



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

**“Estudio molecular de la proteína
argonauta 1 (AGO1) en la activación de
enhancers dependientes de estrógenos”**

Autor: Juan Cruz Rodríguez Elgassi

Director: Ezequiel Nazer

Co-director: Alberto R. Kornblihtt

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE - UBA - CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Jueves 28 de noviembre de 2024

Juan Cruz Rodríguez Elgassi

Ezequiel Nazer

Alberto R. Kornblihtt

Resumen

Título: “*Estudio molecular de la proteína argonauta 1 (AGO1) en la activación de enhancers dependientes de estrógenos*”.

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Los tratamientos más efectivos actualmente se basan en afectar receptores hormonales en tumores que los expresan. Sin embargo, una proporción significativa de pacientes desarrolla resistencia, lo que conduce a la progresión de la enfermedad hacia un estado metastásico. A nivel molecular, la desregulación transcripcional de enhancers específicos en el tejido mamario contribuye a la tumorigénesis. Además, muchos de los genes comúnmente mutados en el cáncer de mama codifican reguladores epigenéticos. Por lo tanto, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en esta enfermedad para identificar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar tratamientos más efectivos para los tumores positivos para el receptor de estrógeno (ER).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado un rol no canónico de argonauta 1 (AGO1) como coactivador de enhancers inducidos por estrógenos. En esta tesisina, se investigó el papel de AGO1 en la activación transcripcional de enhancers dependientes de estrógenos en células de cáncer de mama. Aunque las proteínas argonauta se conocen principalmente por su función citoplasmática en la regulación génica mediada por pequeños ARN, también se las ha vinculado con funciones nucleares, incluyendo la regulación de la transcripción y la organización de la cromatina.

El objetivo central de este trabajo fue evaluar la interacción entre AGO1, el receptor de estrógeno alfa (ER α) y la ARN polimerasa II (RNAPII) en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D, bajo tratamiento con estradiol (E2). Para ello, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y análisis de Western blot tras la estimulación con E2.

Los resultados demostraron que en las líneas celulares MCF7 y T47D, E2 favorece la interacción entre AGO1 y ER α . En T47D, se observó la interacción entre AGO1 y RNAPII, confirmando la formación de un complejo tripartito entre AGO1, ER α y RNAPII, independientemente de la presencia de E2. En la línea celular MDA231, que no expresa ER α , no se detectó interacción entre AGO1 y RNAPII, lo que sugiere que ER α es necesario para estabilizar esta interacción.

Estos hallazgos proponen un nuevo modelo en el que AGO1 actúa como coactivador transcripcional, facilitando la formación de complejos transcripcionales en enhancers dependientes de estrógenos. Estos resultados tienen importantes implicaciones en la regulación génica en el contexto del cáncer de mama, y futuros estudios deberán centrarse en los mecanismos moleculares que subyacen a la formación del complejo AGO1-ER α -RNAPII y su impacto en la expresión génica dependiente de estrógenos.

Abstract

Title: “*Molecular study of the protein argonaute 1 (AGO1) in the activation of estrogen-dependent enhancers*”.

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women. The most effective treatments currently rely on affecting hormone receptors in tumors expressing them. However, a significant proportion of patients develop resistance, leading to disease progression to a metastatic state. At the molecular level, transcriptional deregulation of specific enhancers in breast tissue contributes to tumorigenesis. Furthermore, many of the combined genes mutated in breast cancer encode epigenetic regulators. Therefore, it is necessary to delve deeper into the molecular mechanisms involved in this disease to identify new therapeutic targets and develop more effective treatments for estrogen receptor (ER) positive tumors.

Recently, our group has demonstrated a non-canonical role of argonaute 1 (AGO1) as a coactivator of estrogen-induced enhancers. In this thesis, the role of AGO1 in the transcriptional activation of estrogen-dependent enhancers in breast cancer cells was investigated. Although argonaute proteins are primarily known for their cytoplasmic function in small RNA-mediated gene regulation, they have also been linked to nuclear functions, including transcription regulation and chromatin organization.

The central objective of this work was to evaluate the interaction between AGO1, the estrogen receptor alpha (ER α) and RNA polymerase II (RNAPII) in the breast cancer cell lines MCF7 and T47D, under treatment with estradiol (E2). To this end, coimmunoprecipitation assays and Western blot analysis were performed after stimulation with E2.

The results showed that in the MCF7 and T47D cell lines, E2 favors the interaction between AGO1 and ER α . In T47D, the interaction between AGO1 and RNAPII has been observed, confirming the formation of a tripartite complex between AGO1, ER α and RNAPII, independently of the presence of E2. In the MDA231 cell line, which does not express ER α , no interaction between AGO1 and RNAPII was detected, suggesting that ER α is necessary to stabilize this interaction.

These findings propose a new model in which AGO1 acts as a transcriptional coactivator, facilitating the formation of transcriptional complexes at estrogen-dependent enhancers. These results have important implications for gene regulation in the context of

breast cancer, and future studies should focus on the molecular mechanisms underlying the formation of the AGO1-ER α -RNAPII complex and its impact on estrogen-dependent gene expression.

Agradecimientos

Esta tesis me ha enseñado muchas cosas, especialmente criterio, dedicación, paciencia y crecimiento personal.

Agradezco profundamente a Alberto por brindarme la oportunidad única de realizar mi tesis en su grupo de investigación. Su experiencia me proporcionó conocimientos imprescindibles que contribuyeron a mi crecimiento como científico.

Expreso mi sincero agradecimiento a mi director, Ezequiel, por enseñarme en excelencia diversas técnicas de biología molecular, así como por guiarme en la planificación experimental, el análisis de resultados y el trabajo constante para alcanzar las metas propuestas.

Agradezco al IFIBYNE y, en especial, a aquellos compañeros de trabajo con quienes compartí la mesa: tesistas de licenciatura, becarios doctorales, posdoctorandos e investigadores. Su apoyo, tanto en la resolución de problemas como en la celebración de logros, me resultaron sumamente valiosos.

Dedico este trabajo a la memoria de mi abuela, Ana María Jácome, cuyo fallecimiento por cáncer de estómago en 2011 me inspiró la determinación de enfocar mi carrera en la biología molecular, especialmente en el estudio del cáncer y el envejecimiento humano. Doce años después, con dedicación, formación y pasión, siento que estoy cumpliendo ese propósito y me encuentro preparado para superar los desafíos venideros.

También agradezco a toda mi familia, sobre todo a mis padres por su apoyo y compañía, a mi hermano, mis amigos de cursada.

Por último, pero no menos importante, expreso mi gratitud a la UBA. El recorrido académico fue largo y desafiante en muchos momentos, me deja con una preparación de primer nivel para afrontar futuros retos intelectuales en la ciencia.

Índice

Resumen	2
Abstract	4
Agradecimientos	6
Índice	7
Introducción	8
1. Argonauta y su rol canónico	8
2. Argonauta en el núcleo celular	10
3. Cáncer de mama, los receptores esteroides y AGO1	11
Objetivos e Hipótesis	14
Materiales y Métodos	15
1. Líneas celulares y medios de cultivo	15
2. Transfección de ADN con lipofectamina	16
3. Ensayo de inmunoprecipitación (IP)	16
4. Western Blot (WB)	18
5. Análisis de imágenes en Image Studio	19
6. Anticuerpos utilizados	19
Resultados	21
1.a. Análisis de la interacción entre AGO1 y ER α en células MCF7 y T47D	21
1.b. Análisis de la interacción entre AGO1 y el receptor de progesterona (PR) en células T47D	23
1.c. Análisis de la interacción de AGO1 y ER α en un sistema heterólogo (HEK293)	24
2. Estrategias para abordar la inespecificidad en los ensayos de inmunoprecipitación (IP) de RNAPII	27
3.a Análisis de la interacción entre AGO1 y RNAPII en células T47D	29
3.b. Análisis de la formación del complejo tripartito RNAPII-AGO1-ER α en células T47D	29
3.c. Análisis de la interacción de entre AGO1 y RNAPII en MDA231	30
Discusión y Conclusiones	32
Conclusiones generales:	35
Referencias Bibliográficas	36

Introducción

1. Argonauta y su rol canónico

El ARN mensajero (ARNm) es una molécula de ARN monocatenario que almacena la información genética necesaria para la síntesis de proteínas. Su transcripción es llevada a cabo por la ARN Polimerasa II (RNAPII) a partir de una secuencia específica de ADN, conocida como gen. Funcionalmente, el ARNm actúa como un intermediario que transporta esta información desde el núcleo hasta el citoplasma, donde es traducida por los ribosomas en una proteína funcional. Además del ARNm, existen otros tipos de ARN que desempeñan funciones clave en la regulación de la expresión génica, como el silenciamiento mediado por ARN.

El mecanismo de silenciamiento génico es llevado a cabo por pequeñas moléculas de ARN no codificante, tales como los pequeños ARN de interferencia (siRNAs) y los microARNs (miRNAs) (Ender and Meister, 2010). Estas moléculas se integran al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), y lo dirigen hacia el ARNm objetivo para promover su degradación o inhibir su traducción. Durante este proceso, RISC interacciona principalmente con las proteínas argonauta (AGO), que actúan como las principales efectoras del complejo a nivel post-transcripcional (Figura 1A).

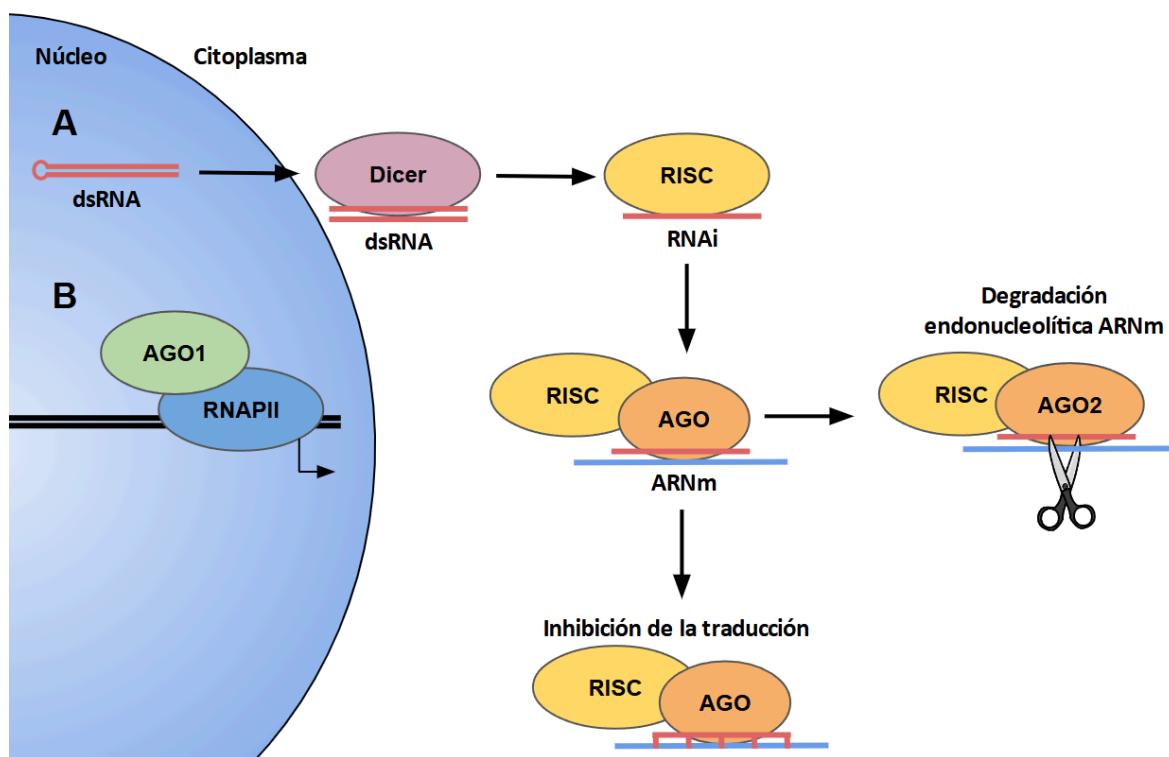


Figura 1: A. Rol canónico de las proteínas AGO en el citoplasma, las cuales pueden ser dirigidas, mediante ARNs pequeños no codificantes específicos, para inhibir la traducción o degradar el ARNm objetivo. B. Rol nuclear de AGO1 como coactivador transcripcional de la ARN polimerasa II (RNAPII).

La familia de proteínas AGO se divide filogenéticamente en tres clados principales: AGO, PIWI y WAGO, siendo este último específico de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Hutvagner and Simard 2008; Siomi et al., 2011). El número de proteínas AGO varía entre especies, desde una en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* hasta veintisiete en *C. elegans* (Tolia and Joshua-Tor, 2007). En humanos, existen cuatro miembros de la familia AGO: AGO1, AGO2, AGO3 y AGO4, de los cuales solo AGO2 posee actividad endonucleasa, necesaria para la degradación endonucleolítica de los ARNm objetivo (Meister 2013). Las proteínas AGO contienen varios dominios funcionales conservados: el dominio PAZ, que se une al extremo 3' de los ARN pequeños, y el dominio PIWI, responsable de la actividad endonucleasa en AGO2 (Meister, 2013). Además, el dominio MID interactúa con el extremo 5' del ARN guía facilitando el reconocimiento y emparejamiento con el ARNm objetivo, mientras que el dominio N-terminal está implicado en la interacción con otros componentes del complejo RISC (Figura 2) (Peters and Meister, 2007).



Figura 2: Esquema representativo de la estructura de dominios de las proteínas AGO, utilizando como modelo la proteína AGO1 de humano.

2. Argonauta en el núcleo celular

Además de su función canónica citoplasmática, se ha demostrado que las proteínas AGO también están implicadas en la regulación de diversas funciones nucleares, tales como la transcripción, la topología de la cromatina y el *splicing* (Alló et al., 2009; Nazer et al., 2018a; Nazer et al., 2018b; Shuaib et al., 2019; Xu C et al., 2021; Fallatah et al., 2021). Cabe destacar que estas funciones nucleares están conservadas evolutivamente en distintos organismos modelos, como *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* y humanos.

En *A. thaliana*, se ha observado que AtAGO1 se asocia tanto con los sitios de inicio de la transcripción (TSS) como con los sitios de corte y poliadenilación (pA) (Liu et al., 2018). De manera similar, en *D. melanogaster*, dAGO2 (ortóloga estructural de AGO1 en humanos) también interacciona con los TSS, modulando la estructura cromatínica y regulando la transcripción de genes específicos (Nazer et al., 2018a). Esta asociación de las proteínas AGO con los TSS sugiere la existencia de un mecanismo conservado entre diferentes especies. Además, AtAGO1 regula la transcripción de programas génicos en respuesta a diferentes estímulos, como hormonas vegetales y estrés ambiental, a través del reclutamiento de la RNAPII fosforilada en serina 2 (Ser2P) y serina 5 (Ser5P). Esto sugiere que AtAGO1 participa en la modulación del ciclo transcripcional, especialmente en el procesos de iniciación de la transcripción (Liu et al. 2018).

En *D. melanogaster*, dAGO2 se asocia preferentemente con loci transcripcionalmente activos y regula la transcripción interactuando con la maquinaria transcripcional, facilitando la liberación de la pausa cercana al promotor (Cernilogar et al. 2011). A su vez, dAGO2 promueve la activación transcripcional al favorecer la formación de bucles cromatínicos entre el enhancer y el promotor (Moshkovich et al. 2011). Más recientemente, se ha demostrado que dAGO2 modula la elongación de la RNAPII. (Nazer et al., 2018a; Nazer et al., 2018b). En humanos, y en consonancia con lo observado en *A.thaliana* y *D. melanogaster*, AGO1 se asocia con promotores activos y colabora con la maquinaria transcripcional para potenciar la transcripción en células tumorales de cáncer de próstata (PC3) (Figura 1B) (Huang et al., 2013). En contraste, no se ha detectado una

asociación significativa entre AGO2 y la cromatina. Además, se ha demostrado que AGO1, pero no AGO2, co-inmunoprecipita con la RNAPII de manera dependiente del ADN e independiente del ARN (Huang et al., 2013). Esto sugiere que la interacción de AGO1 con el complejo transcripcional ocurre cuando ambas proteínas están asociadas con la cromatina.

Estudios recientes han revelado que AGO1 regula la expresión génica al modular la arquitectura de la cromatina en células tumorales de cáncer de hígado humano (HepG2), destacando su papel en la organización tridimensional del genoma y en la transcripción mediada por enhancers (Shuaib et al., 2019). Estos hallazgos en HepG2 son consistentes con investigaciones realizadas por nuestro grupo en líneas tumorales de cáncer de mama, donde hemos demostrado que AGO1 participa en la regulación de la transcripción y la organización tridimensional de la cromatina (Gómez Acuña et al., 2020).

3. Cáncer de mama, los receptores esteroides y AGO1

El cáncer de mama es el más frecuente entre mujeres a nivel mundial y se caracteriza por su heterogeneidad clínica y en la respuesta a los tratamientos. Se clasifica en subtipos basados en la expresión de receptores hormonales esteroideos, como el receptor de estrógeno (ER) y el de progesterona (PR), los cuales actúan como reguladores clave de la transcripción en respuesta a sus ligandos (Tecalco-Cruz et al., 2017). En particular, el receptor de estrógenos alfa (ER α) interactúa con la hormona esteroidea estradiol (E2), promoviendo la progresión del cáncer de mama (Tecalco-Cruz et al., 2017).

El E2, debido a su naturaleza liposoluble, puede atravesar pasivamente la membrana plasmática. Una vez en el interior de la célula, se une a ER α , lo que induce la formación de un complejo receptor-ligando que dimeriza con otro complejo de ER α -E2, provocando un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear en ER α . Este cambio permite que el complejo ER α -E2 interaccione con proteínas citoplasmáticas que facilitan su transporte al núcleo.

En el núcleo, el complejo ER α -E2 actúa como un factor de transcripción, uniéndose a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Figura 3). Esta unión activa la transcripción de genes clave en la proliferación, supervivencia y metástasis de las células cancerosas de mama (Tecalco Cruz et al., 2017).

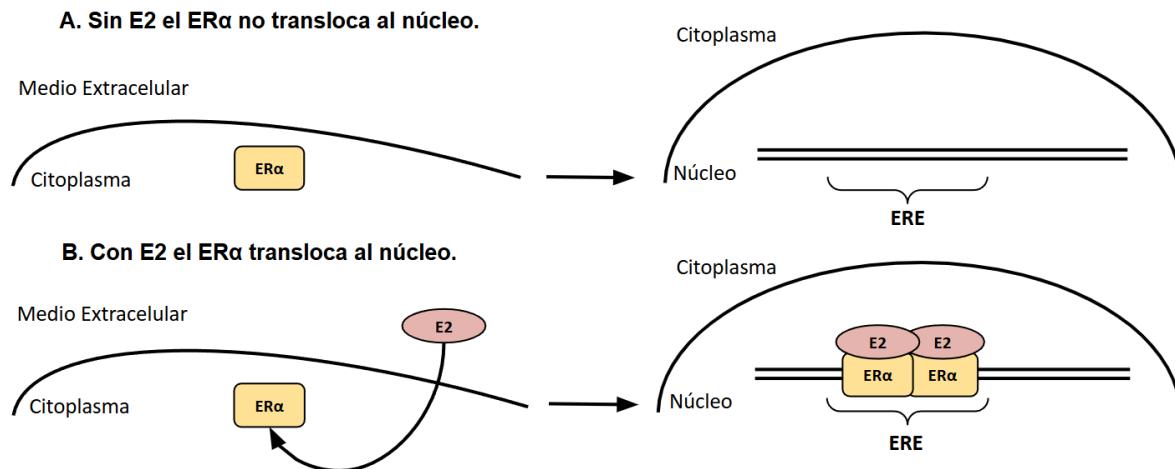


Figura 3: A. En ausencia de E2, el ER α permanece inactivo y no transloca al núcleo. B. El ER α , tras unirse al E2, forma un homodímero que se traslota al núcleo donde se asocia con elementos de respuesta específicos a estrógenos (ERE), actuando como factor de transcripción.

En este contexto, se ha identificado que las proteínas AGO interactúan con los receptores de estrógeno. Se ha reportado que AGO2 se asocia con el receptor de estrógeno beta (ER β) (otra isoforma del ER) en el núcleo de las células tumorales de cáncer de mama humano (MCF7), y que esta interacción depende de ARN (Tarallo et al., 2017). Esta asociación es fundamental para regular la transcripción, modulando la expresión de genes implicados en la progresión del cáncer de mama (Tarallo et al., 2017).

El grupo del cual soy parte, ha demostrado que AGO1 se asocia con enhancers y que esta interacción es dependiente de la transcripción activa (Alló et al., 2014). Además, hemos identificado por primera vez que AGO1 se asocia preferentemente con enhancers dependientes de ER α , y que esta asociación se intensifica con el tratamiento con E2 (Gómez Acuña et al., 2020). También hemos informado que la disminución de AGO1 impacta negativamente en la transcripción de estos enhancers y en la formación de bucles cromatínicos entre los enhancers de ER α y sus genes objetivo. Estos hallazgos sugieren que AGO1 actúa como un coactivador clave en la transcripción de enhancers dependientes de E2, afectando tanto la topología de la cromatina como la regulación de la respuesta a estrógenos en líneas tumorales de cáncer de mama (Figura 4) (Gómez Acuña et al., 2020).

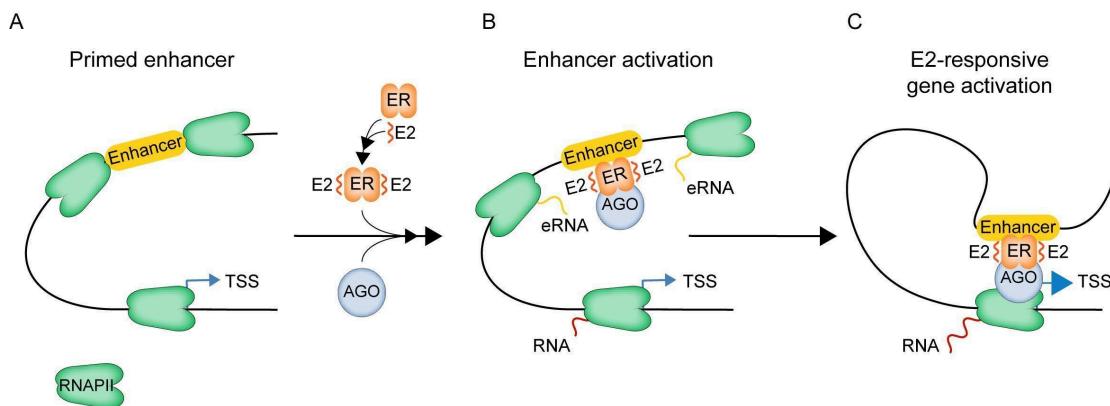


Figura 4: Modelo propuesto del papel de AGO1 como coactivador de la transcripción dependiente de estrógenos en células de la línea celular MCF7. En esta ilustración se representa el enhancer ARN (eRNA) transcrita por la RNAPII, que también está presente en el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Basado en Gómez Acuña et al. (2020).

Considerando el papel de AGO1 como coactivador transcripcional de enhancers respondedores a E2, esta tesina se enfoca en validar la interacción entre AGO1 y ER α en diferentes líneas tumorales de cáncer de mama, así como en explorar si AGO1 también se asocia con la RNAPII. Parte de estos hallazgos fueron presentados en el Simposio Internacional de Cáncer de Mama de Buenos Aires, durante el mes de septiembre de 2024 bajo la modalidad poster.

Objetivos e Hipótesis

La hipótesis central es que AGO1 actúa como coactivador transcripcional de enhancers dependientes de estrógenos, interactuando con ER α y potencialmente con RNAPII.

La validación de esta hipótesis permitirá profundizar en el conocimiento del papel molecular de AGO1 en la regulación de los programas génicos mediados por ER α en el contexto del cáncer de mama.

En este marco, se plantearon los siguientes objetivos específicos para esta Tesina de Licenciatura:

- **Objetivo específico 1:** Caracterizar la interacción entre AGO1 y el ER α en diversas líneas celulares tumorales de cáncer de mama.
- **Objetivo específico 2:** Evaluar la formación del complejo AGO1-RNAPII en líneas celulares tumorales de cáncer de mama.

Materiales y Métodos

1. Líneas celulares y medios de cultivos

La línea celular MCF7 está constituida por células epiteliales de adenocarcinoma de glándula mamaria humana. La línea T47D, por células epiteliales derivadas de un carcinoma ductal de glándula mamaria humana. Las línea MDA231 está constituida por células de cáncer de mama estables que no expresan de forma endógena al ER α . La línea HEK293 son células epiteliales derivadas del riñón embrionario humano. Las cuatro líneas celulares son adherentes y fueron cultivadas en placas p100 en medio de cultivo completo con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con rojo fenol y 10% (v/v) de suero fetal bovino, antibióticos (100 μ g/ml final de penicilina y 100 μ g/ml final de estreptomicina). Entre 4 a 5 millones de células corresponden a una placa p100 confluente.

El procedimiento de mantenimiento de las células implica que, antes de que éstas alcancen la confluencia deseada, se aspira el medio completo de cultivo. Luego, se añade 1 mL de tripsina al 2,5% p/v e incuba a 37°C en estufa con 5% de CO₂ durante tres minutos. Para detener la reacción, se incorporan 9 mL de medio completo. Posteriormente, se plaquea en una nueva placa p100 según el experimento a realizar, llevando el volumen final a 10 mL con medio completo.

El medio hambreado consiste en remover las hormonas esteroideas presentes en el suero y el rojo fenol (indicador de pH) que posee el medio completo, ya que activa la vía de señalización de estradiol, de esta forma cuando se tiene la confluencia deseada se cambia de medio completo a hambreado, para mantener el número de células totales necesarias sin ser comprometida la activación de la vía de señalización del estradiol. El medio hambreado, se compone por suero fetal bovino charcolizado al 1%, el cual está desprovisto de hormonas esteroideas sin rojo fenol. El protocolo de preparación de las líneas celulares para el tratamiento con estradiol fue:

Las placas p100 confluentes fueron sometidas a un protocolo de preparación y tratamiento específico. Inicialmente, se aspiró completamente el medio de cultivo. Luego, se lavaron las células tres veces con 1 mL de buffer salino de fosfato (PBS) (1X, pH = 7,4), agitando suavemente en cada lavado. Posteriormente, se añadieron 10 mL de medio hambreado y se incubaron las células durante 72 horas a 37°C en una estufa con una atmósfera controlada de 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación, se agregó E2 a una concentración final de 100 nM y se incubó por 1 hora. Finalmente, se procedió a lisar las

células para su posterior análisis. Este proceso fue repetido según las necesidades experimentales.

2. Transfección de ADN con lipofectamina

Las células HEK293 fueron transfectadas con plásmidos utilizando *Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)* en medio *Opti-MEM™ (Invitrogen)*, según las instrucciones del fabricante. Utilizando una relación 1:3, siendo 2 µg de ADN plasmídico para 6 µL de lipofectamina. Para la transfección de ADN plasmídico se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Se añadieron 2 µg de ADN plasmídico en un tubo eppendorf de 2 mL y se agregaron 500 µL de medio Opti-MEM™ 1X. En un nuevo tubo eppendorf, se mezclaron 500 µL de medio Opti-MEM™ con 6 µL de lipofectamina. Luego, el contenido del tubo que contenía el ADN plasmídico se transfirió al tubo con lipofectamina y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos lipofectamina-ADN. Tras la incubación, se añadieron por goteo 1 mL de los complejos lipofectamina-ADN para cada plásmido diferente en las placas p60 y se dejó incubar durante 48 horas.

Vectores de expresión utilizados:

- **pIRESneo-FLAG/HA-Ago1:** Las secuencias de AGO1 y AGO1^{Y527E} se encuentran fusionadas a los tags FLAG y HA en el extremo N-terminal, utilizando vectores separados para cada secuencia, bajo el control del promotor constitutivo CMV (Addgene #10820).
- **pSG1-HEGO:** La secuencia que codifica al gen del ERα se encuentra bajo el control del promotor constitutivo SV40 (Tora et al., 1989).

3. Ensayo de inmunoprecipitación (IP)

Se analizó la interacción entre proteínas endógenas en células MCF7, T47D y MDA231 como construcciones de proteínas transfectadas en HEK293. Las células fueron cosechadas luego de ser tratadas con E2. Para la preparación y análisis de muestras celulares mediante inmunoprecipitación, se siguió el siguiente protocolo:

Se aspiró el medio de cultivo de la placa p100 de células y se lavaron dos veces con 1 mL de PBS. Las células se recolectaron mediante raspado (scrapping) y la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 1,5 mL (de ahora en adelante tubo “eppendorf”). Se centrifugó la muestra a 10.000 g durante 30 segundos y se aspiró el sobrenadante con una

bomba de vacío. Se añadieron 500 µL de Buffer Lisis al pellet de células, homogenizando e incubando en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, la fragmentación del ADN se realizó mediante sonicación de las muestras en un Branson 450 durante 10 segundos al 20% de potencia. Luego, los lisados se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 500 µL del sobrenadante, correspondiente al extracto total, y se transfirieron a un nuevo tubo eppendorf, reservando 30 µL como input.

Para la inmunoprecipitación, se añadió el volumen adecuado de anticuerpo que reconoce la proteína de interés al extracto total, incubando durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se tomaron 25 µL de matriz de sefarosa acoplada a proteína A (*Protein A Sepharose™ Fast Flow de GE*) por cada tubo de eppendorf para la IP. La suspensión de proteína A se lavó con 1 mL de Tris-buffered saline (TBS) 1X, se vortexeó y se centrifugó a 10,000 g durante 10 segundos, eliminando el TBS con una bomba de vacío. Este proceso de lavado se repitió tres veces y luego se diluyó al medio con Buffer Lisis.

Se tomaron 50 µL de la suspensión final y se añadieron a cada uno de los tubos eppendorf incubados previamente con el anticuerpo primario. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación constante. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 g durante 10 segundos y el sobrenadante fue removido por vacío. Se añadió 1 mL de TBS a cada muestra y se sometió a rotación durante 5 minutos., repitiendo este proceso de lavado por un total de tres veces. Se eliminó el exceso de líquido con una aguja hipodérmica 23G. Finalmente, el input y el inmunoprecipitado se analizaron mediante Western Blot para evaluar la presencia de la proteína de interés.

Durante el protocolo de inmunoprecipitación descrito previamente, se realizaron dos pasos adicionales por la presencia de una banda inespecífica en los controles inmunoglobulinas G.

Primer paso adicional:

- Armar una solución tomando una alícuota de la matriz de sefarosa acoplada del tipo proteína G y A, este paso se llama pre-clearing.
- A cada extracto celular se lo incubó por rotación a temperatura ambiente por 15 minutos, previo a la incubación con anticuerpos primarios (las proteínas que generan uniones inespecíficas con la sefarosa acoplada del tipo proteína G y A se remueven de esta forma).

Segundo paso adicional:

- Previo al último lavado de TBS del protocolo de inmunoprecipitación, transferir el sobrenadante a tubos nuevos (suponiendo que el plástico de los eppendorfs interactúa con proteínas responsables de la banda inespecífica).

Soluciones Buffer usadas durante el protocolo de inmunoprecipitación:

- **Buffer Lisis:** TBS 1X y Tritón X-100 0,5 % (v/v).
- **Buffer PBS (1X, pH = 7.4):** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM y H₂O c.s.p. 1 L.
- **Buffer TBS (1X):** Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, NaCl 150 mM y H₂O c.s.p. 1 L.

4. Western Blot (WB)

Las muestras proteicas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (p/v), de un espesor de 1,5 mm, bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Para la preparación del gel de poliacrilamida de separación al 10% (10 mL) se añadieron 4 mL de agua destilada, 2,5 mL de buffer de Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8), 3,3 mL de una solución de acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida al 0,8% (p/v), 10 µL de TEMED, 100 µL de SDS al 10% (p/v), y 100 µL de persulfato de amonio al 10% (p/v). Para el gel de poliacrilamida de concentración de muestra ("stacking") (4 mL) se añadieron 3 mL de agua destilada, 1,25 mL de buffer de Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8), 0,65 ml de una solución de acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida al 0,8% (p/v), 10 µL de TEMED, 50 µL de SDS al 10% (p/v), y 50 µL de persulfato de amonio al 10% (p/v).

Se agregó una dilución al medio de Cracking Buffer 2X a cada tubo eppendorf de las muestras inmuprecipitadas e input según correspondía. Se calentaron las muestras a 95°C durante 5 minutos. Luego, se sembraron 20 µL de la muestra en cada calle del gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Se sembraron 3 µL del marcador de pesos moleculares "*Precision Plus Protein Standards*" de Bio-Rad, que genera bandas desde 250 kDa a 25 kDa. Se ajustó la corrida electroforética a 200 voltios en 1 L de Buffer de corrida durante 1 hora, en una cuba de electroforesis (*mini Protean, BioRad*).

Posteriormente, se transfirieron las proteínas separadas por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (*Amersham™ Protan™*). La transferencia se realizó durante toda la noche a 30 voltios en frío y con 1 L de Buffer de transferencia. Luego, se bloquearon las membranas de nitrocelulosa transferidas durante 1 hora a temperatura

ambiente en una solución al 5% (p/v) de leche descremada en TTBS 1X. Se incubaron las membranas con el anticuerpo primario diluido 1:1000 en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Se lavaron las membranas 3 veces con TTBS con rotación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se disolvió el anticuerpo secundario 1:10000 en la misma solución de bloqueo y se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios estaban acoplados a fluoróforos con emisión en el infrarrojo cercano a 800 nm. Se lavaron las membranas 3 veces con TTBS en rotación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se dejaron secar las membranas en oscuridad y se analizaron en el equipo Odyssey de Li-Cor.

Soluciones Buffer usadas durante el protocolo de Western Blot:

- **Buffer de corrida:** Tris-glicina 1X, SDS 1% (p/v) y H₂O c.s.p. 1 L.
- **Buffer de transferencia:** 20% metanol (v/v), Tris-glicina 1X y H₂O c.s.p. 1 L.
- **Buffer TTBS (1X):** TBS 1X, Tween20 0,05 % (v/v) y H₂O c.s.p. 1 L.
- Solución de Bloqueo: leche descremada en polvo 5% (p/v) y TTBS 1X c.s.p. 25 mL.
- **Cracking Buffer (2X):** 0,31 M Tris (pH=6,8), SDS 1% (p/v), 25% glicerol (v/v), 0,05% (p/v) azul de bromofenol y 10% (v/v) Beta-mercaptopropanoalcohol.

5. Análisis de imágenes en Image Studio

Para el análisis de las imágenes obtenidas durante el estudio, se utilizó el Image Studio, una herramienta especializada en el procesamiento y análisis de imágenes en el ámbito de la biología molecular. Este software permite la visualización, cuantificación y análisis de diferentes parámetros de las imágenes, como la densidad de bandas en geles de electroforesis o la intensidad de fluorescencia en imágenes de Western Blot. Además, Image Studio ofrece diversas herramientas de procesamiento de imágenes, como ajuste de brillo y contraste, corrección de fondo y alineación de imágenes para comparaciones cuantitativas.

6. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos utilizados para el paso de incubación de la IP y para la incubación del anticuerpo primario del Western Blot, todos con una dilución de 1:1000.

Hechos en conejo:

- RPB1: Monoclonal, Cell Signaling (#14958S).

- AGO1: Monoclonal, Cell Signaling (Argonaute 1 (D84G10) XP® Rabbit mAb #5053).
- HA: Polyclonal, Sigma (#H6908).
- Progesterona: Monoclonal, Cell Signaling Receptor A/B (D8Q2J) XP® mAb #8757.
- IgG normal: Cell Signaling (Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control #3900).

Hechos en rata:

- AGO1: Monoclonal, Sigma (#SAB4200084).
- IgG normal: bio-techne (Rat (IgG2B) Isotype Control #MAB0061).

Hecho en raton:

- ER α : Monoclonal, Santa Cruz (#SC-8002).
- FLAG: Monoclonal, Sigma (#F1804).
- IgG normal: Cell Signaling (Mouse (G3A1) mAb IgG1 Isotype Control #5415).

Resultados

1.a. Análisis de la interacción entre AGO1 y ER α en células MCF7 y T47D

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que AGO1 se asocia con enhancers activos en células de cáncer de mama, actuando como coactivador transcripcional del ER α en la regulación génica dependiente de estrógenos (Gómez Acuña et al., 2020). La interacción entre AGO1 y ER α es particularmente relevante, ya que facilita la formación de bucles cromatínicos entre enhancers y sus respectivos promotores, un proceso clave para la activación génica mediada por estradiol (E2) en el cáncer de mama. Para profundizar en el rol molecular de AGO1 y su relación con el ER α , esta tesis se propone estudiar dicha interacción en diversas líneas tumorales de cáncer de mama. El procedimiento experimental se detalla en la Figura 5.

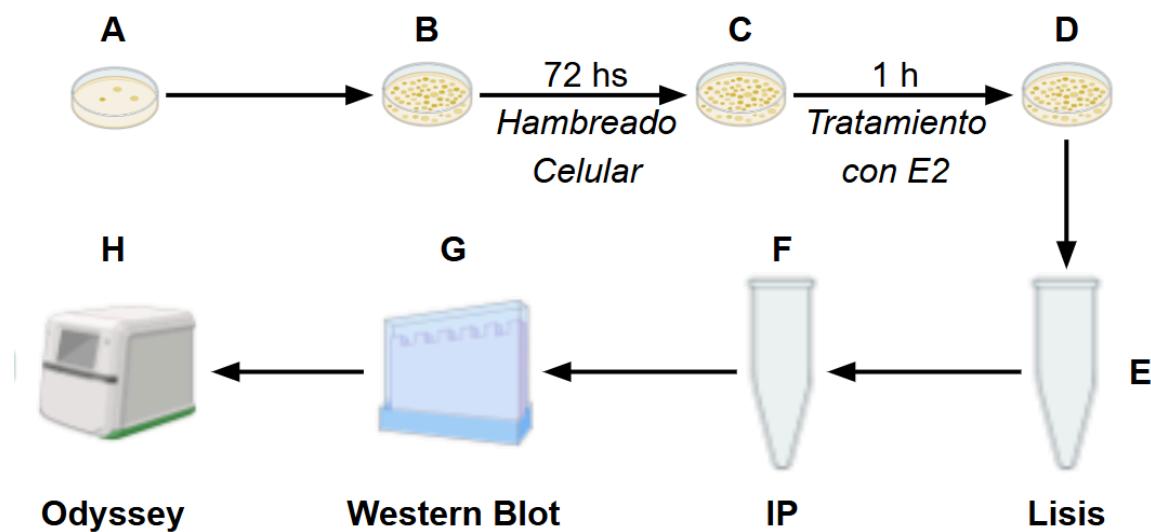


Figura 5: Diagrama de flujo que ilustra las técnicas de biología molecular empleadas en cada experimento realizado a lo largo de esta tesis.

En cuanto al diseño experimental, una vez que las células alcanzan la confluencia celular necesaria, se retira el medio completo y se reemplaza por un medio “blanco” de hambreado durante 72 horas (ver detalles en la sección 1 de Materiales y Métodos). Este enfoque busca minimizar la cantidad de suero utilizada, permitiendo mantener la viabilidad celular mientras se desactiva la vía de señalización del E2. Además, se emplea un medio de cultivo sin rojo fenol, ya que este compuesto puede actuar como un análogo funcional de los

estrógenos. Por estas razones, el hambreado se realiza en medio sin rojo fenol (medio “incoloro”) y con suero fetal bovino charcolizado, carente de hormonas esteroideas. Este protocolo garantiza que cualquier diferencia observada en la interacción entre AGO1 y ER α sea atribuible específicamente al efecto del E2.

Como primera aproximación, se verificó la interacción entre AGO1 y ER α mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) en la línea celular MCF7, tanto en células no estimuladas como tratadas con E2 (Figura 6). Para ello, se utilizó un anticuerpo específico contra AGO1 y se realizó la Co-IP a partir de extractos proteicos totales. Se emplearon inmunoglobulinas G (IgG) normales como control, asegurando la especificidad del ensayo y evitando que cualquier señal observada fuera el resultado de uniones inespecíficas de anticuerpos o proteínas no relacionadas.

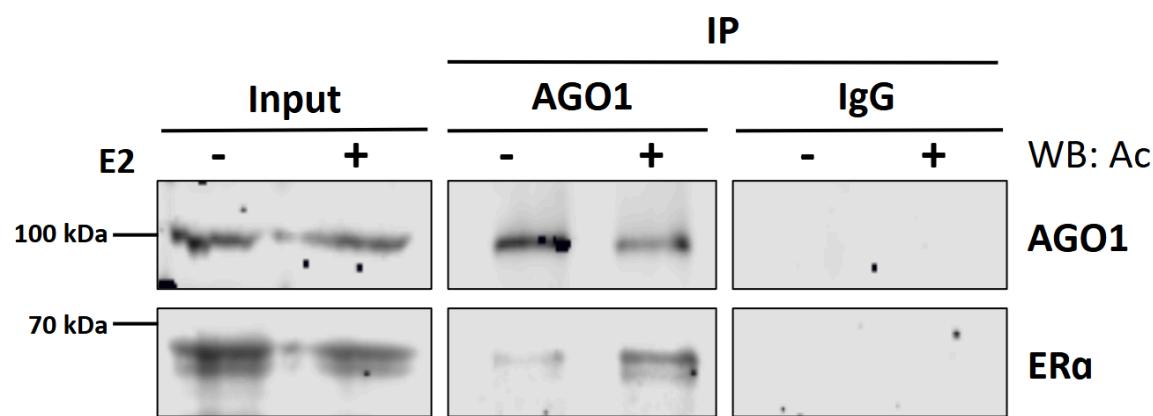


Figura 6: Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) entre AGO1 y ER α en células MCF7, tanto en condiciones no estimuladas como tratadas con E2.

Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que AGO1 forma un complejo con ER α , cuya interacción se intensifica en presencia de E2. Esto sugiere que la presencia de estrógenos estabiliza la asociación entre AGO1 y ER α . Para profundizar en la caracterización de este complejo, se realizó un ensayo similar en la línea celular T47D, que también expresa ER α . Los resultados obtenidos en T47D fueron consistentes con los observados en MCF7, reforzando la idea de que esta interacción es favorecida por E2 en distintas líneas celulares de cáncer de mama (Figura 7.A).

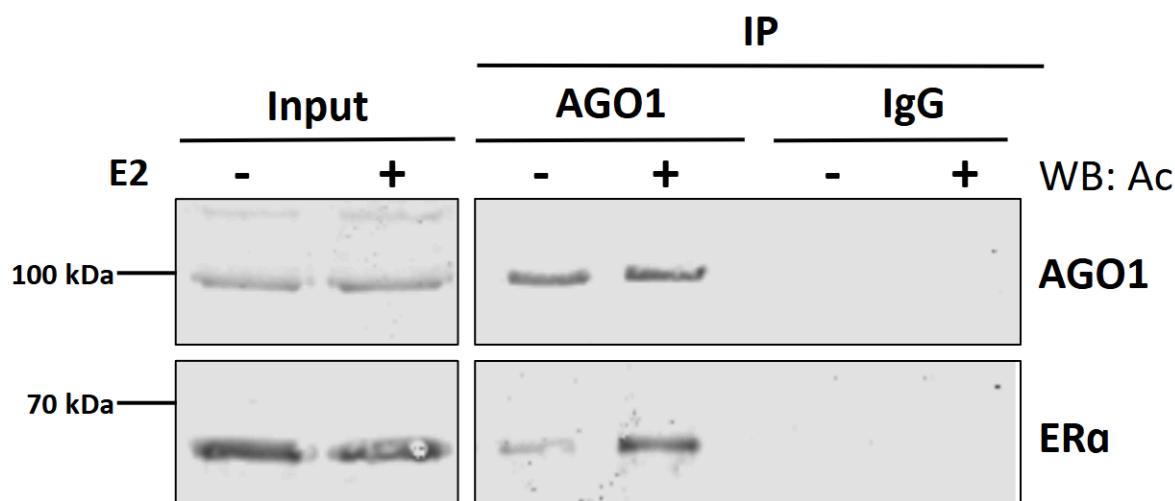


Figura 7.A: Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) entre AGO1 y ER α en células T47D, tanto en condiciones no estimuladas como tratadas con E2.

En conjunto, esta estrategia permitió validar la consistencia de los resultados, confirmando que la formación del complejo AGO1-ER α no está restringida a la línea celular MCF7, sino que también ocurre en la línea celular T47D. Es relevante destacar que, en ambas líneas celulares, el tratamiento con E2 favorece significativamente la interacción entre AGO1 y ER α en comparación con las condiciones no estimuladas (Figuras 6 y 7.A), lo que subraya la dependencia de esta interacción respecto a la presencia de estrógenos.

1.b. Análisis de la interacción entre AGO1 y el receptor de progesterona (PR) en células T47D

En estudios anteriores, nuestro grupo demostró que AGO1 colocaliza, aunque en menor grado, con regiones del genoma asociadas a otros receptores nucleares, como el receptor de progesterona PR, que también puede interactuar con ER α (Mohammed et al., 2015; Gomez Acuña et al., 2020). Sobre la base de estos antecedentes, nos propusimos investigar si AGO1 también forma un complejo con las dos isoformas del receptor de progesterona (PR-A y PR-B, de 90 kDa y 120 kDa, respectivamente).



Figura 7.B: Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) entre AGO1 y las isoformas A y B del receptor de progesterona (PR) en células T47D, tanto en condiciones no estimuladas como tratadas con E2.

Tal como se observa en la Figura 7.B, en la línea celular T47D AGO1 interactúa con ER α , pero no se detecta la formación de un complejo con ninguna de las isoformas de PR bajo las condiciones experimentales empleadas. Estos hallazgos sugieren que la interacción entre AGO1 y ER α es específica y no se extiende a otros receptores nucleares, como el receptor de progesterona.

1.c. Análisis de la interacción de AGO1 y ER α en un sistema heterólogo (HEK293)

Para profundizar en la caracterización de la interacción entre AGO1 y ER α , se exploró la posibilidad de reproducir dicha interacción en una línea celular humana no relacionada con el cáncer de mama, específicamente en HEK293. Esta línea, derivada de células embrionarias de riñón, no expresa ER α de forma endógena y es frecuentemente empleada como sistema heterólogo de expresión por su alta eficiencia en la transfección.

Se investigó la capacidad de regenerar el complejo AGO1-ER α mediante la transfección transitoria de ER α y la versión salvaje de AGO1. Paralelamente, se utilizó una mutante puntual, AGO1^{Y527E}, para evaluar si la formación del complejo AGO1-ER α dependía de la habilidad de AGO1 para interactuar con ARNs pequeños (Figura 8) (Peters and Meister, 2007). Como control negativo, las células se transfecaron con un vector vacío ("Mock"), sin las construcciones de AGO1, para asegurar la especificidad de las interacciones observadas en los ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP).

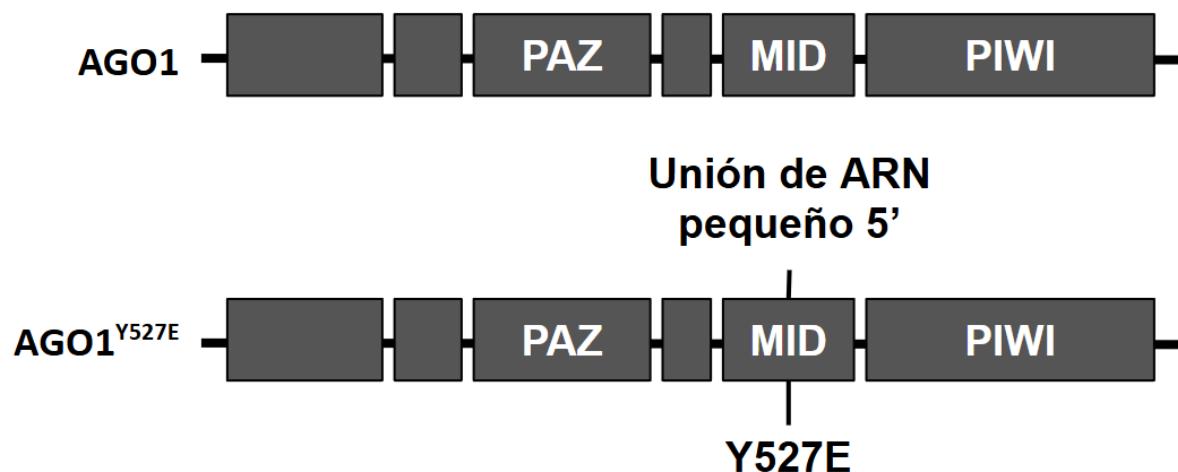


Figura 8: Dominios de la proteína AGO1 y AGO1^{Y527E} humana.

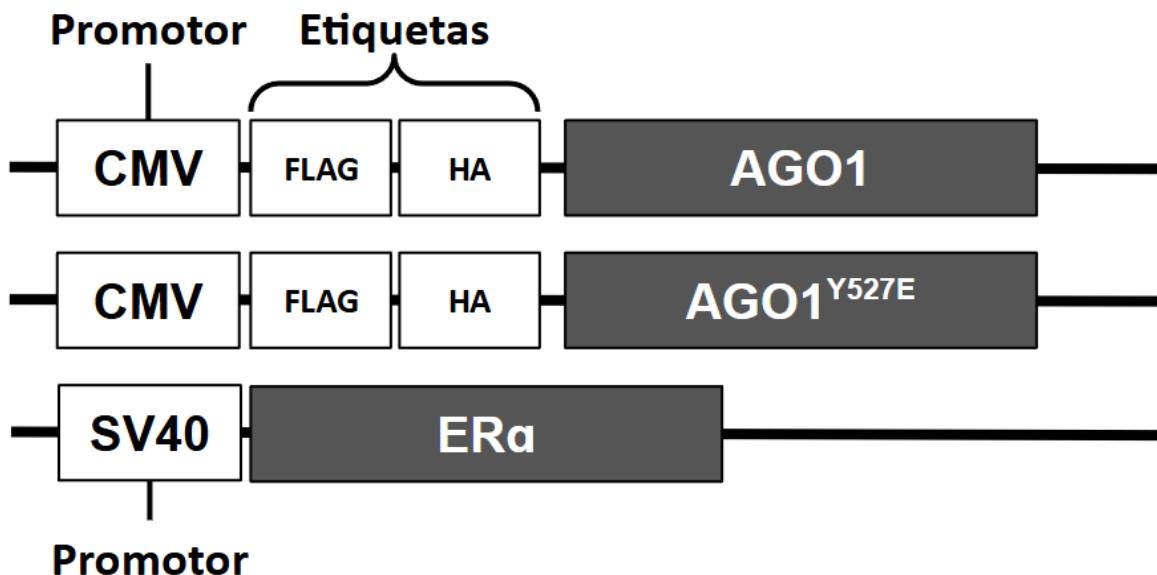


Figura 9: Esquema de construcciones de expresión para AGO1, AGO1^{Y527E} y ERα en vectores separados. Los vectores de AGO1 y AGO1^{Y527E} están fusionados a los epítopes FLAG y HA en el extremo N-terminal bajo el control del promotor constitutivo CMV. La expresión de ERα está dirigida por el promotor constitutivo SV40. Estos vectores se utilizaron en células HEK293, como sistema heterólogo, para evaluar la formación del complejo tanto en condiciones no estimuladas como tratadas con E2.

Es fundamental señalar que las construcciones AGO1 y AGO1^{Y527E} están etiquetadas con epítopes HA y FLAG. La ventaja de utilizar ambas etiquetas radica en la posibilidad de llevar a cabo la co-inmunoprecipitación (Co-IP) empleando un anticuerpo monoclonal anti-HA, seguido de un Western Blot (WB) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Figura 9). Esta estrategia de doble etiquetado incrementa la robustez de los resultados, ya

que permite confirmar que las bandas detectadas corresponden efectivamente a las proteínas de interés, minimizando la posibilidad de artefactos inespecíficos.



Figura 10: Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) entre las construcciones de AGO1 y ER α en células HEK293 no tratadas con E2.

En la Figura 10, se observa que, en ausencia de E2, tanto AGO1 como AGO^{Y527E} son eficientemente inmunoprecipitadas; sin embargo, ER α no interactúa con estas construcciones. Como control, la presencia de las proteínas AGO1, AGO^{Y527E} y ER α en el “Input” demuestra que la transfección fue exitosa para todas las construcciones analizadas.

Adicionalmente, se evaluó si la presencia de E2 favorece la interacción entre AGO1 y ER α , siguiendo el mismo esquema experimental en células tratadas con E2, como se indica en la Figura 11. En este contexto, se observa que ER α co-inmunoprecipita con AGO1, sugiriendo que E2 promueve la formación de la interacción entre ambas proteínas. Asimismo, la mutante puntual AGO1^{Y527E} también muestra interacción con ER α . En conjunto, estos resultados indican que AGO1 y ER α podrían interactuar directamente en presencia de E2, independientemente de la capacidad de AGO1 para unirse a ARNs pequeños.

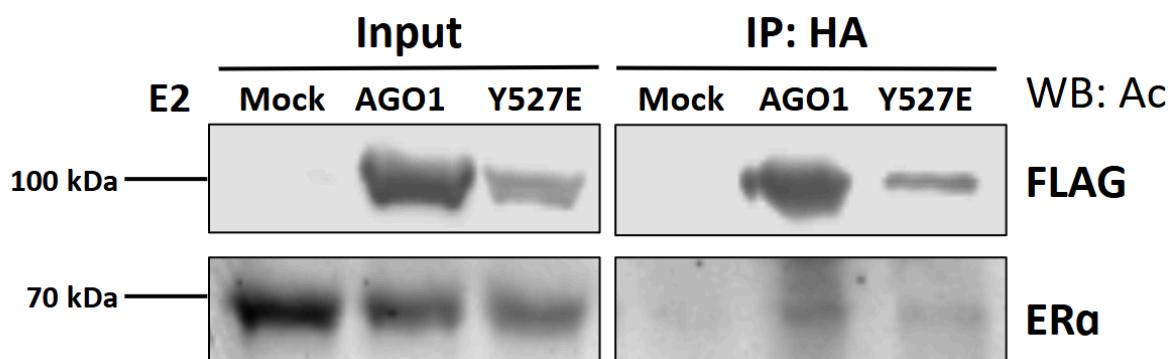


Figura 11: Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) entre AGO1 y el ER α en células HEK293 tratadas con E2.

2. Estrategias para abordar la inespecificidad en los ensayos de inmunoprecipitación (IP) de RNAPII

Hasta este punto, los experimentos se han centrado en validar la formación del complejo AGO1-ER α en diferentes líneas celulares tumorales de mama tratadas con E2. A continuación, abordaremos el siguiente objetivo específico de esta tesis: evaluar la formación del complejo AGO1-RNAPII. Para ello, se replicó el mismo diseño experimental utilizado en los ensayos anteriores. Sin embargo, varios experimentos se vieron comprometidos debido a un problema recurrente: durante la inmunoprecipitación con el control negativo de IgG normal, se detectó una banda inespecífica correspondiente a una proteína de aproximadamente 250 kDa, coincidiendo con el peso molecular de la RNAPII. La Figura 12 muestra un ejemplo de uno de estos experimentos afectados.

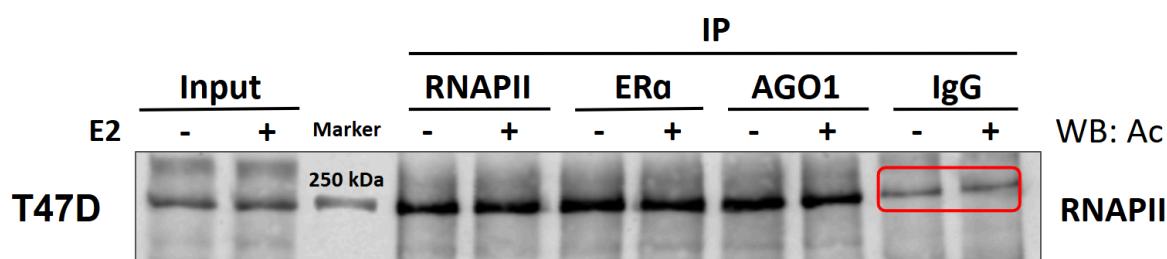


Figura 12: Ejemplo de un experimento de co-inmunoprecipitación que muestra una banda inespecífica a la altura de la RNAPII en el control negativo IgG normal, destacado en rojo.

La presencia persistente de esta banda inespecífica en los controles de IgG normal llevó a realizar una serie de ensayos adicionales para abordar este inconveniente. Una de las estrategias implementadas fue la introducción de un paso de "pre-clearing" en el protocolo de inmunoprecipitación. Este paso consistió en añadir una mezcla de matriz de sefarosa acoplada a proteínas G y A a los extractos celulares antes de la incubación con los anticuerpos de inmunoprecipitación (IP) (ver sección 3 de Materiales y Métodos). El objetivo era eliminar las proteínas que pudieran unirse a estas matrices. Sin embargo, a pesar de esta modificación, la banda inespecífica continuó apareciendo en los controles de IgG normal.

Adicionalmente, se realizó un cambio de tubos en el último lavado de los complejos inmunoprecipitados, planteando la hipótesis de que el plástico de los tubos "eppendorf" pudiera estar interactuando con la proteína responsable de la banda inespecífica. No obstante, incluso con este cambio, la banda inespecífica persistió en los controles de IgG normal en cada inmunoprecipitación realizada.

Finalmente, se optó por llevar a cabo una inmunoprecipitación sin anticuerpo primario, utilizando únicamente la matriz de sefarosa acoplada a proteína G, siguiendo las recomendaciones de la literatura para la especie de IgG utilizada. En la Figura 13, se observa la banda inespecífica en la calle 4, correspondiente a una IP sin anticuerpo primario (sin Ac). Además, en las calles 6 y 7, donde se utilizó IgG normal de otras especies con proteína G, también se detectó la banda inespecífica a la altura de la RNAPII. Sin embargo, en la calle 5, donde se usó IgG normal de conejo con sefarosa acoplada a proteína A, no se observó ninguna banda, lo que confirma la validez del control negativo.

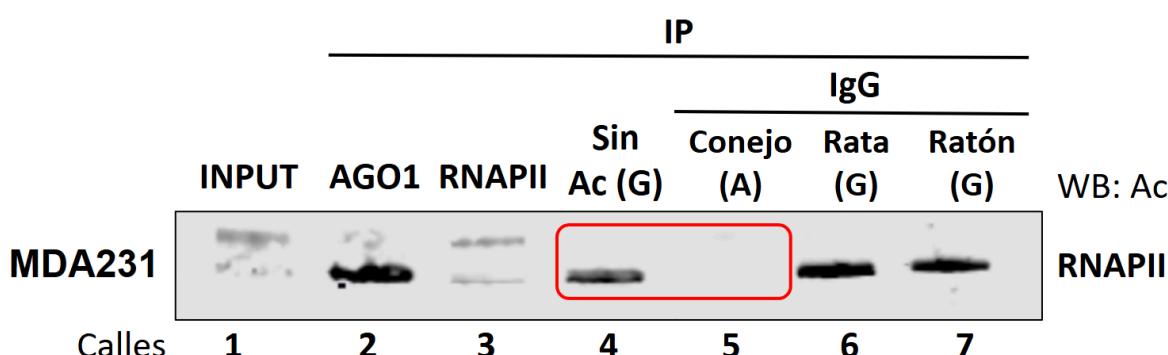


Figura 13: Evaluación de la banda inespecífica en los controles IgG a la altura de la RNAPII. Se utilizó sefarosa acoplada a proteína G en todas las inmunoprecipitaciones (IP), excepto en la calle 5, donde se empleó sefarosa acoplada a proteína A.

En conjunto, estos resultados validaron la especificidad del anticuerpo primario de conejo para la IP de RNAPII (calle 3) y permitieron concluir que las bandas inespecíficas observadas en las IPs con IgG normal se debían al uso de la matriz de sefarosa acoplada a proteína G. A partir de estos experimentos, decidimos utilizar la matriz de sefarosa acoplada a proteína A en todas las inmunoprecipitaciones futuras, independientemente de la especie del anticuerpo utilizado.

3.a. Análisis de la interacción entre AGO1 y RNAPII en células T47D

Estudios previos han reportado que AGO1 se asocia con la RNAPII en extractos totales y nucleares de células de cáncer de próstata como PC3 y LNCaP (Huang et al., 2013). Dado el rol de AGO1 en la modulación de la transcripción de los enhancers dependientes de estrógenos, planteamos la hipótesis de que esta interacción también podría ocurrir en el contexto del cáncer de mama. Para investigar esta posibilidad, se evaluó la formación del complejo entre AGO1 y RNAPII en extractos totales de la línea celular T47D.

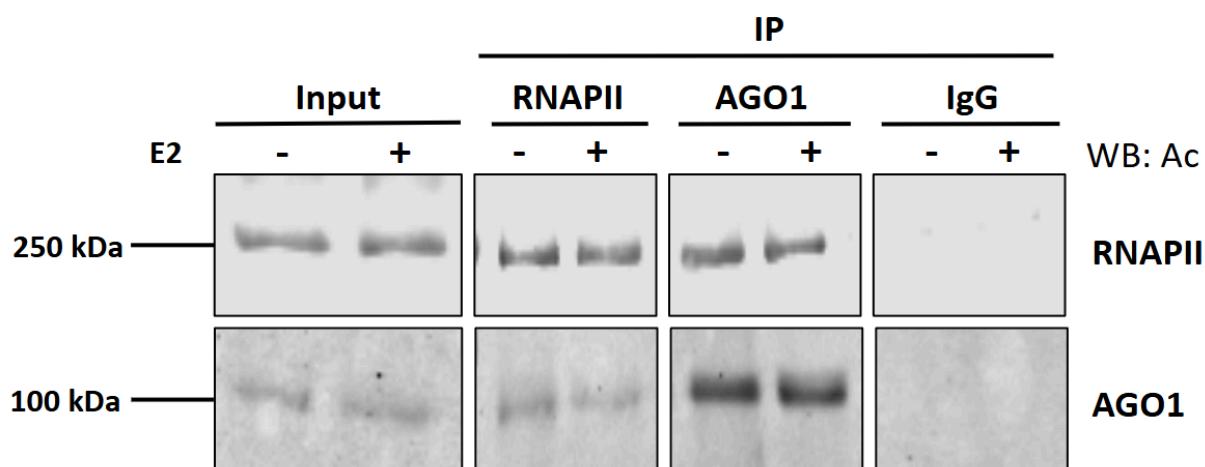


Figura 14: Ensayos de Co-IP para evaluar el complejo RNAPII-AGO1 en células T47D sin estimular o tratadas con E2, usando sefarosa acoplada únicamente a proteína A.

Como se muestra en la Figura 14, se detectó co-inmunoprecipitación entre RNAPII y AGO1 en ambas inmunoprecipitaciones, tanto de AGO1 como de RNAPII. Interesantemente, la formación del complejo AGO1-RNAPII se observa tanto en presencia como en ausencia de E2. El control con IgG normal no reveló señales inespecíficas, lo que valida la especificidad de los anticuerpos utilizados. En conjunto, estos resultados sugieren que AGO1 puede interactuar con RNAPII; sin embargo, a diferencia de la interacción con ER α , la formación de este complejo no depende de la estimulación hormonal.

3.b. Análisis de la formación del complejo tripartito RNAPII-AGO1-ER α en células T47D

Dado que investigaciones previas han demostrado que AGO1 interactúa tanto con la RNAPII (Huang et al., 2013) como con el ER α (Gómez Acuña et al., 2020) en diferentes contextos celulares, y considerando los resultados obtenidos en esta tesis (Figuras 6, 7, 11 y 14) que evidencian interacciones entre AGO1 y ER α , así como entre AGO1 y RNAPII, decidimos explorar si estas tres proteínas pueden formar un complejo tripartito en células de cáncer de mama.

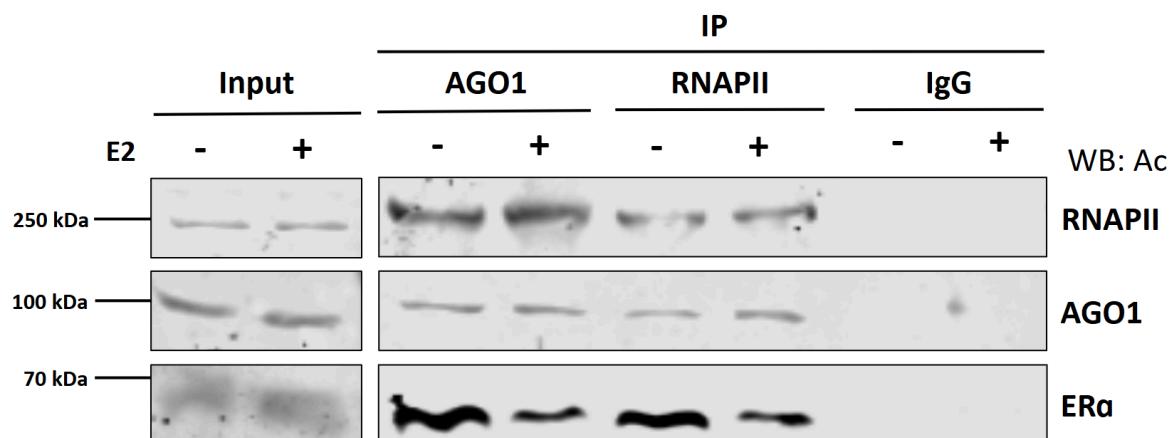


Figura 15: Ensayos de Co-IP para evaluar el complejo tripartito RNAPII-AGO1-ER α en células T47D sin estimular o tratadas con E2, usando sefarosa acoplada únicamente a proteína A.

Como se muestra en la Figura 15, los ensayos de inmunoprecipitación con el control de IgG normal no revelaron señales inespecíficas, lo que confirma la especificidad de los anticuerpos empleados. Interesantemente, se detectaron señales de RNAPII, AGO1 y ER α en las inmunoprecipitaciones de AGO1 y RNAPII. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de las señales entre los tratamientos con y sin E2, lo que sugiere que la formación del complejo proteico es independiente de la presencia de E2.

3.c. Análisis de la interacción de entre AGO1 y RNAPII en MDA231

La función de ER α como factor de transcripción, combinada con su interacción con AGO1, nos llevó a plantear la hipótesis de que el complejo AGO1-RNAPII podría estar mediado por la presencia de ER α . Para investigar esta hipótesis, seleccionamos la línea celular MDA231, que no presenta expresión endógena de ER α , lo que nos permite analizar si la interacción entre AGO1 y RNAPII puede ocurrir en ausencia de este receptor.

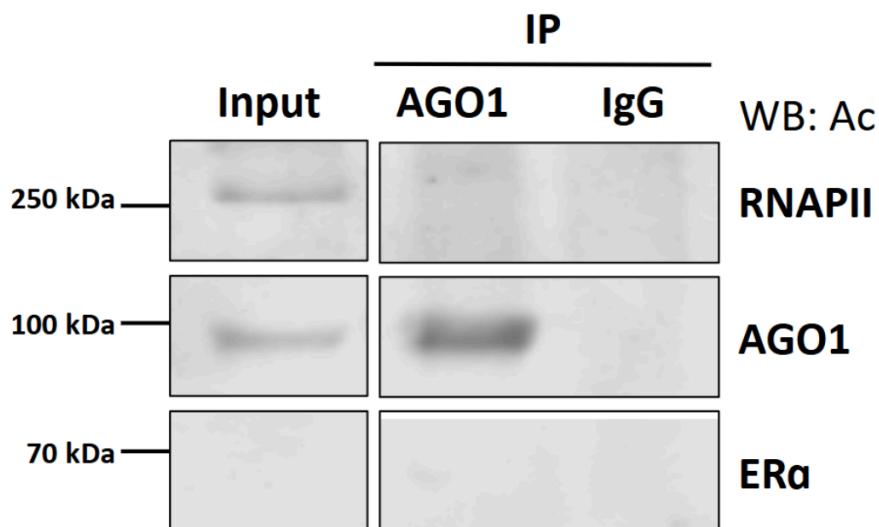


Figura 16: Ensayos de Co-IP entre AGO1 y RNAPII en células MDA231 que no expresa al ER α .

En la Figura 16, se observa que ER α no co-immunoprecipita con AGO1, como era previsible, dado que no está presente en esta línea celular. La señal correspondiente a AGO1 se detecta según nuestras expectativas, mientras que no se identifica la presencia de RNAPII. Además, el control con IgG normal no reveló señales inespecíficas, lo que valida la especificidad de los anticuerpos utilizados. En conjunto, estos hallazgos sugieren que ER α podría desempeñar un papel crucial en la estabilización del complejo entre AGO1 y RNAPII. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otro factor nuclear, inactivo o ausente en este contexto celular, esté mediando dicha interacción.

Discusión y Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesina refuerzan el papel de AGO1 en el marco del modelo propuesto como cofactor relacionado con la transcripción dependiente de estrógenos (Figura 4). La interacción entre AGO1 y ER α se ve favorecida por estradiol (E2) en las líneas celulares MCF7, T47D y HEK293 (Figuras 6, 7.A y 11, respectivamente), lo que sugiere que la formación de este complejo depende de E2. En este sentido, se ha publicado recientemente que en presencia de E2 las proteínas p300 y MED1 aumentan su enriquecimiento en las mismas regiones del genoma que el ER α (Murakami et al., 2017). MED1 actúa como intermediario con la proteína p300, que contribuye al remodelado de la cromatina, lo que facilita la transcripción dependiente de estrógenos y la actividad de la RNAPII (Murakami et al., 2017).

Por otro lado, los resultados obtenidos en la Figura 14, 15 y 16 demostraron que AGO1 y RNAPII forman un complejo, independientemente de la presencia de E2 pero dependiente de ER α . De manera similar, se ha demostrado que el factor de transcripción CREB1 puede reclutar ER α en ausencia de E2 (Berto et al., 2018).

Estos hallazgos sugieren que la interacción entre AGO1 y RNAPII podría seguir una dinámica distinta en comparación con la formación del complejo AGO1-ER α . Es importante destacar que la dependencia de la interacción entre AGO1 y RNAPII con ER α , observada en células MDA231 que no expresan ER α , se estudió en un contexto celular diferente al de los experimentos de estimulación con E2. Por lo tanto, no se puede descartar que otro factor, ausente en esta línea celular, pueda estar contribuyendo a la estabilización de dicha interacción.

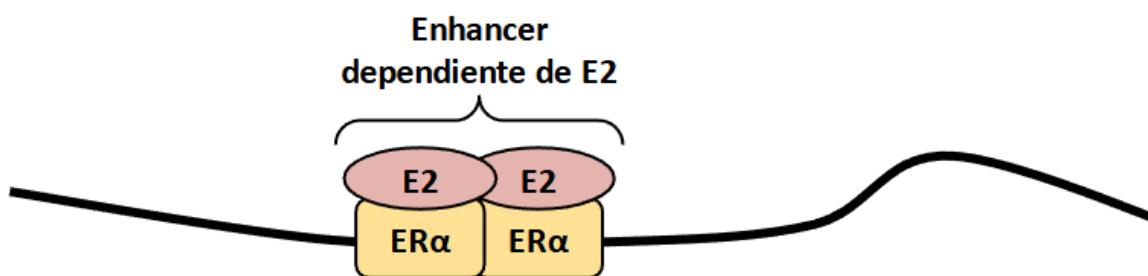
Interesantemente, la mutante AGO1^{Y527E}, que no puede interactuar con ARN pequeños, también co-inmunoprecipita con ER α en presencia de E2. Esto indica que la formación del complejo AGO1-ER α no está mediada por ARN pequeños. Este hallazgo es consistente con estudios previos, tanto nuestros como de otros grupos, que han demostrado que las proteínas AGO pueden desempeñar funciones nucleares de manera independiente de los ARN pequeños, como se ha observado en el control transcripcional y la modulación de la topología de la cromatina (Cernilogar et al., 2011; Alló et al., 2014; Huang et al., 2013; Shuaib et al., 2019; Nazer et al., 2022).

Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de que los eRNAs puedan mediar la interacción entre AGO1 y ER α . En este contexto, la interacción entre AGO1 y ER α podría estar estabilizada en los enhancers a través de los eRNAs transcritos por la RNAPII

en estos sitios regulatorios en respuesta a estradiol. En respaldo de esta hipótesis, estudios en células cancerosas humanas han mostrado que AGO2 se une directamente a los tRNAs nacientes y se asocia con la cromatina desde la cual se transcriben (Woolnough et al. 2015). De manera similar, se ha observado que AGO2 humano se une específicamente a la hebra sentido de los tRNAs nacientes de forma independiente tanto de los pequeños RNAs como de DICER (Woolnough et al. 2015). No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que AGO1 interactúe indirectamente con el RNA naciente de los enhancers a través de su asociación con la RNAPII en los enhancers, debido a la evidencia reciente, sobre el rol de los eRNAs nacientes que interaccionan con el ER α , estabilizando físicamente la unión a DNA en enhancers activos donde su función sería limitada sin RNA (Soota et al., 2024).

Proponemos un modelo en el cual AGO1, al asociarse con los eRNAs en los enhancers, refuerza o estabiliza la interacción con el complejo transcripcional formado por ER α y RNAPII, lo que facilita la activación transcripcional de genes específicos. Este enfoque expande la hipótesis original al sugerir que los eRNAs desempeñan un papel activo en la modulación de la interacción entre AGO1 y ER α , introduciendo un nuevo nivel de regulación en el control transcripcional mediado por enhancers en el contexto del cáncer de mama (Figura 17). Así, este modelo postula que AGO1, tras asociarse con los eRNAs en los enhancers, no solo estabiliza, sino que también potencia la interacción con el complejo ER α -RNAPII, favoreciendo la transcripción eficiente de genes. Esta nueva perspectiva subraya la relevancia de los eRNAs en la regulación de la interacción AGO1-ER α , agregando una capa adicional de complejidad en la regulación transcripcional en cáncer de mama.

A. Enhancer activo por homodímero ER α -E2.



B. Interacción AGO1-ER α estabilizada por eRNA, favoreciendo la formación de complejo ER α -AGO1-RNAPII.

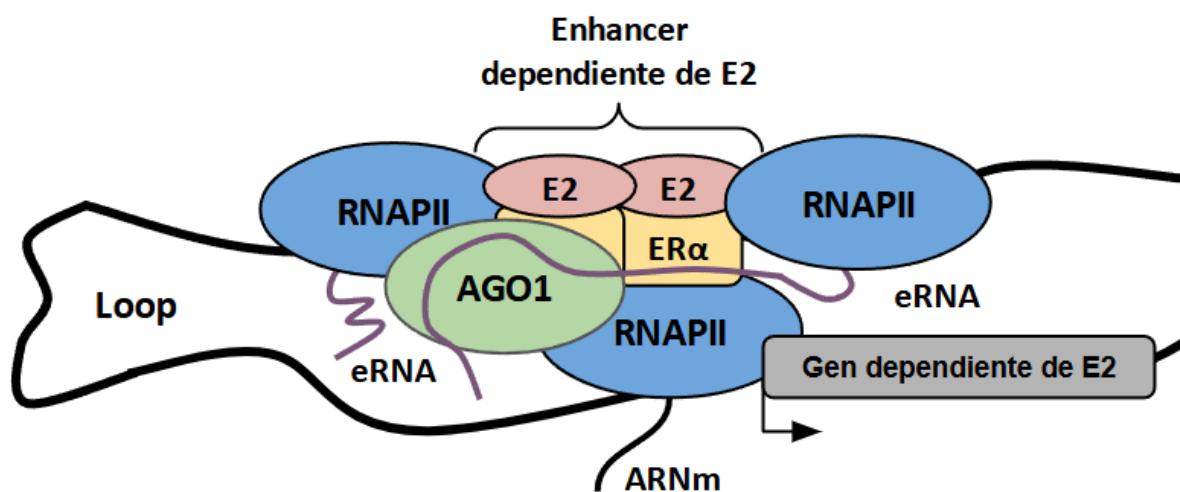


Figura 17: A. El homodímero ER α -E2, trasloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción en enhancers dependientes de E2, activando la transcripción de eRNA. B. Modelo actualizado que ilustra la interacción entre AGO1, ER α y RNAPII en el núcleo de células tumorales de cáncer de mama en respuesta a E2. Este modelo destaca cómo AGO1 se asocia con eRNA para regular la transcripción de genes específicos mediante la activación de enhancers dependientes de estrógenos.

Para validar esta hipótesis, futuros estudios deberían explorar el papel de los eRNAs en esta interacción mediante experimentos de inmunoprecipitación de ARN (RIP) acoplado al análisis por qRT-PCR, con el fin de identificar eRNAs que se asocien con el complejo AGO1-ER α en condiciones dependientes de E2. Además, la disminución de la cantidad de estos eRNAs permitiría evaluar su impacto en la interacción entre AGO1 y ER α y el reclutamiento de AGO1 en los enhancers. En conjunto, estos experimentos proporcionarían una visión más detallada del mecanismo que subyace a la interacción entre AGO1 y ER α y su papel en la regulación génica en el contexto del cáncer de mama.

Conclusiones generales:

- ❖ El E2 favorece la interacción de AGO1-ER α en células MCF7 y T47D.
- ❖ AGO1 no interacciona con isoformas conocidas de PR pero sí con el ER α .
- ❖ El E2 favorece la interacción AGO1 y el ER α expresados ectópicamente en células HEK293.
- ❖ El E2 favorece la interacción de la mutante AGO1^{Y527E} y el ER α expresados ectópicamente en células HEK293, indicando que AGO1 no requiere interaccionar con ARNs pequeños para la formación del complejo AGO1-ER α .
- ❖ AGO1-ER α -RNAPII interaccionan en un complejo tripartito en presencia y ausencia de E2.
- ❖ El E2 parecería ser necesario para favorecer el complejo AGO1-ER α pero no para el complejo AGO1-ER α -RNAPII.
- ❖ AGO1 no interacciona con RNAPII en ausencia de ER α .

Referencias Bibliográficas

- Alló, M., E. Agirre, S. Bessonov, P. Bertucci, Acuña L. Gómez, V. Buggiano, N. Bellora, et al. 2014. “Argonaute-1 Binds Transcriptional Enhancers and Controls Constitutive and Alternative Splicing in Human Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (44). <https://doi.org/10.1073/pnas.1416858111>.
- Alló, Mariano, Valeria Buggiano, Juan P. Fededa, Ezequiel Petrillo, Ignacio Schor, Manuel de la Mata, Eneritz Agirre, et al. 2009. “Control of Alternative Splicing through siRNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing.” *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (7): 717–24.
- Berto M, Jean V, Zwart W, Picard D. ERα activity depends on interaction and target site corecruitment with phosphorylated CREB1. Life Sci Alliance. 2018 Jun 7;1(3):e201800055. doi: 10.26508/lsa.201800055. PMID: 30456355; PMCID: PMC6238530.
- Cernilogar, F. M., M. C. Onorati, G. O. Kothe, A. M. Burroughs, K. M. Parsi, A. Breiling, F. Lo Sardo, et al. 2011. “Chromatin-Associated RNA Interference Components Contribute to Transcriptional Regulation in Drosophila.” *Nature* 480 (7377). <https://doi.org/10.1038/nature10492>.
- Ender, C., and G. Meister. 2010. “Argonaute Proteins at a Glance.” *Journal of Cell Science* 123 (Pt 11). <https://doi.org/10.1242/jcs.055210>.
- Fallatah B, Shuaib M, Adroub S, Paytuví-Gallart A, Della Valle F, Nadeef S, Lanzuolo C, Orlando V. Ago1 controls myogenic differentiation by regulating eRNA-mediated CBP-guided epigenome reprogramming. *Cell Rep.* 2021 Nov 30;37(9):110066. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110066. PMID: 34852230.
- Gómez Acuña, L.I., E. Nazer, S. A. Rodríguez-Seguí, B. Pozzi, V. Buggiano, L. E. Marasco, E. Agirre, C. He, M. Alló, and A. R. Kornblihtt. 2020. “Nuclear Role for Human Argonaute-1 as an Estrogen-Dependent Transcription Coactivator.” *The Journal of Cell Biology* 219 (9). <https://doi.org/10.1083/jcb.201908097>.
- Huang, V., J. Zheng, Z. Qi, J. Wang, R. F. Place, J. Yu, H. Li, and L. C. Li. 2013. “Ago1 Interacts with RNA Polymerase II and Binds to the Promoters of Actively Transcribed Genes in Human Cancer Cells.” *PLoS Genetics* 9 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003821>.
- Hutvagner, G., and M. J. Simard. 2008. “Argonaute Proteins: Key Players in RNA Silencing.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/nrm2321>.

- Liu, C., Y. Xin, L. Xu, Z. Cai, Y. Xue, Y. Liu, D. Xie, Y. Liu, and Y. Qi. 2018. "Arabidopsis ARGONAUTE 1 Binds Chromatin to Promote Gene Transcription in Response to Hormones and Stresses." *Developmental Cell* 44 (3). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.002>.
- Meister, G. 2013. "Argonaute Proteins: Functional Insights and Emerging Roles." *Nature Reviews. Genetics* 14 (7). <https://doi.org/10.1038/nrg3462>.
- Mohammed, Hisham, I. Alasdair Russell, Rory Stark, Oscar M. Rueda, Theresa E. Hickey, Gerard A. Tarulli, Aurelien A. Serandour, et al. 2015. "Progesterone Receptor Modulates ER α Action in Breast Cancer." *Nature* 523 (7560): 313–17.
- Moshkovich, N., P. Nisha, P. J. Boyle, B. A. Thompson, R. K. Dale, and E. P. Lei. 2011. "RNAi-Independent Role for Argonaute2 in CTCF/CP190 Chromatin Insulator Function." *Genes & Development* 25 (16). <https://doi.org/10.1101/gad.16651211>.
- Murakami S, Nagari A, Kraus WL. Dynamic assembly and activation of estrogen receptor α enhancers through coregulator switching. *Genes Dev.* 2017 Aug 1;31(15):1535-1548. doi: 10.1101/gad.302182.117. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28887413; PMCID: PMC5630019.
- Nazer E, Dale RK, Chinen M, Radmanesh B, Lei EP. Argonaute2 and LaminB modulate gene expression by controlling chromatin topology. *PLoS Genet.* 2018 Mar 12;14(3):e1007276. doi: 10.1371/journal.pgen.1007276. PMID: 29529026; PMCID: PMC5864089.
- Nazer, E., R. K. Dale, C. Palmer, and E. P. Lei. 2018. "Argonaute2 Attenuates Active Transcription by Limiting RNA Polymerase II Elongation in *Drosophila Melanogaster*." *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34115-1>.
- Nazer, Ezequiel, Luciana Gómez Acuña, and Alberto R. Kornblihtt. 2022. "Seeking the Truth behind the Myth: Argonaute Tales from 'Nuclearland.'" *Molecular Cell* 82 (3): 503–13.
- Peters, L., and G. Meister. 2007. "Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing." *Molecular Cell* 26 (5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.001>.
- Shuaib, Muhammad, Krishna Mohan Parsi, Manjula Thimma, Sabir Abdu Adroub, Hideya Kawaji, Loqmane Seridi, Yanal Ghosheh, et al. 2019. "Nuclear AGO1 Regulates Gene Expression by Affecting Chromatin Architecture in Human Cells." *Cell Systems* 9 (5): 446–58.e6.
- Siomi, Mikiko C., Kaoru Sato, Dubravka Pezic, and Alexei A. Aravin. 2011. "PIWI-Interacting Small RNAs: The Vanguard of Genome Defence." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (4): 246–58.
- Soota D, Saravanan B, Mann R, Kharbanda T, Notani D. RNA fine-tunes estrogen receptor-alpha binding on low-affinity DNA motifs for transcriptional regulation. *EMBO*

J. 2024 Nov;43(21):5186-5210. doi: 10.1038/s44318-024-00225-y. Epub 2024 Sep 16. PMID: 39284910; PMCID: PMC11535219.

- Tarallo, Roberta, Giorgio Giurato, Giuseppina Bruno, Maria Ravo, Francesca Rizzo, Annamaria Salvati, Luca Ricciardi, et al. 2017. "The Nuclear Receptor ER β Engages AGO2 in Regulation of Gene Transcription, RNA Splicing and RISC Loading." *Genome Biology* 18 (1): 189.
- Tecalco-Cruz, Angeles C., Issis A. Pérez-Alvarado, Josué O. Ramírez-Jarquín, and Leticia Rocha-Zavaleta. 2017. "Nucleo-Cytoplasmic Transport of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells." *Cellular Signalling* 34 (June): 121–32.
- Tolia, N. H., and L. Joshua-Tor. 2007. "Slicer and the Argonautes." *Nature Chemical Biology* 3 (1). <https://doi.org/10.1038/nchembio848>.
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* 1989 Nov 3;59(3):477-87. doi: 10.1016/0092-8674(89)90031-7. PMID: 2805068.
- Woolnough JL, Atwood BL, Giles KE. Argonaute 2 Binds Directly to tRNA Genes and Promotes Gene Repression in cis. *Mol Cell Biol.* 2015 Jul;35(13):2278-94. doi: 10.1128/MCB.00076-15. PMID: 25918241; PMCID: PMC4456445.
- Xu C, Fang X, Lu T, Dean C. Regulación cotranscripcional antagónica a través de ARGONAUTE1 y el complejo THO/TREX orquesta la salida transcripcional de *FLC*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 de noviembre de 2021; 118(47):e2113757118. doi: 10.1073/pnas.2113757118. PMID: 34789567; PMCID: PMC8617408.