



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

# **SOBREEXPRESION DE COACTIVADORES DE RECEPTORES NUCLEARES Y TUMORIGENESIS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área de Ciencias Biológicas

**MARIA FERNANDA RUBIO**

Director de Tesis: **Dra. Mónica Alejandra Costas**

Consejero de Estudio: **Dr. Arturo Romano**

**Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis**

Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, IDIM-CONICET  
y Universidad de Buenos Aires

**Buenos Aires, 2008**

## **SOBREEXPRESION DE COACTIVADORES DE RECEPTORES NUCLEARES Y TUMORIGENESIS**

### **RESUMEN**

Los coactivadores de receptores de hormonas esteroideas (SRC), cumplen un rol importante en varios procesos biológicos. En células normales estas moléculas están presentes en cantidades limitantes, sin embargo, en ciertos tumores se encuentran sobreexpresadas. RAC3 pertenece a esta familia de coactivadores y hemos demostrado previamente que es coactivador del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual se encarga de inducir la expresión de numerosos genes involucrados en proliferación, diferenciación celular y protección de apoptosis, entre otras. En este trabajo se estudió de qué manera la sobreexpresión de RAC3 podría favorecer la progresión tumoral más allá de su acción como coactivador de receptores nucleares.

Observamos que la citoquina TNF $\alpha$ , caracterizada por inducir apoptosis en ciertos tipos celulares y necrosis de tumores, es capaz de aumentar la proliferación en líneas tumorales, induciendo la expresión de Ciclina D1 vía la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Además, observamos que la acción proliferativa de los estrógenos requiere de la actividad de NF- $\kappa$ B, donde ambos: factor de transcripción y receptor nuclear, junto con el coactivador RAC3, forman un complejo ternario que regula la expresión de CD1.

Por otro lado, la sobreexpresión de CD1 en tumores podría ejercer un rol adicional al ya descrito en el control del ciclo celular y relacionado al control de la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B, ejerciendo trans-represión. Observamos además que la sobreexpresión de RAC3, así como la expresión constitutiva de CD1, contribuyen a un aumento de la tasa proliferativa, así como al crecimiento independiente de anclaje, sin embargo, la co-expresión en alto título simultánea resulta en un antagonismo mutuo y la inhibición del crecimiento tumoral.

Estas observaciones sugieren que en el desarrollo tumoral donde exista una sobreexpresión simultánea de CD1 y RAC3, deben existir mecanismos compensatorios de este antagonismo aún no descritos que permiten la propagación tumoral.

**Palabras Clave:** Tumor de mama, Proliferación celular, NF- $\kappa$ B, RAC3, Ciclina D1

## **OVER-EXPRESSION OF NUCLEAR RECEPTOR COACTIVATORS AND CANCER**

### **ABSTRACT**

The steroid receptor coactivators (SRC) play an important role in many biological processes. These molecules are present in limiting quantities in normal cells, but they were found over-expressed in several tumors. RAC3 is a member of SRC's family and we have previously demonstrated that RAC3 is a NF- $\kappa$ B coactivator. This transcription factor induces expression of many genes related to cell proliferation, differentiation, apoptosis-protection and others. In this work we analyzed how the RAC3 over-expression contributes to tumoral progression in addition to its role as nuclear receptor coactivator.

We found that TNF $\alpha$ , initially identified as a protein capable of inducing apoptosis in several different cell lines and tumor necrosis, exerts a mitogenic effects in tumoral cells lines, inducing cyclin D1 expression and activation of NF- $\kappa$ B. Importantly, activation of NF- $\kappa$ B was required for estrogen-induced proliferation whereas the action of estrogens over CD1 gene is mediated by a protein complex that contains both transcription factors and RAC3.

On the other hand, Cyclin D1 over-expression in tumors could have additional roles to the well described effect in the cell cycle control. We found that CD1 could be physically associated to NF- $\kappa$ B and exerting a trans-repressive action over this transcription factor. Moreover, high levels of CD1, as well as high levels of RAC3 may contribute to cell proliferation and anchorage-independent growth, however, the simultaneous constitutive over-expression of both molecules results in a mutual antagonism and tumoral growth inhibition.

These observations probably suggest that in tumoral cells over-expressing high levels of CD1 and RAC3, there are compensatory mechanisms of this antagonism that remains to be determined and lead the tumor propagation.

**Keywords:** Breast cancer, cell proliferation, NF- $\kappa$ B, RAC3, Cyclin D1

### Agradecimientos;

Creo que esta sección será la parte más difícil de la tesis, no porque no sepa a quienes brindarles mis agradecimientos, sino porque temo no solo olvidarme de nombrar a todos aquellos que me han ayudado y apoyado en este camino sino por que siempre es difícil abrir nuestros sentimientos y hacerles llegar a esas personas que siempre estuvieron mi más profundo agradecimiento.

Primero que todos quiero agradecer a FCEN-UBA por darme la oportunidad de poder desarrollar esta tesis de Doctorado y a CONICET por aceptarme como becaria de Doctorado.

A Mónica, quien apenas conociéndome me abrió las puertas en su laboratorio, confió en mí y me ayudo en mi formación profesional, quien siempre me escucho, fue abierta a la hora de discutir, me estimuló a ver más allá de un posible resultado y que es capaz de apoyarte y aconsejarte en cada triunfo o fracaso personal y profesional. Por que les enseña a las personas que la rodean que la mejor manera de sobrevivir es remándola y que ni la pared más gruesa es suficiente para tirarte para atrás si uno tiene voluntad y perseverancia.

A la gente que me ayudo en mi formación, a Santiago que me ayudo en los primeros ensayos, a Víctor Nahmod que siempre tenía un buen experimento para hacer y que con sus anécdotas enriqueció mis mañanas.

A mis compañeros/amigos del labo, cuando uno se da cuenta que pasamos juntos más del la mitad del día, compartiendo más que un juego de pipetas, nuestras vidas, nuestros pesares y alegrías, cuando nos preocupamos si fuimos o no al dentista, en como están nuestros padres y hacemos a diario nuestras sesiones psicoanalíticas, en donde discutimos resultados y evaluamos posibles explicaciones a resultados fuera de lo común. A los que estuvieron antes que yo en el lab, a Nacho que me hizo un lugar para que yo también pudiese desarrollarme y crecer, a Geor mi gran amiga porque compartimos tantas cosas juntas desde las salidas de los miércoles hasta los sábados de pipeteo. A Cey.....gracias peti vos sabes que no tengo palabras para agradecerte lo que me ayudaste a crecer en estos años que compartimos por que te admiró por tu perseverancia y tenacidad. A Sabri, gracias por escucharme y por ayudarme en esta última etapa de experimentos y por confiar en mi. A Marina la más nuevita pero que sin embargo ya encara su proyecto, se plantea preguntas y se acerca sigilosamente para hacerme una buena pregunta. A Ceci E. por los viajes en el 159 a Quilmes por tenerme paciencia cuando yo la pierdo, por siempre brindarme tu oído. Gracias a todos por hacer que el trabajo diario sea más liviano, que cada fracaso sea menos doloroso, que cada equivocación se tome como una anécdota y que los días en vez de ser una rutina sean un día de placer.

A los chicos Tc, Berti por ayudarme en lo más molecular, Marian por las mañanas de compañía y Gasman por estar siempre dispuesto a apoyarme. Gracias por los momentos que compartimos.

A las chicas de Neuro (las chicas de Bachi) Sil, Gaby y Yani, siempre tan cálidas, amables y trabajadoras. Yani, gracias por tu apoyo inigualable en esta última etapa.

A nuestro vecino el Dr. G. Semeniuk, por siempre preocuparse por mi salud, por su buena onda con nuestro grupo, por ser mi compañía matutina, por sus ganas de aprender y entender lo que hacemos y por sus críticas constructivas.

A la gente de “Riñón”, al grupo del Dr. Pirola y de la Dra. Felisa Molinas por prestarme los equipos que necesite para desarrollar esta tesis, pero también por hacer que este Instituto sea una gran familia que se preocupa y se alegra por los avances de sus miembros.

A Marga y Jessica, las secretarias, que siempre están atentas de nuestras necesidades y nos recuerdan las fechas de vencimientos.

A la gente de Quilmes, al Dr. Flaco Marpegán y al Dr. Diego Golombek no solo por contactarme con Mónica sino también por enseñarme los criterios básicos para poder desarrollarme en este ámbito. A Gaby Ferreyra porque me enseñó a “pipetear”, a Pato Agostino por ser mi compañera y mi amiga. Y por último a la UNQ por brindarme mi formación y una vez recibida un lugar en docencia en donde transmitir en parte mis experiencias y conocimientos a nuevas generaciones de investigadores.

A mis grandes amigas, Naty, Sil, Pato y Silvana, gracias por compartir estos años conmigo, por esta etapa de crecimiento, por que saben que son mi gran apoyo porque muchas cosas las supere gracias a ustedes, porque nunca me dejaron bajar los brazos, confían en mi y por ser parte de este logro en mi vida...porque cuando yo no confié en mi capacidad su confianza en lo que soy y en lo que puedo lograr me hicieron seguir adelante. A mi amada hermana, Mari, gracias por compartir conmigo 4 años de convivencia por ser mi apoyo, escucharme, bancarme más de un berrinche y ser mi amiga.

A mi mamá y a mi papá, por impulsarme para hacer lo que quería, por enseñarme que la voluntad y la perseverancia es el motor de todo proyecto, por que nunca me negaron nada, porque me enseñaron a no bajar la cabeza y que de cada fracaso hay algo para aprender y que ser humilde es la mejor de las cualidades. Todo lo que soy se los debo a ustedes, a su confianza y a su amor. Los quiero.

A Ale, gracias amor y disculpa este último año de locura.

Muchas gracias a todos los que participaron en este hermoso momento de mi vida.

*A mi papá y a mi mamá*  
*A mi hermana*  
*A Mirta y Alberto*

*“It is much more difficult to be convincing about ignorance concerning disease mechanisms than it is to make claims for full comprehension, especially when the comprehension leads, logically or not, to some sort of action. When it comes to serious illness, the public tends, understandably, to be more skeptical about the skeptics, more willing to believe the true believers. It is medicine’s oldest dilemma, not to be settled by candor . . . What it needs is a lot of time and patience, waiting for the science to come in, as it has in the past, with the solid facts”*

Thomas, L. *“The medusa and the snail: More notes of a Biology watcher”*, p25-26. New York: Viking Press, 1974.

**INDICE**

	Pág.
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>I-CANCER</b> .....	<b>2</b>
I.1-Fallas en la homeostasis: balance entre proliferación y muerte celular .....	3
I.2- Vías que conducen a la progresión tumoral.....	4
I.2.1- Mutaciones que otorgan independencia de factores de crecimiento: <b>oncogenes</b> .....	5
I.2.2- Mutaciones en genes que inhiben el crecimiento: <b>supresores tumorales</b> .....	5
I.2.3- Mutaciones en genes que producen la evasión de apoptosis.....	8
I.2.4- Mutaciones que evitan la senescencia y llevan a la inmortalización.....	10
I.2.5- Mutaciones que promueven la angiogénesis, la capacidad de invadir y la metástasis.....	10
<b>II- PROLIFERACION YCANCER</b> .....	<b>12</b>
II.1- Biología molecular del ciclo celular.....	12
II.1.1- Ciclinas .....	12
II.1.2- Regulación de la actividad de los complejos ciclina/Cdk: <b>Inhibidores de Cdk (CKI)</b> .....	16
II.1.3- Puntos de control.....	16
II.2- Ciclo celular del cáncer: rol oncogénico de Ciclina D1 .....	20
II.2.1- Ciclina D1.....	21
II.2.2- Ciclina D1 en el desarrollo mamario y la progresión tumoral.....	29
<b>III- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN</b> .....	<b>31</b>
III.1- Receptores nucleares: características generales.....	32
III.1.1- Interacción de los receptores con los factores generales de la transcripción y coactivadores.....	34
III.1.2- Interacción con otros factores de transcripción y vías de activación independiente de ligando .....	36
III.1.3- El Receptor de estrógenos.....	38
III.2- El factor de transcripción NF-κB.....	47
III.2.1- Características generales .....	47
III.2.2- Vías de señalización que activan NF-κB .....	49
III.2.3- Regulación de la actividad de NF-κB y sus correguladores .....	52
III.2.4- Rol de NF-κB en la protección de apoptosis .....	54
III.2.5- Rol de NF-κB en la regulación del ciclo celular.....	55
III.2.6- Inducción de NF-κB por la citoquina pro-inflamatoria TNFα .....	55
III.2.7- Rol de NF-κB en la progresión tumoral y el cáncer de mama .....	57
III.3- Interacción entre las actividades mediadas por ER y por NF-κB.....	58
<b>IV- CORREGULADORES TRANSCRIPCIONALES</b> .....	<b>59</b>
IV.1- Coactivadores .....	61
IV.1.1- Coactivadores con actividad Histona acetiltransferasa (HAT).....	62

IV.2- Coactivadores de la familia p160: Coactivadores de Receptores de hormonas esteroideas (SRC).....	63
IV.2.1- Características generales de RAC3 y su rol en cáncer.....	65
IV.3- Correpresores .....	68
IV.4- Rol de Ciclina D1 como corregulador transcripcional .....	69
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> .....	71
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	75
<b>I- MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	76
<b>II- CULTIVO DE CELULAS</b> .....	76
<b>III- VECTORES DE EXPRESION Y PLASMIDOS REPORTEROS</b> .....	77
<b>IV- TRANSFORMACION DE BACTERIAS Y PURIFICACION DE PLASMIDOS</b> .....	78
IV.1- Transformación de bacterias.....	78
IV.2- Preparación de ADN a pequeña escala .....	78
IV.3- Purificación de plásmidos a gran escala y cuantificación del ADN plasmídico .....	79
<b>V-TRANFECCION DE CÉLULAS EN CULTIVO</b> .....	80
V.1-Transfección transitoria utilizando el reactivo Lipoaectamine™ .....	80
V.2-Transfección transitoria por el método de Cloruro de Calcio .....	81
<b>VI- TRANSDUCCION DE CELULAS T47-D</b> .....	82
<b>VII- ENSAYOS DE PROLIFERACION Y VIABILIDAD CELULAR</b> .....	82
VII.1- Drogas y tratamientos.....	82
VII.2- Ensayo de proliferación por incorporación de timidina tritiada ( <sup>3</sup> H-Timidina).....	84
VII.3- Tinción de células supervivientes con cristal violeta.....	84
VII.4- Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.....	84
<b>VIII- ANÁLISIS DE EXPRESION DE GENES REPORTEROS</b> .....	85
VIII.1- Cosecha de células y preparación de extractos .....	85
VIII.2- Detección de actividad Luciferasa .....	85
VIII.3- Medición de actividad β-Galactosidasa .....	86
<b>IX- ENSAYO DE WESTERN BLOT</b> .....	86
IX.1- Preparación de extractos celulares.....	86
IX.2- Determinación de la concentración de proteínas.....	87
IX.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membrana.....	87
IX.4- Ensayo de <i>Western blot</i> .....	88
<b>X- ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN</b> .....	89
<b>XI- ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA</b> .....	90
XI.1- Extracción de proteínas nucleares.....	90
XI.2- Marcación radioactiva y purificación de los oligonucleótidos con la secuencia κB.....	91

XI.3- Incubación del oligonucleótido con el extracto proteico nuclear .....	93
<b>XII- INMUNOPRECIPITACION DE CROMATINA (ChIP) .....</b>	<b>95</b>
XII.1- Preparación de las muestras .....	95
XII.2- Reacción de inmunoprecipitación de cromatina .....	96
XII.3- Reacción de cadena de la Polimerasa (PCR) .....	97
<b>XIII- CRECIMIENTO EN <i>SOFT AGAR</i> .....</b>	<b>98</b>
XIII.1- Preparación de las placas de <i>soft agar</i> .....	99
<b>XIV- INMUNOFUORESCENCIA .....</b>	<b>100</b>
<b>XV- ANTICUERPOS UTILIZADOS .....</b>	<b>100</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>102</b>
<b>I- EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF<math>\alpha</math>) INDUCE PROLIFERACION EN LA LINEA TUMORAL MAMARIA T47-D .....</b>	<b>103</b>
I.1- TNF $\alpha$ induce proliferación celular en la línea tumoral T47-D y aumenta la respuesta mitótica de los estrógenos .....	103
I.2- Para la proliferación de células T47-D se requiere la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B .....	105
I.3- Efecto de la inhibición específica de NF- $\kappa$ B sobre la proliferación celular y sobre la actividad del Receptor de estrógenos activado .....	107
I.4- La inhibición de NF- $\kappa$ B no induce apoptosis pero si bloquea el efecto de los estrógenos sobre el ciclo celular .....	109
I.5- La expresión de Ciclina D1 sería uno de los genes blanco modulados por TNF $\alpha$ vía el ER y NF- $\kappa$ B .....	110
I.6- El efecto del 17E no antagoniza la activación de NF- $\kappa$ B .....	113
I.7- El ER, NF- $\kappa$ B y RAC3 son parte de un mismo complejo proteico .....	116
I.8- El Receptor de estrógenos controla la expresión del gen de ciclina D1 a través de secuencias $\kappa$ B en su promotor .....	118
<b>II- ROL DE CICLINA D1 COMO MODULADOR TRANSCRIPCIONAL .....</b>	<b>121</b>
II.1- El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es capaz de interactuar físicamente con Ciclina D1 .....	121
II.2- Ciclina D1 regula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B .....	124
II.3- Ciclina D1 no afecta la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B ni la unión a sus secuencias blanco en el ADN .....	126
II.4- La represión de la actividad de NF- $\kappa$ B por CD1 involucra la actividad de Histona Deacetiltransferasas (HDAC) .....	128
II.5- La actividad de NF- $\kappa$ B es regulada por los niveles de CD1 y del coactivador RAC3 de manera antagónica .....	130
II.6- Ciclina D1 sería capaz de regular la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por unión	

a secuencias κB en el ADN.....	133
<b>III- PATRON DIFERENCIAL EN LA EXPRESION DEL COACTIVADOR RAC3 Y DE CICLINA D1 DURANTE EL CICLO CELULAR.....</b>	<b>136</b>
III.1- La expresión de Ciclina D1 y del coactivador RAC3 es temporalmente distinta.....	136
III.2- La sobreexpresión conjunta de CD1 y RAC3 altera la proliferación celular.....	138
III.3- El aumento en los niveles de CD1, RAC3 o de ambos altera la capacidad en la transformación celular.....	139
<u>CONCLUSIONES</u> .....	142
<u>DISCUSIÓN</u> .....	145
<u>PUBLICACIONES</u> .....	158
<u>ABREVIATURAS</u> .....	159
<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	162

# **INTRODUCCION**

## I- CANCER

Las células tumorales han sufrido una desregulación en el control del crecimiento, son capaces de escapar al sistema inmunológico y han adquirido inmortalidad como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas que provocan que estas células tengan una ventaja por sobre el resto de las otras.

El desarrollo tumoral es una enfermedad del ADN y tiene carácter hereditario si estas alteraciones genéticas ocurren en las células sexuales. La progresión tumoral, como veremos, es el resultado de la acumulación de anormalidades genéticas, donde el número exacto de mutaciones que deben suceder parece depender del tipo tumoral.

Los mecanismos por los cuales una célula normal se transforma progresivamente a la malignidad, requieren la adquisición secuencial de mutaciones que se generan como consecuencia del daño al genoma. Este daño al ADN puede ser resultado de procesos endógenos o exógenos, tales como, errores en la replicación, inestabilidad química del ADN, generación de radicales libres durante los procesos metabólicos o por factores externos como agentes ionizantes, radiación UV o carcinógenos químicos (Ames, BN 1984; Hall, J *et al.* 1999; van Steeg, H *et al.* 1999).

Si bien las células poseen mecanismos de reparación del ADN en muchos casos estos errores no pueden ser reparados, lo cual genera cambios permanentes, produciendo mutaciones en genes responsables de mantener la integridad genómica; y facilitando así, la adquisición de nuevas mutaciones. La evolución de una célula normal a una maligna involucra la alteración en genes implicados en los mecanismos de homeostasis que controlan la proliferación y muerte celular, así como en la adhesión, migración y colonización de otros órganos.

Las mutaciones que pueden producir esta alteración de la homeostasis incluyen: mutaciones puntuales, inestabilidad cromosómica que deriva en amplificación, sobreexpresión de determinados genes y modificaciones epigenéticas del ADN.

## I.1- FALLAS EN LA HOMEOSTASIS: BALANCE ENTRE PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR

El ser humano esta compuesto de un número finito de células, que se dividen y diferencian solo con el fin de repoblar órganos y tejidos cuando determinadas señales son secretadas, dos casos paradigmáticos de homeostasis entre vida y muerte celular son el ciclo menstrual en las mujeres o el desarrollo de la glándula mamaria durante la lactancia.

Este control sobre la multiplicidad celular se debe a una intrincada red de mecanismos moleculares que gobiernan, por un lado la proliferación y por el otro la muerte celular. Cualquier factor que altere este balance tiene el potencial de alterar el número de células de un órgano o tejido, y luego de algunas generaciones este incremento puede ser clínicamente detectable como una *hiperplasia* que por la acumulación de mutaciones en otros genes involucrados en la proliferación y/o muerte celular pueden generar *neoplasia*.

Es importante comprender que el daño al ADN en si mismo no es un evento mutagénico sino que necesita la replicación del ADN y la subsiguiente división celular para convertir ese simple daño químico en un cambio en el ADN, por lo tanto la proliferación es un factor vital en la generación de mutaciones y en la expansión de clones de células conteniendo estas mutaciones. Esto es ilustrado en la figura 1 (página 4).

Dado que existen múltiples chequeos que limitan la proliferación inadecuada, entonces para que una célula que ha adquirido una mutación se expanda se deben acumular mutaciones en genes cruciales que permitan la replicación autónoma y la invasión. Esto es consistente con evidencias que demuestran que las células leucémicas requieren pocas divisiones para desarrollarse dado que por si mismas las células madres de las cuales derivan poseen una alta tasa proliferativa, de aproximadamente  $10^{12}$  divisiones por día.

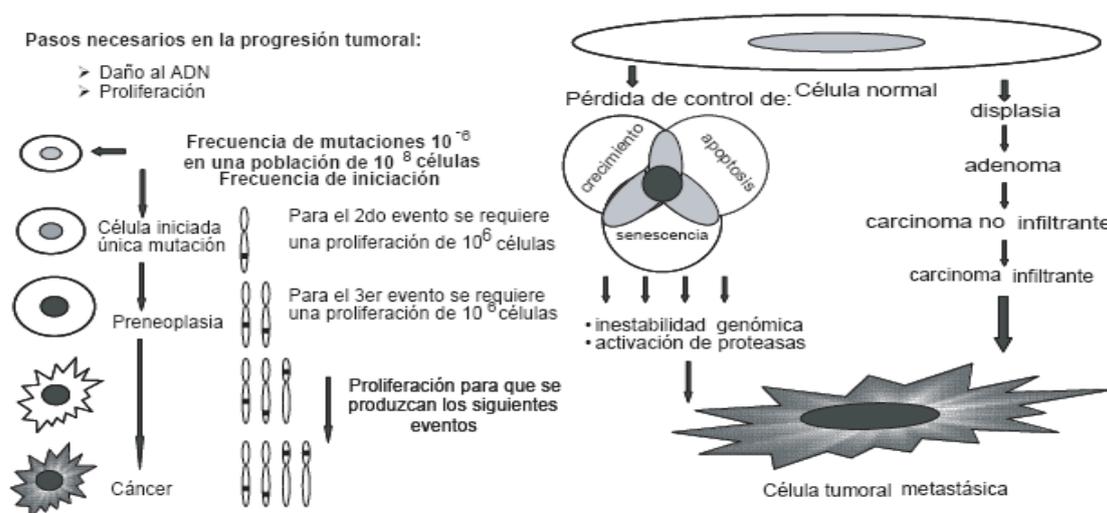
Por otro lado, si se considera que la tasa de mutación en una célula madre está en el orden de  $10^{-10}$  por división celular, esto daría una baja probabilidad de incorporar un cambio en el ADN, sin embargo, se ha determinado que la gran mayoría de las células

madres están iniciadas o sea tienen al menos un gen mutado y que la adquisición de nuevas mutaciones se debe a la expansión clonal y a la acumulación de nuevas mutaciones; en donde los factores exógenos tienen un rol fundamental. Según se muestra en el modelo de carcinoma de colon (Cho, KR *et al.* 1992; Cahill, DP *et al.* 1999) se necesitaría la acumulación de al menos cinco mutaciones para generar una célula adaptada al crecimiento autónomo.

## I.2- VIAS QUE CONDUCEN A LA PROGRESION TUMORAL

Como se describió en las secciones anteriores, los tumores se inician como resultado de una única mutación en una única célula progenitora; y mutaciones subsiguientes en la descendencia de esta célula sumada a su expansión clonal dan como resultado que las células hijas posean las ventajas típicas del cáncer. Pero para que estas células prosperen las mutaciones adquiridas deben otorgar alguno de estos dos beneficios: deben permitir la expresión inadecuada o la activación de genes, los cuales en general estimulan la proliferación o la protección a la apoptosis, a los que se denominan **oncogenes**; la otra consecuencia debe ser la inactivación de genes o proteínas que normalmente inhiben la proliferación denominados **genes supresores**.

Para resumir; se podrían describir 5 vías que deberían ser activadas o inactivadas en la génesis de una célula tumoral. Estas son presentadas en la figura 1 y se listan a continuación con algunos casos paradigmáticos.



**Figura 1** La proliferación tiene un rol fundamental en la adquisición secuencial de mutaciones que otorgan a una célula normal los beneficios de una célula tumoral, siendo éstos la proliferación

independiente de estímulos, la evasión de los mecanismos que conducen a la muerte celular, la inmortalización, la capacidad de migrar e invadir otros tejidos.

### I.2.1- MUTACIONES QUE OTORGAN INDEPENDENCIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO: **ONCOGENES**

Las células normales proliferan en respuesta a factores de crecimiento externos, los cuales median su acción después de unirse a su receptor e inducir una cascada de respuesta. En el caso de las células tumorales, estas han encontrado mecanismos capaces de mantener una constante activación de estas cascadas aún en ausencia del factor de crecimiento; donde el resultado final de esta continua activación es la expresión del gen de **ciclina D (CD)** (Hinds, PW *et al.* 1994).

Algunos ejemplos de estas mutaciones son las siguientes:

- i- Sobreexpresión de factores de crecimiento (**EGF, FGF, TGF $\alpha$** , etc.)
- ii- Mutaciones en los receptores de factores de crecimiento (**erb-B**)
- iii- Mutaciones en moléculas involucradas en las cascadas de transducción de señales (**ras**)
- iv- Activación inapropiada de factores de transcripción (**c-myc, Receptores nucleares, NF- $\kappa$ B**)

En la sección II.2 se hará referencia con más detalle de estas alteraciones y su relación con la expresión aberrante de **CD**.

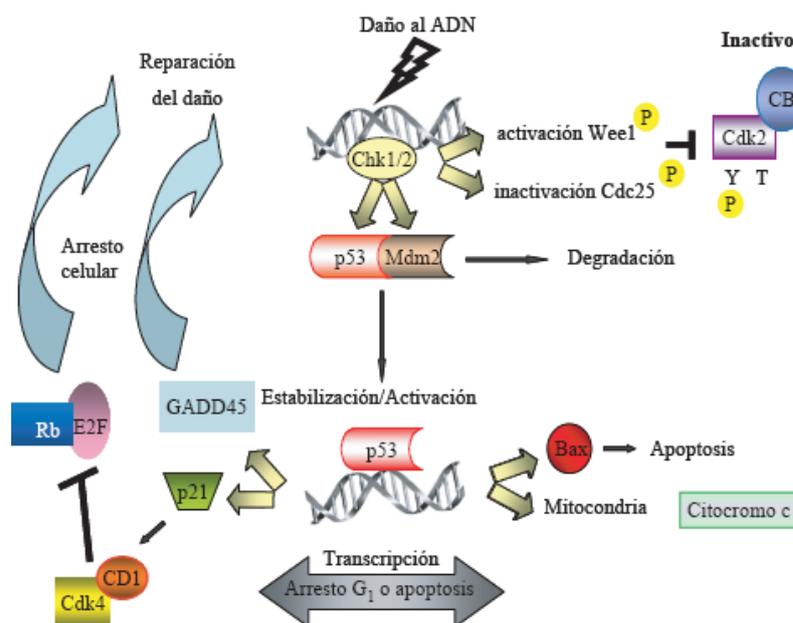
### I.2.2- MUTACIONES EN GENES QUE INHIBEN EL CRECIMIENTO: **SUPRESORES TUMORALES**

El descubrimiento de la habilidad de los **oncogenes** para inducir transformaciones neoplásicas contestaba algunas de las preguntas sobre la base molecular de los orígenes de una célula tumoral pero no daba todas las respuestas. En 1969 Harris, con sus experimentos de fusión entre células normales y tumorales (Harris, H *et al.* 1969) mostró que el híbrido resultante perdía sus características malignas sugiriendo que en las células normales existían moléculas que eran capaces de suprimir la capacidad tumorigénica y a estas moléculas, aún desconocidas, se las denominó **supresores tumorales**.



- i- El gen de **Retinoblastoma (Rb)**: actúa para controlar la entrada al ciclo celular. En células que no se están dividiendo; normalmente se encuentra no fosforilado y asociado al factor de transcripción **E2F** y a **Histona desacetilasas (HDAC)**, actuando como un complejo de silenciamiento de genes; dado que este complejo mantiene a las histonas en una forma desacetilada, lo cual restringe el acceso de los factores de transcripción. Luego de producirse la estimulación por mitógenos **Rb** es fosforilado, y esto provoca la ruptura del complejo con **E2F**, activando la transcripción de genes involucrados en el ciclo celular. Por lo tanto una mutación o la delección del gen de **Rb** provoca que **E2F** este siempre activo.
- ii- El guardián del genoma, **p53**: esta proteína se encarga de monitorear daño al ADN y de dirigir una respuesta apropiada. Las señales de stress que activan a **p53** incluyen: anoxia, insuficiencia de nucleótidos para la síntesis del ADN, la activación inapropiada de oncogenes y diversas lesiones en el ADN. Una vez activado puede inducir ya sea el arresto del ciclo celular o si la maquinaria de reparación es ineficiente para solucionar el problema induce apoptosis. Más del 70% de los cánceres humanos presentan defectos en este gen.

En la figura 3 se resumen algunas de las actividades de esta proteína tanto en su rol como factor de transcripción o en su interacción con otras proteínas.



**Figura 3:** Vías por las cuales p53 causa el arresto del ciclo celular o alternativamente apoptosis. El daño al ADN, activa a la proteína Chk1/2 que es la responsable de frenar la entrada en mitosis y puede activar a

p53 quien regula la expresión de genes tales como GADD45 y p21 que favorecen la reparación del ADN e inhiben la entrada a la fase S. Alternativamente, si el daño al ADN es irreparable induce la activación de moléculas involucradas en apoptosis. (Adaptación de Bertram JS 2000)

### I.2.3- MUTACIONES EN GENES QUE PRODUCEN LA EVASION DE APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso que requiere energía en forma de ATP e involucra cambios morfológicos característicos como el encogimiento celular, pérdida de membrana nuclear, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos preservando la estructura de la membrana plasmática hasta fases muy tardías en las cuales son fagocitados sin que se desate una respuesta inflamatoria, a diferencia de la necrosis que se inicia por un daño a la membrana y la liberación del contenido celular al exterior disparando un proceso inflamatorio.

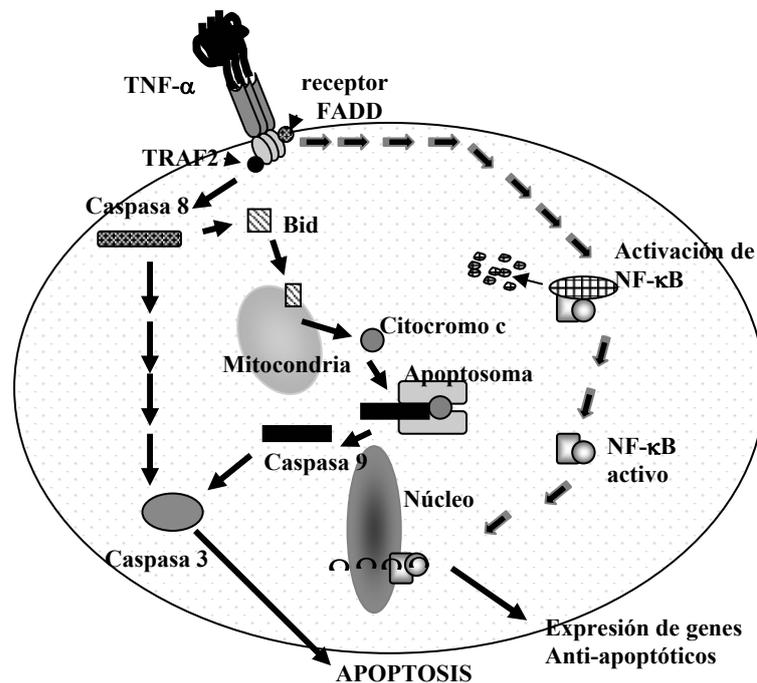
La muerte celular programada es un mecanismo esencial para eliminar células que están en exceso o que son potencialmente peligrosas (Strasser, A *et al.* 2000). Existen básicamente dos vías de inducción de apoptosis que se diferencian precisamente en la etapa de iniciación del proceso (figura 4). Estas son: la vía de membrana, que se dispara por asociación de inductores específicos a la membrana plasmática utilizando receptores que llevan dominios de muerte y la vía mitocondrial, que se dispara por privación de factores de crecimiento, así como el daño al ADN y otras señales de estrés. No obstante, existen estímulos que son capaces de activar ambas cascadas simultáneamente, tal es el caso de la citoquina proinflamatoria **TNF $\alpha$** .

En este proceso se pueden diferenciar varias fases, y en cada una de ellas participa un grupo determinado de moléculas, muchas de las cuales se encuentran mutadas en cáncer:

a) *Fase de señalización iniciadora*: durante la cual la célula recibe estímulos apoptóticos por privación de factores de crecimiento, agentes citotóxicos o radiaciones ionizantes, mediante receptores de muerte (**TNF $\alpha$** , Fas, FADD y TRAIL) o por inductores fisiológicos como ROS o Ca<sup>+2</sup>.

b) *Fase de preparación*: el tránsito por esta etapa constituye un punto sin retorno y esta mediado por la activación de cisteína proteasas denominadas **caspasas** (caspasa 8, 9, 10 y 12), por inductores fisiológicos como Bax, ROS, Citocromo c y el apoptosoma y finalmente por la activación de nucleasas que fragmentan el ADN específicamente como es el caso de AIF, endonucleasa G y PARP.

c) *Ejecución*: durante esta etapa la célula adquiere la morfología final caracterizada por la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN, en este caso las moléculas implicadas son las caspasas 3, 6 y 7.



**Figura 4:** La cascada apoptótica de membrana se dispara a través de receptores de la familia de TNF tipo I (p55) que poseen dominios de muerte. Cuando estos receptores unen sus ligandos específicos reclutan moléculas adaptadoras como FADD (*Fas Associated Death Domain*) involucrada en la activación de la Caspasa 8. En el caso de TNF $\alpha$ , a través de otras moléculas adaptadoras como TRAF2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2*), se dispara simultáneamente una cascada protectora de apoptosis, con la activación de NF- $\kappa$ B, vía la degradación de su factor inhibidor I $\kappa$ B y translocación del factor activo al núcleo.

La vía mitocondrial se dispara en forma directa, independiente de un receptor de membrana, por daño al ADN (entre otras señales) o por la vía de membrana a través de Bid. En ambos casos, las proteínas de la familia Bcl-2: Bid, Bax, Bim o Bad, pueden cambiar su localización soluble en el citosol o anclándose a membranas. Cuando se localizan en la membrana mitocondrial facilitan la salida del Citocromo c al citosol. Otros miembros de la familia Bcl-2, cuyo rol es anti-apoptótico, como Bcl-2 y Bcl-xL compiten con los pro-apoptóticos en la regulación de este proceso. Una vez en el citosol, el Citocromo c se asocia con proteínas adaptadoras y la pro-Caspasa 9, para formar el apoptosoma, que lleva a la activación de esta caspasa. Tanto la vía de membrana como la mitocondrial a través de las caspasas iniciadoras, convergen en la activación de la Caspasa 3, que es una caspasa efectora que actúa sobre otros substratos específicos para manifestar el fenotipo apoptótico.

Este mecanismo de muerte celular programada es efectivo para eliminar células que han adquirido mutaciones en genes cruciales, sobre todo en **oncogenes**. La alteración de este mecanismo se puede dar a nivel de muchos genes involucrados en esta compleja cascada.

- i- Mutación en genes anti-apoptóticos (**bcl-2**)
- ii- Mutación en mediadores apoptóticos (**FAS, TRAIL y TNF $\alpha$ -R**)

#### I.2.4- MUTACIONES QUE EVITAN LA SENESCENCIA Y LLEVAN A LA INMORTALIZACION

Cuando una célula normal es colocada en cultivo y sufre pasajes sucesivos, sucede que luego de 50 a 100 generaciones las células dejan de dividirse y entran en senescencia replicativa. En contraste, cuando se hacen cultivos a partir de células tumorales, la mayoría de estas células son capaces de tener una replicación ilimitada.

Hoy en día se sabe, que un evento crucial en la vida de una célula normal es la progresiva erosión de las terminaciones de los cromosomas denominados *telómeros*, como consecuencia del mecanismo de replicación del ADN donde la polimerasa es incapaz de sintetizar los extremos de los cromosomas. Las células con secuencias teloméricas de una longitud crítica, alteran el patrón de genes transcritos y se vuelven insensibles a la mayoría de los estímulos que inducen la división celular y entran en arresto celular. Por lo tanto, uno de los mecanismos para evitar la senescencia replicativa involucra mantener la longitud de estas secuencias constante, mediante mutaciones que llevan a la activación o reactivación de la enzima **telomerasa**, esta enzima tiene una actividad crucial durante el desarrollo embrionario pero su actividad desaparece en el estadio adulto en la mayoría de los linajes celulares (Franco, S *et al.* 2002). La reactivación de la **telomerasa** puede entonces participar en el desarrollo tumoral promoviendo la replicación ilimitada y facilitando la acumulación de mutaciones.

#### I.2.5- MUTACIONES QUE PROMUEVEN LA ANGIOGENESIS, LA CAPACIDAD DE INVADIR Y LA METASTASIS

Durante la evolución de una célula tumoral, ésta adquiere la capacidad de proliferar, de evadir los controles sobre la proliferación y muerte celular para finalmente alcanzar

la inmortalidad, para ello es necesario la disponibilidad de nutrientes y una vía para la eliminación de productos metabólicos tóxicos. En ausencia de una nueva irrigación, ningún tumor podría alcanzar un tamaño importante, pues las células centrales morirían por falta de oxígeno y nutrientes. La estrategia utilizada por las células tumorales es la generación de una red nueva de vasos y capilares sanguíneos y para ello estas células han encontrado la manera de aumentar la expresión de factores pro-angiogénicos así como suprimir sus reguladores negativos (Hahnfeltd, P *et al.* 1999).

Se denomina metástasis al proceso por el cual una célula tumoral abandona el tumor primario, viaja a través del sistema circulatorio y se establece en un sitio secundario. Varios eventos son necesarios para que las células malignas dejen el tumor primario y proliferen en un sitio distante, entre ellos se encuentran la adquisición de movilidad (*rolling*), modificación de las proteínas de anclaje y adhesión celular, capacidad de invasión que involucra la degradación de matriz, proliferación y la formación de nuevos vasos (angiogénesis) en el órgano blanco de destino.

A pesar que la base genética de la tumorigénesis puede variar entre los distintos tumores, los pasos necesarios para la metástasis son similares en todos ellos. La generación de vasos sanguíneos, como fue comentado, es un paso esencial para el crecimiento del tumor primario, por otro lado el incremento de la vascularización aumenta las chances que una célula tumoral tome contacto con el torrente sanguíneo y colonice otros órganos. Durante el proceso metastático las células necesitan anclarse a otras células y/o proteínas de la matriz extracelular, por lo tanto las moléculas de adhesión van a jugar un rol primordial tanto en el anclaje a la matriz como en la extravasación (invasión). Otras moléculas cuya actividad es necesaria es la mediada por proteinasas encargadas de degradar la matriz, entre las que se destacan las metaloproteasas.

Finalmente, la colonización del sitio secundario por las células tumorales requiere su proliferación y esta mediada por la presencia de factores de crecimiento secretados en estos sitios secundarios.

## II- PROLIFERACION Y CANCER

Como se comentó al inicio de esta exposición uno de los pasos necesarios para el desarrollo tumoral, es la expansión clonal de las células que han adquirido una determinada mutación y eso se traduce en un aumento de la tasa proliferativa. Para entender mejor por que mecanismos una célula normal puede aumentar su tasa de división celular, se describirán los mecanismos moleculares por los que sucede la división de una célula normal y finalmente se nombrarán alguna de las moléculas que se encuentran desreguladas en cáncer.

### II.1. BIOLOGIA MOLECULAR DEL CICLO CELULAR

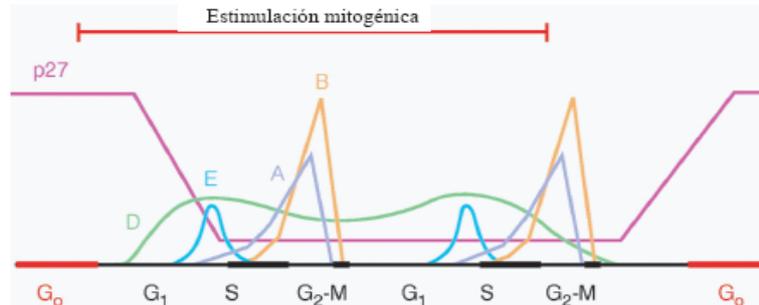
La mayoría de las células se encuentran en estado de quiescencia o arresto celular ( $G_0$ ) la mayor parte de “su vida” o sea en un estado de no proliferación, mientras que las células que se están dividiendo pueden estar en alguna de las 4 fases en las que se divide el ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  y M). Cada una de estas fases se caracteriza por un pool de moléculas que regulan que los eventos que deben transcurrir en determinada fase sucedan y propician la transición a la siguiente fase. Si las condiciones no son las adecuadas o han ocurrido fallas, por ejemplo en la replicación del ADN, dentro de este pool de moléculas reguladoras existen proteínas que se encargan de censar que la fase transcurrió correctamente así como la integridad celular antes de iniciar la siguiente etapa.

En la figura 2 (página 5) se mostraron las fases del ciclo celular y los acontecimientos relevantes que suceden en cada una de ellas. A continuación se describirán las funciones de algunas de las moléculas que están involucradas en el transcurso de las distintas fases del ciclo celular y su correlación con el desarrollo tumoral.

#### II.1.1- CICLINAS

Los primeros trabajos realizados por Rao y Johnson (Rao, PN *et al.* 1970), no proporcionaban información sobre que moléculas estaban involucradas en la progresión del ciclo celular, pero si sugerían la existencia de moléculas que estaban presentes en un estadio celular y no en otro, siendo su presencia lo que regulaba la transición entre las

fases. Los complejos descritos en estos trabajos ya han sido caracterizados y consisten en una subunidad regulatoria denominada **Ciclina** y una proteína con actividad Serina/Treonina quinasas llamadas **quinasas dependientes de ciclinas (Cdk)**. En la figura 5 se muestra la fluctuación en la expresión de ciclinas en las distintas fases.



**Figura 5:** Fluctuaciones de ciclinas y p27 durante el ciclo celular. (Adaptado de Sherr CJ 1996)

### i- Ciclinas de la fase G<sub>1</sub>

Las **Ciclinas** de tipo **D (CD)** actúan como sensores de factores de crecimiento dado que su expresión depende directamente de señales extracelulares más que de la fase del ciclo celular. En células que se encuentran en quiescencia (G<sub>0</sub>), los niveles de **CD** son casi indetectables, pero la presencia de mitógenos induce su expresión, acumulándose a finales de la fase G<sub>1</sub>.

Se han caracterizado tres isoformas de esta Ciclina (D1, D2 y D3) y cada una de ellas es expresada diferencialmente en distintos tipos celulares, siendo la más ubicua la de tipo D1. Las tres isoformas son inducidas tempranamente en respuesta a factores de crecimiento y normalmente se asocian con **Cdk4** y **Cdk6**. La actividad catalítica de este complejo se manifiesta en mitad de G<sub>1</sub> y alcanza su máxima actividad cerca de la transición G<sub>1</sub>-S y persiste a través del ciclo siempre y cuando la estimulación mitogénica continúe.

La pérdida de la actividad del complejo en un estadio muy temprano de G<sub>1</sub> impide que las células entren en la fase S y produce el arresto celular, en cambio si el complejo desaparece tarde en G<sub>1</sub> o durante la fase S, la célula prosigue el ciclo (Baldin, V *et al.* 1993; Sherr, CJ 1996) esta dependencia de la presencia de **CD1/Cdk4** caracteriza, como se verá más adelante, el primer punto de control. A partir de esto se puede suponer que este complejo debe fosforilar uno o varios sustratos y que esto permite la salida de G<sub>1</sub>, siendo uno de estos sustratos el Retinoblastoma (**Rb**).

El **Rb** fue uno de los primeros **supresores tumorales** en ser caracterizado, en su forma hipofosforilada se encuentra unido por un lado a Histona deacetilasas (HDAC) que remueven grupos acetilos de las histonas, lo que provoca la condensación de la cromatina y por el otro al factor de transcripción **E2F**; por lo tanto el complejo formado reprime la transcripción. La fosforilación de **Rb** libera a **E2F**, que es capaz de activar la transcripción de varios genes necesarios para la fase S (ver Fig. 2) entre ellos: dihidrofolato reductasa, timidina quinasa, histona H2A, ADN polimerasa, antígeno nuclear de células proliferando (PCNA), así como el gen de **Ciclina E (CE)**, **Ciclina A (CA)**, **Cdk1** y la de su propio gen.

La expresión de **CE**, es periódica y máxima en la transición G<sub>1</sub>-S, siendo su contraparte catalítica la **Cdk2**. Una vez activo este complejo completa el proceso de fosforilación de **Rb** y liberación de **E2F**, además de ser uno de los responsables de fosforilar a la Histona 1. En concordancia con la entrada en la fase S, la inactivación de **Rb** que en principio depende de la presencia de mitógenos vía **CD** se convierte en independiente de éstos factores vía **CE**, durante la fase G<sub>1</sub> tardía y esto concuerda con los experimentos de depleción de **CD** en esta fase del ciclo celular.

## ii- Ciclinas de la fase S

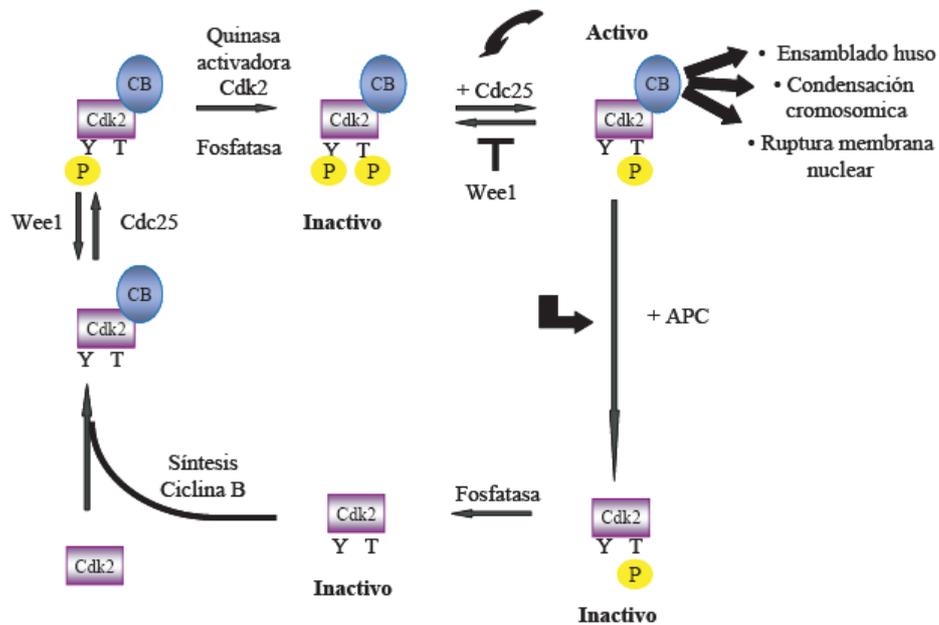
La replicación del ADN ocurre en un período acotado del ciclo celular denominada fase S, y la ciclina que controla esta fase es la **Ciclina A**. Como se comentó anteriormente, la expresión de esta proteína está a cargo de **E2F** por lo que su expresión es muy baja en G<sub>1</sub> y se incrementa en la transición de la fase S/G<sub>2</sub>, por lo que se supone que esta ciclina contribuye en la transición G<sub>1</sub>/S, en la progresión de la fase S y en la transición G<sub>2</sub>/M (ver Figura 5, página 12).

La **CA** se asocia a dos Cdks, **Cdk2** y **Cdk1**, donde la actividad **CA/Cdk2** sería requerida para la progresión de la fase S mientras que la actividad **CA/Cdk1** se requeriría en la transición G<sub>2</sub>/M. Poco se sabe sobre cuáles son los sustratos de estos complejos, sin embargo en aquellos experimentos en los cuales se muta **Cdk1** se observa que las células arrestan en G<sub>2</sub> mientras que células que no expresan **Cdk2** son incapaces de sintetizar ADN, otorgándoles una localización temporal a ambos complejos.

**iii- Ciclinas de la fase G<sub>2</sub>/M**

La progresión a través de la fase G<sub>2</sub> y la entrada a la fase M es regulada por el complejo **Ciclina B/Cdk1**. Los niveles de esta ciclina oscilan a través del ciclo celular (Figura 5) siendo casi indetectable en la fase S, su expresión se incrementa a través de G<sub>2</sub> y es abruptamente degradada en anafase, sin embargo su actividad es máxima en los límites de G<sub>2</sub>/M y permanece hasta su degradación. Tres isoformas han sido caracterizadas (B1, B2 y B3), durante la interfase **CB1** y **CB2** se encuentran en el citoplasma mientras que **CB3** tiene localización nuclear. Durante la transición G<sub>2</sub>/M las ciclinas citoplasmáticas translocan al núcleo antes que la membrana nuclear se rompa, esta translocación parece ser necesaria para la actividad normal de la **CB** y es regulada por fosforilación. En cambio **CB3**, se asocia con **Cdk1** y **Cdk2**, compartiendo características con **CA**.

El mecanismo de activación de este complejo **CB/Cdk1/2** esta altamente regulado a través de fosfatasas y quinasas, siendo estas modificaciones post-traduccionales las encargadas de regular tanto la localización como la actividad del complejo. El mecanismo de activación se detalla en la figura 6.



**Figura 6:** Secuencia de fosforilación y desfosforilaciones que llevan a la activación del complejo CB/Cdk2 donde Y corresponde al aminoácido Tirosina y T al residuo Treonina.

## II.1.2- REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS CICLINA/Cdk: **INHIBIDORES DE Cdk (CKI)**

Para que el ciclo celular progrese correctamente se debe conseguir una adecuada regulación de la actividad de los distintos complejos Ciclina/Cdk y para ello es necesario que las ciclinas se acumulen en los tiempos adecuados regulando temporalmente su síntesis, actividad y degradación. Ya fue explicado como se regula temporalmente su expresión mientras que la actividad de estos complejos es controlada por proteínas denominadas **inhibidores de Cdk (CKI)**, las cuales han sido asignadas a una de dos familias de acuerdo a su estructura y su Cdk blanco.

La primer clase incluye los miembros de la familia **INK4** que son inhibidores de Cdk4 y 6, ellos son: **p16, p15, p18 y p19**, entre las características destacables de estas proteínas esta que: poseen múltiples repeticiones de ankirina, que su unión es específica para **Cdk4/6** y que su sobreexpresión arresta a las células en la fase G<sub>1</sub>.

La familia **Cip/Kip** de inhibidores regula la actividad de las quinasas asociadas a CE, CA y CD; sus miembros son **p21, p27 y p57**. Estas proteínas son potentes inhibidores de Cdk2 pero son reguladores positivos de Cdk4 y 6. La formación de estos complejos tripartitos (CD/Cdk4/Cip) titularían las moléculas de **p27 y p21** libres permitiendo que los complejos CE/Cdk2 ejecuten su actividad. Este pool de inhibidores latentes es liberado cuando los mitógenos desaparecen y la síntesis de CD se detiene, produciéndose la transición a la fase S.

En células quiescentes los niveles de **p27** son elevados, pero una vez que las células empiezan a dividirse sus niveles disminuyen, y la proteína residual es secuestrada en los complejos de CD/Cdk4 (ver figura 5). Cuando a células que están proliferando se les saca el estímulo mitogénico, aumentan los niveles de **p27** por un lado, a causa de un incremento en la síntesis de **p27** y por el otro debido a la disminución en la expresión de CD y a un aumento en su degradación lo que provoca la liberación de **p27**, como consecuencia de ambos mecanismos la célula es arrestada en G<sub>0</sub>.

## II.1.3- PUNTOS DE CONTROL

Bajo circunstancias normales el ciclo celular procede sin interrupciones, sin embargo, si algún daño sucede las células tienen la capacidad de frenar el ciclo en

cualquiera de sus fases hasta reparar el daño, en caso de no poder superar el daño la célula entra en un estado  $G_0$  irreversible o inicia los mecanismos que la llevarán a la muerte celular. Estos puntos de restricción a veces involucran una demora en la activación o inactivación de un complejo particular Ciclina/Cdk.

#### iv- Punto de control de $G_1$

El arresto celular en respuesta a daño al ADN en estadios tempranos de  $G_1$  puede demorar la proliferación y en general depende de la actividad de **p53**, como ya se comentó con antelación esta proteína es un **supresor tumoral** muy lábil y su estabilidad es inducida como respuesta al daño genómico; una vez activada su función como factor de transcripción modula la expresión de múltiples genes entre ellos: **p21**, Mdm2 y GADD45. En particular la expresión de **p21** produce la inhibición de CE/Cdk2 y el arresto en  $G_1$ , actuando por un mecanismo similar al explicado para **p27**.

El inhibidor **p21** se asocia a otras moléculas como PCNA y se ha demostrado que es capaz de inhibir la replicación del ADN en ciertos tipos celulares aunque el mecanismo todavía no ha sido dilucidado

Otro importante regulador de los complejos de la fase  $G_1$ , es **p16** que es el responsable de inhibir el complejo CD/Cdk4, aunque el mecanismo por el cual sus niveles son incrementados no se conoce aún, este estaría asociada a la activación de **p53**. Se ha encontrado que el locus del gen de **p16** codifica para otra proteína denominada **p19<sup>ARF</sup>**, que se produce por rearreglo (*splicing*) de un primer exón alternativo dando un marco de lectura diferente. La proteína **p19<sup>ARF</sup>** es capaz de interaccionar con Mdm2 y neutralizar su efecto inhibitorio sobre **p53**. Otro mecanismo de control es la modificación post-traducciona de las proteínas Cdk, en donde la fosforilación o desfosforilación en determinados residuos Treonina o Tirosina, regula la actividad de los complejos Ciclina/Cdk.

#### ii- Punto de control de S

Poco se sabe de los mecanismos de control de la fase S en mamíferos, pero si se sabe que involucra el chequeo de la replicación del ADN. Los trabajos realizados en levaduras han permitido dilucidar algunos de los componentes de esta vía. Todas las

células eucariotas establecen cohesión entre las hebras de ADN hermanas durante la replicación y esta se debe mantener hasta el inicio de la anafase. El mantenimiento de esta cohesión es de gran importancia y una de las funciones de este punto de control.

Otro aspecto que debe ser controlado es que la mitosis no se inicie durante el transcurso de la fase S, algunos de los homólogos caracterizados en levaduras se han encontrado también en mamíferos y muchas de ellas se localizan en la horquilla de replicación. **ATM** y **ATR** son proteínas con actividad quinasa y ambas están involucradas en el chequeo del daño al ADN, y en este contexto estarían fosforilando a varios sustratos entre ellos a **p53**, esta fosforilación regula su actividad transcripcional y la asociación con otras proteínas. Otras dos proteínas quinasas que son activadas por **ATM** en respuesta al daño al ADN son **Chk1** y **Chk2**. La depleción de **Chk1** impide el retraso de la progresión del ciclo celular en respuesta al bloqueo de la replicación, esto mismo sucede si se depleta **ATR**.

**Chk1** y **Chk2** pueden fosforilar Cdc25 y se cree que esta fosforilación previene la activación del complejo CB/Cdk1 dado que Cdc25 es una fosfatasa que promueve la entrada a mitosis por desfosforilación de Cdk1 (ver figura 6). La expresión de un mutante de Cdc25 que no puede ser fosforilado, induce la entrada en mitosis aún en ausencia de ADN replicado, sugiriendo un rol primordial de esta proteína en el control de la fase S.

### iii- Punto de control de G<sub>2</sub>

Como se ha discutido hasta el momento, en los puntos de control se monitorea el estado del ADN y se previenen transiciones inapropiadas a la fase S y a la mitosis cuando se detectan problemas en la integridad celular y del ADN. Nuevamente los estudios realizados en levaduras fueron los primeros en dar luz a los mecanismos de control en esta fase y si bien hoy en día se sabe más sobre lo que ocurre en mamíferos aún algunos aspectos quedan por discernir.

La activación del complejo CB/Cdk1 ocurre por desfosforilación de Cdk1 en los residuos Treonina 14 y Tirosina 15 por la proteína fosfatasa **Cdc25**, su hiperfosforilación correlaciona con un incremento de la actividad fosfatasa, cuando se

produce daño al ADN, **Cdc25** se encuentra hipofosforilada. La activación de **Cdc25** en mamíferos ocurre cerca de la entrada en mitosis, por asociación con el complejo CB/Cdk1, cuando se produce daño celular **Chk1** fosforila a **Cdc25** en un residuo Serina 216 y favorece la interacción con la proteína 14-3-3 $\sigma$ , esta interacción, en levaduras, produce su exclusión nuclear. En lo que respecta a la localización subcelular de **Cdc25** en mamíferos es aún controversial, pero sí se sabe que el complejo CB/Cdk1 se encuentra en citoplasma hasta el inicio de la mitosis y es retenido en este compartimiento si se produce daño al ADN.

Otro blanco de fosforilación de **Chk1** es **Wee1**, que posee actividad quinasa y media la fosforilación de Cdk1 en un residuo Tirosina 15 que la inactiva y produce el arresto en G<sub>2</sub>. En la figura 6 se muestra el mecanismo de activación del complejo CB/ Cdk1, en donde se indican algunas de las vías de control.

#### **iv- Punto de control del huso mitótico**

La mayoría de las células poseen un punto de control antes que las cromatides hermanas se separen, denominado punto de control del huso mitótico y que inhibe la progresión del ciclo celular en respuesta a señales generadas por daño en el huso mitótico o por cromosomas que no se han unido a microtúbulos.

Durante la mitosis, las dos células hijas reciben una copia de cada cromosoma, las cromatides hermanas se encuentran unidas mediante un complejo ADN/proteína denominado cinetocoro, a los cuales se unen los microtúbulos que emergen de los polos opuestos del huso mitótico. Cuando todos los cinetocoros han unido un microtúbulo, el huso empuja las cromatides hermanas hasta alinearlas en el ecuador de la célula. El punto de control de esta fase, monitorea que exista una interacción correcta de los microtúbulos y el cinetocoro e inhibe la separación de las cromatides y así el comienzo del anafase si se detecta algún defecto.

Este punto de chequeo controla la transición entre la metafase y la anafase; para que esta transición progrese, en la célula se debe producir la degradación proteolítica de varias proteínas que son necesarias para la entrada de la mitosis pero que luego de producirse la activación del proteosoma deben desaparecer, entre ellas el complejo

CB/Cdk1, las proteínas involucradas en la cohesión de las cromátides hermanas y aquellas involucradas en la interacción de los microtúbulos.

La carencia de tensión se traduciría en una señal química que llevaría a cambios por fosforilación en proteínas asociadas al cinetocoro, que son capaces de censar la tensión que ejercen los microtúbulos sobre las proteínas cinetocóricas. Estudios genéticos en levaduras han identificado dos proteínas quinasas, MSP1 y BUB1, necesarias para el arresto celular en respuesta a defectos del huso. Mad1, que es fosforilada en respuesta a la activación de este punto de control, sería uno de los blancos de MSP1 y esta acción depende de la asociación entre BUB1, BUB3 y Mad2.

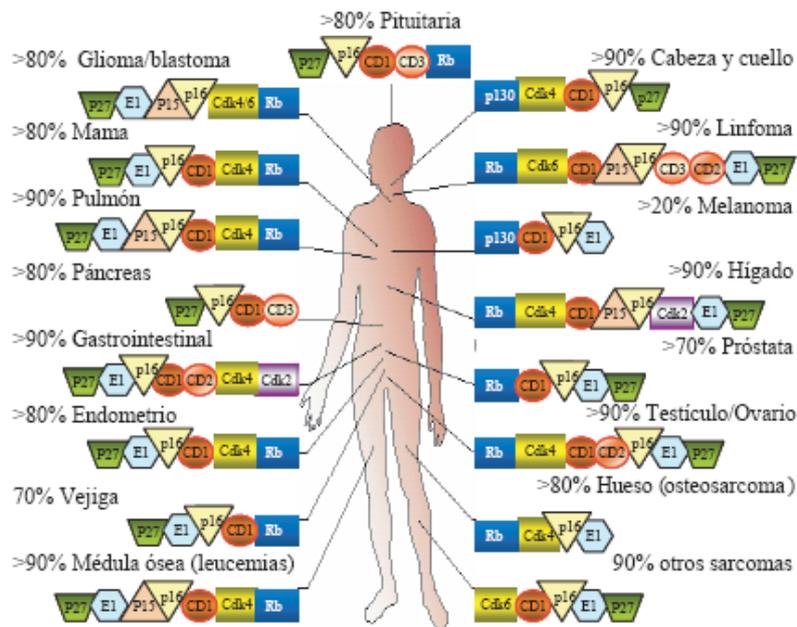
Estudios bioquímicos y de inmunolocalización realizados en eucariotas demuestran que Mad1, Mad2 y Mad3 interaccionan con el activador de APC, Cdc20, mientras que BUB1 y 3 forman un complejo, que junto con Mad2 se localizan en los cinetocoros libres durante la profase y prometafase y que una vez que los cromosomas se alinean en el ecuador desaparecen. Entonces, cuál es el rol de Cdc20 en células normales; esta proteína es un activador de la proteólisis dependiente de APC; la unión de Mad2 a este complejo inhibe la actividad de ubiquitinación de APC y por lo tanto inhibe la transición de fase.

## II.2- CICLO CELULAR DEL CANCER: ROL ONCOGENICO DE CICLINA D1

Entonces, ¿es el cáncer una enfermedad del ciclo celular? La mayoría de los estudios realizados en células tumorales demuestran que las mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en el ciclo celular llegan al 100% de los casos, como se resume en la figura 7.

Más de 100 **oncogenes** y **supresores tumorales** han sido identificados, donde la mayoría de ellos están involucrados en la transducción de señales que mimetizan el efecto de la inducción por mitógenos, desacoplando a la célula de su entorno y produciendo una activación continua de genes involucrados en la proliferación celular.

Entre las proteínas que se encuentran sobreexpresadas, **Ciclina D1** se destaca por su potencialidad como oncogen (Hinds, PW *et al.* 1994), en la siguiente sección se describirá algunos aspectos relevantes de esta molécula.



**Figura 7:** Porcentaje en el cual proteínas que participan en la regulación del ciclo celular se encuentran mutadas en algunos de tipos de cáncer.

### II.2.1- CICLINA D1

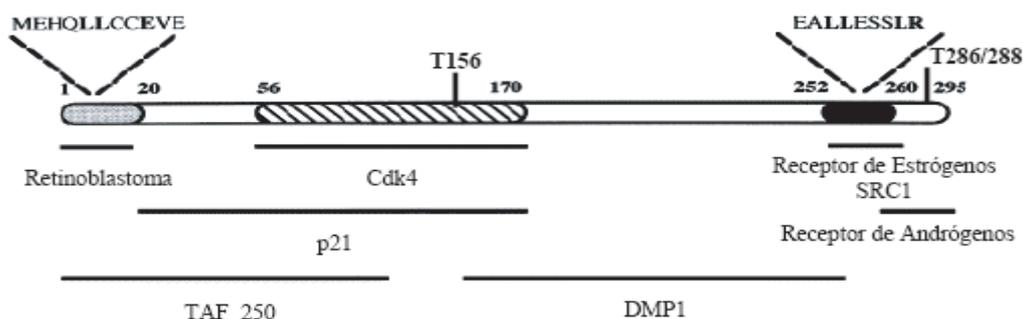
**Ciclina D1 (CD1)**, como ya fue explicado, actúa como sensor e integrador de señales extracelulares que llegan a través de los receptores de superficie, activando distintos factores de transcripción, y actúa como mediador en la transición de la fase G<sub>1</sub> temprana a la tardía, a través de la unión a Cdk, a Histona acetiltransferasas (HAT) y HDAC, para modificar la estructura local de la cromatina en genes involucrados en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular (Matsushime, H *et al.* 1992; Coqueret, O 2002). Además, es capaz de formar asociaciones físicas con más de treinta (30) factores de transcripción o reguladores de la transcripción (Wang, C *et al.* 2004).

La amplificación del cromosoma 11q13, región donde se ubica el gen de **CD1**, es frecuente en un amplio espectro de tumores, el cual incluye carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza, carcinomas de esófago, cáncer de vejiga, carcinoma primario de mama, tumor de pulmón de células pequeñas y hepato-carcinomas (Dickson, C *et al.* 1995). Pero esta amplificación no siempre correlaciona con niveles aumentados de la proteína, un ejemplo paradigmático es el de cáncer de mama donde solo el 13% de los casos presenta amplificación del gen pero sin embargo el 50% de las pacientes sobreexpresan la proteína.

La sobreexpresión aberrante de esta proteína, en ausencia de amplificación génica, se ha observado en sarcomas, tumores colorectales y melanomas además cáncer de mama. La detección de niveles elevados de **CD1** esta asociado con la progresión tumoral y la metástasis celular, funcionando como un colaborador para otros **oncogenes** en la transformación, por ejemplo **Ras, Src, E1A** (Hinds, PW *et al.* 1994). El hecho que esta proteína pueda contribuir en la oncogénesis fue avalado por estudios en ratones transgénicos en donde la sobreexpresión de **CD1** en células del epitelio mamario produce hiperplasia ductal y eventualmente tumores (Wang, TC *et al.* 1994), en cambio la depleción de este gen produce defectos en el desarrollo mamario durante el embarazo, indicando que esta proteína tiene un rol indispensable en la maduración de este tejido en ratones (Fantl, V *et al.* 1995; Sicinski, P *et al.* 1995). Además niveles elevados de CD1 parecen correlacionar con un diagnóstico favorable y una mejor respuesta al tratamiento con antiestrógenos en tumor de mama **Receptor de estrógenos (ER+)** positivos (Han, S *et al.* 2003; Hwang, TS *et al.* 2003), dado quizás a que estaría involucrada en los estadios tempranos de la carcinogénesis mamaria (Weinstat-Saslow, D *et al.* 1995), sin embargo la bibliografía al respecto es contradictoria (Kenny, FS *et al.* 1999).

Un dato llamativo pero coherente, es que el aumento y/o sobreexpresión de **CD1** correlaciona con una inhibición en la diferenciación celular, mediante la represión de distintos factores de transcripción involucrados en los procesos de diferenciación como es el caso de MyoD en mioblastos (Rao, SS *et al.* 1994), PPAR $\gamma$  en la diferenciación de adipocitos (Wang, C *et al.* 2003) o inhibiendo la actividad de BETA2/NeuroD en células del epitelio intestinal (Ratineau, C *et al.* 2002), entre algunos ejemplos.

En la figura 8 se muestran alguno de los dominios presentes en **CD1** y que han sido caracterizados por ser los responsables de interaccionar con otras proteínas, además se indican los residuos aminoacídicos blanco de fosforilación.



**Figura 8:** Representación esquemática de los dominios de interacción de CD1, además se remarcan algunos de los residuos aminoacídicos relevantes en la regulación de su actividad y en la vía de degradación. (Adaptada de Coqueret O 2002)

Pero cuáles son los factores que promueven que **CD1** se encuentre sobreexpresada en tumores, para ello se resumirán algunas de las vías por las cuales se controla la abundancia de **CD1** en células normales, y que implica la regulación de su expresión, de su localización celular y de su degradación.

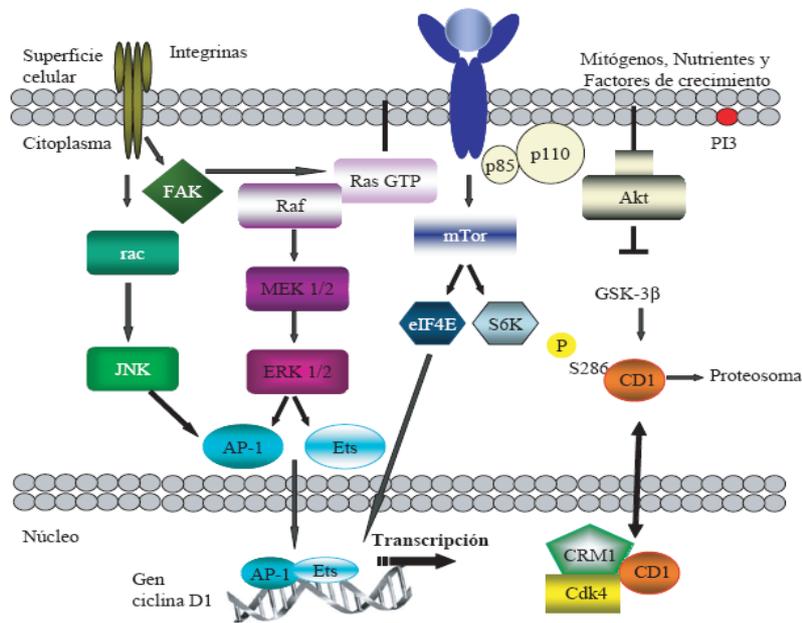
#### **i- Múltiples factores regulan la expresión de Ciclina D1**

En células normales, la abundancia de **CD1** es inducida por distintos factores de crecimiento que incluyen: Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento de insulina I y II (IGF-I y II) (Holthoner, W *et al.* 2002), Factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Beier, F *et al.* 2001), aminoácidos (Nelsen, CJ *et al.* 2003), hormonas entre las cuales se encuentran: andrógenos (Fu, M *et al.* 2003), ácido retinoico (Suzui, M *et al.* 2002), estrógenos (Castro-Rivera, E *et al.* 2001); ligandos para el Receptor de Proliferación de Peroxisomas activados  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (Wang, C *et al.* 2003), factores secretados por adipositos (Iyengar, P *et al.* 2003), hormonas gastrointestinales (Song, DH *et al.* 2003), entre otros; cada una de estas señales regula la expresión de **CD1** en tipos celulares específicos.

La unión de estos factores a sus receptores ya sea de superficie o en el interior de la célula, en el caso de hormona esteroideas, desencadena una cascada de eventos que finalmente resulta en la activación de distintos factores de transcripción. El número de intermediarios en cada una de estas cascadas varía según el tipo celular, y mutaciones en los genes que codifican para estos mediadores involucra la estimulación constitutiva de la expresión de **CD1** y el desarrollo oncogénico. En la figura 9 se detallan algunas de las cascadas de activación de la expresión de Ciclina D1 y algunos de los miembros que se encuentran mutados en tumores.

En esta cascada de señalización se activan una clase de Serina/Treonina quinasas que se inducen por mitógenos denominadas MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) o quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Filmus, J *et al.* 1994; Chang, L

*et al.* 2001). Estas vías involucran la activación secuencial de la proteína pequeña de unión a GTP **Ras** y la proteína quinasa **Raf-1** que es la encargada de fosforilar quinasas de MAPK (MAPKK) o de ERK (MEK), la fosforilación de ERK lleva a su translocación nuclear y a la activación de genes. La inactivación de **Ras** causa una disminución en los niveles de CD1 (Aktas, H *et al.* 1997; Peeper, DS *et al.* 1997), y como es de esperar una activación constitutiva de **Ras** correlaciona con una expresión elevada de CD1 y la progresión tumoral (Hinds, PW *et al.* 1994).

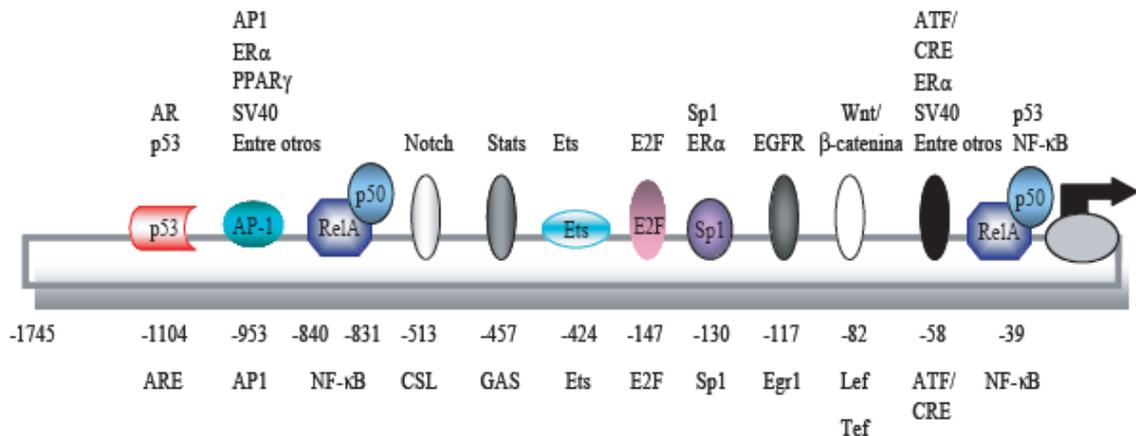


**Figura 9:** Regulación de la expresión del gen de ciclina D1, en donde se observa la cooperación entre la adhesión celular, la estimulación con factores de crecimiento y nutrientes en la inducción de la expresión.

La adhesión de las células a los componentes de la matriz extracelular, también induciría la transcripción de **CD1** (ver figura 9), probablemente a través de la vía de las MAPK, que se activa por la interacción entre las proteínas transmembrana denominadas Integrinas y la matriz extracelular (Schlaepfer, DD *et al.* 1994; Bottazzi, ME *et al.* 1997).

La región promotora del gen de **CD1** contiene múltiples secuencias reconocidas por diferentes factores de transcripción como se muestra en la figura 10 (Herber, B *et al.* 1994). A estos elementos se unen distintos complejos transcripcionales que serían los responsables de activar o reprimir la expresión de CD1 ante la estimulación de un amplio rango de mitógenos. En algunos, pero no en todos los casos, se ha confirmado la

unión de los factores de transcripción a estos elementos y los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la activación transcripcional del gen de ciclina D1 ocurriría de manera tipo celular y mitógeno específica. Entre los factores de transcripción que se unen a este promotor, ya sea de manera directa o indirecta formando complejos, se encuentran AP1 (Watanabe, G *et al.* 1996; Brown, JR *et al.* 1998), CREB (Lee, RJ *et al.* 1999), STAT3 y 5 (Matsumura, I *et al.* 1999),  $\beta$ -Catenina (Shtutman, M *et al.* 1999), ets-2, p53, E2F, Sp1(Watanabe, G *et al.* 1998), NF- $\kappa$ B (Guttridge, DC *et al.* 1999; Hinz, M *et al.* 1999) y receptores nucleares como AR, PPAR $\gamma$  y ER $\alpha$  (Altucci, L *et al.* 1996; Sabbah, M *et al.* 1999), entre otros. Se discutirá brevemente el rol de **NF- $\kappa$ B** y **ER $\alpha$**  sobre la regulación de la expresión de **CD1**; mientras que en secciones posteriores se hará un desarrolló más profundo de la función y relevancia de ambos factores de transcripción en los procesos fisiológicos y en el desarrollo tumoral.



**Figura 10:** Elementos de unión a distintos factores de transcripción en el promotor de ciclina D1. (Adaptado de Wang C. 2004)

**NF- $\kappa$ B:**

Este factor de transcripción ha sido implicado en la regulación de la proliferación, transformación y desarrollo tumoral. La activación de NF- $\kappa$ B es inducida por una diversa variedad de estímulos que incluyen: citoquinas inflamatorias como **TNF $\alpha$** , ésteres de forbol, toxinas bacterianas (Lipopolisacárido LPS), virus, luz ultravioleta, y una gran variedad de mitógenos. Tal como se describe en detalle más adelante en esta Introducción.

Los grupos de Strauss M. y Baldwin A. demostraron por primera vez en 1999, que **NF- $\kappa$ B** era capaz de estimular la transcripción de **CD1**. Como se muestra en la figura 10, el promotor del gen de ciclina D1 contiene dos sitios putativos de unión para **NF- $\kappa$ B**, en estos trabajos (Guttridge, DC *et al.* 1999; Hinz, M *et al.* 1999) se demostró que este factor de transcripción era capaz de unirse a ambos sitios con igual afinidad, tanto bajo la inducción con suero como bajo el estímulo con la citoquina inflamatoria **TNF $\alpha$** . La activación del promotor de CD1 por **NF- $\kappa$ B** sucedería principalmente a través del sitio proximal sin embargo no se puede descartar que en otro contexto celular o bajo otras condiciones de estímulo el sitio distal tenga un rol relevante como modulador de la expresión de **CD1**.

**NF- $\kappa$ B** ha sido también involucrado en la inhibición de la diferenciación celular (Beg, AA *et al.* 1995; Guttridge, DC *et al.* 1999), y esto estaría relacionado con el aumento de la expresión de **CD1**. En mioblastos que carecen de actividad de **NF- $\kappa$ B** se ve incrementado su tiempo de duplicación y bajo condiciones que inducen diferenciación son capaces de salir más rápidamente del ciclo celular que las células salvajes para iniciar la miogénesis (Guttridge, DC *et al.* 1999). Sin embargo en el epitelio mamario tendría un rol crucial en el desarrollo mamario durante el embarazo, en donde el bloqueo de la activación de **NF- $\kappa$ B** en ratones produce una disminución en los niveles de **CD1** y severos trastornos en la lactancia debido a la proliferación defectuosa del árbol lobuloalveolar durante el embarazo (Cao, Y *et al.* 2001).

### ***ER $\alpha$***

Dentro de la familia de hormonas esteroideas, los estrógenos son los responsables de la proliferación del epitelio mamario normal y uno de los principales implicados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama (Clarke, R *et al.* 1992). Varios estudios sugieren que **CD1** estaría mediando el efecto de los estrógenos sobre la proliferación tanto en condiciones normales como en el desarrollo tumoral, como ya se comentó anteriormente ratones que carecen de **CD1** muestran defectos en la respuesta estrogénica del epitelio mamario durante el embarazo (Sicinski, P *et al.* 1995).

Esta hormona ejerce su efecto a través de la unión a su receptor (**ER**) que tras su activación interacciona específicamente con secuencias del ADN denominadas elementos respondedores a estrógenos (ERE), usualmente estos elementos se localizan río arriba de los promotores regulados por estrógenos (Beato, M *et al.* 1995) y en donde esta interacción activa la transcripción de sus genes blanco. Como se puede observar en la figura 10, el promotor de CD1 carece de ERE, sin embargo, en varios trabajos se han descrito vías alternativas por los cuales el Receptor de estrógenos estaría actuando (Sabbah, M *et al.* 1999; Castro-Rivera, E *et al.* 2001), entre ellas los sitios AP1 donde el mecanismo podría involucrar la interacción directa entre ambas proteínas y por lo tanto no dependería de la unión directa del ER $\alpha$  con el ADN (Webb, P *et al.* 1995). Este no sería el único mecanismo por el cual el ER $\alpha$  estaría modulando la expresión de **CD1**, en la línea tumoral mamaria humana ZR-75 se vio que el receptor activado estaría regulando la expresión de este gen mediante sitios Sp1 (Castro-Rivera, E *et al.* 2001), y en donde se confirma lo observado en la línea MCF-7 de tumor de mama humana donde la mutación en el sitio CRE del promotor de CD1 causa la pérdida completa de respuesta al estímulo con estrógenos.

## **ii- La localización subcelular de CD1 regula su actividad y su degradación:**

La distribución subcelular de las Ciclinas de tipo D es otro de los eventos a ser regulado y que es dependiente del ciclo celular. Una vez sintetizada es fosforilada en su Treonina 156, y la interacción con Cdk4 hace que el complejo sea reconocido por la quinasa activada por ciclinas (CAK) que es la responsable de fosforilar a Cdk4 en su residuo Treonina 172 necesaria para que el complejo transloque al núcleo (Diehl, JA *et al.* 1997). Esta importación al núcleo coincide con la fase G<sub>1</sub>, pero una vez que la célula comienza a replicar su ADN, **CD1** desaparece del núcleo y se ubica en el citoplasma a pesar del hecho que sus niveles de síntesis no decrecen marcadamente durante la fase S (Baldin, V *et al.* 1993; Diehl, JA *et al.* 1998). En esta reubicación estaría involucrada la fosforilación de la Treonina 286, la mutación que cambia la Treonina por una Alanina (T286A) provoca que esta proteína permanezca en el núcleo durante la interfase (Diehl, JA *et al.* 1997), estas observaciones han sido confirmadas por una variante de *splicing* alternativo que involucre un C-terminal distinto, detectada en ciertos tejidos normales y tumorales, y en donde esta isoforma se localiza constitutivamente en núcleo,

posiblemente por la pérdida de la Treonina 286 (Diehl, JA *et al.* 1998; Solomon, DA *et al.* 2003).

La exportación al citoplasma depende del complejo CRM1 y se ha visto que tanto la inhibición de este complejo con leptomicina B como la inhibición de la quinasa que fosforila este residuo (GSK3 $\beta$ ) o la mutación T286A no solo evitan la exportación al citoplasma de **CD1** sino que también inhiben parcialmente su degradación dependiente de ubiquitinación (Diehl, JA *et al.* 1998; Alt, JR *et al.* 2000; Guo, Y *et al.* 2005); sin embargo esta no es la única vía de degradación de **CD1** dado que en ninguna de estas situaciones se observa una acumulación excesiva de esta proteína, a continuación describiremos brevemente los mecanismos por los cuales **CD1** es degradada.

En células normales, se produce una acumulación parcial de **CD1** debido a su rápida ubiquitinación y consiguiente degradación, con una vida media de aproximadamente 20 minutos en fibroblastos que se encuentran en activa proliferación, esta labilidad garantiza que esta subunidad desaparezca rápidamente en ausencia de mitógenos y esto coincide con su período de máxima actividad. Seguida su síntesis, **CD1** se asocia con Cul-1, uno de los componentes del complejo SCF (Skp1-Cullin-Fbox) ubiquitin-ligasa E3, para ser luego degradada por el proteosoma 26S (Russell, A *et al.* 1999). Esta degradación constitutiva es el mecanismo utilizado, generalmente, para regular los niveles de **CD1** libre y frenar la proliferación celular cuando las condiciones dadas por el contexto celular no son las adecuadas.

Como se describió anteriormente, cuando **CD1** se encuentra asociada a Cdk4 el mecanismo de degradación parece ser distinto e involucra la fosforilación de la Treonina 286 por la Glucógeno sintetasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), aunque esta quinasa es capaz de fosforilar a **CD1** libre, esta actividad parece ser más eficiente cuando esta unida a Cdk4. En contraste a lo que ocurre con **CD1** que se acumula en el núcleo durante la fase G<sub>1</sub> y es exportada al citoplasma durante la fase S; GSK3 $\beta$  es predominantemente citoplasmática durante G<sub>1</sub> pero una fracción significativa entra al núcleo durante la fase S (Diehl, JA *et al.* 1998), esta actividad y localización diferencial se puede deber a que la activación de la vía de **Ras** por mitógenos, que lleva al aumento de la transcripción de **CD1** es capaz también de inhibir a GSK3 $\beta$ , por lo tanto una

disminución en los niveles de mitógenos provocaría la bajada en los niveles de **CD1** por dos vías: disminuyendo su expresión y aumentando su degradación por activación de GSK3 $\beta$ .

En trabajos publicados por el grupo de Udit Verma (Kwak, YT *et al.* 2005), se demostró que **IKK $\alpha$** , quinasa involucrada en la activación del factor de transcripción **NF- $\kappa$ B**, era capaz de fosforilar a **CD1** en el residuo T286 y provocar su translocación al citoplasma en donde es degradada. Este hallazgo demostró no solo que GSK-3 $\beta$  no sería la única quinasa encargada de modificar la localización subcelular de CD1 sino que **IKK $\alpha$**  puede encontrarse en núcleo y ser funcional en este compartimiento.

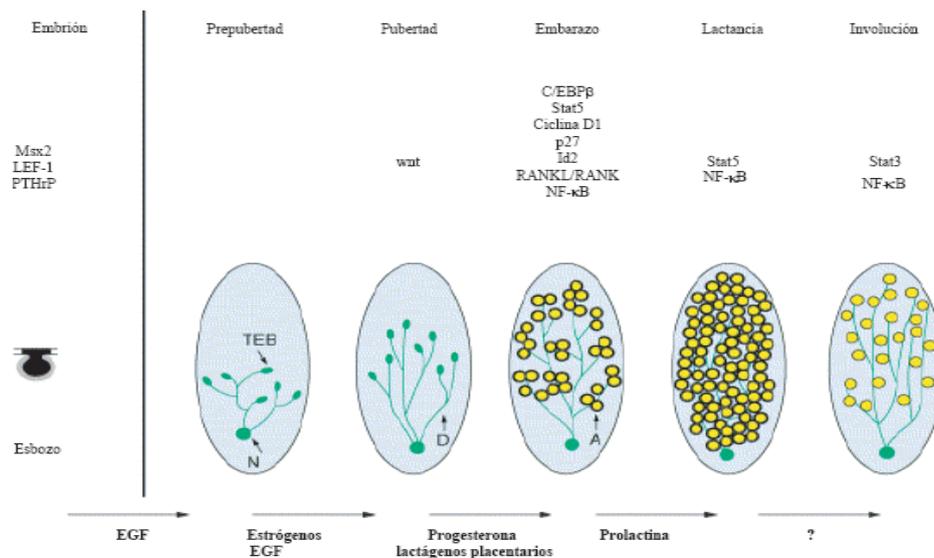
Otra modificación post-traduccional que estaría involucrada en la degradación de CD1 es la fosforilación de la Treonina 288 que es fosforilada por la Serina/Treonina quinasa Mirk/Dyrk1B, cuya actividad esta restringida a la fase G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> temprana (Zou, Y *et al.* 2004) y esto se debería a que la expresión de Mirk disminuye por activación de la vía de MEK/ERK activada por mitógenos (Deng, X *et al.* 2003), en construcciones en donde se ha cambiado la Treonina por una Alanina se ha observado que esta es mucho más estable que la Ciclina D1 salvaje además la sobreexpresión transitoria de Mirk en células no transformadas Mv1Lu de epitelio pulmonar arresta a las células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Zou, Y *et al.* 2004).

## II.2.2- CICLINA D1 EN EL DESARROLLO MAMARIO Y LA PROGRESION TUMORAL

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso altamente regulado (Hennighausen, L *et al.* 2001), se hará una breve descripción de cómo ocurre este proceso en ratones. Al nacer el epitelio mamario consiste en una red simple de conductos que ocupan una porción minoritaria del tejido graso de la mama. Durante la pubertad, se produce un incremento en el crecimiento ductal pero se mantiene un balance entre proliferación y apoptosis que ocurre en estructuras denominadas yemas de los finales terminales (*terminal end buds* TEB), sin embargo el mayor crecimiento del epitelio ocurre durante el embarazo e involucra la proliferación extensiva y rápida en donde se generan ramificaciones laterales formando un complejo árbol de unidades lobuloalveolares. En la lactancia, las células del epitelio mamario de las terminales se diferencian y empiezan a secretar leche. Durante la involución, la mayoría de la red

epitelial se retrae en tamaño mediante un mecanismo de apoptosis y se produce una remodelación tisular hacia una estructura similar a la de una hembra nulípara.

Para el desarrollo apropiado de la glándula mamaria se requiere de la estimulación hormonal adecuada y de la interacción estroma-epitelio (Hennighausen, L *et al.* 2001), en la figura 11 se resumen algunas de las moléculas y hormonas que controlan el desarrollo mamario en sus distintos estadios. En particular **ER $\alpha$**  y **NF- $\kappa$ B** tienen un rol crucial, mientras los estrógenos estarían induciendo la proliferación del tejido epitelial mamario en la transición a la pubertad, el factor de transcripción **NF- $\kappa$ B** es activado durante el embarazo, con un pico de actividad a los 15-16 post-coito y durante la involución (Clarkson, RW *et al.* 2000; Geymayer, S *et al.* 2000), su función durante el embarazo estaría relacionada con la inducción de **CD1**, manteniendo el estado proliferativo de las células lobuloalveolares previniendo su diferenciación terminal y retrasando el comienzo de la regresión celular debida a apoptosis.



**Figura 11:** Hormonas y genes que controlan el desarrollo de la glándula mamaria. En la etapa embrionaria se distingue un esbozo de la glándula compuesta de epitelio y estroma. En el estadio prepuberal la mama se caracteriza por la presencia de tejido graso (estroma) y a partir del pezón (N) se originan los ductos (D) y en las terminales de estos se formarán las yemas de los finales terminales (TEB) durante la pubertad. Durante el embarazo se empiezan a generar las estructuras lobuloalveolares (A) tras la diferenciación terminal de las células epiteliales que componen los TEB. La involución de la glándula mamaria post-lactancia es un proceso apoptótico que involucra de actividad de *bax* y *bcl-x*. (Adaptado de Hennighausen L 2001)

Los experimentos realizados con animales deficientes en *CD1*<sup>-/-</sup> muestran que estos son viables pero poseen anomalías en el desarrollo de un número acotado de tejidos

como ser retina, sistema nervioso y el epitelio mamario (Fantl, V *et al.* 1995; Sicinski, P *et al.* 1995), esto indicaría que **CD1** tiene una función tejida específica sobre todo en la proliferación del epitelio mamario durante el embarazo por otro lado ratones transgénicos que sobreexpresan **CD1** específicamente en la glándula mamaria muestran hiperplasia mamaria pero no desarrollan tumores lo que haría suponer que **CD1** funciona colaborando con otros **oncogenes** aumentando su potencial oncogénico, este es el caso de oncogenes como Myc, Ras y E1A (Hinds, PW *et al.* 1994). En todos estos casos la ausencia del gen CD1 bloquea el desarrollo tumoral inducido por los oncogenes Ras y Neu pero no el inducido por Wnt1 o Myc (Yu, Q *et al.* 2001).

La terapia endocrina es una modalidad de tratamiento en todos los estadios tumorales de cáncer de mama que son positivos para el Receptor de estrógenos y durante años el tamoxifeno ha sido la terapia de elección. Este tratamiento ha mostrado ser eficiente con lo que respecta a la reducción de la recurrencia, tasa de mortalidad y en la prevención del cáncer de mama (Jordan, VC 1999; Jordan, VC *et al.* 1999), sin embargo no todos los tumores **ER(+)** responden a este tratamiento y tempranamente muchos de ellos se hacen resistentes a pesar de mantener la expresión de **ER** (Jordan, VC 1999). Resultados obtenidos en la línea tumoral de mama T47-D que responde a estrógenos muestran que la expresión constitutiva de **CD1** confiere resistencia al tratamiento con anti-estrógenos (Hui, R *et al.* 2002); mientras que otros tipos de tumor nunca responden a este tratamiento y correlacionan con un peor pronóstico lo que ha llevado a investigar otros blancos terapéuticos.

### III- FACTORES DE TRANSCRIPCION

El rol de los factores de transcripción es crítico en la regulación de la función celular tanto en la activación, represión y/o modificación de la expresión de genes que son requeridos para el crecimiento, desarrollo, diferenciación y muerte celular. En donde la activación de la transcripción requiere de la interacción secuencial y coordinada de manera precisa de una gran variedad de complejos enzimáticos que son reclutados por proteínas de unión a secuencias específicas del ADN, por ende la regulación de este proceso se da en todos los niveles ya sea en el reconocimiento de la secuencia, modificaciones covalentes de las histonas, reclutamiento de correguladores y componentes de la maquinaria basal de transcripción, y el ensamblado de complejo de

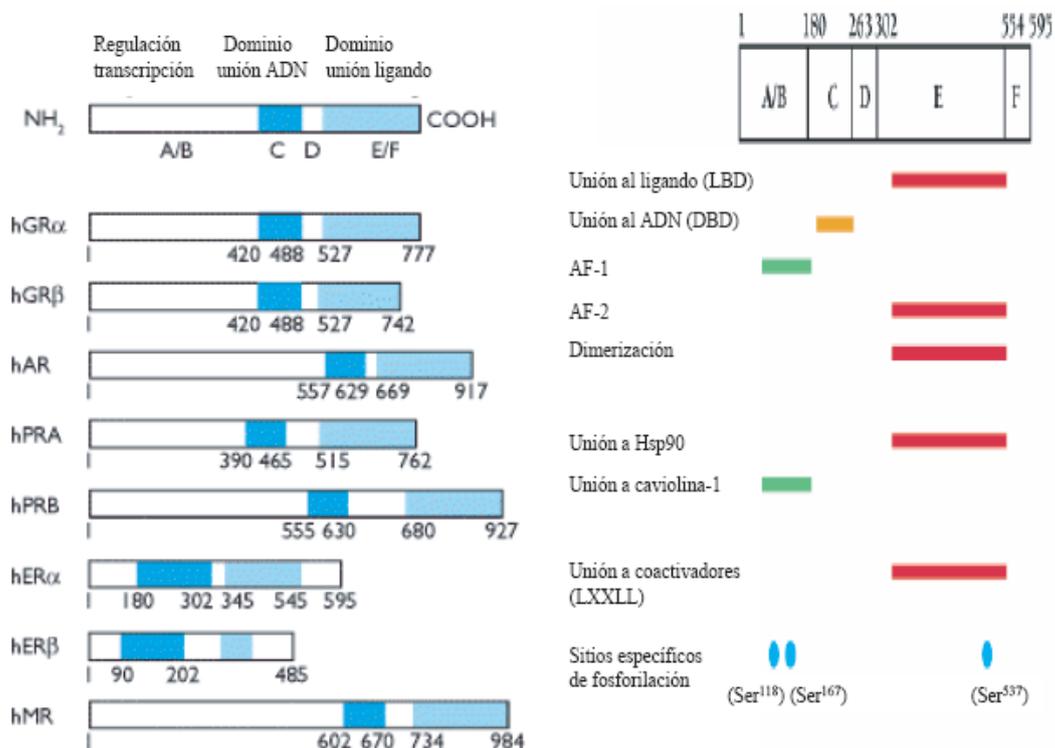
elongación. Varias evidencias demuestran que fallas durante el proceso de activación o represión de la transcripción pueden generar que los factores de transcripción presenten una activación incorrecta o se encuentran inactivos o constitutivamente activos; lo cual conduce a un mal funcionamiento celular, inestabilidad y en algunos casos al desarrollo tumoral.

### III.1- RECEPTORES NUCLEARES: CARACTERISTICAS GENERALES

A mediados de los '70 se demostró que los esteroides actuaban sobre su tejido blanco gracias a la presencia de receptores específicos de alta afinidad, pero en contraste a los péptidos hidrofílicos y factores de crecimiento que se unen a sus receptores en la superficie celular; las hormonas lipofílicas son capaces de difundir a través de la membrana plasmática e interactuar con sus receptores que se encuentran en el interior de la célula (Mangelsdorf, DJ *et al.* 1995b). Estas hormonas incluyen las esteroideas, retinoides, tiroideas y la vitamina D que son potentes reguladores del desarrollo, diferenciación celular y fisiología de los órganos.

La superfamilia de receptores nucleares puede ser dividida en cuatro (4) clases basadas en sus propiedades de dimerización y de unión al ADN. La clase I incluye a los denominados Receptores de hormonas esteroideas, entre ellos al **Receptor de Estrógenos (ER)**, el de Progesterona (PR), el de Glucocorticoides (GR) y el de Mineralocorticoides (MR), estos funcionan como homodímeros inducidos por ligando y se unen a sitios organizados como repeticiones invertidas, en ausencia de ligando se encuentran en citoplasma excepto el **ER**. La clase II se encuentra retenida en el núcleo en ausencia de ligando y forman heterodímeros con el Receptor de ácido 9-cis-retinoico (RXR), se caracterizan por unirse a repeticiones directas del ADN y son conocidos como Receptores de hormonas no esteroideas e incluyen: el Receptor de Tirosina (TR), el Retinoide (RAR), el de Vitamina D y PPAR. La clase III que se une como homodímero a repeticiones directas y los receptores de clase IV que se unen como monómeros; incluyen a la mayoría de los denominados Receptores huérfanos. Cada subfamilia, a su vez, esta compuesta de subtipos de receptores que son productos de genes individuales o isoformas que son producto del rearreglo (*splicing*) alternativo de un mismo gen (Mangelsdorf, DJ *et al.* 1995a; Giguere, V 1999).

Todos los miembros de esta gran familia tienen una organización estructural idéntica, como se muestra en la figura 12, esta consta de una región N-terminal A/B, seguida por el dominio de unión al ADN (DBD) consistente en dos dedos de zinc (región C), una región puente D y en el C-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD región E); en algunos receptores, existe un dominio extra que se encuentra en el C-terminal y contiguo al LBD (región F). Los dominios de transactivación se encuentran en regiones separadas, siendo ellos: el dominio AF-1 que tiene actividad constitutiva y que se encuentra en la región A/B que es la zona menos conservada entre los distintos Receptores nucleares (NR), mientras que el dominio de activación que depende de la unión al ligando AF-2 se encuentra en la región C-terminal en los alrededores del LBD y esta altamente conservado entre todos los miembros de la superfamilia de NR (Danielian, PS *et al.* 1992). Una vez activado el Receptor se une al ADN mediante el DBD e interacciona con secuencias específicas conocidas como elementos respondedores a hormona (HRE), mientras que el LBD posee las propiedades esenciales para el reconocimiento de la hormona, asegurando la especificidad y la selectividad de la respuesta fisiológica.



**Figura 12:** Miembros de la familia de Receptores esteroides, con sus dominios estructurales más relevantes. En el esquema de la derecha se detallan los dominios característicos del ER $\alpha$  así como algunos de los residuos Serina que son blanco de fosforilación necesarios para la regulación de su actividad.

Antes que las hormonas se unan al receptor, este se encuentra formando parte de un complejo con varias chaperonas perteneciente a la familia de proteínas de shock térmico (Hsp), entre ellas Hsp90, Hsp70 y p23, que mantienen al receptor en una conformación que favorece la unión del ligando (Segnitz, B *et al.* 1995), seguida la unión de la hormona el complejo se disocia, se produce la translocación al núcleo (en el caso de GR, MR, AR y PR), la dimerización y unión a sus sitios HRE en la cromatina. Datos actuales muestran que las chaperonas tendrían relevancia durante el ensamblado y el desensamblado de la maquinaria transcripcional, o sea tendrían una función nuclear asociada también al reciclado de los Receptores. La regulación en la expresión de genes por hormonas depende de la interacción del receptor unido al ADN con otros factores de transcripción y con la maquinaria general de la transcripción, que esta parcialmente mediada por moléculas denominadas coactivadores y correpresores; dependiendo de la naturaleza de estas interacciones va a ser el resultado final, es decir, inducción o represión de la transcripción.

### III.1.1- INTERACCION DE LOS RECEPTORES CON LOS FACTORES GENERALES DE LA TRANSCRIPCION Y COACTIVADORES

Los Receptores de hormona esteroideas parecen ser capaces de interactuar con varios componentes de la maquinaria general de la transcripción; por ejemplo la actividad transcripcional del **ER** es incrementada en respuesta a la sobreexpresión de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y las dos proteínas interactúan *in vitro* (Sadovsky, Y *et al.* 1995). Otros componentes del complejo TFIID, generalmente denominados TAF<sub>II</sub>S, esenciales para la activación de la transcripción y que pueden dirigir la selectividad de la ARN polimerasa II por un promotor (Verrijzer, CP *et al.* 1995) se han identificado por ser potenciales blancos de los NR; tal es el caso de TAF<sub>II</sub>30 que es requerida para la transactivación de **ER** y en ensayos *in vitro* se han caracterizado por interactuar (Jacq, X *et al.* 1994). También se ha descrito que TFIIB interactúa con TR, ER, PR y el receptor de vitamina D<sub>3</sub> (Beato, M *et al.* 1996)

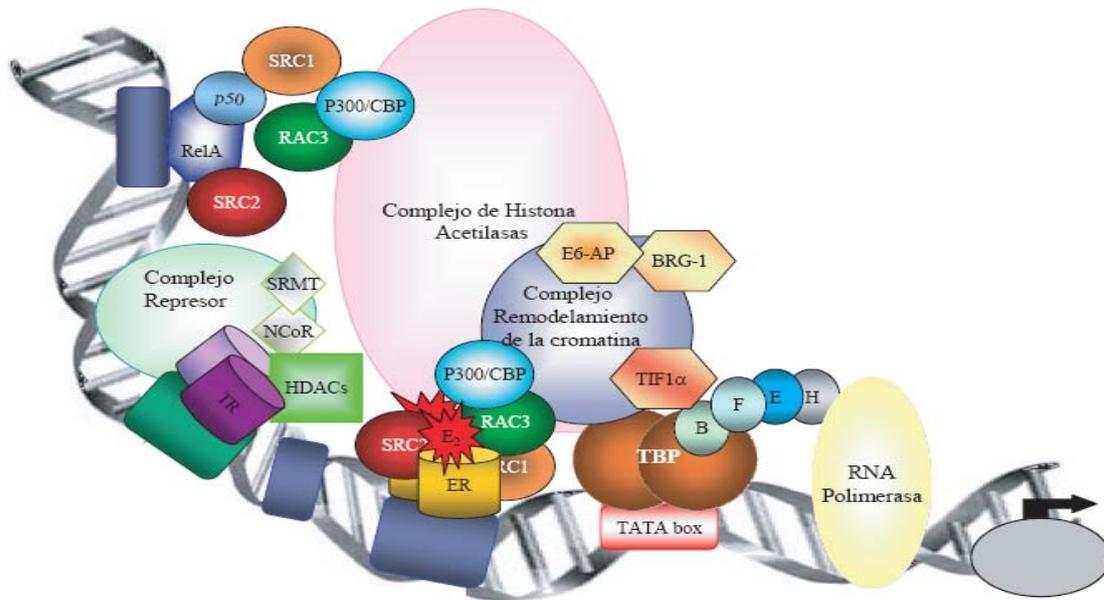
Los coactivadores son requeridos para la transactivación de distintos factores de transcripción (Chrivia, JC *et al.* 1993; Arany, Z *et al.* 1994; Kwok, RP *et al.* 1994), alrededor de finales de los '90 un gran número de factores intermediarios de la transcripción (TIFs) fueron identificados. Varias de estas proteínas interactúan con el

LBD del **ER** de manera ligando dependiente (Cavailles, V *et al.* 1994; Halachmi, S *et al.* 1994); uno de ellos es RIP40 que solo se uniría a la variante activa del **ER** tanto *in vitro* como *in vivo* (Cavailles, V *et al.* 1995). De manera similar se identificó a la proteína ubicua GRIP170 que se une a GR y aumenta su activación (Eggert, M *et al.* 1995).

Otras proteínas han sido identificadas por chequeos genéticos para factores intermediarios (Lee, JW *et al.* 1995; Onate, SA *et al.* 1995); en el caso de los TR y RAR, la acción de coactivadores presupone el desplazamiento dependiente de ligando de correpresores que para estos receptores suelen ser **NCoR** y **SMRT** (Burris, TP *et al.* 1995; Chen, JD *et al.* 1995; Horlein, AJ *et al.* 1995), en tanto que los Receptores de hormonas esteroideas no interactúan con estos correpresores en ausencia de su ligando, sin embargo tanto NCoR como SMRT interactúan con **ER $\alpha$**  cuando se encuentra unido a antagonistas pero esto solo ocurriría de manera tejido específico (Shang, Y *et al.* 2002), resultados similares han sido obtenidos con el PR y AR.

Se han identificado una gran variedad de proteínas que interactúan con estos receptores, entre estos correguladores muchos poseen actividades enzimáticas que favorecen el remodelado de la cromatina como por ejemplo actividad ATPasa intrínseca (BRG-1) o asociada (TIF1 $\alpha$ ), proteínas que interactúan o tienen homología con el aparato de ubiquitinación (E6-AP), pero muchos de ellos tienen la capacidad de aumentar la actividad transcripcional de NRs mediante su actividad Histona acetiltransferasa (HAT). Un modelo actual sugiere que la unión del ligando produce el desensamblado de correpresores y Histona deacetilasas (HDAC) y el reclutamiento de coactivadores con actividad HAT asociada o intrínseca; en donde la unión del ligando induce un cambio conformacional en el Receptor en particular en el dominio AF-2 y sería este cambio el que favorecería el intercambio de correpresores por coactivadores.

Estos hallazgos pusieron al descubierto la complejidad de los mecanismos moleculares involucrados en la transactivación mediada por NR. Estudios realizados utilizando el promotor de MMTV mostraron que distintos Receptores pueden reclutar distintos complejos de correguladores al mismo promotor. En la figura 13 se esquematiza la complejidad de este proceso y alguna de las moléculas identificadas.



**Figura 13:** Esquema donde se muestra el ensamblaje de la maquinaria basal de la transcripción que es capaz de interactuar tanto con moléculas encargadas del remodelamiento de la cromatina por su actividad intrínseca o por reclutamiento de proteínas con actividad quinasa o de ubiquitinización, las zonas azules representan zonas de activación a la cual se unen distintos factores de transcripción que gracias a la reestructuración de la cromatina interacción con la maquinaria basal de la transcripción aumentando su actividad. En tanto que las zonas en verde representan secuencias en donde o bien se unen represores o bien factores de transcripción inactivos como es el caso de E2F o Receptores nucleares de hormonas no esteroideas que son capaces de reclutar moléculas que reprimen la transcripción como es el caso de correpresores o HDAC.

### III.1.2- INTERACCION CON OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCION Y VIAS DE ACTIVACION INDEPENDIENTES DE LIGANDO

Normalmente, los Receptores de hormonas esteroideas controlan la actividad de promotores no solamente por interacción directa o indirecta con los factores de transcripción generales sino también a través de interacciones positivas o negativas con otros factores de transcripción. Bajo ciertas condiciones fisiológicas estas clases de interacciones, que pueden resultar en sinergismo o represión, tendrían un rol esencial en la eficiencia en la modulación de múltiples promotores. En promotores artificiales, los sitios HRE pueden regular positivamente la unión a sus sitios de varios factores de transcripción si estos se localizan a una distancia apropiada (Schule, R *et al.* 1988); en estos experimentos se determinó que la organización de la cromatina era esencial para este sinergismo.

Un caso paradigmático es el observado en el promotor del gen de glutamina sintetasa, que es inducida por glucocorticoides cuando ciertos contactos célula-célula se establecen en la retina, este elemento de 42 pares de bases contiene secuencias para GRE y un sitio AP1/CRE, sugiriendo que GR actúa en combinación con los factores AP1/CREB/ATF (Zhang, HY *et al.* 1991). La sobreexpresión de c-Jun previene la inducción del gen de la enzima por Glucocorticoides y este efecto es contrarrestado por expresión de otros de los miembros de AP1, como por ejemplo Jun-D, lo que sugiere una participación de estos en la modulación de la respuesta hormonal. Como resultado de esta interacción entre señales se puede producir un efecto potenciado o inhibitorio dependiendo del receptor, los miembros de AP1 presentes, el tipo celular y el promotor usado (Shemshedini, L *et al.* 1991). En varios sistemas el efecto mediado por la interacción con AP1 puede ocurrir cuando el receptor tiene unido un antagonista, esto sugeriría que pueden existir al menos dos mecanismos diferentes involucrados en la transactivación y en la transrepresión (Webb, P *et al.* 1995). Por lo tanto los Receptores de hormonas esteroideas pueden interaccionar directamente con estos factores y reprimirse mutuamente, típicamente este efecto puede tomar lugar tanto en sitios compuestos que contienen secuencias HRE y para el Factor de transcripción, por ejemplo AP1, como en sitios separados.

Es conocido el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la transcripción mediada por **NF- $\kappa$ B** y esto ocurriría al menos por dos mecanismos; uno de ellos involucra la interacción de GR con la subunidad RelA de **NF- $\kappa$ B** (Mukaida, N *et al.* 1994; Ray, A *et al.* 1994) y en donde parece estar involucrado el DBD de GR. Aparentemente GR bloquea la capacidad de unión al ADN de **NF- $\kappa$ B** no solamente cuando se une a sus ligandos sino cuando esta complejado a ligandos antagonistas como RU486. El otro mecanismo involucra la inducción de la expresión de **I $\kappa$ B $\alpha$** , que es el inhibidor natural de **NF- $\kappa$ B** y que lo mantiene en un complejo citoplasmático inactivo (Auphan, N *et al.* 1995; Scheinman, RI *et al.* 1995); este efecto puede ser importante para los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los glucocorticoides.

Un hecho inesperado fueron los estudios en donde se veía que los NR podían ser activados en respuesta a señales iniciadas a través de receptores de la membrana plasmática tanto en presencia como en ausencia de ligando (Power, RF *et al.* 1991;

O'Malley, BW *et al.* 1995); la inducción de los elementos respondedores a hormona en construcciones reporteras en respuesta a estas señales puede ser inhibida por antagonistas esteroides por lo tanto estaría mediada por el NR (Smith, CL *et al.* 1993).

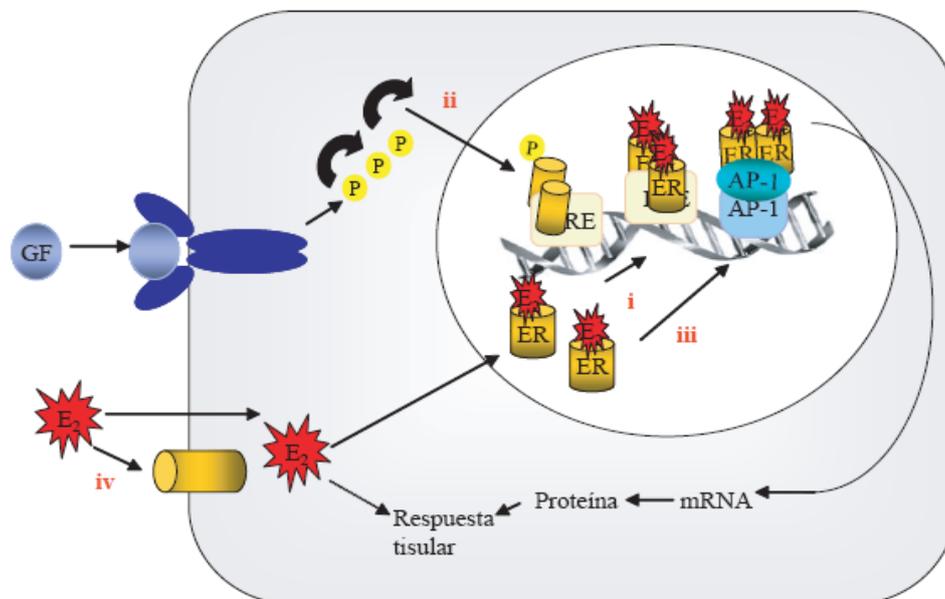
Como se detallará más adelante, el **ER** actúa como sustrato para las MAPK *in vitro* y en respuesta a la activación de Ras *in vivo* (Kato, S *et al.* 1995). Esta clase de integración en las señales podría ser esencial para el entendimiento del efecto de los estrógenos sobre la proliferación celular en cáncer, que además de influir en los niveles de expresión de CD1, también está involucrado en la transcripción de genes tempranos como ser *jun* y *fos* dos de los miembros de la familia AP1. La activación de la vía de Ras/MAPK aumenta la función mediada por el dominio constitutivo e independiente de ligando AF1 del **ER**, probablemente por fosforilación del receptor (Kato, S *et al.* 1995).

### III.1.3- EL RECEPTOR DE ESTROGENOS

La hormona esteroidea  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) es el regulador del crecimiento, diferenciación y función de un amplio rango de tejidos blanco, que incluyen los tractos reproductivos de machos y hembras, glándula mamaria, sistema cardiovascular y esquelético. El efecto de esta hormona está mediada por dos receptores intracelulares **ER $\alpha$**  y **ER $\beta$** , codificados por dos genes distintos (Giguere, V *et al.* 1998), que poseen la estructura característica de la familia de los NR. Ambos Receptores tienen 6 dominios (A-F) codificados por 8-9 exones. Los tres principales dominios funcionales son: (a) un N-terminal variable (18% homología) que contiene a las regiones A/B que regula la transcripción de manera gen y tipo celular específico a través del dominio AF-1; (b) un dominio central DBD que muestra un alto grado de homología entre ambos subtipos (97%) y (c) el dominio de unión al ligando LBD que contiene al AF-2 que también posee homología entre ambos receptores (60%), esto hace que ambos receptores interactúen con sitios ERE idénticos y exhiban una afinidad similar tanto por ligandos endógenos como sintéticos (Kuiper, GG *et al.* 1997b). El dominio D que es una región corta de 40-50 aminoácidos que separan los dominios DBD y el LBD, contiene las secuencias para la dimerización y secuencias de localización nuclear (NLS), además esta región interactúa con proteínas correpresoras. Estudios realizados sobre la función del dominio F muestran que estaría involucrado en el reconocimiento de agonistas o antagonistas quizás a través de la interacción con factores específicos de cada tipo celular.

Los estudios *in vitro* sugieren que ambos receptores pueden tener roles redundantes, sin embargo estudios de localización en tejidos muestran distintos patrones de expresión (Kuiper, GG *et al.* 1997a); donde **ER $\alpha$**  está expresado mayoritariamente en mama, útero, cerviz, vagina, mientras que **ER $\beta$**  tiene un patrón de expresión mucho más limitado, detectándose en ovario, próstata, testículo, bazo, pulmón, hipotálamo y timo (Couse, JF *et al.* 1997).

Experimentos realizados con ratones que carecen de cada uno de estos **ER**, muestran que: los ratones hembras **ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>** presentan hipoplasia del tracto reproductivo, hipergonadismo, carencia de desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad y exceso de tejido adiposo mientras que en los machos se observa una degeneración testicular, una disfunción epididimal; estos fenotipos generan un déficit en el comportamiento sexual que resulta en infertilidad de ambos sexos. En contraste, los machos **ER $\beta$ <sup>-/-</sup>** son fértiles mientras que las hembras exhiben una función ovárica ineficiente y subfertilidad (Korach, KS 1994; Kregge, JH *et al.* 1998; Couse, JF *et al.* 1999). Como se ha descrito brevemente en otras secciones hay varios mecanismos por los cuales se puede activar al **ER**, los mismos se discutirán a continuación y se esquematizan en la figura 14.



**Figura 14:** El efecto biológico del  $E_2$  es mediado a través de al menos 4 vías; **i** *vía clásica dependiente de ligando*: los complejos  $E_2$ -ER se unen a las secuencias ERE de distintos promotores; **ii** *vía independiente de ligando*: distintos factores de crecimiento (GF) activan vías de quinasas que llevan a la fosforilación (P) esto activa al ER en ausencia de ligando; **iii** *vía independiente ERE*: los complejos  $E_2$ -ER se unen a secuencias alternativas a las ERE, en este caso se pone de ejemplo la unión vía la interacción con AP-1 y

**iv** *vía no genómica*: E<sub>2</sub> actuaría a través de un receptor putativo, que sería un mecanismo por el cual se conectaría a una cascada de señalización que generaría una rápida respuesta tisular. (Adaptado de Hall JM 2001)

### **i- Mecanismo clásico dependiente de ligando**

Este modelo establece que en ausencia de ligando, el receptor se encuentra secuestrado en el núcleo formando parte de un complejo multiproteico inhibitorio. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el **ER** que promueve la homodimerización y la afinidad en la unión a sus sitios ERE. El receptor unido al ADN interacciona con la maquinaria general de la transcripción directa o indirectamente vía cofactores (McKenna, NJ *et al.* 1999b), esta interacción con coactivadores estabilizan la formación de un complejo de preiniciación de la transcripción y facilita la reorganización de la cromatina. Dependiendo del contexto celular y del promotor, la unión del **ER** puede tener un efecto positivo o negativo sobre la expresión de sus genes blanco.

Esta actividad transcripcional es mediada por los dominios AF-1 y AF-2, este último contiene una  $\alpha$ hélice anfipática conservada que es esencial tanto para su actividad transcripcional como para interactuar con los miembros de la familia de Coactivadores de Receptores de Hormonas Esteroideas (SRC) (Heery, DM *et al.* 1997; McKenna, NJ *et al.* 1999b). Ambos dominios parecen funcionar de manera sinérgica en la mayoría de los mecanismos activados por ligando, pero se ha visto que pueden actuar de manera independiente en ciertas circunstancias (Tzukerman, MT *et al.* 1994).

Dado el alto grado de homología en el DBD de ambos **ER**, en un principio no fue claro si **ER $\beta$**  no representaba un nivel de redundancia en la señalización por estrógenos o tenían funciones biológicas únicas. Los estudios realizados utilizando sistemas reporteros acoplados a secuencias ERE muestran que ambos subtipos son capaces de regular de forma positiva la transcripción, aunque **ER $\alpha$**  usualmente muestra una activación mayor. La preservación de la señal mediada por E<sub>2</sub> en ratones **ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>** tal como es la inducción del PR conocido blanco del **ER $\alpha$** , indican la capacidad de **ER $\beta$**  para compensar la pérdida del otro receptor.

Un dato llamativo es que cuando ambos Receptores son co-expresados *in vitro* hay tendencia a formar heterodímeros, además **ER $\beta$**  es capaz de interactuar con sus secuencias aún en ausencia de ligando y de esta manera atenuar la actividad del subtipo  $\alpha$ . Todas estas evidencias harían suponer que en células donde ambos receptores están presentes, la respuesta a la señalización por  $E_2$  estaría dada por el porcentaje de **ER $\alpha$ :ER $\beta$**  existente (Hall, JM *et al.* 1999).

## **ii- Intercomunicación con factores de crecimiento: Mecanismo independiente de ligando**

En ausencia de  $E_2$ , la función del **ER** puede ser modulada por señales extracelulares. Estos hallazgos se enfocaron principalmente en la capacidad del EGF y del IGF-1 así como del análogo 8-Bromo-AMP cíclico de activar al **ER** e incrementar la expresión de sus genes blanco (Smith, CL 1998). Es posible que estas vías de activación permitan que ER sea activado aún en presencia de niveles bajos de  $E_2$ , como es en el caso de machos o alternativamente este mecanismo pueda servir para amplificar las vías de factores de crecimiento y aumentar el efecto de mitógenos en los tejidos que responden a  $E_2$ . En experimentos realizados *in vivo* en ratones, la administración de anticuerpos anti-EGF atenúa la respuesta uterina a estrógenos mientras que el tratamiento con el antagonista ICI 164384 reduce la mediada por EGF (Ignar-Trowbridge, DM *et al.* 1992); observaciones similares se obtuvieron en glándula mamaria donde la intercomunicación de ambas señales es necesaria para una efectiva acción mitogénica. En estudios realizados en úteros de ratones **ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>** se observa falta de respuesta a la acción mitogénica de EGF.

Dominios específicos del Receptor parecen ser críticos en la activación independiente de ligando y la mayoría de la evidencia acumulada indica que las modificaciones en el estado de fosforilación del ER por quinasas celulares puede servir como un importante mecanismo de activación. La Serina 118 en el dominio AF-1 del ER $\alpha$  es blanco de fosforilación por la vía de MAPK activadas por EGF e IGF-1 y esta modificación potencia la actividad mediada por este dominio, en donde la secuencia que rodea a este residuo está altamente conservada entre las especies. La desfosforilación de este residuo es mediada por la Proteína Fosfatasa 5 (PP5) (Ikeda, K *et al.* 2004). Existen

evidencias que los coactivadores podrían servir como punto de convergencia entre el ER y los factores de crecimiento, dado que algunos de ellos, es el caso de **SRC1** y **SRC3**, son fosforilados por MAPK (Rowan, BG *et al.* 2000) y además la asociación de coactivadores con el dominio AF-1 del **ER $\alpha$**  depende de la fosforilación mediada por MAPK (Kato, S *et al.* 1995).

Los residuos de Ser104 y Ser106 son blanco de fosforilación del complejo CA/Cdk2 (Rogatsky, I *et al.* 1999), la estimulación de **ER $\alpha$**  por esta Ciclina ocurre cuando las células son tratadas con E<sub>2</sub> o con el antiestrógeno tamoxifeno y esto correlaciona con las observaciones hechas que demuestran que la actividad agonista del tamoxifeno es mediada a través del AF-1 del **ER $\alpha$** .

El **ER $\alpha$**  es también acetilado tanto *in vivo* como *in vitro* (Wang, C *et al.* 2001a); el coactivador **p300** lo acetila selectivamente y directamente en residuos lisina en el dominio D, cuando se compara el receptor salvaje con un **ER $\alpha$**  al que se le han sustituido estas lisinas se ve un aumento en la actividad dependiente de ligando, sugiriendo que la acetilación directa de **ER $\alpha$**  normalmente suprime la sensibilidad por el ligando, sin embargo esta modificación no altera su respuesta a la activación por MAPK.

### **iii- Acción del Receptor de estrógenos independiente de la unión al ADN**

Los mecanismos mencionados antes sirven para explicar la regulación de genes que poseen secuencias ERE en su promotor; sin embargo existen varios estudios, que muestran la inducción de estrógenos vía la activación de ER en genes que carecen de estos sitios, entre ellos el caso del promotor de CD1 en la glándula mamaria. Estos datos llevaron al descubrimiento que el ER activado por su ligando puede regular genes en ausencia de unión directa al ADN. Algunos ejemplos son: la activación de la enzima Colagenasa vía **ER $\alpha$**  que es mediada por la interacción del receptor con Fos y Jun en los sitios de unión a AP1, y en donde varios genes conteniendo secuencias promotoras ricas en GC son activados vía complejos ER $\alpha$ -Sp1.

Los estudios realizados muestran que la activación utilizando sitios AP1 requiere de los dominios AF-1 y AF-2 del receptor, que unen e incrementan la actividad de los componentes **SRC** del complejo de coactivadores. Un mutante del **ER $\beta$**  humano que carece de un dominio funcional AF-1, es incapaz de regular genes vía AP1 (Kushner, PJ *et al.* 2000).

#### **iv- Mecanismo no genómico de estrógenos, el Receptor de Estrógenos de membrana**

El efecto biológico rápido de estrógenos en ciertos tejidos, podría estar mediado por un putativo ER de membrana encargado de interconectarse con proteínas involucradas en la transducción de señales intracelulares, en donde las vías de **ER** y de tirosina quinasas acopladas a membrana estarían integradas. Los estrógenos se ha visto que son capaces de activar la señal de MAPK en una variedad de tipos celulares y existen bastantes evidencias que algunos de los efectos protectivos, mediados por E<sub>2</sub>, sobre el sistema vascular son mediados por mecanismos no genómicos del **ER $\alpha$** , el cual involucra una activación bifásica de la Oxido Nítrico sintasa endotelial (eNOS) por estrógenos a través de las vías de MAPK y de Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt (Mendelsohn, ME 2000; Simoncini, T *et al.* 2000). En osteoblastos y osteoclastos, las MAPK son rápidamente activadas por E<sub>2</sub>, que podría estar involucrado en los efectos proliferativos y antiapoptóticos de la hormona (Kousteni, S *et al.* 2001).

#### **v- Mecanismo de activación del ER específica de tejidos**

Las actividades de **ER $\alpha$**  y de **ER $\beta$**  están involucradas en diversas vías celulares y con la identificación de componentes sintéticos que mezclan actividades agonistas/antagonistas se incremento la complejidad de estas vías de señalización. Surgió un nuevo desafío cuyo objetivo es desarrollar ligandos que retengan los efectos benéficos de los E<sub>2</sub> pero que carezcan de sus acciones mitogénicas y quizás carcinogénicas en útero y mama.

El clásico modelo de ligandos agonistas es que funcionan como interruptores moleculares, convirtiendo al **ER** de su forma inactiva a la forma activa, mientras los

antiestrógenos inhiben competitivamente la unión de los agonistas y dejan al Receptor en un estado latente. Sin embargo, este modelo no es capaz de explicar el mecanismo utilizado por los Moduladores Selectivos del ER (SERM).

La primera evidencia que la actividad de ligandos sintéticos de **ER** era dependiente del tejido blanco, fueron resultados de estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama tratados con el antagonista tamoxifeno como tratamiento adyuvante y se observó un efecto positivo en los huesos (Love, RR *et al.* 1992), mientras que los estudios cristalográficos de los **ER** complejados con diferentes ligandos confirmaron que agonistas y antagonistas inducen cambios conformacionales distintos en la estructura del Receptor y esto tendría sus consecuencias en su actividad.

Al menos se han clasificado tres tipos de antiestrógenos, basados en su estructura y actividad biológica. Los de Tipo I representados por el ICI 182780 funcionan como antagonistas puros y se oponen a la actividad de los estrógenos en todos los contextos tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que los de Tipo II y III representados por los derivados de raloxifeno y tamoxifeno, respectivamente; son reconocidos como SERM. Estos agentes se diferencian de los antiestrógenos puros en que mimetizan el efecto biológico de los E<sub>2</sub> en tejidos específicos pero tienen efectos opuestos en otros (tabla 1).

Actividad biológica selectiva de los ligandos de ER en sus tejidos blanco

	Huesos	Mama	Cardiovascular	Utero
17β- Estradiol	+	+	+	+
ICI 182780	-	-	-	-
Tamoxifeno	+	-	+	+
Raloxifeno	+	-	+	-
GW5638	+	-	+	-

En el efecto agonista de los estrógenos los dominios AF son imprescindibles, mientras que el antagonista ICI 182780 bloquea totalmente la función de ambos dominios. Entonces, por definición, los SERMs son una mezcla de agonista/antagonista que dependen del contexto celular y del promotor para ejercer su efecto, esto puede ser ilustrado por el tamoxifeno, el cual inhibe al dominio AF-2 y por lo tanto actúa como

antagonista en todos los contextos en donde este dominio este involucrado; sin embargo en contextos donde AF-1 es el dominio activador el tamoxifeno actúa como agonista parcial. Entonces, la actividad agonista de E<sub>2</sub> y tamoxifeno parece estar mediada a través de mecanismos distintos, reflejando que el dominio AF-1 es capaz de reclutar coactivadores diferentes según se una E<sub>2</sub> o tamoxifeno y en donde la co-expresión de coactivadores o correpresores junto con **ER $\alpha$**  altera la actividad agonista/antagonista del tamoxifeno (Smith, CL *et al.* 1997).

#### **vi- Interacción del Receptor de estrógenos con corre reguladores**

El **ER $\alpha$**  ha sido caracterizado por interactuar con un gran número de proteínas *in vitro* y algunas de estas interacciones tienen una consecuencia funcional sobre la transcripción. Los primeros experimentos mostraron que la sobreexpresión de un tipo particular de NR podía inhibir la activación transcripcional mediada por otro de los miembros de familia de NR de manera dosis dependiente; indicando la posibilidad que estos Receptores compitieran por cantidades limitantes de un determinado factor necesario para una óptima actividad (Meyer, ME *et al.* 1989); después de ser postulada esta hipótesis surgieron múltiples trabajos en donde se identificaron una gran cantidad de estos factores que incrementan o reprimen la actividad de distintos NR, denominados coactivadores o correpresores, respectivamente.

El modelo actual para explicar la regulación específica de tipo celular sugiere que las células blanco expresan niveles diferentes de corre reguladores; esto en conjunto con distintas concentraciones de **ER $\alpha$** , **ER $\beta$**  y de ligando, permite una regulación fina de distintos genes en respuesta a estrógenos (McKenna, NJ *et al.* 1999a). Más adelante en esta introducción se describirán en detalle estas moléculas.

#### **vii- El Receptor de estrógenos y el cáncer de mama**

Los estudios epidemiológicos han identificado un número de factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de mama (Landis, SH *et al.* 1999), un incremento de este riesgo ha sido asociado con un comienzo temprano de la menstruación, ausencia de embarazo o primer embarazo tardío, período corto de lactancia, menopausia tardía,

uso de hormonas para terapia de reemplazo e incremento de la densidad ósea, en donde el punto de conexión de estos factores es la exposición prolongada a hormonas sexuales femeninas.

El estrógeno más activo en la glándula mamaria es el  $17\beta$ -estradiol, que actúa localmente estimulando la síntesis del ADN y promoviendo la formación de las terminales ductales; además es considerado como un estimulador y promotor tumoral. La fuente principal de estrógenos circulantes es por esteroidogénesis en el ovario en mujeres premenopáusicas y mediante aromatización de andrógenos ováricos y adrenales en las mujeres postmenopáusicas. La importancia de la esteroidogénesis en el desarrollo del cáncer de mama se vislumbra por el hecho que las mujeres que naturalmente o de manera inducida presentaban una menopausia temprana tenían un menor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Aunque el 67% de los casos de cáncer de mama se manifiesta durante el período postmenopáusico, una gran mayoría de estos casos (95%) inicialmente son dependientes de hormona, esto estaría indicando que los estrógenos juegan un rol crucial en su desarrollo y evolución.

La expresión de **ER** correlaciona con tumores diferenciados, pronóstico favorable y respuesta al tratamiento con antiestrógenos; sin embargo, una cantidad considerable de pacientes adquieren resistencia a este tratamiento. En general los niveles expresados de este receptor es mucho mayor que en el tejido normal (Early Breast Trialists' Collaborative Group, 1998). Los tumores que muestran una baja diferenciación frecuentemente carecen de **ER** y presentan fenotipos mucho más agresivos.

Existen alteraciones moleculares específicas que correlacionan con el desarrollo del cáncer de mama, entre ellas una mutación somática en el dominio de acetilación del **ER $\alpha$**  que ocurre con alta frecuencia en las mujeres caucásicas con hiperplasia mamaria (Fuqua, SA *et al.* 2000), esta mutación presenta una sustitución de una Lisina 303 por una Arginina que confiere una hipersensibilidad a estrógenos haciendo que el **ER $\alpha$**  se active en presencia de bajas concentraciones de la hormona.

Por otro lado, en el cáncer de mama existe correlación entre la presencia de **ER $\alpha$**  y un aumento en los niveles de varios coactivadores, entre ellos **SRC3** y una disminución en la expresión de correpresores como **NCoR** que es asociado con una menor respuesta al tratamiento con antiestrógenos.

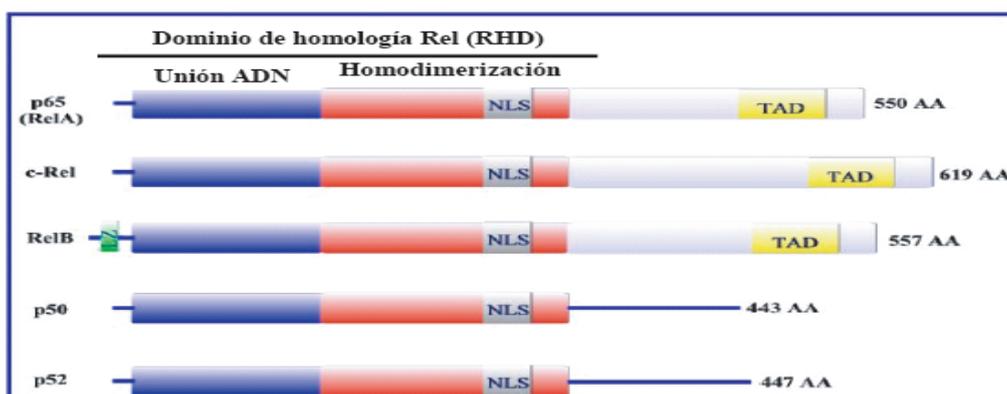
### III.2- EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR NF- $\kappa$ B

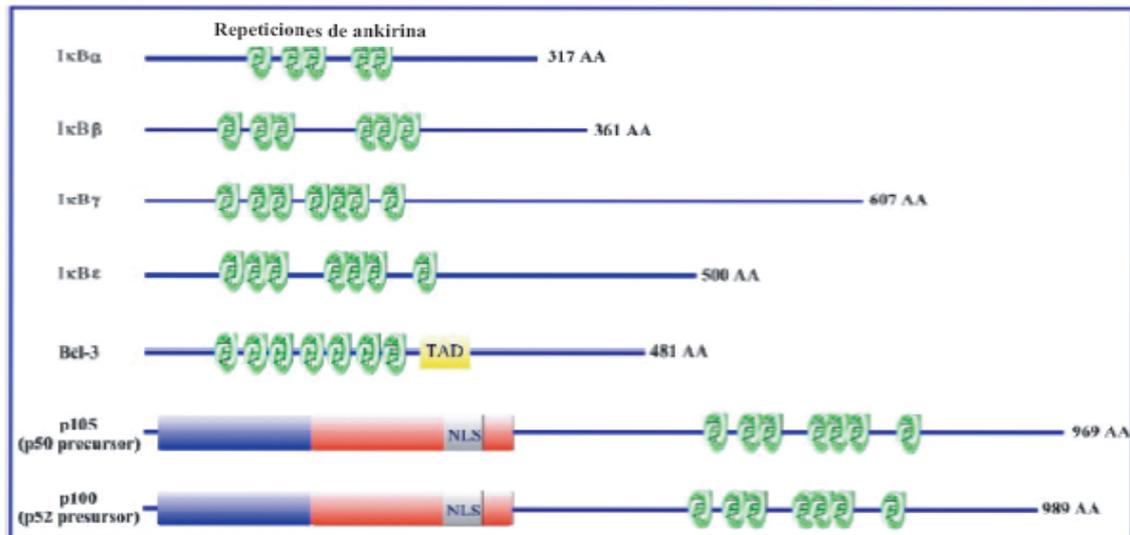
Durante su ciclo de vida la célula encuentra situaciones en donde su supervivencia depende de la interrelación entre distintas vías de señalización, entre ellas la que depende de la activación del factor de transcripción **NF- $\kappa$ B** sería crucial en la respuesta a estímulos apoptóticos. Pero esta no sería su única función sino que también tiene un rol primordial en la respuesta inmune normal e inflamatoria así como en el control de la proliferación celular, diferenciación y la muerte celular. Un amplio rango de estímulos activan a este factor de transcripción que incluyen citoquinas, mitógenos, metales tóxicos, productos bacterianos y virales (Pahl, HL 1999).

Entre los genes que son activados por **NF- $\kappa$ B** son los que codifican para citoquinas, factores de crecimiento, proteínas de respuesta de fase aguda, moléculas de adhesión, otros factores de transcripción y varios reguladores de la apoptosis. Además está involucrado en la expresión de genes de respuesta temprana involucrados en la interacción célula-célula, comunicación intercelular, trans migración y en la iniciación de la tumorigénesis (Israel, A 2000).

#### III.2.1- CARACTERÍSTICAS GENERALES

Esta familia de factores de transcripción fue asociada originalmente con procesos inflamatorios. La familia **NF- $\kappa$ B/Rel** comprende 5 miembros: **NF- $\kappa$ B1 (p105/p50)**, **NF- $\kappa$ B2 (p100/p52)**, **RelA (p65)**, **c-Rel** y **RelB**. Como se esquematiza en la figura 15 estas proteínas poseen un N-terminal estructuralmente conservado denominado dominio de homología Rel (RHD), mediante este dominio se produce la dimerización, la unión al ADN, la localización nuclear y la interacción con las proteínas inhibitorias **I $\kappa$ B**.





**Figura 15:** En el panel superior se encuentran esquematizados los 5 miembros de la familia Rel, que se caracterizan por su dominio de homología RHD, que incluye el dominio de unión al ADN y el de dimerización, en donde se encuentra la secuencia de importación al núcleo (NLS); 3 miembros de esta familia contienen la región de transactivación (TAD) pero 2 de los miembros carecen de este dominio por lo que la dimerización entre estos miembros lleva a la represión de la transcripción, por este motivo y dado que su precursor (p100 y p105) presentan repeticiones de ankirina se lo reconoce también como miembros de la familia de inhibidores IκB, los cuales se esquematizan en el panel inferior. (Adaptado Xiao W 2004)

En su forma activa, **NF-κB** forma dímeros producto de distintas combinaciones entre sus subunidades; cada miembro de la familia, excepto **RelB**, puede formar homodímeros así como heterodímeros. **RelB** forma heterodímeros con **p100**, **p52** y **p50**. El heterodímero más ubicuo es el formado por **RelA/p50**. Las subunidades **RelA**, **c-Rel** y **RelB** contienen dominios de transactivación no homólogos entre sí en su C-terminal (TAD), que son necesarios para la activación transcripcional mediada por estas proteínas; en cambio las subunidades **p50** y **p52** carecen de estos dominios. Estas dos últimas proteínas se generan por procesamiento proteolítico de los precursores, **p105** y **p100**, respectivamente. Estos precursores son procesados constitutivamente a través de mecanismos co-traduccionales, pero el procesamiento de **p105** es mucho más eficiente, por tal motivo las células exhiben altos niveles constitutivos de **p50**, mientras que los niveles estacionarios de **p52** son más bajos, debido a que su procesamiento es inducible y está altamente controlado (DiDonato, JA *et al.* 1997). Al carecer de dominios de transactivación los homodímeros de estas proteínas si bien conservan la capacidad de unirse al ADN son incapaces de activar la transcripción y de esta manera reprimen la expresión.

En células en reposo, **NF- $\kappa$ B** se encuentra retenido en el citoplasma en forma inactiva a través de la asociación con las proteínas de la familia **I $\kappa$ B** cuyos miembros son: **I $\kappa$ B $\alpha$** , **I $\kappa$ B $\beta$**  e **I $\kappa$ B $\epsilon$**  (figura 15), estas proteínas se caracterizan por la presencia de múltiples repeticiones de ankyrina que median la unión con el RHD del factor de transcripción y con otras proteínas. Los precursores **p105** y **p100** también contienen estas repeticiones, por lo tanto pueden funcionar como inhibidores. Los estudios cristalográficos y mecanísticos han revelado que **I $\kappa$ B $\alpha$**  enmascara la secuencia de translocación nuclear de la subunidad **RelA**, dejando el NLS de **p50** expuesto (Huxford, T *et al.* 1998), este NLS expuesto acoplado con la secuencia de exportación nuclear (NES) presente tanto en el **I $\kappa$ B $\alpha$**  y **RelA**, da como resultado un constante transporte entre núcleo-citoplasma del complejo formado por **RelA/p50/I $\kappa$ B $\alpha$**  y dado que el proceso de exportación es mucho más potente que el de importación, la localización de **NF- $\kappa$ B** unido a **I $\kappa$ B $\alpha$**  es citoplasmática. Un mecanismo similar es utilizado por **I $\kappa$ B $\epsilon$** , sin embargo **I $\kappa$ B $\beta$**  carece de NES pero es capaz de enmascarar ambos NLS del **NF- $\kappa$ B** haciendo que este permanezca en citoplasma en células no estimuladas. Dos proteínas de la familia **I $\kappa$ B** han sido caracterizadas, **Bcl-3** y **I $\kappa$ B $\zeta$**  estas son constitutivamente nucleares y pueden actuar como correguladores (Yamamoto, M *et al.* 2004).

### III.2.2- VIAS DE SEÑALIZACION QUE ACTIVAN NF- $\kappa$ B

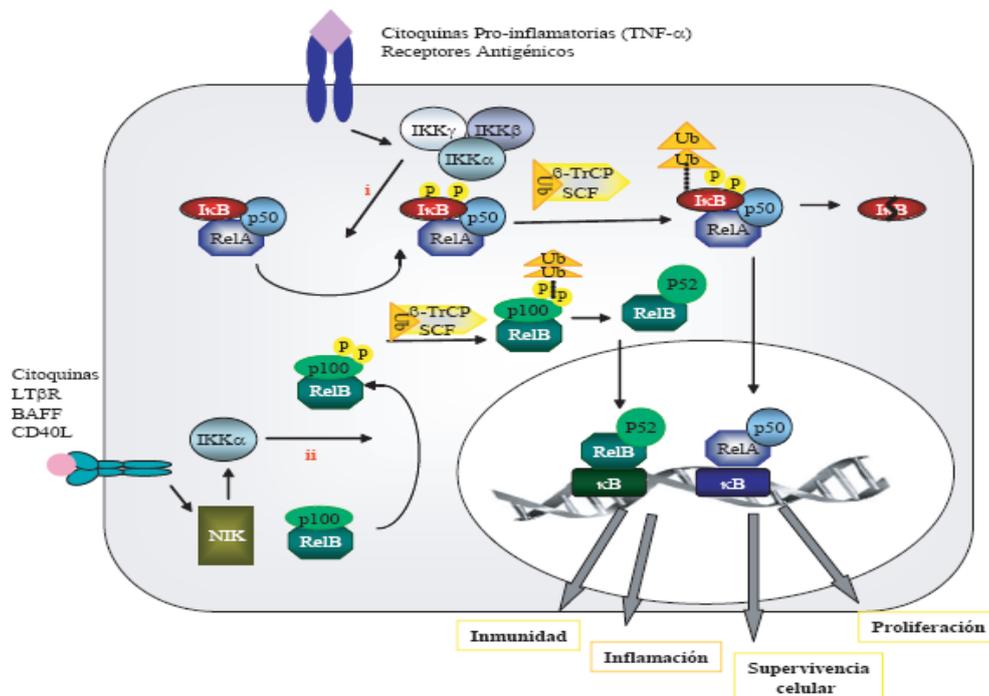
Se han caracterizado tres vías generales de señalización, todas ellas consisten en la activación secuencial de quinasas, la dimerización de **NF- $\kappa$ B**, su ulterior unión al ADN, y finalmente el aumento de la actividad transcripcional del factor **NF- $\kappa$ B**. Estas vías de activación, esquematizadas en la figura 16, se denominan: i- Vía canónica y ii- Vía no canónica y se describirán a continuación:

#### i- Vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B

Los principales activadores de esta vía son: el lipopolisacárido bacteriano (LPS), citoquinas pro-inflamatorias tales como **IL1 $\beta$**  y **TNF $\alpha$** . Aunque los eventos tempranos seguidos a la interacción del ligando con su receptor es específico para cada estímulo y son levemente distintos (Hayden, MS *et al.* 2004), las señales iniciadas convergen en el complejo quinasa de **I $\kappa$ B** (**IKK**), que incluye a las proteínas **IKK $\gamma$ /IKK $\alpha$ /IKK $\beta$** , una

vez activada, **IKK** fosforila a **IκBα** en los residuos Ser32 y Ser36 (Traenckner, EB *et al.* 1995) y esta modificación la marca para ser reconocida por la maquinaria de ubiquitinación que involucra el complejo SCF-β-TrCP y degradada por el proteosoma 26S, esto genera el desenmascaramiento del NLS de **NF-κB** y su translocación al núcleo.

**IKKα** e **IKKβ** poseen un 50% de homología, ambas proteínas contienen un dominio quinasa N-terminal, una región C-terminal que contiene un cierre de leucina y un dominio hélice-loop-hélice. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* indican que aunque tanto **IKKα** e **IKKβ** son capaces de fosforilar a **IκBα**, **IKKβ** es mucho más potente en la fosforilación inducida por estímulos inflamatorios.



**Figura 16:** La vía clásica o canónica de activación de NF-κB (i) es activada por una variedad de señales inflamatorias que incluyen citoquinas pro-inflamatorias y antígenos de microorganismos como ser el LPS bacteriano, estas señales llevan a la activación del complejo IKK y la degradación de IκBα. El complejo NF-κB que es liberado por esta vía suele ser el constituido por RelA:p50. La vía no canónica (ii) es activada por algunos miembros de la familia de Receptores de TNFα que incluyen LTβR, BAFF y CD40L y lleva al procesamiento del precursor p100 y la liberación del complejo p52:RelB.

Además ambas proteínas son funcionalmente distintas, mientras **IKKβ** como ya se ha comentado es el principal responsable de la degradación de IκB; **IKKα** sería necesaria solo cuando la degradación de IκB es inducida por el ligando de RANK y por

la proteína viral v-FLIP pero además tiene un amplio espectro de funciones no compartidas por **IKK $\beta$** , que incluyen la fosforilación de histonas (Yamamoto, Y *et al.* 2003), de **CD1** (Kwak, YT *et al.* 2005), de **RelA** y **c-Rel** que participan en la terminación de la activación de **NF- $\kappa$ B** (Lawrence, T *et al.* 2005), además como veremos participa de la activación de la vía no canónica (Xiao, W 2004). La actividad del complejo **IKK** es regulado por fosforilación y sería **IKK $\gamma$**  la subunidad regulatoria del complejo que serviría de sitio de reconocimiento para los activadores de la vía.

Esta activación suele ser transitoria debido a que **NF- $\kappa$ B** es capaz de unirse a sitios en el promotor del gen de **I $\kappa$ B $\alpha$** , activando la síntesis de su inhibidor, el cual se acumula en el núcleo y produce la disociación de **NF- $\kappa$ B** de su unión al ADN (Arenzana-Seisdedos, F *et al.* 1997); los nuevos complejos **I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B** son exportados al citoplasma, reprimiendo la transcripción mediada por **NF- $\kappa$ B**. **I $\kappa$ B $\alpha$**  es el único de los miembros de **I $\kappa$ B** cuya expresión es regulada por **NF- $\kappa$ B**. Los 3 miembros de **I $\kappa$ B** son blanco de degradación por la vía canónica.

Además del procesamiento constitutivo del precursor **p105**, que produce pequeñas cantidades de **p50** necesarias para la actividad basal de **NF- $\kappa$ B**, existe un procesamiento inducible y que depende de la fosforilación mediada por **IKK** y la ubiquitinación de **p105**. Este puede ocurrir en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias y LPS (Heissmeyer, V *et al.* 1999), y en donde este procesamiento inducible puede ser producto de 2 procesos distintos que emplean diferentes ubiquitin ligasas y que podrían marcar a **p105** para su completa degradación o su procesamiento parcial (Cohen, S *et al.* 2004).

## ii- Vía de activación no canónica

Esta vía es activada en respuesta a un subset de inductores de **NF- $\kappa$ B**, tales como linfotoxina B, el factor de activación de células B (BAFF), RANK ligando o el ligando CD40, aunque estos pueden también activar la vía canónica. La vía no canónica es independiente de **IKK $\gamma$**  e **IKK $\beta$** , y en donde la quinasa responsable de mediar la activación es un homodímero formado por **IKK $\alpha$**  que fosforila a **p100** asociada a **RelB**.

El procesamiento de **p100** libera al complejo transcripcionalmente activo **p52/RelB**. (Xiao, W 2004).

En esta vía la quinasa **NIK** es activada por unión de alguno de los ligandos antes nombrados a su receptor y sería esta quinasa la encargada de fosforilar y activar al homodímero **IKK $\alpha$** , quien a su vez interacciona con **p100** y es formando este complejo que fosforila Serinas específicas tanto del C-terminal como del N-terminal de **p100**, que lo marca para su ubiquitinación y procesamiento vía el proteosoma dando lugar a **p52** y la translocación del dímero **p52/RelB** al núcleo, por lo tanto **p100** funcionaría como el principal supresor de la actividad de **RelB**.

### iii- Vía de activación por daño al ADN

Esta vía es considerada atípica dado que no involucra la iniciación producto de la unión de un ligando a su receptor y por ende es independiente del complejo **IKK**. La activación de **NF- $\kappa$ B** producto de la irradiación ultravioleta (UV), involucra la fosforilación del dominio C-terminal de **I $\kappa$ B $\alpha$**  por la Casein quinasa 2 activada por p38 (Kato, T, Jr. *et al.* 2003).

## III.2.3- REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE NF- $\kappa$ B Y SUS CORREGULADORES

Debido a la actividad ubicua de este factor de transcripción, que es capaz de regular la expresión de numerosos genes involucrados en diversos procesos celulares, debe existir un control temporal y específico en la respuesta mediada por este factor de transcripción. Como se discutió, diferentes estímulos activan distintas quinasas, que son capaces de marcar diferencialmente a **I $\kappa$ B** para su degradación; sumado a esto los distintos miembros de **I $\kappa$ B** tienen distintas afinidades por los dímeros **NF- $\kappa$ B**, por ejemplo **I $\kappa$ B $\alpha$**  tiene mayor afinidad por **RelA/p50**, mientras que **I $\kappa$ B $\epsilon$**  se une a **RelA/c-Rel** y **p100** se une a **RelB**, esta degradación selectiva puede determinar cuando los dímeros, ya sean activos o represivos, son liberados. Es más, los genes blanco requieren miembros específicos para su activación y estos varían de gen a gen; aunque diferentes estímulos pueden activar distintas combinaciones de dímeros pero también un mismo

estímulo puede generar distintas oleadas y subconjunto de activación de genes debido a la dinámica en la degradación y síntesis *de novo* de I $\kappa$ B.

En cuanto a la activación de los miembros del complejo **IKK**, se ha visto que depende de su fosforilación, dado que la sobreexpresión de la Proteína Fosfatasa 2A (PPA2) inhibe su activación mientras que el tratamiento con ácido ocaidaico, inhibidor de esta fosfatasa, aumenta la activación del complejo **IKK** (DiDonato, JA *et al.* 1997). Estudios realizados mutando las Serinas 177 y 181 de **IKK $\beta$**  disminuye su actividad y se vio que la fosforilación de ambas Serinas aumenta en células estimuladas con **TNF $\alpha$**  e IL1.

Finalmente, la actividad de los distintos miembros de la familia **NF- $\kappa$ B** son regulados por una variedad de modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación, acetilación, ubiquitinación e isomerización de Prolinas. Por lo tanto, la regulación de **NF- $\kappa$ B** es diferente para cada tipo celular y puede depender que quinasas y que subunidades de **NF- $\kappa$ B** son expresadas y en que proporción se activa **NF- $\kappa$ B**. Una falla en la regulación de este factor de transcripción que produzca su activación constitutiva favorece distintas condiciones patológicas entre ellas inflamación aguda, shock séptico y el desarrollo tumoral como se verá más adelante.

La acetilación en Lisinas de **RelA** (Lys 218, 221, 310) activan a **NF- $\kappa$ B** por inhibición de la unión de **I $\kappa$ B $\alpha$**  a esta subunidad y previenen la exportación nuclear del complejo (Chen, LF *et al.* 2002); mientras que la acetilación en la Lys 122 y 123 reprimen su capacidad transcripcional debido a que reducen su unión al ADN (Hu, J *et al.* 2005). La subunidad **p50** también es blanco de acetilación y produce un aumento en la actividad transcripcional del complejo.

Experimentos con líneas celulares deficientes para una o varias subunidades de **NF- $\kappa$ B** muestran que la especificidad *in vivo* de la activación de genes no solo depende de la secuencia  $\kappa$ B a la que se une el factor de transcripción sino que depende de la interacción con otros factores unidos al ADN (Hoffmann, A *et al.* 2003). Este nivel adicional de regulación es similar al explicado para los NR, y aseguran la especificidad de la activación para garantizar la respuesta diferencial a distintos estímulos.

La actividad transcripcional de **NF- $\kappa$ B** es regulada por correguladores, algunos de los cuales también interaccionan con el **ER**, entre los coactivadores se encuentran **p300/CBP**, **pCAF**, y los miembros de la familia **SRC** (**SRC1**, **SRC2** y **SRC3**) (Gerritsen, ME *et al.* 1997; Na, SY *et al.* 1998; Sheppard, KA *et al.* 1999; Werbajh, S *et al.* 2000). Las subunidades **p50** y **RelA** tienen distintas afinidades por diferentes coactivadores, mientras **p300** tiene mayor afinidad por **RelA** y es capaz de acetilarlo en las Lys 218, 221 y 310 (Chen, F *et al.* 2001), **pCAF** esta involucrado en la transactivación de **NF- $\kappa$ B** por interacción con **p50**. Sin embargo, la función de un coactivador no sería universal, sino que estaría determinado por el factor de transcripción al cual se une y el contexto del promotor. Los componentes del complejo correpresor incluye a **SMRT**, **NCoR** e Histona deacetilasas (**HDAC1**, 2 y 3) (Gao, Z *et al.* 2005), en donde la **HDAC3** tiene la capacidad de desacetilar a **RelA** aumentando su interacción con **I $\kappa$ B $\alpha$**  y la exportación nuclear (Chen, L *et al.* 2001).

### III.2.4- ROL DE NF- $\kappa$ B EN LA PROTECCION DE APOPTOSIS

**NF- $\kappa$ B** fue considerado inicialmente como un factor pro-apoptótico dada su rápida activación en respuesta a estímulos que promueven la muerte celular y por estar involucrado en la expresión de algunos genes involucrados en este proceso como ser **TNF $\alpha$** , **c-myc** y **Fas** ligando. Sin embargo, este factor de transcripción esta involucrado en los mecanismos anti-apoptóticos, una evidencia directa de este efecto fue obtenida con modelos de silenciamiento de genes de miembros de la familia de **NF- $\kappa$ B** (Beg, AA *et al.* 1996; Costas, M *et al.* 1996; Liu, ZG *et al.* 1996; Wang, CY *et al.* 1998; Costas, MA *et al.* 2000; Franco, DL *et al.* 2002). Ratones deficientes en **RelA** mueren durante el desarrollo embrionario a través de una apoptosis masiva de hepatocitos; un fenotipo similar se observa en ratones **IKK $\beta$ <sup>-/-</sup>**. Cuando se cruzan ratones que carecen de **RelA** o **IKK $\beta$**  con ratones que no expresan **TNF $\alpha$**  o su receptor, se revierte parcialmente el fenotipo letal, sugiriendo que la deficiencia en la activación de **NF- $\kappa$ B** sensibiliza a las células en la respuesta citotóxica mediada por **TNF $\alpha$** .

Alguno de los genes anti-apoptóticos blanco de **NF- $\kappa$ B** incluyen reguladores del ciclo celular, proteínas estabilizadoras de la membrana mitocondrial (**Blf-1** y **Bcl-xl**), los inhibidores de caspasas de la familia **IAP** y los factores asociados al receptor de

TNF $\alpha$  (**TRAF1** y **TRAF2**). El efecto pro o anti-apoptótico de **NF- $\kappa$ B** dependería del contexto celular en combinación con la amplia variedad de activadores que estimulan su activación.

### III.2.5-ROL DE NF- $\kappa$ B EN LA REGULACION DEL CICLO CELULAR

Un papel crítico de **NF- $\kappa$ B** en la progresión del ciclo celular surgió de observaciones en donde la actividad de este factor se encontraba elevada durante la transición G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> en fibroblastos de ratón, así como en la regeneración hepática y en células de tumor mamario. Los niveles de activación de **NF- $\kappa$ B** se relacionan con señales que controlan la progresión del ciclo celular en distintas líneas celulares y en donde su inhibición causa el arresto celular en células de glioma humano. La identificación de los sitios de unión para **NF- $\kappa$ B** en el promotor de CD1 brindo evidencias directas de la contribución de este factor de transcripción en el ciclo celular (Guttridge, DC *et al.* 1999; Hinz, M *et al.* 1999).

En contraste, varios estudios demuestran que la activación de **NF- $\kappa$ B** es necesaria para causar el arresto del ciclo celular y/o inducir la diferenciación terminal. Este es el caso de los ensayos realizados en queratinocitos de ratones que carecen de **IKK $\alpha$**  en donde se observa la ausencia de diferenciación terminal (Hu, Y *et al.* 1999; Li, Q *et al.* 1999; Takeda, K *et al.* 1999). Nuevamente es destacable la diferencia en el rol de este factor de transcripción teniendo en cuenta el tipo y el contexto celular.

### III.2.6- INDUCCION DE NF- $\kappa$ B POR LA CITOQUINA PROINFLAMATORIA TNF $\alpha$

Las citoquinas proinflamatorias **TNF $\alpha$**  y **IL1** son potentes activadores de **NF- $\kappa$ B**, y median su función a través de interacción con sus receptores. **TNF $\alpha$**  puede generar un amplio espectro de respuestas biológicas, incluyendo inflamación, proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La decisión final será el resultado del balance entre las vías activadas cuando **TNF $\alpha$**  se une a su receptor. Los resultados obtenidos muestran que la activación de **NF- $\kappa$ B** sería primordial en el resultado final, dado que el bloqueo de la

función de este factor de transcripción muestra una marcada sensibilización en células al efecto apoptótico inducido por **TNF $\alpha$**  (Beg, AA *et al.* 1996; Wang, CY *et al.* 1996).

Para **TNF $\alpha$**  se han caracterizado dos receptores, **TNFR1** (p55) y **TNFR2** (p75), pero en la mayoría de las células la activación de **NF- $\kappa$ B** ocurre a través de **TNFR1** (Baker, SJ *et al.* 1998; Orlinick, JR *et al.* 1998), mientras que se ha visto que **TNFR2** sería un pobre inductor de apoptosis. La unión del ligando induce la trimerización de los receptores y resulta en el reclutamiento de proteínas de señalización a través de su dominio citoplasmático. Ambos receptores muestran una estructura similar en el dominio extracelular (Tartaglia, LA *et al.* 1992) y no así en su dominio intracelular.

El estímulo con **TNF $\alpha$**  provoca la activación de dos factores de transcripción AP1 (Brenner, DA *et al.* 1989) y **NF- $\kappa$ B** (Osborn, L *et al.* 1989). Varios segundos mensajeros y actividades quinasas han sido propuestos por ser activados en respuesta a **TNF $\alpha$** , entre ellas y como ya ha sido descrito el complejo **IKK** que produce la activación de **NF- $\kappa$ B**.

Un mayor entendimiento en los efectos mediados por los receptores para **TNF $\alpha$**  fue la identificación de las moléculas asociadas a la región intracelular de los receptores una vez que estos trimerizan. Mientras que la activación de **TNFR1** resulta en el reclutamiento de las proteínas **TRADD** (Proteína con dominio de muerte asociada al **TNFR1**) (Hsu, H *et al.* 1995) y favorecería la conexión con **TRAF2** y **FADD**; la activación de **TNFR2** produce la asociación de **TRAF1/2** (Rothe, M *et al.* 1995). La interacción de **TRAF2** con ambos receptores explicaría por que desencadenan repuestas parecidas, más allá de poseer dominios citoplasmáticos distintos y sería **TRAF2** el principal encargado de la activación de **NF- $\kappa$ B**.

El dominio de muerte presente en la región citoplasmática de **TNFR1** media la interacción proteína-proteína con otras proteínas que poseen dominios de muerte tal como **TRADD**, **FADD** y **RIP**. **FADD** estaría involucrado en la activación de la vía apoptótica mientras que **RIP** y **TRAF2** activarían la vía anti-apoptótica gracias a la activación de **NF- $\kappa$ B** (Liu, ZG *et al.* 1996), por lo tanto la inducción de apoptosis por **TNF $\alpha$**  dependería de una inhibición en la activación de este factor de transcripción. Por

otro lado **TNFR2** carece de dominio de muerte, sin embargo es capaz de inducir apoptosis además de activar a **NF- $\kappa$ B**, y ambos mecanismos estarían mediados por **TRAF2**, dado que este es capaz de asociarse y secuestra proteínas con rol anti-apoptótico, como ser miembros de la familia IAP (Fotin-Mleczek, M *et al.* 2002).

### III.2.7- ROL DE NF- $\kappa$ B EN LA PROGRESION TUMORAL Y EL CANCER DE MAMA

La capacidad de **NF- $\kappa$ B** de suprimir apoptosis y regular la transición del ciclo celular indica claramente que este factor puede participar en varios aspectos del proceso oncogénico. Un aumento de su actividad es evidente en varios tipos tumorales que incluyen carcinoma de células no-pequeñas de pulmón (Mukhopadhyay, T *et al.* 1995), cáncer de tiroides (Gilmore, TD *et al.* 1996), leucemias de linfocitos T- y B (Bargou, RC *et al.* 1996), melanoma (Devalaraja, MN *et al.* 1999), cáncer de colon (Dejardin, E *et al.* 1999), de vejiga (Sumitomo, M *et al.* 1999) y cáncer de mama (Sovak, MA *et al.* 1997). Alteraciones cromosómicas en los genes de los miembros de la familia de **NF- $\kappa$ B** brindaron evidencias adicionales sobre el rol de este factor de transcripción en la oncogénesis.

La activación constitutiva de este factor de transcripción produce un incremento en la expresión no solo de genes involucrados en el ciclo celular sino también en genes anti-apoptóticos y aquellos relacionados con la adhesión celular, angiogénesis y procesos inflamatorios todos ellos relacionados con invasividad y metástasis.

Como se comento en los primeros capítulos, a medida que el cáncer progresa, las células adquieren autonomía de factores de crecimiento, esto también se observa en tumor de mama, en donde los estrógenos pierden su capacidad de inducir proliferación y eso lleva a una resistencia al tratamiento con anti-estrógenos. Esto podría deberse a la heterogeneidad tumoral y la selección clonal de células que carecerían del **ER**, como producto de una disminución en su expresión, mutaciones en su gen, alteración en la regulación de sus genes blanco, generación de variantes de **ER** que funcionan como dominantes positivos y por desregulación de factores de transcripción independientes de estrógenos (Clark, GM 1998).

En extractos nucleares de células de epitelio mamario humano no transformadas se observan bajos niveles de **NF-κB**, sin embargo niveles elevados fueron detectados en distintas líneas celulares derivadas de tumor de mama humanos y en muestras patológicas; en general este aumento en la activación de **NF-κB** correlaciona con tumores que son resistentes al tratamiento con anti-estrógenos dado que carecen de **ER**. Una de las vías propuestas que conducirían a la activación de este factor de transcripción sería la activada por EGF, cuyo receptor se encuentra sobreexpresado en el 30% de los tumores ER (-), este receptor activa la vía de la PI3K/Akt y de esta manera **NF-κB** sería capaz de controlar la progresión del ciclo celular. En una serie de trabajos realizados por el grupo de Pardee, se observó que la simple inhibición de **NF-κB** era capaz de revertir el fenotipo tumoral de la glándula mamaria (Biswas, DK *et al.* 2000; Biswas, DK *et al.* 2001; Biswas, DK *et al.* 2004).

### III.3- INTERACCION ENTRE LAS ACTIVIDADES MEDIADAS POR ER Y POR NF-κB.

Además de la estimulación de la transcripción por unión directa a sus secuencias de unión en el ADN los factores de transcripción pueden regular la expresión de genes mediante la modulación de la actividad de otros factores, un ejemplo de este mecanismo fue el explicado para AP1 y algunos de los miembros de la familia de los NR y para **NF-κB** y el GR. Esta interacción entre distintos factores de transcripción puede ser tanto positiva como negativa.

Un mecanismo antagónico entre **NF-κB** y el **ER** ha sido descrito (Evans, MJ *et al.* 2001), y varios modelos se han propuesto para explicar este efecto, entre ellos la formación de un complejo receptor-NF-κB (Ray, P *et al.* 1997) que podría inhibir la unión de **NF-κB** al ADN (Galien, R *et al.* 1997), estabilización de **IκB** mediada por **ER** (Sun, WH *et al.* 1998; Hsu, SM *et al.* 2000) o por competición por un mediador transcripcional común a ambos y que se encuentre en cantidades limitantes como son los coactivadores **CBP/p300** y miembros de la familia **SRC** (Sheppard, KA *et al.* 1998; Speir, E *et al.* 2000). Utilizando mutantes puntuales en residuos del dominio LBD del **ER** se observó que este dominio estaría involucrado no solo en la interacción con **NF-**

**κB** sino también en su capacidad de reprimir su actividad transcripcional (Valentine, JE *et al.* 2000).

Estudios realizados en células hepáticas determinaron que esta inhibición es recíproca, en donde el **ERα** activado no inhibiría la capacidad de **NF-κB** de unirse a sus secuencias del ADN sino que estaría disminuyendo la actividad HAT requerida para la eficiente activación de **NF-κB** y la sobreexpresión de **CBP** revierte el antagonismo observado entre ambos factores de transcripción (Harnish, DC *et al.* 2000).

Las evidencias expuestas hasta ahora parecen sugerir que no existiría un único mecanismo de transrepresión de la actividad de **NF-κB** por el **ER** activado y que este dependería de la combinación de distintos factores, el contexto y el tipo celular.

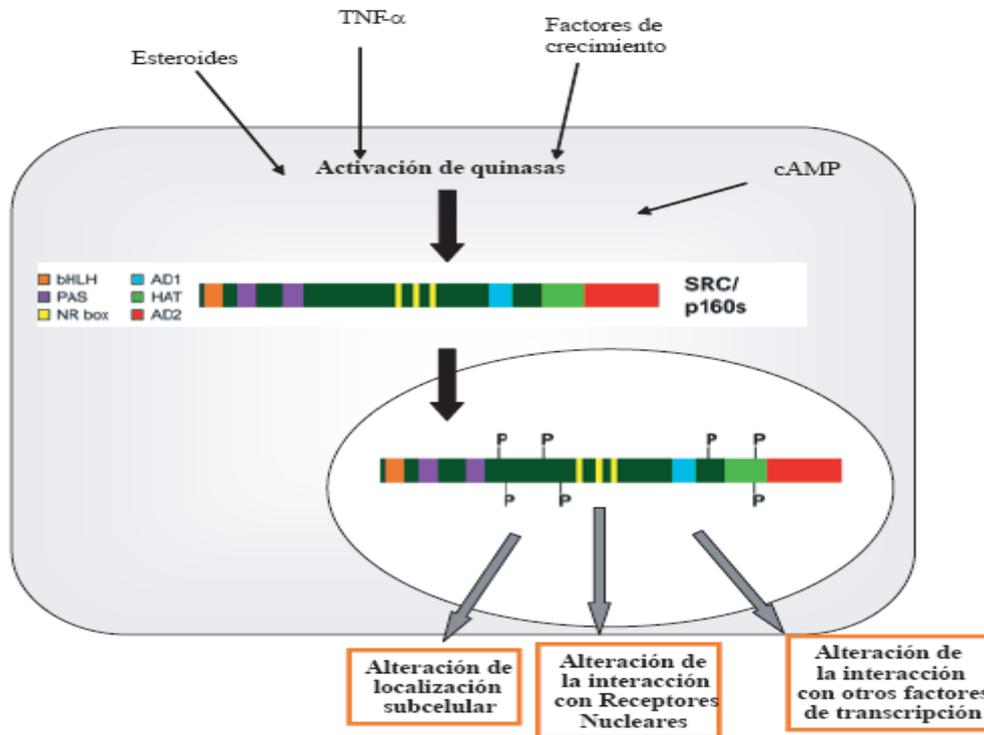
#### IV- CORREGULADORES TRANSCRIPCIONALES

La señalización celular no solo modifica el patrón de genes que se expresan debido a la activación de distintas cascadas que activan la función de determinados factores de transcripción sino que también influyen en la actividad y localización celular de distintos correguladores y en conjunto determinarán la respuesta específica de tipo celular o de un tejido particular ante una misma cascada de activación.

Los correguladores son moléculas que mediante su interacción con distintos factores de transcripción pueden activar o reprimir la expresión de un determinado gen (McKenna, NJ *et al.* 2002). El número de correguladores y complejos involucrados es enorme sugiriendo que para que una activación o represión sea eficiente se necesita una combinación específica de eventos, léase factor de transcripción y promotor involucrado, además del tipo celular y su contexto.

Distintas modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación, metilación, etc.) tanto en los factores de transcripción como en sus correguladores, resultado de la activación de una determinada cascada de señalización, aumenta o disminuye la afinidad de distintos correguladores por ese factor de transcripción y viceversa (Wu, RC *et al.* 2002; Dutertre, M *et al.* 2003), alterando indirectamente la expresión de un

determinado gen, sin embargo en ninguno de los casos estudiados estas modificaciones afectan la función del corregulador (Figura 17).



**Figura 17:** En el esquema se muestra el efecto de la fosforilación sobre correguladores, en este caso particular se ejemplifica con coactivadores de la familia SRC/p160, donde los efectos de fosforilación ocurrirían en el citoplasma y esto alteraría tanto su localización subcelular como su capacidad de interactuar con distintos factores de transcripción.

Por otro lado, el patrón de expresión de la mayoría de los correguladores no es el mismo para todos los tejidos o tipos celulares y en un determinado contexto celular, esto también determinaría la eficiencia de transactivación de un determinado factor de transcripción. Una gran cantidad de estudios realizados en distintos tipos de tumores indican que existe un cambio en el patrón de expresión de ciertos correguladores, lo cual está asociado con la progresión tumoral.

Los trabajos realizados utilizando mutantes que carecen de alguno de los correguladores demuestran que no son funcionalmente redundantes aunque existe una compensación mínima que ocurriría cuando un determinado corregulador es eliminado.

#### IV.1- COACTIVADORES

Los primeros experimentos realizados en levaduras dieron los indicios de la existencia de moléculas que se encontraban en cantidades limitantes en la célula y que distintos factores de transcripción dependían de éstas para una óptima activación de la transcripción (Gill, G *et al.* 1988), luego los trabajos realizados en sistemas de co-transfección transitoria utilizando los receptores PR y ER extendieron este concepto a la familia de Receptores Nucleares (Meyer, ME *et al.* 1989). A estos factores se los denominó colectivamente coactivadores, debido a su capacidad de aumentar la capacidad transcripcional de distintos factores de transcripción; en general estas moléculas no se unen directamente al ADN, sino que interaccionan indirectamente a través de la asociación con otras proteínas que si se unen al ADN.

En 1999 el grupo de Lanz *et al.* (Lanz, RB *et al.* 1999) aisló y caracterizó funcionalmente un coactivador al que se denominó SRA, lo relevante de este coactivador es que a diferencia de los demás, éste es una molécula de ARN, que interacciona con el dominio AF-1 de los receptores nucleares, expresado de manera específica de tipo celular y es capaz de interaccionar con otros coactivadores como por ejemplo SRC1.

Una vez reclutado a la secuencia del promotor, los coactivadores aumentan la capacidad transcripcional a través de una combinación de mecanismos que incluyen: un reclutamiento más eficiente de la maquinaria basal de transcripción o mediante actividades enzimáticas propias o de otras proteínas que se asocian a ellos que resulta en una activación de la expresión óptima. Estas actividades enzimáticas en general producen un remodelamiento de la cromatina debido a fosforilación (SWI-SNF), acetilación (CBP/p300, pCAF, SRCs), metilaciones (CARM1, PRMT-1/2) y ubiquitinaciones (E6-AP, Rsp5). La asociación de los factores de transcripción y de los coactivadores a un determinado promotor se encuentra temporalmente regulada (Shang, Y *et al.* 2000). Por otro lado, la afinidad de un factor de transcripción por una secuencia consenso de un determinado promotor varía de acuerdo a los coactivadores que es capaz de reclutar.

En particular el **ER $\alpha$** , interacciona con diferentes clases de coactivadores; entre ellos los miembros de la familia **SRC**, pero en todos los casos es mediante el AF-2 en el

LBD y el dominio de interacción con NR (NID) del coactivador que consiste del motivo rico en leucinas (LXXLL). El análisis mutacional del **ER $\alpha$**  muestra que ciertos aminoácidos en las hélices 3, 4, 5 y 12 estarían involucradas en la interacción entre este receptor y miembros de la familia **SRC**, siendo estos residuos conservados entre la familia de NR.

#### IV.1.1- COACTIVADORES CON ACTIVIDAD HISTONA ACETILTRANSFERASA (HAT)

La correlación entre la acetilación de histonas y el aumento de la actividad transcripcional y la desacetilación con represión es producto de trabajos de hace más de cuarenta años (Allfrey, VG *et al.* 1964a; Allfrey, VG *et al.* 1964b). Con el descubrimiento de coactivadores que poseen la capacidad de acetilar histonas y otras proteínas, estas primeras observaciones fueron confirmadas. Estas modificaciones epigenéticas han sido propuestas por ser uno de los mecanismos por los cuales un determinado promotor puede ser regulado por reclutamiento específico de distintos complejos proteicos (Fischle, W *et al.* 2003).

Varios coactivadores han sido caracterizados por poseer la capacidad de acetilar histonas y entre ellos se encuentran: **pCAF**, **p300/CBP**, TAF<sub>II</sub>250 y dos de los miembros de la familia p160 de Coactivadores de Receptores de hormonas esteroideas (SRC), **SRC1** y **SRC3**. Pero en muchos de los casos la capacidad de acetilar no se limita solo a Histonas, por ejemplo **pCAF** y **p300** acetilan al AR (Fu, M *et al.* 2000), mientras el **ER $\alpha$**  es específicamente acetilado por **p300** (Wang, C *et al.* 2001a). El coactivador **SRC3** es acetilado por **p300** o **CBP** y esta modificación altera su asociación con el **ER** (Chen, H *et al.* 1999). En el caso de la acetilación de factores de transcripción esta modificación puede alterar la unión al ADN, la interacción proteína-proteína o la localización subcelular.

En particular, **CBP/p300** su función sería como un integrador molecular coordinando el ensamblado de complejos lo que parece ser su rol primordial y por otra parte acetilando distintos sustratos, entre ellos Myb, p53 y **NF- $\kappa$ B**. **CBP** interacciona con el LBD de los NR de manera dependiente de ligando y con **SRC1** al mismo tiempo,

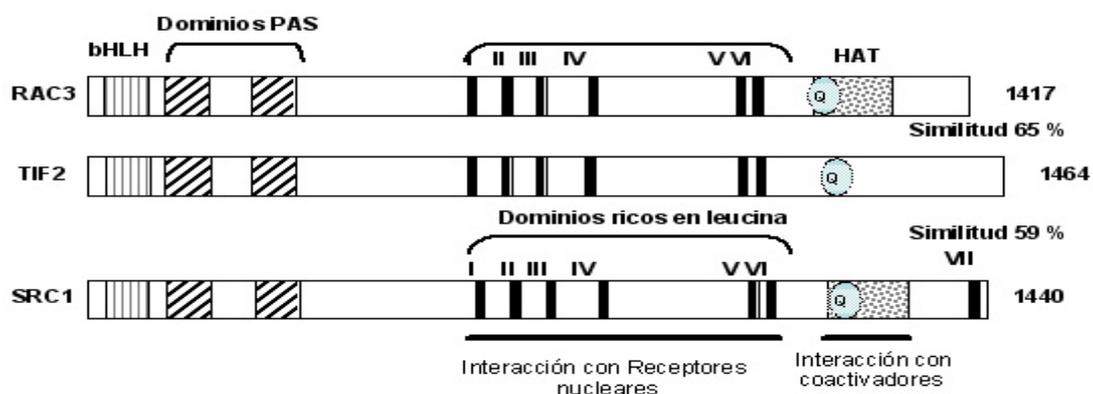
sugiriendo que el complejo puede servir como un integrador nuclear de múltiples vías de señalización

Cada una de estas enzimas con función acetilasa pertenecen a una de dos categorías: Tipo A localizada en el núcleo o de tipo B localizada en el citoplasma, aunque esta diferencia parece no ser tan rígida y estas proteínas pueden funcionar en múltiples complejos o localizaciones. Las HAT de tipo B se encargarían de acetilar las histonas recién sintetizadas para que sean transportadas al núcleo donde son desacetiladas e incorporadas al ADN. Las HAT de tipo A, se dividen a su vez en cinco familias, entre las cuales se destacan **p300/CBP** y los dos miembros de **SRC** que poseen esta actividad.

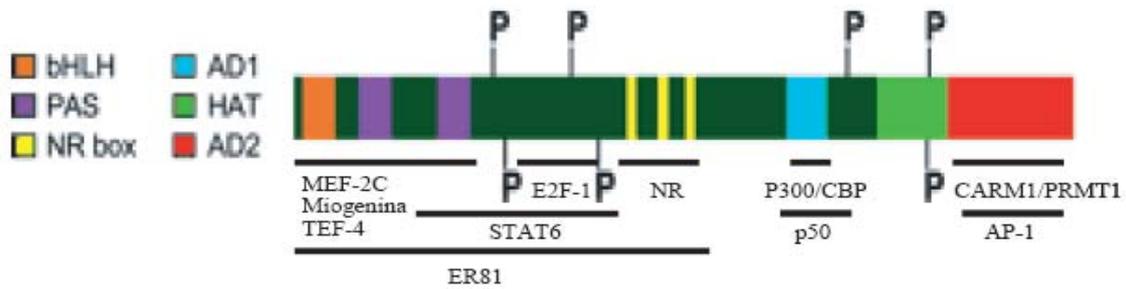
#### IV.2- COACTIVADORES DE LA FAMILIA p160: COACTIVADORES DE RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS (SRC)

Esta familia de coactivadores esta compuesta por tres miembros, **SRC1**, **SRC2** y **SRC3** que son estructuralmente y funcionalmente distintos de los otros coactivadores; poseen un peso molecular de aproximadamente 160 kDa y entre ellos poseen una similitud de secuencia del 40%. Presentan un dominio altamente conservado en su N-terminal denominado bHLH-PAS (Hélice-loop-hélice básico-Per/ARNT/PAS) que estaría involucrado en la unión al ADN y la heterodimerización entre proteínas que poseen este dominio (Liao, L *et al.* 2002) y un dominio común presente en la mayoría de los coactivadores, responsable de la interacción con los Receptores Nucleares que posee un motivo conservado LXXLL, la estructura general de los tres miembros se esquematiza en la figura 18A.

A



B



**Figura 18:** En el diagrama superior (A) se muestran los dominios estructurales de los 3 miembros de la familia p160 de coactivadores de receptores nucleares, los números en el costado derecho muestran la similitud entre el coactivador RAC3 y los otros dos miembros. En el esquema inferior (B) se muestra en detalle los dominios de interacción entre RAC3 y distintas proteínas.

Un rasgo distintivo de los miembros de esta familia es que el motivo LXXLL esta presente varias veces y estos serían determinantes para la interacción directa con distintos factores de transcripción, los aminoácidos que rodean estos motivos parecen influir en la selectividad de interacción con los NR (McInerney, EM *et al.* 1998). Además, dos de los miembros de esta familia, **SRC1** (NCoA-1) y **SRC3** (NCoA-3/pCIP/ACTR/TRAM-1/RAC3/AIB1) poseen un dominio funcional con actividad HAT en su C-terminal, no presente en **SRC2** (NCoA-2/GRIP1/TIF-2), solapado a este dominio se encuentra el sitio de interacción con las metiltransferasas CARM1 y PRMT1. La funcionalidad del dominio HAT es mucho menor y estructuralmente diferente al presente en **p300/CBP**. Los tres miembros de la familia son capaces de interactuar con este coactivador y potenciar la actividad HAT mediante motivos LXXLL localizados en el dominio denominado Dominio de Activación (AD) con motivos ricos en glutamina (Q).

Los primeros trabajos determinaron que la interacción entre esta familia de coactivadores y el **ER $\alpha$**  ocurría a través del dominio AF-2 sin embargo trabajos posteriores demostraron que los coactivadores **SRC** son capaces de interactuar con AF-1 y AF-2 (Webb, P *et al.* 1998), la capacidad de ambos dominios para unirse a superficies separadas del mismo coactivador es de importancia para entender la capacidad de estos dominios de transactivación para actuar de manera sinérgica.

**SRC1** fue el primer miembro de la familia de Coactivadores de Receptores de hormona esteroideas (**SRC**) en ser caracterizado. Estimula la transcripción de genes por

$E_2$  e incrementa la interacción entre los dominios N- y C-terminal del **ER $\alpha$** . Estos resultados sugieren que luego de la unión del ligando, **SRC1** promueve la interacción de AF-1 y AF-2. Una de las hipótesis de la resistencia al tratamiento con tamoxifeno adquirida en el cáncer de mama, podría ser producto de la alteración en la expresión de correguladores y se ha observado niveles más bajos de **SRC1** en pacientes que no responden a tamoxifeno. En el caso de **SRC2** interacciona con **ER $\alpha$**  de manera dependiente de ligando, y en este contacto participarían los dominios AF-1 y AF-2, sin embargo solo el AF-2 del **ER $\beta$**  estaría involucrado en esta interacción.

En cuanto al tercer miembro de la familia **SRC3**, no estimula la transcripción mediada por **ER $\beta$** , y este fue el primer indicio de que ambos receptores utilizan diferentes correguladores. Este miembro es sustrato para la actividad HAT de **p300/CBP**, esta modificación es estimulada por  $E_2$  y produce la disminución en la interacción entre **ER $\alpha$**  y **SRC3**. El rol de **SRC3** se describirá con más detalle en la siguiente sección.

Uno de los modelos de activación de estos coactivadores implica su fosforilación por quinasas reguladas ya sea por factores de crecimiento o citoquinas y esta modificación favorecería su translocación al núcleo (Liao, L *et al.* 2002), una vez en el núcleo serían reclutados a los distintos promotores por unión al factor de transcripción o NR en donde reclutarían complejos conteniendo actividades HAT y histona metiltransferasas. Este evento resultaría en la modificación de la estructura local de la cromatina facilitando el reclutamiento de la ARN polimerasa II y la transcripción.

#### IV.2.1- CARACTERISTICAS GENERALES DE RAC3 Y SU ROL EN CANCER

Este miembro de la familia **p160/SRC**, es capaz de interaccionar con varios miembros de la superfamilia de Receptores Nucleares entre ellos RAR, ER, TR y PR, dado que varios grupos caracterizaron de forma simultánea a esta proteína asociada a estos NR de ahí la multiplicidad de nombres asociado a la misma proteína: **p/CIP** (proteína asociada al cointegrador p300/CBP) (Torchia, J *et al.* 1997), **RAC3** (proteína asociada a RAR-3) (Li, H *et al.* 1997), **ACTR** (Chen, H *et al.* 1997), **TRAM-1** (Molécula activadora del receptor de hormonas tiroideas 1) (Takeshita, A *et al.* 1997) y **AIB-1** (Proteína amplificada en cáncer de mama-1) (Anzick, SL *et al.* 1997).

Por otro lado, **SRC3/RAC3** es capaz de interactuar con otros factores de transcripción, entre ellos **NF- $\kappa$ B** como fue demostrado por nuestro grupo (Werbajh S 2000), además de AP1, E2F-1, Ets, entre otros (Arimura, A *et al.* 2004; Louie, MC *et al.* 2004; Myers, E *et al.* 2005); además es capaz de reclutar HAT a través de su interacción con **p300/CBP** y metiltransferasas (CRAM-1) para el remodelamiento de la cromatina y facilitar así la transcripción de genes blanco. Específicamente, **RAC3** tiene un rol importante en varios procesos biológicos que involucran: proliferación celular (Planas-Silva, MD *et al.* 2001), migración (Bai, J *et al.* 2000), diferenciación, crecimiento somático, maduración sexual, función reproductiva femenina (Xu, J *et al.* 2000) y vasoprotección (Yuan, Y *et al.* 2002).

**RAC3** es modificado post-traduccionalmente y su función es regulada por citoquinas y factores de crecimiento; bajo condiciones normales de crecimiento, **RAC3** se encuentra localizado en el citoplasma pero si las células son estimuladas con factores de crecimiento, por ejemplo insulina, rápidamente se localiza en el núcleo; esta redistribución puede ser bloqueada por la adición de un inhibidor de la PP2A. Se ha caracterizado que **RAC3** es un blanco de fosforilación de MAPK activada por IGF (Font de Mora, J *et al.* 2000) y de IKK (Wu, RC *et al.* 2002), esta fosforilación promueve la localización nuclear y el aumento de la expresión mediada por **NF- $\kappa$ B**. En la figura 18 B se muestra un esquema de RAC3 con los dominios de interacción más relevantes.

Basado en los análisis de expresión en distintos tejidos, se encuentra niveles detectables del mRNA de **RAC3** en los siguientes tejidos: placenta, corazón, páncreas, músculo, pulmón, riñón, cerebro, hígado, útero, pituitaria, glándula mamaria y testículo (Liao, L *et al.* 2002); niveles extremadamente altos de mRNA han sido encontrados en varios líneas celulares de cáncer de mama **ER(+)** y tumor de ovario. Estos resultados correlacionan con las observaciones realizadas en carcinomas de mama humanos, donde se detecto una amplificación frecuente en la región del cromosoma 20q11-12 (Anzick, SL *et al.* 1997).

El gen que codifica para RAC3 esta localizado en la región cromosómica 20q12 y posee una longitud de aproximadamente 75 kb y contiene 22 exones, donde el primer intrón tendría más de 40 kb. El comienzo y final de la traducción estarían en el exón 2 y

22 respectivamente. Las isoformas de **RAC3** se producen por rearreglo (*splicing*) alternativo, en donde la isoforma que excluye el exón 3 (**RAC3 $\Delta$ 3**) ha sido detectada en células de cáncer de mama y su sobreexpresión fue capaz de incrementar la sensibilidad de los cultivos a hormonas y factores de crecimiento (Reiter, R *et al.* 2001).

Los trabajos realizados en ratones que carecen del gen que codifica para este coactivador muestran un retraso en el crecimiento y una disminución en el tamaño corporal, poseen niveles normales de hormonas pero los niveles de IGF-1 son menores que en ratones salvajes (Xu, J *et al.* 2000; Liao, L *et al.* 2008). Si bien estos ratones tienen una función reproductiva levemente reducida, las hembras **RAC3<sup>-/-</sup>** exhiben un desarrollo y función anormal de su sistema reproductivo (Xu, J *et al.* 2000). Cuando estos ratones fueron cruzados con ratones que expresaban el **proto-oncogen Ras**, se vio una disminución en la incidencia en el desarrollo de cáncer; además, la frecuencia de desarrollar tumor de mama, la velocidad de crecimiento y de producir metástasis en pulmón se vio reducida en los ratones **RAC3<sup>-/-</sup>/ras<sup>+</sup>** en comparación con los que codifican para **RAC3** (Liao, L *et al.* 2002).

En células humanas de cáncer de mama, MCF-7, se vio que este coactivador es reclutado al promotor de **CD1** y aumenta su expresión (Planas-Silva, MD *et al.* 2001) mientras que la depleción de **RAC3** disminuye el crecimiento celular mediado por E<sub>2</sub>. En trabajos recientes, se demostró que la sobreexpresión moderada de **RAC3** en el epitelio mamario de ratones producía un aumento en la expresión de **CD1** y de E-Cadherina, además se observa un aumento de la tasa proliferativa y un aumento en el crecimiento de las ramificaciones laterales y de los TEB durante el desarrollo de la mama que genera un aumento del contenido epitelial en el tejido graso (Avivar, A *et al.* 2006)

Nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión de este coactivador en la línea embrionaria humana de riñón, HEK293, es capaz de evitar la apoptosis inducida tanto por la vía extrínseca como por la vía intrínseca, y el modelo propuesto es por aumento de la actividad transcripcional de **NF- $\kappa$ B** y un mecanismo no genómico que involucra la retención de factores pro-apoptóticos como AIF-1 (Factor inductor de apoptosis 1) en el citoplasma (Colo, GP *et al.* 2008), mientras que en células leucémicas humanas, K562, que demostramos que poseen niveles elevados de este coactivador y son insensibles al tratamiento con flavopiridol, al disminuirse los niveles de **RAC3** mediante

un ARN de interferencia, se ve un aumento en la sensibilización al tratamiento con esta droga y la subsiguiente muerte celular (Colo, GP *et al.* 2007).

En suma con todos los resultados obtenidos en cuanto al rol que tendría **RAC3** en el desarrollo del cáncer de mama, ovario, endometrio y próstata (Anzick, SL *et al.* 1997; Glaeser, M *et al.* 2001; Gnanapragasam, VJ *et al.* 2001), los primeros trabajos en donde se demostraba que este coactivador podía interaccionar y aumentar la actividad transcripcional de otros factores de transcripción no relacionados a los NR, abrió las puertas al descubrimiento que **RAC3** no solo estaría implicado en el desarrollo de cáncer hormono dependiente sino en aquellos tejidos que no dependen de hormona para proliferar como es el caso de páncreas, colon, gástrico, células escamosas esofágicas, células hepáticas, entre otros (Ghadimi, BM *et al.* 1999; Sakakura, C *et al.* 2000; Wang, Y *et al.* 2002; Henke, RT *et al.* 2004). En correlación con estas observaciones, estudios realizados en biopsias de pacientes con cáncer de mama, han revelado que la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con la ausencia de ER y PR (Bouras, T *et al.* 2001); sin embargo la presencia de amplificación correlaciona con la presencia de ambos receptores (Bautista, S *et al.* 1998).

#### IV.3- CORREPRESORES

Estas moléculas son importantes reguladores negativos, así como para los coactivadores, los primeros en ser caracterizados fueron los que se encontraban asociados a Receptores Nucleares, los receptores de hormonas no esteroideas, TR y RAR en ausencia de su ligando reprimen la transcripción basal por unión directa a su secuencia promotora y esta función es mediada por su capacidad de asociarse a **SMRT** y **NCoR**, aunque estas moléculas parecen no poseer una actividad represiva intrínseca tienen la capacidad de reclutar complejos que incluyen **HDAC**, que aumenta la compactación de la cromatina y limita la actividad transcripcional.

- i- **Rol de NCoR:** hay solo dos reportes que examinan la interacción de ER y este correpresor; en el primero de ellos, **ER $\alpha$**  inmunoprecipita con un anticuerpo para **NCoR** en extracto de células tratadas con tamoxifeno, pero no en células control o tratadas con E<sub>2</sub>. El tratamiento de estas células con EGF, convierten al tamoxifeno de antagonista a un rol agonista y disminuye la interacción del

receptor y el correpresor. **NCoR** interacciona con **ER $\alpha$**  de manera independiente de ligando *in vitro*.

**ii- Rol de SMRT:** la sobreexpresión de **SMRT** reduce la actividad de **ER $\alpha$**  tanto basal como la estimulada por tamoxifeno pero no afecta la actividad mediada por E<sub>2</sub>. Al igual que NCoR, interacciona con **ER $\alpha$**  de manera independiente de ligando *in vitro*. Además, E<sub>2</sub> disminuye los niveles de mRNA de SMRT en la pituitaria de rata.

**iii- Rol de las histona deacetilasas (HDAC):** El reclutamiento de **HDAC** sería uno de los principales encargados de regular la represión de la transcripción y el silenciamiento de genes, el cual involucraría la inhibición de la maquinaria basal de la transcripción y el reclutamiento de enzimas que modifican la estructura de la cromatina haciéndola más compacta.

#### IV.4- ROL DE CICLINA D1 COMO CORREGULADOR TRANSCRIPCIONAL

En 1997 con el auge del estudio de los corre reguladores, el grupo de Zwijssen RML, describió por primera vez una nueva función para **CD1** como un regulador positivo de la actividad transcripcional del **ER**, en donde esta función era independiente de la unión a **Cdk** (Neuman, E *et al.* 1997; Zwijssen, RM *et al.* 1997). La interacción entre el dominio LBD del **ER** y **CD1**, sucede aún en ausencia de ligando dado que **CD1** serviría de puente permitiendo el reclutamiento del coactivador **SRC1** a través del dominio C-terminal de **CD1** donde se ubica un motivo rico en leucinas similar al descrito en varios coactivadores entre ellos los miembros de la familia **SRC** (Zwijssen, RM *et al.* 1998), las regiones que flanquean a este dominio serían las encargadas de contribuir a la especificidad de la interacción; dado lo que se describió en este trabajo, **CD1** es capaz de unirse a **SRC1** y **RAC3/SRC3** pero no así con **CBP**. Estos fueron los primeros de una serie de trabajos en donde se caracterizó a **CD1** como corre regulador, en donde su función parecía depender de su capacidad de asociarse a distintos NR y ser puente entre estos y distintos coactivadores (McMahon, C *et al.* 1999).

Sin embargo, la acción de **CD1** sobre la actividad transcripcional de los NR no siempre era positiva sino que dependía del NR con el que **CD1** interactuaba, así se vio que es capaz de inhibir la actividad de AR unido a su ligando y esta función era mediada nuevamente por su dominio C-terminal pero en donde no solo estaría implicado el motivo LLXXXL sino un dominio rico en aminoácidos ácidos por el cual se une a AR, esta interacción estaría bloqueando la unión de **pCAF** y de esta manera estaría reprimiendo la actividad de **AR** (Reutens, AT *et al.* 2001). Un mecanismo similar fue caracterizado para **PPAR $\gamma$**  en donde **CD1** y el NR estarían compitiendo por la unión a **p300** (Wang, C *et al.* 2001a; Fu, M *et al.* 2005) mientras que trabajos posteriores postularon que la acción inhibitoria de **CD1** sobre la actividad de AR se debía al reclutamiento de **HDAC** (Petre, CE *et al.* 2002), un mecanismo similar fue propuesto para el efecto inhibitorio de la interacción de **CD1** con TR en ausencia de ligando y en este caso **CD1** favorecería el reclutamiento de **HDAC3** (Lin, HM *et al.* 2002). Este rol de correpresor no solo se limitaba a NR sino que también se describió para otros factores de transcripción como es el caso de STAT3 (Bienvenu, F *et al.* 2001).

En trabajos posteriores se dilucidó uno de los posibles mecanismos por el cual **CD1** estaría inhibiendo la actividad de **p300** (Fu, M *et al.* 2005), en donde se mapeo los dominios de ambas proteínas que estarían involucrados en esta interacción, y se observó que el dominio bromo y los motivos ricos en cisteína e histidina (CH3) de **p300** son requeridos para esta represión dado que **CD1** inhibe la actividad HAT de este coactivador.

Por lo tanto, **CD1** puede cumplir ambos roles, como coactivador o correpresor transcripcional, dependiendo del factor de transcripción con el cual interactúa, los dominios implicados, y los correguladores que es capaz de reclutar.

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **Conceptos destacados de la introducción y construcción de la hipótesis**

En base a todo lo expuesto en la introducción existen varios mecanismos que controlan el desarrollo y progresión de una célula tumoral, en donde aquellas que han adquirido mutaciones que le otorguen algún beneficio con respecto al resto prosperarán. Entre estas ventajas se encuentran el aumento en la proliferación celular, la evasión de los mecanismos que producen apoptosis, la capacidad de escapar a los mecanismos de senescencia y adquirir características que le permitan migrar y colonizar nuevos tejidos. Esto último está íntimamente relacionado con angiogénesis, la desdiferenciación y el crecimiento en ausencia de anclaje.

Los coactivadores de receptores nucleares de la familia p160, fueron en su mayoría descritos por encontrarse en cantidades limitantes en tejidos normales, teniendo la capacidad de aumentar la actividad transcripcional mediada por receptores nucleares cuando se aumentaban sus niveles de expresión. En el caso particular del coactivador RAC3, en varios trabajos se demostró que se encuentra sobreexpresado en tumores de mama, ovario y próstata, y esto llevó al estudio de la relevancia de dicha sobreexpresión en la progresión de tumores que dependían de hormonas para su proliferación. Como resultado de estos estudios se observó que este coactivador era capaz de contribuir al desarrollo tumoral dado que favorecía las señales proliferativas mediadas por hormonas esteroideas.

Sin embargo, el descubrimiento de que estas moléculas eran capaces de interaccionar y aumentar la actividad transcripcional de otros factores de transcripción, abrió las puertas para el hallazgo de que RAC3 no solo estaría implicado en el desarrollo de cáncer hormono dependiente sino también en aquellos tejidos que no dependen de hormona para proliferar.

En el año 2000, nuestro grupo descubrió que RAC3 es además coactivador de NF- $\kappa$ B, que como ha sido descrito en la introducción participa en el control de numerosas funciones biológicas en todos los tejidos y tiene un rol destacado en el desarrollo de la glándula mamaria, además de la capacidad de NF- $\kappa$ B de suprimir apoptosis y regular la transición del ciclo celular. Estas evidencias sugieren que este factor puede participar en varios aspectos del proceso oncogénico, más allá de la dependencia o no de hormonas esteroideas.

De acuerdo con estas observaciones, estudios realizados en biopsias de pacientes con cáncer de mama, han revelado que la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con la ausencia de ER y PR. Esta carencia de receptores nucleares o de su actividad en general esta asociada a una actividad transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B aumentada. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el coactivador estaría contribuyendo a la tumorigénesis en cada caso no fueron del todo esclarecidos.

### **Hipótesis de trabajo**

Nuestra hipótesis principal al inicio de este trabajo de tesis fue que la sobreexpresión de coactivadores; como es el caso de RAC3, podría favorecer la progresión tumoral contribuyendo a la proliferación celular que no solo involucraría las señales mediadas por hormonas esteroideas y sus receptores, sino también citoquinas y factores de crecimiento vía otros factores de transcripción.

Dado que NF- $\kappa$ B controla la expresión de genes anti-apoptóticos y del ciclo celular, muchos de los cuales son además blanco de receptores nucleares, la sobreexpresión de RAC3, podría estar afectando las interacciones regulatorias entre ambas señales de un modo diferencial en células tumorales respecto de células normales, actuando como un integrador y amplificador de señales involucradas en la regulación de la expresión de genes primordiales para la entrada al ciclo celular; entre ellos el proto-oncogen Ciclina D1.

Existen evidencias de que Ciclina D1 es capaz de reclutar complejos conteniendo coactivadores ó correpresores y de esta manera modula la actividad transcripcional de distintos receptores nucleares. Dado que NF- $\kappa$ B interacciona con estos mismos corre reguladores es posible que la actividad de este factor de transcripción pueda ser regulada por Ciclina D1.

De acuerdo a esta hipótesis es que se plantearon los objetivos de trabajo que se describen a continuación.

### **Objetivo principal**

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la posible participación del coactivador RAC3 en el control de la proliferación celular inducida por distintas señales y su interacción con otras moléculas sobreexpresadas en distintos tumores como es el caso de Ciclina D1.

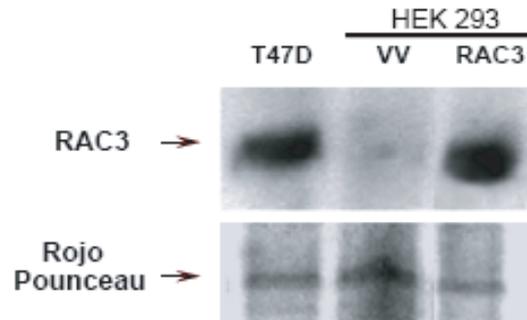
### **Objetivos particulares**

- Determinar el rol del coactivador RAC3 en la proliferación inducida por estrógenos.
- Dado que RAC3 es coactivador de NF- $\kappa$ B y este factor de transcripción es activado por TNF $\alpha$ , investigar la acción de RAC3 sobre esta cascada supuestamente inductora de muerte de células tumorales.
- Determinar si la sobreexpresión del proto-oncogen Ciclina D1 tiene algún efecto en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B y la proliferación celular.
- Determinar los efectos de la sobreexpresión simultánea de RAC3 y de Ciclina D1 en el desarrollo tumoral.

# **MATERIALES Y METODOS**

## I- MODELO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó líneas celulares como la línea tumoral T47-D que corresponde a células ductales de tumor mamario humano que dependen de estrógenos para su crecimiento y han sido caracterizadas por poseer niveles altos de coactivador y células HEK 293 que corresponden a células embrionarias de riñón humano que poseen niveles limitantes de coactivador como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19** Comparación de los niveles de expresión de RAC3 entre células de la línea tumoral de mama humana T47-D y células de la línea embrionaria de riñón humana HEK 293 que han sido transfectadas de manera transitoria con un vector de expresión para RAC3 o bien el vector vacío (vv).

Las células T47-D fueron utilizadas en el modelo de inducción de la proliferación mediada tanto por estrógenos como por la activación de NF- $\kappa$ B; mientras que la línea HEK 293 fue utilizada en el modelo de sobreexpresión de Ciclina D1 y RAC3 para determinar la posible formación de complejos con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la capacidad de los mismos de regular su actividad.

## II- CULTIVO DE CELULAS

Las células de tumor mamario humano T47-D y MCF-7, así como la línea derivada de tumor mamario murino HC11 fueron crecidas en medio esencial mínimo Dulbecco modificado con medio Eagle F12 (DMEM/F12) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA). La línea embrionaria de riñón humano, HEK 293 fue crecida en DMEM alta glucosa (Gibco). Los experimentos en donde se utilizó la línea HC11 fueron realizados en colaboración con la Dra. Edith Kordon.

Todos los medios fueron suplementados con 10% suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100  $\mu$ g/ml). Las células fueron mantenidas a 37° C en

atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>. Todas las líneas fueron mantenidas en placas plásticas estériles de 10 cm y repicadas con tripsina (0,25% p/v y 1 mM EDTA en PBS), cada 3 días aproximadamente.

Para los experimentos donde se utilizó 17β-estradiol, 48 horas antes de empezar los experimentos, el medio fue cambiado por DMEM sin rojo fenol, suplementado con 10% suero fetal bovino tratado con carbón activado (charcol).

### III- VECTORES DE EXPRESION Y PLASMIDOS REPORTEROS.

En los experimentos en donde se quiso inhibir específicamente al factor de transcripción NF-κB, se utilizó el vector de expresión pRC-ssIκB conteniendo la forma mutada del IκBα en Ser32 y Ser 36 que impide su fosforilación y posterior proteólisis, generosamente cedido por el Dr. G Cadwell y el Dr. M Karin.

Para los experimentos de sobreexpresión del coactivador RAC3 o de Ciclina D1 se utilizaron como vector vacío el plásmido pCMX ó pcDNA6 (Invitrogen). Tanto el vector pCMX como el vector de expresión para RAC3 (pCMX-HA-RAC3) fueron gentilmente donados por el Dr. R. Evans, The Salk Institute, San Diego, USA.

El Dr. Eduardo Canepa, Universidad de Buenos Aires, Argentina generosamente nos cedió bacterias conteniendo un vector de clonado conteniendo el cADN de ciclina D1 el cual fue cortado y clonado en el vector de expresión pcDNA6 en los sitios de restricción Bam H1 y Eco R1.

El plásmido reportero κB-Luc fue provisto por el Dr. Omar Coso, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Para los ensayos de actividad del promotor de ciclina D1, se utilizó una construcción promotorCD1-Luc diseñada de la siguiente manera: un fragmento de 915 pb del promotor de ciclina D1 humano fue preparada por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) usando ADN genómico de la línea T47-D como molde y los *primers* fueron sintetizados a partir de la secuencia publicada -890 al +25. El producto amplificado por PCR fue subclonado en el vector pGL3-Basic en los sitios MluI y Hind III. La secuencia nucleotídica fue confirmada por secuenciamiento.

El vector de expresión para la proteína β-galactosidasa (RSV-β-gal) se utilizó para normalizar los datos de unidades relativas obtenidos en la medición de la actividad Luciferasa.

## IV- TRANSFORMACION DE BACTERIAS Y PURIFICACION DE PLASMIDOS

### IV. 1- TRANSFORMACION DE BACTERIAS

Para la preparación de todos los plásmidos utilizados en este trabajo, se transformaron 100 µl de bacterias quimiocompetentes *Escherichia coli* DH5α con 10 µl del ADN de interés en cada caso.

Se incubaron las bacterias primero con el ADN 15 minutos en hielo, luego se incubó el microtubo a 42° C por 90 segundos. Se agregó 1 ml de **LB** sin antibiótico, con el fin que se exprese la resistencia que posee el plásmido y se incubó durante 45 minutos a 37° C.

Se sembraron 100 µl del **LB** con las bacterias en una placa de Petri con **LB-agar** suplementado con Ampicilina 0,1 mg/ml para seleccionar solo las bacterias transformadas.

El cultivo se incubó toda la noche a 37° C y de las colonias crecidas se picaron 7 al azar y se crecieron en 5 ml de medio **LB** con el agente selector, durante 12 horas con agitación a 37° C, para luego proceder a la purificación y chequeo del plásmido a pequeña escala.

### SOLUCIONES UTILIZADAS

#### **LB (Luria-Bertani)**

10 g/l Triptona

5 g/l Extracto de levadura

5 g/l NaCl

#### **LB-agar**

LB + 15 g/l de agar

### IV.2- PREPARACION DE ADN A PEQUEÑA ESCALA

Se utilizó el método de lisis alcalina, modificado de *Birnboim and Doly*, 1979.

Las bacterias crecidas en LB fueron centrifugadas a máxima velocidad por 1 minuto, el precipitado de bacterias se resuspendió en 100 µl de **solución de**

**resuspensión (1)** durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se agregó 200 µl de **solución de lisis (2)**, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en hielo, tras lo cual se agregó 150 µl de **solución neutralizante (3)**, se mezcló por inversión e incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 10.000 rpm 5 minutos. Al sobrenadante se le agregó 5 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego se agregó un volumen de cloroformo: 24/isoamílico: 1, se agitó y se dejó reposar, para optimizar la separación de las fases se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm.

A la fase acuosa extraída se le agregó 2,5 volúmenes de etanol 100% y se dejó precipitando 3 horas a  $-20^{\circ}$  C, tras lo cual se centrifugó a 10.000 rpm 10 minutos, el ADN precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% v/v y se volvió a centrifugar. Una vez evaporado el etanol, el plásmido fue resuspendido en 20 µl H<sub>2</sub>O microfiltrada.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### **Solución resuspensión (1)**

50 mM Glucosa

50 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA pH 8,0

##### **Solución de lisis (2)**

1% p/v SDS

20 mM NaOH

##### **Solución neutralizante (3)**

3 M Acetato de Potasio pH 5,5

#### IV.3- PURIFICACION DE PLASMIDOS A GRAN ESCALA Y CUANTIFICACION DEL ADN PLASMIDICO

Los plásmidos utilizados para transfectar líneas celulares en cultivo fueron preparados por medio del sistema de maxi preparaciones de Qiagen, siguiéndose todos los pasos que se indican en el protocolo provisto por el proveedor, utilizando las columnas Qiagen-tip 500, con un rendimiento de 1 µg/µl.

El ADN disuelto, fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia), la concentración y grado de pureza

(relación Absorbancia 260nm/Absorbancia 280nm) de los plásmidos aislados fue determinada por el equipo y verificada multiplicando la absorbancia obtenida a 260 nm por el factor de dilución y la constante de absorptividad molar (50) para el ADN doble cadena.

## V- TRANSFECCION DE CELULAS EN CULTIVO

### V.1- TRANSFECCION TRANSITORIA UTILIZANDO EL REACTIVO

Lipofectamine™ .

Las células de tumor mamario humano T47-D presentan una muy baja eficiencia de transfección (menos del 30%), existen diversos métodos que se basan en la utilización de sistemas de liposomas comerciales que en mayor o menor medida favorecen la incorporación de ADN foráneo por este tipo de células.

Se siguió los pasos recomendados para T47-D en el protocolo del reactivo Lipofectamine™ (Gibco) para líneas celulares adherentes. Las células se crecieron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en DMEM sin suero ni antibióticos, y fueron transfectadas transitoriamente con una masa total de 800 ng de ADN (incluyendo 50 ng del vector RSV- $\beta$ -gal), el medio de transfección fue reemplazado por medio DMEM/F12 fresco y completo (10 % suero fetal bovino más antibióticos) luego de 5 horas.

Para los ensayos que no sean de genes reporteros se requiere que la población celular sea representativa del cambio introducido por transfección, en aquellos experimentos donde no se utilizaron vectores reporteros se utilizó el plásmido de expresión para la enzima  $\beta$ -galactosidasa para estandarizar el porcentaje de células que dieron positivas para la reacción con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopiranosida (X-gal).

### SOLUCIONES UTILIZADAS

#### **Solución X-Gal**

0,2% X-Gal

2 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O

5 mM  $K_3Fe(CN)_6$

## V.2- TRANSFECCION TRANSITORIA POR EL METODO DE CLORURO DE CALCIO

El método que se utilizó para transfectar transitoriamente a las células de la línea HEK 293 fue el método de cloruro de calcio, dado que estas células tienen una eficiencia de incorporación de ADN foráneo del 95%. Por este motivo se puede asumir que cuando se analizan cambios en los niveles de proteínas específicas o la proliferación en respuesta a altos o bajos niveles de expresión de los genes transfectados, están refiriéndose a más del 90% de la población celular.

Este método se basa en la formación de un precipitado de ADN-fosfato de calcio, este último facilitaría la interacción del ADN con la superficie celular que entraría a la célula por endocitosis. El ADN se mezcla directamente con una solución concentrada de **CaCl<sub>2</sub> (tubo A)**, la cual luego es goteada al **buffer fosfato (tubo2)** mientras se burbujea, este procedimiento favorece la formación de un fino precipitado haciendo que el ADN sea incorporado a la célula con mayor eficiencia. La mezcla A + B se incuba 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se gotea sobre las células y a las 5 horas el medio es cambiado por medio fresco.

### MEZCLA DE TRANSFECCION 10X

#### **ADN- CaCl<sub>2</sub> (Tubo A)**

5 µg/ml ADN plasmídico total

250 mM CaCl<sub>2</sub>

#### **HeBs 2x pH 7,12 (Tubo B)**

50 mM HEPES

280 mM NaCl

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Para cada ensayo se utilizó un protocolo de transfección adecuado a los requisitos del mismo. En los ensayos de sobreexpresión de una determinada proteína para evaluar proliferación, se sembraron  $8 \times 10^5$  células/placa de 10 cm, con 9 ml de medio DMEM, a las 24 horas se agregó 1 ml de la mezcla de transfección y 24 horas después, las células fueron repicadas, sembrándose  $8 \times 10^3$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos.

En los ensayos de modificación de la expresión de proteínas por sobreexpresión ectópica de un determinado gen, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) en 1 ml de medio DMEM y se procedió de manera similar con las células sembradas en placa de 10 cm. Los cultivos fueron estimulados según corresponda 24 horas después de ser cambiado el medio de transfección, luego se hicieron extractos proteicos para ensayo de *Western blot*.

En los ensayos reporteros las células se sembraron en placa de 24 pocillos, a una densidad de  $1 \times 10^5$  células en 500  $\mu$ l de medio por pocillo. A las 24 horas se transfectaron con 200 ng de ADN/pocillo (150 ng del vector con el gen a sobreexpresar o vector sin inserto, 40 ng del vector reportero y 10 ng del vector RSV- $\beta$ -gal), los estímulos se detallarán en cada sección.

## **VI- TRANSDUCCION DE CELULAS T47-D**

Para aquellos experimentos en donde no se utilizaron vectores reporteros es necesario que la población celular sea representativa del cambio inducido por transfección. Por lo tanto, dada la baja eficiencia de incorporación de ADN foráneo de las células de la línea T47-D por los métodos de transfección descritos en la sección anterior, se utilizó una construcción adenoviral no replicativa conteniendo el gen mutado del  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Ad5ss $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ) (Cafferata, EG *et al.* 2001).

Para estos ensayos las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 70-80% y fueron transducidas con el adenovirus en medio libre de suero a una multiplicidad de infección de 500 (1:500 células T47-D/partícula viral) por 12 horas con agitación suave cada hora. Tras lo cual el adenovirus fue lavado y se agregó medio suplementado con suero y se dejó crecer 12 horas más antes de ser estimuladas.

## **VII- ENSAYOS DE PROLIFERACION Y VIABILIDAD CELULAR**

### **VII.1- DROGAS Y TRATAMIENTOS**

En los ensayos de proliferación realizados en células T47-D, HC11, MCF-7 o HEK 293, se cultivaron  $8 \times 10^5$  células/pocillo en placa de 96 pocillos salvo excepciones que son descriptas a continuación.

En los ensayos donde se evaluó proliferación de las células de las líneas T47-D, MCF-7 y HC11, a las 24 horas después de repicadas, las células fueron estimuladas con TNF $\alpha$  humano (5, 10 ó 20 ng/ml) y/o 17- $\beta$ -estradiol (17E 100 nM) en presencia o no del inhibidor del factor de transcripción NF- $\kappa$ B sulfasalazina (Sz 200-500  $\mu$ M) por 24, 48, 72 ó 96 horas, en estos casos se evaluó proliferación por incorporación de metil[ $^3$ H]Timidina. En los ensayos de viabilidad celular post-tratamiento con dosis crecientes de TNF $\alpha$  (0,05-50 ng/ml), las células fueron estimuladas a los tiempos indicados, luego de lo cual fueron fijadas y teñidas con el colorante básico cristal violeta, el porcentaje de viabilidad se calculo con respecto a la condición basal a cada tiempo.

En aquellos experimentos donde se utilizaron oligonucleótidos conteniendo la secuencia consenso  $\kappa$ B, las células fueron sembradas a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos y fueron transfectadas, en las mismas condiciones descriptas en el inciso V.1 con 1  $\mu$ M del oligonucleótido de ADN doble cadena que posee la siguiente secuencia consenso para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B; 5'-G\*AGGGGACTTTCCC\*T-3', esta fue modificada en sus extremos por adición de grupos fosforotiate. Esta modificación hace que los oligonucleótidos sean más estables dado que no son reconocidos eficientemente por las endonucleasas intracelulares que degradan secuencias cortas de ADN doble cadena. Como control se utilizó un mutante con la misma composición de bases pero su secuencia se encuentra alterada 5'-C\*TTTGAGGCCCTGG\*A-3'; 24 horas después de la adición del oligonucleótido, las células fueron estimuladas con las diferentes dosis de TNF $\alpha$  humano, 17E y Sz por 24, 48, 72 y 96 horas. En este caso el porcentaje de proliferación fue determinada por tinción con el colorante cristal violeta.

En los ensayos donde se evaluó proliferación de las células HEK 293, estas fueron previamente transfectadas de manera transitoria con los siguientes vectores de expresión: pCMX-HA-RAC3, pcDNA6-CD1, ambos vectores ó bien con el vector correspondiente sin inserto. A las 24 horas después de ser sembradas en la placa de 96

pocillos, se sacó el medio y las monocapas fueron lavadas con buffer fosfato salino pH 7.0 dos veces para eliminar la presencia de suero, luego se agregó 200 µl de medio sin suplementar con suero fetal bovino o con medio suplementado con 10% suero. Tras 16 horas de cultivo se agregó 100 µl de DMEM más 30% suero fetal bovino, quedando una concentración final de 10% y las células se dejaron crecer en estas condiciones por 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Utilizándose la tinción con cristal violeta para evaluar el porcentaje de proliferación.

#### VII.2- ENSAYO DE PROLIFERACION POR INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (<sup>3</sup>H-Timidina)

Para este ensayo, a las células T47-D, MCF-7 ó HC11 crecidas en placas de 96 pocillos se les agregó 1 µCi/pocillo de metil[<sup>3</sup>H]Timidina (New England Nuclear Life Science, Boston, MA, USA) en las últimas 8 horas de cultivo, luego de las cuales las células fueron cosechadas. Las monocapas fueron lavadas 2 veces con Buffer fosfato salino (PBS) y se les agregó una solución conteniendo 0,3 N NaOH y 1% SDS para favorecer la lisis celular y la desnaturalización del ADN. El radioactivo incorporado se midió utilizando líquido de centelleo (OptiPhase HiSafe 2, PerkinElmer) para radiación β (Packard Instruments).

#### VII.3- TINCION DE CELULAS SUPERVIVIENTES CON CRISTAL VIOLETA.

Monocapas de células T47-D ó HEK 293 crecidas en placas de 24 o 96 pocillos fueron fijadas con una solución 0,2% Glutaraldehído/2% Formaldehído durante 15 min.

Se descartó el sobrenadante y se tiñó con 0,5% p/v de cristal violeta en 50% metanol. Luego de lavados sucesivos con agua, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector para Elisa para placa de 96 pocillos.

#### VII.4- ANALISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO

El número de células T47-D en diferentes fases del ciclo celular fueron monitoreadas por determinación del contenido de ADN. Luego de 24 horas post-tratamiento con 17E, en presencia o no de Sz, las células fueron lavadas 2 veces con

PBS, levantadas con tripsina y resuspendidas en 70% etanol. Al momento de realizarse la medición se precipitó las células, las cuales fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas por 3 horas a 4° C con una **solución de Ioduro de Propidio** 50 µg/ml. Las muestras se midieron en un BD FACSCalibur System y los datos obtenidos fueron analizados con el programa CellQuest de BD.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### **Solución de Ioduro de Propidio**

0,1 % p/v Citrato de sodio

0,1 % v/v Triton X-100

50 µg/ml Ioduro de Propidio

### **VIII- ANALISIS DE EXPRESION DE GENES REPORTEROS.**

#### VIII.1- COSECHA DE CELULAS Y PREPARACION DE EXTRACTOS

Las células, ya sea T47-D ó HEK 293, fueron transfectadas de la manera que se describió en las secciones V.1 y V.2 respectivamente, con los plásmidos reporteros pGL3 basic-promotorCD1 Luciferasa o pGL3 basic-κB Luciferasa más el vector RSV-β-Galactosidasa como control interno. Las monocapas celulares, estimuladas con los tratamientos adecuados por la cantidad de horas indicadas en la sección de resultados, fueron lavadas 2 veces con PBS y se agregó 100 µl de *Reporter Lysis Buffer* (Promega) a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Las células se incubaron en este buffer por 15 minutos a temperatura ambiente y luego, se colectó el lisado en microtubos que fueron centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos. Del sobrenadante obtenido: 15 µl se utilizó para la reacción de Luciferasa y 50 µl fueron sembradas en placa de 96 pocillos para la reacción de β-Galactosidasa.

#### VIII.2- DETECCION DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

El ensayo de actividad de la enzima Luciferasa se realizó agregando 50 µl del reactivo *Luciferase Assay System* (Promega) a los 15 µl de muestra de extracto celular o de buffer de lisis como control (blanco). Rápidamente se colocó el microtubo en el

luminómetro (Triathler, Hidex) y se tomó la lectura a los 30 segundos para cada tubo. El ensayo se realizó en oscuridad dado que los reactivos son sensibles a la luz.

Las Unidades Relativas de Luminiscencia (URL) corresponden a las cuentas por segundo (CPS) y fueron normalizados a los valores obtenidos en la medición de actividad  $\beta$ -Galactosidasa.

### VIII.3- MEDICION DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA

Para medir la actividad  $\beta$ -Galactosidasa presente en los 50  $\mu$ l de extracto, se agregaron 50  $\mu$ l de Buffer  $\beta$ -Gal 2X que contiene el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido). Se incubó entre 30-60 minutos a 37° C protegido de la luz. Una vez que la reacción viró de incoloro a color amarillo, se frenó la reacción con 150  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector para Elisa.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### **Buffer $\beta$ -Galactosidasa 2X**

0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

0,1 M  $\beta$ -Mercaptoetanol

1,33 mg/ml ONPG

### IX- ENSAYOS DE *Western blot*

#### IX.1- PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES

Las proteínas totales de T47-D ó HEK 293 se obtuvieron a partir de una placa de 10 cm ó de un pocillo de placa de 6 pocillos al 80% de confluencia. Tras ser estimuladas a diferentes tiempos de acuerdo al tratamiento que será descrito en la sección de Resultados, las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PBS y fueron levantadas utilizando 1 ml de PBS y colectadas en microtubos para ser centrifugadas 5 minutos a 3000 rpm a 4° C. Las células fueron resuspendidas en 1 volumen de *pellet* con **Buffer de lisis**, y se incubaron entre 15-30 minutos en hielo.

Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4° C, este procedimiento permite eliminar el ADN genómico así como los restos de membranas lipídicas, por ello el sobrenadante fue transvasado a un microtubo nuevo. Luego se midió la concentración de proteínas mediante el método de *Bradford* y las muestras fueron desnaturalizadas mediante la adición de *Laemmli buffer 2X* y luego calentadas a 95° C durante 5 minutos, los extractos se conservaron a -20° C hasta ser sembrados en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

## IX.2- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de *Bradford*.

La curva de calibración se realizó con un estándar de la proteína Albumina sérica bovina pura (BSA) en el rango de linealidad del método (0,05-0,5 µg/µl), y la concentración de las muestras fueron obtenidas por interpolación de los valores de absorbancia en esta curva de calibración.

Para la preparación de la reacción de *Bradford*, el reactivo 5X fue diluido en agua destilada y se sembró 200 µl de esta dilución en placa de 96 pocillos a la cual se le agregó 1-2 µl de la muestra a cuantificar. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de Elisa.

## IX.3- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) Y TRANSFERENCIA A MEMBRANA

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron en minigeles discontinuos, entre 6-12 % de acrilamida/bisacrilamida con SDS.

Se sembraron entre 50-100 µg de proteínas en *Laemmli buffer* y un marcador de peso molecular (Full range Rainbow, Amersham) como referencia.

La corrida electroforetica se realizó en cubas para minigeles (C.B.S. Scientific Co.) a 90-100 V utilizando **buffer de corrida 1X**.

Una vez terminada la corrida, los geles se lavaron en buffer de transferencia para eliminar el exceso de detergente y las proteínas fueron transferidas electroforeticamente a membranas de Polivinilidenofluoruro PVDF (Amersham), previamente activadas en

metanol 100% durante 1 minuto. La transferencia se realizó en frío 2-3 horas a 100 V en **buffer de transferencia 1X**.

#### IX.4- ENSAYO DE *Western blot*

Las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Rojo Ponceau para verificar la presencia de proteínas y escaneadas. Luego las membranas se lavaron con agua destilada para sacar el colorante e incubadas con 10% leche en polvo descremada (Nestlé) en **T-TBS** por 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear el pegado inespecífico. Luego se realizaron 3 lavados de 5 min. para lavar el exceso de leche.

Con el anticuerpo primario se incubaron 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C, de acuerdo a lo previamente establecido como óptimo para cada anticuerpo, diluido en T-TBS 0,5% BSA. Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron lavados con T-TBS (2 lavados de 5 min. y 2 lavados de 10 min.), para quitar el exceso de anticuerpo y evitar el pegado inespecífico.

Tras estos lavados, la membrana fue incubada durante 1 hora, con el anticuerpo secundario especie específico que se encuentra conjugado a la enzima Peroxidasa de Rabanito (HRP). Luego la membrana se lavó con T-TBS en las mismas condiciones descriptas más 3 lavados adicionales con TBS para eliminar el detergente que interfiere en la reacción quimioluminiscente.

La membrana se cubrió con la solución de luminol, y tras escurrir el exceso de reactivo, se colocó en un chasis y por encima de la membrana se ubico la película radiográfica (AGFA). Se expuso durante 1-15 min. en oscuridad y se utilizó el kit de revelado (AGFA).

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### **Buffer fosfato salino (PBS) 1 litro 10X**

2 gr KCl

80 gr NaCl

2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

6,1 gr Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### **Buffer de lisis:**

50 mM Hepes pH 7,4

250 mM NaCl

1 mM EDTA

1% NP-40

**Laemmli buffer 2X**

4% SDS

20% glicerol

10% 2-mercaptoetanol

0,004% azul de bromofenol

125 mM Tris HCl pH 6,8

**Buffer de corrida 1X**

25 mM Tris

250 mM Glicina

0,1% SDS

**Buffer de transferencia 1X**

25 mM Tris

193 mM Glicina

20 % metanol

**Rojo Ponceau**

0,1 % rojo Ponceau

0,5 % Acido acético

**T-TBS**

100 mM Tris-HCl pH 7,6

150 mM NaCl

0,05% Tween 20

## X- ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACION

Este ensayo tiene como objetivo determinar si dos o más proteínas forman parte de un mismo complejo proteico, pero no permite determinar si esta interacción es directa o no. Para estos experimentos se utilizaron células tanto de la línea T47-D como de la línea HEK 293, que fueron crecidas en placas de 10 cm al 80% de confluencia. Se colectaron las células de igual manera que la descrita en la sección IX.1 pero en este caso se utilizó 1 ml de **buffer de lisis** para levantar las monocapas que fueron colocadas en microtubos, los cuales se colocaron en hielo durante 15 minutos para permitir que el buffer actúe y luego, los microtubos fueron centrifugados por 5 minutos a 8000 rpm, el

sobrenadante se transvaso a otro microtubo y se agregó el anticuerpo primario correspondiente y se incubó durante toda la noche con agitación a 4° C. Tras esta incubación se agregó 10 µl de proteína G-Sepharose (Amersham) y se agitó durante 90 minutos a 4° C.

Para lavar el pegado inespecífico, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min y el precipitado, que contiene la proteína G-Sepharose unida a la porción conservada (Fc) del anticuerpo primario que reconoce a la proteína de interés más todas aquellas proteínas que estén interaccionando con ella, fue lavado 3 veces con **buffer de lisis**.

Finalmente, el precipitado se resuspendió en *Laemmli buffer 2X* y se sembraron en gel SDS-PAGE para su posterior análisis por *Western blot* utilizando los anticuerpos específicos para la detección de las proteínas de interés.

## XI- ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA

### XI.1- EXTRACCION DE PROTEINAS NUCLEARES

Este ensayo permite evaluar el grado de activación de un factor de transcripción y consiste en incubar las proteínas que se encuentran en el núcleo celular con oligonucleótidos que poseen las secuencias consenso para el factor de transcripción a estudiar.

Para estos ensayos se utilizaron células de la línea T47-D estimuladas por 45 minutos ya sea con h-TNFα (20 ng/ml), 17E (100 nM) o ambos en presencia o no del inhibidor Sz (200 µM).

Cuando se utilizaron células de la línea HEK 293, estas fueron transfectadas 24 horas antes de estimular, con los vectores de expresión pcDNA6 (vector vacío) o pcDNA6-CD1. Las células fueron tratadas por 60 o 180 minutos con el éster de forbol 12-miristate 13-acetato (PMA).

Las células fueron lavadas con **buffer de lisis A** en ausencia de detergente y los núcleos fueron aislados utilizando el **buffer de lisis A** y centrifugación a 1500 rpm por 5 min. Las proteínas nucleares se extrajeron lavando el precipitado de núcleos con **buffer hipertónico B** y agitación constante durante 15 minutos a 4° C, luego se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos.

Las reacciones de unión a oligonucleótidos se realizaron en **buffer C**.

## XI.2- MARCACION RADIOACTIVA Y PURIFICACION DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS CON LA SECUENCIA κB

Dado que el oligonucleótido comercial con el que contamos se encuentra como simple cadena de ADN, el primer paso consistió en obtener la doble cadena, para ello se colocaron masas iguales (10 µg) de cada uno de los oligonucleótidos simple cadena, cuya secuencia se detalla a continuación:

5'- AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'

La reacción se llevó a cabo en presencia de 5 µl de **buffer annealing 10X** y se agregó agua destilada hasta llegar a un volumen final de 50 µl, se incubó 5 minutos a 85° C en agua. El enfriado se realizó lentamente en el mismo recipiente hasta llegar a 40° C; al alcanzar esta temperatura el recipiente se coloca a 4° C y cuando se alcanza la temperatura de 10° C, el microtubo donde se realizó la reacción se pasa a hielo.

La marcación se realizó utilizando la enzima polinucleótido quinasa del bacteriofago T4 (PNKT4), que cataliza la transferencia de fosfatos en la posición γ del ATP a los grupos 5'-OH tanto de ADN doble como simple cadena, la mezcla de reacción es la que se detalla a continuación:

### **Reacción de marcación radiactiva:**

10X Buffer	2,5 µL
T4PNK	0,5 µL
Oligonucleótido	150 ng
[ <sup>32</sup> P]-γ-ATP	50 µCi
H <sub>2</sub> O	c.s.p. 25 µL

La reacción se incubó 60 min a 37° C y fue frenada a -20° C.

Dado que tanto el paso de hibridización de las dos cadenas no es completa conduciendo a la presencia de oligonucleótidos simple cadena así como isoformas no convencionales de 3 cadenas, que son también reconocidas por la PNKT4 transformándose en contaminaciones y que la marcación radiactiva no es 100 % eficiente, en la mezcla obtenida van a coexistir: oligonucleótidos simple cadena

marcados radiactivamente y no marcados, oligonucleótidos doble cadena marcados y no, más las isoformas antes nombradas.

Por esta razón, la sonda fue purificada utilizando un gel 20 % poliacrilamida nativo que es eficiente para separar oligonucleótidos de entre 6-100 pb, entonces esto nos permite separar las distintas isoformas, para favorecer la resolución de estos geles se utilizan cubas separativas de 20 cm de largo y la corrida electroforética se realiza en presencia de **buffer TAE 1X**.

Dado que los colorantes utilizados en el buffer de siembra pueden interferir y contaminar los oligonucleótidos, la muestra se siembra agregando solamente una gota de Glicerol para darle densidad y en una calle paralela se siembra el buffer que contiene los colorantes azul de bromofenol y xilencianol. Estos colorantes tienen una movilidad electroforética relativa característica dependiendo del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, en este caso el azul de bromofenol tiene una movilidad relativa de 12 pares de bases (pb) y el xilencianol de 45 pb, por lo que la sonda a purificar se detectara como una banda intensa cercana a la banda que corresponde al xilencianol.

La figura 20 corresponde a una placa radiográfica representativa, luego de revelarla se hace una ventana sobre la banda que corresponde al oligonucleótido doble cadena y después se alinea la placa con el gel y se procede a cortar el taco del gel.

Una vez separado la porción del gel se coloca en un microtubo y se cubre con **Solución de elusión**, el tubo se incuba toda la noche a 37° C.

Se centrifugó para hacer decantar partículas del gel que se desprendan y el sobrenadante se pasa a un tubo limpio, y se agregan 2-2,5 volúmenes de 100 % Etanol frío, se deja incubar 1 hora a -70° C y luego se centrifugó. El precipitado se lava con Etanol 70%.

Luego de secar el oligonucleótido purificado se resuspende en agua destilada tal que la concentración de oligonucleótido marcado sea de 1 µg/µl.



**Figura 20** Placa radiográfica que corresponde al patrón de bandas obtenidas luego de la corrida electroforética realizada en un gel al 20% de poliacrilamida nativo. Los puntos oscuros al costado de la placa corresponden a la ubicación de los colorantes xilencianol y azul de bromofenol, respectivamente.

### XI.3- INCUBACION DEL OLIGONUCLEOTIDO CON EL EXTRACTO PROTEICO NUCLEAR

En el tubo de reacción se coloca el volumen de muestra que correspondan a 6  $\mu\text{g}$  de extracto nuclear y se lleva a 10  $\mu\text{l}$  con **Solución C**, a esta preparación se le agrega 200 ng de ácido poli-deoxiinositico-deoxicitilico (polydIdC:dIdC), que inhibe la unión no específica de proteínas nucleares a la sonda marcada, y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregan 2 ng de oligonucleótido marcado y se lleva a un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , esta mezcla se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente durante la que se produce la interacción entre NF- $\kappa\text{B}$  y su secuencia consenso.

Las muestras son luego sembradas con glicerol, en un gel nativo al 5% de poliacrilamida utilizando **buffer TAE 0,25X**, en una calle paralela se siembran los colorantes. La electroforesis se realiza a una potencia de 150 Volt.

Una vez que se logra la separación deseada, teniendo en cuenta la separación entre ambos colorantes, el gel se coloca sobre un papel *Whatman* y se seca por vacío durante una hora a 80° C.

Una vez secado el gel se coloca en un chasis que contiene una placa amplificadora (Kodak), se coloca la placa radiográfica sensible a los rayos  $\gamma$  y se deja exponiendo a -70° C.

Para los ensayos de competencia utilizando un oligonucleótido no relacionado se utilizaron distintas masas del oligonucleótido sin marcar CCAAT

5'-GATCCCGGAGCCCGGGCCAATCGGCGCA-3'

Para determinar la identidad de los complejos obtenidos, los complejos oligonucleótido/proteínas fueron incubados con anticuerpos específicos para las distintas subunidades del factor NF- $\kappa$ B durante 30 minutos previos a ser sembrados en el gel, técnica que se denomina *Supershift*

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### **Buffer de lisis A**

10 mM Hepes (pH 7,9)

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM KCl

0,5% NP-40

##### **Buffer hipertónico B**

10 mM Hepes (pH7,9)

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 mM EDTA

20 % glicerol

0,42 M KCl

##### **Buffer C**

10 mM Hepes (pH7,9)

60 mM KCl

20 % glicerol

0,25 mM EDTA

0,125 mM EGTA

##### **Buffer TAE 50X (1 litro)**

242 gr Tris Base

57,1 ml ácido acético glacial

37,2 gr Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O

##### **Buffer annealing 10X**

500 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM Espermidina

100 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM DTT

**Solución de elusión**

0,5 M Acetato de Amonio

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

0,1 % SDS

## XII- INMUNOPRECIPITACION DE CROMATINA

### XII.1- PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las células T47-D o HEK 293 fueron estimuladas por el tiempo detallado en la sección de Resultados, pasado este tiempo las células se tratan con Formaldehído 1% durante 10 minutos, esto permite fijar las proteínas unidas al ADN, transcurrido este tiempo las monocapas se lavan 2 veces con PBS 1X, se levantan y se pasan a un microtubo. Los tubos se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos. Los precipitados se resuspenden en 1 ml de **buffer Ripa modificado**.

Para obtener fragmentos de ADN de tamaño entre 500-1000 pb, las muestras fueron tratadas con ultrasonido (Sonifier 150, Branson), 6 pulsos de 1 minutos a 40% de potencia, en la figura 21, se muestra el chequeo en gel de agarosa al 1,5% de la puesta a punto de la fragmentación, donde cada calle corresponde a una alícuota de muestra tomada después de cada pulso.



**Figura 21** La fotografía que se muestra es representativa de la puesta a punto realizada para la obtención de fragmentos que se encuentren entre 500-1000 pb.

Para chequear la concentración de ADN de partida, se tomó una alícuota de 50 µl y se llevó a un volumen final de 500 µl con **buffer Ripa modificado**, se le agregó 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó durante 4-5 horas con agitación a 65° C para revertir el entrecruzamiento y digerir las proteínas. Luego se extrae con un volumen de Fenol 25: Cloroformo 24: isoamilico 1 (PIC 25:24:1). La fase acuosa se pasa a otro microtubo, se le agrega 2 volúmenes de 100% Etanol más 150 µl de Acetato de sodio 3 M y se deja precipitando en frío.

El ADN precipitado se lava con 1 ml de Etanol 70% y tras centrifugar 10 minutos a 10000 rpm se descarta el sobrenadante. Al precipitado de ADN se dejó evaporar el alcohol y luego se resuspende en 50 µl **buffer TE**. Esta dilución se cuantifica de manera similar a la descrita en la sección IV.3.

## XII.2. REACCION DE INMUNOPRECIPITACION DE CROMATINA

Para el ensayo de inmunoprecipitación se tomó un volumen de muestra que corresponda a 50 µg de ADN y el volumen de reacción se ajustó a 1 ml con **buffer de Ripa modificado**. A esta mezcla se le agregó 1 µl de anticuerpo primario y se incubó durante toda la noche con agitación a 4° C, luego se agregó 10 µl de Proteína G-Sepharose y se incubó con agitación a 4° C durante 90 minutos.

Se realizaron 3 lavados con **buffer de lavado** y se realizó un último lavado con **buffer final de lavado**, estos lavados se hicieron centrifugando a 3000 rpm por 5 minutos y descartando el sobrenadante. Finalmente el precipitado que contiene la proteína G unida al anticuerpo primario y esta a su vez al complejo ADN-proteínas, se resuspendió en 450 µl de **buffer de elusión** y se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante que se obtiene luego de centrifugar 2 minutos a 10000 rpm se pasa a un tubo nuevo al que se le agrega 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), y se incubó a 65° C durante 4-5 horas con agitación.

Luego se hizo una extracción con PIC y a la fase acuosa se le agregó 2,5 volúmenes de 100% Etanol y Acetato de sodio a una concentración final de 0,3 M, se incubó en frío y luego se centrifugó a 10000 rpm 10 minutos, el precipitado se lavó con 1 ml de Etanol 70% y luego de centrifugar se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar. Una vez que es el ADN está bien seco se resuspendió en 25 µl de **buffer TE**.

### XII.3. REACCION DE CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para el diseño de los cebadores (*primers*) se utilizó la bibliografía existente y la secuencia se diseñó para amplificar la región del promotor de ciclina D1 que contiene los elementos distales κB y que abarca desde el -749 al -858. La secuencia de los *primers* se detalla a continuación:

Fw 5'-TCCATTCAGAGGTGTGTTTCTC-3'

Rv 5'-GGATTCAGCTTAGCATGCG-3'

Las condiciones para realizar la reacción se puso a punto teniendo en cuenta el equipo (Mastercycler personal, Eppendorf) y utilizado la  $T_m$  de los *primers*, como control positivo de cada muestra se utilizó el ADN purificado antes de inmunoprecipitar, como control negativo se utilizó un microtubo sin molde. La reacción se realizó de la siguiente manera:

#### **Reacción de PCR**

Buffer 10X	5 μl
Molde	2-3 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 μl
10 mM dNTPs mix	1 μl
20 μM <i>primers</i> Rv	1 μl
20 μM <i>primers</i> Fw	1 μl
Taq polimerasa (Invitrogen)	0,3 μl
H <sub>2</sub> O	c.s.p. 50 μl

El programa de PCR se puso a punto para los *primers* utilizados y fue el siguiente:

95° C	5 minutos	
95° C	30 segundos	} 40 ciclos
51° C	60 segundos	
72° C	60 segundos	
72° C	5 minutos	

Una vez terminada la reacción de amplificación se sembraron las muestras en un gel de agarosa al 1,5% y se observaron en un transiluminador para detectar la banda de 200 pb que corresponde a la secuencia amplificada.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### **Buffer Ripa modificado**

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

65 mM NaCl

1% Tritón X-100

0,1% SDS

5% Deoxicholate

##### **Buffer de lavado**

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

2 mM EDTA

1% Tritón X-100

0,1% SDS

##### **Buffer final de lavado**

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

500 mM NaCl

2 mM EDTA

1% Tritón X-100

0,1% SDS

##### **Buffer de elusión**

100 mM NaHCO<sub>3</sub>

1% SDS

##### **Buffer TE**

250 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM EDTA

### **XIII- CRECIMIENTO EN *SOFT* AGAR**

Las células HEK 293 crecidas en placa de 10 cm fueron transitoriamente transfectadas con vectores de expresión: pCMX-RAC3, pcDNA6-CD1, ambos o el

vector sin inserto como control junto con el vector que expresa para la Proteína fluorescente verde (pcEGFP) que contiene el gen para el marcador de selección que otorga resistencia a la droga Neomicina. A las 24 hs post-transfección a las células se las comenzó a tratar con una dosis 800  $\mu\text{g/ml}$  de Neomicina, las células fueron seleccionadas durante 30 días y el seguimiento se realizó por presencia de fluorescencia. Tras este periodo las células fueron contadas y se sembraron 8000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos. Las células T47-D se utilizaron como control positivo.

### XIII.1- PREPARACION DE LAS PLACAS DE *SOFT* AGAR

En este protocolo se utilizan dos soportes de agarosa:

**i- Agar base:** este posee mayor porcentaje de agarosa. Se funde 1% agarosa en PBS estéril en microonda y se deja enfriar en baño termostático hasta que llegue a los 40° C. A parte se preparó DMEM alta glucosa 2X suplementado con 20% suero fetal bovino que se mantuvo a una temperatura de 40° C, también en baño.

En esterilidad se mezclan volúmenes iguales de agarosa 1% y del medio de cultivo y se vertió 1,5 ml de esta preparación por pocillo formando un soporte de aproximadamente 2 cm de espesor

**ii- Agar superior:** Fundir 0,7 % de agarosa en PBS en microondas y dejar enfriar a 40 °C y calentar el resto del DMEM 2X suplementado con 20% suero fetal bovino. En esterilidad se alicuoto 750  $\mu\text{l}$  en microtubos de 2 ml el medio de cultivo calentado y se le agregó las células. A estas alícuotas se les agregó 750  $\mu\text{l}$  de agarosa y rápidamente se colocó sobre el agar base. Generando una capa de agar de 2 cm de espesor, una vez solidificada se agregó 1,5 ml de DMEM 10% suero fetal bovino.

Las placas fueron incubadas en estufa de cultivo durante 1-2 meses. Pasado este tiempo las colonias fueron teñidas con cristal violeta, y luego observadas por microscopia de campo claro y chequeadas por fluorescencia.

#### XIV- INMUNOFLUORESCENCIA

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos cargados, 24 hs después las células fueron tratadas por 45 minutos con 17E (100 nM), TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o el tratamiento simultáneo. Tras lo cual las células fueron fijadas utilizando una solución 0,2% Glutaraldehído/2% Formaldehído durante 15 min. Luego de ser lavadas, las células fueron permeabilizadas con una solución que contiene 0,2% del detergente Triton-X en PBS durante 15 minutos.

Para bloquear el pegado inespecífico se utilizó una solución de 3% de la proteína purificada Albumina sérica bovina (BSA) en PBS y los vidrios se incubaron en esta solución durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavó con **PBS** y se incubó durante 18 hs. con el anticuerpo primario (anti-RelA 1/500 ó anti-ER $\alpha$  1/500) a 4° C, luego se lavó 3 veces con PBS durante 10 minutos. Las células se incubaron por 60 minutos con el anticuerpo secundario acoplado a los fluorocromos Fluoresceína (1/1000 anti-ratónFite) o Rodamina (1/1000 anti-conejoRod) y tras lo cual se lavó con PBS durante 10 minutos (3 veces).

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia Olympus acoplado a una cámara digital.

#### XV- ANTICUERPOS UTILIZADOS

Para los ensayos de *Western blot*, co-inmunoprecipitación, inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) e inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Proveedor	Especie	PM (kDa) *
RAC3	Santa Cruz (SC)	conejo	160
ER $\alpha$	SC	ratón	67
RelA	SC	conejo	65
Bcl3	SC	conejo	60
Ciclina D1	SC	conejo	36
Ciclina E	SC	conejo	50
Cdk4	SC	conejo	32
Cdk2	SC	conejo	35

---

I $\kappa$ B $\alpha$	SC	conejo	40
IAP-2	SC	conejo	68
Histona H3	Upstate	conejo	16
p50	SC	conejo	50
p52	SC	conejo	52
HDAC1	SC	conejo	57

**\* Del péptido a identificar**

# **RESULTADOS**

## I- EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF $\alpha$ ) INDUCE PROLIFERACION EN LA LINEA TUMORAL MAMARIA T47-D

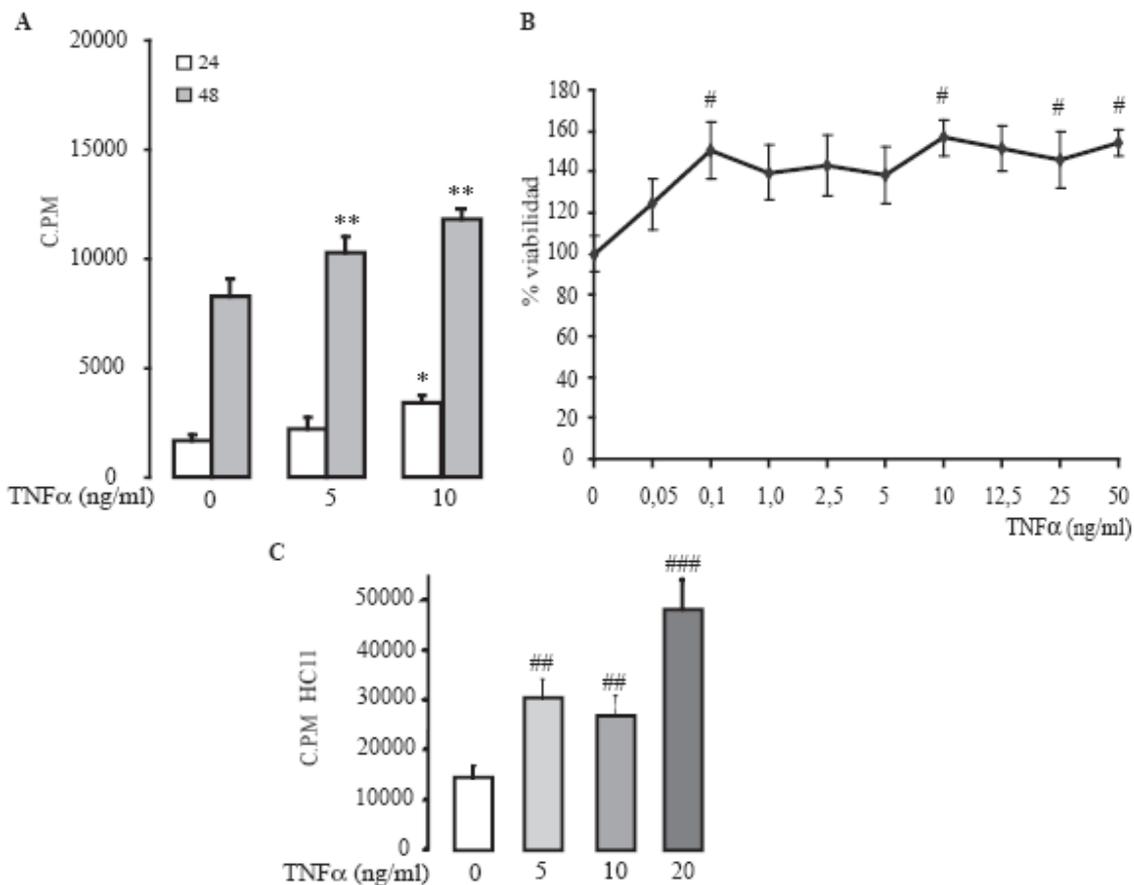
### I.1- TNF $\alpha$ induce proliferación celular en la línea tumoral T47-D y aumenta la respuesta mitótica de los estrógenos.

La línea de tumor mamario T47-D responde normalmente a estrógenos (E<sub>2</sub>), los cuales aumentan su respuesta proliferativa mediada por el Receptor de Estrógenos (ER $\alpha$ ) (Biswas, DK *et al.* 2000). Esta línea tumoral al igual que otras que dependen de hormona para proliferar, entre ellas la línea MCF-7, poseen niveles elevados del coactivador de receptores nucleares (SRC3/RAC3).

Como se describió en la introducción, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), es una citoquina inflamatoria que posee distintos papeles biológicos dependiendo del receptor, es decir si es de tipo I (p55) o de tipo II (p75), del linaje celular y del contexto fisiológico. Esta citoquina fue identificada inicialmente como una proteína que inducía necrosis en tumores sólidos de ratón (Larrick, JW *et al.* 1990), aunque sólo unos pocos tipos celulares son naturalmente sensibles a su actividad pro-apoptótica.

Con el fin de determinar el efecto del TNF $\alpha$  sobre la proliferación de líneas tumorales de mama, células T47-D o MCF-7 humanas o la línea murina HC11 fueron estimuladas con distintas dosis de citoquina (5-20 ng/ml). Para estos experimentos, las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y la proliferación fue evaluada 24, 48, 72, 96 ó 1 semana después de ser estimuladas mediante las técnicas de tinción con cristal violeta o por marcación con <sup>3</sup>H-timidina (Figura 22 A, B y C).

Como se puede observar, los resultados obtenidos con las distintas concentraciones de TNF $\alpha$  fueron particularmente interesantes, dado que no se observó una actividad pro-apoptótica; sino por el contrario se puede observar una actividad mitogénica (a 10 ng/ml  $\sim$ 2 veces con respecto a la condición basal a las 24 y 48 hs) sobre las células T47-D (Figura 22 A y 23 A) y sobre las HC11 (Figura 22 C). Sin embargo, no se observó un efecto similar de esta citoquina, sobre la actividad proliferativa en la línea MCF-7 (Figura 23 B) que ha sido previamente descrita por ser sensible al tratamiento con TNF $\alpha$ .

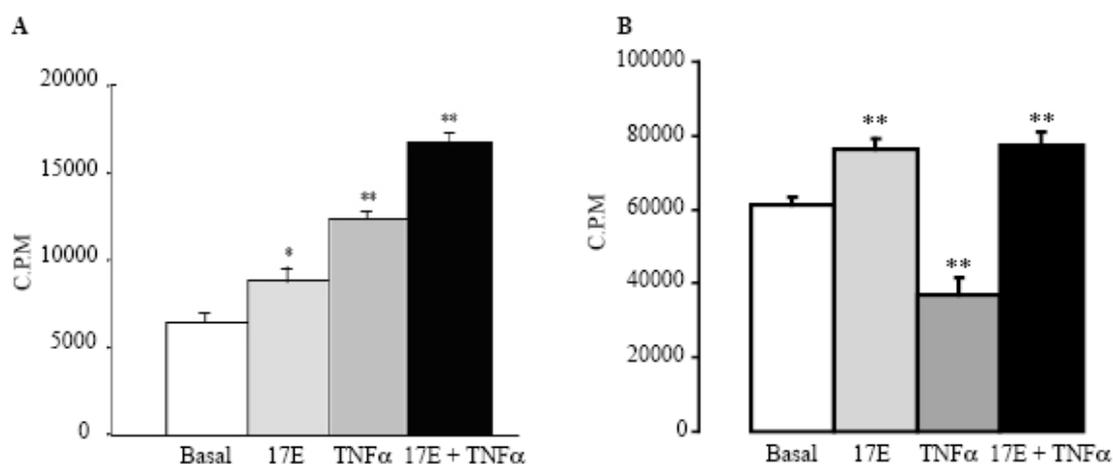


**Figura 22 TNF $\alpha$  induce proliferaci3n en la l3nea tumoral de mama humana T47-D y la l3nea murina HC11:** Las c3lulas T47-D o HC11 fueron crecidas en placas de 96 pocillos, 24 hs despu3s fueron estimuladas con distintas dosis de TNF $\alpha$ . **A** El diagrama de barras corresponde al promedio de triplicados  $\pm$  d.s. de la incorporaci3n de  $^3$ H- timidina durante las 3ltimas 8 hs de cultivo. Las c3lulas T47-D fueron estimuladas por 24 o 48 hs con TNF $\alpha$  (5 y 10 ng/ml) \*p<0,01 y \*\* p<0,001 con respecto a la condici3n basal a las 24 y 48 hs respectivamente (Test de Tukey). **B** Las c3lulas T47-D fueron estimuladas por 24 hs con dosis crecientes de TNF $\alpha$ , las c3lulas fueron luego fijadas y te3idas con cristal violeta, el % viabilidad fue calculado con respecto a la condici3n basal #p <0,001 (Test de Tukey). **C** El diagrama de barras corresponde al promedio de triplicados  $\pm$  d.s. de la incorporaci3n de  $^3$ H- timidina durante las 3ltimas 8 hs de cultivo. Las c3lulas HC11 fueron estimuladas por 48 hs con TNF $\alpha$  (5, 10 o 20 ng/ml) ## p<0,014,### p<0,0001 ambos con respecto a la condici3n basal (Test de Scheffe).

Para evaluar si adem3s de su propia actividad mitog3nica TNF $\alpha$ , inductor de la v3a de activaci3n de NF- $\kappa$ B, era capaz de antagonizar con la actividad proliferativa mediada por 17 $\beta$ -estradiol (17E) (Hsu, SM *et al.* 2000; Speir, E *et al.* 2000; Valentine, JE *et al.* 2000; Evans, MJ *et al.* 2001); se realizaron experimentos de proliferaci3n a 48 hs post-tratamiento con TNF $\alpha$  (10 ng/ml), 17E (100 nM) o ambos. Como se puede observar en la figura 23; la estimulaci3n con 17E induce proliferaci3n tanto en la l3nea

MCF-7 como en la T47-D, sin embargo cuando las células fueron sometidas al tratamiento simultáneo con 17E y  $\text{TNF}\alpha$ , se puede observar que la citoquina no antagoniza el efecto de la hormona y más aún la respuesta proliferativa se vio aumentada en la línea T47-D (Figura 23 A), mientras que la citoquina parece no afectar la inducción de la proliferación mediada por 17E en la línea MCF-7 (Figura 23 B)

De acuerdo con estos experimentos,  $\text{TNF}\alpha$  tendría un efecto proliferativo en la línea tumoral de mama T47-D y este no presentaría un efecto antagónico con el observado cuando las células fueron estimuladas con 17E en presencia de ambos estímulos (Figura 23 A).



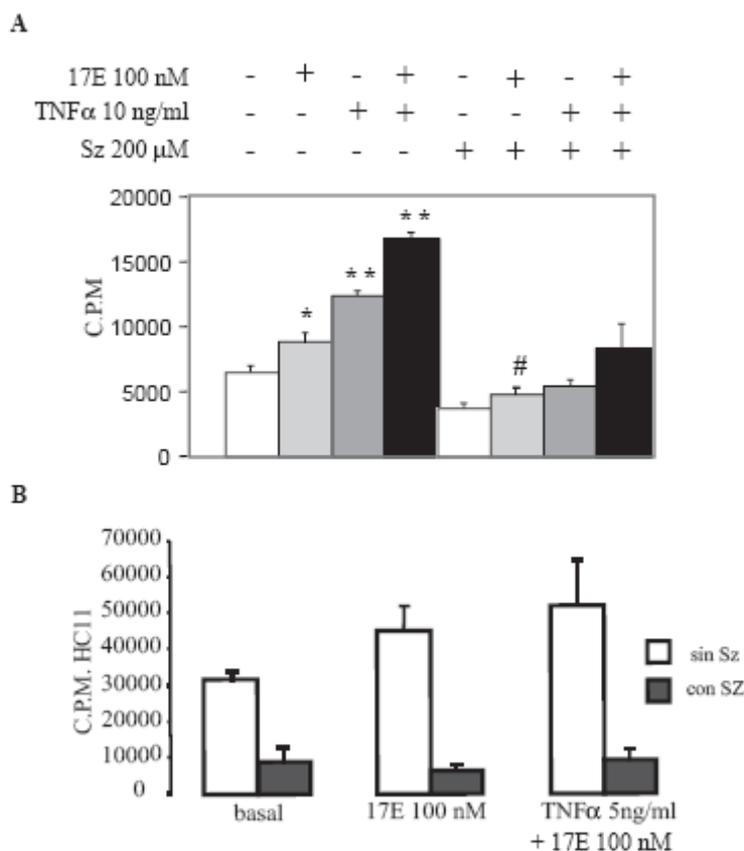
**Figura 23: Efecto de estrógenos y la citoquina proinflamatoria  $\text{TNF}\alpha$  sobre la proliferación de la línea tumoral mamaria T47-D y MCF-7.** El diagrama de barras corresponde al promedio de triplicados  $\pm$  d.s. de la incorporación de  $^3\text{H}$ - timidina durante las últimas 8 hs de cultivo. Las células A T47-D y B MCF-7 fueron estimuladas por 48 hs con  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) y 100 nM 17E. \*  $p < 0,01$  y \*\*  $p < 0,001$  con respecto a la condición basal (Test de Tukey).

### **I.2- Para la proliferación de células T47-D se requiere la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.**

Dado que  $\text{TNF}\alpha$ , además de activar a varias MAPK, activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B que esta involucrado en el control del ciclo celular y la supervivencia (Chen, F *et al.* 2001; Joyce, D *et al.* 2001), decidimos determinar si NF- $\kappa$ B estaba involucrado en la respuesta proliferativa mediada por  $\text{TNF}\alpha$ , para ello analizamos el efecto del inhibidor sulfasalazina (Sz) (Wahl, C *et al.* 1998; Costas, MA *et al.* 2000) sobre la

proliferación celular. Se estimularon las células durante 30 minutos con Sz (200  $\mu$ M), luego se trataron con 10 ng/ml de TNF $\alpha$ , 100 nM de 17E o el tratamiento simultáneo, tras 48 horas de tratamiento la proliferación celular se midió por incorporación de  $^3$ H-timidina.

Como se puede observar en la figura 24, la Sz como era de esperar inhibe de manera significativa la acción mitogénica del TNF $\alpha$ , así como con el tratamiento simultáneo con la citoquina y 17E, tanto en la línea T47-D (Figura 24 A) como en la HC11 (Figura 24 B). Mientras que el resultado obtenido con el tratamiento con Sz y 17E fue sorpresivo dado que es capaz de inhibir la actividad mitogénica de 17E aún en ausencia de activación de la vía de NF- $\kappa$ B.



**Figura 24 Efecto de la inhibición de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B sobre la respuesta mediada por 17E y TNF $\alpha$ :** La proliferación de la línea **A** T47-D o **B** HC11 fue ensayada por incorporación de  $^3$ H-timidina durante las últimas 8 hs de cultivo. Las células fueron previamente estimuladas con 17E (100 nM) y TNF $\alpha$  (10 ng/ml o 5 ng/ml respectivamente). Cuando se utilizó el inhibidor de NF- $\kappa$ B, sulfazalacina (Sz 200  $\mu$ M) las células fueron preincubadas durante 30 min antes del tratamiento con 17E y/o TNF $\alpha$ . El diagrama de barras corresponde al promedio de triplicados  $\pm$  d.s. \* p

<0,01 y \*\* p<0,001 con respecto a la condición basal mientras que # p<0,001 con respecto al tratamiento con 17E (Test de Tukey).

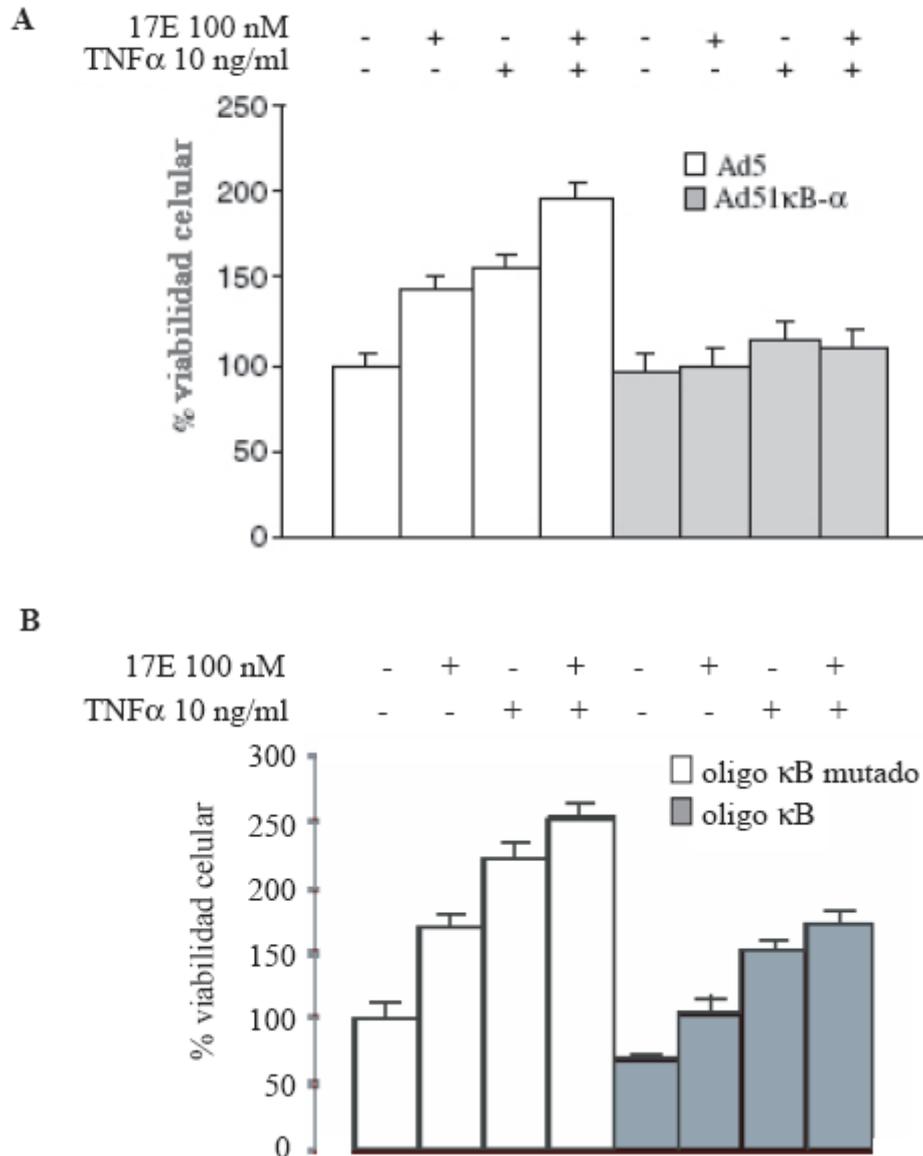
### **I.3- Efecto de la inhibición específica de NF- $\kappa$ B sobre la proliferación celular y sobre la actividad del Receptor de estrógenos activado.**

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B en su forma inactiva se encuentra asociado con la proteína inhibitoria I $\kappa$ B que lo retiene en el citoplasma, la fosforilación de esta proteína por IKK, activada por señales extracelulares, por ejemplo TNF $\alpha$ , permiten la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Sin embargo, I $\kappa$ B no es el único sustrato de la IKK siendo RAC3 uno de los más recientemente reportados (Wu, RC *et al.* 2002).

Dado que la sulfasalazina (Sz) inhibe la actividad de la IKK afectando no solo la activación de NF- $\kappa$ B sino también la fosforilación de RAC3 esto podría influir negativamente en la actividad de aquellos factores de transcripción que utilizan a RAC3 como coactivador, entre ellos el ER y del propio NF- $\kappa$ B.

Con el fin de determinar si el efecto de la Sz sobre la acción de E<sub>2</sub> se debía a la inhibición específica de NF- $\kappa$ B o a la ausencia de fosforilación de RAC3, y así confirmar la relevancia de la actividad de NF- $\kappa$ B en la proliferación y sobre la actividad del ER activado, se realizaron experimentos donde células de la línea T47-D fueron transducidas con un vector adenoviral expresando al dominante super-represor I $\kappa$ B $\alpha$  (Costas, MA *et al.* 2000; Cafferata, EG *et al.* 2001) ó transfectadas con oligonucleótidos de ADN conteniendo secuencias específicas de NF- $\kappa$ B y estimuladas con TNF $\alpha$  (10 ng/ml), 17E (100 nM) o el estímulo simultáneo.

Los resultados obtenidos (Figura 25 A y B) corroboran lo observado con Sz y demuestran que NF- $\kappa$ B es necesario para la proliferación de ciertas líneas de tumor mamario, tanto de forma directa, vía la activación con TNF $\alpha$  como en la proliferación mediada por estrógenos



**Figura 25 El factor de transcripción NF- $\kappa$ B media la acción del 17E y TNF $\alpha$  sobre la proliferación celular:** La viabilidad celular de las células T47-D, determinada por cristal violeta, fue evaluada mediante dos modelos que corresponden a la inhibición de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B; en **A** las células fueron transducidas con el Adenovirus5-ssI $\kappa$ B $\alpha$  o el control y la viabilidad fue ensayada 24 h post-tratamiento con TNF $\alpha$ , 17E o la combinación de ambos. En cambio en **B** las células fueron incubadas con un oligonucleótido conteniendo la secuencia de unión de NF- $\kappa$ B o un mutante y la viabilidad fue evaluada tras una semana de estimulación. Las barras indican el promedio de triplicados  $\pm$  d.s.

#### **I.4- La inhibición de NF- $\kappa$ B no induce apoptosis pero si bloquea el efecto de los estrógenos sobre el ciclo celular.**

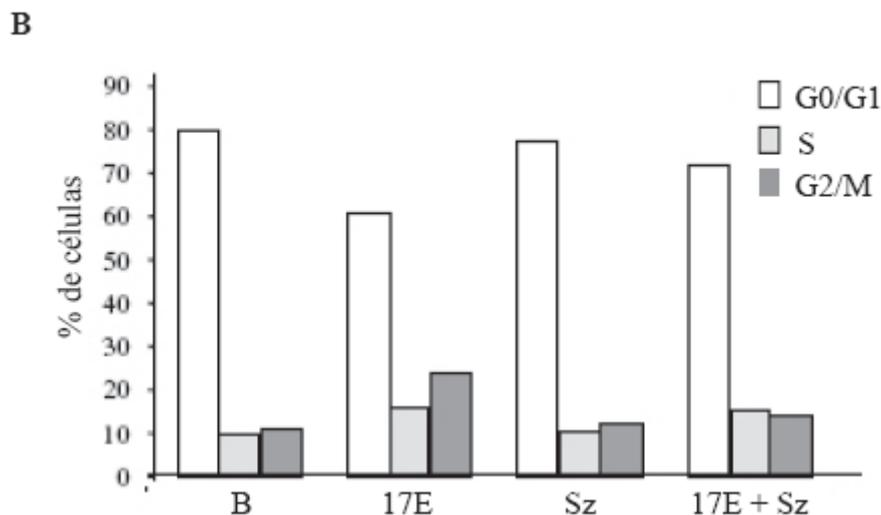
De acuerdo a los resultados obtenidos, la activación de NF- $\kappa$ B sería necesaria para la proliferación ya sea independiente de E<sub>2</sub> y mediada por TNF $\alpha$  como aquella inducida por 17E.

Se ha visto previamente que la inhibición de NF- $\kappa$ B durante la estimulación con TNF $\alpha$  induce apoptosis en varias líneas celulares (Beg, AA *et al.* 1996; Liu, ZG *et al.* 1996; Franco, DL *et al.* 2002), por lo tanto el efecto de los distintos inhibidores de NF- $\kappa$ B sobre la proliferación celular podrían ser consecuencia de la inducción de apoptosis y no a una inhibición de la proliferación; para descartar esta posibilidad se realizaron experimentos en donde se evaluó la viabilidad celular utilizando distintas dosis de Sz mediante las técnicas de exclusión del colorante *Trypan blue* y por observación microscópica (Figura 26 A).

Además se evaluó el número de células con posible contenido de ADN hipodiploide mediante citometría de flujo (FACS), por otro lado, esta técnica nos permitió determinar el número de células en las distintas fases del ciclo celular. Las células fueron tratadas por 24 hs con 17E (100 nM) con o sin Sz (200  $\mu$ M) y según se puede observar en la figura 26 B, la inhibición de NF- $\kappa$ B disminuye el número de células en G<sub>2</sub>/M en respuesta al tratamiento con 17E y esto no se debería a un efecto tóxico de la Sz dado que el número de células en G<sub>2</sub>/M por tratamiento con la droga es similar al basal. Además el tratamiento con Sz produce un incremento en el número de células en G<sub>0</sub> y una disminución en el número de células en G<sub>2</sub>/M junto con una menor inhibición de la fase S inducida por 17E a las 24 hs posteriores a la estimulación.

A





**Figura 26 La inhibición de NF- $\kappa$ B no induce apoptosis pero sí bloquea el efecto de los estrógenos sobre el ciclo celular:** A Células T47-D fueron tratadas con Sz sola o en combinación con TNF $\alpha$  por 24 hs y se observó la presencia de signos de cambios morfológicos asociados a mecanismos apoptóticos. **B** La estimulación de las células con 17E induce la entrada al ciclo celular, efecto que se ve bloqueado por la estimulación simultánea con Sz. El diagrama de barras corresponde al análisis del ciclo celular luego de 24 hs de estímulo; los datos fueron analizados con el programa informático CellQuest.

Estos resultados demuestran claramente que para la proliferación de células de tumor mamario ER positivas (ER+) se requiere de la actividad NF- $\kappa$ B, aún cuando la señal proliferativa está dada por estrógenos.

### **1.5- La expresión de Ciclina D1 sería uno de los genes blanco modulados por TNF $\alpha$ vía el ER y NF- $\kappa$ B.**

La expresión de Ciclina D1 (CD1) esta asociada a la proliferación celular, más precisamente a la progresión de las células a través de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Su expresión es inducida por 17E en la glándula mamaria y en células humanas de cáncer de mama estrógeno dependientes. El mecanismo de activación de CD1 depende tanto de la presencia de mitógenos como del contexto celular. Por lo tanto, la activación transcripcional de este gen depende de la interacción de distintos factores de transcripción con secuencias del promotor y también del ensamblado de complejos conteniendo coactivadores.

En la secuencia promotora del gen de CD1 se encuentran elementos  $\kappa$ B; no así, elementos respondedores a estrógenos (ERE, Fig. 10). Por ello se evaluó si la acción de los estímulos antes descritos afectaba la expresión de esta proteína tras 24 ó 48 hs de estímulo, para ello se realizaron extractos proteicos totales que fueron analizados mediante ensayo de *Western blot* y revelados con anticuerpos contra CD1.

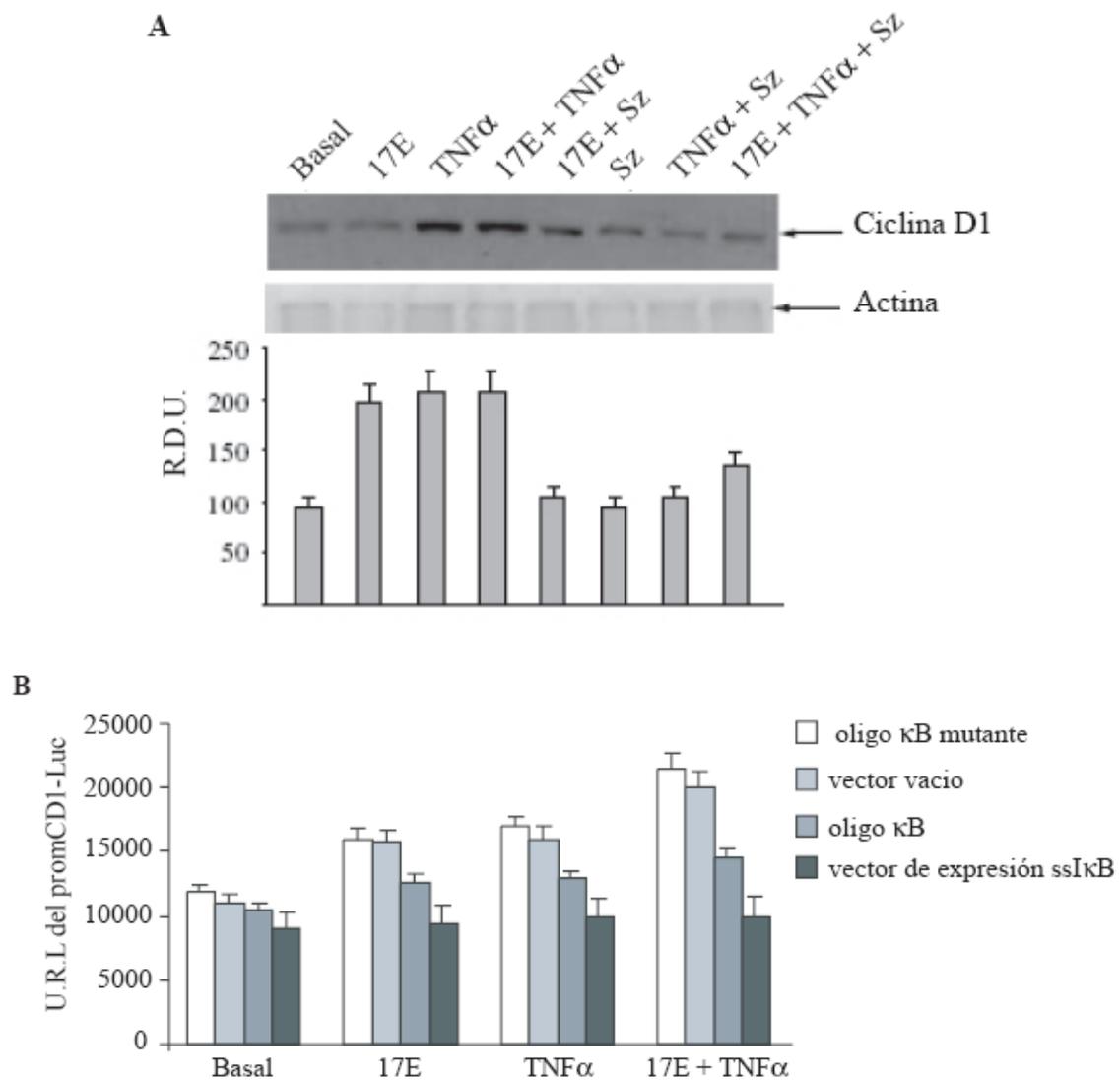
Como se observa en la figura 27 A, los niveles de CD1 se incrementaron significativamente luego del tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$ , 17E o ambos simultáneamente, mientras que el tratamiento con Sz (200  $\mu\text{M}$ ) inhibe dicha expresión, en correlación con lo observado en proliferación. Estos resultados indican que la respuesta proliferativa mediada por  $\text{TNF}\alpha$ , en células ER (+), y aún en ausencia de  $\text{E}_2$ ; se podría deber, al menos parcialmente, al aumento en la expresión de CD1.

De acuerdo a lo observado tanto en la respuesta proliferativa, como en la progresión del ciclo celular y por análisis de la expresión de un marcador de ciclo celular, como es CD1 se corrobora que estos se ven afectados de manera similar por inhibición de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , indicando que este factor de transcripción es necesario para la expresión de CD1, lo cual correlaciona con su rol en la respuesta proliferativa y este efecto va más allá de la presencia del ER activado.

Con el fin de confirmar el requerimiento de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  sobre el control de la expresión de CD1 tanto bajo el estímulo de  $\text{TNF}\alpha$  como cuando el estímulo es 17E, se realizaron ensayos de actividad reportera. Para ello, células T47-D fueron transfectadas con un vector de expresión para la enzima Luciferasa bajo el control de un fragmento del promotor de CD1 (ver Materiales y Métodos) que contiene las secuencias regulatorias descritas previamente (Guttridge, DC *et al.* 1999; Hinz, M *et al.* 1999). Como se puede observar en la figura 27 B, el tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$ , 17E o el estímulo simultáneo aumenta la actividad del promotor de ciclina D1, de manera similar a lo observado en los niveles de proteína. Estos resultados demostraron que la acción de estos estímulos es a nivel transcripcional, en el promotor del gen de CD1.

Cuando se realizaron experimentos de inhibición de la actividad de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , utilizando dos modelos experimentales específicos como son la titulación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  con oligonucleótidos conteniendo la secuencia  $\kappa\text{B}$ , o por transfección con un vector de

expresión para el súper represor I $\kappa$ B (ssI $\kappa$ B) (Werbajh, S *et al.* 2000), se pudo observar que la inhibición de NF- $\kappa$ B reprime la actividad del promotor (figura 27 B), confirmando nuevamente que la actividad de este factor de transcripción es necesaria para la expresión del gen de CD1.



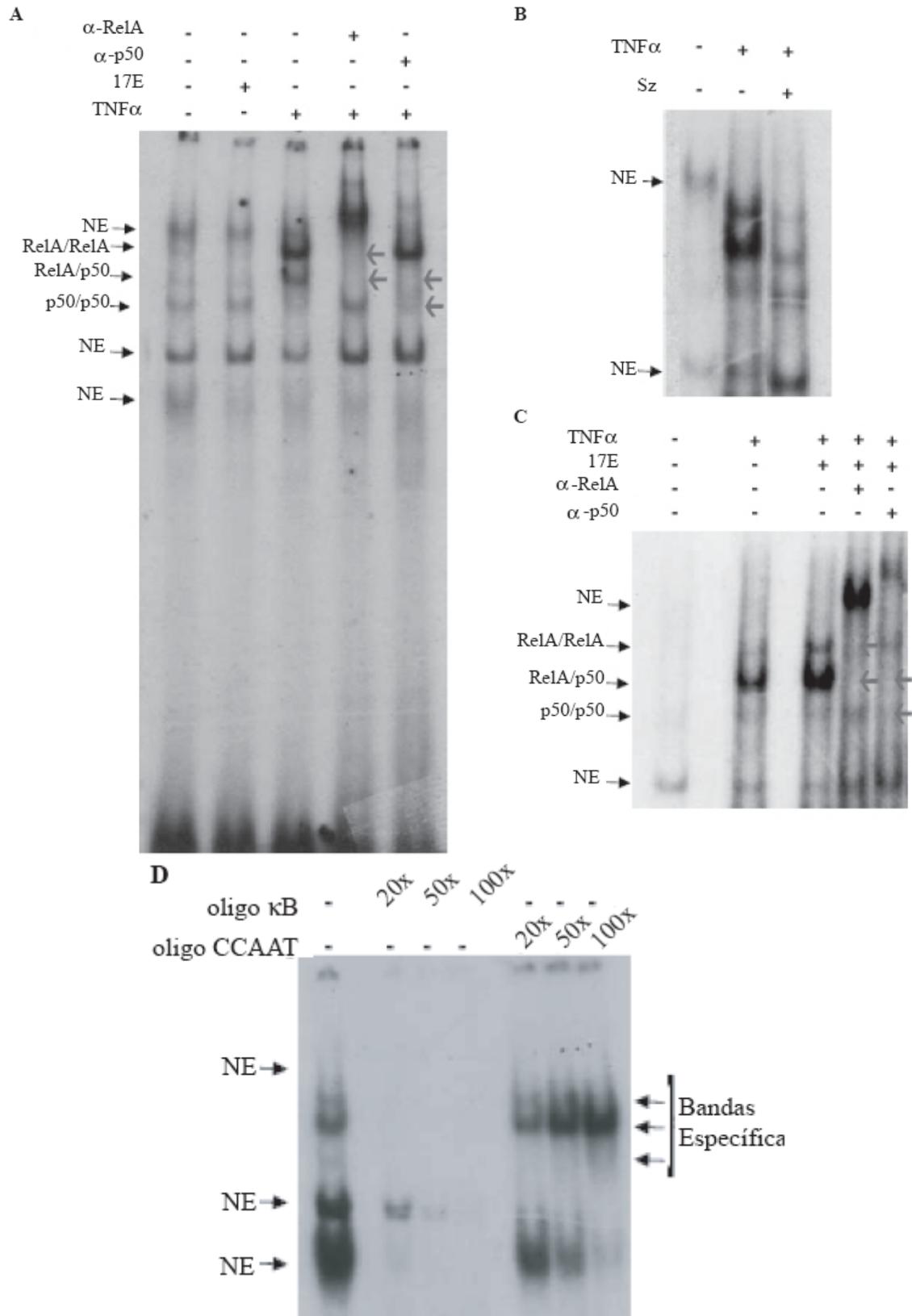
**Figura 27 Efecto de estrógenos, TNF $\alpha$  e inhibidores de la actividad de NF- $\kappa$ B sobre la expresión de Ciclina D1:** La regulación de la expresión de CD1 fue evaluada tanto a nivel de proteína **A** mediante ensayos de *Western blot* realizados a partir de extractos proteicos totales de células T47-D luego de 24 hs de tratamiento con 17E (100 nM), TNF $\alpha$  (10 ng/ml), Sz (200  $\mu$ M) y los tratamientos combinados. El diagrama de barras corresponde al promedio de unidades densitométricas relativas con respecto a la expresión de actina de cinco experimentos independientes. Mientras que en **B** se utilizó un modelo de transfección reportera donde se evaluó la actividad de una construcción conteniendo parte del promotor de CD1 río arriba del gen que expresa la enzima Luciferasa; las células fueron tratadas por 24 hs con TNF $\alpha$ , 17E o ambos. Las barras representan el promedio de triplicados  $\pm$  d.s. de las unidades relativas de luminiscencia normalizada a los valores correspondientes de  $\beta$ -galactosidasa.

### **I.6- El efecto del 17E no antagoniza la activación de NF- $\kappa$ B.**

Previamente, se ha demostrado que los estrógenos inhiben la activación de NF- $\kappa$ B (Hsu, SM *et al.* 2000; Evans, MJ *et al.* 2001); sin embargo, los resultados mostrados hasta ahora indican que tanto 17E como TNF $\alpha$  estimularían una respuesta similar, aumentando la proliferación celular y la expresión de CD1. Más aún, la acción de los estrógenos dependería de la actividad de NF- $\kappa$ B, entre otras, dado que la simple inhibición de este factor de transcripción reprime el estímulo mediado por 17E.

Para demostrar que, al menos en el modelo planteado, el 17E no antagoniza con la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  se realizaron ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA). Como muestra la figura 28 A, en la línea tumoral de mama humana, TNF $\alpha$  activa la localización nuclear de varios complejos conteniendo miembros de la familia de NF- $\kappa$ B (figura 28 A, calle 3). Para determinar la identidad de cada complejo se utilizaron anticuerpos específicos para los dos miembros ubicuos de la familia, RelA (p65) y p50 (figura 28 A, calles 4 y 5). Cuando las células fueron tratadas con el inhibidor Sz la formación de estos complejos se vio significativamente inhibida (Figura 28 B).

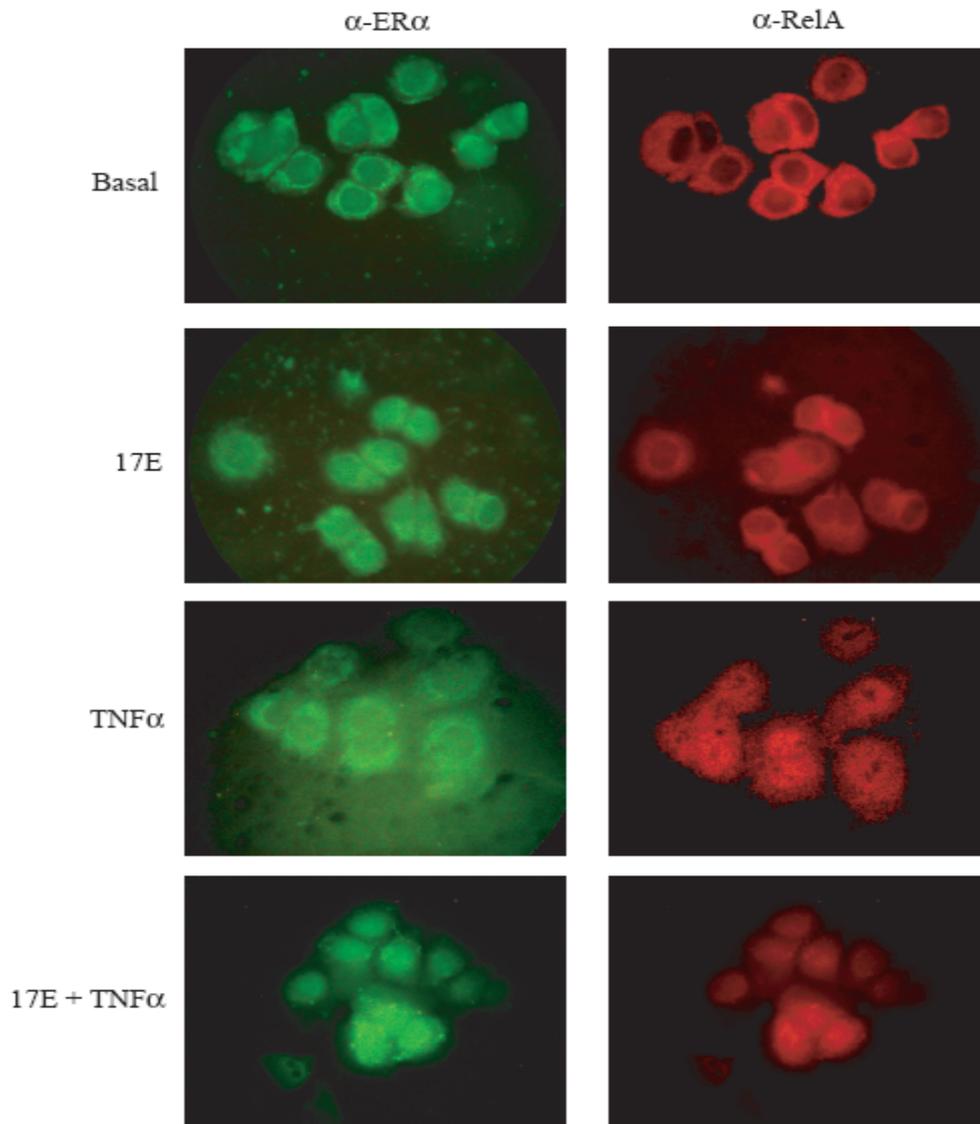
El tratamiento simultáneo de 17E más TNF $\alpha$  no inhibe la unión de NF- $\kappa$ B a sus oligonucleótidos específicos cuando se compara con el tratamiento con TNF $\alpha$  únicamente (Figura 28 C comparar calle 3 *versus* calle 2), indicando que la actividad de ER no antagoniza con la activación de NF- $\kappa$ B. Además, los complejos formados son similares a los obtenidos con TNF $\alpha$  como se puede observar en la figura 28 C (calles 3-5). La especificidad de la unión se determinó por competición con el oligonucleótido  $\kappa$ B sin marcar o con el oligonucleótido no relacionado CCAAT, tal como se describe en Materiales y Métodos (Figura 28 D).



**Figura 28 Efecto de estrógenos sobre la unión de NF- $\kappa$ B a sus sitios específicos en el ADN:** Extractos de proteínas nucleares obtenidas de células T47-D tratadas por 45 minutos con **A** TNF $\alpha$  (10 ng/ml), **B** la citoquina más Sz (200  $\mu$ M) o **C** TNF $\alpha$  en combinación con 17E fueron incubados con oligonucleótidos

conteniendo los sitios de unión para NF- $\kappa$ B y sometidos al ensayo de EMSA. **D** La especificidad de unión se determinó por competición con el oligonucleótido específico sin marcar o con oligonucleótido no relacionada marcado (CCAAT). En todos los casos la identidad de los complejos unidos fue determinada por ensayos con anticuerpos contra las subunidades RelA y p50, indicados por las flechas a la izquierda. Las flechas a la derecha indican el corrimiento de banda.

Estos resultados fueron corroborados mediante la técnica de inmunofluorescencia en donde se evaluó la localización subcelular tanto de ER $\alpha$  como de NF- $\kappa$ B tras el estímulo con las dosis indicadas de 17E, TNF $\alpha$  o el tratamiento simultáneo. Como se observa en la figura 29, como era de esperar los tratamientos con 17E o con TNF $\alpha$  producen la translocación al núcleo del ER $\alpha$  y de NF- $\kappa$ B, respectivamente; mientras que el estímulo con ambos no altera la importación de estos factores de transcripción al núcleo.



**Figura 29 Efecto de 17E sobre la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo:** Células T47-D fueron estimuladas durante 45 minutos con 17E (100 nM), TNF $\alpha$  (10 ng/ml) o el tratamiento simultáneo, tras lo cual las células fueron fijadas y se las incubó con anticuerpos contra ER $\alpha$  y la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B. y luego se incubó con los anticuerpos secundarios anti-ratón acoplado a Fitc o anti-conejo acoplado a Rodamina, respectivamente.

### **I.7- El ER, NF- $\kappa$ B y RAC3 son parte de un mismo complejo proteico.**

Se ha demostrado previamente que el promotor del gen de ciclina D1 carece de elementos de unión para el ER activado (ERE) (Castro-Rivera, E *et al.* 2001), y el mecanismo que fue descrito en la Introducción parece depender de su capacidad de interactuar con otros factores de transcripción, como es el caso de AP1, y mediante esta asociación los estrógenos estarían ejerciendo, indirectamente, su acción sobre la activación de la expresión de CD1.

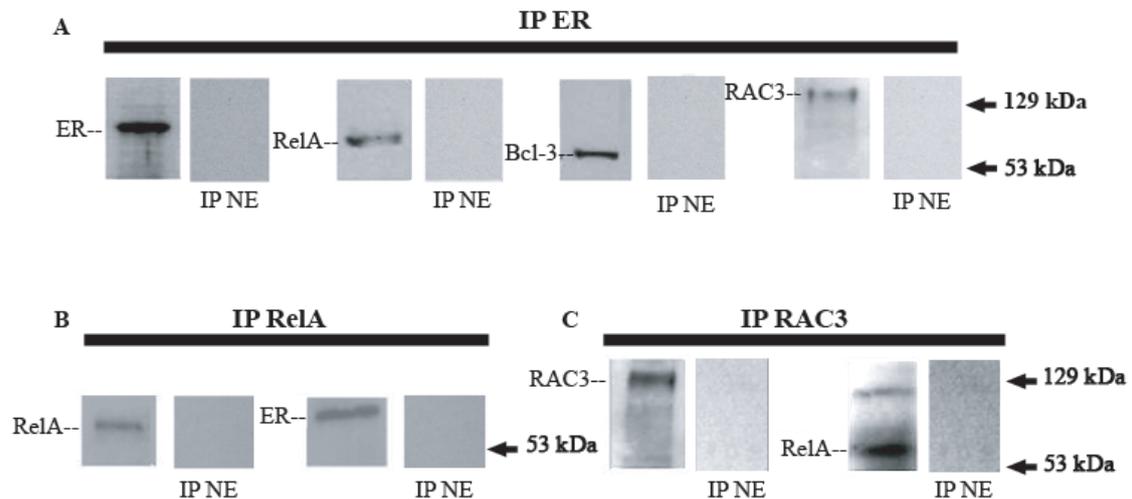
Por otro lado, existen varios trabajos en donde se demuestra que NF- $\kappa$ B y ER $\alpha$  tendrían funciones antagónicas, tal como se describe en la Introducción. Sin embargo, los resultados mostrados hasta ahora indicarían que este antagonismo entre la vía de los estrógenos y la vía de TNF $\alpha$  no estaría sucediendo, al menos en el modelo utilizado; sino, más bien, un efecto cooperativo en la inducción de la expresión de CD1 y la respuesta proliferativa. Dado que es sabido que RAC3 interactúa con ER y nuestro grupo ha demostrado que este coactivador también interactúa con NF- $\kappa$ B (Werbajh, S *et al.* 2000), se estudió si era posible la formación de complejos conteniendo a estas tres moléculas.

A partir de extractos proteicos de células T47-D estimuladas con TNF $\alpha$  y 17E, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y luego las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por *Western blot*. Como se muestra en la figura 30 A la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B fue detectada en los inmunoprecipitados obtenidos cuando se utilizó un anticuerpo específico para el ER $\alpha$  y esta proteína fue detectada en los *Western blot* realizados a partir de muestras de inmunoprecipitados usando el anticuerpo contra RelA (Figura 30 B).

Estos resultados indicarían la posibilidad de que miembros de la familia de NF- $\kappa$ B y el ER $\alpha$  estén formando parte de un mismo complejo. Cuando se analizó en ambos

inmunoprecipitados la presencia de un coactivador común a ambos factores de transcripción como es RAC3, se observó que este era capaz de inmunoprecipitar con ambas proteínas de manera similar (Figura 30 A y B). Cuando se realizó el ensayo inverso, es decir, se inmunoprecipitó RAC3 y las membranas fueron revelados con anticuerpos para ER $\alpha$  y RelA, estas moléculas fueron detectadas (Figura 30 C).

Un miembro particular de la familia de I $\kappa$ B, la proteína Bcl-3, ha sido caracterizado por tener una función distinta a la descrita para los otros miembros, dado que cuando forma complejo con p52 puede actuar como transactivador funcionando como un coactivador; entre los genes que es capaz de modular se encuentra CD1 (Planas-Silva, MD *et al.* 2001). Además Bcl-3 se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama y esto correlaciona con tumores que no responden al tratamiento con antiestrógenos (Westerheide, SD *et al.* 2001). De acuerdo con estas evidencias, se investigó también, si RAC3 podía formar parte de complejos conteniendo otros miembros de la familia NF- $\kappa$ B diferentes de RelA y que podrían relacionarse a la vía no canónica de activación del factor. Para ello, se realizaron otros ensayos de inmunoprecipitación y como se puede observar en la figura 30 A existiría una asociación entre Bcl-3 y el ER $\alpha$ .



**Figura 30 El Receptor de estrógenos activado es capaz de interactuar con miembros de la familia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B:** Extractos celulares de T47-D estimuladas con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) más 17E (100 nM) por 45 min, fueron inmunoprecipitadas (IP) y analizadas mediante *Western blot*. **A** *Western blot* de ER $\alpha$ , RelA, y RAC3 a partir de IP-ER $\alpha$ . **B** *Western blot* de RelA y ER $\alpha$  a partir de IP-RelA y **C** *Western blot* de RAC3 y RelA a partir de IP-RAC3.

Estos resultados demuestran que diferentes complejos ER/coactivador/miembros de la familia NF- $\kappa$ B podrían estar regulando los niveles de expresión de CD1 y en

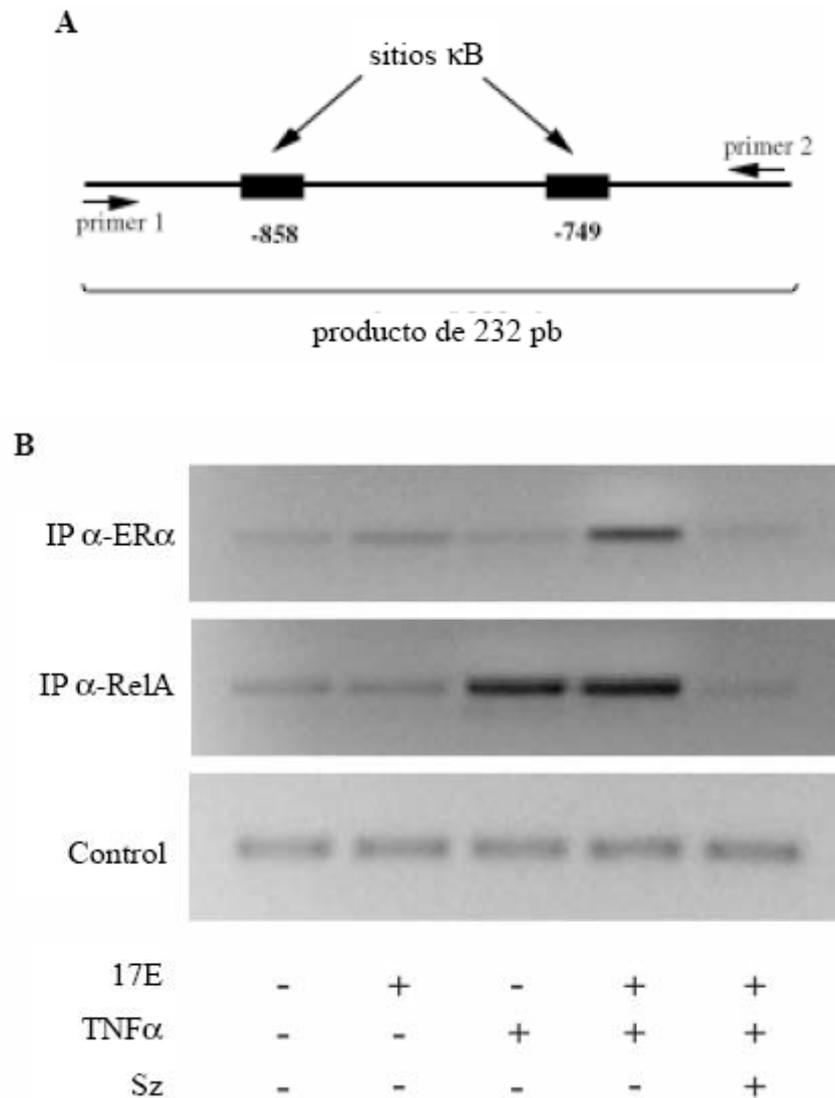
consecuencia la proliferación celular, en un contexto donde los niveles de coactivador se encuentran elevados con respecto a los detectados en células normales.

### **I.8- El Receptor de estrógenos controla la expresión del gen de ciclina D1 a través de secuencias $\kappa$ B en su promotor.**

Aunque no se han descrito sitios ERE en el promotor de CD1, dos sitios  $\kappa$ B han sido descritos en esta región (Hinz, M *et al.* 1999). Para determinar si el complejo proteico conteniendo al ER $\alpha$  activado podría estar controlando la expresión del gen de CD1 a través de los elementos  $\kappa$ B del promotor, se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (ver Materiales y Métodos).

Los complejos ADN-proteína obtenidos a partir de células T47-D, estimuladas con 17E, TNF $\alpha$  o ambos estímulos, en presencia o no de Sz; fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos contra ER $\alpha$ , donde los fragmentos de DNA inmunoprecipitados fueron amplificados utilizando *primers* específicos para la región del promotor del gen de ciclina D1 que contiene las secuencias  $\kappa$ B (figura 31 A). En la figura 31 B se puede observar que ante el estímulo con 17E se ve un aumento en la unión del ER activado a este fragmento de ADN respecto a las condiciones basales. Por otro lado, la unión del ER activado se intensifica aún más ante el estímulo simultáneo con TNF $\alpha$ , mientras que el tratamiento con Sz resulta en la inhibición total de la unión del ER activado a estas secuencias  $\kappa$ B, detectándose niveles similares a las condiciones basales.

Como control positivo de la unión de complejos a secuencias  $\kappa$ B, se realizaron además ensayos de inmunoprecipitación de RelA. En la figura 31 B se muestra que solo se observa un aumento en la unión de RelA cuando NF- $\kappa$ B ha sido activado por TNF $\alpha$  y que el tratamiento con 17E no afecta esta unión. El agregado de Sz inhibe la unión de RelA llevando los valores a niveles basales levemente menores que los detectados en condiciones basales.



**Figura 31 El Receptor de estrógenos activado interacciona con los elementos  $\kappa$ B del promotor de ciclina D1:** En el esquema **A** se muestra la sección del promotor de ciclina D1 que contiene los sitios distales  $\kappa$ B a ser amplificados por la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). **B** Las bandas corresponden al fragmento del promotor de ciclina D1 mostrado en **A** obtenidos luego de que células T47-D fueron sometidas a los distintos tratamientos y los complejos proteína/ADN fueron inmunoprecipitados con anticuerpos contra ER $\alpha$  o contra la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B. El control representa el control de carga en ausencia de anticuerpo.

Estos resultados demuestran claramente que ER se une a secuencias  $\kappa$ B en el promotor de CD1 ante el estímulo de estrógenos y que el aumento de la presencia de NF- $\kappa$ B en estos sitios incrementa aún más su unión. Dado que en ausencia de estímulo con TNF $\alpha$  también pueda detectarse la presencia de ER activado en estos sitios, esto podría deberse a la presencia de niveles basales de RelA unido a estos sitios y que son detectados tal como se muestra en la figura (calle 2).

Estos resultados demuestran que la citoquina TNF $\alpha$  contribuye a la proliferación dependiente de estrógenos mediante la activación de NF- $\kappa$ B y que un complejo conteniendo ambos factores de transcripción junto con el coactivador RAC3 podría inducir la expresión de CD1, vía la unión de complejos NF- $\kappa$ B/ER/RAC3 a sitios  $\kappa$ B en el promotor de CD1.

## II- ROL DE CICLINA D1 COMO MODULADOR TRANSCRIPCIONAL

### II.1- El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es capaz de interactuar físicamente con Ciclina D1.

Ciclina D1 (CD1) es el principal regulador de la transición entre las fases  $G_1$  a la S durante el ciclo celular. Por ello entender los mecanismos que regulan su expresión es determinante en el estudio de la proliferación y el desarrollo tumoral. En la sección anterior se han presentado resultados que demuestran que el ER activado utiliza los elementos  $\kappa$ B del promotor de CD1 para aumentar su expresión, para ello requiere de la actividad de NF- $\kappa$ B y la presencia del coactivador RAC3, el cual se encuentra sobreexpresado en diversos tumores, como se describió en la Introducción. Más aún, la propia CD1 se encuentra sobreexpresada en distintos tumores.

En trabajos recientes, se ha visto que CD1 es capaz de actuar como regulador transcripcional de receptores nucleares, tal es el caso del ER $\alpha$ , AR, TR, PPAR $\gamma$ , actuando como coactivador o como correpresor y formando complejos donde se reclutan otras actividades enzimáticas.

Entonces, dado que NF- $\kappa$ B interactúa con los mismos coactivadores que interactúan con los receptores nucleares, entre ellos RAC3, y siendo CD1 un blanco de este factor de transcripción, se quiso determinar si existen complejos similares conteniendo a NF- $\kappa$ B. Para ello, células T47-D fueron estimuladas con el éster de forbol 12-0-tetraecanoilforbol-13-acetato (PMA), un inductor de la vía de activación de NF- $\kappa$ B y se realizaron experimentos de inmunoprecipitación. Previamente, se determinó el grado de activación de NF- $\kappa$ B tras el estímulo con PMA mediante curvas dosis-respuesta (5, 10 y 100 ng/ml), observándose que la dosis efectiva era la de 10 ng/ml. Los extractos proteicos fueron inmunoprecipitados y analizados por Western blot utilizando anticuerpos específicos para la subunidad RelA, CD1 y para la quinasa dependiente de ciclina 4 (Cdk4).

Como se muestra en la figura 32 A la subunidad RelA fue detectada en los inmunoprecipitados realizados con el anticuerpo contra CD1, mientras que esta proteína fue revelada en los inmunoprecipitados realizados con anticuerpo para RelA, indicando

que este miembro de la familia de NF- $\kappa$ B y CD1 pueden ser parte de un mismo complejo proteico.

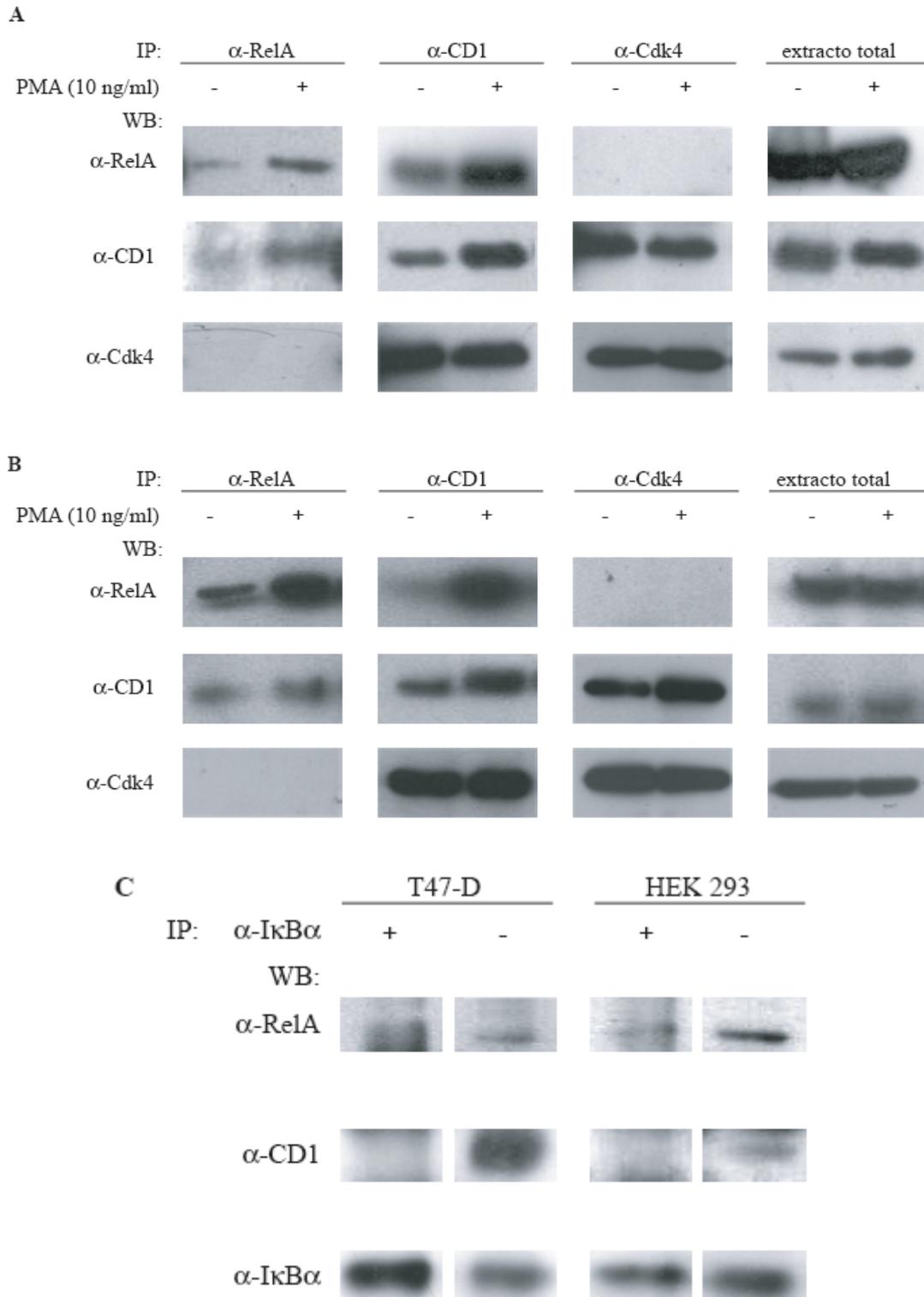
Dado que la línea T47-D ha sido caracterizada por poseer niveles elevados de CD1 comparables a los observados en algunos tumores, se analizó si esta interacción también ocurría en una línea celular que posee niveles normales de CD1 como es la línea embrionaria de riñón humana, HEK 293. Como se observa en la figura 32 B, los resultados fueron similares a los obtenidos en la línea tumoral.

En ambas líneas celulares se observaron bajos niveles de RelA interaccionando con CD1 aún en condiciones basales, en ausencia de estímulo para la activación de NF- $\kappa$ B. Si bien las células contienen niveles basales de NF- $\kappa$ B activo, con el objeto de determinar si esta interacción podía corresponder a la asociación de CD1 con NF- $\kappa$ B inactivo, se realizaron ensayos de *Western blot* para determinar la presencia de I $\kappa$ B en los complejos conteniendo CD1 y RelA en ausencia de estímulo utilizando anticuerpos anti-I $\kappa$ B e inmunoprecipitados de CD1 y esta proteína no fue detectada (no mostrado). En otros experimentos se realizaron inmunoprecipitados de I $\kappa$ B (Figura 32 C) a partir de extractos proteicos de células no estimuladas. Como se puede observar en la figura 32 C, cuando los inmunoprecipitados analizados por *Western blot* fueron incubados con anticuerpo para RelA se comprueba la interacción ya descrita entre ambas proteínas; sin embargo cuando la membrana fue incubada con anticuerpo para CD1 no se pudo observar interacción en ninguna de las dos líneas celulares.

De acuerdo con estos resultados, puede concluirse que CD1 se asocia con la forma activa de NF-  $\kappa$ B.

En los trabajos reportados hasta el momento, todos ellos demuestran que este rol de CD1 como corregulador transcripcional sería independiente de su interacción con su quinasa asociada o sea de Cdk4 (Zwijnsen, RM *et al.* 1997) para evaluar si esta proteína forma parte del complejo se realizaron inmunoprecipitados con un anticuerpo contra esta quinasa y como era de esperar esta proteína es detectada en los *Western blot* revelados contra CD1 pero no contra RelA.

Estos resultados estarían indicando que NF- $\kappa$ B y CD1 formarían parte de un mismo complejo, que este sería independiente de la presencia de Cdk4 y esta interacción no dependería de la sobreexpresión de CD1.



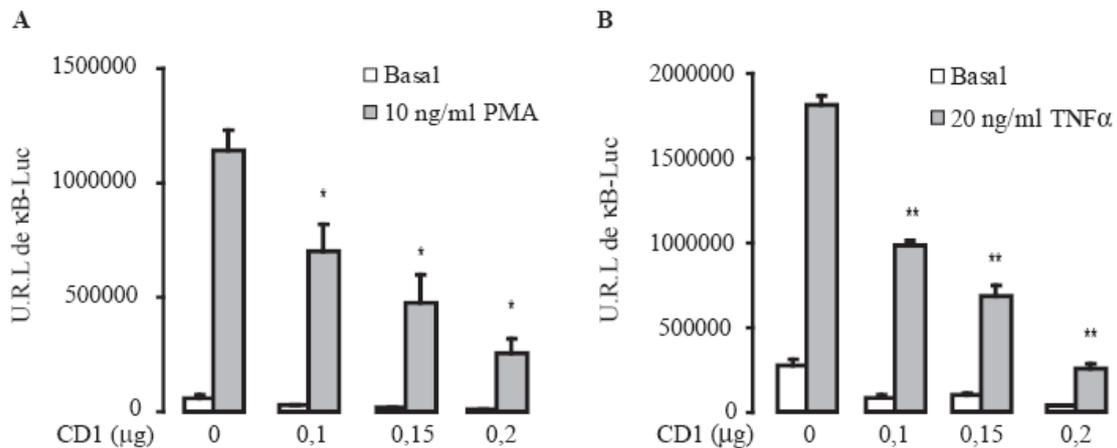
**Figura 32 Asociación física entre las proteínas Ciclina D1 y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B:** Extractos proteicos de células **A** T47-D o **B** HEK 293 que habían sido tratadas por 45 minutos con PMA (10 ng/ml) fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos contra CD1, RelA y Cdk4 y los inmunoprecipitados resultantes fueron analizados por ensayos de *Western blot* con cada uno de los anticuerpos utilizados. **C** Células basales T47-D o HEK 293 fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo I $\kappa$ B $\alpha$  y las muestras fueron analizadas por *Western blot* con anticuerpos para CD1, RelA o I $\kappa$ B $\alpha$ .

## II.2- Ciclina D1 regula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B.

Ciclina D1 es capaz de formar asociaciones con gran cantidad de proteínas muchas de ellas relacionadas con la diferenciación celular como es el caso de PPAR $\gamma$ , DMP1, MyoD entre otras. Estas asociaciones parecen reprimir la capacidad de distintos tipos celulares en su diferenciación final. Por otro lado, CD1 es capaz de interactuar con el ER $\alpha$  y aumentar su actividad transcripcional gracias al reclutamiento de coactivadores de la familia SRC que favorece el remodelamiento de la cromatina.

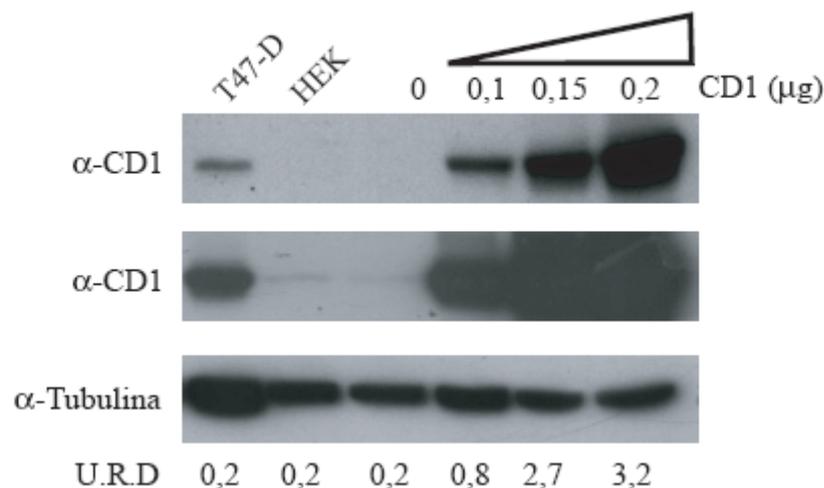
En base a los resultados obtenidos, en donde se vió que CD1 y un miembro de la familia NF- $\kappa$ B formaban parte de un mismo complejo, se analizó si esta interacción tenía algún efecto sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Para ello células de la línea HEK 293 fueron cotransfectadas de manera transitoria con un vector reportero conteniendo sitios consenso de unión  $\kappa$ B en presencia o ausencia de distintas masas (0,1; 0,15 ó 0,2  $\mu$ g) de un plásmido expresando CD1 o un control con vector vacío. Seguida la transfección, las células fueron estimuladas por 6 hs con una dosis de 10 ng/ml de PMA, transcurridas las cuales se evaluó la actividad de la enzima luciferasa.

En la figura 33 A se observa que la actividad del factor de transcripción se vió inhibida de manera dosis-respuesta en la medida que la masa del plásmido expresando para CD1 se incrementa (40% de represión con respecto a la condición control cuando la masa del vector fue de 0,1  $\mu$ g). El mismo efecto fue obtenido cuando se utilizó la citoquina pro-inflamatoria TNF $\alpha$  que es un activador mucho más potente y específico de la vía de NF- $\kappa$ B (Figura 33 B, 45% de represión, comparar columna 2 y 4).



**Figura 33 Ciclina D1 regula la actividad del factor de transcripción de manera dependiente de su cantidad:** En células HEK 293 transfectadas con distintas cantidades del vector que expresa para Ciclina D1, se midió la actividad transcripcional del factor NF-κB mediante la utilización del vector reportero que contiene las secuencias de unión κB río arriba del gen de luciferasa. Las células fueron tratadas con **A** PMA (10 ng/ml) o **B** TNFα (20 ng/ml). Las barras representan el promedio de triplicados ± d.s. de las unidades relativas de luminiscencia normalizada a los valores correspondientes de β-galactosidasa. \*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,001$  corresponde al tratamiento con PMA o TNFα de las células con niveles aumentados de CD1 con respecto a la condición sin sobreexpresión de CD1 (Test de Tukey).

Para corroborar que realmente las distintas masas de plásmido correlacionan con un aumento creciente en la cantidad de proteína se realizaron extractos proteicos de las células transfectadas y se analizó la presencia de CD1 por *Western blot* (Figura 34).



**Figura 34 Niveles de expresión del vector que expresa el gen de ciclina D1:** Extractos proteicos de células T47-D, HEK 293 salvajes o transfectadas con masas crecientes del vector de expresión para CD1 fueron analizados por *Western blot* con un anticuerpo contra Ciclina D1. Únicamente cuando las placas de rayos X fueron sobreexpuestas se detectó CD1 en las células HEK 293 salvajes o que se encuentran

transfectadas con el vector vacío. Las unidades densitométricas relativas corresponden al promedio de las URD de placas sobreexpuestas con respecto a la expresión de tubulina de 5 experimentos independientes.

Por lo tanto, CD1 sería capaz de reprimir la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B y este efecto sería dependiente de los niveles de expresión de CD1.

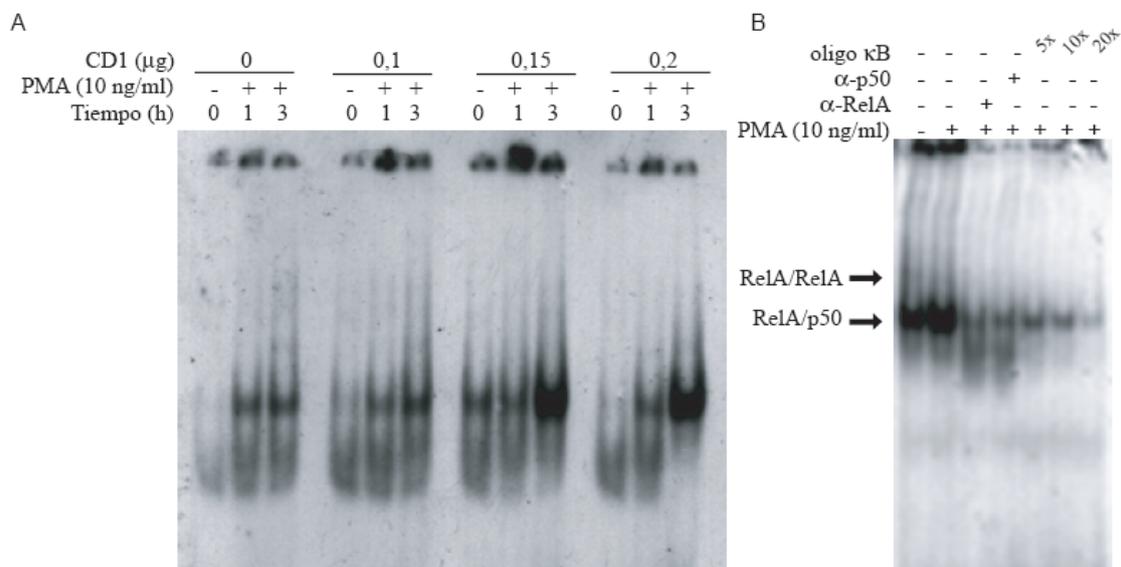
### **II.3- Ciclina D1 no afecta la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B ni la unión a sus secuencias blanco en el ADN.**

Los dímeros de NF- $\kappa$ B, en condiciones de reposo, se encuentran secuestrados en el citoplasma como complejos latentes debido a su interacción con los miembros de la familia I $\kappa$ B, los cuales bloquean las secuencias de translocación al núcleo (Ghosh, S *et al.* 2002). Debido a que se ha demostrado que el efecto inhibitorio que tiene CD1 sobre el factor de transcripción STAT3 (Bienvenu, F *et al.* 2001) se debe en parte a su capacidad de bloquear su translocación al núcleo, se ensayó si CD1 es capaz de inhibir la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y su habilidad de unirse a sus secuencias en el ADN.

Para evaluar los niveles de NF- $\kappa$ B activo presente en el núcleo se realizaron ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA), en estos ensayos células HEK 293 fueron transfectadas con distintas masas de un plásmido de expresión para CD1 o su vector vacío y la activación de NF- $\kappa$ B fue inducida por estímulo con PMA (10 ng/ml) por 60 o 180 minutos. Como se observa en la figura 35 A, el incremento en los niveles de CD1 no cambia la capacidad del NF- $\kappa$ B activo que se encuentra en el núcleo de unirse a sus secuencias consenso (comparar las calles 2 con las calles 5, 8 y 11), indicando que la interacción entre CD1 y NF- $\kappa$ B no afectaría la unión de este factor de transcripción al ADN.

Para determinar cuales de los miembros de la familia NF- $\kappa$ B estarían formando parte de estos complejos, los extractos de proteínas nucleares se incubaron con anticuerpos para los dos miembros ubicuos de esta familia, como es el caso de RelA y p50. En la figura 35 B se identificó la presencia de complejos ADN/proteína conteniendo el heterodímero RelA/p50 y el homodímero p50/p50 (comparar la calle 2

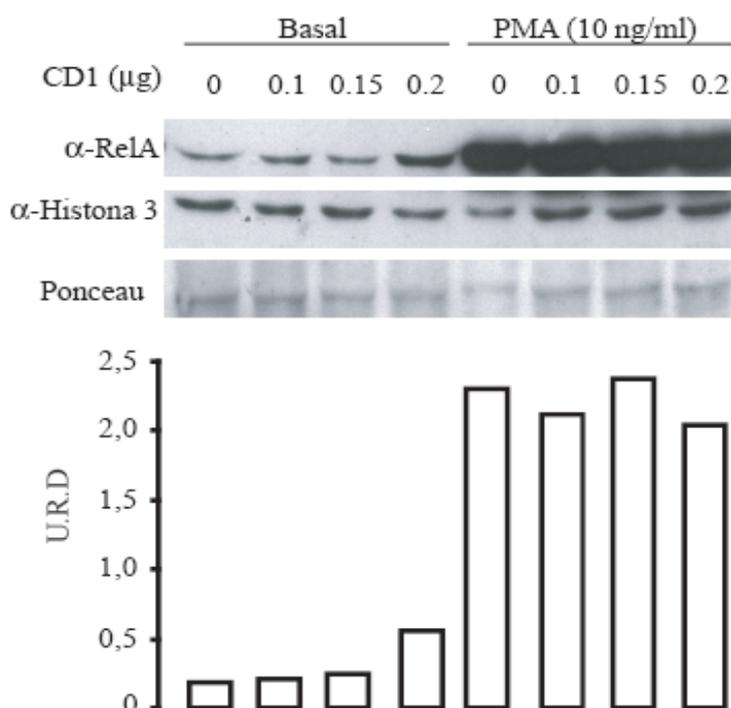
con las calles 3 y 4). Con el fin de determinar la especificidad de los complejos unidos se realizaron ensayos de competición en donde se utilizaron cantidades crecientes del oligonucleótido  $\kappa$ B sin marcar (Figura 35 B comparar la calle 2 con las calles 5, 6 y 7).



**Figura 35 Efecto de Ciclina D1 sobre la unión al ADN de NF- $\kappa$ B:** **A** Células HEK 293 transfectadas con diferentes masas del vector codificando para CD1 o el control con vector vacío, seguidas las 24 h luego de la transfección las células fueron estimuladas por 60 o 180 minutos con PMA (10 ng/ml). Las proteínas nucleares fueron analizadas por EMSA utilizando un oligonucleótido doble cadena conteniendo los sitios de unión para NF- $\kappa$ B. **B** La especificidad de unión fue determinada por competición con el oligonucleótido  $\kappa$ B sin marcar, mientras que la identidad de los complejos formados fue determinada utilizando anticuerpos contra las subunidades RelA y p50 del factor de transcripción.

La ausencia de efecto sobre la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo fue también confirmada por *Western blot* a partir de extractos nucleares de cada una de las condiciones experimentales (Figura 36).

Como resultado de estos experimentos se observó que el efecto inhibitorio de CD1 sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B no afectaría su translocación al núcleo y la interacción de ambas no interferiría con la unión del factor de transcripción a sus secuencias consenso.



**Figura 36 La sobreexpresión de CD1 no altera los niveles de NF-κB en núcleo:** Las proteínas nucleares fueron analizadas por *Western blot* para detectar la cantidad de NF-κB disponible en núcleo en las condiciones de transfección descritas. Las membranas fueron analizadas con anticuerpos contra RelA y las unidades densitométricas relativas fueron obtenidas de comparar los valores obtenidos para las distintas condiciones con respecto a la presencia de Histona 3.

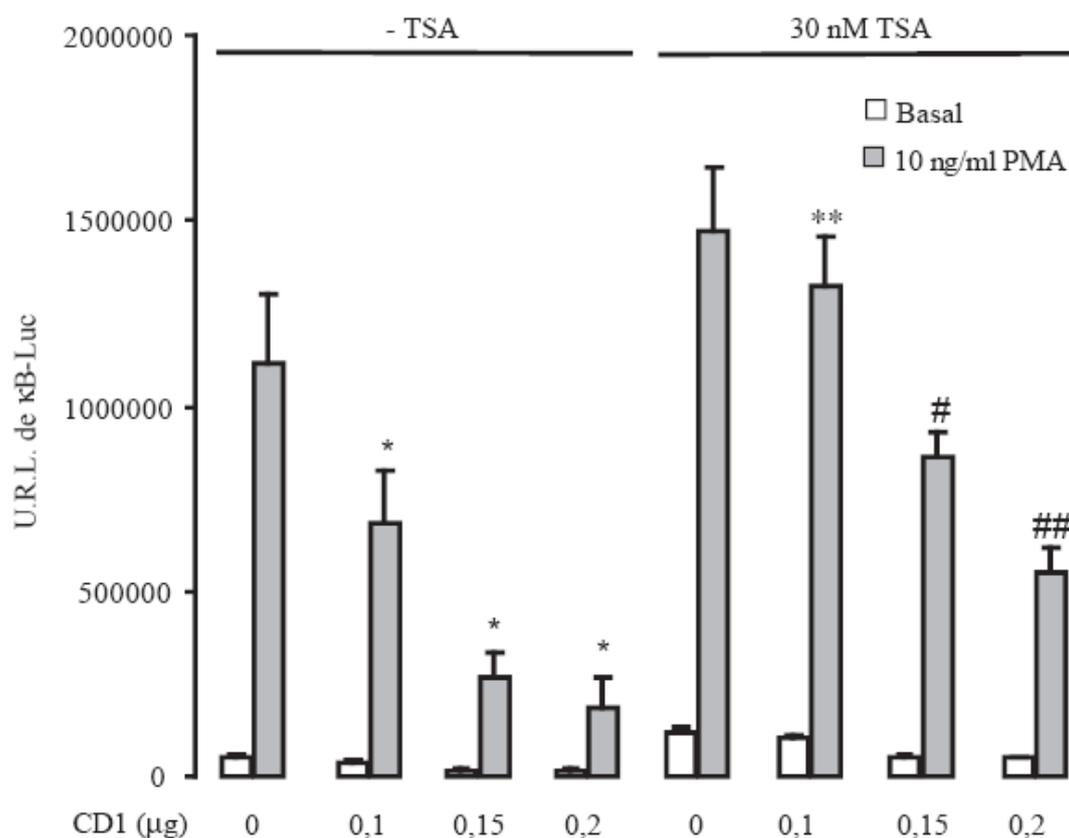
#### **II.4- La represión de la actividad de NF-κB por CD1 involucra la actividad de Histona Deacetiltransferasas (HDAC).**

En trabajos previos se describió que CD1 reprime la actividad del cointegrador p300 (Fu, M *et al.* 2005) o del receptor de hormonas tiroideas (TR) (Lin, HM *et al.* 2002) por reclutamiento de HDAC al contexto de la cromatina. Ha sido demostrado por nuestro grupo que la inhibición de la actividad de HDAC mediante la utilización de un inhibidor específico como es la Tricostatina A (TSA), favorece la activación de NF-κB e inhibe los mecanismos apoptóticos activados por la inducción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tesis doctoral de la Dra Georgina P. Colo 2007).

Para investigar si la represión ejercida por CD1 sobre la actividad de NF-κB podía involucrar la acción mediada por HDAC, se llevaron a cabo ensayos de actividad reportera similares a los realizados anteriormente pero en este caso, las células fueron

tratadas con el inhibidor TSA (30 nM) o con el vehículo DMSO (0,01 %) durante 30 minutos previos al estímulo con PMA.

Como muestra la figura 37, la transactivación de NF- $\kappa$ B inducida por PMA fue aproximadamente 22 veces mayor que la actividad basal. Esta activación se vió significativamente inhibida cuando los niveles de CD1 se aumentaron mediante la utilización de diferentes masas del vector de expresión para esta proteína. Esta inhibición fue de aproximadamente el 40 % y similar a la obtenida en la figura 33 A. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con TSA este efecto inhibitorio fue revertido, en células que expresan bajos niveles de CD1 (comparar columna 12 y 10), sugiriendo que el reclutamiento de HDAC estaría involucrado en la capacidad de CD1 de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B.



**Figura 37** La represión mediada por Ciclina D1 sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B involucraría la acción de Histona deacetilasas: Células HEK 293 fueron co-transfectadas con el vector reportero  $\kappa$ B-luciferasa en presencia o no de cantidades crecientes del vector que expresa el gen de Ciclina D1, 7 h después las células fueron estimuladas por 30 minutos con 30 nM de TSA o DMSO, tras este período se realizó el tratamiento con 10 ng/ml PMA por 6 h. Las barras representan el promedio de triplicados  $\pm$  d.s. de las unidades relativas de luminiscencia normalizada a los valores correspondientes de

$\beta$ -galactosidasa. \* $p < 0,001$  corresponde al tratamiento con PMA de las células con niveles aumentados de CD1 con respecto a la condición sin sobreexpresión de CD1. \*\*  $p < 0,001$ , #  $p < 0,001$  y ##  $p < 0,001$  corresponde al tratamiento con TSA + PMA con respecto a la misma condición sin TSA para 0,1, 0,15 y 0,2  $\mu\text{g}$  de CD1, respectivamente (Test de Tukey).

La ausencia de efecto de TSA cuando los niveles de CD1 se incrementaron podría indicar: por un lado, que la dosis de TSA no fue lo suficientemente alta como para inhibir a las HDAC o bien que existirían otros mecanismos por los cuales CD1 estaría reprimiendo la actividad de NF- $\kappa$ B.

### **II.5- La actividad de NF- $\kappa$ B es regulada por los niveles de CD1 y del coactivador RAC3 de manera antagónica.**

Como se describió en la primera sección de resultados, RAC3 es coactivador de NF- $\kappa$ B y además de poseer actividad Histona acetiltransferasa (HAT), es capaz de reclutar en el contexto del ADN otras moléculas con esta actividad como es el caso de p300/CBP. En vista de los datos obtenidos, que demuestran la participación de HDAC en la represión mediada por CD1, se quiso determinar si un aumento en la expresión de moléculas con actividad HAT, en este caso RAC3, era capaz de revertir el efecto de CD1 debido a un incremento de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Cabe agregar que tanto CD1 como RAC3 se encuentran sobreexpresados en distintos tipos tumorales pero sin embargo no existen trabajos en donde se haya estudiado el efecto que ejercen el uno sobre el otro cuando ambos se encuentran en niveles anormales.

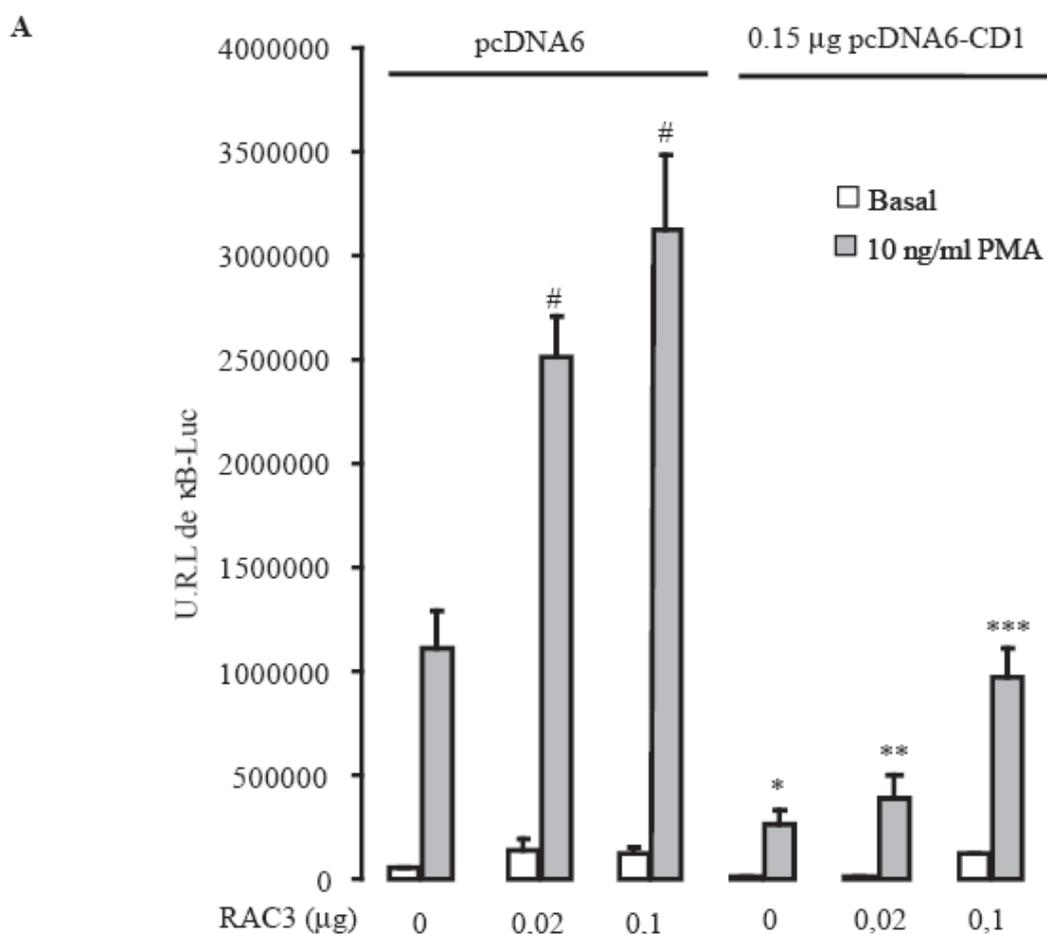
A tal fin se realizaron ensayos reporteros para analizar la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en dos modelos experimentales distintos. En uno de ellos, células HEK 293 fueron co-transfectadas con el vector reportero  $\kappa$ B-Luciferasa más cantidades crecientes de un plásmido de expresión del gen de RAC3 (0,02 y 0,1  $\mu\text{g}$ ) con o sin una masa constante del vector expresando para CD1 (0,15  $\mu\text{g}$ ). En el otro modelo se utilizó el protocolo inverso por lo tanto se co-transfectó con masas crecientes del plásmido para CD1 y se mantuvo la masa del vector para RAC3 constante (0,02  $\mu\text{g}$  o 0,1  $\mu\text{g}$ ).

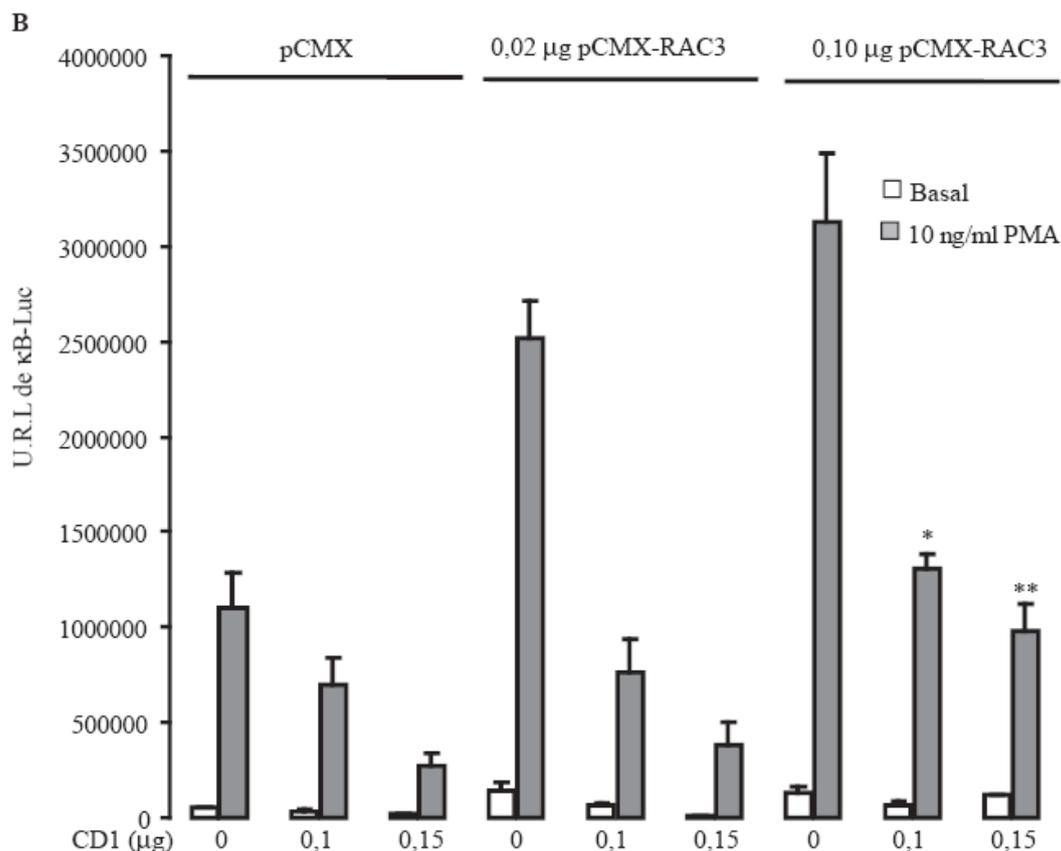
Como se observa en la figura 38 A, niveles crecientes de RAC3 producen un aumento en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B de manera dosis dependiente

(comparar la columna 2 con las columnas 4 y 6). Sin embargo, aunque niveles elevados de CD1 inhiben la acción de RAC3 (comparar columna 10 y columna 4), cuando se utilizaron cantidades mayores del vector de expresión de RAC3, la actividad de NF- $\kappa$ B bajo el estímulo de PMA revierte el efecto de CD1 a niveles similares a los observados en ausencia de los vectores de expresión para RAC3 o CD1 (comparar columnas 12 y 2).

En la figura 38 B se muestra que en presencia de niveles elevados de RAC3 la acción represiva de CD1 persiste, tanto cuando se utilizó una cantidad baja de vector de expresión de RAC3 (0,02  $\mu$ g) como cuando se incrementó la cantidad de plásmido (0,1  $\mu$ g).

Estos ensayos indicarían que la sobreexpresión de RAC3 disminuye la represión de CD1 sobre la actividad de NF- $\kappa$ B pero solo cuando se expresan bajos niveles de CD1.





**Figura 38 Efecto de la sobreexpresión de RAC3 sobre la represión mediada por Ciclina D1:** Células HEK 293 fueron co-transfectadas con el vector reportero  $\kappa$ B-luciferasa junto con **A** cantidades crecientes del vector de expresión para RAC3 en presencia o no del vector que expresa para CD1 (0,15  $\mu$ g). # $p < 0,001$  corresponde al tratamiento con PMA de las células con niveles aumentados de RAC3 con respecto a la condición sin sobreexpresión de RAC3. \*  $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,001$  y \*\*\*  $p < 0,001$  corresponde al tratamiento de células expresando CD1 (0,15  $\mu$ g) + PMA con respecto a la misma condición sin expresión de CD1 para 0, 0,02 y 0,1  $\mu$ g de RAC3, respectivamente (Test de Tukey) o **B** diferentes masas del vector que expresa CD1 en presencia del vector que expresa RAC3 en una masa fija de 0,02 ó 0,1  $\mu$ g \* $p < 0,001$  corresponde al tratamiento con PMA de las células con una masa 0,1  $\mu$ g RAC3 + 0,1  $\mu$ g CD1 con respecto a la condición 0,1  $\mu$ g CD1 y \*\* $p < 0,001$  corresponde al tratamiento de células expresando CD1 (0,15  $\mu$ g) + 0,1  $\mu$ g RAC3 con respecto a la misma condición sin RAC3 (Test de Tukey) Las barras representan el promedio de triplicados  $\pm$  d.s. de las unidades relativas de luminiscencia normalizada a los valores correspondientes de  $\beta$ -galactosidasa.

Los datos obtenidos muestran la dominancia de CD1 como correpresor sobre la actividad coactivadora de RAC3 y quizás para revertir este efecto serían necesarias otras moléculas coactivadoras que posean una actividad HAT más potente como es el caso de p300/CBP.

## **II.6- Ciclina D1 sería capaz de regular la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por unión a secuencias $\kappa$ B en el ADN.**

La presencia de CD1 se ha descrito por afectar la acetilación y metilación de histonas en promotores específicos (Hulit, J *et al.* 2004) y de esta manera estaría regulando la actividad de distintos factores de transcripción. Esta función de CD1 se debería a su capacidad de interaccionar y reclutar distintas proteínas en el contexto de la cromatina y así alterar su estructura ya sea para activar o reprimir la transcripción.

Dado los resultados obtenidos, en donde la inhibición de la actividad desacetilasa revierte parcialmente el efecto represor de CD1 sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B se evaluó la posibilidad que CD1 estuviese regulando tal actividad alterando la estructura de la cromatina facilitando, directa o indirectamente, la asociación de proteínas con actividad represora a los promotores de genes blanco de NF- $\kappa$ B. Con ese fin se utilizó un ensayo de ChIP para analizar la unión de la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B, del coactivador RAC3, de CD1 y de la Histona deacetilasa1 (HDAC1) a un fragmento de ADN del promotor de CD1 que contiene secuencias  $\kappa$ B (ver Figura 31 A).

En estos experimentos se utilizaron las líneas celulares T47-D y HEK 293, con el fin de comparar los patrones de reclutamiento de proteínas en células con altos y bajos niveles de RAC3 y CD1, respectivamente. Para la estimulación de la actividad de NF- $\kappa$ B se utilizó PMA (10 ng/ml), las células fueron fijadas y su ADN fragmentado (como se describió en Materiales y Métodos) a distintos tiempos post-estímulo (0, 15, 30, 60 y 180 minutos).

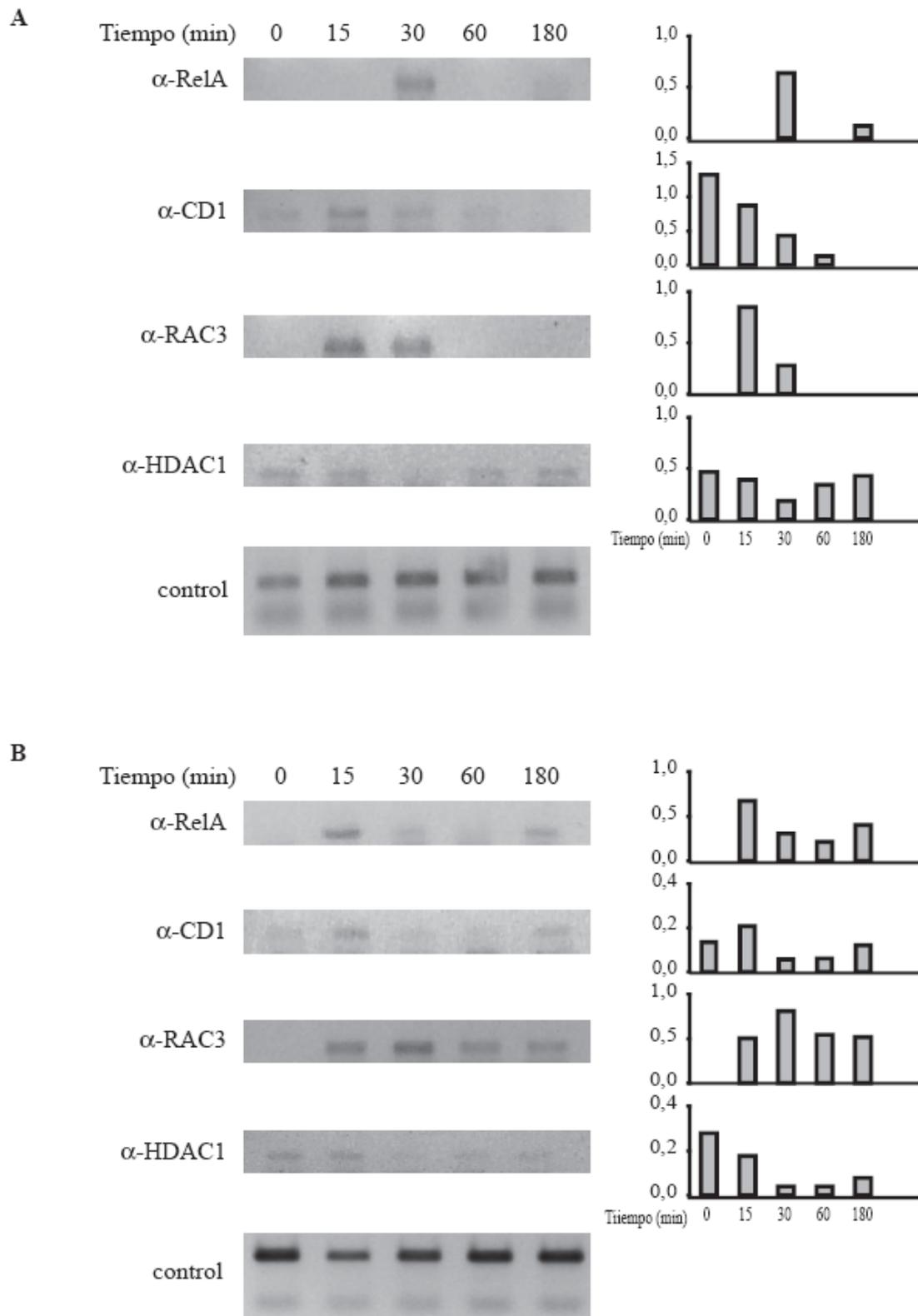
Como se observa en la Figura 39 A y B, el reclutamiento de RelA ocurre a los 15 y 30 minutos post-estímulo, respectivamente y disminuye luego de 60 minutos de estimulación en ambas líneas celulares. Cuando se evaluó la asociación de CD1 a su propio promotor se pudo observar no sólo que era capaz de ser reclutado sino que su presencia en el inmunoprecipitado coincidía con la condición basal o sea sin estímulo con PMA, se incrementa tras 15 minutos de estímulo y disminuye a los 30 minutos post-tratamiento.

Para examinar la posibilidad de que CD1 estuviese actuando como un correpresor reclutando proteínas que tengan la capacidad de reprimir la transcripción se ensayó por un lado el patrón de asociación de RAC3 que es capaz de regular positivamente la actividad de NF- $\kappa$ B (Werbajh, S *et al.* 2000) y por otro lado se evaluó la posibilidad que HDAC1 estuviese presente en el contexto de estas secuencias de ADN. Esta proteína ha sido caracterizada por inhibir la actividad de este factor de transcripción en el contexto del promotor de I $\kappa$ B $\alpha$  (Gao, Z *et al.* 2005).

Los perfiles de asociación de RAC3 al ADN en ambas líneas celulares muestran una cinética de interacción diferente (ver Figura 39 A y B), observándose que en la línea tumoral de mama T47-D que posee niveles elevados de RAC3 la asociación es más persistente que en la línea HEK 293; mientras que en la línea tumoral la presencia de RAC3 es detectable a los 15 minutos post-estímulo, se incrementa luego de 30 minutos y permanece asociado tras 180 minutos de tratamiento con PMA. En la línea embrionaria de riñón la presencia del coactivador asociado al ADN es sólo detectable en una fracción reducida de tiempo aumentando a los 15 minutos de estímulo y disminuyendo abruptamente a los 30 minutos.

En cuanto a la asociación de HDAC1 al promotor de CD1, se observó en ambas líneas la misma cinética, siendo detectable en ausencia de tratamiento, similar a lo observado con CD1 y su presencia disminuye tras 30 minutos de tratamiento, y esto coincide con la máxima asociación de RelA. Sin embargo, mientras que en la línea HEK 293 la unión de HDAC se incrementa nuevamente luego de 60 minutos, en la línea T47-D la reasociación ocurriría luego de 180 minutos de estimulación y ésto coincide con la disociación de RAC3.

Estos resultados indicarían que CD1 podría ejercer su efecto inhibitorio sobre la actividad de NF- $\kappa$ B actuando a nivel del promotor, siguiendo una cinética de asociación que muestra estar sincronizada al reclutamiento de otros factores que poseen la capacidad de activar o reprimir la actividad de NF- $\kappa$ B en sus genes blanco.



**Figura 39** Ciclina D1 regula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en el contexto local de la cromatina: **A** Células de la línea HEK 293 o **B** T47D fueron estimuladas con PMA (10 ng/ml) por 15, 30, 60 o 180 minutos tras lo cual se aisló y fragmentó la cromatina. Los ensayos de ChIP se realizaron inmunoprecipitando con anticuerpos contra RelA, CD1, RAC3 o HDAC1. Las bandas corresponden al fragmento del promotor de ciclina D1 que contiene los elementos  $\kappa$ B amplificados por PCR.

### III- PATRON DIFERENCIAL EN LA EXPRESION DEL COACTIVADOR RAC3 Y DE LA CICLINA D1 DURANTE EL CICLO CELULAR

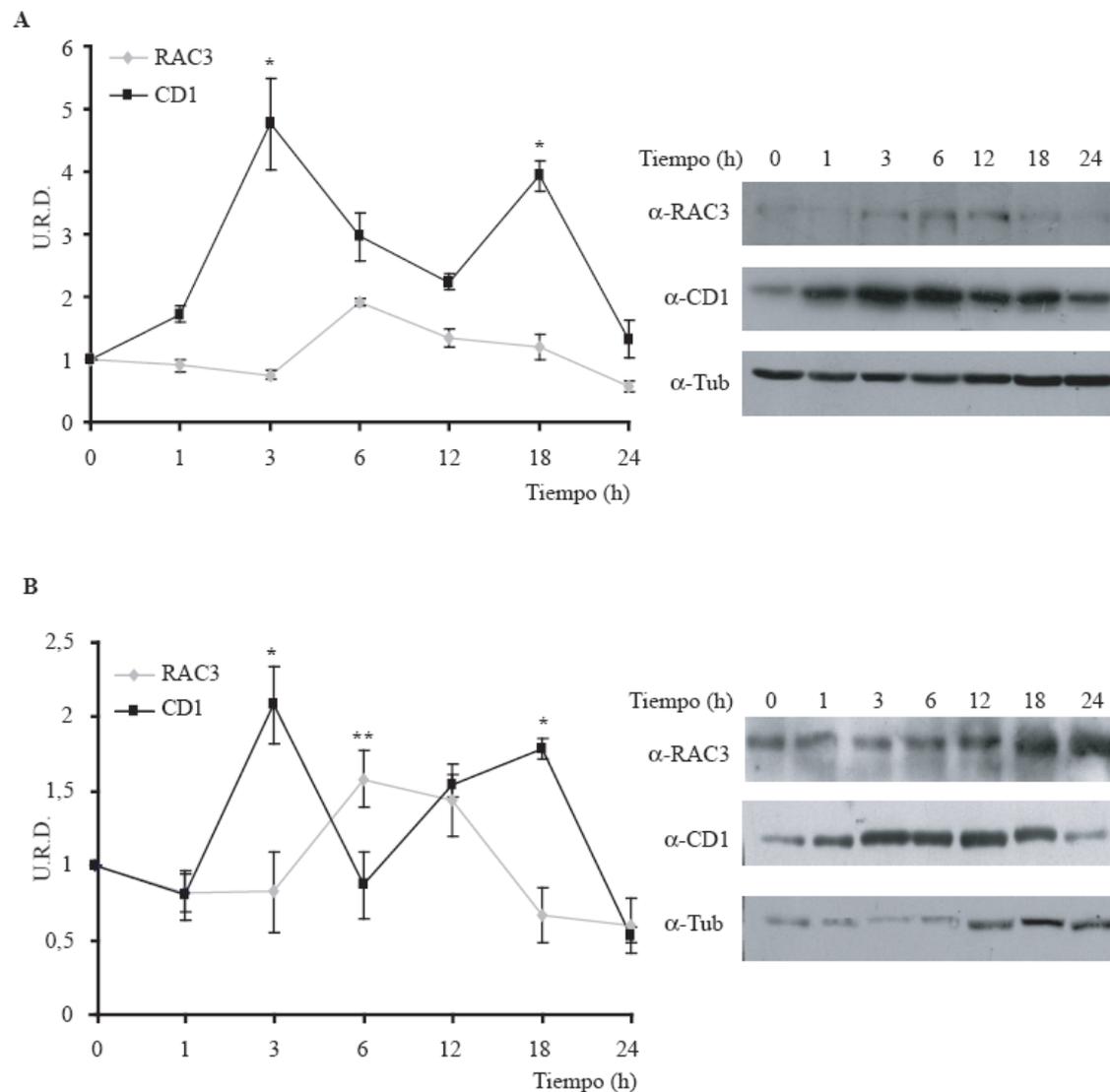
#### III.1- La expresión de Ciclina D1 y del coactivador RAC3 es temporalmente distinta

Tanto CD1 como RAC3 han sido caracterizados por tener un rol en la regulación de las transiciones de fase durante el ciclo celular, mientras que la presencia de CD1 sería primordial tanto para que una célula inicie la división celular como para el pasaje a través del primer punto de control denominado punto de restricción (ver figura 2). Recientemente se ha observado que RAC3 sería necesario para la transición de la fase G<sub>1</sub> a la fase S (Louie, MC *et al.* 2006).

La expresión de CD1 depende de la activación de varios factores de transcripción activados por distintas vías (ver Figura 9 y 10) y minoritariamente por la activación del factor de transcripción E2F. En cuanto a la regulación de la expresión de RAC3 se conoce muy poco pero en trabajos de los grupos de Chen H-W (Louie, MC *et al.* 2006) y de O'Malley BW (Mussi, P *et al.* 2006) se ha demostrado recientemente que el factor de transcripción E2F es capaz de regular su expresión.

Ambas proteínas han sido caracterizadas por encontrarse sobreexpresadas en distintos tumores y estar relacionadas con la progresión tumoral, sin embargo hasta el momento no existen trabajos en los cuales se encuentre correlación entre los niveles de ambas proteínas y el desarrollo tumoral. Con el fin de examinar los perfiles de expresión de CD1 y RAC3, células de las líneas HEK 293 y T47-D fueron sincronizadas por privación de suero por 16 horas.

A diferentes tiempos luego del agregado de suero, se realizaron extractos proteicos totales que fueron analizados por *Western blot*. Como se muestra en las Figuras 40 A y B, ambas líneas tendrían un patrón similar de expresión para CD1 y para RAC3. Sin embargo, habría un desfase entre ambos perfiles, en donde la expresión de CD1 aumentaría tras 3 horas luego de la adición de suero, mientras que los niveles de RAC3 aumentan 6 horas después en ambas líneas celulares.



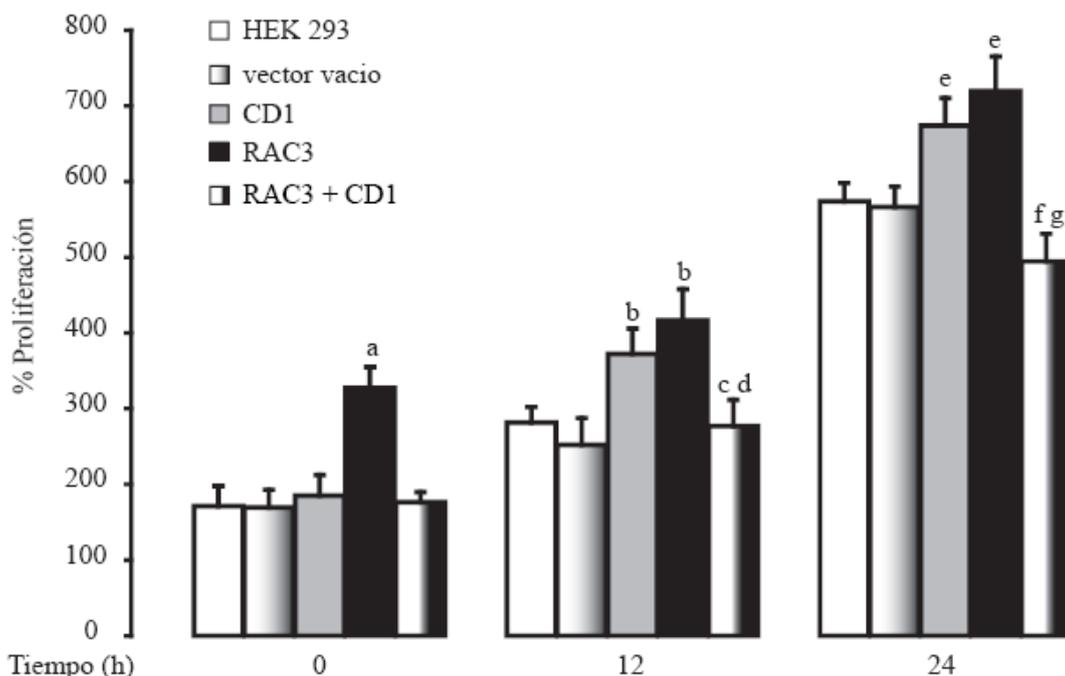
**Figura 40 La expresión de CD1 y RAC3 se encuentra regulada diferencialmente durante el ciclo celular:** **A.** Células HEK 293 o **B** T47-D fueron sincronizadas por privación de suero durante 16 h y luego inducidas a entrar en ciclo celular por agregado de medio conteniendo 10 % suero fetal bovino. Las células fueron cosechadas a los tiempos indicados luego del agregado de suero para su análisis por la técnica de *Western blot*. Las curvas de tiempo corresponden al promedio de las unidades densitométricas relativas con respecto a la expresión de tubulina de cinco experimentos independientes. \* $p < 0,001$  aumento de la expresión de CD1 con respecto al tiempo 0 y \*\* $p < 0,01$  aumento de la expresión de RAC3 con respecto al tiempo 0.

Estos resultados, junto con los obtenidos en los experimentos de ChIP donde se observa una cinética particular de unión al ADN para estas proteínas, estarían sugiriendo que la expresión de ambas moléculas estaría sincronizada coincidiendo quizás con su rol particular en la progresión del ciclo celular.

## II.2- La sobreexpresión conjunta de CD1 y RAC3 altera la proliferación celular.

Con el fin de analizar si el aumento en los niveles de expresión de CD1 y/o RAC3 podrían alterar la proliferación celular, células HEK 293 fueron transfectadas con vectores de expresión para CD1, RAC3 o ambos vectores. Luego, las células fueron sincronizadas por 16 horas por privación de suero y la proliferación celular se evaluó a distintos tiempos luego de la adición de suero, 0, 12 y 24 horas, por tinción con cristal violeta.

En la figura 41 se muestran los porcentajes de proliferación con respecto al tiempo en que a las células se les cambio el medio de cultivo completo (10% suero fetal bovino) por medio de cultivo sin suero. El tiempo 0 corresponde al porcentaje de proliferación de las células en ausencia de factores de crecimiento (durante las 16 hs de privación). Como se observa en la figura, bajo estas condiciones habría una muy baja proliferación, sin embargo aquellas células que expresan altos niveles de RAC3 serían capaces de dividirse a pesar de la carencia de factores de crecimiento que promueven la proliferación celular.



**Figura 41 La co-expresión de RAC3 y CD1 inhiben la proliferación celular:** Células HEK 293 transfectadas con CD1, RAC3 o ambos fueron sincronizadas por privación de suero y su proliferación

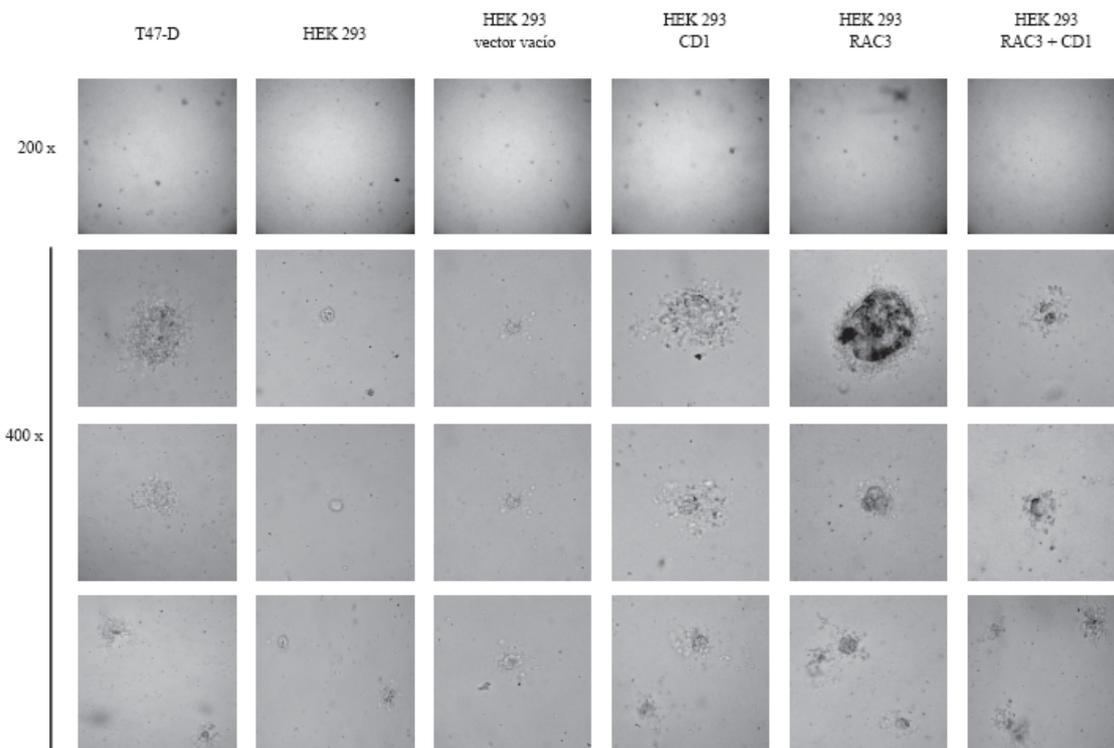
fue determinada por tinción con cristal violeta a distintos tiempo luego de agregado 10% de suero fetal bovino. Las barras representan el promedio  $\pm$  ds de al menos 3 experimentos independientes. a  $p < 0,001$  corresponde a la condición de RAC3 sobreexpresado a tiempo 0 con respecto a las células sin transfectar o transfectadas control, b  $p < 0,001$  ó e  $p < 0,001$  corresponde a las células transfectadas con RAC3 o CD1 versus las células control a las 12 ó 24 hs, respectivamente, c y d  $p < 0,001$  o f y g  $p < 0,001$  corresponde a las células expresando RAC3+CD1 versus los tratamientos individuales con RAC3 o CD1 a las 12 ó 24 hs, respectivamente.

Como era de esperar, la sobreexpresión de CD1 induce proliferación y los mismos resultados fueron obtenidos cuando se aumentaron los niveles de RAC3. Sin embargo, los resultados obtenidos cuando ambas proteínas fueron sobreexpresadas muestran una marcada inhibición de la proliferación celular, este resultado podría indicar un antagonismo entre estas proteínas sobre la señalización proliferativa cuando ambas son co-expresadas en altos niveles y al mismo tiempo.

### **III.3- El aumento en los niveles de CD1, RAC3 o de ambos altera la capacidad en la transformación celular.**

Las células normales necesitan de una matriz para adherirse y crecer, una característica de las células tumorales es que adquieren la capacidad de proliferar en ausencia de anclaje. Para examinar si el aumento en la expresión de estas moléculas alteraba la capacidad de crecer en ausencia de anclaje y por lo tanto participar en la transformación celular. Células de la línea HEK 293 fueron transfectadas bajo las mismas condiciones descriptas en la sección anterior pero se realizó una selección utilizando la droga Neomicina para garantizar la presencia del vector deseado.

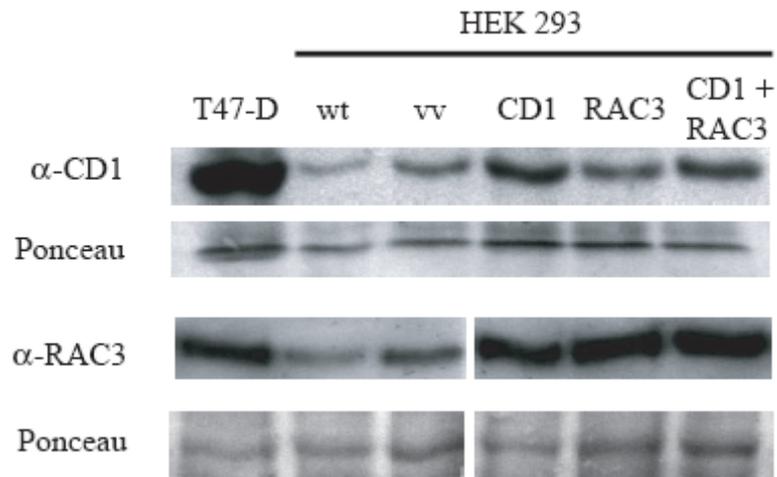
Las células seleccionadas fueron crecidas durante 30 días en una matriz de agarosa al 0,35%. Ha sido descripto que las células HEK 293 no tienen la capacidad de crecer en esta matriz mientras que las células T47-D forman colonias como se puede observar en la figura 42. Cuando se evaluó si el aumento en los niveles de CD1, RAC3 o ambas modificaban el fenotipo de la línea HEK 293, se pudo observar que tanto el aumento en los niveles de CD1 como de RAC3 aumenta el número de colonias formadas con respecto a las células salvajes (Figura 42). Sin embargo, cuando los niveles de ambas proteínas fue aumentada de manera conjunta esta capacidad se vió inhibida como se muestra en la figura 42



**Figura 42 La co-expresión de RAC3 y CD1 inhibe la capacidad de formar colonias en ausencia de anclaje:** Células HEK 293 fueron transfectadas de manera estable con vectores de expresión para RAC3, CD1 o ambos, en conjunto con el plásmido que expresa la Proteína fluorescente verde (GFP) que contiene la resistencia para Neomicina y las células fueron seleccionadas en presencia de la droga y por la presencia de fluorescencia. Las células fueron sembradas en una matriz de agarosa al 0,35 %, luego de 30 días de crecimiento se tomaron fotografías para determinar la presencia de colonias.

Estos resultados estarían de acuerdo a los obtenidos en los ensayos de proliferación donde la co-expresión de CD1 y RAC3 tendría un efecto antagónico y revertiría la capacidad individual de estas moléculas de incrementar la formación de colonias creciendo independiente de anclaje.

En la figura 43 se muestra los niveles de RAC3 y CD1 expresados durante la selección de las células HEK 293 transfectadas con los distintos vectores en comparación con los niveles de las células HEK 293 salvajes y la línea tumoral T47-D



**Figura 43 Niveles de expresión de CD1, RAC3 o de ambos:** Extractos proteicos de células T47-D, HEK 293 sin transfectar o transfectadas de manera estable con vectores de expresión para CD1, RAC3 o ambos o bien la condición control donde se utilizó un vector vacío.

# **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis pueden resumirse en las siguientes observaciones:

1. La citoquina pro-inflamatoria  $TNF\alpha$  caracterizada originalmente por su acción en la necrosis de tumores o bien la apoptosis de ciertos tipos celulares, es capaz de inducir proliferación de células tumorales.
2. La acción proliferativa de  $TNF\alpha$  en las células de tumor mamario humano respondedoras a estrógenos ocurre a través de la activación de  $NF-\kappa B$ .
3. La acción proliferativa de los estrógenos en las células T47-D requiere de la actividad  $NF-\kappa B$ .
4. Como consecuencia de las conclusiones precedentes, se desprende que el tratamiento simultáneo con  $TNF\alpha$  y estrógenos (17E), no resulta en un antagonismo entre ambas señales, sino que  $TNF\alpha$  tiene un efecto potenciador de la proliferación mediada por estrógenos a través de  $NF-\kappa B$  entre otras posibles señales inducidas por la citoquina.
5. El efecto de  $TNF\alpha$  y 17E sobre la proliferación estaría dado al menos por el aumento en la expresión de Ciclina D1.
6. Si bien la expresión del gen de CD1 es controlada por numerosas señales y a través de sitios específicos para distintos factores de transcripción, no se han descrito sitios para la unión del receptor de estrógenos. De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, el aumento en la expresión de CD1 por estrógenos es dependiente de  $NF-\kappa B$ , dado que utiliza los sitios de unión para este factor en el promotor del gen de CD1.
7. La acción proliferativa de los estrógenos es dependiente de los niveles de expresión de RAC3 no solo porque actúa como coactivador de su receptor, sino que es necesario para la formación de complejos conteniendo ER activado/RAC3/ $NF-\kappa B$  capaces de unirse al menos a los sitios  $\kappa B$  del promotor de CD1 y aumentar su expresión.
8. La sobreexpresión del coactivador RAC3, que es necesario para la activación de la transcripción mediada tanto por el ER como por  $NF-\kappa B$ , contribuiría a la proliferación tumoral tanto hormono-dependiente como independiente y en ambos casos la actividad  $NF-\kappa B$  estaría cumpliendo un rol clave.

9. Ciclina D1, además de su rol en la progresión del ciclo celular, es capaz de interaccionar con NF- $\kappa$ B de manera independiente de la asociación con su quinasa dependiente de ciclina (Cdk).
10. CD1 tiene un efecto represor de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B que no involucra una inhibición de la translocación o la unión del factor de transcripción a sus elementos en el ADN.
11. El efecto correpresor de CD1 sobre NF- $\kappa$ B estaría mediado por el reclutamiento de histona deacetilasas.
12. La acción correpresora de CD1 sobre NF- $\kappa$ B puede ser parcialmente revertida por la sobreexpresión de RAC3, probablemente vía su actividad endógena acetilasa de histonas o el reclutamiento de otras actividades enzimáticas.
13. Existe una diferencia temporal en el patrón de expresión de CD1 y RAC3 que sería dependiente del ciclo celular. Estos resultados sugieren también una diferencia en la actividad NF- $\kappa$ B en las distintas etapas del ciclo celular, según predominen la actividad coactivadora o correpresora.
14. Por análisis de la cinética de unión de factores a sitios  $\kappa$ B en un promotor, se demuestra que tanto en células tumorales como no tumorales, la activación génica dependiente de NF- $\kappa$ B ocurre al menos por el desplazamiento de complejos conteniendo CD1/HDAC que son reemplazados por complejos NF- $\kappa$ B/RAC3.
15. La sobreexpresión de RAC3, así como la expresión constitutiva de CD1 contribuyen a un aumento en la tasa proliferativa, así como al crecimiento independiente de anclaje, sin embargo, la co-expresión en alto título simultánea resulta en un antagonismo mutuo y la inhibición del crecimiento tumoral.

## **DISCUSION**

## DISCUSION

Existen múltiples eventos que pueden contribuir al desarrollo tumoral, sin embargo en los primeros estadios, aquellas mutaciones que favorezcan un aumento en la proliferación celular y una inhibición de la apoptosis serán las que otorguen mayor beneficio en la progresión tumoral (Bertram, JS 2000). Como se ha mencionado en la introducción, los coactivadores de receptores de hormonas esteroideas (SRC) tienen un rol primordial en la activación de la proliferación celular y como ha sido descrito recientemente por nuestro grupo, también en la protección contra la muerte celular mediada por apoptosis, tanto activada por la vía intrínseca como extrínseca (Colo, GP *et al.* 2007; Colo, GP *et al.* 2008). Esta función biológica dependería tanto de su capacidad de transferir acetilos mediante su actividad Histona acetiltransferasa como por su capacidad de interaccionar con distintas proteínas (Colo, GP *et al.* 2008), lo cual favorecería la activación de la expresión de distintos genes mediante la asociación no solo con receptores nucleares sino también con otros factores de transcripción no dependientes de hormona como NF- $\kappa$ B, entre otros (Werbajh, S *et al.* 2000; Arimura, A *et al.* 2004; Louie, MC *et al.* 2004; Myers, E *et al.* 2005).

Hasta el momento se han descrito varios mecanismos por los cuales RAC3 contribuiría a la proliferación celular, pero en general estos están relacionados a su interacción con Receptores nucleares (Planas-Silva, MD *et al.* 2001). En este trabajo de tesis hemos observado que la sobreexpresión de RAC3 estaría favoreciendo no solo la proliferación vía su interacción con el ER sino también la mediada por citoquinas pro-inflamatorias y de esta manera dos vías descritas por ser antagónicas participan conjuntamente en la proliferación celular. Además hemos observado que el hecho de aumentar los niveles de este coactivador produce que la célula sea capaz de proliferar aún en ausencia de mitógenos.

Como ha sido comentado en la introducción de este trabajo, los coactivadores de Receptores de hormonas esteroideas fueron descritos, originalmente, por encontrarse sobreexpresados en tumores cuya proliferación dependía de hormonas, tales como mama y ovario (Anzick, SL *et al.* 1997), carcinoma de endometrio (Glaeser, M *et al.* 2001) y cáncer de próstata (Gnanapragasam, VJ *et al.* 2001), estos hallazgos no resultaron sorprendentes dada la función de estos coactivadores como mediadores de la actividad de receptores nucleares. Posteriormente, se demostró que el rol de estas

moléculas no era exclusivo sino que era extensivo para otros factores de transcripción como es el caso de NF- $\kappa$ B, como fue descrito por nuestro grupo en el año 2000 (Werbajh, S *et al.* 2000).

Estas observaciones resultaron de suma importancia dado que NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción clave en varios procesos relacionados con el desarrollo y progresión tumoral, regulando la expresión de numerosos genes involucrados en la proliferación celular como en la transcripción de genes con rol anti-apoptótico (Colo, GP *et al.* 2008). De acuerdo con esto, era factible suponer que otros tumores no dependientes de hormonas esteroideas y que tuvieran altos niveles de RAC3, podrían tener favorecida su progresión a través de un aumento de su actividad NF- $\kappa$ B. Paralelamente y con posterioridad a estos hallazgos, se describió a RAC3 como una proteína cuyos niveles de expresión se encontraban aumentados en otros tipos de tumores no estrictamente relacionados al control de hormonas esteroideas, como por ejemplo: cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma colorectal y hepatocelular (Ghadimi, BM *et al.* 1999; Sakakura, C *et al.* 2000; Wang, Y *et al.* 2002; Henke, RT *et al.* 2004).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, efectivamente RAC3 contribuye a la progresión tumoral dependiente de NF- $\kappa$ B y más aún, esta actividad es importante en la respuesta a hormonas esteroideas.

Conjuntamente, estas observaciones sugieren que este coactivador juega un rol en la progresión tumoral, a través de mecanismos no estrictamente relacionados con la actividad de receptores nucleares o estímulos dependientes de hormonas, y en muchos casos no solo dependerá de las vías que son activadas sino también con que proteínas está interaccionando tanto en el contexto de la cromatina como en el citoplasma, según hemos demostrado recientemente (Colo, GP *et al.* 2008).

Una célula que ha adquirido ciertas mutaciones para llegar a convertirse en una célula tumoral debe primero ser capaz de escapar al reconocimiento del sistema inmunológico y a los mecanismos que desencadenan la muerte celular. El factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) es una citoquina pro-inflamatoria que fue inicialmente descrita por ser capaz de inducir la necrosis de tumores sólidos en ratones (Larrick, JW *et al.* 1990) y apoptosis en varias líneas celulares (Beg, AA *et al.* 1996; Costas, M *et al.* 1996), además es sabido que durante el desarrollo tumoral existe infiltración de células del sistema inmune y liberación de mediadores inflamatorios.

La interacción de TNF $\alpha$  con su receptor desencadena la activación de señales antagonicas, una de ellas involucra la activación de caspasa 8 llevando a la apoptosis y la otra vía lleva a la activación de NF- $\kappa$ B que entre sus genes blanco se encuentran aquellos relacionados con los procesos anti-apoptóticos. Si bien esta citoquina fue originalmente descrita por su acción necrótica de tumor y apoptótica, pocos tipos celulares resultan naturalmente sensibles a la muerte inducida por TNF $\alpha$  y solo ocurre apoptosis en presencia de agentes sensibilizantes como Cicloheximida, Actinomicina D o bien Sulfasalazina (Beg, AA *et al.* 1996; Costas, M *et al.* 1996; Liu, ZG *et al.* 1996; Costas, MA *et al.* 2000; Franco, DL *et al.* 2002)

Si bien son pocos los tipos celulares que resultan naturalmente sensibles a la muerte inducida por TNF $\alpha$ , no esperábamos que resultara inductor de la proliferación en una línea de tumor mamario. Sin embargo, en las células T47-D, la citoquina no solo no indujo apoptosis aún en presencia de un agente sensibilizador como la Sz, sino que estimuló la proliferación y potenció la acción proliferativa dependiente de estrógenos.

Uno de los mecanismos por los cuales TNF $\alpha$  podría estar induciendo la proliferación de las células de tumor mamario y contribuyendo a la acción de los estrógenos es a través de la activación de numerosas quinasas ((Liu, ZG *et al.* 1996; Vanden Berghe, W *et al.* 1998; Franco, DL *et al.* 2002), algunas de las cuales fosforilan sustratos involucrados en el control de la proliferación e inclusive al Receptor de estrógenos y al coactivador RAC3. Sin embargo, en nuestros experimentos observamos que la sola inhibición de NF- $\kappa$ B es suficiente para inhibir la respuesta proliferativa a TNF $\alpha$ . Más aún, para nuestra sorpresa, el bloqueo de este factor de transcripción también resultó en una inhibición de la acción proliferativa de los estrógenos.

Existen antecedentes que demuestran que NF- $\kappa$ B tiene un rol fundamental en la proliferación de la glándula mamaria (Clarkson, RW *et al.* 2000) y en la progresión de tumores de mama que no responden al tratamiento con tamoxifeno (Biswas, DK *et al.* 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sugieren que la presencia de NF- $\kappa$ B activo es necesaria también para la proliferación de una línea tumoral de mama que responde al estímulo de estrógenos.

De acuerdo con los resultados previos obtenidos en el grupo de trabajo del Dr. O'Malley, la quinasa IKK responsable de la activación de NF- $\kappa$ B, también es capaz de fosforilar a RAC3 induciendo su translocación al núcleo (Wu, RC *et al.* 2002). En vista de nuestras observaciones, los efectos de Sz podrían atribuirse a su efecto sobre la

ausencia de fosforilación de un coactivador necesario para ER, dado que esta droga inhibe a la IKK. Sin embargo, en nuestros experimentos, además de la inhibición farmacológica de NF- $\kappa$ B, también se utilizaron otros métodos que no afectan a la IKK pero inhiben específicamente a NF- $\kappa$ B, tales como la sobreexpresión de I $\kappa$ B superrepressor y la titulación del factor de transcripción con oligonucleótidos específicos. En todos los casos, los resultados obtenidos fueron similares, demostrando claramente el requerimiento de NF- $\kappa$ B para la acción proliferativa mediada por estrógenos, la expresión de CD1 y la unión de ER al promotor del gen de CD1.

Un hecho llamativo es que la inhibición de NF- $\kappa$ B afecta la proliferación inducida por estrógenos, aún en condiciones basales de actividad NF- $\kappa$ B o sea en ausencia de TNF $\alpha$ . Luego, si los estrógenos requieren indefectiblemente de la actividad NF- $\kappa$ B para inducir una respuesta proliferativa, ¿cómo se logran niveles adecuados de factor de transcripción activo en ausencia de estímulos adicionales de estrógenos? ¿y en condiciones fisiológicas?. Para responder a estas preguntas debemos considerar el hecho de que NF- $\kappa$ B puede ser activado por múltiples señales además de una citoquina inflamatoria, incluyendo el estrés. Por lo tanto, no es extraño pensar que siempre deben existir niveles basales de activación del factor de transcripción, probablemente suficientes para la actividad estrogénica. En un contexto fisiológico, probablemente sea muy difícil hallar células con ausencia absoluta de actividad NF- $\kappa$ B. Se podría especular, que en etapas tempranas en el desarrollo de un tumor mamario, cuando predomina el requerimiento de ER, los niveles de NF- $\kappa$ B activo resultan suficientes para la acción proliferativa y a medida que el tumor progresa, otras señales se vuelven más predominantes en el control de la progresión tumoral, probablemente, vía NF- $\kappa$ B entre otras señales. En este contexto, las propias citoquinas inflamatorias inducidas para combatir el tumor, podrían estar induciendo su proliferación a través de la activación de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, y de acuerdo con otros estudios realizados en modelos animales *knockout* para IKK $\alpha$ , se ha demostrado que este factor de transcripción juega un rol clave en el desarrollo de la glándula mamaria (Cao, Y *et al.* 2001).

Si bien podría esperarse que por algún mecanismo los propios estrógenos induzcan la activación de NF- $\kappa$ B en los niveles requeridos para mediar su respuesta proliferativa, nuestros resultados demuestran claramente que ésto no ocurre. Los experimentos de EMSA muestran que los estrógenos no afectan los niveles de activación ni la composición de los complejos NF- $\kappa$ B.

Estos resultados estarían en contraposición a los descritos en distintos trabajos en donde se ha observado antagonismo entre ER y NF- $\kappa$ B (Hsu, SM *et al.* 2000; Speir, E *et al.* 2000; Valentine, JE *et al.* 2000; Evans, MJ *et al.* 2001). Entre los modelos propuestos para explicar el mecanismo molecular por el cual los estrógenos reprimen la actividad NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  se encuentran aquellos que sugieren que los estrógenos estarían mediando la inducción de la expresión de p105 que secuestra al NF- $\kappa$ B activo en el citoplasma (Hsu, SM *et al.* 2000). También han sido identificados residuos en el dominio de unión al ligando (LBD) del ER que podrían ser responsables de la trans-represión sobre la actividad de NF- $\kappa$ B (Valentine, JE *et al.* 2000). En otros trabajos se sugiere una competición por coactivadores comunes a ambos factores de transcripción activados (Speir, E *et al.* 2000), similar al observado entre el Receptor de Glucocorticoides y NF- $\kappa$ B (Werbajh, S *et al.* 2000).

En nuestros estudios, no se ha observado antagonismo entre la actividad del ER y de NF- $\kappa$ B en la línea T47-D al menos a las dosis de TNF $\alpha$  y 17E utilizadas, es más, se ha podido observar que ambas moléculas son parte de un mismo complejo proteico, en donde se encuentra RAC3, coactivador común a ambos factores de transcripción y sería a través de este complejo que los estrógenos estarían induciendo la expresión de CD1.

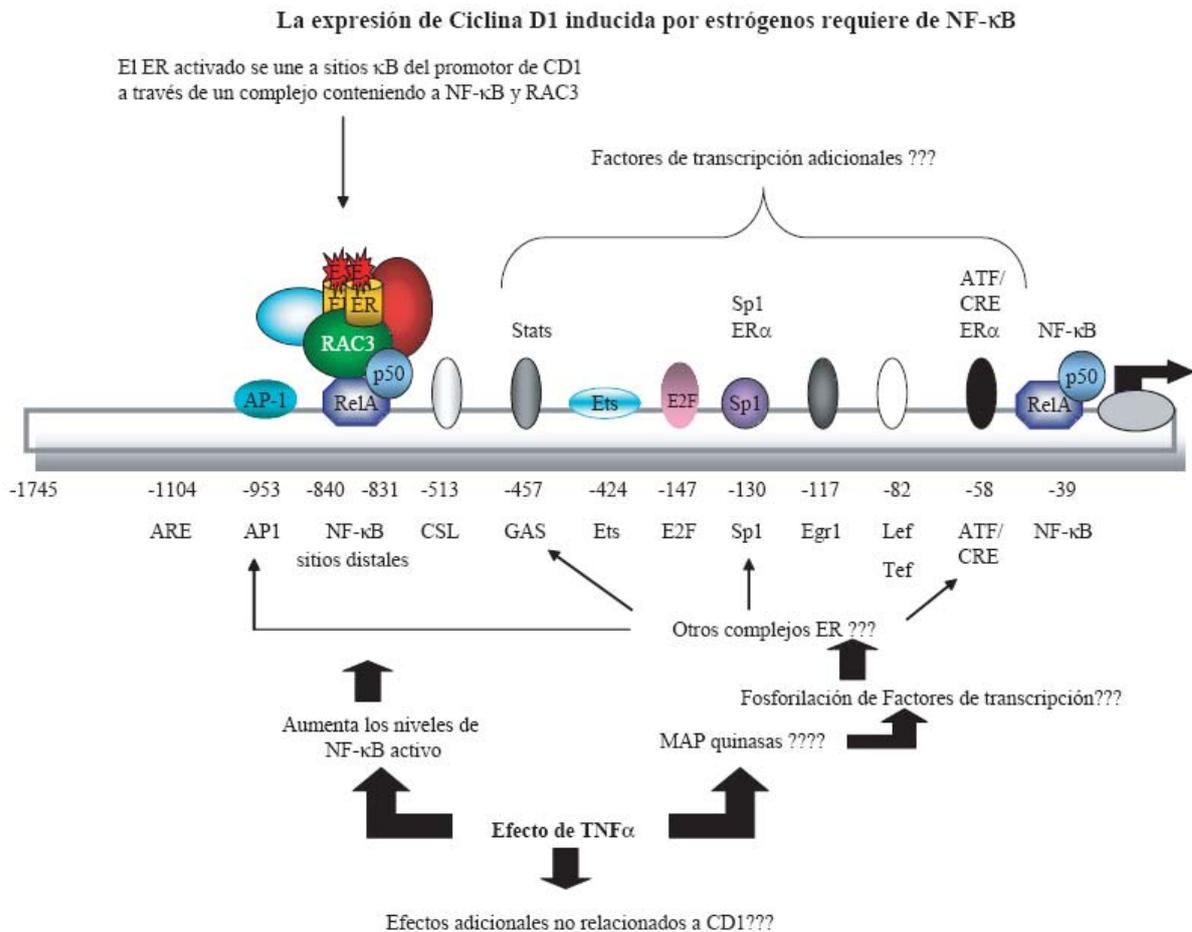
Ciclina D1 es una de las proteínas clave en el control del ciclo celular y es sabido que su expresión puede ser controlada por NF- $\kappa$ B (Guttridge, DC *et al.* 1999; Hinz, M *et al.* 1999). Por otro lado, también se ha descrito que en su promotor existen numerosas secuencias para la unión de otros factores de transcripción a través de los cuales los estrógenos podrían controlar su expresión (Webb, P *et al.* 1995; Castro-Rivera, E *et al.* 2001). Sin embargo, no se han descrito secuencias específicas de unión para ER. Esto último ha llevado a muchos grupos a dilucidar por que medios los estrógenos inducen la expresión de este gen, entre los modelos propuestos la interacción con los factores AP-1 y Sp1 han sido los mejor caracterizados (Webb, P *et al.* 1995; Castro-Rivera, E *et al.* 2001) (ver figura 44).

De acuerdo con nuestros resultados, uno de los mecanismos por los cuales TNF $\alpha$  induce proliferación de las células de tumor mamario humano y que contribuye además a la acción proliferativa de los estrógenos es el aumento en la expresión de CD1. Demostramos que NF- $\kappa$ B y ER no son antagónicos, sino que pueden interaccionar físicamente formando parte de un complejo que contiene a RAC3 y todo este complejo se recluta a los sitios  $\kappa$ B presentes en el promotor de CD1. Este es el modelo molecular

por el cual  $\text{TNF}\alpha$  puede estar induciendo proliferación y contribuyendo a la respuesta a estrógenos (Figura 44). Según este modelo, los sitios  $\kappa\text{B}$  en el promotor de CD1 serían blanco de acción para señales inducidas por  $\text{TNF}\alpha$  que activa a  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , o bien aquellas inducidas por estrógenos o la combinación de ambos estímulos. En presencia de estrógenos, el ER activado formaría complejos con  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  activo y RAC3 que serían reclutados a los sitios  $\kappa\text{B}$  para aumentar la expresión de CD1. Este modelo no excluye sin embargo, que los estrógenos o  $\text{TNF}\alpha$  pueden estar controlando la respuesta proliferativa a través del control de la expresión de otros genes, o bien, vía la activación de otras cascadas de señal. Más aún, los complejos ER activado/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ /RAC3 podrían también ser reclutados a otros promotores y controlar la expresión de otros genes necesarios para la proliferación celular.

Existen evidencias que demuestran que los estrógenos pueden regular la expresión de CD1 solo a través de una vía indirecta activando Akt y ERK 1/2 (Castoria, G *et al.* 2001). Más aún, según otros autores, la acción proliferativa de los estrógenos ni siquiera requeriría de su actividad transcripcional, dado que mutantes de ER transcripcionalmente inactivos son capaces de inducir la entrada en fase S (Migliaccio, A *et al.* 1998). De acuerdo con estas observaciones y los resultados obtenidos en este trabajo, muy probablemente, exista más de un mecanismo por el cual los estrógenos sean capaces de controlar la respuesta proliferativa y esto podría depender del tipo celular y sus características tumorales o no tumorales.

En este contexto, del mismo modo puede interpretarse la capacidad de  $\text{TNF}\alpha$  para inducir una respuesta proliferativa. Según se mencionó previamente en esta discusión, muy pocos tipos celulares son naturalmente sensibles a la muerte inducida por esta citoquina, que en general, solo es capaz de inducir apoptosis cuando se bloquea la vía de activación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Según nuestros resultados, en células que no son sensibles a la muerte por  $\text{TNF}\alpha$  aún en presencia de un agente sensibilizador como Sz, como las células de la línea T47-D o de la línea HC11, la citoquina tiene un efecto proliferativo. Resulta interesante destacar que en las células MCF-7, donde el  $\text{TNF}\alpha$  no induce proliferación, la Sz también inhibe la acción proliferativa de los estrógenos, aunque en este caso, dado que no se han realizado experimentos con otros bloqueantes de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , el efecto podría ser consecuencia de la inhibición de IKK, quinasa requerida para la fosforilación de RAC3 y su translocación nuclear junto con ER.



**Figura 44 Modelo de acción de ER:** Uno de los genes blanco involucrado en la inducción de la proliferación por estrógenos es CD1. El promotor de CD1 contiene varias secuencias específicas involucradas en el control de la expresión que pueden ser parte de la respuesta a estrógenos. El Receptor de estrógenos puede encontrarse unido al promotor de CD1, dado que este se puede unir a los elementos distales κB a través de un complejo con NF-κB y coactivadores.

Tanto NF-κB, como ER y RAC3 son moléculas que suelen estar alteradas en numerosos tumores. Nuestros resultados sugieren que NF-κB y RAC3 podrían ser puntos de ataque adicionales a los ya conocidos en el desarrollo de estrategias antitumorales, más allá de la dependencia o no de estrógenos.

Resulta interesante remarcar que CD1 es otro gen usualmente alterado en numerosos tumores y precisamente es también un gen blanco de ER/NF-κB/RAC3.

NF-κB y el ER son capaces de interactuar con las mismas moléculas que se encargan de regular su actividad transcripcional (Sheppard, KA *et al.* 1999; Werbajh, S

*et al.* 2000). Entre estas moléculas se encuentra Ciclina D1, la cual fue inicialmente descrita por su rol como modulador de la actividad de Cdk, sin embargo a finales de los '90 esta proteína fue descrita por ser capaz de interactuar con varios factores de transcripción, como miembros de la familia de receptores nucleares, regulando la actividad transcripcional de los mismos mediante su asociación con corre reguladores. Este nuevo rol de CD1 parecía depender no solo del factor de transcripción al cual se asociaba sino también del contexto del promotor.

Dado que CD1 fue descrito por regular positivamente al ER tanto en presencia como en ausencia de ligando (Neuman, E *et al.* 1997; Zwijssen, RM *et al.* 1997), en donde el mecanismo molecular propuesto implica la interacción con miembros de la familia SRC, este modelo sería capaz de explicar los resultados obtenidos en líneas tumorales de mama ER (+) que sobreexpresan CD1. En estos modelos se observa una resistencia temprana al tratamiento con anti-estrógenos a pesar de mantener la expresión de ER (Jordan, VC 1999; Jordan, VC *et al.* 1999), una posible explicación para estas observaciones se podría deber a que CD1 es capaz de interactuar con el ER unido al anti-estrógenos y servir de puente entre coactivadores y el ER convirtiendo el efecto antagonista del tamoxifeno en un efecto agonista. Los resultados obtenidos en la línea tumoral de mama T47-D que responde a estrógenos muestran que la expresión constitutiva de CD1 confiere resistencia al tratamiento con anti-estrógenos (Hui, R *et al.* 2002); mientras que otros tipos de tumor nunca responden a este tratamiento y correlacionan con un peor pronóstico, lo que ha llevado a investigar otros blancos terapéuticos. En este contexto, se encontró que en muchos tumores de mama se encuentra aumentada la actividad de NF- $\kappa$ B (Biswas, DK *et al.* 2000; Biswas, DK *et al.* 2001; Biswas, DK *et al.* 2004) y correlacionan con un peor pronóstico.

En los resultados presentados se ha demostrado por primera vez que CD1 es capaz de interactuar con miembros de la familia NF- $\kappa$ B tanto en condiciones basales como bajo estímulo, en una línea que posee altos niveles de CD1 como es la línea de tumor mamario T47-D como en la línea transformada HEK 293. Si bien la cantidad de RelA presente en los complejos inmunoprecipitados con anticuerpo anti-CD1 aumenta bajo estímulo con TNF $\alpha$  o PMA, nuestros resultados sugieren que CD1 podría formar parte de complejos NF- $\kappa$ B activos, dado que en controles realizados en inmunoprecipitados

de células basales tanto de la línea T47-D como HEK293 utilizando el anticuerpo contra  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  y donde se evaluó la presencia de CD1 mediante *Western blot*, esta proteína no fue detectada, así como tampoco se detectó en inmunoprecipitados de CD1. Esto estaría sugiriendo que la interacción entre CD1 y RelA en condiciones basales ocurriría con la cantidad de NF- $\kappa$ B activo que existe bajo estas condiciones.

Cuando se evaluó lo que ocurría con la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B cuando los niveles de CD1 de la línea HEK 293 fueron aumentados a niveles comparables a los encontrados en la línea tumoral T47-D, se observa que CD1 tiene un efecto represor sobre la actividad de NF- $\kappa$ B.

Estos resultados no fueron sorprendidos dado que CD1 ha sido descrito por tener un efecto trans-represor sobre la actividad transcripcional de otros receptores nucleares, como es el caso de AR, PPAR $\gamma$  y el TR (Reutens, AT *et al.* 2001; Wang, C *et al.* 2001b; Fu, M *et al.* 2005) y otros factores de transcripción como STAT3 (Bienvenu, F *et al.* 2001). Entre los mecanismos moleculares propuestos, se encuentran la interacción de Histona deacetilasas (Lin, HM *et al.* 2002; Petre, CE *et al.* 2002), la asociación con el coactivador CBP/p300 impidiendo su interacción con el factor de transcripción activado (Wang, C *et al.* 2001b; Fu, M *et al.* 2005) o bien, la interacción de CD1 con el factor de transcripción impidiendo su translocación al núcleo (Bienvenu, F *et al.* 2001).

Si bien cualquiera de estos mecanismos podría estar participando en la inhibición de la actividad NF $\kappa$ B por CD1, tampoco podría descartarse que se tratara de una acción no estrictamente vinculada a los modelos descritos y que se debiera a la actividad de quinasas dependientes de ciclinas. Sin embargo, cuando se estudió la acción de inhibidores de la actividad de deacetilasas, la acción trans-represora de CD1 sobre NF- $\kappa$ B se vió inhibida, demostrando que esta actividad enzimática es necesaria para la acción de CD1. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos interpretar que CD1 estaría mediando su efecto inhibitorio sobre la actividad NF- $\kappa$ B a través de la asociación con correpresores en el contexto del promotor donde el factor de transcripción se une.

Los correpresores inhiben la actividad transcripcional de los complejos a los cuales son reclutados a través de una actividad deacetilasa de histonas, propia o reclutada, que al disminuir el balance de cargas negativas, aumenta la afinidad de las histonas por el ADN, aumentando su compactación e inhibiendo la transcripción. Esto ocurre normalmente en el control de la expresión génica, detectándose la presencia de estos

complejos en genes que se encuentran apagados o con bajo nivel de expresión. En presencia de estímulos que inducen la expresión génica, estos complejos deben ser desplazados y reemplazados por otros que llevan coactivadores y la actividad acetilasa de histonas que facilita la transcripción.

En ausencia de estímulos, aquellos genes cuya expresión se ve afectada en el ciclo celular alternan en las distintas etapas del mismo, entre la presencia de complejos de activación e inhibición. Es de esperar que en presencia de altos niveles de coactivadores éstos compitan con los correpresores, detectándose una inhibición de la actividad correpresora y un aumento de la expresión génica.

De acuerdo con esta idea, se realizaron experimentos en los cuales se modificaron los niveles de expresión de CD1 o RAC3 y se analizó la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Altos niveles de RAC3 logran revertir parcialmente la inhibición ejercida por CD1, demostrando que más allá de otros mecanismos, la acetilación de histonas en el promotor juegan un rol clave en el control de la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B y regulada por CD1.

Estos resultados sugieren un efecto antagónico entre ambas moléculas, si bien tanto CD1 como RAC3 muestran una expresión aberrante y han sido asociados a múltiples tipos de cáncer y a la progresión tumoral, siendo ambas importantes en el control de la proliferación celular (Baldin, V *et al.* 1993; Sherr, CJ 1996; Louie, MC *et al.* 2004)

Como ya ha sido comentado y se desprende de los resultados obtenidos, NF- $\kappa$ B gracias a su interacción con RAC3 es capaz de regular la expresión de CD1 y como fue demostrado, en la línea tumoral de mama T47-D; RAC3, ER y NF- $\kappa$ B son parte de un mismo complejo el cual es reclutado a las secuencias de unión  $\kappa$ B en el promotor de CD1. De esta manera se plantearía una paradoja o circuito de retroalimentación, en donde la expresión de Ciclina D1 y su rol proliferativo, dependería de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B asociado a RAC3, mientras que por otro lado tendría un efecto anti-proliferativo reprimiendo la actividad de NF- $\kappa$ B y su propia expresión (Figura 45).

Una consecuencia de la expresión de CD1 es la entrada a ciclo celular y durante años el modelo que explicaba la alta tasa proliferativa en tumores se debía a un aumento en la expresión de CD1. Sin embargo, de acuerdo a nuestras observaciones, al evaluar que sucedía con la proliferación celular y la transformación tumoral cuando ambas

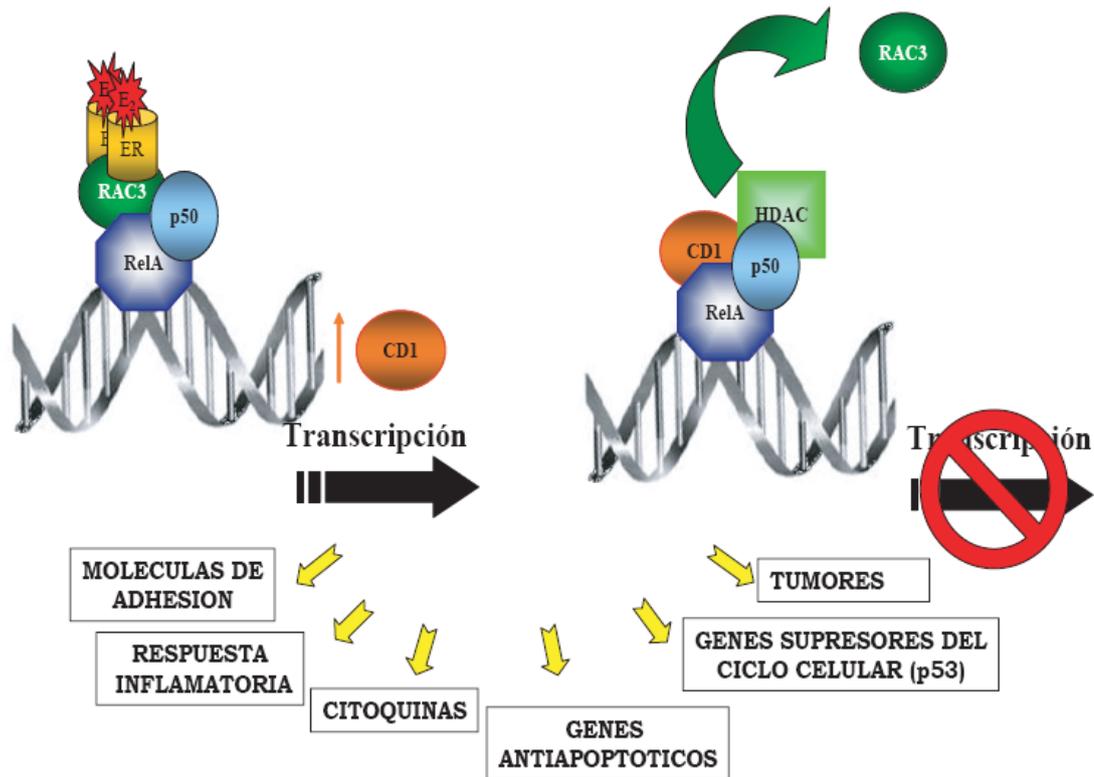
proteínas se encontraban co-expresadas, se pudo observar una inhibición en ambos parámetros y esto correlaciona con un modelo en donde la expresión de CD1 serviría no solo para regular la actividad de NF- $\kappa$ B sino también sería capaz de antagonizar los efectos que conlleva la sobreexpresión de RAC3 y de esta manera limitar la activación mitogénica y la progresión del ciclo celular.

De acuerdo con nuestros resultados, la sobreexpresión conjunta de RAC3 y CD1 produce una inhibición mutua de los efectos estimulantes de ambas moléculas en la proliferación y la formación de colonias. Sin embargo, en los modelos fisiológicos en los cuales la expansión tumoral en presencia de altos niveles de CD1 resulta evidente, sería importante determinar si existe una sobreexpresión además de RAC3, y si así fuera, si se trata del mismo tipo celular, dado que los tumores si bien se originan a partir de la expansión clonal de una célula, una vez que progresan y adquieren nuevas mutaciones, resultan policlonales.

No debemos descartar sin embargo, que a pesar de estas interacciones antagónicas, en un modelo fisiológico de progresión con alta expresión de RAC3 y CD1, se desarrollen mecanismos que inhiban los circuitos de retroalimentación o anulen su antagonismo, probablemente, vía un aumento en los niveles de NF- $\kappa$ B constitutivamente activo.

Este balance de acciones opuestas podría contribuir a las observaciones equivocadas que resultan de analizar distintos tipos de tumores en base a la expresión de CD1 en donde su sobreexpresión es bastante ambigua en cuanto a su correlación con la progresión, tratamiento y agresividad tumoral, dando lugar a la necesidad de más de un marcador tumoral o pronóstico a la hora de decidir el tratamiento adecuado.

Más allá de que el modelo de interacción fue analizado en el promotor de CD1, estas interacciones regulatorias entre CD1 y RAC3 en el control de la actividad de NF- $\kappa$ B podrían tener lugar en otros promotores conteniendo sitios  $\kappa$ B, regulando entonces de un modo similar otros genes blanco de NF- $\kappa$ B. Esto resulta particularmente interesante, si consideramos que muchos de estos genes están relacionados a numerosas respuestas biológicas como son la proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, adhesión, angiogénesis, entre muchas otras (Figura 45).



**Figura 45 Modelo del balance de acciones entre RAC3 y CD1 sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B:** En donde ambas proteínas mediante distintas interacciones regulatorias con coactivadores o correpresores estarían controlando la expresión de los genes blanco de NF- $\kappa$ B.

A partir de lo expuesto podemos concluir:

- I. La sobreexpresión del coactivador RAC3 puede contribuir al desarrollo tumoral no solo por vías relacionadas a la interacción con receptores de hormonas esteroideas, sino también por asociación a factores activados por citoquinas inflamatorias y estas vías de transducción de señal se manifiestan aún ante el estímulo hormonal.
- II. Las citoquinas inflamatorias, supuestamente involucradas en la respuesta anti-tumoral, podrían contribuir en su proliferación.
- III. La sobreexpresión de CD1 en tumores podría ejercer un rol adicional al ya descrito en el control del ciclo celular y relacionado al control de la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B.

PUBLICACIONES

**Los contenidos de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones:**

- **Rubio MF**, Werbahj S, Cafferata EGA, Quagliano A, Coló GP, Nojek IM, Kordon EC, Nahmod VE and Costas MA. *TNF $\alpha$  enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B.* Oncogene **25(9):1367-77, 2006**
- **Rubio MF**, Coló GP, Alvarado CV, Micenmacher SM, Ruiz Grecco M and Costas MA. *Cyclin D1 represses NF- $\kappa$ B activation through a Cdk4-independent mechanism.* **En preparación.**

## **ABREVIATURAS**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
AIF-1: Factor inductor de apoptosis-1  
AP-1: Proteína Activadora-1  
APC: Complejo promotor de la anafase  
ARN: Ácido Ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ATM: ataxia telangiectasia mutated  
ATP: Adenosina Trifosfato  
ATR: Proteína relacionada con ATM y Rad3  
bHLH-PAS: Dominio básico hélice-loop-hélice- Per-Arnt/AhR-Sim  
CAK: Quinasa activadora de Cdk  
Cdk: Quinasa dependiente de ciclina  
Chk1/2: Quinasa del checkpoint  
CRM1: Proteína Receptora de Secuencias NES  
DBD: Dominio de unión al ADN  
EMSA: Ensayo de cambio de movilidad electroforética  
ERE: Elemento respondedor a estrógenos  
Erk1/2: Proteínas quinasas activadas por señales extracelulares  
FADD: Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte  
GSK3 $\beta$ : Quinasa Glucógeno sintasa  $\beta$   
HRE: Elemento respondedor a hormona  
Hsp: Proteína de shock térmico  
I $\kappa$ B: Inhibidor de NF- $\kappa$ B  
IAP: Proteína Inhibidora de Apoptosis  
IKK: quinasa de I $\kappa$ B  
IL: Interleuquina  
I $\kappa$ B: Inhibidor de NF- $\kappa$ B  
JNK: quinasa de c-Jun  
kDa: kilodalton  
LBD: Dominio de unión al ligando  
MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos  
MEK: quinasa de MAPK regulada por estímulos extracelulares  
mg: miligramo

µg: microgramo

min: minutos

ml: mililitro

µl: microlitro

mM: milimolar

µM: micromolar

MMTV: Virus de tumor mamario murino

NES: Señal de Exportación Nuclear

NF-κB: Factor Nuclear *kappa* B

NLS: Señal de Localización Nuclear

nM: nanomolar

NR: Receptor nuclear

PAGE: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

PBS: Solución Salina de Buffer Fosfato

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PI3K: Fosfatidil-Inositol-3 Quinasa

PM: Peso Molecular

pM: picomolar

PP2/5: Proteína fosfatasa

RAC3: Coactivador asociado al Receptor del Ácido Retinoico 3

RIP: Proteína que Interactúa con Receptor

RNAi: ARN de interferencia

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SERM: Moduladores selectivos del Receptor de estrógenos

SRC-1: Coactivador de Receptores Esteroideos

TAD: Dominio de transactivación

TBP: Proteínas de unión a la secuencia TATA

TEB: Yemas de las terminales

TIF2: Factor Intermediario de la Transcripción 2

TNFα: Factor de Necrosis Tumoral

TNFR: Receptor de TNF

TRADD: Proteína con Dominio de Muerte Asociada al Receptor de TNF

TRAF: Factor Asociado al Receptor de TNF

## BIBLIOGRAFIA

- Aktas, H., H. Cai, *et al.* (1997). "Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1." Mol Cell Biol **17**(7): 3850-7.
- Alt, J. R., J. L. Cleveland, *et al.* (2000). "Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation." Genes Dev **14**(24): 3102-14.
- Altucci, L., R. Addeo, *et al.* (1996). "17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells." Oncogene **12**(11): 2315-24.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, *et al.* (1964a). "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 786-94.
- Allfrey, V. G. and A. E. Mirsky (1964b). "Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis." Science **144**(3618): 559.
- Ames, B. N. (1984). "The detection of environmental mutagens and potential carcinogens." Cancer **53**(10): 2034-40.
- Anzick, S. L., J. Kononen, *et al.* (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." Science **277**(5328): 965-8.
- Arany, Z., W. R. Sellers, *et al.* (1994). "E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators." Cell **77**(6): 799-800.
- Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, *et al.* (1997). "Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm." J Cell Sci **110 ( Pt 3)**: 369-78.
- Arimura, A., M. vn Peer, *et al.* (2004). "The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6." J Biol Chem **279**(30): 31105-12.
- Auphan, N., J. A. DiDonato, *et al.* (1995). "Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis." Science **270**(5234): 286-90.
- Avivar, A., M. C. Garcia-Macias, *et al.* (2006). "Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium." FEBS Lett **580**(22): 5222-6.
- Bai, J., Y. Uehara, *et al.* (2000). "Regulation of invasive cell behavior by taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer." Cell **103**(7): 1047-58.
- Baker, S. J. and E. P. Reddy (1998). "Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily." Oncogene **17**(25): 3261-70.
- Baldin, V., J. Lukas, *et al.* (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." Genes Dev **7**(5): 812-21.
- Bargou, R. C., C. Leng, *et al.* (1996). "High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Blood **87**(10): 4340-7.
- Bautista, S., H. Valles, *et al.* (1998). "In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity." Clin Cancer Res **4**(12): 2925-9.
- Beato, M., P. Herrlich, *et al.* (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." Cell **83**(6): 851-7.

- Beato, M. and A. Sanchez-Pacheco (1996). "Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex." Endocr Rev **17**(6): 587-609.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." Science **274**(5288): 782-4.
- Beg, A. A., W. C. Sha, *et al.* (1995). "Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B." Nature **376**(6536): 167-70.
- Beier, F., Z. Ali, *et al.* (2001). "TGFbeta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression." Mol Biol Cell **12**(12): 3852-63.
- Bertram, J. S. (2000). "The molecular biology of cancer." Mol Aspects Med **21**(6): 167-223.
- Bienvenu, F., H. Gascan, *et al.* (2001). "Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism." J Biol Chem **276**(20): 16840-7.
- Biswas, D. K., A. P. Cruz, *et al.* (2000). "Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8542-7.
- Biswas, D. K., S. C. Dai, *et al.* (2001). "The nuclear factor kappa B (NF-kappa B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10386-91.
- Biswas, D. K., Q. Shi, *et al.* (2004). "NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 10137-42.
- Bottazzi, M. E. and R. K. Assoian (1997). "The extracellular matrix and mitogenic growth factors control G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors." Trends Cell Biol **7**(9): 348-52.
- Bouras, T., M. C. Southey, *et al.* (2001). "Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu." Cancer Res **61**(3): 903-7.
- Brenner, D. A., M. O'Hara, *et al.* (1989). "Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha." Nature **337**(6208): 661-3.
- Brown, J. R., E. Nigh, *et al.* (1998). "Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1." Mol Cell Biol **18**(9): 5609-19.
- Burris, T. P., Z. Nawaz, *et al.* (1995). "A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9525-9.
- Cafferata, E. G., A. M. Guerrico, *et al.* (2001). "NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta." J Biol Chem **276**(18): 15441-4.
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, *et al.* (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." Trends Cell Biol **9**(12): M57-60.
- Cao, Y., G. Bonizzi, *et al.* (2001). "IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development." Cell **107**(6): 763-75.
- Castoria, G., A. Migliaccio, *et al.* (2001). "PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells." Embo J **20**(21): 6050-9.
- Castro-Rivera, E., I. Samudio, *et al.* (2001). "Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements." J Biol Chem **276**(33): 30853-61.

- Cavailles, V., S. Dauvois, *et al.* (1994). "Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10009-13.
- Cavailles, V., S. Dauvois, *et al.* (1995). "Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor." Embo J **14**(15): 3741-51.
- Clark, G. M. (1998). "Should selection of adjuvant chemotherapy for patients with breast cancer be based on erbB-2 status?" J Natl Cancer Inst **90**(18): 1320-1.
- Clarke, R., R. B. Dickson, *et al.* (1992). "Hormonal aspects of breast cancer. Growth factors, drugs and stromal interactions." Crit Rev Oncol Hematol **12**(1): 1-23.
- Clarkson, R. W., J. L. Heeley, *et al.* (2000). "NF-kappaB inhibits apoptosis in murine mammary epithelia." J Biol Chem **275**(17): 12737-42.
- Cohen, S., H. Achbert-Weiner, *et al.* (2004). "Dual effects of IkappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing." Mol Cell Biol **24**(1): 475-86.
- Colo, G. P., R. R. Rosato, *et al.* (2007). "RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis." FEBS Lett **581**(26): 5075-81.
- Colo, G. P., M. F. Rubio, *et al.* (2008). "The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmatic action." Oncogene **27**(17): 2430-44.
- Coqueret, O. (2002). "Linking cyclins to transcriptional control." Gene **299**(1-2): 35-55.
- Costas, M., T. Trapp, *et al.* (1996). "Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis." J Clin Invest **98**(6): 1409-16.
- Costas, M. A., L. Muller Igaz, *et al.* (2000). "Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1499**(1-2): 122-29.
- Couse, J. F., S. C. Hewitt, *et al.* (1999). "Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta." Science **286**(5448): 2328-31.
- Couse, J. F., J. Lindzey, *et al.* (1997). "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse." Endocrinology **138**(11): 4613-21.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Chen, F., V. Castranova, *et al.* (2001). "New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation." Am J Pathol **159**(2): 387-97.
- Chen, H., R. J. Lin, *et al.* (1997). "Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300." Cell **90**(3): 569-80.
- Chen, H., R. J. Lin, *et al.* (1999). "Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase." Cell **98**(5): 675-86.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." Nature **377**(6548): 454-7.
- Chen, L., W. Fischle, *et al.* (2001). "Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation." Science **293**(5535): 1653-7.
- Chen, L. F., Y. Mu, *et al.* (2002). "Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB." Embo J **21**(23): 6539-48.

- Cho, K. R. and B. Vogelstein (1992). "Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence." J Cell Biochem Suppl **16G**: 137-41.
- Chrivia, J. C., R. P. Kwok, *et al.* (1993). "Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP." Nature **365**(6449): 855-9.
- Danielian, P. S., R. White, *et al.* (1992). "Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors." Embo J **11**(3): 1025-33.
- Dejardin, E., V. Derewowski, *et al.* (1999). "Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells." Oncogene **18**(16): 2567-77.
- Deng, X., D. Z. Ewton, *et al.* (2003). "Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation." J Biol Chem **278**(42): 41347-54.
- Devalaraja, M. N., D. Z. Wang, *et al.* (1999). "Elevated constitutive IkappaB kinase activity and IkappaB-alpha phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO-alpha transcription." Cancer Res **59**(6): 1372-7.
- Dickson, C., V. Fantl, *et al.* (1995). "Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer." Cancer Lett **90**(1): 43-50.
- DiDonato, J. A., M. Hayakawa, *et al.* (1997). "A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB." Nature **388**(6642): 548-54.
- Diehl, J. A., M. Cheng, *et al.* (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-511.
- Diehl, J. A. and C. J. Sherr (1997). "A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase." Mol Cell Biol **17**(12): 7362-74.
- Dutertre, M. and C. L. Smith (2003). "Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains." Mol Endocrinol **17**(7): 1296-314.
- Eggert, M., C. C. Mows, *et al.* (1995). "A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor-interacting protein stimulates receptor-dependent transcription in vitro." J Biol Chem **270**(51): 30755-9.
- Evans, M. J., A. Eckert, *et al.* (2001). "Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo." Circ Res **89**(9): 823-30.
- Fantl, V., G. Stamp, *et al.* (1995). "Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development." Genes Dev **9**(19): 2364-72.
- Filmus, J., A. I. Robles, *et al.* (1994). "Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras." Oncogene **9**(12): 3627-33.
- Fischle, W., Y. Wang, *et al.* (2003). "Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond." Nature **425**(6957): 475-9.
- Font de Mora, J. and M. Brown (2000). "AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor." Mol Cell Biol **20**(14): 5041-7.
- Fotin-Mleczek, M., F. Henkler, *et al.* (2002). "Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2757-70.
- Franco, D. L., I. M. Nojek, *et al.* (2002). "Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis." Cell Death Differ **9**(10): 1090-8.
- Franco, S., M. Alsheimer, *et al.* (2002). "Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerase-deficient mice." Eur J Cell Biol **81**(6): 335-40.
- Fu, M., M. Rao, *et al.* (2003). "Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth." Mol Cell Biol **23**(23): 8563-75.

- Fu, M., C. Wang, *et al.* (2005). "Cyclin D1 represses p300 transactivation through a cyclin-dependent kinase-independent mechanism." J Biol Chem **280**(33): 29728-42.
- Fu, M., C. Wang, *et al.* (2000). "p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation." J Biol Chem **275**(27): 20853-60.
- Fuqua, S. A., C. Wiltschke, *et al.* (2000). "A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions." Cancer Res **60**(15): 4026-9.
- Galien, R. and T. Garcia (1997). "Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site." Nucleic Acids Res **25**(12): 2424-9.
- Gao, Z., P. Chiao, *et al.* (2005). "Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter." J Biol Chem **280**(22): 21091-8.
- Gerritsen, M. E., A. J. Williams, *et al.* (1997). "CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2927-32.
- Geymayer, S. and W. Doppler (2000). "Activation of NF-kappaB p50/p65 is regulated in the developing mammary gland and inhibits STAT5-mediated beta-casein gene expression." Faseb J **14**(9): 1159-70.
- Ghadimi, B. M., E. Schrock, *et al.* (1999). "Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas." Am J Pathol **154**(2): 525-36.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109 Suppl**: S81-96.
- Giguere, V. (1999). "Orphan nuclear receptors: from gene to function." Endocr Rev **20**(5): 689-725.
- Giguere, V., A. Tremblay, *et al.* (1998). "Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling." Steroids **63**(5-6): 335-9.
- Gilmore, T. D., M. Koedood, *et al.* (1996). "Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer." Oncogene **13**(7): 1367-78.
- Gill, G. and M. Ptashne (1988). "Negative effect of the transcriptional activator GAL4." Nature **334**(6184): 721-4.
- Glaeser, M., T. Floetotto, *et al.* (2001). "Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas." Horm Metab Res **33**(3): 121-6.
- Gnanapragasam, V. J., H. Y. Leung, *et al.* (2001). "Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer." Br J Cancer **85**(12): 1928-36.
- Guo, Y., K. Yang, *et al.* (2005). "Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis." Oncogene **24**(16): 2599-612.
- Guttridge, D. C., C. Albanese, *et al.* (1999). "NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1." Mol Cell Biol **19**(8): 5785-99.
- Hahnfeldt, P., D. Panigrahy, *et al.* (1999). "Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy." Cancer Res **59**(19): 4770-5.
- Halachmi, S., E. Marden, *et al.* (1994). "Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription." Science **264**(5164): 1455-8.
- Hall, J. and S. Angele (1999). "Radiation, DNA damage and cancer." Mol Med Today **5**(4): 157-64.

- Hall, J. M. and D. P. McDonnell (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." Endocrinology **140**(12): 5566-78.
- Han, S., K. Park, *et al.* (2003). "Cyclin D1 expression and patient outcome after tamoxifen therapy in estrogen receptor positive metastatic breast cancer." Oncol Rep **10**(1): 141-4.
- Harnish, D. C., M. S. Scicchitano, *et al.* (2000). "The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells." Endocrinology **141**(9): 3403-11.
- Harris, H., O. J. Miller, *et al.* (1969). "Suppression of malignancy by cell fusion." Nature **223**(5204): 363-8.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-224.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, *et al.* (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." Nature **387**(6634): 733-6.
- Heissmeyer, V., D. Krappmann, *et al.* (1999). "NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes." Embo J **18**(17): 4766-78.
- Henke, R. T., B. R. Haddad, *et al.* (2004). "Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma." Clin Cancer Res **10**(18 Pt 1): 6134-42.
- Hennighausen, L. and G. W. Robinson (2001). "Signaling pathways in mammary gland development." Dev Cell **1**(4): 467-75.
- Herber, B., M. Truss, *et al.* (1994). "Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter." Oncogene **9**(7): 2105-7.
- Hinds, P. W., S. F. Dowdy, *et al.* (1994). "Function of a human cyclin gene as an oncogene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 709-13.
- Hinz, M., D. Krappmann, *et al.* (1999). "NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition." Mol Cell Biol **19**(4): 2690-8.
- Hoffmann, A., T. H. Leung, *et al.* (2003). "Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities." Embo J **22**(20): 5530-9.
- Holnthoner, W., M. Pillinger, *et al.* (2002). "Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells." J Biol Chem **277**(48): 45847-53.
- Horlein, A. J., A. M. Naar, *et al.* (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." Nature **377**(6548): 397-404.
- Hsu, H., J. Xiong, *et al.* (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Hsu, S. M., Y. C. Chen, *et al.* (2000). "17 beta-estradiol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor-kappa B activation by increasing nuclear factor-kappa B p105 level in MCF-7 breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **279**(1): 47-52.
- Hu, J. and N. H. Colburn (2005). "Histone deacetylase inhibition down-regulates cyclin D1 transcription by inhibiting nuclear factor-kappaB/p65 DNA binding." Mol Cancer Res **3**(2): 100-9.

- Hu, Y., V. Baud, *et al.* (1999). "Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK $\alpha$  subunit of I $\kappa$ B kinase." Science **284**(5412): 316-20.
- Hui, R., G. L. Finney, *et al.* (2002). "Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells." Cancer Res **62**(23): 6916-23.
- Hulit, J., C. Wang, *et al.* (2004). "Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice." Mol Cell Biol **24**(17): 7598-611.
- Huxford, T., D. B. Huang, *et al.* (1998). "The crystal structure of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex reveals mechanisms of NF- $\kappa$ B inactivation." Cell **95**(6): 759-70.
- Hwang, T. S., H. S. Han, *et al.* (2003). "Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients." Pathol Int **53**(2): 74-80.
- Ignar-Trowbridge, D. M., K. G. Nelson, *et al.* (1992). "Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4658-62.
- Ikeda, K., S. Ogawa, *et al.* (2004). "Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription." Mol Endocrinol **18**(5): 1131-43.
- Israel, A. (2000). "The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B?" Trends Cell Biol **10**(4): 129-33.
- Iyengar, P., T. P. Combs, *et al.* (2003). "Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization." Oncogene **22**(41): 6408-23.
- Jacq, X., C. Brou, *et al.* (1994). "Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor." Cell **79**(1): 107-17.
- Jordan, V. C. (1999). "Targeted Antiestrogens to Prevent Breast Cancer." Trends Endocrinol Metab **10**(8): 312-17.
- Jordan, V. C. and M. Morrow (1999). "Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer." Endocr Rev **20**(3): 253-78.
- Joyce, D., C. Albanese, *et al.* (2001). "NF- $\kappa$ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 73-90.
- Kato, S., H. Endoh, *et al.* (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science **270**(5241): 1491-4.
- Kato, T., Jr., M. Delhase, *et al.* (2003). "CK2 Is a C-Terminal I $\kappa$ B Kinase Responsible for NF- $\kappa$ B Activation during the UV Response." Mol Cell **12**(4): 829-39.
- Kenny, F. S., R. Hui, *et al.* (1999). "Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer." Clin Cancer Res **5**(8): 2069-76.
- Korach, K. S. (1994). "Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor." Science **266**(5190): 1524-7.
- Kousteni, S., T. Bellido, *et al.* (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity." Cell **104**(5): 719-30.

- Krege, J. H., J. B. Hodgin, *et al.* (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15677-82.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, *et al.* (1997a). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology **138**(3): 863-70.
- Kuiper, G. G. and J. A. Gustafsson (1997b). "The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens." FEBS Lett **410**(1): 87-90.
- Kushner, P. J., D. A. Agard, *et al.* (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(5): 311-7.
- Kwak, Y. T., R. Li, *et al.* (2005). "IkappaB kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation." J Biol Chem **280**(40): 33945-52.
- Kwok, R. P., J. R. Lundblad, *et al.* (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB." Nature **370**(6486): 223-6.
- Landis, S. H., T. Murray, *et al.* (1999). "Cancer statistics, 1999." CA Cancer J Clin **49**(1): 8-31, 1.
- Lanz, R. B., N. J. McKenna, *et al.* (1999). "A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex." Cell **97**(1): 17-27.
- Larrick, J. W. and S. C. Wright (1990). "Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha." Faseb J **4**(14): 3215-23.
- Lawrence, T., M. Bebiien, *et al.* (2005). "IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation." Nature **434**(7037): 1138-43.
- Lee, J. W., F. Ryan, *et al.* (1995). "Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator." Nature **374**(6517): 91-4.
- Lee, R. J., C. Albanese, *et al.* (1999). "pp60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells." J Biol Chem **274**(11): 7341-50.
- Li, H., P. J. Gomes, *et al.* (1997). "RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8479-84.
- Li, Q., Q. Lu, *et al.* (1999). "IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton." Genes Dev **13**(10): 1322-8.
- Liao, L., X. Chen, *et al.* (2008). "Steroid receptor coactivator 3 maintains circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) by controlling IGF-binding protein 3 expression." Mol Cell Biol **28**(7): 2460-9.
- Liao, L., S. Q. Kuang, *et al.* (2002). "Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1." J Steroid Biochem Mol Biol **83**(1-5): 3-14.
- Lin, H. M., L. Zhao, *et al.* (2002). "Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors." J Biol Chem **277**(32): 28733-41.
- Liu, Z. G., H. Hsu, *et al.* (1996). "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death." Cell **87**(3): 565-76.

- Louie, M. C., A. S. Revenko, *et al.* (2006). "Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity." Mol Cell Biol **26**(10): 3810-23.
- Louie, M. C., J. X. Zou, *et al.* (2004). "ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance." Mol Cell Biol **24**(12): 5157-71.
- Love, R. R., R. B. Mazess, *et al.* (1992). "Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer." N Engl J Med **326**(13): 852-6.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995a). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-50.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, *et al.* (1995b). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-9.
- Matsumura, I., T. Kitamura, *et al.* (1999). "Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells." Embo J **18**(5): 1367-77.
- Matsushime, H., M. E. Ewen, *et al.* (1992). "Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins." Cell **71**(2): 323-34.
- McInerney, E. M., D. W. Rose, *et al.* (1998). "Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation." Genes Dev **12**(21): 3357-68.
- McKenna, N. J., R. B. Lanz, *et al.* (1999a). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." Endocr Rev **20**(3): 321-44.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Minireview: nuclear receptor coactivators--an update." Endocrinology **143**(7): 2461-5.
- McKenna, N. J., J. Xu, *et al.* (1999b). "Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions." J Steroid Biochem Mol Biol **69**(1-6): 3-12.
- McMahon, C., T. Suthiphongchai, *et al.* (1999). "P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5382-7.
- Mendelsohn, M. E. (2000). "Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean?" Circ Res **87**(11): 956-60.
- Meyer, M. E., H. Gronemeyer, *et al.* (1989). "Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function." Cell **57**(3): 433-42.
- Migliaccio, A., D. Piccolo, *et al.* (1998). "Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor." Embo J **17**(7): 2008-18.
- Mukaida, N., M. Morita, *et al.* (1994). "Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression." J Biol Chem **269**(18): 13289-95.
- Mukhopadhyay, T., J. A. Roth, *et al.* (1995). "Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma." Oncogene **11**(5): 999-1003.
- Mussi, P., C. Yu, *et al.* (2006). "Stimulation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) gene overexpression by a positive regulatory loop of E2F1 and SRC-3." Mol Endocrinol **20**(12): 3105-19.

- Myers, E., A. D. Hill, *et al.* (2005). "Associations and interactions between Ets-1 and Ets-2 and coregulatory proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in breast cancer." Clin Cancer Res **11**(6): 2111-22.
- Na, S. Y., S. K. Lee, *et al.* (1998). "Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations." J Biol Chem **273**(18): 10831-4.
- Nelsen, C. J., D. G. Rickheim, *et al.* (2003). "Amino acids regulate hepatocyte proliferation through modulation of cyclin D1 expression." J Biol Chem **278**(28): 25853-8.
- Neuman, E., M. H. Ladha, *et al.* (1997). "Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4." Mol Cell Biol **17**(9): 5338-47.
- O'Malley, B. W., W. T. Schrader, *et al.* (1995). "An alternative ligand-independent pathway for activation of steroid receptors." Recent Prog Horm Res **50**: 333-47.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, *et al.* (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." Science **270**(5240): 1354-7.
- Orlinick, J. R. and M. V. Chao (1998). "TNF-related ligands and their receptors." Cell Signal **10**(8): 543-51.
- Osborn, L., C. Hession, *et al.* (1989). "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes." Cell **59**(6): 1203-11.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-66.
- Peeper, D. S., T. M. Upton, *et al.* (1997). "Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein." Nature **386**(6621): 177-81.
- Petre, C. E., Y. B. Wetherill, *et al.* (2002). "Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity." J Biol Chem **277**(3): 2207-15.
- Planas-Silva, M. D., Y. Shang, *et al.* (2001). "AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression." Cancer Res **61**(10): 3858-62.
- Power, R. F., S. K. Mani, *et al.* (1991). "Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors." Science **254**(5038): 1636-9.
- Rao, P. N. and R. T. Johnson (1970). "Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis." Nature **225**(5228): 159-64.
- Rao, S. S., C. Chu, *et al.* (1994). "Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators." Mol Cell Biol **14**(8): 5259-67.
- Ratineau, C., M. W. Petry, *et al.* (2002). "Cyclin D1 represses the basic helix-loop-helix transcription factor, BETA2/NeuroD." J Biol Chem **277**(11): 8847-53.
- Ray, A. and K. E. Prefontaine (1994). "Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 752-6.
- Ray, P., S. K. Ghosh, *et al.* (1997). "Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor." FEBS Lett **409**(1): 79-85.
- Reiter, R., A. Wellstein, *et al.* (2001). "An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer." J Biol Chem **276**(43): 39736-41.
- Reutens, A. T., M. Fu, *et al.* (2001). "Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner." Mol Endocrinol **15**(5): 797-811.

- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge, *et al.* (1999). "Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex." J Biol Chem **274**(32): 22296-302.
- Rothe, M., V. Sarma, *et al.* (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." Science **269**(5229): 1424-7.
- Rowan, B. G., N. L. Weigel, *et al.* (2000). "Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **275**(6): 4475-83.
- Russell, A., M. A. Thompson, *et al.* (1999). "Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer." Oncogene **18**(11): 1983-91.
- Sabbah, M., D. Courilleau, *et al.* (1999). "Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11217-22.
- Sadovsky, Y., P. Webb, *et al.* (1995). "Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein." Mol Cell Biol **15**(3): 1554-63.
- Sakakura, C., A. Hagiwara, *et al.* (2000). "Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers." Int J Cancer **89**(3): 217-23.
- Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, *et al.* (1995). "Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids." Science **270**(5234): 283-6.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, *et al.* (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." Nature **372**(6508): 786-91.
- Schule, R., M. Muller, *et al.* (1988). "Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors." Science **242**(4884): 1418-20.
- Segnitz, B. and U. Gehring (1995). "Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2179-83.
- Shang, Y. and M. Brown (2002). "Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs." Science **295**(5564): 2465-8.
- Shang, Y., X. Hu, *et al.* (2000). "Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription." Cell **103**(6): 843-52.
- Shemshedini, L., R. Knauthe, *et al.* (1991). "Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors." Embo J **10**(12): 3839-49.
- Sheppard, K. A., K. M. Phelps, *et al.* (1998). "Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1." J Biol Chem **273**(45): 29291-4.
- Sheppard, K. A., D. W. Rose, *et al.* (1999). "Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators." Mol Cell Biol **19**(9): 6367-78.
- Sherr, C. J. (1996). "Cancer cell cycles." Science **274**(5293): 1672-7.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, *et al.* (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5522-7.
- Sicinski, P., J. L. Donaher, *et al.* (1995). "Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast." Cell **82**(4): 621-30.

- Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, *et al.* (2000). "Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase." Nature **407**(6803): 538-41.
- Smith, C. L. (1998). "Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways." Biol Reprod **58**(3): 627-32.
- Smith, C. L., O. M. Conneely, *et al.* (1993). "Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6120-4.
- Smith, C. L., Z. Nawaz, *et al.* (1997). "Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen." Mol Endocrinol **11**(6): 657-66.
- Solomon, D. A., Y. Wang, *et al.* (2003). "Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation." J Biol Chem **278**(32): 30339-47.
- Song, D. H., B. Rana, *et al.* (2003). "Gastrin-induced gastric adenocarcinoma growth is mediated through cyclin D1." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(1): G217-22.
- Sovak, M. A., R. E. Bellas, *et al.* (1997). "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer." J Clin Invest **100**(12): 2952-60.
- Speir, E., Z. X. Yu, *et al.* (2000). "Competition for p300 regulates transcription by estrogen receptors and nuclear factor-kappaB in human coronary smooth muscle cells." Circ Res **87**(11): 1006-11.
- Strasser, A., L. O'Connor, *et al.* (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-45.
- Sumitomo, M., M. Tachibana, *et al.* (1999). "Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression." Hum Gene Ther **10**(1): 37-47.
- Sun, W. H., E. T. Keller, *et al.* (1998). "Estrogen inhibits phorbol ester-induced I kappa B alpha transcription and protein degradation." Biochem Biophys Res Commun **244**(3): 691-5.
- Suzui, M., M. Masuda, *et al.* (2002). "Growth inhibition of human hepatoma cells by acyclic retinoid is associated with induction of p21(CIP1) and inhibition of expression of cyclin D1." Cancer Res **62**(14): 3997-4006.
- Takeda, K., O. Takeuchi, *et al.* (1999). "Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha." Science **284**(5412): 313-6.
- Takeshita, A., G. R. Cardona, *et al.* (1997). "TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1." J Biol Chem **272**(44): 27629-34.
- Tartaglia, L. A. and D. V. Goeddel (1992). "Two TNF receptors." Immunol Today **13**(5): 151-3.
- Torchia, J., D. W. Rose, *et al.* (1997). "The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function." Nature **387**(6634): 677-84.
- Traenckner, E. B., H. L. Pahl, *et al.* (1995). "Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli." Embo J **14**(12): 2876-83.
- Tzukerman, M. T., A. Esty, *et al.* (1994). "Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions." Mol Endocrinol **8**(1): 21-30.

- Valentine, J. E., E. Kalkhoven, *et al.* (2000). "Mutations in the estrogen receptor ligand binding domain discriminate between hormone-dependent transactivation and transrepression." J Biol Chem **275**(33): 25322-9.
- van Steeg, H. and K. H. Kraemer (1999). "Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer." Mol Med Today **5**(2): 86-94.
- Vanden Berghe, W., S. Plaisance, *et al.* (1998). "p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor." J Biol Chem **273**(6): 3285-90.
- Verrijzer, C. P., J. L. Chen, *et al.* (1995). "Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II." Cell **81**(7): 1115-25.
- Wahl, C., S. Liptay, *et al.* (1998). "Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B." J Clin Invest **101**(5): 1163-74.
- Wang, C., M. Fu, *et al.* (2001a). "Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity." J Biol Chem **276**(21): 18375-83.
- Wang, C., M. Fu, *et al.* (2001b). "Inhibition of cellular proliferation through IkappaB kinase-independent and peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of cyclin D1." Mol Cell Biol **21**(9): 3057-70.
- Wang, C., Z. Li, *et al.* (2004). "Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential." Cancer Treat Res **119**: 217-37.
- Wang, C., N. Pattabiraman, *et al.* (2003). "Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation." Mol Cell Biol **23**(17): 6159-73.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, *et al.* (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." Science **274**(5288): 784-7.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, *et al.* (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science **281**(5383): 1680-3.
- Wang, T. C., R. D. Cardiff, *et al.* (1994). "Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice." Nature **369**(6482): 669-71.
- Wang, Y., M. C. Wu, *et al.* (2002). "Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray." Cancer **95**(11): 2346-52.
- Watanabe, G., C. Albanese, *et al.* (1998). "Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1." Mol Cell Biol **18**(6): 3212-22.
- Watanabe, G., A. Howe, *et al.* (1996). "Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12861-6.
- Webb, P., G. N. Lopez, *et al.* (1995). "Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens." Mol Endocrinol **9**(4): 443-56.
- Webb, P., P. Nguyen, *et al.* (1998). "Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins." Mol Endocrinol **12**(10): 1605-18.
- Weinstat-Saslow, D., M. J. Merino, *et al.* (1995). "Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions." Nat Med **1**(12): 1257-60.
- Werbajh, S., I. Nojek, *et al.* (2000). "RAC-3 is a NF-kappa B coactivator." FEBS Lett **485**(2-3): 195-9.

- Westerheide, S. D., M. W. Mayo, *et al.* (2001). "The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition." Mol Cell Biol **21**(24): 8428-36.
- Wu, R. C., J. Qin, *et al.* (2002). "Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase." Mol Cell Biol **22**(10): 3549-61.
- Xiao, W. (2004). "Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription." Cell Mol Immunol **1**(6): 425-35.
- Xu, J., L. Liao, *et al.* (2000). "The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6379-84.
- Yamamoto, M., S. Yamazaki, *et al.* (2004). "Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta." Nature **430**(6996): 218-22.
- Yamamoto, Y., U. N. Verma, *et al.* (2003). "Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression." Nature **423**(6940): 655-9.
- Yu, Q., Y. Geng, *et al.* (2001). "Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation." Nature **411**(6841): 1017-21.
- Yuan, Y., L. Liao, *et al.* (2002). "Steroid receptor coactivator-3 is required for inhibition of neointima formation by estrogen." Circulation **105**(22): 2653-9.
- Zhang, H. Y. and A. P. Young (1991). "A single upstream glucocorticoid response element juxtaposed to an AP1/ATF/CRE-like site renders the chicken glutamine synthetase gene hormonally inducible in transfected retina." J Biol Chem **266**(36): 24332-8.
- Zou, Y., D. Z. Ewton, *et al.* (2004). "Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288." J Biol Chem **279**(26): 27790-8.
- Zwijnsen, R. M., R. S. Buckle, *et al.* (1998). "Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1." Genes Dev **12**(22): 3488-98.
- Zwijnsen, R. M., E. Wientjens, *et al.* (1997). "CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1." Cell **88**(3): 405-15.