cada tejido.

Por otro lado, existen estudios que intentan adjudicar un rol a las preferencias de codones sinónimos observadas vinculado a la estructura de la proteína, en particular establecer el rol de los codones raros. El uso de codones sinónimos se relacionó con la estructura secundaria de las proteínas^{76,82,130,131}, se encontró una mayor presencia de codones raros en vueltas, lazos y dominios de unión^{130,131} así como en regiones conectoras de dominios en proteínas multidomínos^{76,80,82}. Esto contribuye a la comprensión del modelo de plegado co-traducciona l de las proteínas, y a la naturaleza discontinua del proceso de traducción, en el cual existen sitios lentos o de pausas que podrían vincularse con el plegado de distintos dominios en una proteína^{82,130}.

El grupo de investigación de la Sección Bioquímica se ha interesado en el tráfico ribosomal, y en cómo influye el uso de codones sinónimos en la modulación de la expresión génica. En particular, trabajos realizados en nuestro laboratorio mostraron que cambios de codones sinónimos en la secuencia codificante de la proteína de unión a ácidos grasos Efgabp1 expresada en *E. coli*¹³² modifican la solubilidad de la proteína. Asimismo, se mostró que la expresión del mismo mutante era capaz de activar un promotor *heat shock*, como sensor que detecta proteínas mal plegadas⁸³. Esto sugiere que el uso de distintos codones sinónimos no es equivalente y puede llevar a que una misma cadena polipeptídica, con igual secuencia de aminoácidos pueda adoptar diferentes conformaciones¹³².

Otros estudios realizados con un propósito similar, consistieron en el reemplazo de codones sinónimos en la secuencia codificante de la Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT). Estos estudios permitieron detectar una pausa traduccional diferencial que se asoció con una disminución del 20-30% de la actividad específica de la enzima, cuando fue sintetizada en extractos de traducción *in vitro* de *E. coli*^{59,133}.

Recientemente, un estudio en células humanas reportó que un alelo del gen de Resistencia a Multi Droga 1 (MDR1), que codifica para la glicoproteína P, portadora de una mutación sinónima, produjo un cambio de especificidad de la proteína por el sustrato. La glicoproteína P codificada por el gen mutante generó una especificidad por el sustrato alterada y diferente sensibilidad a los inhibidores. Los autores del trabajo sugirieron que la presencia de un codón raro podría afectar el tiempo de plegado co-traducciona l y de inserción en la membrana, alterando la estructura de los sitios de interacción con el sustrato y los inhibidores¹³⁴.

Si bien el efecto de los codones sinónimos^{59,113,133,134} es frecuentemente considerado al expresar proteínas recombinantes en *E coli*, para minimizar la formación de cuerpos de inclusión y/o para obtener la proteína activa, la incidencia del uso de codones y poblaciones de ARNt en la cinética de traducción y la estructura tridimensional de las proteínas es generalmente desestimado.

1.9 Hipótesis

En este trabajo se propone abordar el estudio del plegamiento *in vivo* de proteínas partiendo de la hipótesis de que el establecimiento de la estructura tridimensional *in vivo* es un proceso parcialmente co-traduccional en el que inciden dos elementos estrechamente vinculados: 1) la cinética traduccional y su modulación, 2) la composición de la maquinaria de traducción en cada situación celular específica.

1.10 El modelo de estudio: Receptor de Estrógenos α (ER α)

Los receptores de estrógenos (ERs) son factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos que pertenecen a la familia de receptores nucleares. Esta familia incluye a los receptores de glucocorticoides, receptores tiroideos/retinoideos, receptores de vitamina D, receptor de esteroideos, de estrógenos y andrógenos y receptores huérfanos para los que no se conoce el ligando^{135,136}. Estos receptores están presentes ya sea en el citoplasma o núcleo celular¹³⁶ y participan de diversas funciones.

Existen dos tipos de ERs, el ER α y el ER β que son productos de distintos genes^{137,138}. Ambos tipos de ERs se unen a estrógenos, pero se diferencian en su concentración y localización en tejidos así como en su estructura y modo de acción^{135,137,139}. El ER α se expresa principalmente en el útero, hígado, riñón y corazón mientras que el ER β se expresa principalmente en ovario, próstata, pulmón, tracto gastrointestinal y vejiga. La co-expresión ocurre en glándulas mamarias, epidermis, tiroides, adrenales, médula ósea y ciertas regiones del cerebro¹⁴⁰.

El ER α está implicado en la homeostasis, proliferación y desarrollo de diversos tejidos así como en la diferenciación celular. Su función reguladora de la transcripción puede

ser dependiente o independiente de estrógenos. Sus efectos dependientes de los estrógenos se evidencian principalmente en el desarrollo de los sistemas reproductivos femenino y masculino, así como en el desarrollo del sistema nervioso central, esquelético y cardiovascular^{141,142}.

1.10.1 Estructura del ER α

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares presentan una estructura en dominios¹³⁶ que se muestra en la Figura 5 (A-F).

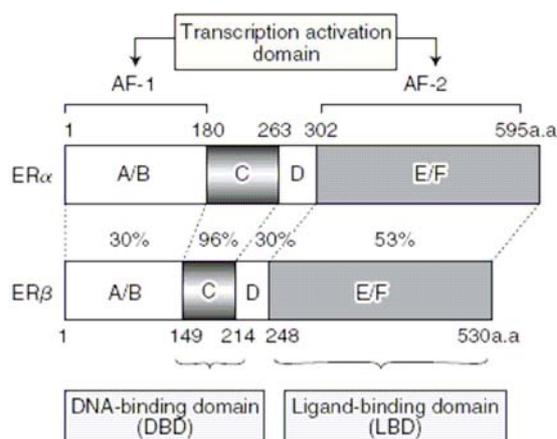


Figura 5. Comparación de la estructura del ER α y ER β . Se representan los distintos dominios de los ERs y el porcentaje de similitud de secuencia de aminoácidos (a.a.). Extraído Inoue S. & Horie-Inoue K. 2004.¹⁴³.

El dominio A/B corresponde al dominio amino-terminal de la proteína y está involucrado en la transactivación AF-1 que controla la transcripción de forma independiente de hormonas^{138,144,145}. En la familia de receptores nucleares es un dominio poco conservado y de tamaño variable¹⁴⁶. La región C es altamente conservada y contiene al dominio de unión al ADN (DBD)¹⁴⁶. Se caracteriza por 2 motivos de dedos de zinc que funcionan cooperativamente en la unión al ADN^{147,148}. La región E contiene al dominio de unión al ligando (LBD)^{135,149}. Es un dominio globular que conforma el sitio de unión a la hormona, una interfase de dimerización y una función de co-activación y co-represión (AF-2) de la transcripción^{138,144,145}. La actividad de AF-2 es estrictamente dependiente de ligando. Las regiones D y F son de tamaño variable y poco conservadas¹³⁵.

No se ha podido determinar la estructura tridimensional completa del ER α . Hasta el momento se determinó la estructura del DBD y del LBD del ER α mediante cristalografía de rayos X^{150,151}. (ver Figura 6).

Se ha descrito la plasticidad conformacional del ER, en particular de estos dominios LBD y del DBD, lo cual contribuye a la interacción y formación de complejos con distintas moléculas que median sus efectos¹³⁹. El LBD se dispone en una estructura de α -hélices antiparalelas plegadas tipo sándwich. La región es altamente estructurada y consiste en 12 α -hélices que al unirse al ligando adoptan una conformación que expone una superficie hidrofóbica donde se unen proteínas hidrofóbicas^{146,152}. La hélice 12 conforma un interruptor molecular que regula la comunicación entre los sitios del ligando y de actividad co-activadora^{139,153,154}. El “bolsillo” de unión al ligando está formado por una cavidad, que al unirse el estradiol, estabiliza a la hélice 12, encapsulando al ligando en el bolsillo. Algunos ligandos son capaces de interferir con esta hélice 12, previniendo la interacción con co-activadores¹³⁹. La unión del DBD al ADN (al motivo llamado ERE) induce cambios conformacionales en el ER α que aumentan su estabilidad térmica y su contenido en α -hélices¹⁵⁵. Estos cambios son más pronunciados que los generados por la unión del estradiol al LBD¹⁴¹. Los estudios estructurales realizados por RMN sugieren que la región Nt del ER α es desordenada en solución acuosa, pero formaría estructuras en α -hélices y/o una superficie hidrofóbica al interactuar con co-factores transcripcionales^{147,156}.



Figura 6. Forma dimérica del LBD del ER en complejo con el DES dietilstilbestrol (PDB code 3ERD; Shiau et al. 1998¹⁵⁴).

En mamíferos, además de los ER α y β , existen isoformas que surgen de la expresión de distintos promotores del mismo gen o de splicing alternativo¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

El gen del ER α está controlado por al menos 7 promotores¹⁶⁰. Algunos de ellos se utilizan diferencialmente en los distintos tipos celulares^{160,161} aunque sólo uno está asociado a la expresión del ER en un tejido específico, el promotor T, en el tracto reproductivo masculino^{147,160}.

El gen del ER α genera el ER completo de 66 kDa y una variante de splicing que carece de dominio Nt completo de 46 kDa¹⁶⁰ (ver Figura 7). Sin embargo, algunos

autores han reportado la expresión *in vitro* de la forma de 46 kDa¹⁶² a partir del transcrito que origina la forma de 66 kDa, indicando que podría ser resultado de un escaneo ribosómico débil¹⁶³ o por la existencia de un IRES¹⁶⁴.

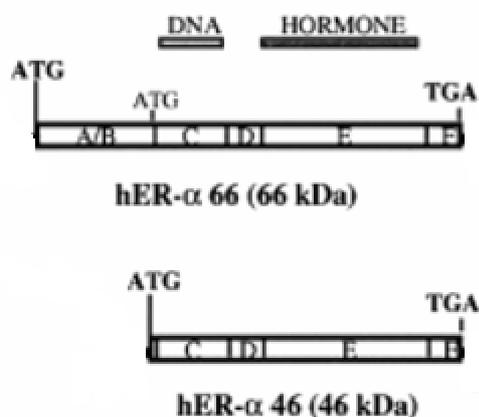


Figura 7. Isoformas del ERα codificadas por el gen ESR1. Modificado de Flouriot *et al.* 2000¹⁶³.

1.10.2 Mecanismos de acción del ERα

El ERα es un factor de transcripción que activa o reprime la expresión de diversos genes específicos^{23,165}. Para ejercer esta función, debe estar en una conformación tal que permita su dimerización y establecer interacciones específicas con ligandos estrógenicos, con el ADN y con otras proteínas que participan en esa función^{139,144,145,166,167}.

La unión de cada ligando al ERα genera una conformación única ERα- ligando, que puede afectar la unión del receptor a co-factores^{159,168}. El ligando natural del ERα es el 17β estradiol (E2) que actúa como agonista. Las terapias hormonales para el tratamiento de algunos tipos de procesos tumorales o terapias endocrinológicas, que tienen como blanco al ERα, han desarrollado un gran número de efectos secundarios en los pacientes tratados. Por este motivo el diseño de otros ligandos, llamados Moduladores de ER Selectivos (SERMs)¹⁶⁹, con diferentes características funcionales, ha tomado gran importancia biomédica. Los SERMs regulan las funciones del ER de forma tejido dependiente y presentan diferente perfil agonista (con actividad transcripcional) o antagonista (sin activación transcripcional). Entre ellos se encuentra el tamoxifeno¹⁷⁰ que actúa como antagonista en el tejido mamario y como agonista en el útero y esqueleto; el raloxifeno¹⁷⁰ que actúa como antagonista en el tejido mamario y como agonista en tejido óseo pero no en el útero y al ICI164, un antagonista puro¹⁷¹.

Los ER son proteínas solubles citoplásmicas y nucleares que en ausencia de hormona se encuentran unidos a Hsp90¹⁵². La unión del ER al ligando induce conformaciones (activación) que llevan a la disociación de Hsp90¹⁵², exponiendo los principales sitios de dimerización y transactivación presentes en el dominio E del ER α ¹³⁵. El ER α activado, forma homo o heterodímeros -con el ER β ^{138,165,167} y regula la transcripción mediante unión cooperativa a secuencias específicas de ADN llamadas EREs (Elemento de Respuesta a ER). Cada ERE se compone de 2 hexanucleótidos separados por 3 nucleótidos (5'AGGTCAnnnTGACCT3') y se localizan en regiones reguladoras de los genes blanco¹⁷²⁻¹⁷⁴.

De los promotores blanco que contienen EREs, sólo el de la Vitelogenina A2 contiene el ERE consenso. La mayoría de los ERE son palíndromos imperfectos que difieren en al menos 1 par de bases del consenso o se presentan como ½ ERE¹⁷⁵ tienen menor afinidad por el ER¹⁷⁶ y generan un nivel adicional de la regulación de la actividad del ER con menor afinidad por el ER¹⁷⁶.

El mecanismo fundamental de control de la transcripción por el ER α mediado por ligando es contactando directamente la maquinaria basal de transcripción¹²⁹ y reclutando proteínas co-reguladoras¹⁶⁷ que generan cambios en el empaquetamiento de la cromatina¹³⁹. Dichos cambios son promovidos por enzimas remodeladoras de la cromatina (Acetilinasas de Histonas (HAT))^{160,161} que participan en la activación transcripcional. El ER recluta en los promotores que responden a estrógenos al complejo remodelador de cromatina SWI/SNF y a las HAT^{142,177-179}.

Otras respuestas mediadas por el ER se producen a través de la represión de la transcripción y son mediadas por un grupo de enzimas llamadas deacetilasas de histonas (HDACs). Estas respuestas represoras se inducen por ligandos antagonistas, del ER α , que reclutan a co-represores nucleares como NCoR y SMRT a promotores de genes que responden a estrógenos^{142,180,181}.

El ER α también puede reclutar HAT a través de una vía dependiente de la ciclina D1¹⁷⁹ o HDAC a través de un factor de crecimiento MTA-1, componente del complejo remodelador de nucleosomas NuRD¹⁸² de una forma ligando-independiente.

La conformación del ER α con alta afinidad por el ligando, depende de interacciones secuenciales con chaperonas y co-proteínas^{35,36,182,183}. El ER α entra a la "vía de maduración" a través de una interacción co- o postraduccional con Hsp70 y subsiguiente interacción con Hsp90^{136,161,184-185} que se esquematiza en la Figura 8 La

transferencia de sustratos entre Hsp70 y Hsp90 es facilitada por la acción de Hop (Hsp70-Hsp90 Organizing Protein), que contiene sitios de unión para ambas^{23,184}. Los componentes necesarios para la formación del complejo ER-hsp90 se encuentran pre-asociados en una estructura llamada foldosoma^{186,187}. En el paso final de maduración del receptor un conjunto de proteínas que incluye a la Hsp60, p23 (co-factor de hsp90) y diferentes PPI reclutan al complejo del receptor-Hsp90^{184,185,188,189}. Aunque el rol de p23 no es claro, la unión de p23-Hsp90 es importante para la maduración de kinasas tipo src y de receptores de hormonas esteroideas, ya que drogas antitumorales de la clase de la Ansamicina como herbimicina A o geldanamicina bloquean este proceso^{23,185}.

Otra proteína que ha sido aislada unida al ER es la Disulfidril-Isomerasa (PDI), de 55 kDa^{51,190,191}.

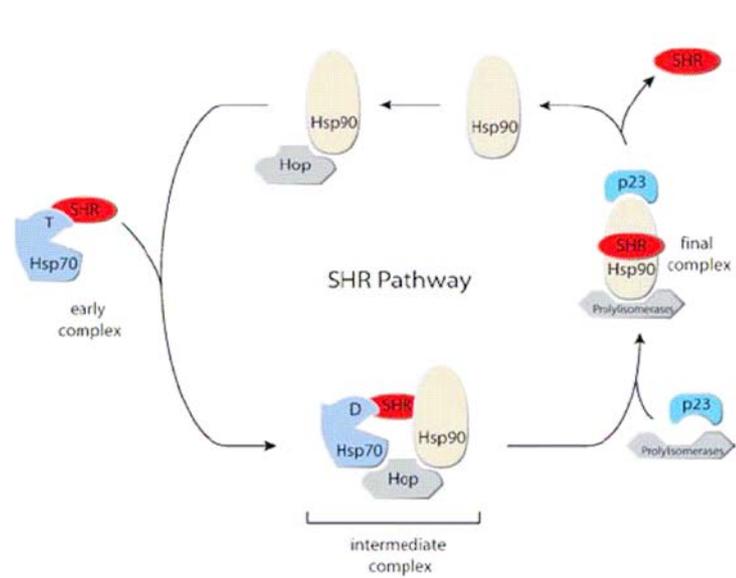


Figura 8. Formación del heterocomplejo e interacción con hsp90. Ciclo básico de activación por chaperonas de los receptores hormonales esteroideo (SHR). Hsp70 forma junto con el SHR el "complejo intermediario" de chaperonas que consiste en Hsp70, Hsp90 y Hop. Hsp 70 y Hop son luego intercambiadas por una proylisomerasa (PPI) y p23 para formar el "complejo final" o "foldosoma". La unión de p23 es reversible, no requiere de ATP y aumenta la estabilidad del complejo. Hsp40 y Hsp60 también pueden participar de la formación del complejo. En complejo con las chaperonas el SHR está activado y la unión de la hormona al receptor previene de la reunión del receptor con el complejo. Tomado de Wegele *et al.* 2004.¹⁸⁵.

El ER α resulta ser una molécula de gran importancia en procesos normales, la homeostasis, proliferación, desarrollo, diferenciación celular y mantenimiento de diversos tejidos. Asimismo, se ha vinculado al ER α a varias patologías entre ellas, algunos tipos de tumores de mama^{141,192}, endometrio¹⁹³, próstata¹⁹⁴ y renal¹⁹⁵, así como enfermedades artero coronarias¹⁹⁶ y osteoporosis¹⁹⁷. El rol regulatorio central del ER α en estos procesos ha llevado a que sea una molécula blanco en el diseño de drogas, para el desarrollo de terapias hormonales para controlar procesos tumorales, y en el tratamiento de enfermedades endócrinas¹⁹⁸, la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas¹⁴², control de la reproducción, y otros.

Como se mencionó anteriormente el efecto producido por algunos de los fármacos generados depende del tipo celular. La naturaleza tejido-específica de las respuestas a SERMs y los factores de riesgo asociados con su uso¹⁹⁹, aún no se comprende bien. Existen varias hipótesis que explican las respuestas tejido específicas del ER α . Algunos autores atribuyen respuestas tejido específicas a SERMs a la presencia de cofactores distintos que interaccionan con el ER α ²⁰⁰. Sin embargo, algunos trabajos muestran que las diferencias de co-factores transcripcionales entre los tejidos no son significativas^{138,166,199}. Otros autores explican la respuesta diferencial de los tejidos a los estrógenos a la expresión de diferentes isoformas del ER α , de tamaño variable^{158,201}. Por otro lado, muchos de los efectos tejido específicos podrían ser explicados por la actividad de Receptor de Estrógenos β , que responde a estrógenos y media otro tipo de respuestas que podrían interferir^{163,202}.

Considerando las respuestas mediadas por el ER α , y teniendo en cuenta la flexibilidad estructural de la molécula y la respuesta diferencial a SERMs tejido específica, nuestro propósito es analizar la posibilidad de que el ER en realidad adopte una conformación parcialmente diferente, según el tipo celular donde es sintetizado, y que por ello, presente diferencias funcionales en distintos tejidos.

En este trabajo nos planteamos dar un primer paso hacia ese objetivo, y que consistió en explorar la variabilidad conformacional del ER α sintetizado en dos sistemas de traducción *in vitro*, ambos eucariotas, pero de distinto origen, de plantas y de mamíferos, y luego comparar propiedades estructurales y funcionales del receptor.

1.11 Objetivos

El marco general de este proyecto es elucidar cuál es la contribución de la maquinaria traduccional y de la cinética de traducción en el plegamiento *in vivo* de proteínas.

En particular, buscamos determinar si la maquinaria de traducción o la cinética traduccional, pueden llevar a la variabilidad de conformación y de las propiedades funcionales del receptor de estrógenos alfa humano (RE- α)

Específicamente, nos propusimos optimizar la expresión en dos extractos de traducción acelulares de origen eucariota: RRL y WGE con el fin de estudiar si el RE α adopta diferentes conformaciones y/o propiedades funcionales (unión a ligandos y al ADN) cuando es sintetizado en distintos contextos celulares a partir de la misma secuencia codificante. Por otro lado, planteamos un análisis de la cinética de traducción a través de dos estrategias; la identificación de las pausas durante la traducción del ER α en ambos extractos de traducción y la influencia de codones sinónimos en la secuencia codificante del RE α en la cinética de traducción y/o en la conformación adoptada por la proteína.

2. Materiales y Métodos

Vector pSG5-ER α

El vector pSG5-ER α WT fue cedido gentilmente por el Dr. Carlos Rovira (*Hospital Universitario de Lund, Lund, Suecia*). El vector contiene la secuencia correspondiente al ADNc de ER α (número de acceso NM_000125) que fue clonado en el vector pSG5 (Stratagene, CA, USA), utilizando los sitios Bgl II y BamH I (Figura 9). Este vector permite la amplificación en sistemas procariontes y su expresión en sistemas eucariotas.

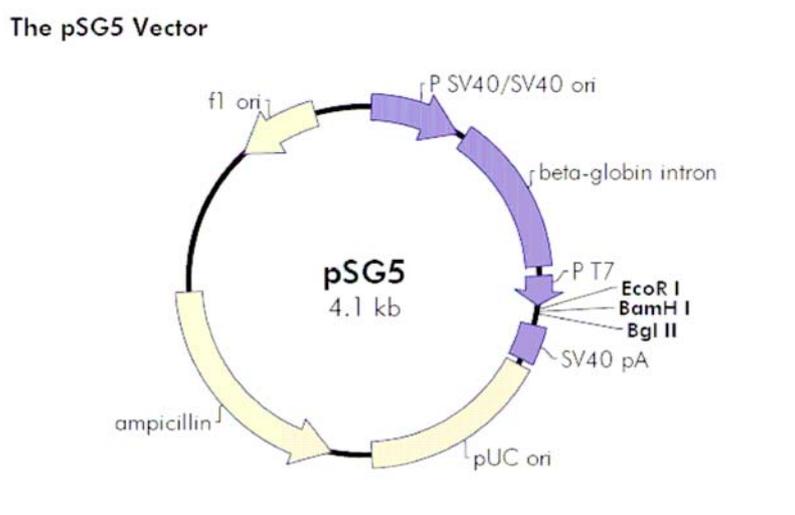


Figura 9. Esquema del mapa de restricción del vector pSG5. El mapa del vector pSG5-ER α se muestra en el Anexo 1.

Cepa bacteriana

Escherichia coli K12 XL1 Blue: supE44, hsd R17, recA1, endA1, gyr A46, thi relA1, lac⁻, F(proAB⁺, lacZ Δ M15, Tn10(tet^r)). Se utilizó para amplificación de plásmidos.

Secuenciación

El primer paso al recibir el vector pSG5-ER α fue confirmar la secuencia codificante del ER α . El vector pSG5-ER α WT fue secuenciado en el servicio del CTAG de Facultad de Ciencias utilizando los cebadores del vector pSG5for

(5'CCTACAGCTCCTGGGCAACG3'); y pSG5rev (5'TGATGCTATTGCTTTATTTTG3') y los cebadores internos diseñados; 5'TCCTCTCCCTGCAGATTC3'; 5'GCCTACATGCGCCCACTAGCCG3' y 5'GAATCTGCCAAGGAGACTCG3'.

Análisis de secuencia

La secuencia fue analizada en los programas GeneRunner y ClustalX. La secuencia codificante del ER α , clonada entre los sitios *Bam*HI y *Bgl*II, se mostró sin cambios. Se detectó una alteración en el sitio *Bgl*II del vector, que dejó de existir.

La secuencia obtenida de la región codificante coincidió con la secuencia publicada en el Gene Bank con el número de acceso NM_000125.

Para los análisis de similitud e identificación de secuencia se utilizó el programa nBLAST²⁰³ que utiliza la base de datos del GeneBank. Los análisis de familias y motivos de proteínas se realizaron con el programa Expassy Scan Prosite²⁰⁴. Para los alineamientos de secuencias se utilizó el programa ClustalX²⁰⁵.

Cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias (*Escherichia coli* XL1-Blue) se realizaron en medio LB a 37°C con agitación. En el caso de las células transformadas con plásmidos portadores de resistencia a ampicilina se agregó en el medio el antibiótico a una concentración de 100 μ g/mL. Las bacterias también se cultivaron en medio semisólido en placas de Petri con LB-agar con o sin ampicilina según el caso. Las cepas bacterianas utilizadas se conservaron en glicerol 25%, a -80°C.

Preparación de células competentes y transformación

Se prepararon células competentes mediante el protocolo de cloruro de calcio de Ausubel et al. Brevemente, las bacterias (conservadas a -80°C) se descongelaron en hielo. Se incubaron 5 minutos con 1 μ L de plásmido (250-500ng/uL) en hielo. Posteriormente se incubaron 2 minutos a 42 °C y luego otros 2 minutos en hielo. Se agregaron 300-500 μ L de LB, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se plaquearon de 10-100 μ L en medio selectivo LB-Agar-Ampicilina. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue aislado de acuerdo al protocolo de Ausubel et al con algunas modificaciones, en el cual las bacterias se someten a lisis alcalina.

Las células, provenientes de un cultivo o.n de 3 mL, se precipitaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 2 min, en tubos eppendorf. Se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100µL de Solución I. y se vortexearon. Se agregaron 200 µL de Solución II y se invirtió el tubo 5 veces. Luego se agregaron 150 µL de solución III fría. Se centrifugó la mezcla a 12000g, 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y agregó 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 12000g 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 1mL de etanol 70% frío. Se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire. Por último se resuspendió en 30 µL de agua miliQ.

Cuantificación de los ácidos nucleicos

La concentración de los ácidos nucleicos se determinó por espectrofotometría a partir de la determinación de absorbancia a 260 nm (1 unidad de absorbancia = 50 µg/mL de ADN; 1 unidad de absorbancia = 40 µg/mL de ARN) y por cuantificación en gel utilizando el programa Multigauge de FUJI, con un estandar de concentración conocida.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La calidad y el tamaño de los plásmidos y ARN se analizaron en electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1% en buffer TAE 1X(0.04 M Tris-acético, 1mM de EDTA). Los ácidos nucleicos se visualizaron con bromuro de etidio, 0.5 µg/mL. Las muestras se sembraron con buffer de carga 1X, (Fermentas) y se utilizó marcador de peso molecular 1 Kb, fermentas.

Linearización del ADN plasmídico molde

10µg de plásmido se digirieron en 50 µL de reacción con 2 U de *SaI* I (Fermentas) según indicaciones del proveedor. La mezcla se incubó a 37°C o.n. y la reacción se verificó mediante electroforesis de agarosa 0,8%. Los productos de la digestión se purifican del gel mediante el kit de QIAGEN.

Transcripción *in vitro*

Las reacciones de transcripción se realizaron utilizando sistemas de transcripción *in vitro* (Promega, CA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y ajustando algunas condiciones. Se logró el mejor rendimiento realizando la reacción en 50 µL (volumen total) de 80 mM Tris.HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 5 mM dithiothreitol (DTT), 50 µg/mL BSA, 1.5 mM ATP, 1.5 mM GTP, 1.5 mM UTP, 1.5

mM CTP, 2.5 μ L (100 unidades) de RNasin (Promega), 5 μ g de molde de ADN de pSG5-ER α linearizado con Sal I y 80 unidades de T7 ARN polimerasa (Promega). La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas. Luego, el producto es tratado con DNasa-libre de RNasa durante 30 minutos a 37°C para degradar el molde de ADN. Los transcritos son purificados por RNeasy Mini Column Kit (QIAGEN) eluyendolos en 30 μ L de agua. La pureza e integridad del ARN fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Ausubel, Maniatis).

Traducción *in vitro*

La traducción *in vitro* se realizó utilizando el Lisado de Reticulocito de Conejo (RRL) (L4960-Promega) o el Extracto de Germen de Trigo (WGE) (L4380-Promega) en presencia de 30 μ g/mL de ARNm del ER α . En algunos ensayos se utilizó para la reacción [³⁵S]methionine (Redivue L-³⁵S Methionine 15 mCi/mL, Amersham AG1594). La reacción se incubó durante 2 horas a 30°C. Se detiene enfriando la mezcla a 0°C en hielo.

Proteólisis limitada del ER α

La reacción de proteólisis limitada se realizó modificando levemente el protocolo descrito en Eng y col, (1997)²⁰⁶. Se utilizaron 3 μ L de mezcla de traducción cada 10 μ L de reacción de proteólisis, conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl and 10% (v/v) glicerol. El tiempo cero de la reacción es determinado por el agregado de la quimotripsina (Chymotrypsin-Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl (TLCK) (Sigma) (0.5 – 1 mU). La mezcla se incubó a 25°C y se tomaron alícuotas de 10 μ L periódicamente según lo indicado. La reacción se detuvo mediante el agregado de Buffer de Muestra (SB) e incubación a 80°C durante 10 minutos. Los péptidos resultantes se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

Cuantificación de radioactividad

Las fracciones del ER α fueron cuantificadas utilizando el Phosphorimager (Fuji BAS1800, Japan) y los datos se analizaron utilizando el programa Science Lab- Multi Gauge V2.2 (FUJI). Para calcular el porcentaje de ER resistente a la degradación por proteasa, se midió a través del programa la banda a la altura de la proteína de 66 kDa y se normalizó por la intensidad de una banda de igual área correspondiente al blanco. Se tomó como 100 % la intensidad de la banda correspondiente al ER α de 66kDa al tiempo 0 de proteólisis. Los ensayos se repitieron varias veces según se indica. El

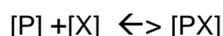
error fue menor del 17% en el caso de las muestras provenientes de WGE y menor de 4% para las muestras de RRL.

Ensayo de unión al ligando

Se realizaron ensayos de afinidad de unión al ligando, en colaboración con la Dra. Nora Artagaveytia y Estela Román, Facultad de Medicina. Para ello, en la reacción de traducción *in vitro* descrita anteriormente, se utilizaron aminoácidos no radioactivos. La unión del ER α fue determinada por ensayo de unión al ligando de Múltiples Puntos como se describió previamente²⁰⁷, de acuerdo con los protocolos estandarizados escritos por la European Organization for Research and Treatment of Cancer²⁰⁸. Para determinar la constante de disociación- k_d para el 17- β -estradiol (E2), se incubó el extracto de traducción con E2 radiomarcado (2,4,6,7 3H-17 β -Estradiol 87 Ci/mmol) en concentraciones entre 0.5×10^{-9} to 8.4×10^{-9} M durante 16 horas a 4 °C. La incubación se realizó con un exceso molar de 200 veces de Dietilestilbestrol (DES) para estimar la unión no-específica. Luego de la incubación, se separa fracción de E2 marcado, unido y no unido mediante centrifugación en presencia de dextrano coated charcoal (DCC). Mediante la determinación de la cantidad de radioactividad correspondiente a la hormona libre, respecto a la radioactividad total, se obtiene la cantidad de unión específica. La unión específica de ER fue calculada para cada concentración de E2 utilizada. Las fracciones de ER unidas y no unidas fueron estimadas mediante medidas en contador de líquido de centelleo²⁰⁹. Los resultados obtenidos se analizan por el Método Scatchard²⁰⁹ que permitió estimar la constante de afinidad.

Medida de la constante de equilibrio por el método de Scatchard

Se calculó la constante de equilibrio para la unión del ER α a su ligando, el estradiol mediante el método de Scatchard²⁰⁹. A través de la medida de actividad específica de la hormona marcada es posibles determinar las especies que están en equilibrio. Considerando la reacción de unión del ER α [P] al ligando E2 [X]:



La reacción en equilibrio se describe por la constante:

$$K = \frac{[PX]}{[P][X]}$$

y considerando que $[P] = P_0 - [PX]$, siendo P_0 la concentración inicial de ER.

Se obtiene entonces,

$$\frac{[PX]}{[X]} = K[P] = K(P_0 - [PX])$$

El gráfico de $[PX]/[X]$ en función de $[PX]$ se conoce como gráfico de Scatchard y su pendiente corresponde a $-K$. Mediante el ensayo de unión al ligando, descrito previamente, es posible determinar $[PX]$, la hormona unida al $ER\alpha$, y $[X]$ la hormona libre y de ésta manera obtener la constante de afinidad del $ER\alpha$.

Análisis de Solubilidad del $ER\alpha$

Los productos de traducción fueron centrifugados a 15.000g durante 30 minutos a fin de separar la fracción soluble e insoluble. El precipitado fue resuspendido en un volumen de Tris 10mM pH 8, igual al de la mezcla centrifugada. Ambas fracciones S (solubles) y P (precipitado) se analizaron por SDS-PAGE, autorradiografía y cuantificados por PhosphorImager. Para evaluar si el ligando modifica o no la solubilidad del ER, se realizó el análisis de solubilidad de los productos de traducción en presencia de DES como ligando y/o EtOH, según se indica.

Extracción de polirribosomas por ultracentrifugación

Se siguió el método descrito por Komar *et al.* (1999)⁵⁹ con algunas modificaciones. Se realizó una traducción de 4-6 minutos que se detuvo con el agregado de un volumen igual de buffer A frío (A: Tris HCl pH 7.6 20 mM, NH_4Cl 200 mM, $MgCl_2$ 20 mM, DTT 2 mM y EDTA 0.2 mM). Los extractos se depositaron sobre 3 mL de glicerol al 30% en buffer A diluido al medio, y se centrifugaron 2 h a 200000 rpm en rotor SWi 50.1 (Beckman) a 4 °C para precipitar los polirribosomas. Los polisomas se resuspendieron en 12 μ L en 1mM Tris-HCl pH 7.6 conteniendo ribonucleasa A 0.5 mg/mL y se incubaron durante 30-45 minutos a 37°C. Para aumentar la hidrólisis del enlace éster peptidil-ARNt se agregó NaOH a una concentración final de 10 mM y se incubó por 30 minutos. Los péptidos nacientes obtenidos se incubaron a 100°C con SB 4X y se analizaron por SDS-PAGE 16% o electroforesis en geles en gradiente 18-4% según el caso.

Dosificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método del ácido bicinonínico (BCA, Pierce). Se utilizó como estándar una serie de 12 diluciones de BSA de concentración conocida (0.547, 0.506, 0.427, 0.309, 0.269, 0.212, 0.116, 0.084, 0.056, 0.042, 0.026, 0.015 mg/mL). La determinación de cada medida se realizó en placa de ELISA utilizando 10 μ L de muestra y agregando en cada pocillo 200 μ L de una solución que contiene ácido bicinonínico (50 partes) y sulfato de sodio (1 parte). Cada medida se realizó por duplicado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se incubó

30 minutos a 37°C hasta desarrollar color y se midió la absorbancia a 550 nm en un Lector de ELISA (Labsystems Multiscan MS).

Análisis de proteínas por electroforesis

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida (10-18%) con SDS²¹⁰ o en gradiente (5-18%)²¹¹. Las muestras se mezclaron con partes iguales de buffer de carga para proteínas 2X y se hirvieron durante 5 minutos. El gel se corrió en Buffer de Corrida a 25mA. Para la estimación del tamaño molecular se utilizó un Marcador de Peso Molecular indicado en cada caso. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie.

Autorradiografía

Los geles una vez teñidos, se secaron sobre un papel wathmann 3M, 60 min a 70° en un secador de geles BioRad Modelo 583. Se expusieron placas BioMax MR (Kodak, 8736936, Rochester, NY), de 1-15 días según el caso.

Western blot

Los geles se transfirieron a una membrana Hybond C (Amersham) del mismo tamaño del gel. Se siguió con el protocolo de Ausubel utilizando un dispositivo de transferencia semi-húmedo y la solución de transferencia (25mM Tris-HCl pH=8.3; 150mM Glicina, 0.037% SDS, 20% etanol). La transferencia se realizó a 0.8mA/cm² durante 60 minutos.

Las membranas, una vez transferidas, se bloquearon en PBS- Tween (0.1%)- leche (5%)- glicina (2%) durante 60 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego se incubaron en el suero de conejo anti-ER α (ER α (H-184): sc-7207. Santa Cruz Biotechnology, inc.) (1:100, en solución de bloqueo) durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS-Tween20 (0.1%). Posteriormente, las membranas se incubaron en una solución de anticuerpo anti- IgG de conejo HRP conjugado a peroxidasa (Promega) (1:3000) o un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Promega) (1:30000) durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno. La detección se realizó utilizando un sistema quimioluminiscente (Pierce); o el sistema NBT-BCIP²¹² dependiendo del anticuerpo secundario utilizado.

3. Resultados

El objetivo general del presente trabajo es establecer cuál es la contribución de la maquinaria y de la cinética de traducción al plegado *in vivo* de proteínas en eucariotas. Como mencionamos previamente, se eligió trabajar con el ER α humano. Nuestro interés se originó al conocer los efectos antagónicos de un mismo SERM sobre el ER α expresado en diferentes tejidos. La gran diversidad de funciones del ER α así como su flexibilidad estructural para llevar a cabo los diversos tipos de interacciones con SERMs, ADN, y otros factores auxiliares permite plantearnos nuestra hipótesis de trabajo en la cual la conformación del ER α podría depender del contexto celular donde es sintetizado.

Específicamente se analizó si el proceso de biosíntesis del ER α y su cinética de traducción asociados a distintos contextos celulares podía llevar a variaciones del plegamiento de la proteína o de su actividad biológica.

La estrategia empleada fue trabajar con sistemas de traducción acelulares que se encuentran disponibles comercialmente. Se eligieron los sistemas de traducción *in vitro* RRL y WGE por ser ambos de origen eucariota y por ser a su vez obtenidos de organismos muy distantes evolutivamente como son los mamíferos y las plantas.

3.1 Capítulo I. Optimización de la expresión del ER α en sistemas acelulares

Los sistemas de traducción *in vitro* RRL y WGE son sistemas “no acoplados” que contienen una mezcla de componentes de la maquinaria de traducción (ARNs y proteínas) necesaria para sintetizar una proteína de interés a partir de ARNm. La expresión en estos sistemas requiere previamente la síntesis del ARN a partir del ADN molde. El vector pSG5-ER α permite la transcripción de la secuencia codificante del ER α a partir del promotor de la T7 polimerasa y fue utilizado en las etapas de expresión del ER α . En primer lugar se llevó adelante un proceso de optimización de las condiciones experimentales de la transcripción y la traducción *in vitro*.

La transcripción *in vitro* es una de las etapas delicadas en nuestro análisis ya que el ARN obtenido es utilizado en las etapas posteriores. La reacción se realizó según las recomendaciones generales del fabricante pero se debieron ajustar algunos parámetros como la conformación del ADN molde y la presencia de espermidina.

Inicialmente se realizó la transcripción utilizando ADN del plásmido superenrollado como molde pero no se obtuvo transcripto en cantidades apreciables.

Por este motivo se utilizó ADN lineal como molde. El vector pSG5-ER α se linearizó con *Sal* I generando 2 fragmentos de 3031 y 2873 pb, indiscriminables por electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1 % como se muestra en la Figura 10. Los sitios de corte de la enzima se muestran en el mapa del vector presentado en M&M. Los fragmentos obtenidos se utilizaron en la reacción de transcripción, uno de ellos tiene un promotor específico para la T7 ARN polimerasa. En la figura 10 se observa el transcrito generado de aproximadamente 3000 bases a la altura de la banda de 1000pb del marcador de peso molecular de ADN.

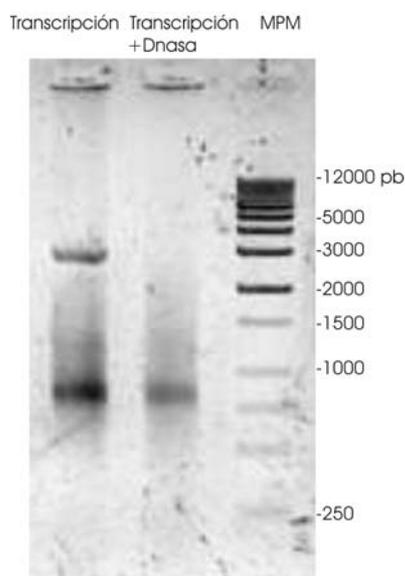


Figura 10. Transcripción *in vitro* a partir de pSG5-ER α /*Sal* I. Carril 1, 2 μ L de reacción de transcripción. Carril 2; 1 μ L de la reacción de transcripción luego del tratamiento con DNAsa. Carril 3 Marcador peso molecular de ADN.

El rendimiento de la reacción se incrementó al doble agregando espermidina. Ésta promueve la transcripción *in vitro* evitando la inhibición de la reacción por formación de complejo ARN-ARN polimerasa sin afectar la interacción de la enzima con el ADN molde²¹³. La

Figura 11 nos muestra el incremento del ARN producido cuando la transcripción ocurre en presencia de 2 mM de espermidina. En estas condiciones se obtiene 45-75 μ g de

ARN a partir de una reacción de 50 μ L. Una vez establecidas las condiciones de reacción óptimas de transcripción se universalizaron para las siguientes reacciones.

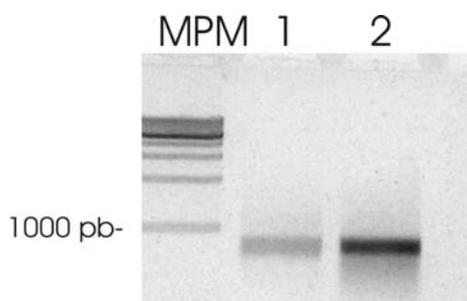


Figura 11. Análisis de los productos de transcripción en presencia y ausencia de espermidina por electroforesis en geles de agarosa. MPM: Marcador de peso molecular. 1: 1 μ L de reacción de transcripción. 2: 1 μ L de reacción de transcripción en presencia de espermidina 2mM.

La traducción *in vitro* es una de las etapas que requiere especial análisis debido a que queremos evaluar cómo diferencias en los componentes de la maquinaria de traducción influyen en el plegamiento de la proteína. Cada ARN a ser traducido necesita un ajuste particular de las condiciones de reacción. El molde de ARN generado en la etapa de transcripción, previamente descrita, se utiliza en esta etapa.

Para controlar la traducción en RRL se utilizó como control positivo el ARN que codifica para luciferasa (provisto en el kit). La traducción en RRL de dicho ARNm se realizó según las recomendaciones del fabricante, utilizando 20 μ g/mL de ARN (concentración final). En estas condiciones se obtiene una proteína marcada de 61 kDa de peso molecular aparente coincidente con el tamaño esperado.

En la traducción del ARN del ER α , se debió ajustar la concentración de RNA utilizada. Los parámetros de calidad del ARN utilizado en esta reacción fueron los de integridad, pureza y alta concentración, así como la ausencia de trazas de alcohol, que podrían inhibir la traducción. Se logró expresar al ER α en RRL utilizando 30 μ g/mL del ARN purificado por columna en cada reacción. En estas condiciones, el ER α fue detectado mediante SDS-PAGE y autoradiografía, lo que permitió obtener una proteína marcada con 35 S de 66kDa, el tamaño esperado para el producto de traducción del ER (Figura 12). La reacción sin agregado de ARN resultó en la ausencia de bandas.

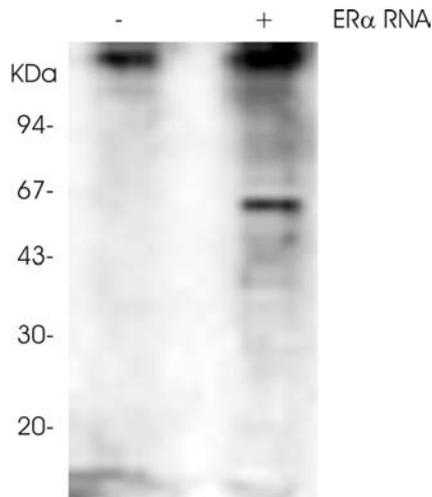


Figura 12. Traducción del ER α WT en RRL. Autorradiografía del análisis por SDS-PAGE 10%. -) control negativo de traducción, sin agregado de ARN, 10 μ L. +) con ARN codificante para el ER α , 10 μ L.

En el caso de WGE, se realizó la traducción utilizando la misma concentración de ARN que en RRL y se determinó la concentración óptima de acetato de potasio. Esta variable es determinante del rendimiento de cada reacción para transcripto.

Se ensayaron distintas concentraciones de acetato de potasio - desde 50mM (la concentración del extracto) a 200 mM – y se determinó que la concentración óptima de acetato de potasio es de 50mM, como se muestra en la Figura 13. El uso de concentraciones superiores a 50mM de acetato de potasio inhibió la reacción de traducción.

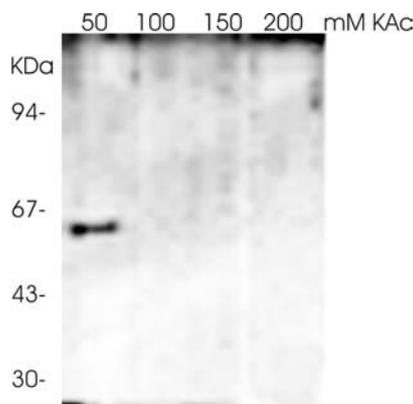


Figura 13. Análisis de los productos de traducción del ER α WT en WGE. SDS-PAGE al 10% y autorradiografía de la traducción en WGE. Carril:1) 50mM, 2) 100 mM, 3) 150 mM y 4) 200 mM de acetato de potasio.

Cuando se utilizó metionina marcada con ^{35}S de alta calidad se observó un aumento de aproximadamente cuatro veces de la cantidad de producto de traducción obtenido por reacción. A su vez, permitió utilizar un volumen considerablemente menor de mezcla de traducción para el análisis de los productos por electroforesis.

Como se observa en las Figuras 14 y 15 la traducción en estas condiciones del ARNm del ER α reveló bandas marcadas menores de 66kDa. En el análisis de la traducción de la luciferasa y CMV (citomegalovirus) -ARNm provistos en los kits- también se detectaron otras bandas de menor peso molecular que el producto final esperado.

Varias hipótesis pueden explicar la existencia de estas bandas menores de 66kDa. En primer lugar pueden ser adjudicadas a la degradación del ER α por proteasas endógenas de los extractos. Alternativamente las bandas podrían ser explicadas como productos que no lograron completar su síntesis, ya sea porque están siendo sintetizados o porque sean productos abortivos de síntesis, donde el ribosoma se desacopló del ARN. En ésta última instancia los fragmentos peptídicos carecerían del extremo Ct completo. Finalmente, podrían explicarse por la existencia de IRES (Internal Ribosome Entry Sequence) en la secuencia del ARNm del ER y se corresponderían a productos que presentan un extremo Nt incompleto.

A modo de verificar alguna de estas hipótesis se llevaron a cabo algunos experimentos que se describen a continuación.

Se realizó la reacción de traducción en presencia de inhibidores de proteasas: PMSF (0,5mM) o de una mezcla de otros inhibidores de proteasas para verificar si estas bandas eran producto de proteólisis espontánea de la proteína en el extracto. Se detectaron bandas menores de 66 kDa en el análisis de la traducción en presencia de inhibidores de proteasas, como se observa en la Figura 14. No hubo síntesis de ER α en presencia de PMSF en ninguno de los extractos de traducción empleados ya que éste inhibidor se solubiliza en isopropanol, que inhibe la traducción.

Por otro lado, como era de esperar, el ensayo de estabilidad del receptor en ambos extractos, incubando la proteína sintetizada a 25 °C durante 30 minutos, muestra que la proteína se mantiene estable, sin ser degradada (Figura 15). La existencia de bandas de menos de 66kDa en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas y la estabilidad del ER en ambos extractos sugieren que el ER α en RRL o WGE no es hidrolizado en las condiciones de nuestro ensayo.

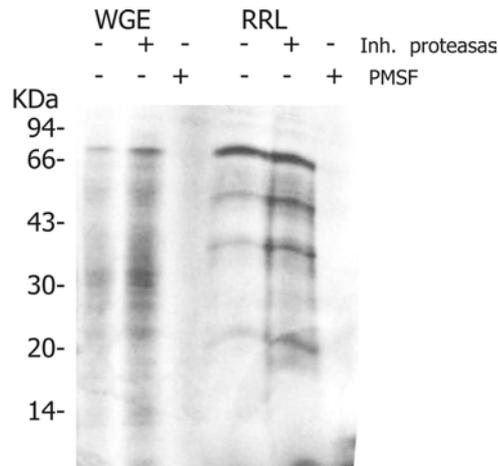


Figura 14. Síntesis del ER α WT en ambos sistemas de traducción *in vitro* RRL o WGE en presencia o ausencia e inhibidores de proteasas (Inh. Proteasas de Roche o PMSF). SDS-PAGE 12% y revelado por autorradiografía.

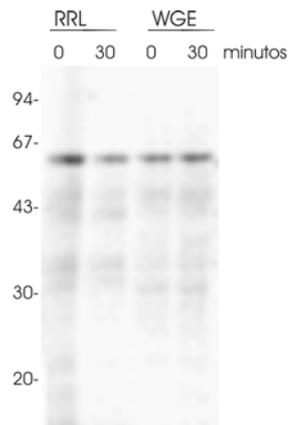


Figura 15. Estabilidad endógena del ER α sintetizado en RRL y WGE. El ER α fue incubado durante 30 minutos luego de la traducción a 25°C.

Para evaluar la posibilidad de que las bandas menores de 66 kDa fueran estadios intermedios del ER en proceso de síntesis, se agregó metionina fría a la reacción esperando la desaparición de dichas bandas una vez completada la síntesis. En estas condiciones se espera que los productos que están siendo sintetizados alcancen su tamaño final y por lo tanto se dejen de visualizar en SDS-PAGE bandas correspondientes a péptidos menores de 66 kDa. El uso de metionina fría, luego de 1

hora de traducción con posterior incubación de una hora y análisis del producto de reacción, no modificó la existencia ni perfil de las bandas observado (resultado no mostrado). Este resultado apoyaría la idea de que las bandas observadas no son cadenas peptídicas del ER α en crecimiento.

En síntesis, las bandas menores de 66kDa podrían representar productos de síntesis abortiva en los cuales el ribosoma se desacopla del ARNm y se termina la traducción prematuramente o se pueden explicar por la existencia de algún elemento de inicio de la traducción interno (IRES). Para discriminar entre ambas posibilidades podríamos utilizar anticuerpos específicos contra el extremo Ct y Nt del ER α para caracterizar los péptidos de menos de 66 kDa.

Se realizó un *western blot* para visualizar el ER α en ambos extractos empleando un anticuerpo anti ER α que reconoce parte del dominio Nt (residuos 2-185) del receptor. Como muestra en la Figura 16 se logró el reconocimiento específico por el anticuerpo anti ER α , de la banda de 66 kDa, tamaño esperado para el ER así como de otras bandas de menor peso molecular aparente. En su conjunto, los resultados obtenidos por esta estrategia no permiten concluir de forma definitiva si las bandas menores de 66 kDa corresponden a eventos de síntesis abortiva o a la presencia de un IRES, ya que el anticuerpo reconoce los primeros 185 aminoácidos del ER, y por este método no podemos conocer el número de aminoácidos reconocido por el anticuerpo en cada fragmento.

Es importante destacar que las bandas menores de 66 kDa observadas son específicas, reproducibles y de determinado peso molecular en cada extracto de traducción. Se puede interpretar que se originan en sitios preferenciales y que genera distintos péptidos en cada extracto de traducción.

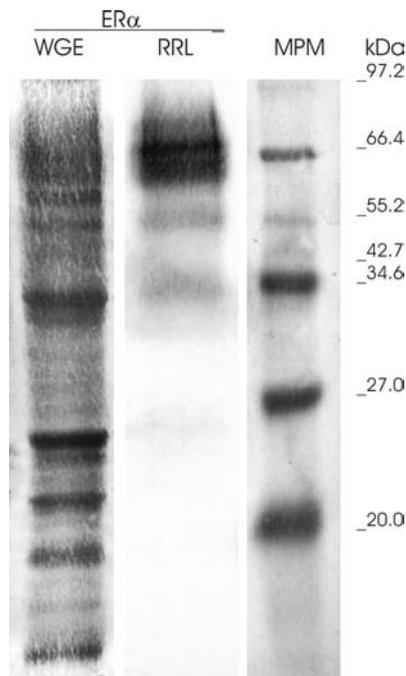


Figura 16. Análisis por western blot del ER α sintetizado en WGE y RRL. Se empleó el anticuerpo anti ER α (H-184) que reconoce los aminoácidos 2-185 de dominio Nt. Se observan bandas derivadas del ER α en ambos extracto, de tamaño molecular aparente menor al esperado.

Por otro lado, para caracterizar la traducción del ER α se estudió la velocidad de síntesis del ER, definida como la acumulación de producto a distintos tiempos de reacción, en RRL y WGE. Para esto se tomaron alícuotas de una traducción de cada uno de los extractos -a distintos tiempos-, luego de haber agregado el ARN ($t=0$) y el progreso de la reacción se analizó por SDS-PAGE y se cuantificó por phosphorImager. La cuantificación del producto al fin del tiempo de traducción muestra que el tiempo de aparición del producto completo es distinto en RRL en comparación con WGE. En RRL se obtiene el 80% del producto final a los 15 minutos, mientras que en WGE se alcanza esta cantidad relativa en torno a los 40 minutos de reacción. Este resultado explica en parte la diferencia en el rendimiento de la traducción observada entre los extractos. La Figura 17 evidencia que la velocidad inicial de síntesis en RRL es mayor que en WGE. Esto podría representar diferencias en el mecanismo de inicio de la traducción y/o síntesis y plegamiento del ER entre ambos extractos. La comparación de las gráficas – obtenidas de los datos cuantitativos del gel- muestra que en WGE y en RRL, luego de 1 hora no hay síntesis del producto de 66kDa, posiblemente por un agotamiento de los sistemas de regeneración de energía.

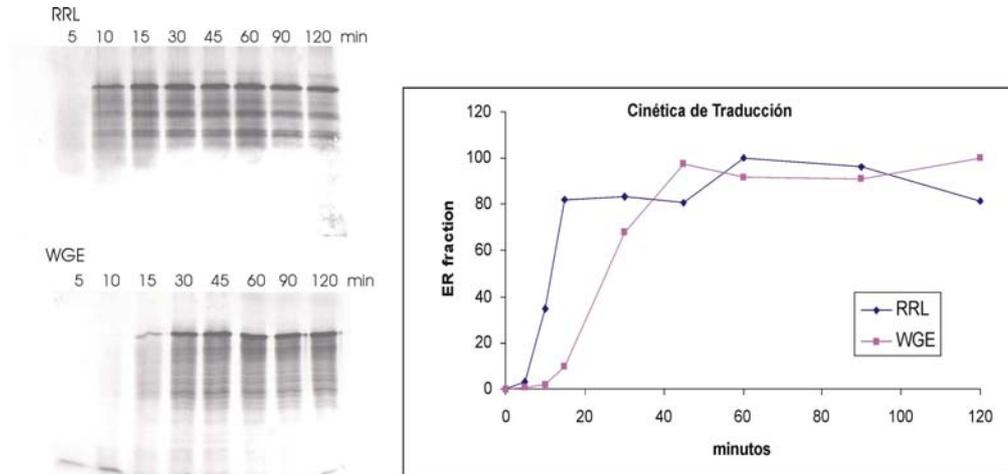


Figura 17. Análisis de la velocidad síntesis del ER α de 66kDa en WGE y RRL. A) Análisis del progreso de la traducción en los sistemas de traducción *in vitro* RRL y WGE realizado por SDS-PAGE 12% y revelado por autorradiografía. B) Grafico comparativo del progreso de la traducción en ambos sistemas acelulares.

El análisis de la síntesis del ER α a tiempos menores reveló la estabilización de intermediarios de síntesis diferentes en ambos sistemas de traducción (marcados con flechas en la Figura 18). Este resultado podría estar vinculado a la existencia de distintas

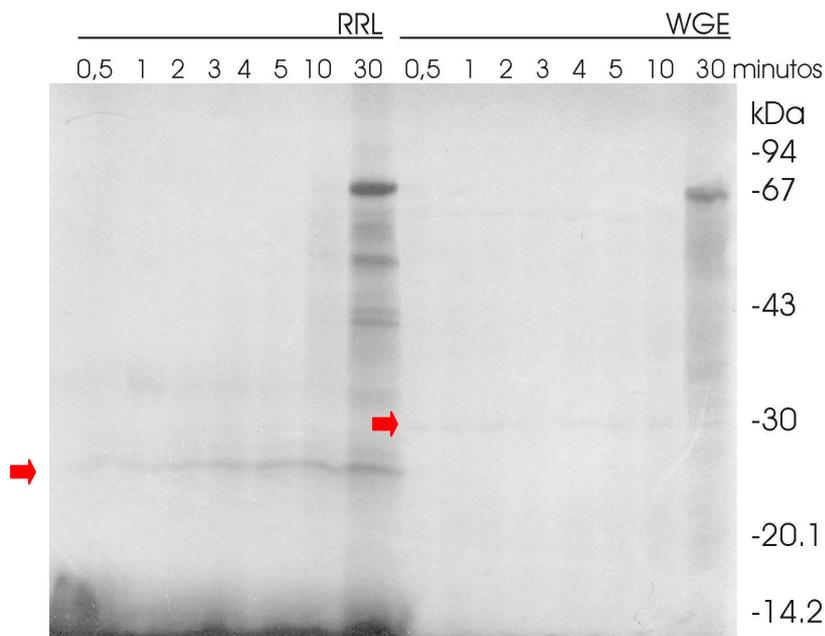


Figura 18. Análisis del progreso de la síntesis del ER α *in vitro* en WGE y RRL realizado por SDS-PAGE 12% y revelado por autorradiografía.

Una vez establecidas las condiciones experimentales adecuadas para la síntesis de ER en ambos sistemas de traducción se comparó el rendimiento de producción de ER α entre ambos extractos.

La producción de ER α es menor en WGE en comparación con RRL. Utilizando 30 μ g/mL de ARN en la reacción de traducción, se obtienen 30 μ mol/mL de ER en RRL y 15 μ mol/mL en WGE. La intensidad de las bandas de 66kDa en cada extracto se cálculo como se describe en M&M utilizando los datos obtenidos en Phosphorimager, y una curva de calibración (Figura 19), con concentraciones conocidas de 35 S metionina. Se consideró que cada molécula de ER α tiene 27 metioninas marcadas. Los resultados se muestran en la Figura 19.

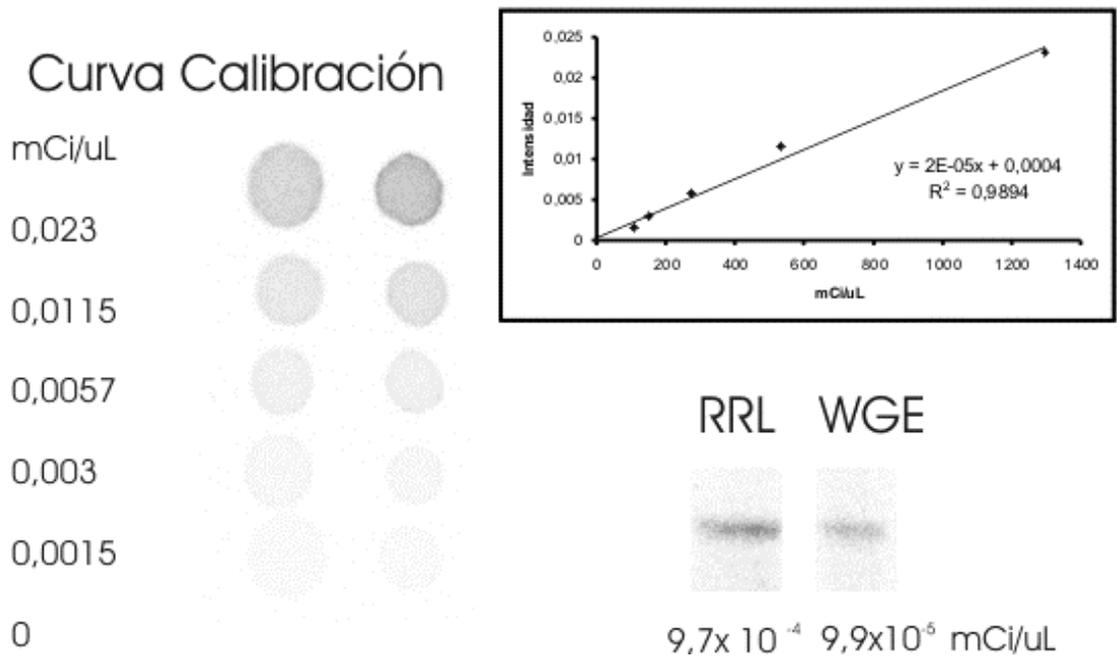


Figura 19. Cuantificación del ER α sintetizado en RRL y WGE. Se realizó una curva de calibración por duplicado con 35 S metionina marcada y se analizó el producto de traducción de 66kDa obtenido en RRL y WGE. Los datos se obtuvieron en Phosphorimager y se analizaron en el programa MULTIGAUGE, considerando que cada molécula de ER sintetizada tiene 27 metioninas marcadas.

3.2 Capítulo II. Estudios Conformacionales del ER α

El estudio del plegamiento de una proteína *in vivo* o en una mezcla compleja es difícil, ya que generalmente los métodos empleados son indirectos. En tales condiciones, las diferencias de conformación pueden ser detectadas mediante proteólisis limitada que permite detectar la accesibilidad diferencial de proteasas a una proteína sustrato, estudiando los péptidos generados en una reacción en condiciones controladas. El perfil de péptidos obtenidos refleja sitios de corte accesibles a la proteasa.

Optimización de la proteólisis limitada del ER α en RRL

Con el objetivo de obtener parámetros conformacionales del ER α se procedió a analizar los productos de traducción de ambos extractos por proteólisis limitada. La proteólisis limitada del ER α por quimotripsina ha sido descrita en la bibliografía en presencia o ausencia de ligando²⁰⁶. A partir de protocolos publicados²⁰⁶ se puso a punto el ensayo de proteólisis limitada como se describe en M&M. La α -quimotripsina (E.C.3.4.21.1) hidroliza los enlaces peptídicos sustrato del lado carboxílico luego de una tirosina, triptofano o fenilalanina, y con menor frecuencia luego de leucina o metionina.

El ³⁵S-ER α en la mezcla de traducción de RRL fue incubado en presencia de la proteasa y los péptidos resultantes de la hidrólisis parcial se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Se ensayaron distintas concentraciones de la enzima para determinar la concentración de quimotripsina que produce una proteólisis parcial del ER α durante 10 minutos de reacción. Como se observa en la Figura 20 se encontraron las condiciones de proteólisis parcial del ER α en presencia de 0,525 mU de quimotripsina/ μ L. Estas condiciones se emplearon en todos los experimentos subsiguientes de proteólisis limitada donde se varió el tiempo de proteólisis.

En estas condiciones, los péptidos mayoritarios producto de la degradación del ER α en RRL por la quimotripsina son de aproximadamente 30 kDa. Estos tamaños se corresponden a los reportados en la bibliografía²⁰⁶, para la proteólisis del ER por quimotripsina durante 10 minutos.

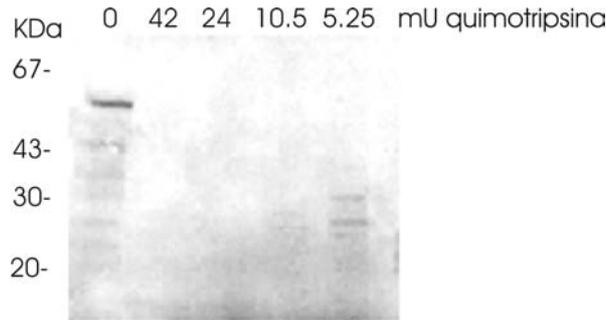


Figura 20. Proteólisis limitada del ER α traducido en lisado de reticulocito de conejo. Se ensayó la proteólisis del ER α durante 10 minutos utilizando distintas cantidades de quimotripsina. SDS-PAGE 12% y revelado por autorradiografía.

Comparación de los perfiles de proteólisis del ER α sintetizado en RRL y WGE

Una vez determinadas las condiciones de proteólisis limitada del ER α sintetizado en RRL se comparó con el patrón de degradación del ER α sintetizado en WGE. En la Figura 21a se muestra la proteólisis limitada del ER α con quimotripsina en ambos extractos en el transcurso del tiempo.

El ER de 66 kDa sintetizado en RRL es rápidamente degradado a fragmentos de peso molecular aparente de 34, 32 y 28 kDa. A su vez, estos fragmentos son degradados más lentamente que el ER de 66kDa, sugiriendo que puedan estar estructurados de forma más compacta. Por otro lado, el ER sintetizado en WGE es más resistente a la proteasa y por tanto presenta una cinética de degradación distinta. Se genera un fragmento de 52 kDa, el cual es más lentamente degradado.

La intensidad de las bandas fue cuantificada por el Phosphorimager como se describe en M&M. La Figura 21b muestra los resultados de 13 experimentos independientes cuantificados por PhosphorImager (y analizados por Software Multigauge Fuji), mostrando la reproducibilidad del resultado. Se observa que en WGE hay una fracción del ER α cercana al 10% del total que es estable luego de 1 hora de exposición a la quimotripsina.

La mayor susceptibilidad del ER α sintetizado en RRL a la degradación por la quimotripsina podría explicarse por una diferencia de concentración de proteínas en los extractos. Sin embargo, la concentración total de proteínas en el extracto de RRL es 5 veces mayor que en WGE (20mg/mL), por lo que la mayor velocidad de degradación en RRL no puede explicarse por un menor contenido total de proteínas. Es pertinente recordar que el rendimiento de síntesis del ER α es mayor en RRL que en WGE, por lo tanto hay más ER α sustrato para la quimotripsina en RRL que en

WGE. Aún así, se observa una resistencia del ER α expresado en WGE respecto al sintetizado en RRL.

La presencia de diferentes proteasas en los extractos de traducción fue descartada, como se mostró en la Figura 15 el control de estabilidad del ER en ambos extractos. Se observó que el ER es estable a 25 °C después de 30 minutos (Figura 21c).

Otra interpretación del perfil diferente de proteólisis limitada en ambos extractos podría vincularse a la existencia de agregados proteicos que oculten sitios blanco de la proteasa. Para analizar esta posibilidad se comparó la solubilidad del ER α sintetizado en ambos extractos mediante centrifugación a 15000g durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió (fracción insoluble) y se analizó junto con la fracción soluble mediante SDS-PAGE. Se observó que los productos traducidos se reparten mayoritariamente en la fracción soluble (>95%) en ambos extractos de traducción.

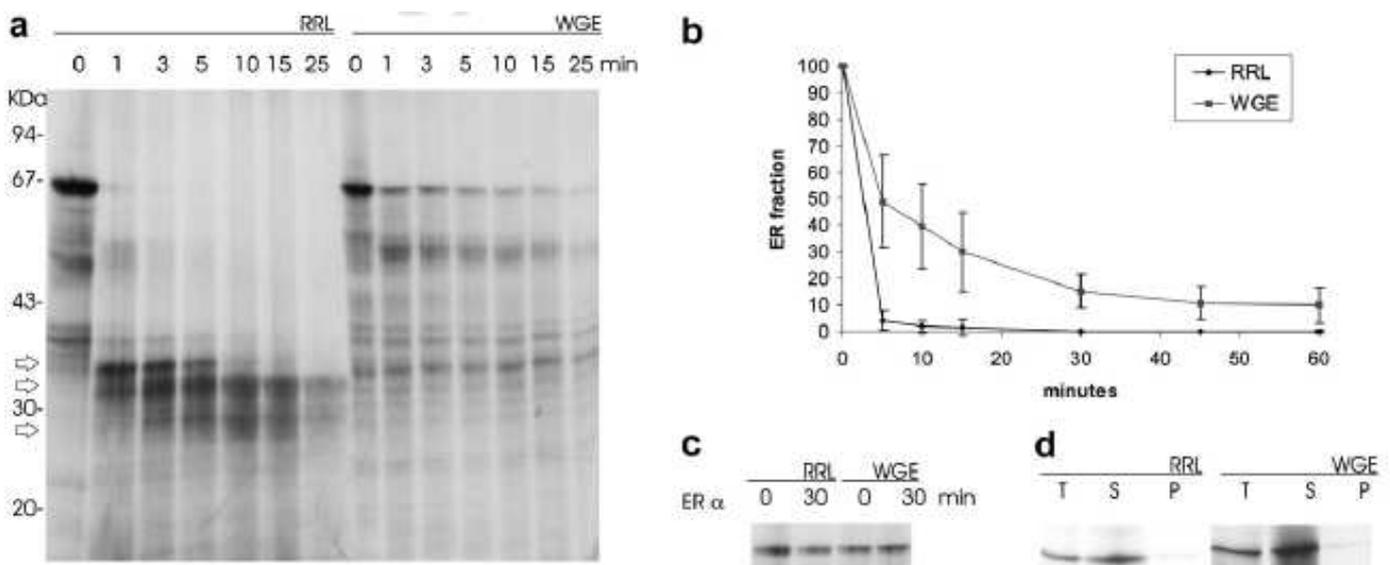


Figura 21. Proteólisis en el transcurso del tiempo del ER α sintetizado en RRL o WGE. 1A. El receptor sintetizado en RRL o WGE fue incubado (t, minutos) en presencia de 0.5 mU de quimotripsina a 25°C durante idénticos períodos de tiempo. Patrón de degradación resuelto en SDS PAGE 12% y revelado por autorradiografía. 1B. Fracción de ER remanente. La fracción de proteína se determinó midiendo la radioactividad de la banda de 66 kDa. 1C: Experimento control de proteólisis endógena, luego que el receptor fue sintetizado se incubó en la mezcla de traducción por otros 30 min a 25°C. 1D: Solubilidad del receptor en RRL y WGE, detectado en la mezcla de traducción total (T), en el sobrenadante (S), y ausente en el precipitado(P)

Aunque este resultado apoya fuertemente nuestra hipótesis, fue necesario descartar otros factores que puedan explicar la resistencia diferencial a la quimotripsina del ER α sintetizado en los 2 extractos de traducción. Entre ellos podemos mencionar:

_la existencia de factores difusibles (proteicos o de otro origen) característicos de uno de los extractos de traducción que estabilicen o desestabilicen al ER α

_la presencia de factores que promuevan o inhiban la actividad de la quimotripsina existentes en los extractos.

_posibles modificaciones postraduccionales que puede sufrir el ER α a través de la modificación en los extractos de traducción

_la acción de chaperonas que puedan influir la conformación del ER α .

Con el objetivo de analizar estas posibles interpretaciones se estudió la proteólisis del ER sintetizado en RRL con el agregado post-traduccionales del WGE, y viceversa. De esta manera, podríamos determinar si existen factores difusibles que actúen postraduccionales, que expliquen las diferencias encontradas en los perfiles de proteólisis del ER α en ambos extractos. Como se muestra en la Figura 22, no se detectaron cambios sustanciales en los perfiles de proteólisis limitada del ER α en ambos extractos. El ER α de 66 kDa sintetizado en RRL es susceptible a la degradación por la quimotripsina incluso luego de ser incubado en presencia del extracto WGE. El ER α sintetizado en WGE sigue siendo resistente a la degradación por la quimotripsina luego de ser incubado en presencia de RRL. El resultado de este experimento explicaría las diferencias de accesibilidad de la quimotripsina al ER α sintetizado en los 2 extractos, por diferencias en la conformación del receptor. De todas maneras, no se puede dejar de lado la posible existencia de factores difusibles de los extractos que actúen de manera co-traduccionales, como es el caso de algunas chaperonas que pueden interactuar con intermediarios de plegamiento del ER y afectar la conformación final del ER α .

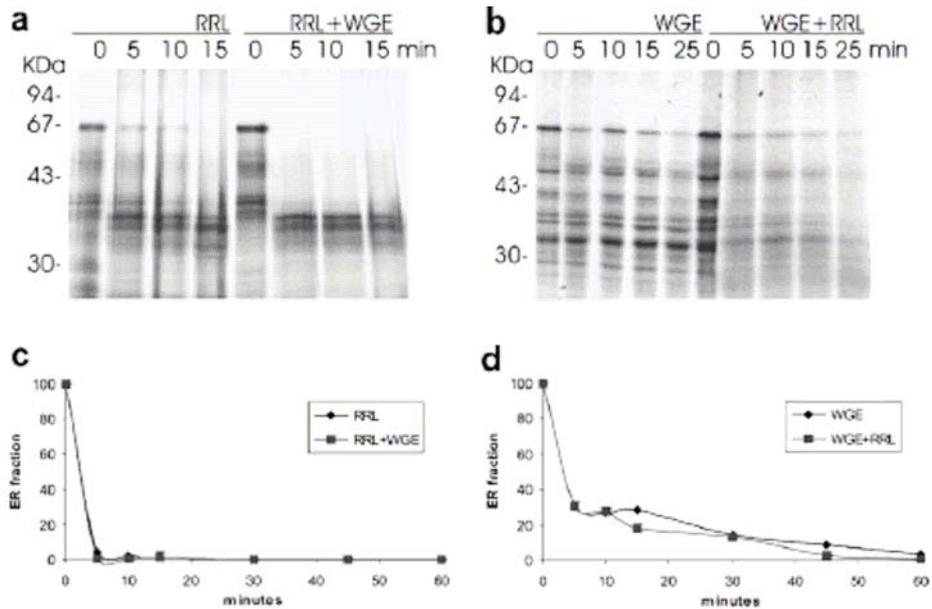


Figura 22. Control de actividad de inhibición de la quimotripsina por WGE y RRL. A) ER Sintetizado en RRL fue preincubado con o sin WGE y digerido con 0.5 mU/uL de proteasa durante 0, 5, 10 o 15 min. B) ER sintetizado en WGE fue preincubado con o sin RRL, y digerido con 0.5mU/uL de proteasa durante 0, 5, 10, 15 o 30 min. Autorradiografía del patrón de digestión resuelta en SDS PAGE 12%.

A partir de los resultados obtenidos surgió la interrogante de si las diferencias de sensibilidad a la proteasa observadas para el ER α sintetizado en RRL y WGE eran debidas a los extractos o dependían de cada proteína. Con el propósito de encontrar una respuesta se realizó la traducción del ARNm que codifica para la luciferasa (provisto por el kit de traducción *in vitro*) en presencia de ^{35}S metionina en ambos extractos de traducción. A continuación se comparó el perfil de proteólisis limitada en las mismas condiciones a las empleadas para el ER α .

Como se muestra en la Figura 23, la luciferasa de 61 kDa fue resistente a la degradación por la quimotripsina en ambos extractos. Este resultado indica que no existen factores propios del RRL que potencien la actividad de la quimotripsina o factores en WGE que la inhiban. Por otro lado, la eficiencia de traducción del ARNm de la luciferasa en WGE es mucho mayor que en RRL, mostrando que los rendimientos de síntesis obtenidos para el ER dependen de la interacción del ARNm con la maquinaria de traducción empleada. Como se mencionó previamente, se observan bandas menores a 61 kDa generadas a partir del transcrito de la luciferasa, particulares de cada extracto (diferentes a las obtenidas durante la traducción del ER α).

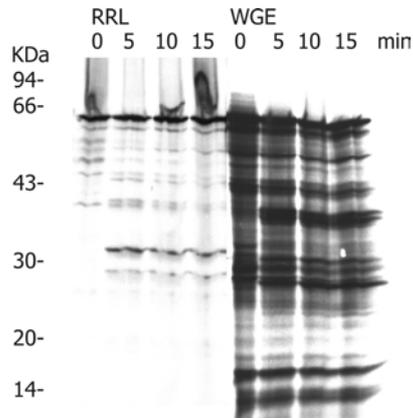


Figura 23. Proteólisis limitada de la luciferasa sintetizada en RRL o WGE. La proteína sintetizada en RRL o WGE fue incubada (t, minutos) en presencia de 0.5 mU de quimotripsina a 25°C. Patrón de degradación resuelto en SDS PAGE 12% revelado por autorradiografía.

Estudios de cambios de conformación del ER α inducidos por ligandos

Como se describió en la introducción, el ER α interacciona con un gran número de moléculas que median sus efectos regulatorios. La unión de ligandos promueve cambios conformacionales en el receptor que contribuye a su función. Con el fin de evaluar el efecto de la unión de ligandos sobre la conformación del ER se utilizaron dos estrategias. Se estudió si existen cambios en la solubilidad del ER o variaciones en la accesibilidad a proteasas en presencia y ausencia de ligandos.

En primer lugar se analizó si el ER α en los extractos de traducción presentaba cambios en su solubilidad en presencia del análogo de estradiol, el dietilbestrol (DES). El DES al igual que las otras hormonas esteroideas se solubiliza en etanol, por lo que la reacción control se realizó en presencia de etanol.

Se evaluó el efecto del etanol a 2 concentraciones (5% y 0,1%) sobre la solubilidad del ER α sintetizado en RRL o WGE y de las proteínas de los extractos en presencia de EtOH o DES. El análisis se basó en una centrifugación a 15000g durante 30 minutos y separación de las fracciones solubles (S) e insolubles (P).

Tabla 0. Comparación de la solubilidad del ER α sintetizado en los extractos de traducción en presencia y ausencia de etanol (EtOH) y ligando (DES). Fracción del ER α ; S_Soluble, P_Insoluble

		Control	EtOH 5%	EtOH 0,1%	DES 1 μ M (EtOH 5%)	DES 1 μ M (EtOH 0,1%)
RRL	S	91,5	85,5	94,4	68,3	95,7
	P	8,5	14,5	5,6	31,7	4,3
WGE	S	94,2	51,7	98,6	51,6	96,4
	P	5,8	48,3	1,4	48,4	3,6

La Tabla 0 se construyó con los resultados obtenidos del análisis de la repartición del ER α en fracciones S y P en presencia o ausencia de ligando analizados por SDS-PAGE y cuantificados por PhosphorImager. Los resultados muestran que el ER α sintetizado en RRL o WGE, en ausencia de etanol, es mayoritariamente soluble (>90%).

La solubilidad del ER en presencia de EtOH al 5% muestra una alteración, que es más evidente en el ER sintetizado en WGE, donde la fracción insoluble pasa a ser aproximadamente el 50%. En el ER sintetizado en RRL, también se observa un cambio de solubilidad pero la fracción insoluble en este caso no supera el 15%. Sin embargo, el EtOH al 0,1% no produce cambios significativos en la solubilidad de ER α . Para evaluar el efecto del DES, se deberían comparar los cambios de solubilidad del ER α en presencia de EtOH 0,1%, cuando no hay un efecto del EtOH sobre la solubilidad del ER. En estas condiciones se observa que el DES no altera la solubilidad del ER α en ninguno de los extractos de traducción.

Es oportuno mencionar, que el efecto del EtOH al 5% en RRL se ve potenciado en presencia de DES, aumentando la fracción insoluble al doble. En cambio en WGE no se observa el mismo efecto

En resumen, se observó un cambio en la solubilidad del ER en presencia de EtOH al 5%. Con los datos obtenidos hasta el momento no podemos discriminar si el EtOH tiene un efecto directamente sobre el ER o indirectamente, afectando la solubilidad de otras proteínas presentes en los extractos que interaccionen con el ER α . Este resultado fue de gran importancia para diseñar e interpretar los ensayos de proteólisis en presencia de ligandos descritos a continuación.

Se ha descrito que el ER α sufre cambios conformacionales al unirse a ligandos *in vitro* que pueden ser detectados mediante proteólisis limitada²¹³. Estos estudios han producido resultados contradictorios. Algunos autores^{155,214} no encontraron diferencias del patrón proteolítico del ER libre o unido a estrógenos mediante digestión con tripsina, quimotripsina, papaína o elastasa. Sin embargo, otros^{215,216} han reportado diferencias del ER libre o unido a ligandos.

La degradación del ER α sintetizado en RRL en presencia de E2 por quimotripsina fue reportada en la bibliografía²⁰⁶, por lo tanto, con el fin de estudiar los cambios conformacionales que sufre el ER α sintetizado en ambos extractos al unirse a sus ligandos, se realizó la reacción de proteólisis limitada en presencia del estradiol (E2) y del DES. Las hormonas esteroideas (al igual que el DES) se solubilizan en etanol, por lo que la reacción control se realizó en presencia de igual concentración de etanol. Se empleó una concentración de etanol que no afectara la solubilidad del ER α .

En tales condiciones se detectó en RRL la estabilización de un intermediario de degradación de 34 kDa y posiblemente uno de menos de 20 kDa. El ER α sintetizado en WGE sigue siendo estable a quimotripsina en presencia o ausencia de ligando (Figura 24).

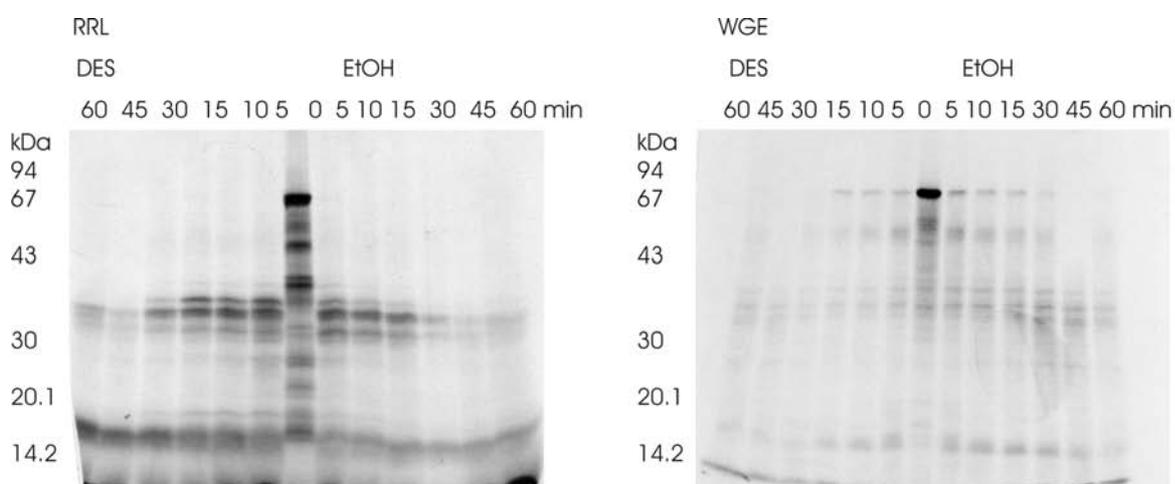


Figura 24. Proteólisis limitada del ER α sintetizado en RRL (A) o WGE (B) en presencia de ligando (1 μ M DES en 0,1% EtOH) resuelto en SDS-PAGE 12% revelado por autorradiografía.

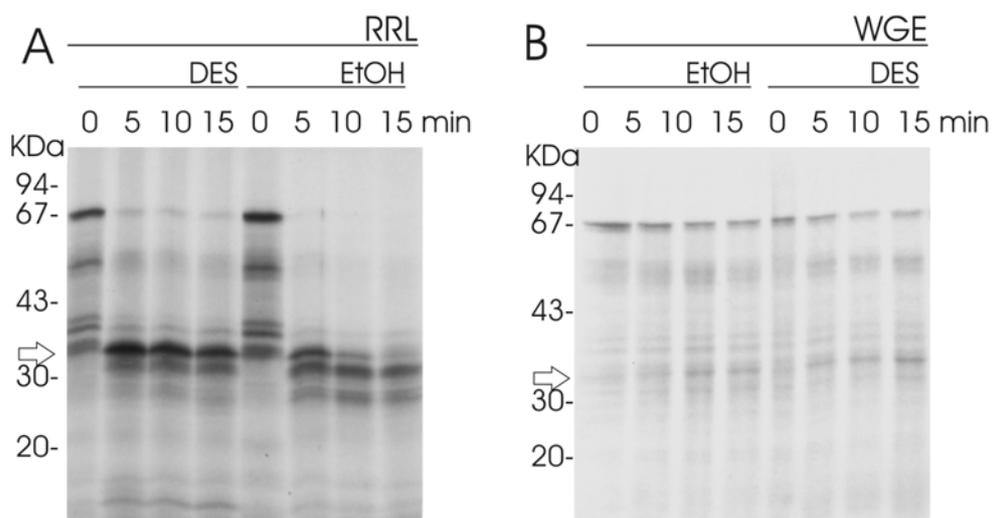


Figura 25. Proteólisis limitada del ER α sintetizado en RRL (A) o WGE (B) en presencia de ligando (1 μ M DES en 5% EtOH). Autorradiografía del análisis por SDS-PAGE 12%. La flecha indica 34 kDa.

Considerando el cambio en la solubilidad del ER α en presencia de EtOH 5%, se realizó el experimento de proteólisis limitada en presencia de DES en 5% EtOH. Como se observa en la Figura 25, en WGE no se detectaron cambios en presencia o ausencia de ligando, siendo el ER α resistente a la degradación por quimotripsina en las condiciones empleadas. En cambio en RRL se observa que en presencia de DES se estabiliza un intermediario de degradación de aproximadamente 34 kDa, como indica la flecha. El resultado fue similar al observado en presencia de EtOH 0,1%. El efecto del E2 no es tan marcado, pero también se observa una estabilización de un intermediario de degradación (Figura 26).

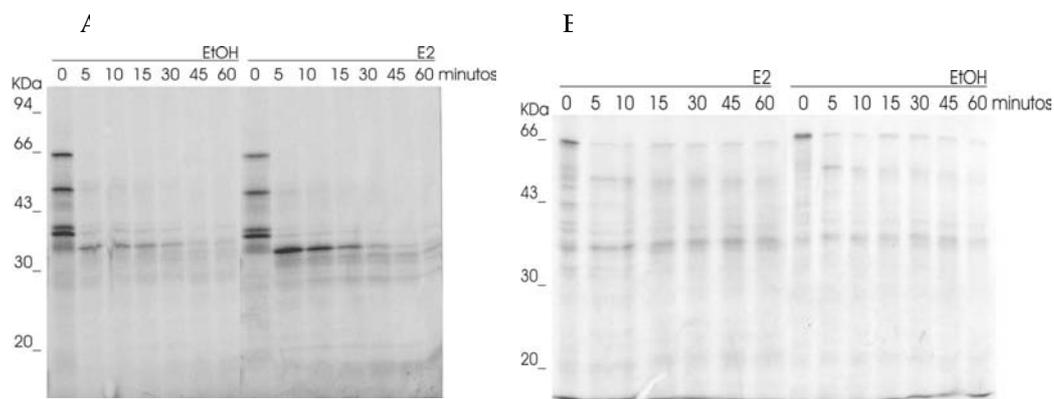


Figura 26. Proteólisis limitada del ER α sintetizado en RRL (A) o WGE (B) en presencia de ligando (1 μ M E2 en 5% EtOH). Autorradiografía del análisis por SDS-PAGE 12%.

Los cambios estructurales de una proteína pueden ir asociados a cambios de funcionalidad o afinidad. Con el fin de caracterizar algunas propiedades funcionales del ER sintetizado en cada uno de los extractos se emplearon dos estrategias experimentales. Por un lado se intentó caracterizar la unión del ER α al ADN, por otro lado se estudió la afinidad del ER α por su ligando (estradiol).

Para realizar el ensayo de unión del ER α al ADN se utilizó una secuencia particular de 25 pb que contiene el elemento palindrómico reconocido por el ER llamado ERE. Esta sonda fue biotinilada para emplear el sistema de streptavidina-peroxidasa como método de detección en geles de retardo. A través de esta estrategia no fue posible caracterizar la unión al ERE del ER α sintetizado en los extractos de traducción ya que el sistema se basa en la detección por biotina-streptavidina-peroxidasa y ambos extractos de traducción presentaron interferencia. El extracto RRL contiene actividad peroxidasa endógena y el WGE contiene varias proteínas biotiniladas. En ambos casos la señal de interferencia impidió detectar la unión ER α -ERE (resultado no mostrado). Este ensayo podría realizarse utilizando el ERE marcado con ^{32}P o con otro tipo de marcado de sonda en fría.

Otra aproximación experimental que se utilizó para caracterizar al ER α en cada uno de los extractos de traducción fue el ensayo de unión al ligando.

Este tipo de ensayo es uno de los análisis básicos empleados para detectar cierto compuesto químico en materiales biológicos. Los ensayos de unión se definen como aquellos que unen moléculas de interés específica y reversiblemente y permiten la detección y cuantificación de dichas moléculas en muestras biológicas en el orden de picogramos por mL (pg/mL). En los ensayos de unión existen 3 componentes básicos: la molécula enlazadora, el ligando y otro ligando marcado que permite cuantificar la unión. La molécula ligadora debe unirse específicamente al ligando y esa unión debe ser suficientemente estable, propiedad que se relaciona con la afinidad. Además, esta estrategia ha sido utilizada para comparar los efectos de mutaciones puntuales en la afinidad por el ligando del ER α ^{173,206}.

En nuestros sistemas de síntesis acelulares, se caracterizó la unión del ER α al estradiol mediante el ensayo de unión a ligando. Se utilizó el protocolo clásico que se emplea de rutina en muestras tumorales para determinar si los tumores responden o no a análogos del ER. En este caso, la molécula que buscamos detectar es el ER α .

sintetizado en RRL o WGE, el ligando marcado es el E2 y el ligando que compite las uniones inespecíficas es el DES. Este ensayo se realizó en la Facultad de Medicina en colaboración con Estela Román y Nora Artagaveytia.

Fue necesario ajustar las condiciones del ensayo debido a que la muestra empleada consistía en la mezcla de traducción (25-100 μ L) que resultó ser escasa en comparación con las muestras de biopsias habituales. Entonces se utilizaron concentraciones de hormona menores a las comúnmente empleadas corriendo el riesgo de que algunas medidas de radiactividad se encontraran en el límite de detección del método. Los resultados permitieron obtener constantes de afinidad de los sitios de unión al estradiol, pero no permitieron cuantificar el ER en cada uno de los extractos. Se obtuvieron medidas de la hormona marcada unida (B) y libre (F), que se utilizaron para la construcción de los gráficos de Scatchard. En la Figura 27 se muestran dichos gráficos para el ER sintetizado en RRL y WGE, a partir de los cuales se deduce de la pendiente la constante de afinidad (Kd). Se pudo determinar un sitio de unión para el ER sintetizado en RRL con una kd de 0,54nM y 2 sitios de unión para el ER sintetizado en WGE con kd de 0,52 y 7,6 nM.

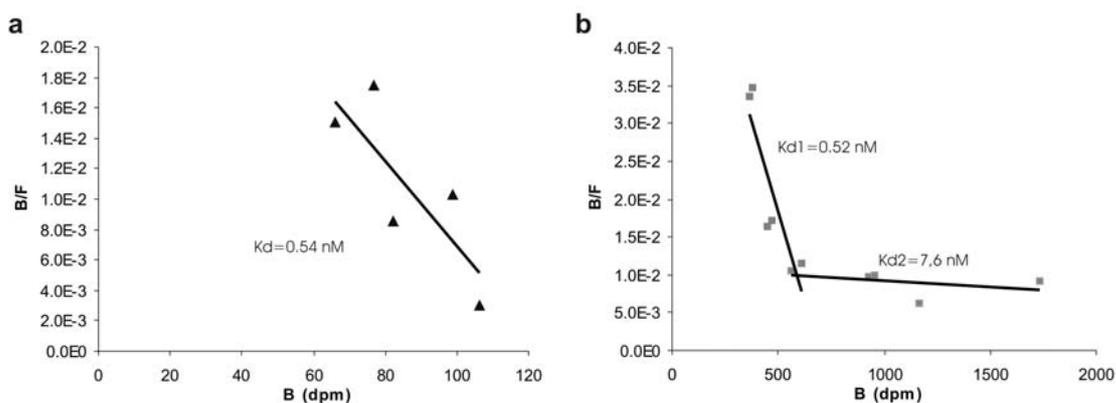


Figura 27. Gráficos de Scatchard para la determinación de la constante Kd del ER α sintetizado en RRL (A) y WGE (B) usando 17.-estradiol radiomarcado en concentraciones entre 0.5×10^{-9} y 8.4×10^{-9} M. B/F representa la fracción de hormona unida(B)/libre(F), y B (la fracción de hormona unida) en dpm. La pendiente de estos gráficos es $-K_d$.

En resumen, los resultados presentados sugieren que el ER α existe como una población de moléculas con diferentes estados conformacionales. Las técnicas empleadas permitieron detectar en RRL una única población uniforme y soluble que es susceptible a la degradación por quimotripsina, que presenta un sitio de unión al ligando definido por una Kd de 0,54 nM y que en presencia de ligando se estabiliza un intermediario de degradación por quimotripsina. En cambio, en WGE se detectaron al menos 2 poblaciones solubles: una que es bastante resistente a la degradación por quimotripsina y otra que se degrada a intermediarios de 52 kDa no detectados en RRL. Además, se detectaron 2 sitios de unión al ligando con afinidades diferentes (0,52 y 7,6 nM).

3.3 Capítulo 3. ER α , mutantes sinónimos y extractos de traducción

Uno de los objetivos específicos del trabajo es comparar la conformación del ER α en extractos de traducción eucariotas: RRL y WGE. Una característica que se puede analizar es la frecuencia de uso de codones de los organismos que dan origen a los extractos de traducción empleados. Utilizando las tablas de uso de codones de trigo (*Triticum aestivum* [gbpln]: 1592) y conejo (*Oryctolagus cuniculus* [gbmam]: 1081) se construyó el gráfico de la Figura 28. Las tablas fueron obtenidas de <http://www.kazusa.or.jp/codon/>, una base de datos que agrupa información sobre la frecuencia de uso de codones de cada organismo; dichas frecuencias se calculan en base al uso de codones de CDS (Complete Protein Coding Genes). En Figura 28 se observa cómo algunos codones cambian de ser de uso frecuente a uso poco frecuente en los dos organismos estudiados. Algunos codones de ciertos aminoácidos se ven involucrados en cambios drásticos de frecuencia, como por ejemplo, la glutamina y prolina, donde uno de los codones más frecuentes pasa a ser de los menos frecuentes y viceversa entre trigo y conejo.

Como se mencionó en la introducción, la frecuencia de uso de codones de un gen puede determinar su cinética de traducción. Por este motivo es relevante la comparación del uso de codones del ER α humano en conejo y trigo. Para esto se construyó el gráfico siguiente y se estudió la frecuencia de uso de codones del ER α en cada una de estas especies utilizando las tablas de uso de codones previamente

mencionadas y la de humano (*Homo sapiens* [gbpri]: 93487). A lo largo de la secuencia del ER se observan oscilaciones de la frecuencia de los codones utilizados.

En varias regiones de la secuencia del ER α humano, por ejemplo las marcadas por una flecha roja en la Figura 29 se evidencia cómo el uso de codones en humano y conejo es más parecido que el de humanos y trigo. Estas observaciones requieren de estudios que permitan vincular el uso de codones con las poblaciones de ARNt. En particular es necesario el desarrollo de estrategias que permitan cuantificar e identificar los distintos ARNt isoaceptores.

Este trabajo abordó el estudio de la cinética de síntesis del ER α humano siguiendo 2 estrategias, el análisis de las pausas de traducción del ER en ambos sistemas de traducción y el estudio de mutantes sinónimos del ER α humano.

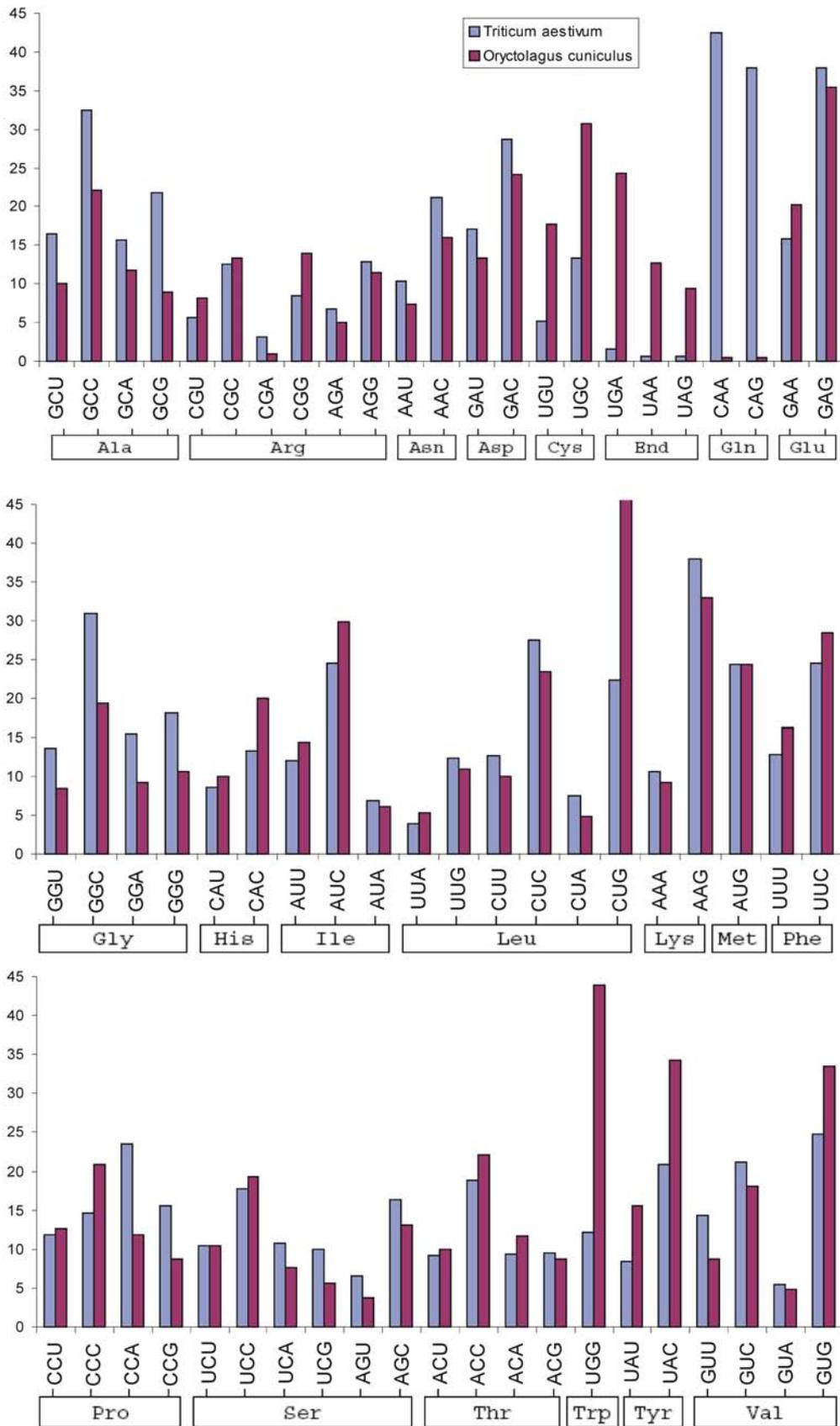


Figura 28. Gráfico comparativo de la frecuencia de uso de codones en Conejo y Trigo.

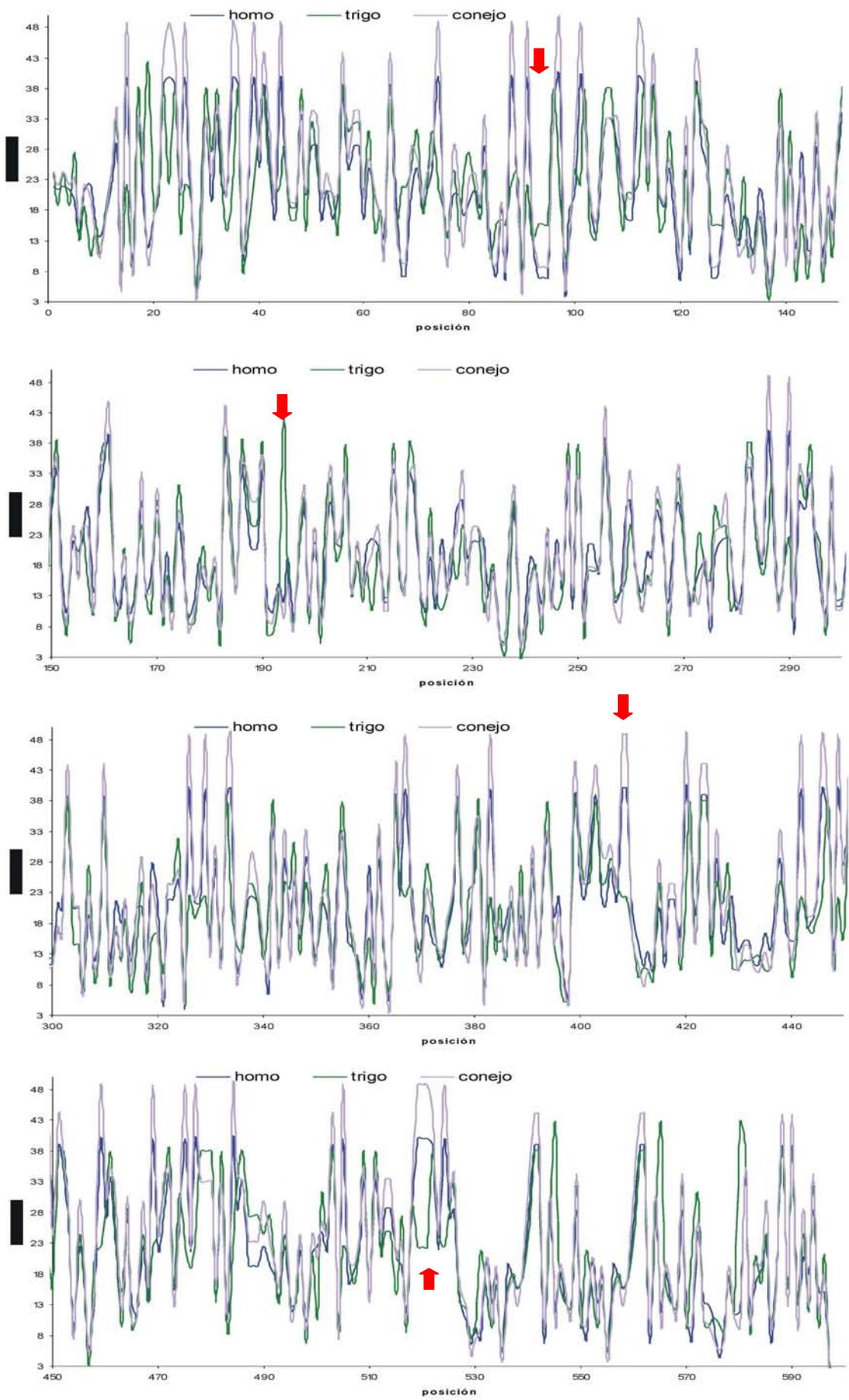


Figura 29. Gráfico que muestra la frecuencia de uso de codones en humano (azul), trigo (verde) y conejo (lila) a lo largo de la secuencia codificante del ER α humano.

Análisis de la cinética de traducción

Una de las hipótesis centrales de nuestro trabajo establece que la estructura tridimensional *in vivo* de una proteína está relacionada a la cinética de traducción y su modulación. Entre los factores que pueden afectar dicha cinética se encuentran el uso de codones sinónimos del ARNm que está siendo traducido, concentración relativa de ARNt, factores regulatorios de traducción, entre otros.

La biosíntesis de proteínas no es un proceso continuo sino que existen pausas del ribosoma sobre el ARN que está siendo traducido. La cinética de traducción estudia las variaciones de velocidad de traducción local y por lo tanto se vincula estrechamente a las pausas del ribosoma sobre el ARNm.

Una aproximación experimental para el estudio de dichas pausas es mediante la purificación de la fracción polirribosómica de una muestra en traducción y posterior análisis de péptidos nacientes. Este análisis revela el tamaño de los péptidos nacientes mayoritarios que se correlacionan con la existencia de pausas de los ribosomas en posiciones preferenciales.

En este trabajo se realizó el estudio preliminar de las pausas de traducción del ER α en RRL y en WGE mediante la purificación de los péptidos nacientes por ultracentrifugación en gradiente del glicerol y posterior análisis por electroforesis y autorradiografía. Dicho análisis se puso a punto partir de protocolos descritos en la bibliografía, mediante el estudio de los péptidos nacientes purificados de la fracción polirribosómica de RRL y WGE por ultracentrifugación^{59,80}.

El resultado se presenta en la Figura 30. Se observa un mayor rendimiento en la purificación de péptidos nacientes en RRL en comparación con WGE.

Este resultado puede explicarse si consideramos nuestro diseño experimental y tenemos en cuenta que las partículas con distinto tamaño tienen distinto coeficiente de sedimentación por lo tanto diferencias en el n° de ribosomas por polisomas o diferencias en el tamaño de los ribosomas entre ambos extractos podrían explicar este resultado. En eucariotas se encuentran de 8 a 10 ribosomas por ARNm. El número depende de la eficiencia de la traducción, una vez que un ribosoma ha avanzado entre 100 y 200 bases puede entrar otro ribosoma para la síntesis de un nuevo polipéptido. El análisis comparativo del perfil de péptidos nacientes purificados junto con los ribosomas sugiere la existencia de pausas de traducción en RRL y WGE diferenciales. Dichas pausas son más evidentes en torno a los 6-16 kDa. Para confirmar este resultado se requiere otro tipo de análisis para determinar si las observaciones detectadas se corresponden a pausas de traducción reales.

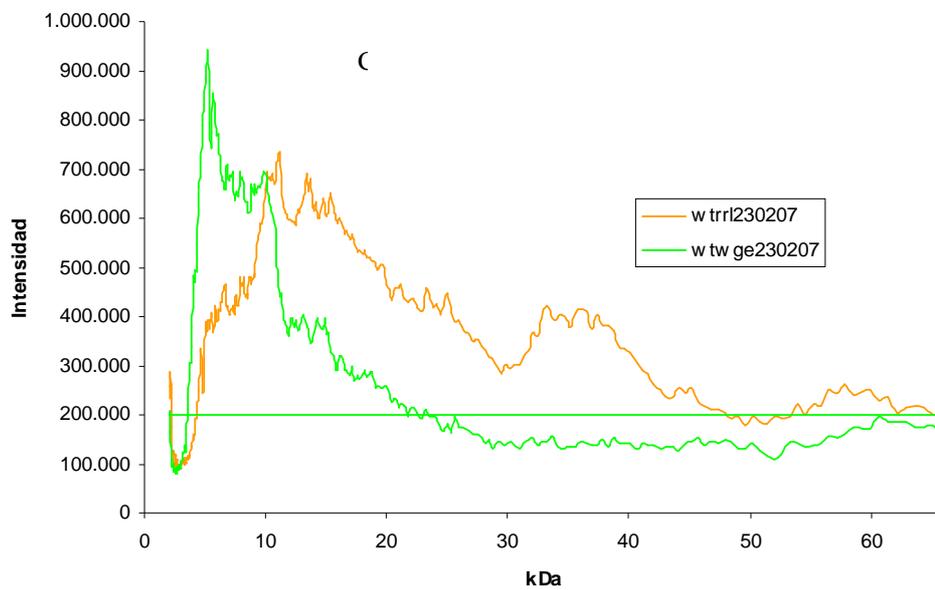
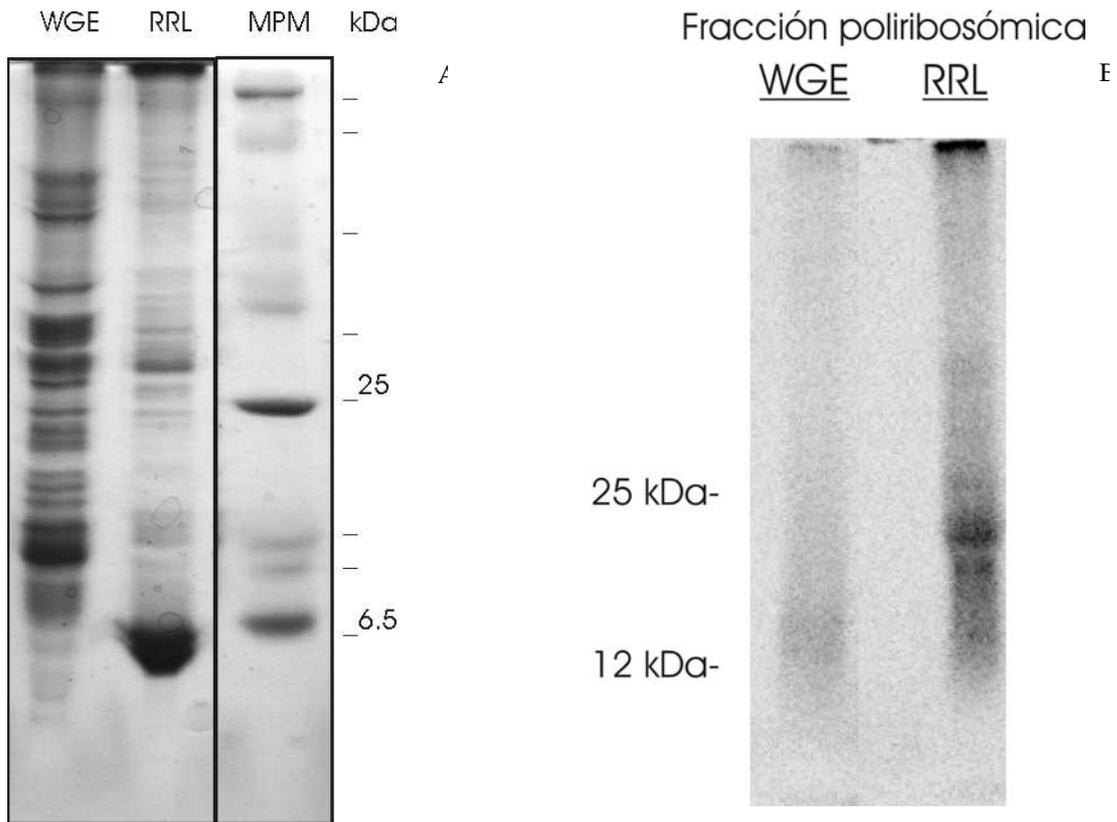


Figura 30. Análisis de pausas de traducción. A) Análisis por SDS-PAGE del perfil de péptidos y proteínas purificadas en la fracción ribosómica en RRL y WGE. Teñido con Azul de Coomassie. B) Autorradiografía del análisis por SDS-PAGE del perfil de péptidos purificados de la fracción polirribosómica. C) Densitograma de la intensidad de bandas correspondientes a péptidos de la fracción polirribosómica resueltos en SDS-PAGE 18% y analizados por PhosphorImager

Caracterización de mutantes sinónimos del ER α

La sustitución de codones sinónimos en la secuencia codificante de un gen es una de las estrategias empleadas para optimizar la síntesis de una proteína en sistemas heterólogos²¹⁷.

Con el fin de evaluar si la presencia de mutaciones sinónimas en la secuencia codificante del ER α pueden alterar su plegamiento, sin haber alterado la secuencia de aminoácidos, se estudiaron dos mutantes sinónimos del ER α , el ER 3P y el 5PL. Dichos mutantes fueron generados en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida. El mutante ER 3P, tiene cambiado los codones que codifican para 3 Prolinas consecutivas ubicadas en las posiciones 93, 94 y 95, y el ER 5PL tiene modificados los codones para las mismas tres prolinas consecutivas y otras 2 Prolinas (85, 87) y 1 leucina (90) cercanas cómo se muestra en la figura. La región mutada corresponde a codones lentos contiguos (en humanos) que codifican para prolinas y se la reemplazó por codones sinónimos abundantes. En dicha región, la abundancia de residuos prolina y su conocido rol sobre la conformación de las proteínas debido a la posibilidad de presentarse en configuración cis o trans y las restricciones estéricas que imponen por su ángulo de enlace, podría afectar la conformación del ER α .

El análisis de la secuencia del ER α de 595 aminoácidos, utilizando el programa Protparam (Expasy) dio un peso molecular de 66216,0 Da y un pI de 8,3. Como se describió en la introducción, del ER α se conocen datos cristalográficos del DBD y el LBD, ambos dominios conforman aproximadamente el 32% de la proteína. El análisis de la secuencia de la proteína mediante el programa de predicción de estructura secundaria mostró la existencia de grandes tramos desestructurados, principalmente en el extremo Nt. Los resultados del análisis se muestran en el Anexo 3. La región que comprende las mutaciones se encuentra en una zona de la proteína desestructurada. A pesar de no tener una estructura definida, éstas posiciones están incluidas en el dominio de transactivación (AF-1) que interacciona con diversos cofactores que modulan la expresión génica.

Los mutantes del ER α se estudiaron de forma análoga a como se estudió la secuencia WT, se transcribieron y tradujeron en los extractos de traducción RRL y WGE. Posteriormente se analizaron por proteólisis limitada. En la Figura 31 se observa el patrón de degradación por la quimotripsina del ER WT y mutantes sintetizados en ambos extractos de traducción. Mediante ésta técnica no se logró detectar posibles diferencias conformacionales entre mutantes. En cambio se observó, al igual que con

la secuencia WT las diferencias detectadas entre ambos extractos, siendo el ER α WT y mutantes sintetizados en WGE más resistentes a la degradación por quimotripsina.

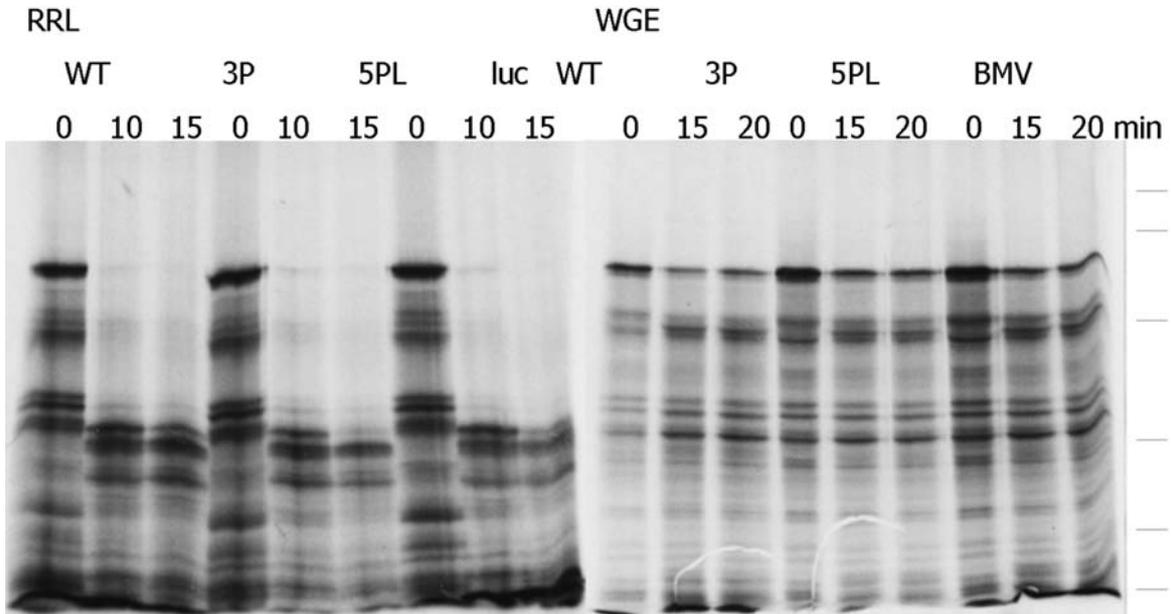


Figura 31. Traducción y proteólisis limitada del ER α WT, 3P y 5PL en RRL y WGE. Análisis por SDS-PAGE al 12% revelado por autorradiografía.

Los estudios de solubilidad del ER WT y mutantes sintetizados en ambos extractos no muestran diferencias entre ellos. En todos los casos los productos de síntesis obtenidos son mayoritariamente (>95%) solubles. La Figura 32 muestra la repartición del ER WT y mutantes en la fracción soluble en RRL y WGE.

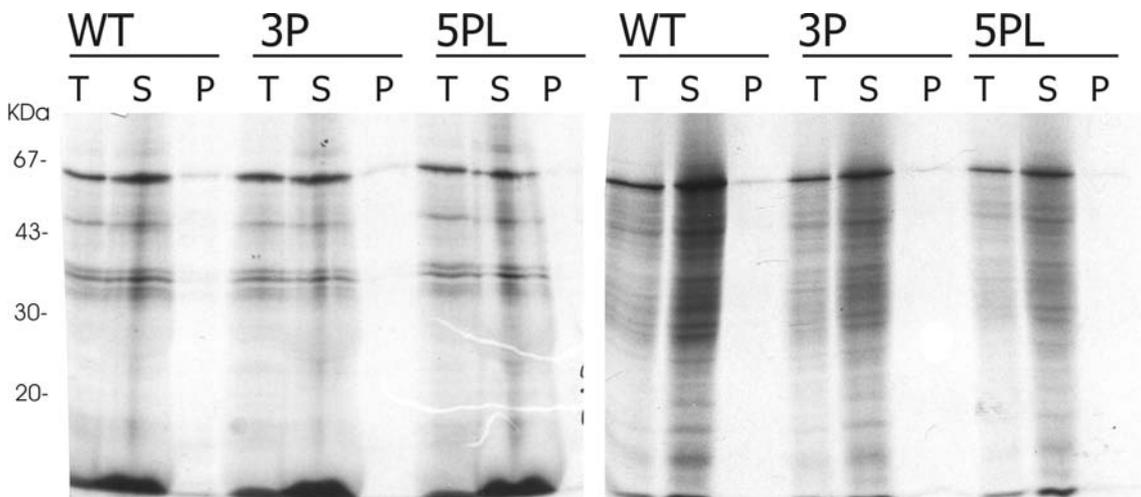


Figura 32. Análisis de la solubilidad del ER α WT y mutantes sintetizados en RRL o WGE por centrifugación a 15.000g. T.Fracción de proteínas totales; S. Fracción de proteínas Soluble; P; Precipitado de proteínas insolubles. Autorradiografía del análisis por SDS-PAGE 12%.

Se analizó si los ligandos DES y E2 tenían un efecto sobre la conformación mediante proteólisis limitada. Los resultados fueron similares a los obtenidos para el ER WT. Los mutantes sintetizados en RRL mostraron una estabilización de un intermediario de degradación cuando la proteólisis fue efectuada en presencia de DES. En cambio en WGE no se detectaron cambios respecto al control.

Con el fin de estudiar la influencia de los codones sinónimos sobre la cinética de traducción se compararon las pausas de traducción del ER α Wt, y del ER α 5PL en los dos extractos de traducción.

Al igual que lo observado para el ER α Wt, en el mutante 5PL se encontraron diferencias en las pausas de traducción entre ambos extractos de traducción (Figura 33)

La comparación del perfil de péptidos nacientes del ER wt y 5PL en un mismo extracto se muestra en las gráficas de la Figura 33. Se observan diferencias en el densitograma de péptidos nacientes para el ER WT y mutante. Esta observación sugiere la posible existencia de pausas del ribosoma durante la traducción, que serían función de la secuencia del ARNm que es traducido y de la naturaleza de la maquinaria de traducción.

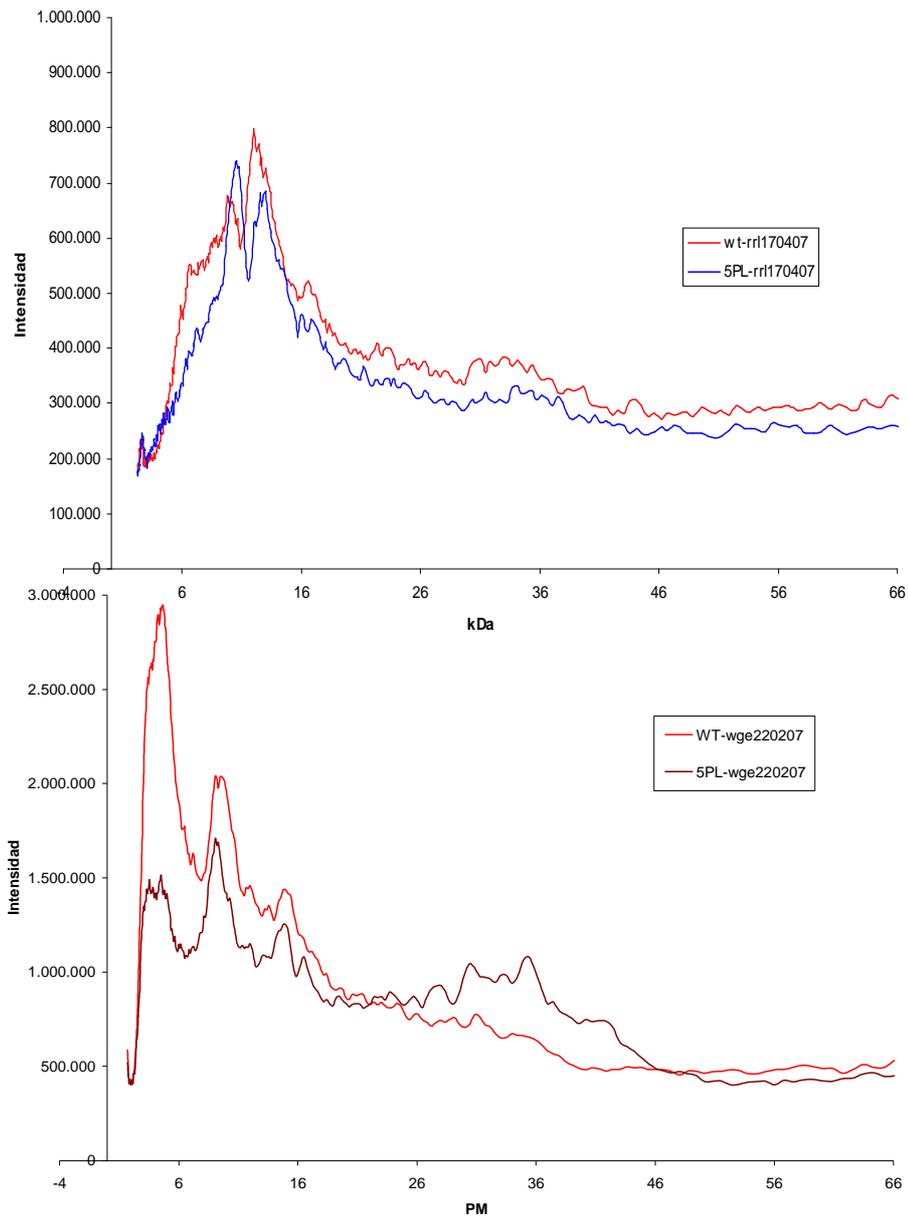


Figura 33. Análisis de pausas de traducción del ER wt y 5PL. Densitograma de la intensidad de bandas correspondientes a péptidos nacientes resueltos en SDS-PAGE 18% y analizados por PhosphorImager

4. Discusión

El principal objetivo de este trabajo es establecer la contribución del ambiente y la cinética de traducción a la conformación de una proteína, en particular del ER α .

El ER α regula la transcripción de diversos genes específicos interaccionando con ligandos estrogénicos, con el ADN y con otras proteínas que participan de esa función^{139,166}. Numerosos trabajos detallan los cambios conformacionales del ER promovidos por la interacción y formación de complejos con las distintas moléculas que median su efectos^{139,141,146,152,156,155, 218} remarcando su flexibilidad estructural

Como se describió en la introducción, muchos de los ligandos estrogénicos (SERMs) que actúan sobre el ER α tienen diferentes efectos en distintos tejidos, comportándose de forma antagónica en tejido mamario y como agonistas en útero o tejido óseo^{139,219}. Por lo tanto, conocer cómo se generan estos efectos diferentes, célula o tejido-específicos, tiene gran importancia para la comprensión de la función del ER α así como para la implementación de nuevos tratamientos farmacológicos.

Nuestra hipótesis de trabajo nos llevó a proponer un posible efecto del contexto de síntesis proteica en la determinación de la estructura espacial del ER α .

Se trabajó con el ER α sintetizado en sistemas de traducción *in vitro* de origen eucariota y se compararon propiedades estructurales y funcionales de la proteína. El uso de extractos de traducción acelulares permitió disponer de mezclas de traducción homogéneas compuestas por ribosomas, ARNt, aminoacil-ARNt sintetasas, factores de iniciación, elongación y terminación, sistemas de regeneración de energía, etc, además de maquinarias involucradas en el plegamiento de las proteínas²²⁰⁻²²³.

La síntesis del ER α en estos extractos permitió simplificar el sistema de estudio discriminando al ER α de componentes frecuentemente presentes en los sistemas *in vivo* que pueden interferir en su detección como por ejemplo variantes de splicing del ER α o el ER β .

4.1 Expresión del ER α en sistemas de traducción acelulares

La expresión del ER α en los extractos de traducción RRL y WGE generó una proteína soluble. El empleo del RRL para la síntesis del ER α ^{213,216} fue descrito en muchos trabajos, sin embargo, en WGE sólo se han expresado algunos receptores de la familia de Receptores Nucleares⁴⁵. Se utilizaron sistemas de traducción no acoplados, en los que el ARN es generado en una etapa independiente de transcripción *in vitro* y utilizado en la síntesis proteica en una segunda etapa. Algunas características de la

expresión del ER α en los extractos e traducción *in vitro*: RRL y WGE se discutirán a continuación.

El inicio de la traducción es un evento crucial en la síntesis de proteínas, y es una etapa controlada en pro y eucariotas. El sistema de síntesis de ARN elegido es dependiente de la T7 ARN polimerasa y carece de mecanismos de modificación del los extremos 5' y 3' del ARN por agregado de la estructura de caperuja en 5' y de cola poli A en 3', características de los ARN celulares eucariotas. Se logró la traducción en la ausencia de estas modificaciones en el ARN debido a la existencia de un elemento potenciador de la traducción en el 5'UTR del transcripto utilizado para la traducción. Esta región consta de 55 bases, derivadas de la proteína g10 de T7²²⁴, puede formar una estructura secundaria en horquilla que promueve la traducción (ver anexo).

Las estructuras secundarias que pueda adoptar el ARN podrían influir tanto en el inicio como en la elongación de traducción, afectando la intervención de factores que reconocen señales en el ARN que va a ser traducido. Es importante mencionar que el ARN empleado en las reacciones de traducción *in vitro* fue previamente desnaturalizado a 80°C. Pero luego de desnaturalizado, al ser incubado en la mezcla de traducción durante 2 horas a 25°C, el ARN sería capaz de volver a formar estructuras secundarias.

La traducción del ER α en RRL y WGE mostró diferencias en el tiempo de aparición del producto y en el rendimiento de la reacción. Como se mencionó, descartamos la existencia de proteasas activas en RRL y WGE en nuestras condiciones de trabajo, por lo que las diferencias observadas serían independientes de la estabilidad de la proteína producida. En WGE se sintetizó el 50% del producto obtenido en RRL. Estas diferencias en el rendimiento de traducción entre ambos extractos pueden adjudicarse a componentes de las maquinarias de traducción empleadas, como por ejemplo, reconocimiento de elementos potenciadores de la traducción, concentración relativa de ARNt, factores de inicio y elongación de la traducción, factores propios de los extractos que puedan estabilizar intermediarios de síntesis del ER α , etc. Existen numerosos ejemplos en los cuales se intenta mejorar el rendimiento de producción de proteínas en extractos libres de células mediante el agregado de alguno de estos factores como por ejemplo factores de inicio de la traducción²²⁵ o RNA⁸⁹ entre otros.

La observación de que en RRL el ER α completo de 66kDa es detectado en menor tiempo que en WGE sugiere diferencias en el inicio y elongación de la traducción entre ambos extractos. Estas diferencias podrían atribuirse a variaciones en la concentración de las proteínas implicadas en estos eventos (por ejemplo que interacciones con el 5'UTR o 3' UTR). Otro factor que puede afectar el rendimiento de

la traducción es el tránsito ribosomal⁹¹ a través de la secuencia codificante del ARN; este punto se discutirá más adelante.

La síntesis del ER α en ambos extractos de traducción produjo péptidos de tamaño molecular aparente menor a 66 kDa. El perfil de estos péptidos es reproducible y es diferente en cada extracto de traducción. Con los ensayos realizados (*western blot*, síntesis del ER α en presencia de inhibidores de proteasas, ensayo de estabilidad del ER α en ambos extractos) no se pudo determinar si estos péptidos son consecuencia de la síntesis abortiva o si se deben a la existencia de un IRES en la secuencia del ARNm del ER α . Para definirlo se debería estudiar si la secuencia codificante Nt del ER α es capaz de promover la traducción. Para esto, se podrían generar construcciones de la región Nt del ER α (de distintos tamaños) y una proteína de fusión conocida, para evaluar si dicha secuencia potencia la traducción. Previamente se ha reportado que ARNm codificante del ER posee un IRES que origina una proteína de 45 kDa que responde a estrógenos¹⁶⁴, sin embargo, también se ha reportado que esta variante se origina de splicing alternativo¹⁶⁰.

4.2 Poblaciones conformacionales del ER α

Las observaciones realizadas en el presente estudio sugieren fuertemente que el ER α sintetizado en los sistemas de traducción eucariotas puede adoptar diferentes conformaciones con diferentes propiedades funcionales. Estas variaciones conformacionales del ER fueron evidenciadas mediante proteólisis limitada, análisis de solubilidad y ensayo de unión a estradiol, su ligando natural.

Se han reportado estudios que emplean la proteólisis limitada para la detección de variaciones conformacionales del ER α inducidas por ligando²¹⁶ o por mutaciones puntuales²⁰⁶. En este caso, se utilizó la α -quimotripsina, que reveló una sensibilidad diferencial del ER α sintetizado en RRL y WGE.

El receptor de 66 kDa sintetizado en RRL fue rápidamente degradado a fragmentos de 34-28 kDa; estos fragmentos también son sensibles a proteólisis. En contraste el ER α sintetizado en WGE fue degradado más lentamente por la proteasa así como los fragmentos generados en la primera digestión. Una posible interpretación es que los fragmentos derivados del ER α , generados por la proteasa, adoptan una estructura más compacta o que los sitios de corte de la quimotripsina sean menos accesibles. En este sistema el ER α de 66 kDa aparece repartido como 2 fracciones con diferente sensibilidad a proteasa, una de las cuales genera rápidamente fragmentos de 53-52 kDa que son igualmente resistentes a la degradación. La presencia en los extractos de

traducción de inhibidores o activadores de la quimotripsina o factores difusibles que interactúen con el ER alterando su estabilidad y/o solubilidad fue descartada.

Adicionalmente, la incubación del ER α traducido en RRL con DES (ligando agonista) mostró la estabilización de un intermediario de 34 kDa producido por la proteólisis de la subsiguiente degradación. Este intermediario generado en la proteólisis podría ser estabilizado por la unión del DES, que promueve un cambio en la conformación del ER α , y podría aumentar la resistencia a la degradación por la proteasa. Para el ER α sintetizado en WGE dicho intermediario de degradación no se ve estabilizado, lo que sugiere que las poblaciones conformacionales presentes en WGE se comportan de forma distinta frente al DES al compararlas con las presentes en RRL.

De manera similar, en los experimentos realizados en presencia de E2 se observó la estabilización de un intermediario similar al observado en los experimentos en presencia de DES, posiblemente por ser ambos ligandos agonistas¹⁵³ que promueven cambios conformacionales similares.

Algunos trabajos han reportado para el Receptor de Mineralocorticoides (MR) la estabilización de un fragmento de 34 kDa generado por la quimotripsina que contiene el LBD completo y la parte Ct de la región bisagra, que une la aldosterona (su ligando) con alta afinidad. La unión del ligando modificaría la compactación del fragmento de 34 kDa y su resistencia a la quimotripsina^{236,237}. Por el motivo expuesto, podríamos suponer que el fragmento estabilizado de 34 kDa del ER α sintetizado en RRL derivado de la digestión por quimotripsina podría corresponder al LBD del ER α .

Por otro lado, en los estudios de la solubilidad, el ER α sintetizado en ambos extractos de traducción se comportó de forma diferencial frente a la incubación con la misma concentración de EtOH. Se observó un cambio en la solubilidad del ER dependiendo del contexto molecular en que se encuentre. Este resultado podría ser explicado por diferencias en la conformación del ER y por lo tanto en el efecto del EtOH sobre los residuos que están más accesibles en la proteína. Alternativamente podría explicarse si el EtOH tiene un efecto sobre otros factores del extracto de traducción que interaccionen directa o indirectamente con el ER α . Cabe mencionar, que trabajos previos han descrito cómo algunos alcoholes polares débiles incluyendo el TFE (trifluoretanol), etanol, etc pueden afectar la conformación nativa de proteínas globulares²²⁶.

La unión del E2 al receptor sintetizado en RRL permitió determinar la Kd de un sitio de unión, 0,54 nM siendo sistemáticamente del mismo orden. El análisis de Scatchard del receptor sintetizado en WGE se mostró más complejo, porque se detectaron al menos

2 sitios de unión al estradiol diferentes (K_d de 0,52 y 7,6 nM). Las constantes obtenidas son del orden de las reportadas en la bibliografía, siendo para el ER α recombinante: 0,5-0,7 nM²²⁷ para el LBD recombinante 0,1nM²²⁸, para preparaciones de tejidos o líneas celulares 0,3 nM^{159;229} y para carcinomas mamarios ductuales entre 0,8 y 10 nM²³⁰.

El análisis de los resultados de los ensayos de proteólisis limitada, de los estudios de solubilidad y del ensayo de unión al ligando, muestra que el conjunto de moléculas de ER α , sintetizado en diferentes maquinarias traduccionales, existe al menos bajo 3 poblaciones conformacionales. Dos poblaciones presentes en WGE, con dos sitios de unión diferentes al E2 y diferente resistencia a la proteólisis y al menos una en RRL sensible a la proteólisis y capaz de generar un intermediario de degradación resistente en presencia de DES.

Esto sugiere que el ER α podría presentarse como una población de conformaciones influenciada por el entorno celular donde es sintetizado, lo que permitiría generar una hipótesis sobre la posible existencia de variaciones conformacionales célula o tejido-específicas. Existen pocos estudios que vinculen el contexto de síntesis con la conformación de una proteína. Es pertinente recordar los experimentos realizados con la proteína Ure2p de levadura (proteína con comportamiento priónico) que muestran que el cambio de sistema de traducción puede alterar el plegado de la proteína²³¹. Cuando Ure2p fue traducida *in vitro* en RRL o en WGE se obtuvieron proteínas con diferente sensibilidad a la degradación con proteinasa K. Los autores explicaron dichas diferencias por formación de estructuras específicas o estados específicos de asociación de Ure2p. Las condiciones de traducción y/o la presencia de ciertos componentes celulares (proteínas accesorias o factores extrínsecos) así como la propia naturaleza del proceso de traducción pueden afectar el plegamiento intracelular de Ure2p llevando a la formación de la isoforma priónica, URE3²³¹. Estas evidencias concuerdan con la hipótesis de trabajo que se maneja en este proyecto según la cual hay una participación del sistema de traducción en la adquisición de la estructura tridimensional de la proteína.

Si las observaciones realizadas en el ER α pudieran generalizarse a otras proteínas estaríamos en presencia de un factor no siempre considerado como es el ambiente de biosíntesis, que puede afectar el mecanismo de plegamiento *in vivo* de las proteínas. Para algunas proteínas, la existencia de más de una conformación *in vivo* es clara y forma parte de su actividad natural (ejemplo: enzimas alostéricas) o se asocia a estados patológicos como es el caso de la proteína priónica (PrPc y PrPsc), pero, la idea de estado nativo generalmente hace referencia a una población conformacional homogénea. Los resultados presentados que indican que el ER α puede presentarse

en varias conformaciones, incluso en un mismo sistema de traducción, sugieren una revisión del concepto de estado nativo.

4.3 Maquinaria de traducción y el ER α

La maquinaria de traducción parece tener una clara influencia de en el plegamiento del ER α . Pero el concepto que tenemos de la maquinaria de traducción considera un sistema de factores que actúan en conjunto y cuya principal función es la síntesis y plegado de las proteínas. A continuación se discutirán los principales factores de la maquinaria de traducción que podrían influir en el plegado del ER α .

En la introducción se describió la participación de las chaperonas en las vías de plegado de las proteínas *in vivo*, en particular, se profundizó en la vía de maduración que atraviesa la superfamilia de Receptores Nucleares y los requerimientos de chaperonas y cofactores para adquirir su conformación activa. Variaciones en la disponibilidad de estas chaperonas podrían afectar la conformación del ER α . En los sistemas de expresión utilizados en este trabajo, los extractos de traducción, existen factores y chaperonas provenientes del citosol de las células que los originaron. Las poblaciones de chaperonas de RRL y WGE pueden diferir pero se ha reportado la existencia de Hsp 90 y Hsp 70 en ambos extractos ^{186-188,232-235}.

En los experimentos de proteólisis limitada del ER α sintetizado en un extracto con el agregado postraducciona del otro extracto, no se detectaron factores que actúan postraducciona en la determinación de la conformación del ER α como chaperonas y enzimas de modificación postraducciona. Sin embargo, las chaperonas que actúan co-traducciona así como proteínas o factores que estabilicen al ER recién sintetizado o a intermediarios de su síntesis podrían tener un rol más relevante en la conformación de este receptor nuclear.

Reportes previos mostraron que los receptores nucleares expresados en RRL y WGE se pueden aislar de complejos con otras proteínas. Denis y Gustafsson²³⁶ mostraron que el Receptor de Glucocorticoides (GR) traducido en RRL, se encuentra como un complejo con actividad de unión al ligando pero no al ADN. No obstante, el GR traducido en WGE no se unía los esteroides pero si a ADN. Se interpretó que en plantas no era posible formar el heterocomplejo GR-hsp90⁴⁵, pero estudios posteriores mostraron que el complejo con la hsp90 de plantas se forma en WGE pero se desensambla muy rápidamente con respecto al formado en RRL⁴⁵. La actividad de unión al ligando del GR⁴⁵ y del MR^{237,238} esta estrechamente relacionada con la interacción con hsp90 en el foldosoma.

Dado que la interacción ER α -Hsp90 podría tener un rol importante en la determinación de la estructura del receptor, resultaría interesante estudiar en nuestro sistema como se ve afectado el ER α al modificar la actividad de hsp90. Para esto, es frecuentemente utilizada la geldanamicina, un inhibidor de la actividad de hsp90.

La existencia y actividad de la hsp90 en RRL fue demostrada^{235,239} pero hay que recordar que en la interacción hsp90-ER participan otras proteínas en la formación del foldosoma. La existencia y actividad de dichas proteínas en RRL y WGE también debería ser evaluada. Trabajos sobre la formación del complejo hsp90-GR mostró la función imprescindible de p23, presente en RRL y ausente en WGE²⁴⁰. En algunos experimentos, con la proteína p53 cuyo plegamiento también depende de la formación del foldosoma, se ha logrado reconstituir la función de hsp90 de WGE mediante el agregado de p23 humana purificada o levadura²⁴¹.

Considerando las variaciones en las “poblaciones de chaperonas” presentes en ambos extractos, el ER α podría formar un complejo estable con hsp90 en RRL mientras que en WGE el complejo con Hsp90 sería inestable. Aunque esta suposición fuera correcta, el foldosoma formado en RRL no afectaría la accesibilidad a la proteasa ya que el ER α sintetizado en RRL se mostró sensible a la proteasa respecto al sintetizado en WGE.

Otra proteína clave en el plegado del ER α es la PDI. Se ha observado variaciones de la conformación del ER α mediante proteólisis limitada en presencia y ausencia de PDI que se correlacionaron con diferentes propiedades de unión al ERE del ER α . En este estudio se concluyó que la PDI, es más importante para el replegado y mantenimiento de la estructura del ER que en su actividad isomerasa sin descartar la importancia de la actividad de la PDI en responder al estrés oxidativo⁵¹.

En nuestro sistema de estudio, sería conveniente determinar la actividad de la PDI y si puede afectar la conformación y las propiedades de unión al ADN del ER α en ambos sistemas de traducción.

4.4 Cinética de traducción y el ER α

Uno de nuestros propósitos es comprender la contribución de la cinética de traducción al plegamiento de las proteínas, en particular del rol del uso de codones en relación con las poblaciones de ARNt, y su vinculación con las pausas durante la traducción y el plegado de las proteínas. Consecuentemente, se analizaron cómo estos factores podrían afectar la conformación del ER α en nuestros sistemas de expresión. En primer lugar se obtuvieron resultados preliminares de la existencia de pausas diferenciales durante la traducción del ER α en ambos extractos de traducción mediante el análisis

del perfil de péptidos nacientes. La confirmación de este resultado requiere de estrategias complementarias, como por ejemplo la descrita por Wolin y Walter⁸⁸. El diseño experimental planteado por los autores a través del análisis de las secuencias de ARNs protegidas por los ribosomas del ataque de ribonucleasas, resulta interesante y su aplicación a nuestro sistema permitiría obtener resultados concluyentes. Asimismo, resulta necesario diseñar experimentos que permitan determinar si existe una correlación entre las pausas de traducción y la conformación de las proteínas. Experimentos recientes lograron combinar medidas de espectroscopia de NMR de péptidos nacientes unidos al ribosoma y análisis bioquímicos⁸⁴. Estrategias de este tipo permitirían vincular los pasos involucrados en el plegado co-traduccional a nivel específico de residuo.

Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que el uso de codones de un gen puede afectar la cinética de traducción^{59,133} y podría estar vinculado al plegamiento de las proteínas⁵⁹. Sin embargo su vinculación con las poblaciones de ARNt no es ampliamente aceptada. Abordar el estudio de las poblaciones de ARNt en eucariotas es complejo. Actualmente se están implementando estrategias que permiten identificar y cuantificar ARNt en distintos tipos celulares¹⁰⁵, aunque generalmente no permiten discriminar entre las bases modificadas presentes en los ARNt que tienen gran importancia durante el reconocimiento codón-anticodón, ni si los ARNt que son analizados están cargados con su aminoácido.

A modo de complementar este estudio, sería interesante estudiar la composición de ARNt de cada extracto empleado o analizar la conformación del ER sintetizado en un extracto con el suplemento de algún ARNt particular. Asimismo, se podría evaluar la influencia de las distintas poblaciones de ARNt en la expresión del ER α en distintas líneas celulares o en extractos de traducción *in vitro* generados en el laboratorio sin la modificación de las poblaciones de ARNt naturales de dichos sistemas.

Por la correlación demostrada entre la frecuencia de uso de codones y las concentraciones relativas de ARNts en *E. coli*¹¹⁰ y en otros organismos, como primera aproximación al estudio de la influencia de las poblaciones de ARNt en la cinética traduccional se contrastó la frecuencia de uso de codones en ambos extractos. El análisis comparativo de la frecuencia de uso de codones en Trigo (*Triticum aestivum*) y Conejo (*Oryctolagus cuniculus*) mostró diferencias en el uso de codones en ambos organismos que podría tener relación con las concentraciones relativas de ARNt. A pesar de que los sistemas de traducción *in vitro*, frecuentemente están suplementados con ARNt isoaceptores de baja concentración para mejorar la eficiencia de traducción, paradójicamente podrían existir diferencias entre ambos sistemas que alteren la dinámica traduccional y que por lo tanto se refleje en las diferentes conformaciones adoptadas por el ER α .

De acuerdo a nuestra hipótesis de trabajo los codones sinónimos raros pueden ser claves si consideramos que el plegado co-traducciona l de las proteínas y las pausas durante la traducción. Por otro lado, se han reportado varias mutaciones sinónimas en el gen del ER α asociadas a algunos procesos tumorales, como por ejemplo las sustituciones en los codones 10(TCT->TCC), 87(TCT->TCC), 243(CGC->CGT), 325(CCC->CCG) y 594(ACA->ACG)²⁴³⁻²⁴⁷. Por este motivo, en se decidió evaluar el aporte de la cinética de traducción a la conformación del ER α , se sustituyendo algunos codones sinónimos que codifican para aminoácidos del dominio N terminal del ER α humano.

Los mutantes sinónimos del ER α , el ER 3P y el 5PL, se sintetizaron de forma similar al ER WT en ambos sistemas de traducción. Se obtuvieron rendimientos de síntesis similares a los obtenidos para el receptor WT en cada uno de los extractos acelulares y perfiles de proteólisis limitada análogos. El análisis preliminar de las pausas de traducción del mutante 5PL mostró diferencias en el sitio de las pausas respecto a la traducción de la secuencia WT, en particular en torno a los 10 kDa, que podría correlacionarse con la ubicación de las mutaciones sinónimas generadas. Aunque es atractiva la idea de que dichas mutaciones puedan tener un efecto sobre la conformación y/o función del ER, mediante las técnicas utilizadas en este trabajo, no se logró detectar diferencias conformacionales entre el ER WT y los mutantes sinónimos analizados.

Por otro lado, se analizó la región donde se ubican de las mutaciones sinónimas con el RESCUE ESE WEB SERVER (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>), que permite localizar sitios potenciadores de splicing. Los mutantes generados no alteran ningún sitio potenciador de splicing reportado hasta el momento. Este resultado sugiere que los mutantes podrían ser estudiados en un sistema celular complejo, independientemente de los posibles efectos de las mutaciones sinónimas sobre los mecanismos de splicing. Por lo tanto, sería pertinente estudiar los mutantes generados en sistemas de expresión diferentes (*in vitro* y/o *in vivo*), con maquinarias traduccionales asociadas e implementar otros métodos de detección de variaciones conformacionales.

4.5 Conclusiones finales

En resumen, en este trabajo nuestro objetivo fue investigar si las propiedades estructurales y funcionales del ER α pueden ser afectadas por el medio celular durante su biosíntesis. Se demostró la existencia de al menos 3 conformaciones del ER α en distintos extractos de traducción *in vitro* empleados que presentan diferente resistencia

a la proteólisis, solubilidad frente al etanol y afinidad por su ligando, evidenciando la influencia de la maquinaria de traducción en la conformación del ER α en un sistema *in vitro*.

Resultados preliminares indicarían la existencia de distintos sitios de pausas durante la traducción del ER α en RRL o WGE. Dichas pausas habrían sido afectadas por la sustitución de codones sinónimos en la secuencia codificante del ER α en ambos sistemas de traducción. Pero, los mutantes sinónimos no mostraron cambios conformacionales respecto al ER α WT mediante los métodos empleados en el trabajo. Estas evidencias sustentan a la hipótesis que propone la existencia de variaciones conformacionales del ER α tejido y/o célula específica relevante para comprender la función de éste receptor nuclear.

El grupo de Flouriot ha sugerido en varios trabajos que el ER α no interactúa con la maquinaria transcripcional de la misma manera en todas las células¹³⁸, incluso conociendo que la mayoría de los co-activadores están ampliamente expresados en cantidades similares en todas las células^{138,166,199}. Los resultados presentados permitirían explicar en parte las diferencias antagónicas de diferentes ligandos del ER α en distintos tejidos generando un espectro de alternativas para la búsqueda de tratamientos contra el cáncer. La confirmación de nuestras observaciones en células intactas permitiría considerar a las conformaciones “nativas” del ER como una población compleja compuesta por un número de conformeros relacionados posiblemente en función de la maquinaria de traducción célula-específica.

Cada tejido e incluso cada tipo celular podría tener una maquinaria de traducción asociada. La confirmación de la existencia de maquinarias de traducción tejido específicas permitiría forjar nuevas hipótesis que intenten explicar algunas enfermedades conformacionales donde una proteína específica es acumulada en agregados intra o extra moleculares tejido específico. El conjunto de enfermedades conformacionales podría considerarse como un grupo mucho más diverso de enfermedades que compromete a proteínas muy diferentes. Los cambios conformacionales que sufren las proteínas involucradas podrían detectarse como en el caso de los de agregados proteicos o podrían pasar desapercibidos, cuando el cambio implica una alteración de la conformación nativa a otra forma soluble de la proteína con propiedades distintas a la proteína nativa.

En eucariotas, la existencia de distintos tejidos y células especializadas con perfiles característicos de expresión, podrían generar nuevas posibilidades en la regulación de la actividad de algunas proteínas, mediante la existencia *in vivo* de “poblaciones conformacionales” de un polipéptido.

5. Perspectivas

En este estudio hemos trabajado en varias direcciones, explorando la influencia de la maquinaria de traducción en el plegamiento de las proteínas, en particular en la conformación del ER α . Los resultados presentados sugieren fuertemente que el ER α sintetizado en diferentes sistemas de traducción puede adoptar diferentes conformaciones contribuyendo a una nueva hipótesis para la comprensión de la función del ER α . El siguiente paso, en este sentido, consiste en estudiar la conformación ER α dentro de la célula y en distintos tejidos. Estrategias que intenten comprender la relación entre la conformación del ER α y su función deben ser implementadas. Una asignatura pendiente en este estudio es el análisis de la función reguladora de la transcripción del ER α producido en ambos sistemas de traducción. Varios métodos permitirían evaluar su funcionalidad, como el estudio de su interacción con el ERE o a distintos ligandos. Pero, el estudio del ER α en líneas celulares permitiría realizar ensayo de actividad para evaluar su función activadora de la transcripción dependiente de ligandos o su función transactivadora.

Este estudio, por otro lado, ha intentado resaltar la importancia de la maquinaria de traducción en la conformación de las proteínas. La maquinaria de traducción resulta ser un sistema de componentes encargados de la síntesis y plegado de una proteína que tendrían roles claves en la adquisición de su estructura tridimensional. Es por este motivo que resulta importante entender la contribución relativa de cada uno de los componentes de la maquinaria de traducción en el plegado de las proteínas *in vivo*.

Las chaperonas moleculares y enzimas que participan en el plegado de las proteínas tienen roles claves durante y luego de la biosíntesis, pudiendo determinar la conformación de una proteína. La influencia de las chaperonas en el plegamiento del ER α , en particular de la hsp90 ha sido reportada y descrita en este trabajo por lo que es trascendente comprender la actividad de la misma y de otras proteínas que participan en el plegado del receptor en los extractos de traducción empleados. También sería interesante estudiar la función de la PPI en los extractos de traducción, ya que muchas veces es un paso limitante en el plegado de las proteínas podría afectar la conformación del ER α .

En los últimos 20 años, una de las principales líneas de investigación de la Sección Bioquímica se centró en el estudio del uso de codones y su relación con las

poblaciones de ARNt y plegado de las proteínas. Sería interesante evaluar la contribución de dichos factores a las diferencias conformacionales detectadas en el ER α sintetizado en RRL y WGE. Generalmente estos extractos vienen adicionados con ARNt para facilitar la expresión de proteínas heterólogas. Por este motivo sería conveniente utilizar extractos de traducción acelulares preparados a partir de líneas celulares estables originadas de distintos tejidos humanos permitiría estudiar la influencia de las poblaciones de ARNt en la cinética traduccional y la conformación de la proteína. Una aproximación experimental de este tipo requeriría la identificación de cada uno de los ARNt y cuantificar su expresión en cada tipo celular.

La cinética de traducción es influenciada por la secuencia codificante que está siendo traducida y su uso de codones (y consecuentemente por las poblaciones de ARNt) lo que incide directamente en el número de residuos expuestos por unidad de tiempo habilitados a establecer interacciones entre sí. Se han descrito mutantes sinónimos puntuales del ER α que se encuentran asociados a la patología tumoral por lo que sería relevante entender la influencia del uso de codones en el ARNm del ER. Los estudios realizados para 2 mutantes sinónimos del ER α no fueron concluyentes, pero el hecho que puedan presentar pausas diferenciales durante la traducción debe ser investigado. Podrían implementarse nuevas estrategias para analizar las pausas de traducción.

6. Referencias

- 1_Plempner R.K. & Wolf D.H. 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trend Biochem Sci* 24: 266-270.
- 2_Thomas P.J., Qu, Bao-He & Pederson P.L. 1995. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trend Biochem Sci* 20: 515-518.
- 3_Dobson C.M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trend Biochem Sci* 24: 329-332.
- 4_Chiti F. & Dobson C.M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75:333-366.
- 5_Kopito R.R. & Ron D. 2000. Conformational disease. *Nat Cell Biol* 2:E207-E209.
- 6_Jahn T.R. & Radford S.E. 2008. Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys* 469: 100–117.
- 7_Aguzzi A & Polymenidou M. 2004. Mammalian Prion Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 116: 313-327.
- 8_Carrell R.W. & Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease- serpins, prions and Alzheimer's. *Curr Opin Struct Biol* 8: 799-808.
- 9_Ross C.A. & Poirier M.A. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: S10-S17.
- 10_Selkoe D.J. 2004. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6 (11):1054-1061.
- 11_Smith D.W. 1996. Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA. *Biotechnol Prog* 12: 417–422.
- 12_Johnson J.L. & Craig E.A. 1997 Protein folding *in vivo*: unraveling complex pathways. *Cell* 90: 201-204.
- 13_Anfinsen C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
- 14_Jaenicke R. 1987. Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 49: 117-237.
- 15_Barnhart M.M., Pinkner J.S., Soto G.E., Sauer F.G., Langermann S., Waksman G., Frieden C. & Hultgren S.J. 2000. PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7709-7714.
- 16_Clark, A.R. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding and translocation. *Curr Opin Struct Biol* 6: 43-50.
- 17_Hartl F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579.
- 18_Martin J. & Hartl F.U. 1997. Chaperone- assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 7: 41-52.
- 19_Clark P.L. 2004. Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem Sci* 29(10): 527-534.
- 20_Baneyx F. 2004. Keeping up with protein folding. *Microbial Cell Factories* 3:6
- 21_Whitford D. 2005. Protein Structure and Function Ed Wiley.
- 22_Dobson C.M. 2004. Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods* 34: 4–14.
- 23_Frydman J. 2001. Folding of newly translated proteins *in vivo*: The Role of Molecular Chaperones. *Annu Rev Biochem* 70:603–47.
- 24_Fedorov A.N. & Baldwin T.O.1997. Cotranslational Protein Folding. *J Biol Chem* 272(52): 32715–32718.
- 25_Jaenicke R. 1993. What does protein refolding *in vitro* tell us about protein folding in the cell? *Phil Trans R. Soc. Lond. B.* 339: 287-295.
- 26_Clark P.L. & King J. 2001. A Newly Synthesized, Ribosome-bound Polypeptide Chain Adopts Conformations Dissimilar from Early *in vitro* Refolding Intermediates. *J Biol Chem* 276(27): 25411–25420.
- 27_Evans M.S., Clarke T.F. & Clark P.L. 2005. Conformations of Co-Translational Folding Intermediates. *Protein Peptide Lett* 12: 189-195.
- 28_Hartl F.U., Hlodan R. & Langer T. 1994. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem Sci* 19: 20-25.
- 29_Gething M.J. & Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
- 30_Hendrick J.P & Hartl F.U. 1993, Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62: 349-384.

- 31_Park S.H., Bolender N., Eisele F., Kostova Z, Takeuchi J., Coffino P. & Wolf D.H. 2007. The Cytoplasmic Hsp70 Chaperone Machinery Subjects Misfolded and Endoplasmic Reticulum Import-incompetent Proteins to Degradation via the Ubiquitin-Proteasome System. *Mol Biol Cell* 18: 153-165.
- 32_Schroder M. & Kaufman R.J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739-89.
- 33_Ciechanover A. 2006. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(7):1197-211.
- 34_Mayer R.J. 2000. The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Mol Cell Biol* 1:145-148.
- 35_Hartl F.U. & Hartl M.H. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- 36_Bukau B., Weissman J. & Horwich A. 2006 Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell* 125: 443-451.
- 37_Nelson R.J., Ziegelhoffer T., Nicolet C., Werner-Washburne M. & Craig E.A..1992. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* 71(1): 97-105.
- 38_Beckmann R.P., Mizzen L.A. & Welch W.J. 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850-854.
- 39_Deshaies R.J., Koch B.D., Werner-Washburne M., Craig E.A. & Schekman R. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332: 800-805.
- 40_Cyr D.M., Lu X. & Douglas M.G. 1992. Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. *J Biol Chem* 267: 20927-20931.
- 41_Langer T., Pfeifer G., Martin J., Baumeister W. & Hartl F.U. 1992. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J* 11: 4757-4767.
- 42_Houry W., Frishman D., Eckerskorn C., Lottspeich F. & Hartl R. 1999. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* 402: 147-154.
- 43_Normark S. 2000. Anfinsen comes out of the cage during assembly of the bacterial pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 7670-7672.
- 44_Ewalt K.L., Hendrick J.P., Houry W.A. & Hartl F.U.. *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *In vivo* observation of peptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90: 491-500.
- 45_Pratt W.B. & Toft D.O. 1997. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endocrine Rev* 18(3): 306-360.
- 46_Prodromou C., Siligardi G., O'Brien R., Woolfson D.N., Regan L., Panaretou B., Ladbury J.E., Piper P.W. & Pearl L.H. 1999. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J* 18(3): 754-62.
- 47_Pearl L.H. & Prodromou C. 2006 Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annu Rev Biochem* 75: 271-94.
- 48_McClellan A.J., Xia Y., Deutschbauer A.M., Davis R.W., Gerstein M. & Frydman J. 2007. Diverse Cellular Functions of the Hsp90 Molecular Chaperone Uncovered Using Systems Approaches. *Cell* 131: 121-135.
- 49_Jakob U., Scheibel T., Bose S., Reinstein J. & Buchner J. 1996. Assessment of the ATP binding properties of Hsp90. *J Biol Chem* 271: 10035-10041.
- 50_Wandinger S.K., Richter K. & Buchner J. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 283(27): 18473-7.
- 51_Schultz-Norton J.R., McDonald W.H., Yates J.R. & Nardulli A.M. 2006. Protein Disulfide Isomerase Serves as a Molecular Chaperone to Maintain Estrogen Receptor α Structure and Function. *Mol Endocrinol* 20: 1982-1995.
- 52_Lu K.P., Finn G., Lee T.H. & Nicholson L.K. 2007 Prolyl *cis-trans* isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3 (10): 619-629.
- 53_Kim C.W., Han K.S., Ryu K.S., Kim B.H., Kim K.H., Choi S.I. & Seong B.L. 2007. N-terminal domains of native multidomain proteins have the potential to assist *de novo* folding of their downstream domains *in vivo* by acting as solubility enhancers. *Protein Sci* 16: 635-643.
- 54_Albanese V., Yen-Wen Yam A., Baughman J., Parnot C. & Frydman J. 2006. Systems Analyses Reveal Two Chaperone Networks with Distinct Functions in Eukaryotic Cells. *Cell* 124: 75-88.
- 55_Deuerling E. & Bukau B. 2004. Chaperone-Assisted Folding of Newly Synthesized Proteins in the Cytosol. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39: 261-277.

- 56_Basharov M.A. 2003. Protein folding. *J Cell Mol Med* 7: 223–237.
- 57_Jensen O.N. 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 391-403.
- 58_Krueger K.E. & Srivastava S. 2006. Posttranslational Protein Modifications. Current Implications for Cancer Detection, Prevention, and Therapeutics. *Mol Cell Proteomics* 5(10): 1799-1810.
- 59_Komar A.A., Lesnik T. & Reiss C. 1999. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during *in vitro* translation. *FEBS Lett* 462: 387-391.
- 60_Sherman M.Y. & Goldberg A.L. 2001. Cellular Defenses against Unfolded Proteins: A Cell Biologist Thinks about Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 29: 15–32.
- 61_Kramer G., Ramachandiran V. & Hardesty B. 2001. Cotranslational folding—omnia mea necum porto? *Int J Biochem Cell Biol* 33: 541–553.
- 62_Frydman J., Nimmegern E., Ohtsuka K. & Hartl F.U. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370: 111-117.
- 63_Kolb V.A., Makeyev E.V. & Spirin A.S. 1994. Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J* 13(15): 3631-7.
- 64_Svetlov M.S., Kommer A., Kolb V.A. & Spirin A.S. 2006. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. *Protein Sci* 15: 242–247.
- 65_Kolb V.A., Makeyev E.V. & Spirin A.S. 2000. Co-translational Folding of an Eukaryotic Multidomain Protein in a Prokaryotic Translation System. *J Biol Chem* 275(22): 16597–16601.
- 66_Nicola A.V., Chen W. & Helenius A. 1999. Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. *Nat Cell Biol* 1(6): 341-345.
- 67_Bukau B., Deuerling E., Pfund C. & Craig E.A. 2000. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101(2): 119-22.
- 68_Netzer W.J. & Hartl F.U. 1997. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 388: 343-349.
- 69_Frydman J., Erdjument-Bromage H., Tempst P. & Hartl F.U. 1999. Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid *de novo* folding of firefly luciferase. *Nat Struct Biol* 6: 697-705.
- 70_Elcock A.H. 2006. Molecular Simulations of Cotranslational Protein Folding: Fragment Stabilities, Folding Cooperativity, and Trapping in the Ribosome. *PLoS Comput Biol* 2(7): 0824-0841.
- 71_Wegrzyn R.D. & Deuerling E. 2005. Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol Life Sci* 62: 2727–2738.
- 72_Tsalkova T., Odom O.W., Kramer G. & Hardesty B. 1998. Different Conformations of Nascent Peptides on Ribosomes. *J Mol Biol* 278: 713-723.
- 73_Kaiser C.M., Chang H.C., Agashe V.R., Lakshminpathy S.K., Etschells S.A., Hayer-Hart M., Hartl F.U. & Barral J.M. 2006. Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature* 444: 455-460.
- 74_Ghosh J., Basu A., Pal S., Chowdhuri S., Bhattacharya A., Pal D., Chattoraj D.K. & DasGupta C. 2003. Ribosome–DnaK interactions in relation to protein folding. *Mol Microbiol* 48(6): 1679–1692.
- 75_Ying B.W., Taguchi H. & Ueda T. 2006. Co-translational Binding of GroEL to Nascent Polypeptides Is Followed by Post-translational Encapsulation by GroES to Mediate Protein Folding. *J Biol Chem* 281(31): 21813–21819.
- 76_Thanaraj T.A. & Argos P. 1996. Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization. *Protein Sci* 5: 1594–1612.
- 77_Sahdev S., Khattar S.K. & Saini K.S. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307:249–264.
- 78_Varenne S., Buc J., Lloubes R., & Lazdunski C. 1984. Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J Mol Biol* 180:549–576.
- 79_Wen J.D., Lancaster L., Hodges C., Zeri A.C., Yoshimura S.H., Noller H.F., Bustamante C. & Tinoco I. 2008. Following translation by single ribosomes one codon at a time. *Nature* 452: 598-603.
- 80_Komar A.A. & Jaenicke R. 1995. Kinetics of translation of α B crystallin and its circularly permuted variant in an *in vitro* cell-free system: possible relations to codon distribution and protein folding. *FEBS Lett* 376:195-198.
- 81_Irwin B., Heck J.D. & Hatfield G.W. 1995. Codon pair utilization biases influence translational elongation step times. *J Biol Chem* 270(39): 22801-6.

- 82_Thanaraj T.A. & Argos P. 1996. Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein Sci* 5: 1973–1983.
- 83_Kozak, M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361: 13-37.
- 84_Hsu S.D., Fucini P., Cabrita L.D., Launay H, Dobson C.M. & Christodoulou J. 2007. Structure and dynamics of a ribosome-bound nascent chain by NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(42): 16516–16521.
- 85_Buchan J.R. & Stansfield I. 2007. Halting a cellular production line: responses to ribosomal pausing during translation. *Biol Cell* 99: 475–487.
- 86_Kim J., Klein P.G & Mullet J.E. 1991. Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J Biol Chem* 266: 14931–14938.
- 87_Evans M.S, Ugrinov K., Frese M.A. & Clark P. 2005. Homogeneous stalled ribosome nascent chain complexes produced *in vivo* or *in vitro*. *Nature Methods* 2(10): 757-762.
- 88_Wolin S.L. & Walter P. 1998. Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. *EMBO J* 7(11): 3559 – 3569.
- 89_Lindhout P., Neeleman L., Van Tol H. & Van Vloten-Doting L. 1985. Ribosomes are stalled during *in vitro* translation of alfalfa mosaic virus RNA 1. *Eur J Biochem.* 152: 625-631.
- 90_Lemm I. & Ross J. 2002. Regulation of *c-myc* mRNA Decay by Translational Pausing in a Coding Region Instability Determinant. *Mol Cell Biol* 22(12): 3959–3969.
- 91_Lesnik T., Solomovici J., Deana A., Ehrlich R. & Reiss C. 2000. Ribosome traffic in *E. coli* and regulation of gene expression. *J Theor Biol* 202(2): 175-85.
- 92_Zhang S., Goldman E. & Zubay G. 1994. Clustering of low usage codons and ribosome movement. *J Theor Biol* 170(4): 339-54.
- 93_Doma, M.K. & Parker, R. 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440: 561–564.
- 94_Deana A., Ehrlich R. & Reiss C. 1998. Silent mutations in the *Escherichia coli* *ompA* leader peptide region strongly affect transcription and translation *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 26: 4778-82.
- 95_Deana A., Ehrlich R., & Reiss C. 1996. Synonymous codon selection controls *in vivo* turnover and amount of mRNA in *Escherichia coli* *bla* and *ompA* genes. *J Bacteriol* 178(9): 2718-20.
- 96_Moore S.D. & Sauer R.T. 2007. The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Ann Rev Biochem* 76: 101-124.
- 97_Hayes C.S., Bose B. & Sauer R.T. 2002. Proline Residues at the C Terminus of Nascent Chains Induce SsrA. Tagging during Translation Termination. *J Biol Chem* 277 (37): 33825–33832.
- 98_Kurita D., Konno T., Takada K, Muto A. & Himeno H. 2007. Molecular mechanism of trans-translation. *Nucleic Acids Symp Ser* 51: 43–44.
- 99_Keiler K.C. 2007. Physiology of tmRNA: what gets tagged and why? *Curr Opin Microbiol* 10: 169-175.
- 100_Emilsson V. & Kurland C.G. 1990. Growth rate dependence of transfer RNA abundance in *Escherichia coli*. *EMBO J* 9 (13): 4359-4366.
- 101_Ames B.N., Hartman P.E. & Jacob F. 1963. Chromosomal alterations affecting the regulation of histidine biosynthetic enzymes in *Salmonella*. *J Mol Biol* 7: 23-42.
- 102_Ikemura T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2(1): 13-34.
- 103_Ikemura T. 1982. Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes. Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and *Escherichia coli* with reference to the abundance of isoaccepting transfer RNAs. *J Mol Biol* 158(4):573-97.
- 104_Plotkin J.B., Robins H. & Levine A.J. 2004. Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. *Proc Natl Acad Sci* 101(34): 12588-12591.
- 105_Dittmar KA, Goodenbour JM & Pan T. 2006 Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. *PLoS Genet* 2(12): e221.
- 106_Goodenbour J.M. & Pan T. 2006. Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 34(21): 6137-46.
- 107_Zhou J., Liu W.J., Peng S.W., Sun X.Y. & Frazer I. 1999. Papillomavirus Capsid Protein Expression Level Depends on the Match between Codon Usage and tRNA Availability. *J Virol* 73: 4972-4982.
- 108_Garel J.P., Mandel P., Chavancy G. & Daille J. 1970. Functional adaptation of tRNAs to fibroin biosynthesis in the silk gland of *Bombyx mori* L. *FEBS Lett.* 7(4): 327-329.

- 109_Okada N., Shindo-Okada N., Sato S., Itoh Y.H., Oda K. & Nishimura S. 1978. Detection of unique tRNA species in tumor tissues by *Escherichia coli* guanine insertion enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(9):4247-51.
- 110_Dong H., Nilsson L. & Kurland C.G., 1996. Co-variation of tRNA Abundance and Codon Usage in *Escherichia coli* at Different Growth Rates. *J Mol Biol* 260 (5): 649-663.
- 111_Elf J., Nilsson D., Tenson T. & Ehrenberg M. 2003. Selective Charging of tRNA Isoacceptors Explains Patterns of Codon Usage. *Science* 300:1718-1722.
- 112_Dittmar K.A., Sorensen M.A., Elf J., Ehrenberg M. & Pan T. 2005 Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep* 6: 151–157.
- 113_Smith D.W.E. 1996 Systems: The Role of tRNA. *Biotechnol Prog* 12: 417-422.
- 114_Smith D.W., McNamara A.L., Mushinski J.F.& Hatfield D.L. 1985. Tumor-specific, hypomodified phenylalanyl-tRNA is utilized in translation in preference to the fully modified isoacceptor of normal cells. *J Biol Chem* 260(1): 147-51.
- 115_Smith D.W., McNamara A.L., Rice M.& Hatfield D.L. 1981. The effects of a post-transcriptional modification on the function of tRNA Lys isoaccepting species in translation. *J Biol Chem* 256(19): 10033-6.
- 116_Chavancy G. & Garel J.P. 1981; Does quantitative tRNA adaptation to codon content in mRNA optimize the ribosomal translation efficiency? Proposal for a translation system model. *Biochimie* 63(3): 187-95.
- 117_Ikemura T. 1981. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol* 151(3): 389-409.
- 118_Sorensen M.A. & Pedersen S. 1991. Absolute *in vivo* translation rates of individual codons in *Escherichia coli*. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. *J Mol Biol.* 222(2): 265-80.
- 119_Bonekamp F., Andersen H.D., Christensen T., Jensen K.F. 1985. Codon-defined ribosomal pausing in *Escherichia coli* detected by using the pyre attenuator to probe the coupling between transcription and translation. *Nucleic Acids Res* 13(11): 4113-23.
- 120_Ortwerth B.J. & Chu-Der O.M. 1974. Studies on the specialized transfer RNA population of the lens. *Exp Eye Res.* 19(6):521-32.
- 121_Smith D.W. & McNamara A.L. 1974. The distribution of transfer ribonucleic acid in rabbit reticulocytes. Levels of aminoacylation and ribosomal attachment during hemoglobin synthesis. *J Biol Chem* 249(5): 1330-4.
- 122_Chamary J.V, Parmley J.L. & Hurst L.D. 2006. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* 7: 98-108.
- 123_Wang D. & Sadée W. 2006. Searching for Polymorphisms That Affect Gene Expression and mRNA Processing: Example ABCB1 (MDR1). *AAPS J* 8(3):E515-20.
- 124_Berg O.G. & Kurland C.G. 1997. Growth rate-optimised tRNA abundance and codon usage. *J Mol Biol* 270(4): 544-50.
- 125_Whittle C.A., Malik M.R. & Krochko J.E. 2007. Gender-specific selection on codon usage in plant genomes. *BMC Genomics* 8:169.
- 126_Sharp P.M., Tuohy T. & Mosurski K. 1986. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res* 14: 125–5143.
- 127_Duret L. & Mouchiroud D. 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4482-4487.
- 128_Duret L. 2000. tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. *Trends Genet* 16(7): 287-9.
- 129_Moriyama E.N. & Powell J.R. 1997. Codon usage bias and tRNA abundance in *Drosophila*. *J Mol Evol* 45(5): 514-23.
- 130_Oresic M. & Shalloway D. 1998. Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. *J Mol. Biol* 281:31-48.
- 131_Tao X. & Dafu D. 1998. The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS Lett* 434: 93-96.
- 132_Cortazzo P., Cervenansky C., Marin M., Reiss C., Ehrlich R., Deana A.. 2002. Silent mutations affect *in vivo* protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(1): 537-41.
- 133_Ramachandiran V., Kramer G., Horowitz P.M. & Hardesty B. 2002 Single synonymous codon substitution eliminates pausing during chloramphenicol acetyl transferase synthesis on *Escherichia coli* ribosomes *in vitro*. *FEBS Lett* 512: 209-212.

- 134_Kimchi-Sarfaty C., Mi Oh J., Kim N-W, Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V. & Gottesman M.M. 2007. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 315: 525-528.
- 135_Ruff M., Gangloff M., Wurtz J.M. & Moras D. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation Structure–function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Brest Cancer Res* 2: 353-359.
- 136_Mclaughlin S.H. & Jackson S.E. 2002 Folding and stability of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Protein Sci* 11:1926–1936.
- 137_Koehler K.F., Helguero L.A., Haldosen L.A., Warner M. & Gustafsson J.A. 2005. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocr Rev* 26: 465–478.
- 138_Merot J., Metivier R., Penot G., Manu D., Saligaut C., Gannon F., Pakdel F., Kah O. & Flouriot G. 2004. The Relative Contribution Exerted by AF-1 and AF-2 Transactivation Functions in Estrogen Receptor α Transcriptional Activity Depends upon the Differentiation Stage of the Cell. *J Biol Chem* 279 (25): 26184–26191.
- 139_Nettles K.W., Bruning J.B., Gil G., O'Neill E.E., Nowak J., Guo Y., Kim Y., DeSombre E.R., Dilis R., Hanson R.N., Joachimiak A. & Greene G.L. 2007. Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain. *EMBO Reports* 8: 563–568.
- 140_Cheung E., Schwabish M.A. & Graus W.L. 2003. Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors α and β . *EMBO J* 22(3):600-611.
- 141_Rollerova E. & Urbancikova M. 2000. Intracellular Estrogen Receptors, their characterization and function. *Endocr Reg* 34: 203-218.
- 142_Moggs J.G. & Orphanides G. 2001. Estrogen receptors: Orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2: 775–781.
- 143_Inoue S. & Horie- Inoue K. 2004. Estrogen Receptor Function and Molecular Mechanisms. *JMAJ* 47(10): 480–485.
- 144_Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E. & Chambon P. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59: 477–487.
- 145_Delaunay F., Pettersson K., Tujague M. & Gustafsson J. 2000. Functional Differences between the Amino-Terminal Domains of Estrogen Receptors α and β . *Mol Pharmacol* 58: 584–590.
- 146_Valley C.C., Metivier R., Solodin N.M., Fowler A.M., Mashek M.T., Hill L. & Alarid E.T. 2005. Differential Regulation of Estrogen-Inducible Proteolysis and Transcription by the Estrogen Receptor α N Terminus. *Mol Cell Biol* 25(13): 5417–5428.
- 147_Wang L.H., Yang X.Y., Zhang X., Mihalic K., Fan Y-X, Xiao W., Howard O.M.Z., Appella E., Maynard A.T. & Farrar W.L. 2004. Suppression of breast cancer by chemical modulation of vulnerable zinc fingers in estrogen receptor. *Nat Med* 10(1): 40-47.
- 148_Sri Krishna S., Majumdar I. & Grishin N.V. 2003. Structural classification of zinc fingers *Nucleic Acids Res* 31(2): 532-550.
- 149_Lazennec G., Ediger T.R, Petz L.N., Nardulli A.M. & Katzenellenbogen B.S. 1997. Mechanistic Aspects of Estrogen Receptor Activation Probed with Constitutively Active Estrogen Receptors: Correlations with DNA and Coregulator Interactions and Receptor Conformational Changes. *Mol Endocrinol* 11(9): 1375-1386.
- 150_Gangloff M., Ruff M., Eiler S., Duclaud S., Wurtz J.M. & Moras D. 2001. Crystal Structure of a Mutant hER α Ligand-binding Domain Reveals Key Structural Features for the Mechanism of Partial Agonism. *J Biol Chem* 276(18): 15059–15065.
- 151_Eiler S., Gangloff M., Duclaud S., Moras D. & Ruff M. 2001. Overexpression, Purification, and Crystal Structure of Native ER α LBD. *Protein Expr Purif* 22: 165–173.
- 152_Aumais J.P., Lee H.S., Lin R. & White J.H. 1997. Selective Interaction of hsp90 with an Estrogen Receptor Ligand-binding Domain Containing a Point Mutation. *J Biol Chem* 272 (18): 12229–12235.
- 153_Nettles K.W. & Greene G.L. 2005. Ligand Control of Coregulator Recruitment to Nuclear Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 309–33.
- 154_Shiau A.K., Barstad D., Loria P.M., Cheng L., Kushner P.J., Agard D.A. & Greene G.L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95: 927-937.
- 155_Greenfield N., Vijayanathan V., Thomas T.J., Gallo M.A. & Thomas T. 2001. Increase in the Stability and Helical Content of Estrogen Receptor α in the Presence of the Estrogen Response Element: Analysis by Circular Dichroism Spectroscopy. *Biochem* 40 (22): 6646-6652.
- 156_Warnmark A., Wikstrom A., Wright A.P.H., Gustafsson J. & Hard T. 2001 The N-terminal regions of estrogen receptor α and β are unstructured *in vitro* and show different TBP binding properties. *J Biol Chem* 276: 45939–45944.

- 157_Matthews J. & Gustafsson J.A. 2003. Estrogen Signaling: A Subtle Balance Between ER α and ER β . *Molecular Interventions* 3(5): 281-292.
- 158_Menuet A., Anglade I., Flouriot G., Pakdel F. & Kah O. 2001. Tissue-Specific Expression of Two Structurally Different Estrogen Receptor Alpha Isoforms along the Female Reproductive Axis of an Oviparous Species, the Rainbow Trout. *Biol Reprod* 65: 1548–1557.
- 159_Bao Ting Zhu, Han G., Shim J., Wen Y. & Jiang X. 2006. Quantitative Structure-Activity Relationship of Various Endogenous Estrogen Metabolites for Human Estrogen Receptor α and β Subtypes: Insights into the Structural Determinants Favoring a Differential Subtype Binding. *Endocrinology* 147(9): 4132–4150.
- 160_Gannon F., Denger S., Metivier R., Reid G., Hübner M., Kos M., Manu D., Brand H. & Penot G. 2002. Estrogen receptors – a novel view. *EMBL Res Rep*:178-183.
- 161_Buchner J. 1999. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 24(4): 136-41.
- 162_Penot G., Le Péron C., Mérot Y., Grimaud-Fanouillère E., Ferrière F., Boujrad N., Kah N., Saligaut C., Ducouret B., Métivier R. & Flouriot G. 2005. The Human Estrogen Receptor alpha Isoform hER α 46 Antagonizes the Proliferative Influence of hER α 66 in MCF7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146: 5474 - 5484.
- 163_Flouriot G., Brand H., Denger S., Metivier R., Kos M., Reid, G. Sonntag-Buck V. & Gannon F. 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 19(17): 4688-700.
- 164_Barraille P., Chinestra P., Bayard F. & Faye J.C. 1999. Alternative Initiation of Translation Accounts for a 67/45 kDa Dimorphism of the Human Estrogen Receptor ER α . *Biochem Biophys Res Commun* 257: 84–88.
- 165_Monroe D.G., Secreto F.J., Subramaniam M., Getz B.J., Khosla S., & Spelsberg T.C. 2005. Estrogen Receptor α and β Heterodimers Exert Unique Effects on Estrogen- and Tamoxifen-Dependent Gene Expression in Human U2OS Osteosarcoma Cells. *Mol Endo* 19(6): 1555–1568.
- 166_McDonnell D.P. & Norris J.D. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296: 1642-1644.
- 167_Rosenfeld M.G., Lunnyak V.V. & Glass C.K. 2006 Sensors and signals: a coactivator /corepressor/epigenetic code for integrating signal dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20: 1405–1428.
- 168_Wijayarathne A.L. & McDonnell D.P. 2001. The Human Estrogen Receptor- α Is a Ubiquitinated Protein Whose Stability Is Affected Differentially by Agonists, Antagonists, and Selective Estrogen Receptor Modulators. *J Biol Chem* 276 (38): 35684–35692.
- 169_Katzenellenbogen, B.S. & Katzenellenbogen, J.A. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta - regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2: 335–344.
- 170_Paige L.A., Christensen D.L., Gron H., Norris J.D. Gottlin E.B., Padilla K.M., Chang C-Y., Ballas L.M., Hamilton P.T. & McDonnell D.P. 1999. Estrogen Receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *Proc Natl Acad Sci* 96: 3999-4004.
- 171_MacGregor J.I. & Jordan V.C. 1998. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50: 151–196.
- 172_Klinge C.M. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29: 2905–2919.
- 173_Wood J.R., Likhite V.S., Loven M.A. & Nardulli A.M. 2001. Allosteric Modulation of Estrogen Receptor Conformation by Different Estrogen Response Elements. *Molecular Endocrinology* 15(7): 1114–1126.
- 174_Nardulli A.M., Grobner C. & Cotter D. 1995. Estrogen Receptor-Induced DNA Bending: Orientation of the Bend and Replacement of an Estrogen Response Element with an Intrinsic DNA Bending Sequence. *Mol Endo* 9: 1064-1076.
- 175_Lin C.Y., Vega V.B., Thomsen J.S., Zhang T., Kong S.L., Xie M., Chiu K.P., Lipovich L., Barnett D.H., Stossi F., Yeo A., George J., Kuznetsov V.A., Lee Y.K., Charn T.W., Palanisamy N., Miller L.D., Cheung E., Katzenellenbogen B.S., Ruan J., Bourque G., Wei C.L. & Liu E.T. 2007. Whole-Genome Cartography of Estrogen Receptor α Binding Sites. *PLoS Genetics* 3(6): e87
- 176_Hall J.M., McDonnell D.P. & Korach K.S. 2002. Allosteric Regulation of Estrogen Receptor Structure, Function, and Coactivator Recruitment by Different Estrogen Response Elements. *Mol Endocrinol* 16(3): 469–486.
- 177_Kingston R.E. & Narlikar G.J. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes and Dev* 13: 2338-2352.

- 178_ DiRenzo J., Shang Y., Phelan M., Sif S., Myers M., Kingston, R & Brown M. 2000. BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol Cell Biol* 20: 7541–7549.
- 179_ Lamb J., Ladha M.H., McMahon C., Sutherland R.L. & Ewen M.E. 2000. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20: 8667–8675.
- 180_ Shang Y., Hu X., DiRenzo J., Lazar M.A. & Brown M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103: 843–852.
- 181_ Wei L.N., Hu X., Chandra D., Seto E. & Farooqui M. 2000. Receptor interacting protein 140 (RIP140) directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem* 275: 40782–40787.
- 182_ Mazumdar A., Wang R.-A., Mishra S.K., Adam L., Bagheri-Yarmand R., Mandal M., Vadlamudi R.K. & Kumar R. 2001. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nature Cell Biol* 3: 30–37.
- 183_ Cheung J. & Smith D.F. 2000. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol* 14(7): 939-46.
- 184_ Gougelet A., Bouclier C., Marsaud V., Maillard S., Mueller S.O., Korach K.S. & Renoir J.M. 2005. Estrogen receptor α and β subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94: 71–81.
- 185_ Wegele H., Muller L. & Buchner J. 2004. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1–44.
- 186_ Hutchison K.A., Dittmar K.D., Stancato L.F. & Pratt W.B. 1996. Ability of Various Members of the hsp70 Family of Chaperones to Promote Assembly of the Glucocorticoid Receptor into a Functional Heterocomplex with hsp90. *Steroid Biochem Molec Biol* 58 (3):251-258.
- 187_ Hutchison K. A., Dittmar K. D. & Pratt W. B. 1994. All of the factors required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90 are preassociated in a self-sufficient protein folding structure - a "foldosome". *J Biol Chem* 269: 27894-27899.
- 188_ Dittmar K.D. & Pratt W.B. 1997. Folding of the Glucocorticoid Receptor by the Reconstituted hsp90-based Chaperone Machinery. The initial hsp90-hp60-hsp70- dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* 272(20): 13047–13054.
- 189_ Dittmar K.D., Banach M., Galigniana M.D. & Pratt W.B. 1998. The Role of DnaJ-like Proteins in Glucocorticoid Receptor-hsp90 Heterocomplex Assembly by the Reconstituted hsp90-zp60-hsp70 Foldosome Complex. *J Biol Chem* 273(13): 7358–7366.
- 190_ Winter J., Klappa P., Freedman R.B., Lilie H. & Rudolph R. 2002 Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin. *J Biol Chem* 277: 310-317.
- 191_ Quan H., Fan G. & Wang C.C. 1995. Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. *J Biol Chem* 270: 17078-80.
- 192_ Ingvarsson. 1999. Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol* 9: 277-288.
- 193_ Sasaki M., Tanaka Y., Kaneuchi M., Sakuragi M. & Dahiya R. 2002. Polymorphisms of estrogen receptor alpha gene in endometrial cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 297(3): 558-564.
- 194_ Tanaka Y., Sasaki M., Kaneuchi M., Shiina H., Igawa M. & Dahiya R. 2003. Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Mol Carcinog* 37(4): 202-208.
- 195_ Tanaka Y., Sasaki M., Kaneuchi M., Fujimoto S. & Dahiya R. 2002. Single nucleotide polymorphisms of estrogen receptor alpha in human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 296(5): 1200-1206.
- 196_ Lu H., Higashikata T., Inazu A., Nohara A., Yu W., Shimizu M. & Mabuchi H. 2002. Association of Estrogen Receptor- α Gene Polymorphisms With Coronary Artery Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* : 817-823.
- 197_ Massart F., Marcucci G. & Brandi M.L. 2008. Pharmacogenetics of bone treatments: the VDR and ERalpha gene story. *Pharmacogenomics*.9(6): 733-746.
- 198_ Sommer S. & Fuqua S.A. 2001. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 11(5): 339-52.
- 199_ Smith C.L. & O'Malley B.W. 2004. Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocr Rev* 25(1): 45–71.
- 200_ Shang Y. & Brown M. 2002. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295(5564): 2465-8.
- 201_ Pakdel F., Métivier R., Flouriot G. & Valotaire Y. 2000. Two Estrogen Receptor (ER) Isoforms with Different Estrogen Dependencies Are Generated from the Trout ER Gene.

- Endocrinology* 141: 571–580.
- 202_Tena-Sempere M., Navarro V.M., Mayen A., Bellido C. & Sánchez-Criado J.E. 2004. Regulation of Estrogen Receptor (ER) Isoform Messenger RNA Expression by Different ER Ligands in Female Rat Pituitary. *Biol Reprod* 70: 671–678.
- 203_Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- 204_Appel R.D., Bairoch A. & Hochstrasser D.F. 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASY WWW server. *Trends Biochem Sci* 19: 258–260.
- 205_Higgins D.G. & Sharp P.M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244.
- 206_Eng F.C., Lee H.S., Ferrara J., Willson T.M. & White J.H. 1997. Probing the Structure and Function of the Estrogen Receptor Ligand Binding Domain by Analysis of Mutants with Altered Transactivation Characteristics. *Mol Cell Biol* 17: 4644-4653.
- 207_Garófalo E.G., Alonso O., Román E., Tasende C., Artagaveytia N, & Delgado L. 1993. *Rev Esp Med Nuclear* 12: 123–128.
- 208_1980. *Eur. J. Cancer* 372:1513–1515.
- 209_Scathard G.N. 1949. Orthopedic X-ray problems in children. *NY State J Med.* 49: 2545–2547.
- 210_Ausubel F.M. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley- Interscience.
- 211_Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- 212_Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis, T. 1989. *Current Opinion in Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1,2,3.
- 213_Gumport R.I. 1970. Effects of spermidine on RNA polymerase reaction. *Ann NY Acad Sci* 171 (3): 915.
- 213_Yi P., Driscoll M.D., Huang J., Bhagat S., Hilf R., Bambara R.A. & Muyan M. 2001 The Effects of Estrogen-Responsive Element- and Ligand-Induced Structural Changes on the Recruitment of Cofactors and Transcriptional Responses by ER α and ER β . *Mol Endo* 16(4): 674–693.
- 214_Fritsch M., Leary C.M., Furlow J.D., Ahrens H., Schuh T.J., Mueller G.C. & Gorski J. 1992. A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* 31(23):5303-11.
- 215_Attardi B. & Happe H.K. 1986. Comparison of the physicochemical properties of uterine nuclear estrogen receptors bound to estradiol or 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology* 119(2): 904-915.
- 216_Kraichely D.M., Sun J, Katzenellenbogen J.A. & Katzenellenbogen B.S. 2000. Conformational Changes and Coactivator Recruitment by Novel Ligands for Estrogen Receptor- α and Estrogen Receptor- β : Correlations with Biological Character and Distinct Differences among SRC Coactivator Family Members. *Endocrinology* 141(10): 3534-3545.
- 217_Robinson M., Lilley R., Little S., Emtage J.S., Yarranton G., Stephens P., Millican A., Eaton M. & Humphreys G. 1984. Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 12(17): 6663-71.
- 218_Warnmark A., Treuter E., Wright A.P.H., & Gustafsson J. 2003. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation *Molecular Endocrinology* 17(10):1901–1909.
- 219_Nuttall M.E., Pendrak I., Emery J.G., Nadeau D.P., Fisher P.W., Nicholson T.A., Zhu Y., Suva L.J., Kingsbury W.D. & Gowen M. 2001. Antagonism of oestrogen action in human breast and endometrial cells *in vitro*: potential novel antitumour agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 47(5): 437-43.
- 220_Lamla T., Stiege W. & Erdmann V.A. 2002. An improved protein bioreactor: efficient product isolation during *in vitro* protein biosynthesis via affinity tag. *Mol Cell Proteomic* 1(6): 466-71.
- 221_Betton J.M. 2003. Rapid translation system (RTS): a promising alternative for recombinant protein production. *Curr Protein Pept Sci* 4(1): 73-80.
- 222_Sitaraman K., Esposito D., Klarmann G., Le Grice S.F., Hartley J.L. & Chatterjee D.K. 2004. A novel cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* 110(3): 257-63.
- 223_Hino M., Kataoka M., Kajimoto K., Yamamoto T., Kido J., Shinohara Y. & Baba Y. 2008. Efficiency of cell-free protein synthesis based on a crude cell extract from *Escherichia coli*, wheat germ, and rabbit reticulocytes. *J Biotech* 13: 183–189.

- 224_Olins P.O. & Rangwala S.H. 1989. A Novel Sequence Element Derived from Bacteriophage T7 mRNA Acts *ELS* an Enhancer of Translation of the *lac2* Gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264(29): 16973-16976.
- 225_Mikami S., Masutani M., Sonenberg N., Yokoyama S. & Imataka H. 2006. An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. *Prot Exp Purif* 46 (2): 348-357.
- 226_Tanaka S., Oda Y., Ataka M., Onuma K., Fujiwara S. & Yonezawa Y. 2001 Denaturation and aggregation of hen egg lysozyme in aqueous ethanol solution studied by dynamic light scattering. *Biopolymers* 59, 370–379.
- 227_Zhang C.C., Glenn K.A., Kuntz M.A. & Shapiro D.J. 2000. High level expression of full-length estrogen receptor in *Escherichia coli* is facilitated by the uncoupler of oxidative phosphorylation, CCCP. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 169–178.
- 228_Brandt M.E. & Vickery L.E. 1997. Cooperativity and Dimerization of Recombinant Human Estrogen Receptor Hormone-binding Domain. *J Biol Chem* 272(8): 4843-4849.
- 229_Katzenellenbogen J.A., Heiman D.F., Carlson K.E., Lloyd J.E.. 1982. *In vivo* and *in vitro* steroid receptor assays in the design of estrogen pharmaceuticals. In: Eckelman WC, ed. Receptor-binding radiotracers. Vol 1. Boca Raton, FL: CRC;93–126.
- 230_Lanari C. y Molinolo A.A. 2003 Progestágenos y cáncer de mama: desarrollo de un modelo experimental. *Química Viva (Argentina)* Vol. 2, número 3.
- 231_Komar A.A., Lesnik T., Cullin C., Guillement E., Ehrlich R., & Reiss C.1997. Differential resistance to proteinase K digestion of the yeast prion-like (Urep2) protein synthesized *in vitro* in wheat germ extract reticulocyte lysate cell free translation systems. *FEBS* 415: 6-10.
- 232_Blagosklonny. 1993. Mutant conformation of p53 translated *in vivo* or *in vitro* requires functional hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(16): 8379–8383.
- 233_Lain B., Iriarte A., & Martinez-Carrion M. 1994. Dependence of the Folding and Import of the Precursor to Mitochondrial Aspartate Aminotransferase on the Nature of the Cell-free Translation System. *J Biol Chem* 269 (22): 15586-15596.
- 234_Murphy P.J.M., Kanelakis K.C., Galigniana M.D., Morishima Y. & Pratt W.B. 2001. Stoichiometry, Abundance, and Functional Significance of the hsp90/hsp70-based Multiprotein Chaperone Machinery in Reticulocyte Lysate. *J Biol Chem* 276(32): 30092–30098.
- 235_Dittmar K.D., Hutchison K.A., Owens-Grillo J.K. & Pratt W.B. 1996.Reconstitution of the Steroid Receptor/hsp90 Heterocomplex Assembly System of Rabbit Reticulocyte Lysate. *J Biol Chem* 271 (22): 12833–12839.
- 236_Denis M. & Gustafsson J. A. 1989. Translation of glucocorticoid receptor mRNA *in vitro* yields a nonactivated protein. *J Biol Chem* 264: 6005-6008.
- 237_Couette B., Jalaguier S., Hellal-Levy C, Lupo B., Fagart J., Auzou G., & Rafestin-Oblin M.E. 1998. Folding Requirements of the Ligand-Binding Domain of the Human Mineralocorticoid Receptor. *Mol Endo* 12 (6): 855-863.
- 238_Couette B., Fagart J., Jalaguier S., Lombes M., Souque A. & Rafestin-Oblin M.E. 1996. Ligand-induced conformational change in the human mineralocorticoid receptor occurs within its hetero-oligomeric structure. *Biochem J* 315: 421-427.
- 239_Rose D.W., Welch W.J., Kramer G., & Hardesty B. 1989. Possible Involvement of the 90-kDa Heat Shock Protein in the Regulation of Protein Synthesis. *J Biol Chem* 264(11): 6239-6244.
- 240_Hutchison K.A., Stancato L.F., Owens G.J., Johnson J.L., Krishna P., Toft D.O. & Pratt W.B. 1995. The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90. *J Biol Chem* 270: 18841-18847.
- 241_Blagosklonny M.V., Toretsky J., Bohlen S. & Neckers L. 1996. Mutant conformation of p53 translated *in vitro* or *in vivo* requires functional HSP90. *Cell Biol* 93: 8379-8383.
- 242_Park C. & Marqusee S. 2004. Probing the high energy states in proteins by proteolysis. *J Mol Biol* 343: 1467–1476.
- 243_Vasconcelos A., Medeiros R., Veiga I., Pereira D., Carrilho S., Palmeira C., Azevedo C. & Lopes C.S. 2002. Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Breast J*. 8(4): 226-9.
- 244_Curran J.E., Lea R.A., Rutherford S., Weinstein S.R. & Griffiths L.R. 2001. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer* 95(4):271-5.

- 245_ Iwase H., Greenman J.M., Barnes D.M., Hodgson S., Bobrow L. & Mathew C.G.. Sequence variants of the estrogen receptor (ER) gene found in breast cancer patients with ER negative and progesterone receptor positive tumors. *Cancer Lett* 108:179–184.
- 246_ Roodi N., Bailey L.R., Kao W.Y., Verrier C.S., Yee C.J., Dupont W.D. & Parl F.F. 1995. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87(6):446-51.
- 247_Curran J.E., Lea R.A., Rutherford S., Weinstein S.R.& Griffiths L.R.. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer* 95:271–275.

Anexo 1. Mapa de Restricción pSG5-ER α

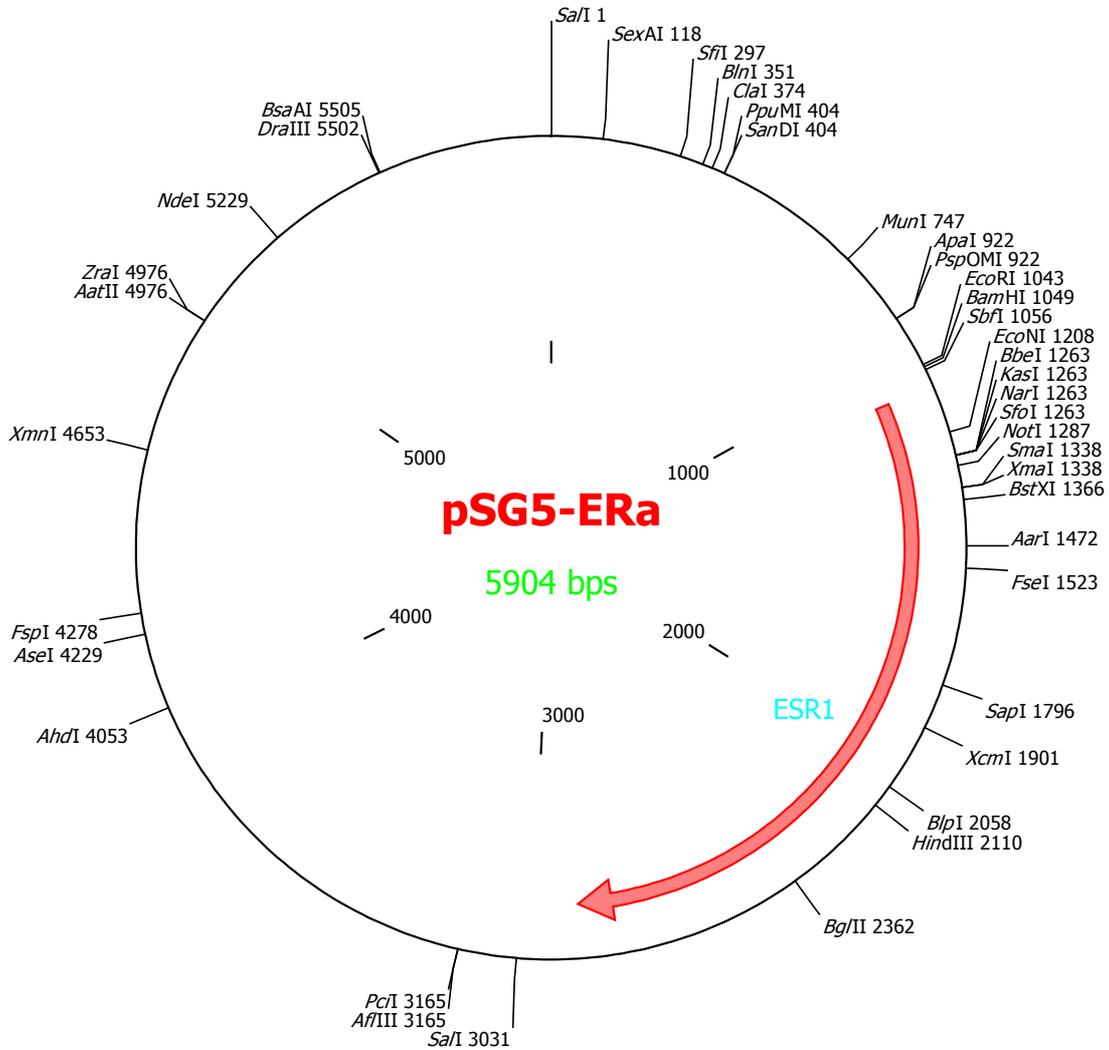


Figura 35. Esquema del mapa de restricción y principales sitios de la construcción pSG5-ER α . La secuencia codificante del ER α fue clonada entre los sitios *Bam* HI y *Bgl* II, este último fue alterado y está ausente de la construcción. El sitio *Bgl* II marcado en el mapa, corresponde a un sitio interno, de la secuencia codificante del ER α .

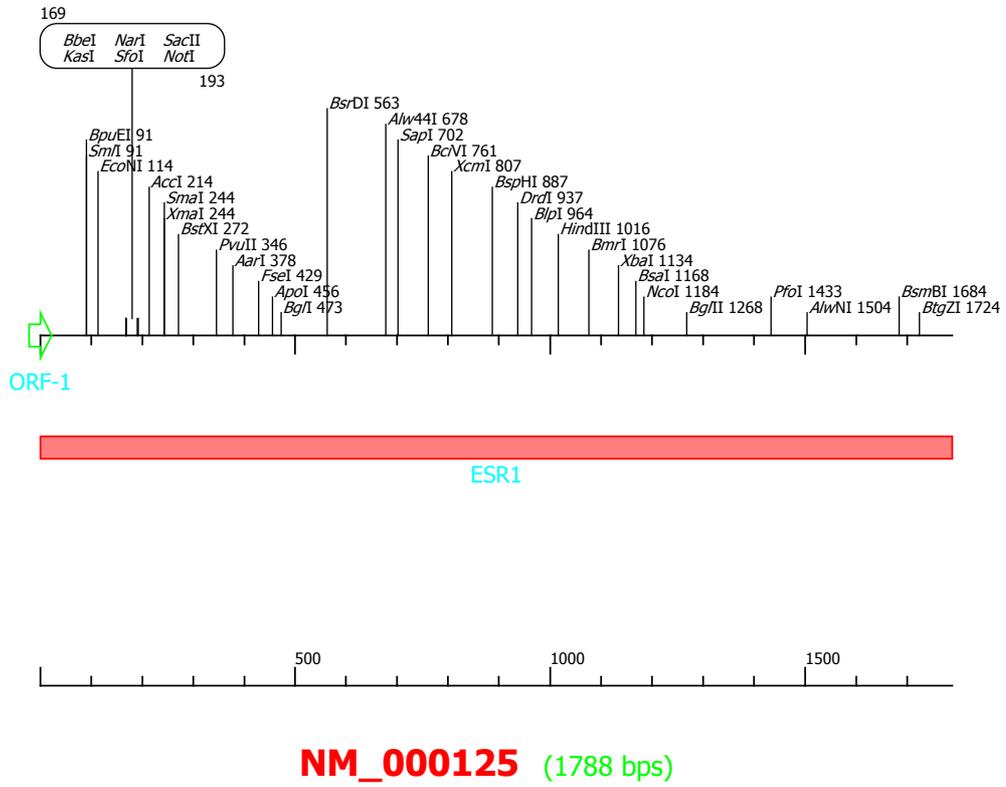


Figura 36. Esquema del mapa de restricción del ER α obtenido a partir de la secuencia NM_000125.

Anexo 2. Soluciones.

LB

10g triptona, 5g extracto de levadura, 5 g NaCl por litro. Autoclavado

LB-agar

10g triptona, 5g extracto de levadura, 5 g NaCl, 15g agar por litro. Autoclavado.

Ampicilina

Stock- 50mg/mL en agua. Filtrada por 0,22µm. Guardada a -20°C.

Cloruro de Calcio (CaCl₂)

1M. Filtrada por 0,22µm.

DTT 1M

3,09g de DTT se disuelven en 20mL de acetato de sodio 0,01M pH 5,2.
Estéril por filtración. Se guarda a -20°C.

EDTA

0,5M pH8. Filtrada por 0,22µm.

Solución de RNAsa DNAsa free

Stock. 10 mg/mL en acetato de sodio 0,01M pH 5,2. Se calienta a 100°C 15 minutos.
Dejar enfriar lentamente. Se ajusta pH agregando 0,1 volumen de Tris.Cl 1M, pH 7,4.
Se guarda en alícuotas a -20°C.

Solución I

Tris.HCl 25mM pH 8, EDTA 10 mM (pH 8) con RNAsa 1mg/mL

Solución II

NaOH 0.2M, SDS 0.1%

Solución III

Acetato de potasio 3M (pH 4.8). A 60mL de acetato de potasio 5M se le agregan 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de H₂O.

Glicerol 50%

Se prepara en Tris 25mM pH8, 100mM de MgSO₄.

Solución de coloración

0.25% Coomassie Brilliant Blue R (SIGMA), 30% etanol, 7% ácido acético.

Solución de decoloración

30% etanol, 7% ácido acético

Bromuro de Etidio

10mg/mL

NaCl

Stock. 5M. Autoclavado.

SDS

SDS(Sodium laurel sulfate) 10% en agua. Ajustar pH a 7,2.

TAE (Tris- Acético- EDTA)

Stock. TAE 50X, Para 1 litro, 242g Tris base, 57,1 mL de ácido acético glacial y 100mL de EDTA 0,5m pH 8.

Tris-glicina

Stock 5X: 125mM Tris, 1,25M Glicina, 0,5% SDS.

Buffer carga (electroforesis agarosa)

Stock 6X: 0,25% Azul de Bromofenol, 0,25% azul de xilencianol, 30% glicerol en agua.
Se guarda a 4°C.

Solución de transferencia

25mM Tris-HCl pH=8.3; 150mM Glicina, 0.037% SDS, 20% etanol

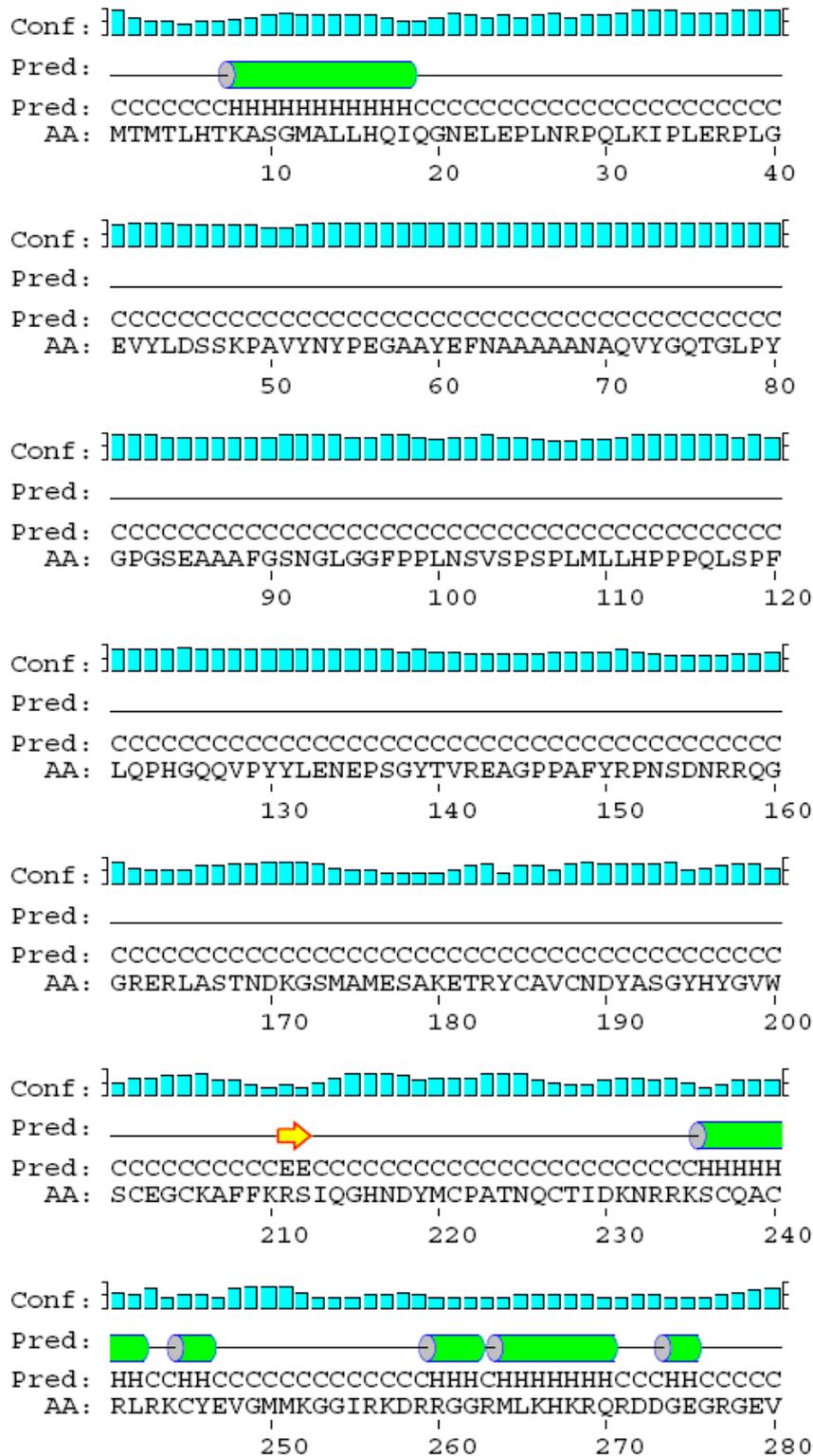
Solución de lavado wb

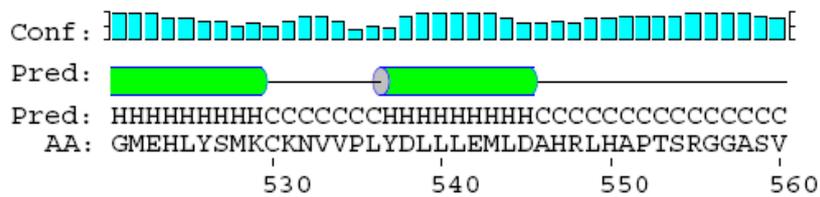
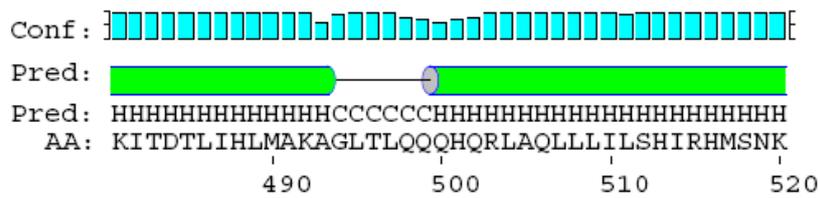
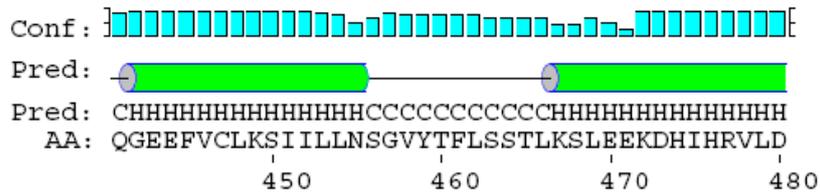
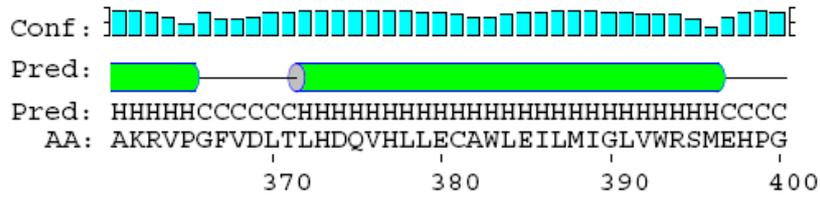
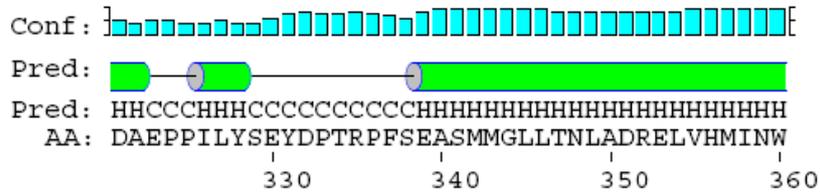
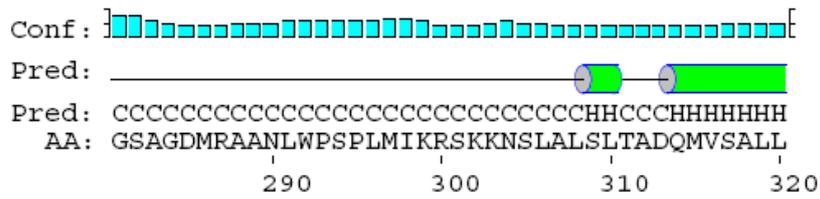
PBS- Tween20 (0.1%)

Solución de bloqueo wb

PBS- Tween20 (0.1%), leche (5%), glicina (2%)

Anexo 3. Estructura secundaria del ER α humano





Anexo 4. Estructura secundaria del extremo 5'UTR

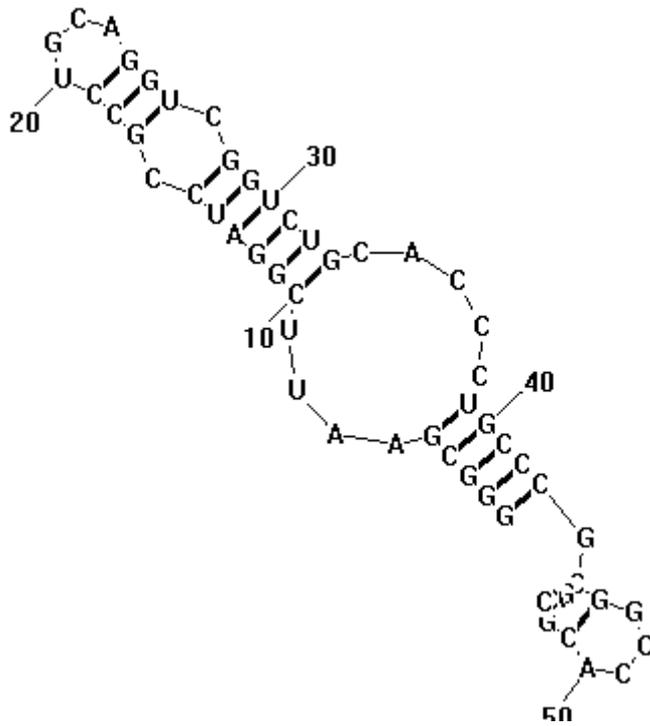


Figura 38. Estructura secundaria del extremo 5'UTR del transcrito generado a partir del vector ER α -pSG5 del Anexo 1. Obtenido con el programa RNA Structure 4.5.