



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Transactivación, presencia de isoformas
y reconocimiento diferencial del
receptor de estrógenos alfa (ER α) en
células humanas”**

Agosto 2016

Camila Yattah

Orientadora: Dra. Mónica Marín

Sección Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias

UdelaR

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Mónica por aceptarme para llevar a cabo este trabajo y por todo lo que me ha enseñado no solo académicamente sino también a nivel personal.

A Florencia Cabrera que fue quien me guió en las primeras instancias de esta tesis.

A mis grandes compañeros de “la 305” y a la sección Bioquímica.

A mi familia, amigos y los de siempre.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
Receptor de estrógenos alfa (ER α).....	3
Conformación y dominios del ER α	3
Ligandos del ER α	6
Vías de señalización del ER α	7
Vía de señalización de actina/MKL1.....	9
Variantes de splicing del ER α	11
OBJETIVOS	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Cultivo celular, transfección y tratamientos.....	16
Ensayos de gen reportero.....	17
Actividad.....	19
Extracción de ARN y síntesis de ADN copia.....	19
PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR).....	20
Ensayos de Western Blot (WB).....	20
RESULTADOS y DISCUSIÓN	22
Cultivo celular.....	22
Eficiencia de transactivación en HeLa y HepG2.....	24
Variantes de <i>splicing</i> del ER α	26
Análisis comparativo del reconocimiento del ER α	30
CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	37
ANEXO	38
Marcadores de peso molecular de ADN.....	38
Marcadores de peso molecular de proteínas.....	38
Vectores utilizados.....	39
Ensayo de β -galactosidasa.....	40
Ensayo de Luciferasa.....	40
Tratamiento de datos correspondientes a los ensayos de actividad.....	41
Soluciones y buffers utilizados.....	42
BIBLIOGRAFÍA	44

INTRODUCCIÓN

La regulación hormonal en los organismos complejos requiere de una perfecta armonización para lograr coordinar todas las funciones y como éstas se ajustan a los organismos. Como muchas manifestaciones de salud dependen de este tipo de regulación, hay un gran interés en investigar los mecanismos que subyacen a este sistema. En este trabajo se estudiarán diferentes características del receptor de estrógenos en relación a su función como receptor hormonal.

Receptor de estrógenos alfa (ER α)

El ER α es un factor de transcripción que media los efectos pleiotrópicos y tejido-específicos de los estrógenos. El ER α wt se encuentra en el núcleo celular, donde regula la transcripción de diferentes genes blanco. En los humanos se expresa en diversos tipos celulares y tejidos controlando funciones fisiológicas en el sistema reproductivo, esquelético, cardiovascular y nervioso central. Se encuentra presente principalmente en la glándula mamaria, en el útero, en el ovario, en órganos reproductivos masculinos (testículos y epidídimo), en el estroma de la próstata, en el hígado y en los tejidos óseo y adiposo. Este receptor tiene un rol predominante tanto en las glándulas mamarias y en el útero como en la preservación de la homeostasis ósea y en la regulación del metabolismo (Paterni, et al., 2014).

Conformación y dominios del ER α

El ER α pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que incluye a los receptores hormonales esteroideos (receptor de glucocorticoides GR, receptor de mineralocorticoides MR, receptor de progesterona PR, receptor de andrógenos AR y receptor de estrógenos ER), receptor de tiroideos y retinoides y el receptor de vitamina D. Estos receptores nucleares comparten una estructura modular conservada con diferentes dominios (figura 1).

El ARNm del ER α wt está compuesto por 8 exones codificantes (Bollig & Miksicek, 2016) y es traducido a una proteína de 595 aminoácidos (AA) donde la isoforma más abundante tiene un peso molecular aparente de 66 kDa (Fox, Liu, & Jordan, 2003).

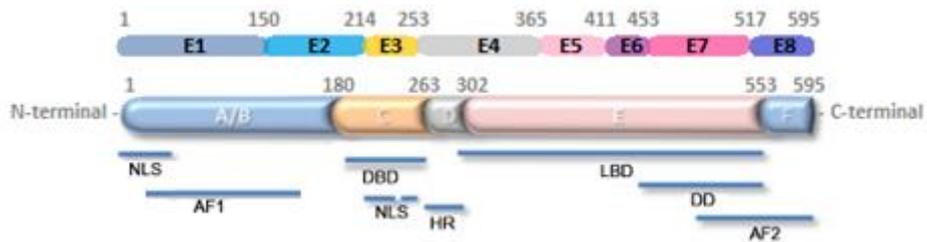


Figura 1. Estructura general del ER α , dominios funcionales y posición de sus exones (E1-E8). NLS, señal de localización nuclear; AF-1, función de activación independiente de ligando; DBD, dominio de unión al ADN; HR, región bisagra; LBD, dominio de unión a ligando; DD, dominio de dimerización y AF-2 función de activación dependiente de ligando. Adaptado de (May et al., 2014). NCBI Reference Sequence: NM_000125.3.

El dominio N-terminal A/B presenta una función de activación (AF-1) compuesta por 180 AA (Fox et al., 2003), codificada por el exón 1 y parte del exón 2 (Bollig & Miksicek, 2016). AF-1 es una región ligando-dependiente involucrada principalmente en interacciones proteína-proteína y en la activación transcripcional de genes blanco (Fox et al., 2003).

El dominio C (AA 181-263), codificado por los exones 2 y 3 (Bollig & Miksicek, 2016), funciona como el dominio de unión al ADN (DBD) que es la región más conservada entre la familia de receptores nucleares (figura 2). De los nueve residuos de cisteína presentes en el DBD, en ocho de ellos hay dos estructuras en dedos de zinc que son cruciales para la dimerización del receptor y la unión específica al ADN. Además el DBD comprende una región llamada caja-P compuesta por 6 AA (CEGCKA) situados hacia el extremo C-terminal del primer dedo de zinc. Esta región es crítica para el reconocimiento de la secuencia de ADN, llamada ERE (elementos de respuesta a estrógenos) constituida por la secuencia consenso 5'-GGTCAnnnTGACC-3'. Este motivo palindrómico permite la unión del receptor en forma dimérica al ADN. Existe otra región del DBD llamada caja-D situada hacia el extremo N-terminal del segundo dedo de zinc, que también contribuye a la unión sitio específica en el ADN. La dimerización hace que las interacciones de la caja-D establezcan la unión DBD-ERE (Fox et al., 2003).

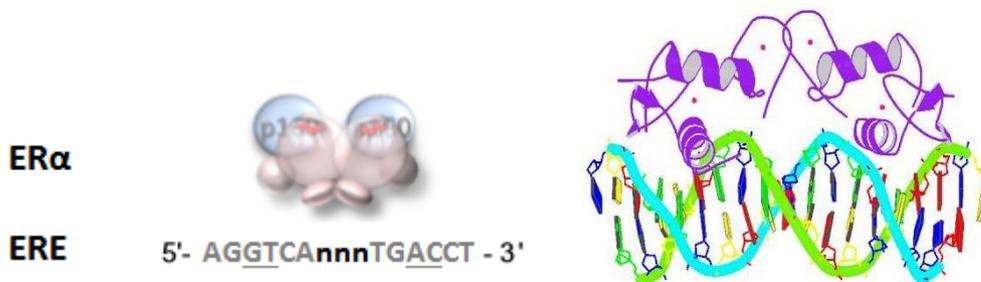


Figura 2. Elementos de respuesta a estrógenos en el ADN (EREs) reconocidos por el ER α (May et al., 2014) y representación tridimensional de la estructura cristalográfica del DBD del ER α en interaccionando con el ADN, código PDB 4AA6.

El dominio D (AA 264-302), codificado por el exón 4 (Bollig & Miksicek, 2016), es una región bisagra que interacciona con la chaperona Hsp90 (proteína del shock térmico de 90 kDa) que se asocia con el ER α en ausencia de ligando de forma inactiva y estable. En ausencia de Hsp90 el ligando puede unirse al receptor (Fox et al., 2003). Esta región presenta funciones regulatorias, y constituye un sitio donde se producen modificaciones post-traduccionales (acetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación) que resulta importante para la localización subcelular del receptor (incluye la secuencia de localización nuclear, NLS) (Casa, et al., 2015).

El dominio E o C-terminal de unión al ligando (LBD) (AA 303-552), codificado por los exones 4 al 8 (Bollig & Miksicek, 2016), es el más grande de los dominios del receptor y contiene regiones de reclutamiento de coactivadores/correpresores y la función de transactivación 2 (AF-2) independiente de ligando (figura 3). El LBD presenta 12 hélices- α que cuando el E2 se une se pliegan en 3 capas formando una cavidad hidrofóbica de hélices- α y 2 hojas- β anti paralelas (Fox et al., 2003).

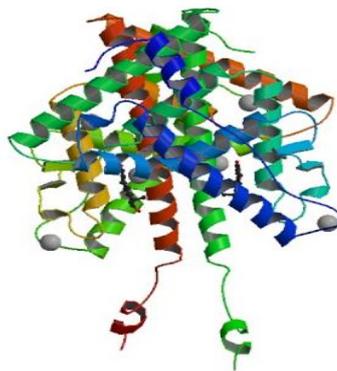


Figura 3. Representación tridimensional de la estructura cristalográfica del LBD del ER α en complejo con el E2. Código PDB 1A52.

El dominio F (AA 554-595) está implicado en la regulación diferencial de la transcripción sensible a estrógenos y antiestrógenos dependiente del tipo celular (Fox et al., 2003).

Existen otras 2 isoformas menos abundantes ER α 36 y ER α 46 de 36 y 46 kDa respectivamente. En ER α 36 tanto AF-1 como AF-2 se encuentran ausentes y los últimos 138 aminoácidos son reemplazados por una secuencia de 22 aminoácidos. ER α 46 no presenta los aminoácidos 1 a 173, región que incluye a AF-1. Ambas isoformas se caracterizan por tener efectos inhibitorios en la actividad del ER α (figura 4) (Jia, 2015).



Figura 4. Estructura general del ER α y dominios funcionales tanto de la proteína wild type de 66 kDa como de sus isoformas de 36 y 46 kDa (Jia, 2015).

La contribución de AF-1 o de AF-2 a la actividad del ER depende tanto del promotor como de la línea celular y del estadio de diferenciación celular. Una actividad transcripcional máxima del ER puede requerir ambos AF en algunas células, pero un AF específico en otras. Esto sugiere que el ER no interactúa con la maquinaria de transcripción de igual manera en todos los tipos celulares (Kerdivel, et al., 2013). Cuanto más diferenciada se encuentra una célula, la señalización ocurre a través del AF-1, mientras AF-2 se convierte en AF dominante involucrado en la actividad transcripcional del ER en células indiferenciadas (Penot et al., 2004). De acuerdo a esto, los contextos celulares son definidos como permisivos a AF-1 o a AF-2 dependiendo de qué AF se encuentra involucrado en la actividad del ER. La línea celular de hepatocarcinoma HepG2 es utilizada para medir la actividad de AF-1, mientras que la función AF-2 es estudiada en células HeLa que derivan de cáncer de cuello uterino. La diferencia en los fenotipos celulares es una de las características que permite explicar la preferencia por un AF dado. A pesar de su origen epitelial común, HeLa y HepG2 presentan una tasa de crecimiento y fenotipo muy diferentes. Las células HeLa muestran un fenotipo indiferenciado y proliferativo asociado a una morfología alargada y poca interacción célula-célula. Sin embargo, las células HepG2 presentan un fenotipo más diferenciado, estableciendo un gran número de contactos celulares (Fernández-calero et al., 2014).

Ligandos del ER α

Los estrógenos, especialmente el E2 controlan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales de las glándulas mamarias. Además de su rol en la fisiología del cuerpo humano, el ER α está asociado a procesos patológicos humanos como cáncer de mama dependiente de estrógenos. Aproximadamente el 70% de los cánceres de mama diagnosticados expresan ER α (ER α +), el cual media los efectos mitogénicos dependientes de E2. Los tumores mamarios que expresan ER α son generalmente más diferenciados y menos invasivos que los tumores ER α - (Kerdivel et al., 2014).

La proliferación de células cancerígenas ER α + puede reprimirse con moléculas anti estrogénicas como el tamoxifeno (usado en terapia hormonal). Por este motivo la expresión del ER α se encuentra generalmente asociada con un buen pronóstico. Con el tiempo, los tumores mamarios ER α + pueden escaparse del control hormonal haciéndose resistentes a la terapia hormonal y transformándose a partir de un fenotipo epitelial bien diferenciado en uno agresivo y metastático. Las células resistentes a la terapia hormonal, exhiben frecuentemente

una pérdida en la actividad o expresión del ER α mientras que la actividad de señalización del receptor de crecimiento aumenta (Kerdivel et al., 2014).

Vías de señalización del ER α

El ER α puede interactuar a través de diferentes mecanismos (figura 5) (Fernández-calero, et al., 2016). En la vía genómica clásica se une directamente al ADN a través de los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) situados en los promotores de los genes que responden a estrógenos (Fernández-calero et al., 2014). El ligando natural del ER α es el 17 β -estradiol (E2) que es sintetizado a partir del colesterol siendo una molécula hidrofóbica capaz de entrar a la célula y al núcleo por difusión. En ausencia del ligando el receptor es secuestrado en el núcleo celular unido a un complejo inhibitorio de chaperonas/proteínas del shock térmico (hsp) como Hsp70 y Hsp90. En este mecanismo llamado "clásico", la unión del E2 induce cambios conformacionales en la estructura terciaria del receptor llevando a la disociación del complejo chaperonas/hsp, luego a la dimerización del receptor unido al E2 en la región reguladora de los genes blanco y finalmente al realineamiento de las 12 hélices- α sobre el E2 unido al LBD para formar una hendidura hidrofóbica con residuos expuestos que sirven como sitio de unión a los coactivadores. Dichos coactivadores interactúan con el ligando unido al receptor y promueven la transcripción del gen a través del remodelado de la cromatina y promoviendo la accesibilidad a la región promotora donde se encuentran los ERE para facilitar el reclutamiento de la ARN polimerasa II, de la actividad acetil-transferasa y el contacto con la maquinaria general de transcripción. Así el ligando específico unido, controla la activación del gen regulado por el receptor no solo por la influencia de la unión en sí, sino también por el grupo de coactivadores que se unen al ER (Bjo, 2016; Fox et al., 2003; Peng & Obe, 2006)

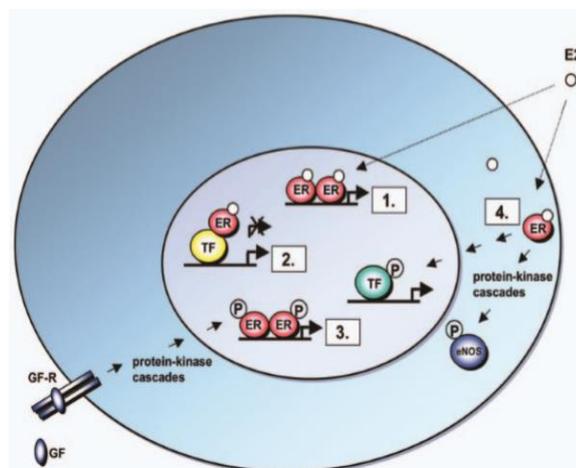


Figura 5. Esquema de los mecanismos de señalización del ER α . 1. Mecanismo clásico de la acción del ER α donde el complejo nuclear ER α unido a E2 se une directamente a EREs en los promotores de sus genes blanco. 2. Acciones genómicas independientes de ERE donde el complejo de ER α -E2 nuclear se une a un complejo de factores de

transcripción (TF) a través de interacciones proteína-proteína que contactan el promotor de los genes blanco. **3.** Acciones genómicas independientes de ligando donde los factores de crecimiento (GF) activan cascadas de protein-quinasas dando lugar a la fosforilación (P) y la activación nuclear del ER α en los EREs. **4.** Acciones no genómicas donde complejos de membrana del ER α unido al E2 activan cascadas de protein-quinasas, dando lugar a funciones alteradas de proteínas en el citoplasma como la activación de eNOS o la regulación de la expresión génica a través de P y activación de un TF (Bjo, 2016).

En la vía genómica no clásica el ER α interactúa con otros factores de transcripción como AP1 (proteína de activación) o Sp1 (proteína de especificidad) y regula la expresión génica sin unirse directamente al ADN, de manera ERE independiente (Fernández-calero et al., 2014). Para activar estos genes no regulados por ERE, el E2 unido al receptor puede unirse directamente a los elementos específicos en la región promotora de estos genes o puede unirse indirectamente a sus elementos de respuesta mediante interacciones con proteínas mediadoras que hacen que el ER se una al promotor. El ER α puede activar la transcripción génica a través de elementos AP-1 en la región promotora de los genes blanco (como el factor de crecimiento tipo insulina IGF-1). La activación de AP-1 ocurre cuando el extremo N-terminal del receptor interactúa con el complejo Fos/Jun en los sitios AP-1, luego de la unión del ligando. La activación de genes blanco del ER también ocurre a través del complejo del ligando unido al receptor y el factor de transcripción Sp1 en sitios ricos en GC de las secuencias promotoras. Otro ejemplo de activación génica independiente de ERE ocurre mediante la interacción del ER α con el factor nuclear- κ B (NF- κ B) inhibiendo la expresión del gen de interleuquina 6 (Bjo, 2016; Fox et al., 2003; Peng & Obe, 2006).

La señalización dependiente de estrógenos resulta no solo en la translocación del ER α al núcleo para que se una directa o indirectamente a elementos de transcripción en el ADN, sino en la translocación del ligando unido al ER hacia la membrana plasmática. La existencia del ER α asociado a la membrana está relacionada a procesos celulares rápidos como la generación de AMPc y el flujo de calcio, cascadas de fosforilación, activación de protein-quinasas (Fernández-calero et al., 2014)

El receptor también actúa a través de un mecanismo no genómico en el cual modula la actividad de quinasas que son capaces de regular la transcripción génica y la actividad de otras proteínas (Fernández-Calero et al., 2016). En ausencia del E2, la activación del ER α independiente de ligando ocurre a través de vías de señalización que activan al receptor mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina en AF-1 y AF-2. La fosforilación aumentada del ER α genera la dimerización del receptor, el reclutamiento de coactivadores o correpresores y los efectos agonistas o antagonistas de la activación génica dependiente del

ER α . Esta vía de activación provoca la interacción entre diferentes vías de señalización, como la vía de factores de crecimiento EGF/EGFR, vías que regulan los niveles de fosforilación celular como PKA y PKC, IGF/receptor de insulina, entre otras. Por ejemplo el mecanismo de activación mediante la interacción EGFR-ER ocurre por la señalización del EGF al EGFR para que active la cascada de fosforilación a través de MAPK y Erk lo que resulta en la fosforilación de serinas en el AF-1 y la subsiguiente transactivación del ER α (Bjo, 2016; Fox et al., 2003; Peng & Obe, 2006).

Vía de señalización de actina/MKL1

Entre los mecanismos moleculares involucrados en la pérdida de respuesta hormonal, el factor de transcripción relacionado a la miocardina MKL1 (leucemia megacarioblástica, también denominado MRTF-A, MAL o BSAC) tiene un rol en la progresión del cáncer como promotor o supresor tumoral dependiendo del contexto celular. MKL1 fue descrito por primera vez como un coactivador del factor de respuesta al suero (SRF) en el control de funciones celulares motiles o contráctiles, especialmente durante la diferenciación de miocitos cardíacos o células musculares lisas de la vasculatura, migración neuronal o metástasis (Kerdivel et al., 2014).

MKL1 se desplaza continuamente entre el núcleo y el citoplasma vía un proceso controlado por la actina globular (actina-G) celular. La importación nuclear de MKL1 se encuentra regulada por la actividad de la proteína RhoA sobre la dinámica de la actina. MKL1 puede quedar secuestrada por la actina-G de forma inactiva en el citosol pero esto puede revertirse por la polimerización de la actina-G en actina filamentosa (actina-F), proceso inducido por RhoA. Además la actina-G nuclear facilita la exportación nuclear de MKL1. Si bien la localización y la actividad de MKL1 son procesos controlados por la actina-G, ambos son independientes entre sí. En células tipo epiteliales, la vía de señalización de actina/MKL1 se encuentra activada por la pérdida de uniones célula-célula que ocurre durante la transición epitelio-mesenquimal (EMT). Además la vía de señalización Rho/actina/MKL1 forma parte del control de la actividad transcripcional del ER α (figura 6) (Flouriot et al., 2014; Kerdivel et al., 2014).

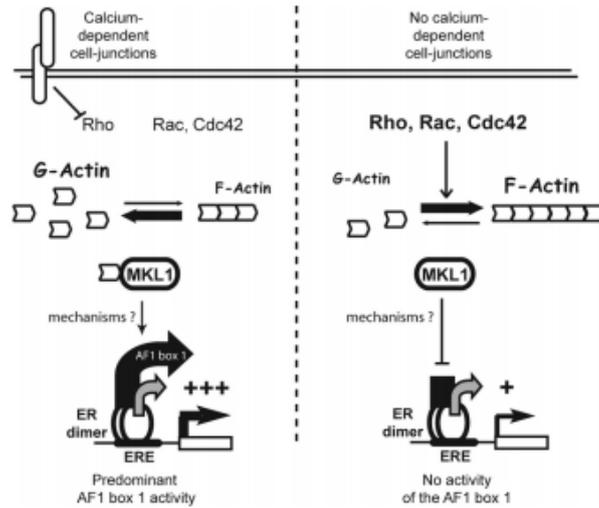


Figura 6. Modelo integrativo de la regulación de la actividad transcripcional del ER α por MKL1. Células epiteliales diferenciadas expresan proteínas involucradas en contactos dependientes de calcio como E-cadherinas. En estas células, el establecimiento de dichos contactos produce una disminución en la actividad de Rho GTPasas, que desplaza el equilibrio entre la actina G y F hacia la generación de un pool de actina-G. Esta forma de actina interacciona con MKL1 que en este caso promueve la actividad transcripcional del ER α potenciada por la actividad de la caja 1 del AF-1. En contraste, en células no diferenciadas que sufrieron la EMT, la elevada actividad de Rho GTPasas desencadena la polimerización de la actina, la cual reduce la cantidad de actina-G presente en estas células. La actina no unida a MKL1 inhibe la actividad de la caja 1 de AF-1 y debilita la potencia de transactivación del ER α (Huet, et al., 2009)

Las líneas celulares tumorales que expresan el ER α presentan un contexto celular permisivo a AF-1 mientras que células tumorales permisivas a AF-2 son siempre ER α -. Además, la expresión estable de un ER α funcional en un células estrictamente permisivas a AF-2 restablece un contexto celular sensible a AF-1. La eficiencia de transactivación del ER α depende fuertemente del estado funcional de MKL1. La inhibición de la actividad de MKL1 favorece la transactivación del ER α vía AF-1 mientras que la activación de MKL1 silencia la actividad del AF-1, reduciendo drásticamente la eficiencia de transactivación del ER α el cual pasa a actuar exclusivamente vía AF-2 (Flourirot et al., 2014; Kerdivel et al., 2014).

En líneas celulares de cáncer de mama que expresan el ER α endógeno, MCF-7, es posible estudiar el impacto de MKL1 generando subclones estables de la línea celular. Dichos subclones se logran mediante la sobreexpresión de la forma wt (rotulada como ZB) y mutantes de MKL1 en las células. El mutante MKL1 Δ N200 (rotulado como D+) presenta una delección en los motivos RPEL en el extremo N-terminal, que son críticos para la unión a actina. El mutante MKL1 Δ C301 (rotulado como D-) tiene una delección en el dominio C-terminal de transactivación y se comporta como una forma negativa en la regulación de sus genes blanco (figura 7) (Huet et al., 2009).

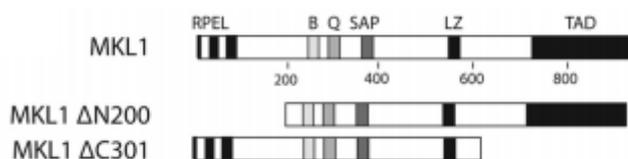


Figura 7. Representación esquemática de MKL1 wt y sus mutantes deletados con los dominios funcionales. La región N-terminal de MKL1 contiene motivos RPEL que median la unión a actina. La región central de la proteína contiene dominios sucesivos básicos (B), ricos en glutamina (Q), proteínas SAF-A/B, Acinus y Pias (SAP) y cremallera de leucina (LZ). Los 300 aminoácidos C-terminales conforman un dominio de transactivación (TAD) (Huet et al., 2009).

La vía de señalización de actina/MKL1 está involucrada en la proliferación de células ER α - que han sido sometidas a la EMT en contraste con las líneas celulares diferenciadas ER α +. La activación de MKL1 induce el escape hormonal del crecimiento celular y esta pérdida de respuesta al E2 es concomitante con la inhibición de la expresión del ER α y con el aumento de la señalización del factor de crecimiento (Kerdivel et al., 2014)

Variantes de splicing del ER α

El ARNm del ER α de células y tejidos que responden a estrógenos, incluyendo tumores mamarios, se expresa típicamente como una mezcla de transcritos. Esta heterogeneidad resulta de un patrón de splicing alternativo que da lugar a una familia de ARNm del ER α correctamente procesados y con ausencia de exones que se traducen en una proteína de tamaño completo y en variantes funcionales (Bollig & Miksicek, 2016).

Entre 30 y 70% de los pacientes con tumores ER α + que responden a una terapia endócrina, desarrollan resistencia durante el tratamiento a pesar de la continua expresión del ER α en sus tejidos. Estos resultados indican que existen otros mecanismos aparte de la pérdida de la expresión del ER α que hacen posible esta resistencia (Al-bader et al., 2010; Kurebayashi et al., 2000).

La expresión del ER α se encuentra regulada a nivel transcripcional (metilación del promotor, presencia de vitamina D y presencia de progesterona y estrógenos), post transcripcional (microARNs) y post traduccional (ubiquitinación, acetilación, s-nitrosilación y fosforilación). Entre los principales mecanismos de regulación se encuentran las variantes de splicing que presentan efectos negativos en la funcionalidad del ER α . En las células se encuentran mayoritariamente aquellas en las que se deletan exones como ER Δ E3, ER Δ E5, ER Δ E6 y ER Δ E7 (figura 8) (Kundu, et al., 2015).

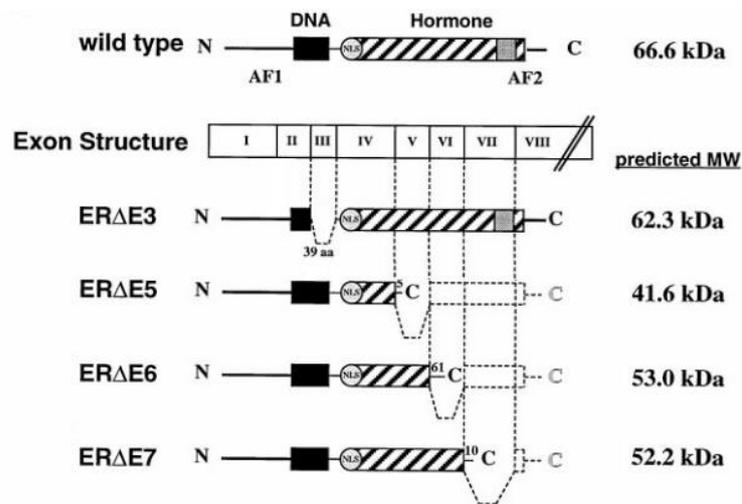


Figura 8. Variantes de splicing del ARNm del ER α . Se muestran los dominios funcionales del receptor y la secuencia de exones de la cual derivan. Las variantes corresponden a deleciones de exones (Bollig & Miksicek, 2016).

El crecimiento tumoral mamario parece ser dependiente de hormonas en los primeros estadios y por ende inhibido con anti estrógenos. Sin embargo, como se mencionó antes, a veces los tumores desarrollan una fase de crecimiento independiente de hormonas que se vuelve insensible a los antagonistas hormonales (Pfeffer, et al., 1995). Estudios en cáncer de mama ER α - demostraron que son negativos para el ER α wt pero pueden expresar variantes de splicing del ER α que juegan un rol crucial en el desarrollo de la enfermedad, indicado por su alto nivel de expresión en tejidos malignos (Al-bader et al., 2010; Al-bader, et al., 2011). Como causas a este mecanismo se propusieron: heterogeneidad tumoral y selección clonal de células ER α -, inhibición de la expresión o mutaciones del ER α , alteraciones del metabolismo o una regulación alterada de los genes que responden a estrógenos. Otra explicación posible es la presencia de estas variantes del receptor que funcionan como factores de transcripción independientes de hormonas (Pfeffer et al., 1995).

El splicing alternativo del ER α es una característica común de los mensajeros derivados de genes que codifican para miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Por lo tanto, las variantes tienen un rol fisiológico en la célula, siendo este mecanismo la regla más que la excepción (Pfeffer et al., 1995).

El ER Δ E3 es una variante de splicing del ER con ausencia del exón 3 que codifica el segundo dedo de zinc del DBD. Esta variante resulta en una proteína con una deleción interna a la cual le falta una porción mayor del DBD (Bollig & Miksicek, 2016) que se comporta como un factor de transcripción negativo (Pfeffer et al., 1995) ya que previene que la proteína forme complejos específicos con EREs suprimiendo la actividad transcripcional inducida por

estrógenos (Al-bader et al., 2010). Si bien ERΔE3 es incapaz de unirse por sí solo a motivos ERE, previene que el ERα wt se una al ADN ya que tiene el dominio de dimerización inducible por hormonas que le permite formar dímeros con el ERα wt que lo hacen ineficiente para unirse de manera estable al ADN (Bollig & Miksicek, 2016). Sin embargo retiene su LBD y NLS permitiendo la unión a la hormona con una afinidad similar al ERα wt. Su translocación al núcleo le permite activar la transcripción en promotores que presentan sitios AP-1 (5'-TGAG/CTCA-3'), con o sin un sitio o medio sitio ERE (5'-GGTCA-3' o 5'-TGACC-3') (Bollig & Miksicek, 2016; Kundu et al., 2015).

ERΔE5 es otra variante de splicing con ausencia del exón 5 dando lugar a un receptor truncado al cual le falta el extremo N-terminal del LBD, pero que presenta AF-1 y la habilidad de unirse al ADN mediante su DBD. (Al-bader et al., 2010). Además retiene el NLS lo que permite su translocación al núcleo (Bollig & Miksicek, 2016). Las variantes que codifican proteínas a las cuales les falta todo o parte de su LBD son activadores constitutivos de transcripción que dan lugar al crecimiento tumoral independientemente de la presencia hormonal (Pfeffer et al., 1995), produciendo un efecto mitogénico en células de cáncer de mama en ausencia de E2 o en presencia de tamoxifeno. Esto está relacionado con la adquisición de resistencia al efecto antiestrogénico de ligandos, en tumores y líneas celulares que responden a estrógenos. El ERΔE5 presenta una función inhibitoria que lo hace parcialmente ineficiente para unirse al ADN o activar la transcripción a través de EREs, esto resulta de una competencia con el ERα wt por la interacción con coactivadores u otros factores celulares (Bollig & Miksicek, 2016). Además reprime la transcripción por parte del ERα wt (Pfeffer et al., 1995).

ERΔE6 es una variante de splicing a la cual le falta el exón 6 y se encuentra particularmente en el tejido de cáncer de mama y en la línea celular ERα+, MCF-7. Esta delección resulta en la pérdida de LBD y el dominio de dimerización (Al-bader et al., 2010).

La variante más observada en tejidos y células de cáncer de mama es ERΔE7 a la cual le falta el exón 7. ERΔE7 es capaz de formar heterodímeros con ERα wt independientemente de la presencia de ligando resultando en un efecto dominante negativo en ERα wt (Al-bader et al., 2010).

El nivel de expresión de las variantes está relacionado con la progresión tumoral en estadios tardíos en la transición desde una fase dependiente de hormonas a una fase de crecimiento independiente de hormonas resistente a anti estrógenos (Pfeffer et al., 1995).

Si las variantes de splicing son traducidas para generar proteínas, una única célula tendría una gran combinación de variantes del ER, dando lugar a factores de transcripción dominantes tanto positivos como negativos. Por otro lado, es probable que las variantes proteicas del receptor presenten alteraciones de su plegamiento, de la dimerización, la interacción con proteínas chaperonas u otros factores celulares y que se vea afectada su distribución celular, su funcionalidad, o que sean rápidamente degradadas (Pfeffer et al., 1995).

La detección de las variantes del ER α podría proveer parámetros adicionales en relación al diagnóstico, el pronóstico y a la respuesta de la terapia en el cáncer de mama (Al-bader et al., 2010).

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de este proyecto es contribuir al conocimiento de la activación transcripcional del ER α y el rol de AF-1 y AF-2 en las líneas celulares HeLa y HepG2 y determinar la presencia de variantes del ER α y su reconocimiento diferencial en células derivadas de MCF-7.

Objetivos Específicos

- Determinar la actividad transcripcional del ER α wt y ER $\alpha\Delta$ 115 mediante ensayos de transfección transitoria en las líneas celulares HeLa y HepG2
- Analizar la presencia de variantes de splicing del ER α endógeno mediante RT-PCR en las líneas celulares derivadas de MCF-7
- Estudiar el reconocimiento diferencial del ER α mediante WB en extractos celulares de las líneas celulares derivadas de MCF-7

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular, transfección y tratamientos

Para comparar la actividad transcripcional del ER α Δ N115 en comparación al ER α wt se trabajó a lo largo de todos los ensayos propuestos con las siguientes líneas celulares humanas: HeLa (N° de catálogo ATCC CCL-2) derivada de adenocarcinoma de endometrio uterino, HepG2 (N° de catálogo ATCC HB-8065) derivada de carcinoma hepatocelular las cuales no expresan el ER α funcional (ER α -). Para estudiar las diferentes variantes y el reconocimiento diferencial del ER α se trabajó con la línea celular MCF-7 (N° de catálogo ATCC HTB-22) derivada de adenocarcinoma mamario que expresan el ER α funcional (ER α +), esta línea expresa la forma WT (MCF-7 ZB) del gen MKL1. Las líneas derivadas de MCF-7, expresando formas mutantes del gen MKL-1 (Δ N200 o D+ y Δ C301 o D-) fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Gilles Flouriot (Kerdivel et al., 2014). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

Las transfecciones de las células HeLa y HepG2 se realizaron empleando jetPEI (Polyplus) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello se sembraron 1x10⁵ células en placas de 24 pocillos en un volumen final de 0,5 mL por pocillo el día previo a la transfección. Las mismas fueron transfectadas con 50 ng de una construcción plasmídica (vector pSG5) conteniendo una secuencia que codifica para las diferentes proteínas del ER α . El vector pSG5-ER α wt codifica para la proteína ER α wt y el vector pSG5-ER α Δ 115 para ER α Δ 115. Este último fue producido mediante mutagénesis sitio dirigida (tabla 1)

Tabla 1. Cebadores utilizados para la mutación sitio dirigida

	Cebador forward	Cebador reverse
ER α Δ 115	5'-GGCCACGGACCATGCAGCTGTCGCCTTT-3'	5'-AAAGGCGACAGCTGCATGGTCCGTGGCC-3'

Para los ensayos de gen reportero, las células fueron co-transfectadas con 100 ng de un “plásmido reportero” que contiene la secuencia del promotor timidin-kinasa controlando la expresión de la enzima Luciferasa. Cuando se analiza la actividad transcripcional del ER α a través de la vía clásica mediante EREs (elementos de respuesta a estrógenos), el vector usado es ERE-tk-Luc cuyo promotor contiene los EREs se encuentra clonado en el vector pGL13. Para obtener un control de transfección y normalizar la actividad de la Luciferasa se incluye en la transfección 100 ng plásmido pCMV SPORT- β gal que contiene el gen de la enzima β -

Galactosidasa bajo el control de un promotor CMV. (Fernández-calero et al., 2014; Kerdivel et al., 2014)

Transcurridas las 24 horas de la transfección, las células son tratadas por otras 24 horas con el ligando 17 β -estradiol (E2) (Sigma-Aldrich) o con etanol (utilizado como control). Se utilizaron las siguientes concentraciones del E2: 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-8} M, manteniendo siempre un volumen final de 0,5 mL por pocillo. Previo al tratamiento con el E2 o con el EtOH se cambia el medio de cultivo a las células por un medio de transfección DMEM sin rojo fenol (Gibco) suplementado con 2.5% de suero charcoal-stripped, L-glutamina y Piruvato de sodio (Sigma-Aldrich). El suero charcoal stripped se encuentra depletado de componentes lipídicos incluyendo hormonas, retinoides y ligandos ácidos grasos de receptor de transcripción nucleares. Es necesario utilizar este suero como medio de transfección para que estos compuestos no interfieran en el experimento (Fernández-calero et al., 2014).

Los experimentos de actividad en la transcripción fueron realizados por triplicado para obtener un análisis estadístico válido de los resultados.

Las líneas celulares derivadas de MCF-7 fueron seleccionados en un medio (DMEM con rojo fenol + 10% de SFB) conteniendo antibióticos selectivos: 5 μ g/mL de Blastidina y 100 μ g/mL de Zeocina (Invitrogen) para mantener la presión de selección. La inducción de la expresión de los clones wt y mutantes de MKL-1 fue realizada con 1 μ g/mL de tetraciclina (Sigma-Aldrich) durante 48 horas a 37°C. Para ello se sembraron 1×10^6 células en 2 botellas de 25 cm² (tratadas con y sin E2) en un volumen final de 5 mL el día previo a la inducción (Kerdivel et al., 2014).

Transcurridas las 24 horas de la inducción, las células son tratadas por otras 24 horas con el ligando E2 con una concentración final de 1×10^{-8} M o con etanol (utilizado como control), manteniendo siempre un volumen final de 5 mL por botella. Previo al tratamiento de inducción se cambia el medio de cultivo a las células por el medio de transfección DMEM sin rojo fenol suplementado con 2.5% de suero charcoal-stripped, L-glutamina y Piruvato de sodio.

Medida de actividad transcripcional

Para el análisis de actividad, se realizaron transfecciones con un gen reportero. Las células fueron transfectadas como fue descrito anteriormente, y 48 horas luego de la transfección se obtuvieron los lisados celulares. Para ello, se removió el medio de cultivo, se realizaron dos

lavados con PBS 1X, y se colectaron las células en Reporter Lysis Buffer (RLB 1X) (Promega), compatible con la detección tanto de la actividad de la Luciferasa como de la β -Galactosidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se almacenaron a -80°C por lo menos durante 1 hora. El lisado celular se transfirió a un tubo estéril de polipropileno y se centrifugó a $6000g$ por 5 min a 4°C . El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y limpio y a partir del mismo se realizaron los ensayos de actividad (figura 1).

Los lisados celulares fueron preparados para medir actividad Luciferasa y β -galactosidasa mediante detección de luz o coloración debida a una reacción enzimática con los sustratos correspondientes. La actividad de ambas enzimas en los distintos extractos fue medida utilizando el kit Luciferase Assay System (Promega) y con el sustrato de la β -Galactosidasa en placas de 96 pocillos.

Para el ensayo de Luciferasa se agregó 10-20 μL de los lisados de HeLa/HepG2 por pocillo en una placa oscura de 96 pocillos. Es fundamental no usar placas transparentes debido a que la señal de luminiscencia de los pocillos adyacentes podría interferir con la señal que está siendo medida. Luego se agregó 40 μL /pocillo del reactivo de Luciferasa y se midió inmediatamente en un luminómetro la luz producida. Es importante optimizar para cada experimento el tiempo de lectura y el retraso en cada medida para lograr una óptima intensidad de luz y no tener interferencia entre las medidas. El tiempo de espera es típicamente 2 segundos y el tiempo de lectura de 10. Como la intensidad de la luz en la reacción decae lentamente, no es recomendable medir la actividad Luciferasa de muchas muestras al mismo tiempo. Cuando se procesan varias muestras, el reactivo de Luciferasa deberá ser agregado a unas pocas para medir la intensidad de luz.

Para el ensayo de β -galactosidasa se agregó 60 μL del sobrenadante del lisado a cada pocillo de una placa transparente de 96 pocillos. Luego se agregó 200 μL del mix con el sustrato para el ensayo de β -galactosidasa a cada pocillo. A su vez 200 μL mix con dicho sustrato fueron agregados a 3 pocillos vacíos para usar como blanco del experimento. Se incubó la placa hasta que apareciera un color levemente amarillo, se detuvo la reacción con carbonato de calcio y se midió en un lector de placas la absorbancia de la microplaca a 405 nm. El tiempo transcurrido para el desarrollo del color amarillo varía entre líneas celulares. La coloración en los lisados del HeLa es inmediata mientras que en los de HepG2 los lisados deben incubarse por lo menos durante 2 horas a 37°C para la aparición del color amarillo. (En el anexo se especifican los componentes de la reacción de B-gal)

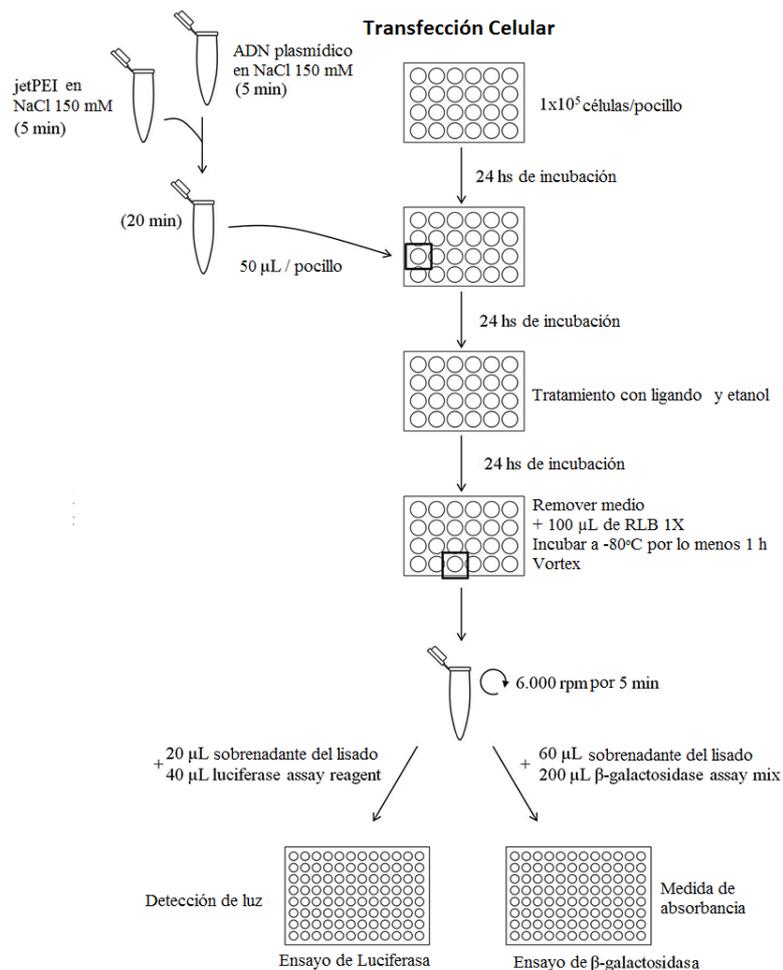


Figura 1. Esquema representativo de la transfección celular. (Fernández-calero, Flouriot, & Marín, 2016.)

Actividad

Se determinó la actividad de la galactosidasa restando la media de las muestras blanco a cada una de las demás muestras. La actividad Luciferasa fue normalizada con la actividad galactosidasa en cada muestra. Luego se expresó la actividad Luciferasa normalizada como las veces que aumenta cada valor sobre el valor promedio medido con el vector vacío tratado con etanol. Finalmente se computó la actividad promedio y la desviación estándar para cada condición.

Extracción de ARN y síntesis de ADN copia

Para evaluar si existen diferentes variantes de splicing del ER α en la línea MCF-7 (MCF-7 ZB, MCF-7 D+ y MCF-7 D-) se realizó la extracción de ARN utilizando el kit RNeasy (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido fue cuantificado mediante Nanodrop (Thermo Scientific) y tratado con ADNasa RQ1 libre de ARNasas para eliminar todo el ADN genómico. Posteriormente 4 µg de este ARN fueron utilizados para la síntesis de ADN

copia (ADNc). Para ello se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukaemia Virus) y Random Hexamers como cebadores (Invitrogen).

PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Una vez obtenido el ADNc de las líneas celulares MCF-7 se evaluó la presencia de las siguientes isoformas mediante RT-PCR: $\Delta 3$, $\Delta 5$ y $\Delta 6+7$. Se empleó como molde el vector pSG5-tk-ERE-Luc como control positivo para cada par de cebadores. Se emplearon los oligos GAPDH para confirmar la RT.

Los cebadores específicos empleados fueron diseñados según la bibliografía (Al-bader, Ford, Al-ayadhy, & Francis, 2011) y sus secuencias se encuentran en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Cebadores utilizados para las amplificaciones por PCR con transcriptasa reversa.

Variante	Cebador forward	Cebador reverse
$\Delta 3$	5'-ATGGAATCTGCCAAGAAGACT-3'	5'-GCGCTTGTGTTTCAACATTCT-3'
$\Delta 5$	5'-CTCATGATCAAACGCTCTAAG-3'	5'-ATAGATTTGAGGCACACAAAC-3'
$\Delta 6+7$	5'-GCTCCTAAGTCTCTTGG-3'	5'-ACGGCTAGTGGGCGCATGTA-3'
GAPDH	5'- ACCACCAACTGCTTAGCACC-3'	5'- CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3'

Los productos de RT-PCR fueron posteriormente analizados mediante electroforesis para ácidos nucleicos en geles de acrilamida al 5% y teñidos mediante tinción con nitrato de plata (ver Anexo).

Western Blot (WB)

Para llevar a cabo los análisis mediante WB, 48 horas luego de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con PBS y colectadas en buffer de carga de proteínas 1X (ver Anexo). Se las colocó durante 10 minutos en el termoblock a 95°C. Posteriormente fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE), en geles de acrilamida al 12% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. La membrana es luego bloqueada a 4°C durante toda la noche (overnight, ON) en solución de bloqueo (5% leche en polvo descremada en buffer TBS-T, ver anexo). A continuación la membrana es incubada con el anticuerpo primario, diluido en TBS-T, de acuerdo a la dilución correspondiente (ver Tabla X) durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 5 lavados de 5 minutos en TBS-T con agitación, para luego incubar la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa, diluido en TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan 5 lavados de 5

minutos en TBS-T con agitación y se procede al revelado con el reactivo comercial ECL (Thermo Scientific). Los anticuerpos utilizados y las diluciones empleadas se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot. Se detallan las diluciones empleadas así como el origen de los mismos

Anticuerpo	Dilución utilizada	Origen	Epítotope	Características
<u>Anticuerpos primarios</u>				
α -ER α (ER1D5)	1:1000	Ratón	N-terminal	Monoclonal
α -ER α (2q418)	1:500	Ratón	AA 494-595	Monoclonal
α -ER α (H-184)	1:500	Ratón	AA 2-185	Policlonal
α -ER α (F-10)	1:200	Ratón	AA 570-595	Monoclonal
α -Tubulina- β	1:2000	Ratón		Monoclonal
<u>Anticuerpos secundarios</u>				
α -IgG de ratón	1:2500	Cabra		

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Con el fin de cumplir los objetivos planteados en este trabajo se presentarán a continuación los resultados discutidos. Para determinar la actividad transcripcional del ER α wt y ER α Δ 115 se realizaron ensayos de transfección transitoria y de gen reportero en las líneas celulares HeLa y HepG2. Para analizar la presencia de variantes de splicing del ER α y estudiar el reconocimiento diferencial del ER α se realizaron RT-PCR y ensayos de wb, respectivamente, de las líneas celulares derivadas de MCF-7.

Cultivo celular

Para la realización de este proyecto se puso a punto el cultivo de las líneas celulares HeLa, HepG2 y MCF-7 (ZB, D+ y D-) y de las condiciones necesarias para su transfección. Estas células presentan diferentes características, como se describen en la Introducción, por ejemplo en cuanto a su morfología, patrón de crecimiento, eficiencia de transfección, entre otras.

Las células HeLa presentaron un crecimiento rápido y con distribución homogénea lo que permitió alcanzar su confluencia total. Además presentaron una viabilidad celular cercana al 100%. Como se reporta en la bibliografía (Andronikou et al., 2000), esto permitió obtener una buena eficiencia de transfección. Por otro lado las células HepG2 crecieron más lentamente y no lograban alcanzar la confluencia ya que no crecían aleatoriamente, sino que lo hacían por parches unas sobre las otras. Además a diferencia de las HeLa, presentaron menor viabilidad celular (del orden del 70%). Esta característica impidió obtener una buena eficiencia de transfección, tal como se reporta (Andronikou et al., 2000) (figura 1).

La viabilidad celular se determinó mediante la exclusión del azul de tripán. Así, las células vivas se ven como células sin teñir, ya que excluyen el colorante debido a la resistencia de su membrana. Por el contrario, las células muertas tienen una membrana desestabilizada, y por tanto permiten el ingreso del colorante, obteniéndose como resultado células teñidas de color azul (Quintero et al., 2013).

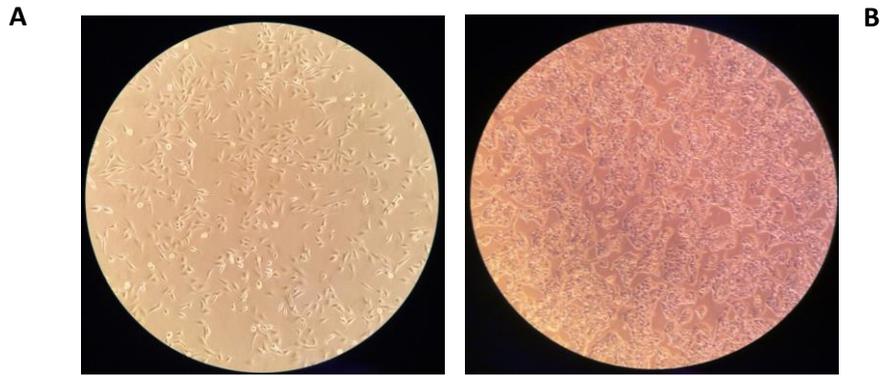


Figura 1. A. Células HeLa y **B.** HepG2 en DMEM + 10% SFB. Aumento 100X.

Las células MCF-7 ZB presentaron un rápido crecimiento en comparación con las MCF-7 D+ y D-. El crecimiento de las 3 sublíneas celulares fue en parches pero en este caso, no crecían unas células encima de otras. Cuando se las indujo con tetraciclina para lograr el fenotipo deseado, las ZB presentaron menor mortalidad que las D+ y D- que tuvieron un patrón de mortalidades similar (figura 2).

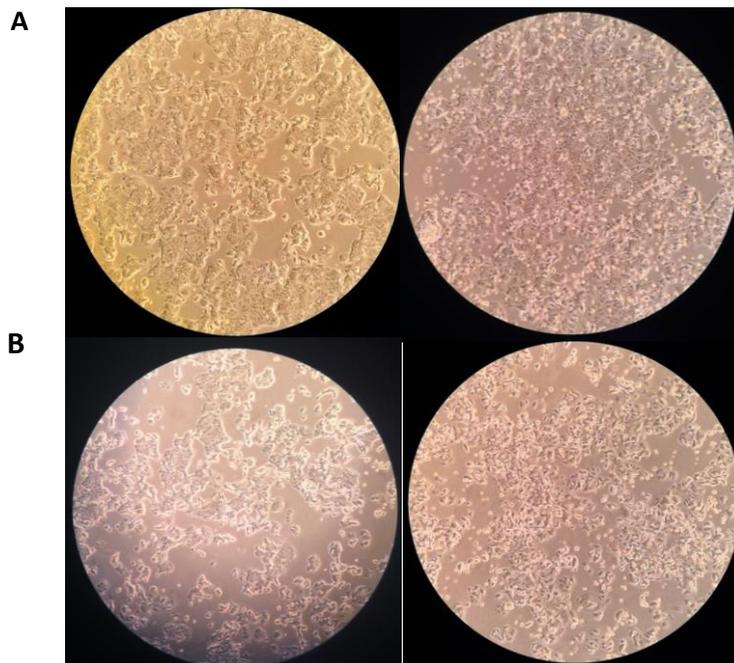


Figura 2. A. Izquierda Células MCF-7 ZB en DMEM + 10% SFB previo a la inducción con tetraciclina. **2. A. Derecha** Células MCF-7 ZB en DMEM + 10% SFB Al día siguiente de la inducción con tetraciclina. **2. B Izquierda** Células MCF-7 D+ en DMEM + 10% SFB previo a la inducción con tetraciclina. **2. B Derecha** Células MCF-7 D+ en DMEM + 10% SFB al día siguiente de la inducción con tetraciclina. Aumento 100X.

Eficiencia de transactivación en HeLa y HepG2

Se estudió la influencia de la ausencia de AF-1 en la eficiencia de transactivación del ER α en respuesta a concentraciones crecientes de E2, evaluando la funcionalidad de la proteína mediante la determinación de la actividad transcripcional utilizando un gen reportero. Para ello se empleó una construcción que contiene la secuencia codificante de la enzima Luciferasa bajo el control de la región promotora de la timidin-kinasa y un sitio EREs corriente arriba del promotor. La eficiencia de transactivación fue analizada mediante experimentos de transfecciones transitorias del ER α wt y del ER α Δ 115 (delección de los primeros 115 aminoácidos) y de los plásmidos reportero y normalizador en las células HeLa y HepG2 (figura 3).

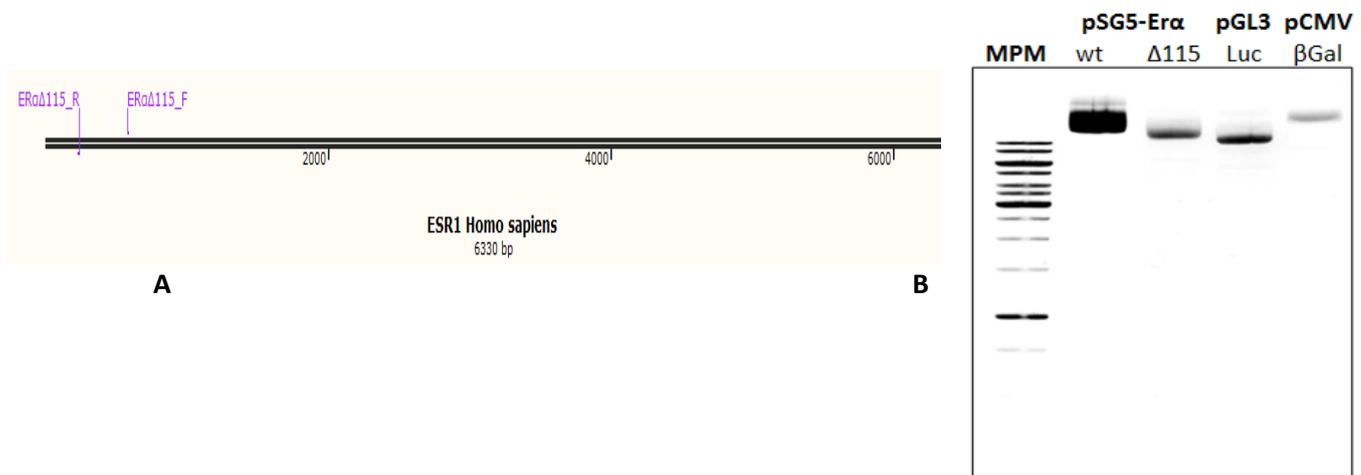


Figura 3. A. Secuencia codificante del gen ESR1 que codifica para el ER α con los sitios de unión a los oligos ER α Δ 115 **B.** Gel de Agarosa al 1% de los plásmidos para transfectar células. En el carril 1 se sembró el marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Thermo). En el 2 y 3 los plásmidos pSG5 conteniendo la secuencia del ER α wt y del ER α Δ 115, respectivamente. En el carril 4, el plásmido reportero conteniendo la secuencia ERE-tk-Luc y en el 5 el plásmido conteniendo el gen normalizador de β -Galactosidasa.

La figura 3 A muestra la secuencia codificante del gen del ER α wt y los sitios de unión de los oligos para realizar la mutagénesis sitio dirigida y obtener la secuencia del ER α Δ 115. En la figura 3 B se observa la conformación de los plásmidos extraídos mediante lisis alcalina que se utilizaron para transfectar las células. Se observa que no hay degradación plasmídica y que se encuentran en la conformación superenrollada necesaria para alcanzar altos niveles de expresión (Weintraub et al., 1986).

Como se ha demostrado previamente que en las células HeLa AF-2 es la función de transactivación dominante y en HepG2 lo es AF-1 (Penot et al., 2004), se esperaba obtener una

marcada disminución en la eficiencia de transactivación con el mutante ER α Δ 115 en la línea celular HepG2 respecto a la proteína wt.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4 y en la tabla 1 en donde se muestra la actividad de la enzima Luciferasa normalizada por la actividad de la enzima β -Galactosidasa para el ER α wt y el mutante.

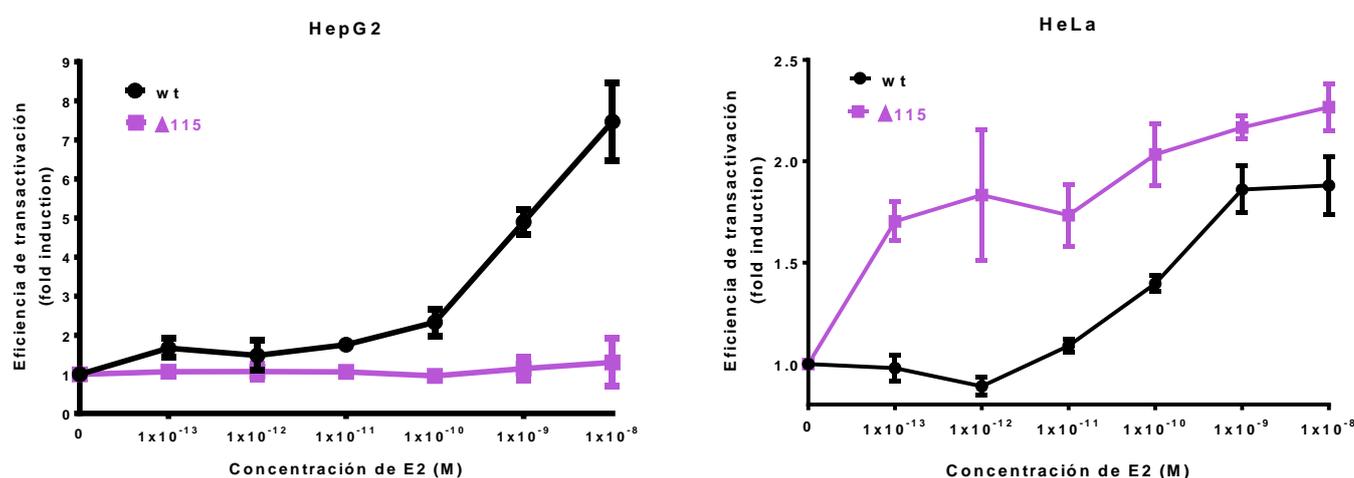


Figura 4. Efecto de la dosis de E2 en la eficiencia de transactivación del ER α wt y ER α Δ 115 en las células HepG2 y HeLa. Ambas líneas fueron co-transfectadas con ERE-tk-Luc (100ng), pCMV SPORT- β Gal (100ng) y pSG5-ER α wt (50ng) o pSG5-ER α Δ 5 (50ng). Transcurridas las 24 horas de transfección, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de E2 (1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-9} M y 1×10^{-8} M) durante 24 horas. Se utilizó EtOH como control (0). La actividad de la Luciferasa fue normalizada con la de β -Galactosidasa y se expresó como el fold-change sobre los valores medidos con EtOH. Los datos corresponden a la media \pm SEM de por lo menos tres experimentos.

Tabla 1. Datos procesados empleados para construir las gráficas de la figura 4. A. ER α wt en HepG2 B. ER α Δ 115 en HepG2. C. ER α wt en HeLa D. ER α Δ 115 en HeLa (los cálculos se presentan en el anexo)

A

[E2] (M)	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1×10^{-13}	1,460	1,626	1,935	1,674	0,139
1×10^{-12}	1,166	1,380	1,912	1,486	0,221
1×10^{-11}	1,737	1,831	1,706	1,759	0,037
1×10^{-10}	2,273	2,023	2,704	2,334	0,198
1×10^{-9}	4,956	5,200	4,554	4,90	0,188
1×10^{-8}	6,919	6,864	6,616	7,45	0,574

B

[E2] (M)	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1×10^{-13}	1,269	0,938	1,039	1,069	0,086
1×10^{-12}	1,198	1,173	0,848	1,073	0,113
1×10^{-11}	0,992	1,099	1,209	1,064	0,073
1×10^{-10}	0,934	1,017	0,934	0,963	0,027
1×10^{-9}	0,873	1,463	1,108	1,148	0,171
1×10^{-8}	1,991	0,816	1,111	1,307	0,353

C

D

[E2] (M)	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1x10 ⁻¹³	0,931	0,963	1,050	0,980	0,036
1x10 ⁻¹²	0,930	0,870	0,828	0,890	0,026
1x10 ⁻¹¹	1,09	1,060	1,115	1,090	0,017
1x10 ⁻¹⁰	1,421	1,423	1,352	1,397	0,023
1x10 ⁻⁹	1,994	1,773	1,817	1,860	0,067
1x10 ⁻⁸	1,919	1,718	2,001	1,880	0,083

[E2] (M)	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1x10 ⁻¹³	1,611	1,707	1,883	1,703	0,054
1x10 ⁻¹²	2,082	1,689	1,547	1,833	0,019
1x10 ⁻¹¹	1,858	1,710	1,593	1,733	0,088
1x10 ⁻¹⁰	2,078	1,949	2,222	2,033	0,088
1x10 ⁻⁹	2,082	2,153	2,182	2,167	0,033
1x10 ⁻⁸	2,191	2,408	2,249	2,267	0,067

Como se muestra en la figura, la actividad del ER α wt tanto en HepG2 como en HeLa coincide con lo reportado (Fernández-calero et al., 2014), el ER α Δ 115 no mostró actividad de transactivación en las células HepG2 en ninguna de las dosis de E2. En las células HeLa ER α Δ 115 se comporta de manera opuesta mostrando un aumento significativo en su eficiencia de transactivación en comparación al ER α wt a partir de la dosis más diluida de 1x10⁻¹³ M de E2. Esto sugiere que la ausencia de la función de activación AF-1 mejora considerablemente la eficiencia de activación de los genes blanco en células dependientes de AF-2.

Para ambas líneas celulares, la respuesta de transactivación de ER α wt comienza en 1x10⁻¹² M de E2 y la mayor eficiencia de transactivación fue obtenida en 1x10⁻⁸ M de E2 para ambos receptores, lo que sugiere que la unión a E2 no fue afectada significativamente.

Los resultados obtenidos mediante esta aproximación empleando la construcción ERE-tk-Luc como reportero permitieron diferenciar la contribución de AF-1 en dos contextos celulares distintos. Para profundizar en la caracterización de la función de esta región del receptor, se ha previsto analizar la actividad de un mutante del ER α wt portador de mutaciones de aminoácidos particulares dentro de AF-1. Así se espera detectar cuales son los residuos esenciales en la función de transactivación al ER α luego de comparar su actividad con ER α wt y con ER α Δ 115 en ambas líneas celulares. Además se podría incluir una línea celular sensible a tanto a AF-1 como a AF-2, para estudiar el efecto de estos mutantes en su activación.

Variantes de *splicing* del ER α

Con el propósito de determinar la presencia de variantes de *splicing* del ER α se trabajó con la línea celular MCF-7 (ZB, D+ y D-) que expresa el receptor endógeno funcional. Para ello se extrajo el ARN total de las células, luego se trató con una ADNasa RQ1 (libre de ARNasas) y a continuación se procedió a la síntesis del ADNc mediante retrotranscripción (RT) (figura 5).

Para analizar dichas variantes se realizaron electroforesis en geles de 5% de poliacrilamida y se visualizó mediante tinción con plata debido a que se esperaban obtener fragmentos muy pequeños y esta técnica es sumamente sensible.

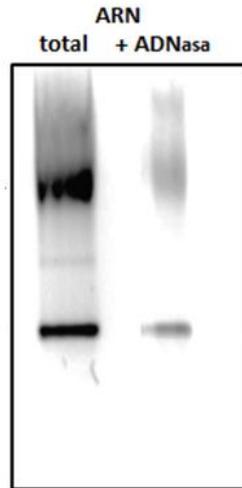
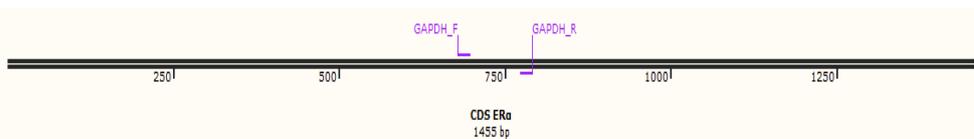


Figura 5. Extracción de ARN. Extracción total de ARN (carril 1), luego del tratamiento con ADNasa RQ1 (carril 2). Gel de Agarosa al 1%, tinción con GelRed.

En la figura 5 se observa un análisis de la extracción de ARN total de la célula previo y luego de tratado con ADNasa. Si bien del ARN tratado con ADNasa se sembró 1/10 de ARN sin tratar, ambas bandas se mantienen con el mismo perfil de intensidad.

Se realizó una amplificación del ADN copia (ADNc) con oligos para un gen constitutivo (GAPDH) como control de la RT (figura 6).

A



B

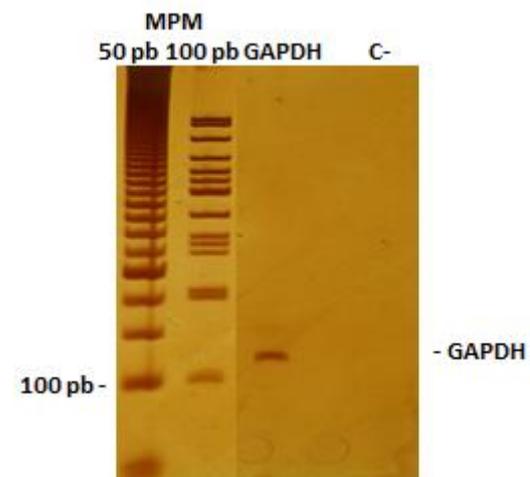
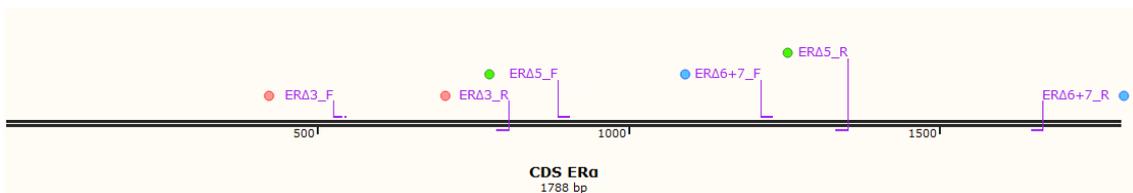


Figura 6. A. Secuencia codificante del gen ESR1 que codifica para el ER α con los sitios de unión a los oligos GAPDH
B. Electroforesis de ácidos nucleicos: fragmento de ADN obtenido con oligos GAPDH. Volumen de muestra 0,2 μ L. El control negativo se realiza sin el ADN molde. Se sembró 0,2 μ L marcador de 50 y 100 pb (Bioron). Condiciones: 100V, potencial constante. Tinción con nitrato de plata.

A partir de la figura 6 se puede confirmar que la calidad del ADNc producido mediante RT es adecuado ya que se obtiene fragmento esperado para GAPDH de 113 pb.

A continuación se estudió el efecto del splicing alternativo en el ER α expresado endógenamente en estas células mediante la detección de variantes por amplificación por PCR con oligos específicos. Para ello se utilizaron los oligos para detectar las variantes correspondientes a la delección de los exones: exón 3 (ER Δ 3), 5 (ER Δ 5), 6 (ER Δ 6), 7 (ER Δ 7) y 6+7 (ER Δ 6+7). Se muestra el sitio de unión de cada par de oligos (figura 7) y una tabla con los tamaños esperados para cada una de las variantes y para el ER α wt con la utilización de cada



par de oligos (tabla 1).

Figura 7. Secuencia codificante del gen ESR1 que codifica para el ER α con los sitios de unión a los oligos ER α Δ 3, ER α Δ 5 y ER α Δ 6+7.

Tabla 2. Tamaño de los fragmentos esperados para cada par de cebadores tanto del ER α wt como de las variantes de splicing (Al-bader, et al., 2011).

Oligos	ER α wt (pb)	Variante (pb)
Δ 3	282	165
Δ 5	467	328
Δ 6		318
Δ 7	453	268
Δ 6+7		135

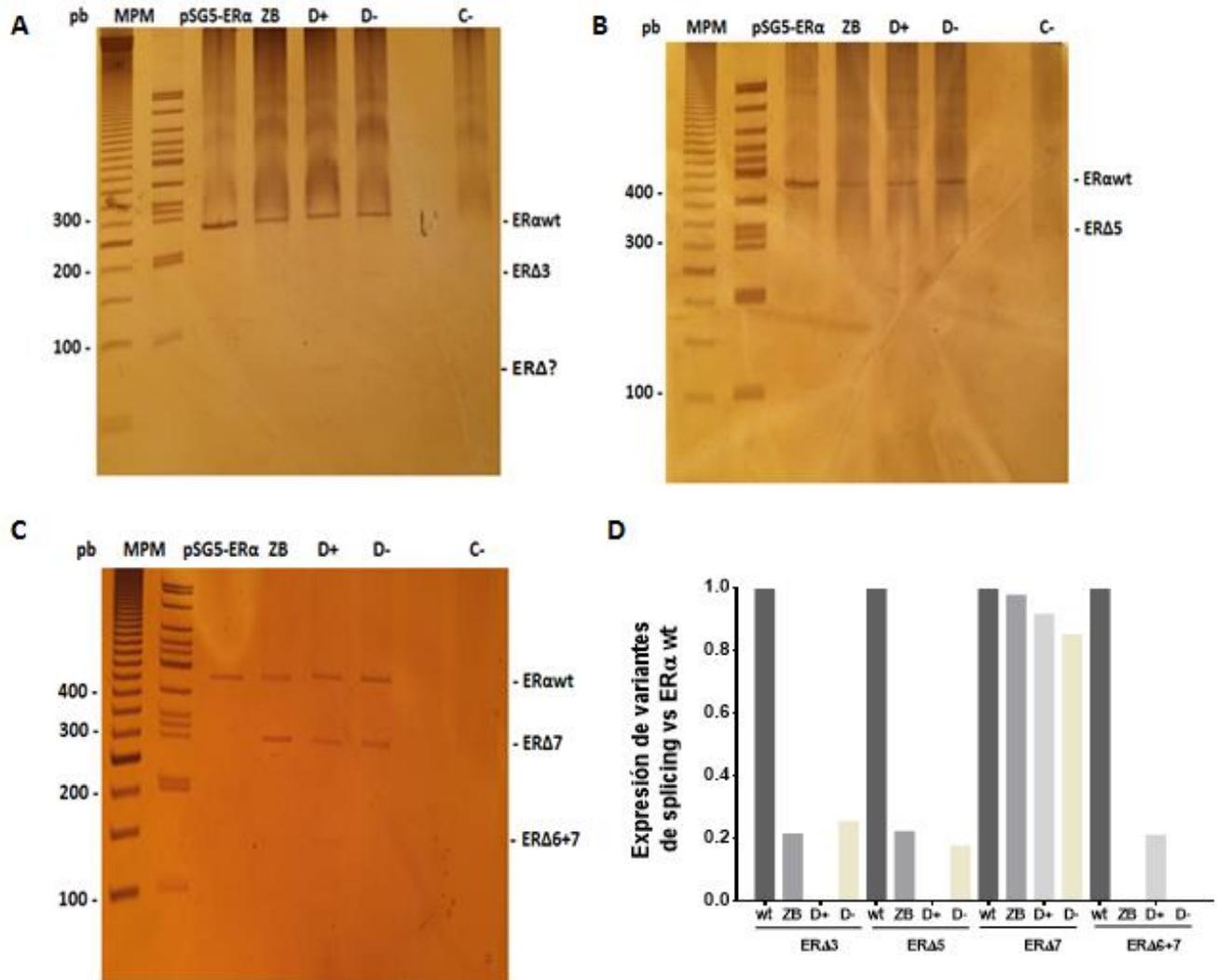


Figura 8. A Detección de variantes de splicing del ERα por PCR en células MCF-7 ZB, D+, D-. RT-PCR MCF7 ZB, D+ y D-, levantado con oligos Δ3. B. Electroforesis de ácidos nucleicos: RT-PCR de MCF7 ZB, D+ y D-, levantado con oligos Δ5. C. Electroforesis de ácidos nucleicos: RT-PCR de MCF7 ZB, D+ y D-, levantado con oligos Δ6+7. Volumen de muestra 0,2 μL. El control negativo corresponde a una PCR sin el ADN molde. Se sembró 0,2 μL marcador de 100 pb (Bioron). Condiciones: 100V, potencial constante. Tinción con nitrato de plata. D. Cuantificación de las bandas observadas en el panel A.

La figura 8 muestra los fragmentos de ADNc amplificados por PCR con los oligos Δ3, Δ5 y Δ6+7 y la cuantificación de dichos fragmentos. Como control positivo se amplificó el plásmido pSG5-ERαwt con cada par de oligos. En todos los casos se observa la presencia del ERα wt con su tamaño esperado para cada caso (tabla 1).

En el caso de las variantes de splicing, ERΔE3 y ERΔE5 se generan únicamente en las células MCF-7 ZB y D-. La variante ERΔE6 no fue detectada en ninguna de las líneas celulares mientras que ERΔE7 se generó en las 3 líneas, tanto en ZB y D- como en MCF-7 D+. ERΔE6+7 se detectó únicamente en las células D+. Además en esta línea celular también se generó una variante de

splicing (ERΔE?) no clasificada en ninguno de los grupos anteriores detectada con los oligos Δ3 y de un tamaño aproximado de 80 pb. Esto demuestra que además de las descritas previamente, existen otras variantes que podrían expresar diferentes isoformas proteicas dando lugar a receptores con una diversidad de funcionalidades. Esto coincide con un estudio reciente en donde se detectaron hasta 62 variantes diferentes del ERα en el cerebro humano (Kundu et al., 2015).

Como aproximación semi-cuantitativa, se realizó un análisis por densitometría de las imágenes obtenidas que permitió expresar el resultado en forma gráfica, y que se presenta en la figura 8. En la misma se muestra la intensidad relativa de las variantes en comparación con la observada en el ERα wt, según lo observado en la electroforesis, luego de una tinción con nitrato de plata. Todas las variantes excepto la delección del exón 7, se transcriben en mucha menor cantidad respecto al wt. En cuanto al ERΔE7, éste se transcribe en cantidades similares al ERα wt y por ende en cantidades mucho mayores en comparación con las demás variantes.

Estos resultados revelan una importante heterogeneidad celular del ERα que resulta del patrón de splicing alternativo y que da lugar a una familia de ARNm procesados con ausencia de determinados exones.

Para corroborar que las bandas detectadas en los geles de electroforesis corresponden a las variantes mencionadas, se debería verificar su secuencia y compararla con la del ERα wt.

Análisis comparativo del reconocimiento del ERα

En un abordaje complementario al análisis de las variantes de splicing del ERα se estudió la presencia de isoformas como las de 46 y 36 kDa del receptor mediante western blot (WB). Se trabajó con las líneas celulares de MCF-7: ZB, D+ y D- en ausencia y presencia de $1 \times 10^{-8} \text{M}$ de E2 para ver si además de diferencias propias de cada línea celular en la expresión del ERα endógeno, había diferencias por la presencia del E2.

Se realizó una electroforesis para visualizar la cantidad de proteína en cada una de las muestras.

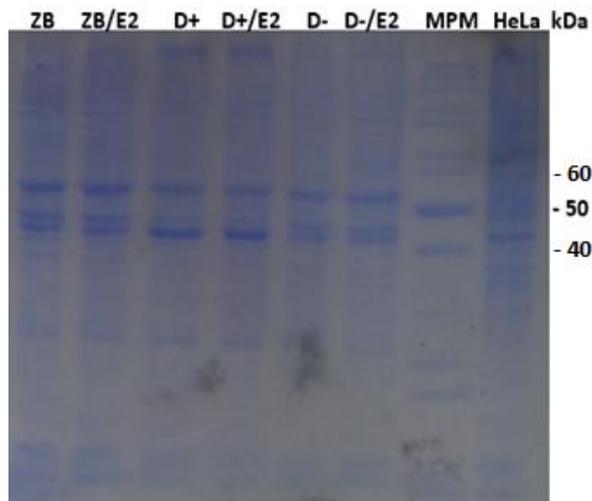


Figura 9. Electroforesis SDS-Page de las proteínas presentes en los extractos celulares de MCF7 (ZB, D+ y D- tratados con y sin E2) y HeLa. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Condiciones: 100V, potencial constante.

Como se muestra en la figura 9 se observa más cantidad de proteína total en el extracto de HeLa que en los de MCF-7. La presencia de E2 no parece afectar la cantidad de proteína. A su vez, dentro de las líneas celulares correspondientes a MCF-7, ZB tanto en ausencia como en presencia de E2 presenta más cantidad de proteína total que MCF-7 D+ y D- en las mismas condiciones. Sin embargo entre 42 y 43 kDa, las células D+ tanto en ausencia como en presencia de E2 presentan una banda mucho más intensa que el resto. Esta línea celular presenta una transfección estable del gen de MKL1 mutado en su extremo N-terminal, donde se deleta el motivo RPEL responsable de la unión a actina (Huet et al., 2009). Por lo tanto, en ausencia de actina unida a MKL1, el equilibrio se desplaza hacia a formación de actina-F formando los filamentos de actina que tienen un peso molecular de 43 kDa que corresponde a la banda intensa presente en D+ y no en las otras líneas.

En la figura 10 se muestra la membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau luego de la transferencia de la electroforesis.

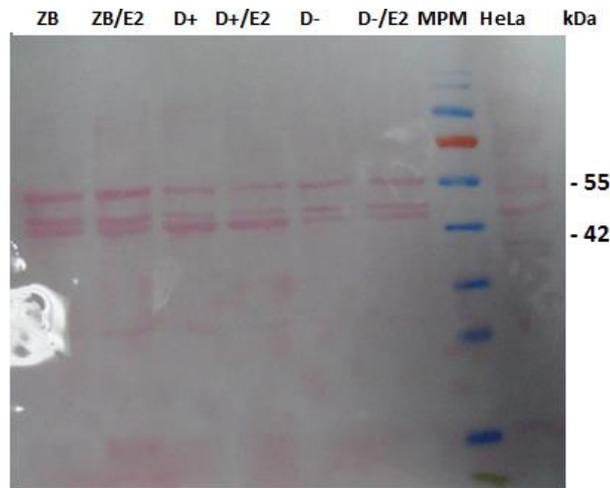


Figura 10. Transferencia de las proteínas de extractos totales resueltos mediante electroforesis, de células MCF7 y HeLa. Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau. Condiciones: 400mA corriente constante, 60 minutos.

En la membrana luego de la transferencia se observa el mismo patrón de intensidad de bandas reveladas en el gel con azul de Coomassie. Con el propósito de detectar la presencia de isoformas del ER α se emplearon distintos anticuerpos que reconocen tanto el extremo N - como el C-terminal del receptor. En la figura 11 se muestra un esquema del reconocimiento de los anticuerpos utilizados en este trabajo en el ER α y sus variantes de splicing. Los anticuerpos N-terminales son capaces de reconocer todas las variantes del ER α mientras que los C-terminales, el F-10 reconoce todas mientras que el 2q418 reconoce parcialmente las variantes ER Δ 7 y ER Δ 6+7.

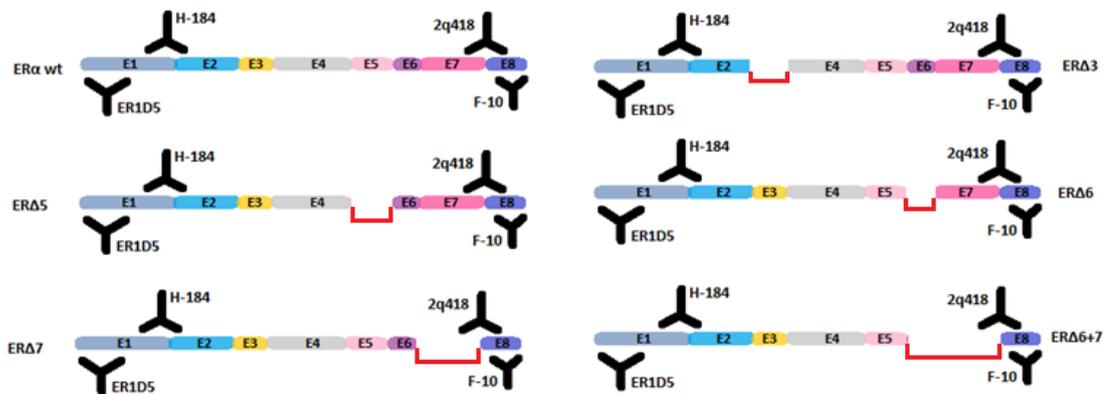


Figura 11. Esquema de reconocimiento de anticuerpos ER1D5, H-184, 2q418 y F-10 en el ER α wt y sus variantes.

En la figura 12 se muestra el WB revelado con el anticuerpo α -ER α ER1D5 monoclonal que reconoce el extremo N-terminal del ER α y la cuantificación de las bandas obtenidas.

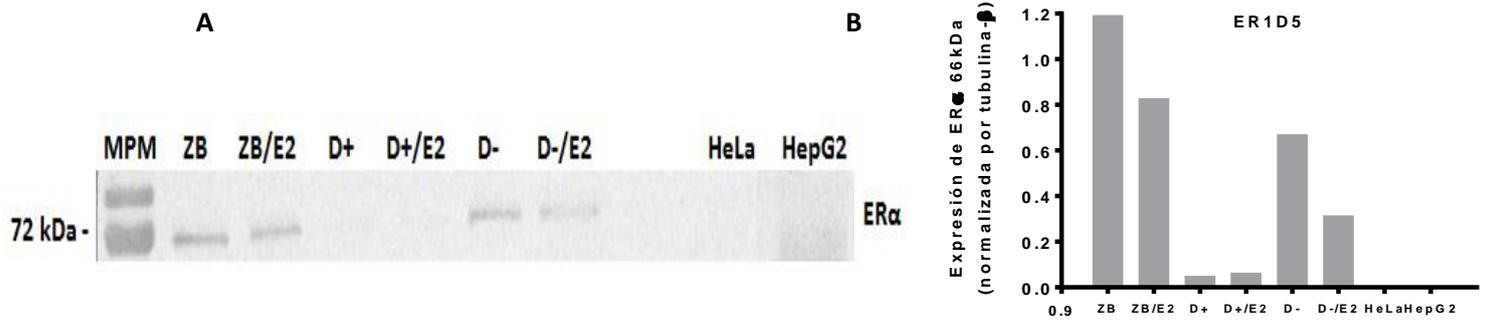


Figura 12. **A** WB de los extractos celulares de MCF7, HeLa y HepG2. α -ER (ER1D5) como anticuerpo primario, dilución 1/1000. α -IgG de ratón como anticuerpo secundario, dilución 1/2500. Solución de revelado: ECL, tiempo de exposición 30 segundos. **B.** Cuantificación de las bandas observadas en el panel A.

En el WB se observa una banda intensa alrededor de 66 kDa correspondiente al ER α , únicamente en MCF-7 ZB y D-. MCF-7 ZB presenta una señal mucho mayor que MCF-7 D-. Sin embargo en MCF-7 D+ y en HeLa y HepG2 no se detectan niveles apreciables del receptor por lo que este anticuerpo N-terminal no es capaz de unirse al receptor y por ende dar una señal de detección. La expresión del ER α es independiente de la presencia de E2.

El análisis por densitometría de las imágenes obtenidas permitió realizar el gráfico que se presenta en el panel B de la figura 12. En el mismo se muestra la intensidad relativa del ER α endógeno luego de la normalización por tubulina β donde se ve reflejado lo observado en la imagen del WB.

Para confirmar este resultado se realizó un WB empleando otro anticuerpo, α -ER α H-184 que detecta la región N-terminal (aminoácidos 2-185) de ER α pero que en este caso es policlonal (figura 13).

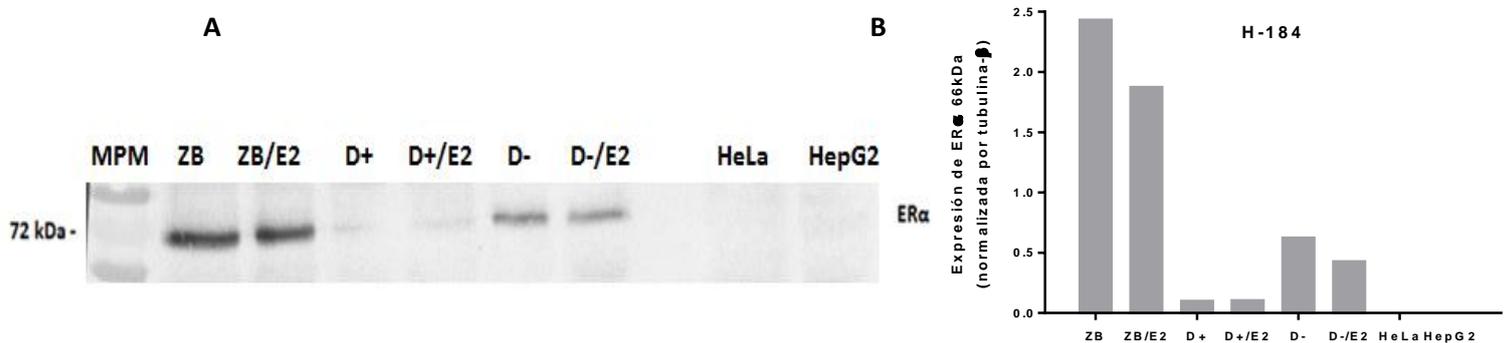


Figura 13. WB de los extractos celulares de MCF7, HeLa y HepG2. α -ER (H-184) como anticuerpo primario, dilución 1/500. α -IgG de ratón como anticuerpo secundario, dilución 1/2500. Solución de revelado: ECL, tiempo de exposición 30 segundos. **B.** Cuantificación de las bandas observadas en el panel A.

En este caso, se detecta el ER α de 66 kDa únicamente en las células MCF-7 ZB (con mayor intensidad de señal) y D- (con menor intensidad de señal), no detectándose en MCF-7 D+ y

tampoco en HeLa y HepG2, confirmando el resultado anterior. Esto es independiente de la presencia de E2. En este caso también se muestra el mismo análisis por densitometría de las imágenes obtenidas.

Esto sugiere que el ER α expresado en las células MCF-7 D+ tienen una modificación en su extremo N-terminal que no permite que se detecten con este tipo de anticuerpos. A su vez este resultado parece confirmar que en las células HeLa y HepG2, las cuales no hay señal de reconocimiento del receptor por los anticuerpos que reconocen el extremo N-terminal.

A continuación, se estudió el reconocimiento del ER α por un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la proteína. Para ello, se utilizaron dos anticuerpos monoclonales, el α -ER α 2q418 que reconoce los aminoácidos 495-595 y el α -ER α F-10 que reconoce un rango menor de aminoácidos 570-595 del extremo C-terminal del ER α .

En la figura 14 se muestra el WB revelado con el α -ER α 2q418 y su correspondiente análisis por densitometría.

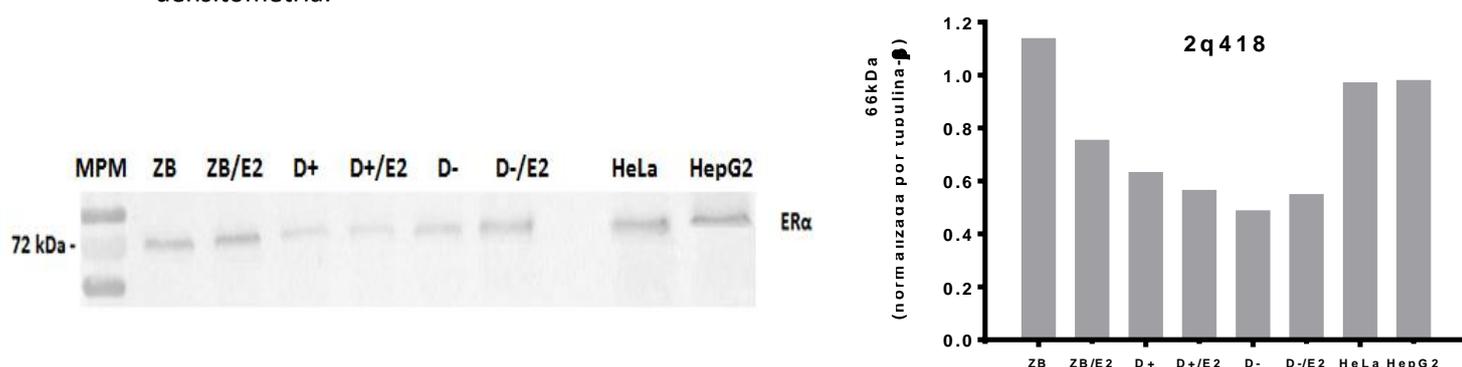


Figura 14. WB de los extractos celulares de MCF7, HeLa y HepG2. α -ER (2Q418) como anticuerpo primario, dilución 1/500. α -IgG de ratón como anticuerpo secundario, dilución 1/2500. Solución de revelado: ECL, tiempo de exposición 30 segundos. **B.** Cuantificación de las bandas observadas en el panel A.

En este caso hay señal correspondiente al ER α de 66 kDa tanto en MCF-7 ZB y D- como en MCF-7 D+. Curiosamente también se observa señal en las células HeLa y HepG2. Se investigó si esta señal era inespecífica mediante ensayos de WB con y sin anticuerpo α -ER α 2q418 (primario). Sin el mismo no se observa banda por lo que no se trataría de una señal inespecífica (datos no mostrados). La señal del ER α tanto en HeLa como en HepG2 corresponde a un receptor no funcional. Probablemente, como tiene el mismo tamaño aparente en la electroforesis que el ER α funcional, su afuncionalidad se deba a que presente una conformación diferente al mismo y alguna modificación en el extremo N-terminal que no permita ser reconocido por anticuerpos N-terminales. El ER α del MCF-7 D+ se expresa en menor cantidad que en el resto de las líneas celulares y a su vez se presume que tiene una

modificación en el extremo N-terminal que no permite ser reconocido por los anticuerpos del extremo N-terminal pero que a su vez, a diferencia de HeLa y HepG2, genera un receptor funcional en las células MCF-7 (Huet et al., 2009).

En la figura 15 se muestra el WB revelado con el α -Er α -F-10 y su correspondiente análisis por densitometría.

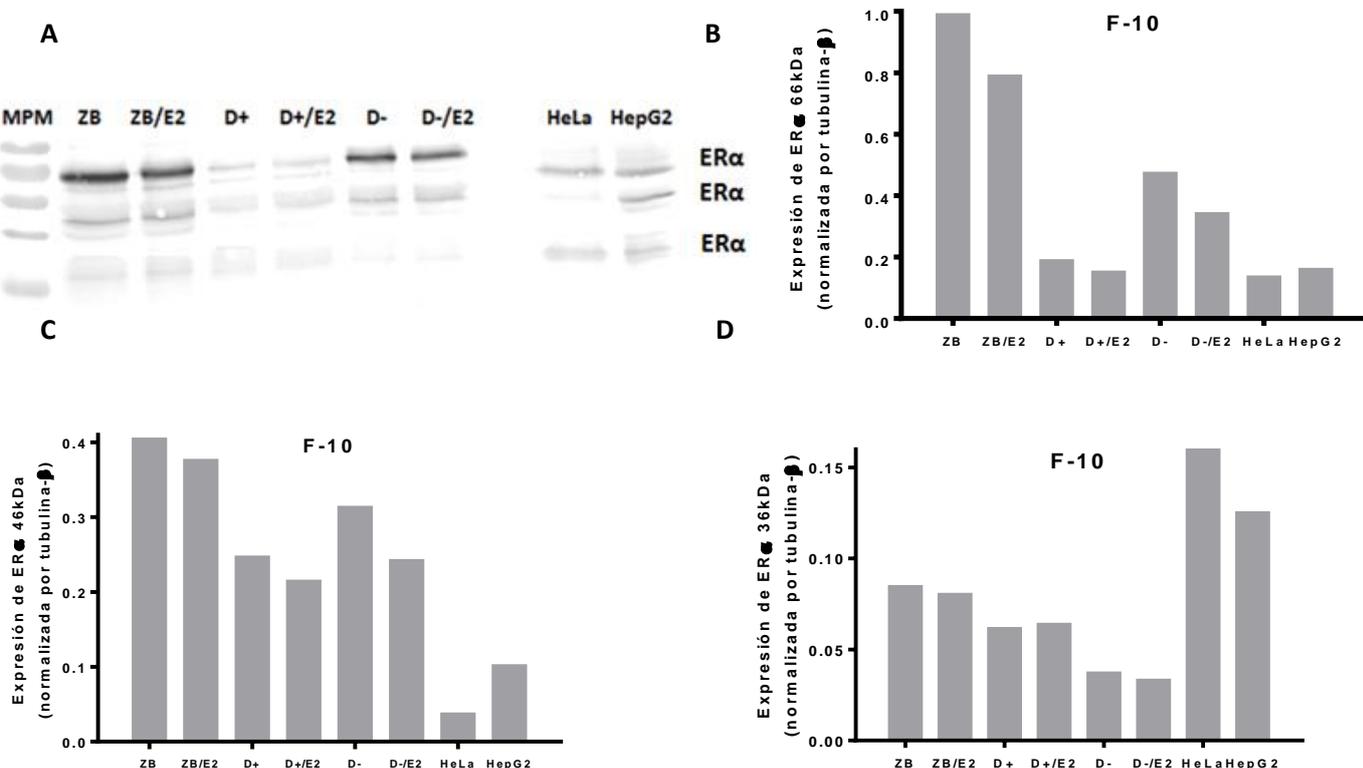


Figura 15. WB de los extractos celulares de MCF7, HeLa y HepG2. α -ER (F-10) como anticuerpo primario, dilución 1/200. α -IgG de ratón como anticuerpo secundario, dilución 1/2500. Solución de revelado: ECL, tiempo de exposición 30 segundos. **B.** Cuantificación de las bandas del ER α de 66 kDa observadas en el panel A. **C.** Cuantificación de las bandas del ER α de 46 kDa observadas en el panel A. **D.** Cuantificación de las bandas del ER α de 36 kDa observadas en el panel A.

Como se muestra en la figura 15 se puede observar la presencia del ER α de 66kDa en todas las líneas celulares. Sin embargo, la señal del ER α en las células MCF-7 D+, HeLa y HepG2 en ausencia y presencia de E2 se encuentra mucho más disminuida que en las MCF-7 ZB y D- en las mismas condiciones.

Con este anticuerpo fue posible detectar las isoformas del ER α de 46 y 36 kDa. El resultado de la densitometría permitió deducir que la isoforma de 46 kDa se expresa más en las células MCF-7 ZB y D-. En las MCF-7 D+ y HeLa y HepG2 se expresa en menor cantidad, sobre todo en estas dos últimas. La isoforma de 36 kDa del ER α se expresa mayoritariamente en las células

HeLa y HepG2 y en las MCF-7 en las que menos se expresa es en las MCF-7 D-. Estas isoformas fueron detectadas por este anticuerpo y no por el α -ER α 2q418, debido a que el α -ER α F-10 reconoce una pequeña región del extremo C-terminal que parece no estar modificada en estas isoformas.

Estos resultados indican que la expresión del ER α endógeno en las células es reconocido de manera diferencial por distintos anticuerpos. Además se detectó la presencia de ER α no funcional reconocido diferencialmente por anticuerpos, que presenta el mismo PM aparente en la electroforesis que el ER α funcional, lo que sugiere que la falta de funcionalidad podría ser causada por una diferencia en la conformación del ER α expresado en las células.

Para la normalización de la cuantificación de los wb, se utilizó la tubulina- β (figura 16).

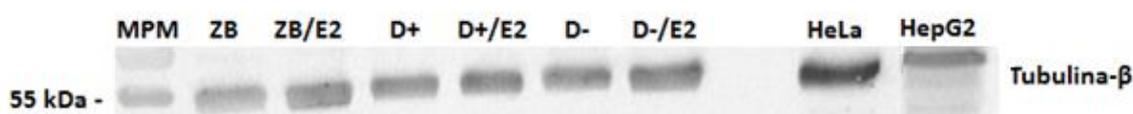


Figura 16. WB de los extractos celulares de MCF7, HeLa y HepG2. Anti beta tubulina como anticuerpo primario, dilución 1/2000. α -IgG de ratón como anticuerpo secundario, dilución 1/2500. Solución de revelado: ECL, tiempo de exposición 30 segundos.

En la figura 16 se observa que la señal de la beta tubulina es muy similar en todas las células, siendo que en HeLa y HepG2 ésta es más fuerte, seguramente por contener mayor cantidad total de proteínas cada uno de los extractos celulares.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

El objetivo principal de este trabajo era contribuir al estudio del rol de AF-1 y AF-2 respecto a la activación transcripcional del ER α , analizar sus variantes de splicing y su reconocimiento diferencial en células humanas.

En cuanto al rol de los AFs los resultados obtenidos indican que AF-1 es importante para obtener una elevada eficiencia de activación de los genes blanco en células dependientes de AF-2, sin embargo en células permisivas únicamente a AF-1, la delección de esta región afectó dicha eficiencia impidiendo el normal funcionamiento del ER α . Para continuar con la caracterización de AF-1, sería interesante analizar el efecto de mutaciones puntuales con cambio de aminoácidos, en líneas celulares sensibles a tanto a AF-1 y AF-2 como a ambos.

El análisis de las variantes de splicing permitió concluir que existe una gran heterogeneidad celular del ER α capaz de producir diferentes isoformas proteicas. Se lograron detectar variantes de splicing con delecciones en los exones 3, 5, 7 y 6+7, pero no se ha detectado la variante en la cual se encuentra deletado el exón 6. Para realizar un estudio más preciso de la concentración relativa de los transcritos del ER sería importante cuantificarlos por Real Time PCR. Por otro lado, sería interesante clonar estas variantes en vectores de expresión para estudiar el efecto de las proteínas expresadas en diferentes células humanas.

El ER α endógeno de tres sublíneas celulares de MCF-7, una con el gen MKL1 wt y dos con variantes mutadas, fue diferencialmente reconocido por distintos anticuerpos. Estas variantes expresaron el ER α de 66 kDa el cual no fue reconocido por todos los anticuerpos de la misma manera, sugiriendo que el ER α expresado en las diferentes sublíneas presentó cambios que no afectaron su peso molecular aparente. En células donde no se expresa de manera funcional, también se ha reconocido la presencia del ER α con el mismo peso molecular aparente. Se sugiere que la falta de funcionalidad podría ser causada por diferencias en la conformación del ER α . En este sentido, sería relevante estudiar el patrón de degradación del ER α para determinar si este reconocimiento diferencial se debe a la presencia de diferencias estructurales.

En conjunto y conociendo la relevancia del ER α en diferentes procesos patológicos como el cáncer de mama, esta información contribuiría a comprender mejor el rol de los AFs, las variantes de splicing y las isoformas proteicas en el desarrollo de esta enfermedad.

ANEXO

Marcadores de peso molecular de ADN

Los marcadores de PM utilizados en las electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida corresponden a GeneRuler DNA Ladder Mix de Thermo Scientific y Bioron 100pb, respectivamente

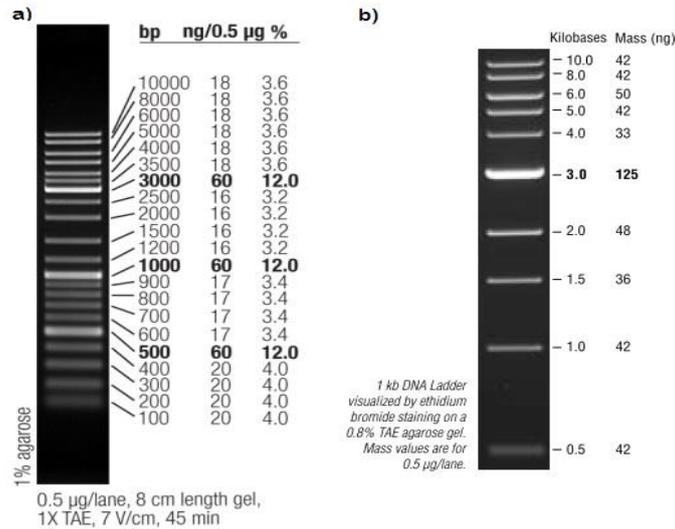


Figura 1 Marcadores de PM de ADN a) GeneRuler DNA Ladder Mix (Cat #: SM0331), Thermo Scientific y b) Bioron 100pb.

Marcadores de peso molecular de proteínas

Los marcadores de PM utilizados en las electroforesis en geles de poliacrilamida fueron el marcador preteñido PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific y el marcador sin teñir Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas.

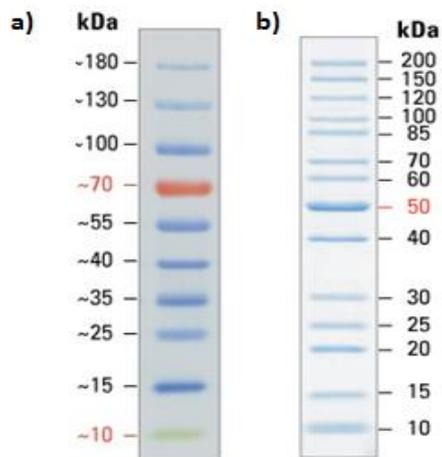
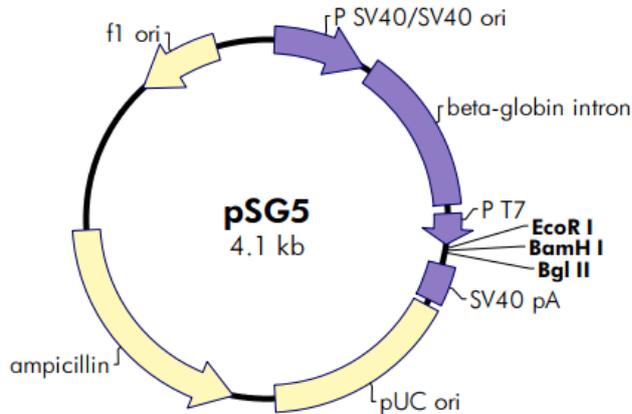


Figura 2. Marcadores de PM utilizados en los geles de poliacrilamida. a) PageRule Prestained Protein Ladder ThermoScientific y b) Unstained Protein Ladder, Fermentas.

Vectores utilizados

pSG5 - Vector donde fueron clonadas las secuencias codificantes de ER α wt y ER α Δ 115



Ampicillin: resistencia a ampicilina

SV40: secuencias promotoras y terminadoras del simian virus 40.

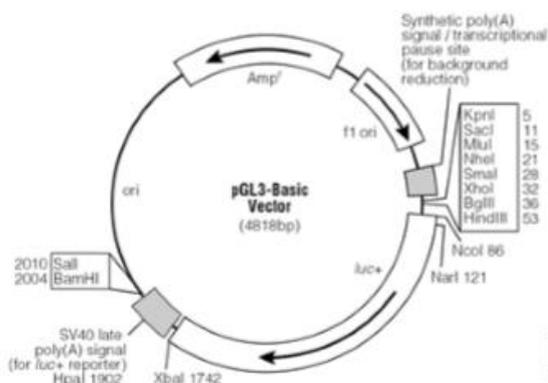
Promotor T7

SV40 polyA signal: señal de poliadenilación para el gen reportero.

pUC: origen de replicación 1342–2009

f1 ori: origen para la producción de ADN simple hebra.

pGL3 Basic - Vector base para las construcciones reporteras



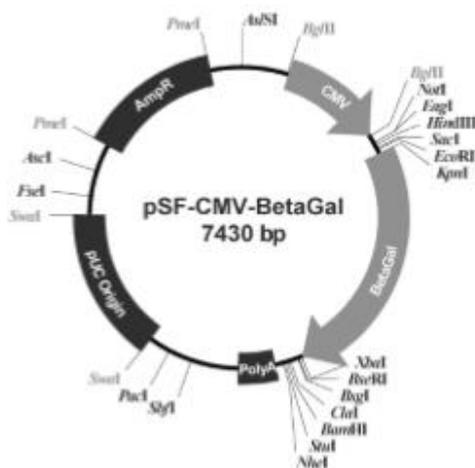
Ampr: resistencia a ampicilina

f1 ori: origen para la producción de ADN simple hebra.

Luc+: gen reportero, secuencia codificante de la enzima Luciferasa (Firefly)

SV40 late poly(A) signal: señal de poliadenilación para el gen reportero.

pCMV- β -Gal - Vector de expresión constitutiva de β -Gal, utilizado para normalización



P CMV: Promotor CMV (citomegalovirus)

BetaGal: secuencia codificante del gen de la Enzima β -Galactosidasa

pUC Origin: origen de replicación.

PolyA: señal de poliadenilación

AmpR: Resistencia a ampicilina

Ensayo de β -galactosidasa

Buffer fosfato 0.1 M pH 7.3:

Na_2HPO_4 5,82 g

NaH_2PO_4 1,24 g de

H_2O c.s.p. 500 mL.

Almacenar a 4°C.

ONPG 4 mg/mL

O-nitrofenil-beta-D- galactopiranosido (ONPG) 250 mg

Buffer fosfato 0.1 M pH 7.3 c.s.p. 250 mL

Almacenar a -20 °C.

β -mercaptoetanol-MgCl₂ 100X

MgCl_2 0,2 g

β -mercaptoetanol 3,19 mL

H_2O c.s.p. 10 mL

Almacenar a 4°C.

Mix para el ensayo de β -galactosidasa: Para 1 punto de medida mezclar 142 μL de buffer fosfato 0.1 M pH 7.3, 2.5 μL de β -mercaptoetanol-MgCl₂ 100X y 55 μL de ONPG 4 mg/mL.

Ensayo de β -galactosidasa: Agregar 60 μL del sobrenadante del lisado a cada pocillo de una placa transparente de 96 pocillos. Agregar 200 μL del mix a cada pocillo y a 3 pocillos vacíos para usar como blanco del experimento. Incubar hasta que aparezca un color levemente amarillo y medir la absorbancia de la microplaca a 405 nm.

Ensayo de Luciferasa

Agregar 10-20 μL de los lisados de HeLa/HepG2 por pocillo en una placa oscura de 96 pocillos. Agregar 40 μL del reactivo de Luciferasa por pocillo y medir inmediatamente la luz producida, en un luminómetro.

Tratamiento de datos correspondientes a los ensayos de actividad

Tabla 1. Datos de los ensayos de Luciferasa y β -Galactosidasa para el ER α wt en células HepG2. El valor promedio del blanco fue de 0,060.

[E2] (M)	Luciferasa			β -Galactosidasa – Blanco		
0	208	208	210	0,244	0,429	0,533
1x10-13	310	381	354	0,368	0,406	0,317
1x10-12	448	431	405	0,666	0,541	0,367
1x10-11	470	503	500	0,469	0,476	0,508
1x10-10	535	738	746	0,408	0,632	0,478
1x10-9	1075	975	812	0,376	0,325	0,309
1x10-8	1014	1406	885	0,254	0,355	0,178

[E2] (M)	Luc/ β -Gal			Promedio Luc/ β -Gal en 0 M E2	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	852	485	394	577	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1x10-13	842	938	1117		1,460	1,626	1,935	1,674	0,139
1x10-12	673	797	1104		1,166	1,380	1,912	1,486	0,221
1x10-11	1002	1057	984		1,737	1,831	1,706	1,759	0,037
1x10-10	1311	1168	1561		2,273	2,023	2,704	2,334	0,198
1x10-9	2859	3000	2628		4,956	5,200	4,554	4,90	0,188
1x10-8	3992	3961	4972		6,919	6,864	6,616	7,45	0,574

Tabla 2. Datos de los ensayos de Luciferasa y β -Galactosidasa para el ER α Δ 115 en células HepG2. El valor promedio del blanco fue de 0,062.

[E2] (M)	Luciferasa			β -Galactosidasa – Blanco		
0	217	219	210	0,306	0,252	0,238
1x10-13	220	223	220	0,218	0,290	0,258
1x10-12	224	230	235	0,228	0,239	0,338
1x10-11	240	220	245	0,295	0,244	0,247
1x10-10	259	251	233	0,338	0,301	0,303
1x10-9	259	222	239	0,362	0,185	0,263
1x10-8	227	261	217	0,139	0,390	0,238

[E2] (M)	Luc/ β -Gal			Promedio Luc/ β -Gal en 0 M E2	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	709	869	882	820	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1x10-13	1009	769	853		1,269	0,938	1,039	1,069	0,086
1x10-12	983	963	695		1,198	1,173	0,848	1,073	0,113
1x10-11	814	902	992		0,992	1,099	1,209	1,064	0,073
1x10-10	766	834	769		0,934	1,017	0,934	0,963	0,027
1x10-9	716	1200	909		0,873	1,463	1,108	1,148	0,171
1x10-8	1633	669	912		1,991	0,816	1,111	1,307	0,353

Tabla 3. Datos de los ensayos de Luciferasa y β -Galactosidasa para el ER α wt en células HeLa. El valor promedio del blanco fue de 0,057.

[E2] (M)	Luciferasa			β -Galactosidasa – Blanco		
0	507	455	499	0,237	0,23	0,217
1x10 ⁻¹³	647	548	635	0,325	0,266	0,283
1x10 ⁻¹²	578	745	650	0,292	0,402	0,367
1x10 ⁻¹¹	633	789	815	0,271	0,348	0,342
1x10 ⁻¹⁰	760	868	897	0,25	0,285	0,31
1x10 ⁻⁹	1058	1191	1252	0,248	0,314	0,322
1x10 ⁻⁸	1104	1143	912	0,269	0,311	0,213

[E2] (M)	Luc/ β -Gal			Promedio Luc/ β -Gal en 0 M E2	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	2139	1978	2300	2139	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1x10 ⁻¹³	1991	2060	2244		0,931	0,963	1,050	0,980	0,036
1x10 ⁻¹²	1979	1853	1771		0,930	0,870	0,828	0,890	0,026
1x10 ⁻¹¹	2336	2267	2383		1,09	1,060	1,115	1,090	0,017
1x10 ⁻¹⁰	3040	3046	2894		1,421	1,423	1,352	1,397	0,023
1x10 ⁻⁹	4266	3793	3888		1,994	1,773	1,817	1,860	0,067
1x10 ⁻⁸	4104	3675	4282		1,919	1,718	2,001	1,880	0,083

Tabla 4. Datos de los ensayos de Luciferasa y β -Galactosidasa para el ER α Δ 115 en células HeLa. El valor promedio del blanco fue de 0,058.

[E2] (M)	Luciferasa			β -Galactosidasa – Blanco		
0	220	203	218	0,377	0,407	0,412
1x10 ⁻¹³	285	272	269	0,332	0,299	0,268
1x10 ⁻¹²	253	252	296	0,228	0,280	0,359
1x10 ⁻¹¹	308	298	298	0,311	0,327	0,351
1x10 ⁻¹⁰	350	323	360	0,316	0,311	0,304
1x10 ⁻⁹	375	350	421	0,338	0,305	0,362
1x10 ⁻⁸	327	362	386	0,280	0,282	0,322

[E2] (M)	Luc/ β -Gal			Promedio Luc/ β -Gal en 0 M E2	Luc/ β -Gal (Fold change)			Promedio Luc/ β -Gal (Fold change)	SEM
0	584	500	529	535	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
1x10 ⁻¹³	858	910	1004		1,611	1,707	1,883	1,703	0,054
1x10 ⁻¹²	1110	900	825		2,082	1,689	1,547	1,833	0,019
1x10 ⁻¹¹	990	911	849		1,858	1,710	1,593	1,733	0,088
1x10 ⁻¹⁰	1108	1039	1184		2,078	1,949	2,222	2,033	0,088
1x10 ⁻⁹	1109	1148	1163		2,082	2,153	2,182	2,167	0,033
1x10 ⁻⁸	1168	1284	1199		2,191	2,408	2,249	2,267	0,067

Soluciones y buffers utilizados

PBS

KCl - 2,7 mM

KH₂PO₄ - 1,4 mM

Na₂HPO₄ - 4 mM

NaCl – 137 mM

TBST

Tris-HCl pH 7.5 - 10 mM

Tween 20 - 0.1%

NaCl – 75 mM

Buffer carga proteínas Laemmli sample buffer (2X)

SDS - 4%

Glicerol - 20%

Tris-Cl (pH 6.8) - 120 mM

Azul de bromofenol - 0.02%

DTT - 30 mM

Tinción con nitrato de plata

Solución de TBE 5X

Tris base - 27 g

Ácido bórico - 13,75 g

EDTA 0,5 M, pH 8.0 - 10 mL

H₂O mRo c.s.p. - 500mL

Solución reveladora

NaOH - 6 g

Formaldehído - 0,66 mL

H₂O mRo c.s.p.- 200 mL

Solución fijadora

EtOH 95% - 20 mL

AcOH - 1mL

H₂O mRo c.s.p. - 200mL

Solución colorante de plata

H₂O mRo - 200 mL

AgNO₃ - 0,45 g

BIBLIOGRAFÍA

- Al-bader, M., Al-saji, S., Ford, C. H. J., Francis, I., & Al-ayadhy, B. (2010). Real-Time PCR : Detection of Oestrogen Receptor-Alpha and -Beta Isoforms and Variants in Breast Cancer, *4156*, 4147–4156.
- Al-bader, M., Ford, C., Al-ayadhy, B., & Francis, I. (2011). Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines, 537–544. <http://doi.org/10.3892/etm.2011.226>
- Andronikou, N., Yu, X., Wei, J., Sridharan, M., Quintanilla, R., Lakshmipathy, U., ... Way, V. A. (2000). Lipofectamine[®] 3000—efficient, reproducible transfection for biologically-relevant cell models, 3–4.
- Bjo, L. (2016). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling : Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, *19*(February), 833–842. <http://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bollig, A., & Miksicek, R. J. (2016). An Estrogen Receptor- α Splicing Variant Mediates Both Positive and Negative Effects on Gene Transcription, (July), 634–649.
- Casa, A. J., Hochbaum, D., Sreekumar, S., & Lee, A. V. (2015). Molecular and Cellular Endocrinology The estrogen receptor alpha nuclear localization sequence is critical for fulvestrant-induced degradation of the receptor, *415*, 76–86. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.007>
- Fernández-Calero, T., Astrada, S., Alberti, Á., Horjales, S., Francois, J., Rovira, C., Marin, M. (2014). Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *143*, 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.016>
- Fernández-Calero, T., Cabrera-Cabrera, F., Ehrlich, R., & Marín, M. (2016). Silent Polymorphisms : Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties ?, 1–16. <http://doi.org/10.3390/life6010009>
- Fernández-calero, T., Flouriot, G., & Marín, M. (n.d.). Chapter 22 The Synonymous Ala87 Mutation of Estrogen Receptor Alpha Modifies Transcriptional Activation Through Both ERE and AP1 Sites, *1366*, 287–296. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-3127-9>
- Flouriot, G., Huet, G., Demay, F., Pakdel, F., Boujrad, N., & Michel, D. (2014). The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications, *268*, 257–268. <http://doi.org/10.1042/BJ20131240>
- Fox, J. E., Liu, H., & Jordan, V. C. (2003). Estrogen Action and Breast Cancer, (1).
- Group, C., Factors, H., & Cancer, B. (2001). Familial breast cancer : collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease, *358*, 1389–1399.
- Huet, G., Me, Y., Tiffoche, C., & Flouriot, G. (2009). Repression of the Estrogen Receptor- α Transcriptional Activity by the Rho / Megakaryoblastic Leukemia 1 Signaling Pathway *, *284*(49), 33729–33739. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.045534>
- Jia, M. (2015). *SC. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*.

<http://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>

- Kerdivel, G., Boudot, A., Habauzit, D., Percevault, F., Demay, F., Pakdel, F., & Flouriot, G. (2014). Molecular and Cellular Endocrinology Activation of the MKL1 / actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY*, 390(1-2), 34–44. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.009>
- Kerdivel, G., Flouriot, G., & Pakdel, F. (2013). *Modulation of Estrogen Receptor Alpha Activity and Expression During Breast Cancer Progression. Hormones and Breast Cancer* (1st ed., Vol. 93). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416673-8.00004-6>
- Kundu, P., Li, M., Lu, R., Stefani, E., & Toro, L. (2015). Molecular and Cellular Endocrinology Regulation of transcriptional activation function of rat estrogen receptor α (ER α) by novel C-terminal splice inserts. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 401, 202–212. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.001>
- Kurebayashi, J., Otsuki, T., Kunisue, H., Tanaka, K., Yamamoto, S., & Sonoo, H. (2000). Expression Levels of Estrogen Receptor- α , Estrogen Receptor- β , Coactivators , and Corepressors in Breast Cancer 1, 6(February), 512–518.
- May, F. E. B., Felicity, C., & May, E. B. (2014). Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha : their therapeutic potential in breast cancer, 225–252.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER a) and beta (ER b): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, 90, 13–29. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>
- Peng, J., & Obe, V. C. J. (2006). Chapter 9 Estrogen Receptor Pathways and Breast Cancer.
- 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. <http://doi.org/10.1074/jbc.M402148200>
- Pfeffer, U., Fecarotta, E., & Vidali, G. (n.d.). Coexpression of Multiple Estrogen Receptor Variant Messenger RNAs in Normal and Neoplastic Breast Tissues and in MCF-7 Cells1, 2158–2165.
- Quintero, P., Adriana, L., Cano, M., Melida, R., & Mora, S. (n.d.). Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2 : Perspectivas de estudios con Chlamydia trachomatis, 17–29.
- Weintraub, H., Cheng, P. P., & Conrad, K. (1986). Expression of Transfected DNA Depends on DNA Topology, 46, 115–122.
- Westley, R. L., & May, F. E. B. (2013). A Twenty-First Century Cancer Epidemic Caused by Obesity : The Involvement of Insulin , Diabetes , and Insulin-Like Growth Factors, 2013.