



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS A TRAVÉS DE SU DOMINIO
AF1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. IVÁN MENESES MORALES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Éste estudio se realizó bajo la dirección del Dr. Alfonso León Del Río, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial estuvo integrado por el Dr. Alfonso León Del Río, la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo y el Dr. Horacio Merchant Larios.

Este trabajo fue parcialmente financiado por donativos del Programa de Investigación de Cáncer de mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y por un donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD-C02-14467.

Durante la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas recibí una beca doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por ofrecer la infraestructura necesaria para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada para mis estudios doctorales.

Agradezco a mi tutor el Dr. Alfonso León Del Río por brindarme su apoyo, confianza y experiencia durante el desarrollo de mis estudios de doctorado en su laboratorio.

Agradezco también a los miembros de mi Comité Tutorial: La Dra. Lourdes Massieu Trigo y el Dr. Horacio Merchant Larios por todo su apoyo y consejos que recibí durante este proceso.

Agradezco a los miembros de mi Jurado de Examen de Grado: A la Dra. Aurea Orozco Rivas por sus valiosos comentarios que ayudaron a enriquecer y mejorar la presente tesis; al Dr. Alfonso León Del Río por su apoyo durante la realización de mis estudios doctorales; a la Dra. Marcela Lizano Soberón por sus comentarios sobre mi tesis; a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta le agradezco su compromiso y comentarios hechos sobre mi escrito y al Dr. Carlos Rosales Ledezma por su apoyo incondicional durante el proceso de revisión de tesis.

Agradezco al Dr. Félix Recillas Targa por haberme recibido en su laboratorio y al Dr. Ernesto Soto Reyes por brindarme su asesoría durante la realización de los experimentos de inmuno-precipitación de cromatina.

Agradezco al Dr. Mario Zurita Ortega por recibirme en su laboratorio y a la Dra. Viviana Valadez Graham por brindarme su asesoría durante la realización de los experimentos de co-inmuno-precipitación e inmuno-precipitación de cromatina.

Agradezco al Dr. Eduardo García Zepeda por recibirme en su laboratorio, a la Dra. Erika Méndez Enríquez por brindarme su asesoría y a la Dra. Cynthia Paola López Pacheco por su apoyo brindado durante la realización de los experimentos de citometría de flujo.

Agradezco al Dr. Alfonso González Noriega y la bióloga Colette Ginette Michalak Sudomirska por su asesoría y apoyo técnico durante el desarrollo de los experimentos de inmunofluorescencia.

Agradezco especialmente a todos los miembros del laboratorio del Dr. León Del Río, en particular al M.C. Rafael Cervantes Roldán por su apoyo y experiencia brindados durante la realización del GST-Pulldown.

A la Dra. Isis Trujillo González por su apoyo para la realización de los ensayos de captura por GST, ensayo de transactivación por heterólogo y transfecciones transitorias.

A la Dra. Ángeles Tecalco Cruz por la realización de los ensayos de co-inmunoprecipitación, ChIP y Re-ChIP.

A la M.C. Vania Gómez Romero por la realización de los ensayos de tumorigénesis en modelo murino.

Al Dr. Tonatiuh Barrios García por su apoyo durante la realización de transfecciones transitorias.

Índice

- Resumen	- 5
- Introducción	- 8
- Antecedentes Generales	- 9
- Antecedentes Específicos	- 13
- Justificación	- 14
- Hipótesis	- 14
- Objetivo general	- 14
- Objetivos Específicos	- 14
- Resultados	- 15
- Discusión	- 38
- Metodología	- 42
- Referencias	- 55
- Apéndice I: Artículo de investigación: SIP1/NHERF2 enhances estrogen receptor alpha transactivation in breast cancer cells.	- 60
- Apéndice II: Colaboraciones en otros artículos de investigación.	- 76

Resumen

El receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) es un factor de transcripción activable por ligando, el cual posee dos dominios con función de activación transcripcional, denominados AF-1 y AF-2. El papel de AF-2 es reclutar complejos de proteínas co-reguladoras, capaces de modificar el nivel de condensación de la cromatina. En contraste, el mecanismo responsable de la actividad independiente de ligando de AF-1 y de su sinergia funcional con AF-2 es aún desconocido. En este trabajo se identificó a la proteína NHERF2 como un co-activador asociado al $RE\alpha$, que interactúa preferentemente con el dominio AF-1.

La sobre-expresión de NHERF2, en la línea celular de cáncer de mama MCF7, resultó en un aumento en la transactivación mediada por el $RE\alpha$. De manera interesante se encontró que la expresión del co-activador SRC-1 en células MCF7, que sobre-expresan de manera estable a NHERF2, produce un incremento sinérgico en la actividad del $RE\alpha$. También se describe la interacción de NHERF2 con el $RE\alpha$ y SRC-1 en la región promotora de genes regulados por la actividad del receptor de estrógenos. La asociación de NHERF2 con el $RE\alpha$ en células MCF7 aumenta la proliferación celular y la habilidad de estas células para formar tumores en un modelo murino.

Se analizó la expresión del ARNm de NHERF2 en muestras de tumores de cáncer de mama en humanos y se encontró en 10 de 22 muestras analizadas, un aumento de 2 a 17 veces con respecto a tejido normal. Se consultaron bases públicas con datos de micro-arreglos (www.oncomine.org) en tejido tumoral y normal y se corroboró sobre-expresión de NHERF2 en muestras de tumores de mama, principalmente positivos al receptor a estrógenos.

Estos resultados sugieren que NHERF2 es un co-activador fuerte del $RE\alpha$ y que puede tener un papel importante en el desarrollo de tumores de mama dependientes de estrógenos.

Abstract

The estrogen receptor alpha (ER α) is a ligand activated transcription factor that possesses two activating domains designated AF-1 and AF-2 that mediate its transcriptional activity. The role of AF-2 is to recruit coregulator protein-complexes capable of modifying chromatin condensation status. In contrast, the mechanism responsible for the ligand-independent AF-1 activity and for its synergistic functional interaction with AF-2 is unclear.

In this study we have identified the protein NHERF2 as an ER α associated coactivator that interacts predominantly with the AF-1 domain of the nuclear receptor. Overexpression of NHERF2 in breast cancer MCF7 cells produced an increase in ER α transactivation. Interestingly, the presence of SRC-1 in NHERF2 stably overexpressing MCF7 cells produced a synergistic increase in ER α activity. We also show that NHERF2 interacts with ER α and SRC-1 in the promoter region of ER α target genes. The binding of NHERF2 to ER α in MCF7 cells increased cell proliferation and the ability of MCF7 cells to form tumors in a mouse model.

We analyzed the expression of NHERF2 in breast cancer tumors and found a 2-17-fold increase in mRNA levels in 45% of the tumor samples compared to normal breast tissue. Also, we accessed public microarray data sets (www.oncomine.org) of studies in normal and breast cancer tumors, and found that the latter display NHERF2 overexpression in estrogen receptor positive-tumor samples.

These results indicate that NHERF2 is a coactivator of ER α that may participate in the development of estrogen-dependent breast cancer tumors.

Introducción

Los estrógenos son hormonas esteroides que activan factores de transcripción específicos, conocidos como receptores nucleares de estrógenos o RE. La activación del RE α (NR3A1) se ha relacionado con el crecimiento y diferenciación celular en glándula mamaria y la pérdida de regulación en su actividad se ha asociado con el desarrollo de cáncer.

La actividad transcripcional del RE α se regula a través de su interacción con co-activadores y co-represores, que al asociarse al receptor permiten o reprimen la transcripción de genes activados por estrógenos. Existe evidencia que relaciona la sobre-expresión de algunos co-activadores del RE α con el desarrollo de tumores de mama dependientes de estrógenos.

En la presente tesis se describe la caracterización de NHERF2 como un co-activador fuerte del RE α , así como las repercusiones biológicas de su sobre-expresión, principalmente las asociadas al aumento en la proliferación de células de cáncer de mama. A través de ensayos funcionales con líneas celulares de cáncer de mama, se determinó que NHERF2 es un co-activador con capacidad intrínseca de activación transcripcional, por lo que al ser reclutado por el RE α directamente al promotor de genes activados por estrógenos aumenta su transcripción, la proliferación celular y la habilidad de estas células para formar tumores en un modelo murino.

Además se observó una alta prevalencia de sobre-expresión determinar la expresión de NHERF2 en muestras de cáncer de mama de pacientes mexicanas diagnosticadas en estadios tempranos. Dato que se corroboró al analizar datos de la expresión del co-activador en bases públicas internacionales de micro-arreglos realizados con muestras de cáncer de mama y tejido normal.

Así el trabajo descrito en esta tesis presenta a NHERF2 como un co-activador importante del receptor de estrógenos alfa y sienta las bases para el estudio de su participación en el desarrollo de tumores de mama positivos para el RE α .

Antecedentes Generales

Receptor de estrógenos:

El receptor de estrógenos alfa (RE α) pertenece al grupo de receptores de esteroides (Fig. 1), que se caracterizan por compartir una estructura modular, compuesta por un dominio de unión a ADN, una región flexible que sirve como bisagra durante las modificaciones estructurales del receptor, un dominio carboxilo-terminal altamente conservado que alberga la región de unión a ligando, la cual regula directamente la actividad de un dominio de activación transcripcional denominado AF-2. En la región amino-terminal los receptores nucleares presentan una alta variabilidad en cuanto a secuencia, estructura y longitud, además de contener uno o varios dominios con función de activación transcripcional, denominados en su conjunto como AF-1 los cuales presentan actividad transactivacional intrínseca, regulable por modificaciones postraduccionales o mediante su interacción con proteínas co-reguladoras (Lavery & McEwan 2005; Kumar & Litwack 2009).

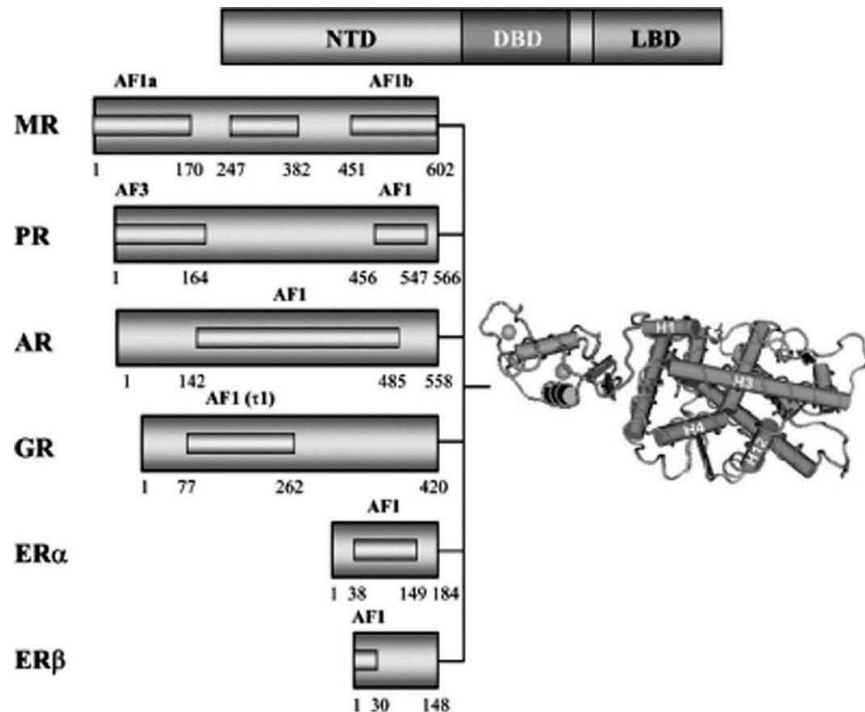


Fig. 1 Representación gráfica de la estructura de los receptores de esteroides. Las regiones de unión a ADN (DBD) y de unión a ligando (LBD) se encuentran altamente conservadas, la región amino-terminal se muestra con las diferencias características de cada receptor, las cajas internas representan dominios con capacidad de transactivación intrínseca (AF1) (Lavery & McEwan 2005).

Mecanismo de acción:

El RE α es un factor de transcripción que lleva a cabo sus funciones a través de dos posibles vías: genómica y no genómica (Acconcia & Kumar 2006). La vía no genómica del RE α se encuentra en plena discusión, por lo que aún no se determina si la respuesta citoplásmica a estrógenos se debe a la activación de un receptor de estrógenos de membrana, denominado GPR30 (Maggiolini & Picard 2010; Revankar et al. 2005; Langer et al. 2010), o si es el mismo receptor de estrógenos alfa que mediante la activación conjunta de la cinasa c-Src y el receptor de progesterona, activan la cascada de cinasas responsable de la activación de genes de respuesta a estrógenos (Shupnik 2004). La vía genómica o clásica del RE α inicia con la unión de estrógeno al receptor lo que favorece su dimerización y posterior translocación al núcleo celular, donde reconoce a una secuencia específica en el promotor de los genes blanco, denominado Elemento de Respuesta a Estrógenos (ERE) (Klinge 2001). Una vez asociado el RE α al promotor del gen de respuesta a estrógenos, adquiere una conformación transcripcionalmente activa, por lo que se facilitan una serie de interacciones con varias proteínas co-reguladoras, así como también con la maquinaria basal de transcripción (Gruber et al. 2004).

Regulación de actividad transcripcional:

Está ampliamente documentado que la transcripción es un proceso altamente regulado y que en él participan complejos multiprotéicos, por lo que no es sorprendente que a la fecha se hayan caracterizado más de 350 co-reguladores (www.NURSA.org). La transcripción genética es un proceso altamente dinámico, donde se llevan a cabo múltiples procesos reversibles de activación y represión, mediante modificaciones postraduccionales de la cromatina, así como también de las proteínas co-reguladoras participantes en el complejo transcripcional, lo que puede interpretarse como un código de regulación transcripcional (Lonard & O'malley 2007; Han et al. 2014; Hermanson et al. 2002).

La regulación de la expresión genética mediada por el RE α , se lleva a cabo a través de la interacción del receptor con varias proteínas que tienen función de co-activadores o co-represores (Glass & Rosenfeld 2000). Algunos de los co-activadores con los que interactúa el dominio AF-2 pertenecen a la familia de p160/SRC-1 y p300/CBP, proteínas

que poseen la capacidad de acetilar los residuos de lisina en las histonas, lo que tiene como consecuencia el relajamiento en la estructura de la cromatina, permitiendo de esta manera el ensamblaje de la maquinaria basal de la transcripción sobre el promotor de los genes blanco (Fig. 2) (Xu & Li 2003). Otros factores que también se unen a esta región funcionan como co-represores, tal es el caso de los complejos de NCoR y SMRT, que reprimen la actividad transcripcional mediada por el $RE\alpha$, reclutando a desacetilasas de histonas o bloqueando directamente el dominio de transactivación AF2 (Torchia et al. 1998).

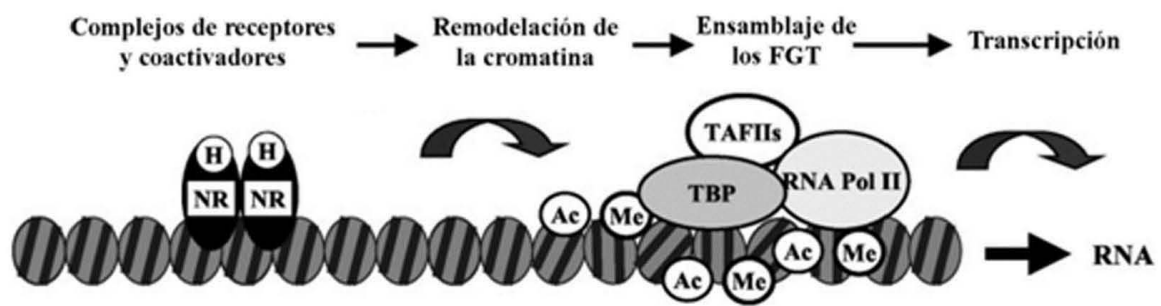


Fig. 2 Esquema de los procesos secuenciales que activan la transcripción genética mediada por receptores nucleares. La unión de la hormona (H) al dímero de receptores nucleares (NR) desencadena el reclutamiento de co-activadores, los cuales mediante una serie de reacciones (Ac, acetilación; Me, metilación) permiten la remodelación en la estructura de la cromatina en el promotor del gen diana y el ensamblaje de los factores generales de transcripción (FGT) para su transcripción (Xu & Li 2003).

Los co-reguladores asociados al dominio de unión a ligando y a la función de activación transcripcional AF-2 han sido ampliamente documentados en la literatura, la mayoría de ellos comparten dominios de interacción, de las cuales se ha podido determinar su estructura cristalina y se sabe que son definidas por la secuencia de aminoácidos LXXLL para los co-activadores y de LXXI/HIXXXI/L para los co-represores (Moras & Gronemeyer 1998; Perissi et al. 1999).

AF-1 es un dominio de activación transcripcional muy importante en los receptores a esteroides, posee una estructura desordenada en solución acuosa y una elevada plasticidad estructural, lo que le permite tener un alto número de conformeros y de potenciales parejas de interacción (Kumar & Litwack 2009; Kumar & Thompson 2003). Aunque no se ha elucidado a la fecha el mecanismo por el cual AF-1 lleva a cabo su

función de transactivación, se ha sugerido la necesidad de un paso previo de estabilización en la estructura de AF-1, que puede darse mediante la interacción con osmolitos orgánicos, fosforilación de residuos específicos o por un mecanismo de plegamiento inducido, regulado por interacciones inter- e intra- moleculares (Métivier et al. 2000; Kumar & Thompson 2012; Lavery & McEwan 2008). Se sugiere que la interacción de un conformero particular de AF-1 con un co-regulador específico conduce a la estabilización estructural del dominio, permitiendo el inicio de una reacción en cadena de interacciones y el reclutamiento de factores de transcripción asociados a la acción transcripcional de AF-1 (Webb et al. 1998). Se han caracterizado varios factores celulares que son capaces de interactuar con este dominio, modificando así la actividad del RE α , aunque la diversidad de los mismos ha dificultado establecer la naturaleza de los mecanismos por los cuales estas proteínas regulan la actividad del receptor de estrógenos (<http://www.picard.ch/downloads/ERinteractors.pdf>).

Colaboración intra-molecular entre AF-1 y AF-2:

Diversos estudios han demostrado que la actividad del receptor de estrógenos alfa humano, depende del tipo celular y del contexto del promotor sobre el cual actúe (Thompson & Kumar 2003; Mérot et al. 2004). Dependiendo de estas variables la participación de los dominios AF-1 y AF-2 en la actividad total del receptor de estrógenos puede ser diferente. Sin embargo, se ha demostrado que se requiere la integridad de ambos dominios para obtener la máxima respuesta del RE α , lo que sugiere que a pesar de llevar a cabo su función por mecanismos distintos, hay una relación de posible carácter sinérgico entre ellos (Métivier et al. 2002; Kraus et al. 1995b; Zwart et al. 2010). Se ha reportado en la literatura que el mecanismo de colaboración transcripcional entre los dominios AF-1 y AF-2 puede ser mediado y regulado por interacción con proteínas co-reguladoras, como SRC-1 de la familia de co-activadores p160 (McInerney et al. 1996b; Métivier et al. 2001; Onate et al. 1998).

Antecedentes específicos

Para identificar factores celulares que fueran capaces de interactuar de manera específica con el dominio AF-1 de RE α se tamizó, utilizando el sistema de doble híbrido en levadura, una biblioteca de ADNc obtenida de tejido humano de mama. De un total de 11 clonas obtenidas, dos presentaron el 98% del total de la secuencia del ARNm de la proteína NHERF2.

NHERF2 es una proteína de 337 aminoácidos que se caracteriza por tener dos dominios de tipo PDZ, que son un tipo de dominio estructural de 80-90 aminoácidos que se encuentra en proteínas de señalización y andamiaje. Forma parte de la familia NHERF (Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factors), caracterizada por presentar uno o varios dominios PDZ, lo que les confiere la habilidad de unir proteínas membranales con citoplasmáticas para regular el metabolismo y crecimiento celular. Existen reportes que sugieren que las proteínas NHERF son capaces de trasladarse al núcleo celular, donde pueden asociarse a factores transcripcionales y favorecer su unión a proteínas asociadas a ADN, promoviendo de esta manera la activación de diversos genes (Voltz et al. 2001; Harris & Lim 2001). Algunos co-activadores transcripcionales de tipo PDZ ya han sido reportados en la literatura, como GRIP1b, GRIP τ o Bridge-1, el cual tiene la capacidad de reclutar a la acetil-transferasa de histonas p300 a través de su dominio PDZ. También se ha demostrado la importancia del dominio PDZ en SATB1 para ejercer su función de represión transcripcional (Yu et al. 2001; Nakata et al. 2004; Thomas et al. 1999; Lee et al. 2005; Kumar et al. 2005).

NHERF2 fue inicialmente reportada en 1997 como SIP-1 [*human Y-linked testis determining gene (SRY) Interactin Protein*] debido a su habilidad de interactuar en el núcleo con el factor de diferenciación testicular SRY (Poulat et al. 1997). En ese trabajo los autores mencionan el hecho de que NHERF2 en el núcleo puede interconectar a SRY con otros factores transcripcionales, proveyendo de esta manera a SRY de la capacidad transactivacional que por sí mismo carece.

Justificación

El dominio AF-1 del receptor de estrógenos alfa presenta una capacidad de transactivación independiente de ligando y una alta plasticidad estructural. A la fecha poco se ha descrito sobre su regulación transcripcional, lo que hace necesaria la identificación y caracterización de novedosos co-reguladores para este dominio.

Hipótesis

La proteína NHERF2 participa en la regulación transcripcional del receptor de estrógenos.

Objetivo general

Caracterizar la función de NHERF2 en la regulación transcripcional mediada por el receptor de estrógenos.

Objetivos específicos

1. Confirmar y caracterizar la interacción de NHERF2 con el receptor de estrógenos.
2. Determinar el efecto de la sobre-expresión de NHERF2 sobre la actividad transcripcional del receptor de estrógenos.
3. Caracterizar el mecanismo de acción de NHERF2.
4. Determinar la importancia celular de la acción de NHERF2 sobre el receptor de estrógenos.
5. Analizar la posible participación de NHERF2 en el cáncer de mama dependiente del receptor de estrógenos.

Resultados

NHERF2 co-localiza en el núcleo celular con el receptor de estrógenos alfa.

NHERF2 ya había sido previamente descrito por inmuno-localización como una proteína citoplásmica y también con distribución nuclear. Para determinar si comparte el mismo compartimento celular que el receptor de estrógenos activo, se realizaron ensayos de inmuno-localización con anticuerpos específicos contra el RE α y NHERF2, en células de hepatoblastoma (HepG2) estimuladas con el agonista estradiol (E2).

Los resultados de microscopía confocal nos muestran el patrón de localización nuclear antes descrito para RE α (Fig. 3, ER α) y la distribución citoplásmica y nuclear de NHERF2 (Fig. 3, NHERF2), así como una marcada co-localización de ambas proteínas en el núcleo celular (Fig. 3, Merge).



Fig. 3 Inmuno-citoquímica en células HepG2 con anticuerpos contra RE α (verde) y NHERF2 (rojo) nos demuestran la localización nuclear de ambas proteínas (Merge).

El agonista estradiol aumenta la interacción de NHERF2 con el RE α .

Para determinar si la interacción entre NHERF2 y RE α , sugerida por los ensayos de inmuno-localización y doble híbrido en levadura, era influenciada por la presencia del agonista del receptor de estrógenos E2 se llevaron a cabo ensayos de captura por proteína de fusión a glutatión-S-transferasa (GST). Se purificó GST-NHERF2 y se inmovilizó en una matriz sólida mediante su interacción con perlas de glutatión-agarosa y se hizo interactuar con un extracto de proteína nuclear obtenido de células de cáncer de mama (MCF7) en presencia y ausencia de E2.

Las proteínas capturadas por la interacción específica a GST-NHERF2 fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la presencia del receptor fue determinada mediante la técnica de Western blot usando un anticuerpo específico para RE α (Fig. 4).

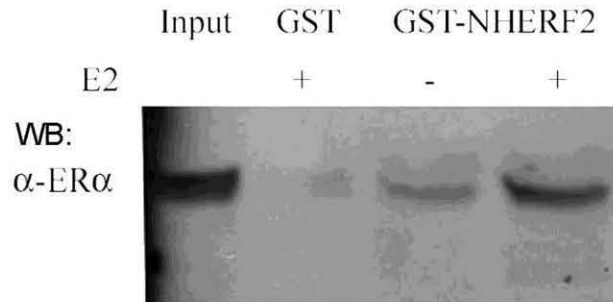


Fig. 4 Ensayo de captura con proteínas de fusión a GST. NHERF2-GST es capaz de interactuar y retener a RE α a partir de un extracto nuclear, esta interacción se ve favorecida por la presencia del agonista estradiol (E2).

Los resultados obtenidos muestran que GST-NHERF2 es capaz de unir al RE α en ausencia de E2 (Fig. 4, E2-). Sin embargo la adición de estradiol a los extractos nucleares aumentó de manera significativa la cantidad de RE α capturado por GST-NHERF2 (Fig. 4, E2+). Para probar que la interacción es específica se usó solamente la proteína GST en un extracto nuclear y la ausencia de inmunoreactividad hacia el receptor demuestra que la interacción entre NHERF2 y RE α es específica (Fig. 4, GST).

NHERF2 utiliza su dominio PDZ2 en la interacción con AF-1 del receptor de estrógenos.

Para determinar los dominios específicos involucrados en la interacción de NHERF2 con el RE α , se utilizó la técnica de GST-Pulldown. Se obtuvieron el dominio amino-terminal de NHERF2 (PDZ1), el carboxilo-terminal (PDZ2) y la proteína completa como proteínas de fusión a GST y se analizó su capacidad por separado de unir al RE α , transcrito y traducido *in vitro* en presencia de metionina-[S³⁵] (Fig. 5).

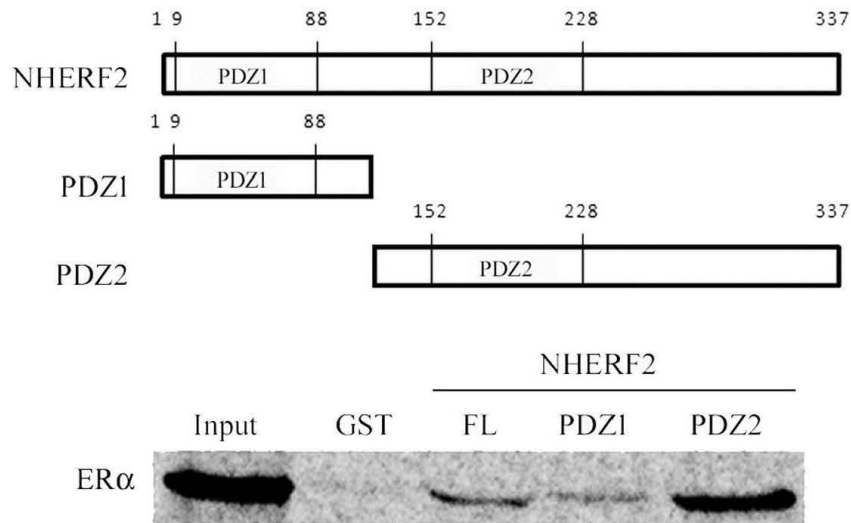


Fig. 5 Experimentos de GST pull-down que nos muestran la interacción física directa entre NHERF2 y el RE α . Arriba se muestra la representación gráfica de la proteína NHERF2 completa y los fragmentos NHERF2 utilizados. Se encontró que el dominio carboxilo de NHERF2 interactúa mejor que el amino-terminal.

Los resultados obtenidos nos muestran que NHERF2 es capaz de interactuar directamente *in vitro* con el RE α , y que este receptor es capaz de interactuar con ambos dominios de NHERF2, pero la interacción con PDZ2 es mejor. Con el fin de identificar los dominios del receptor de estrógenos involucrados en la interacción con NHERF2, se obtuvieron como proteínas de fusión a GST los dominios AF-1 y el carboxilo terminal AF-2 y se analizó su capacidad por separado de unir a NHERF2, transcrito y traducido *in vitro* en presencia de metionina-[S³⁵] (Fig. 6).

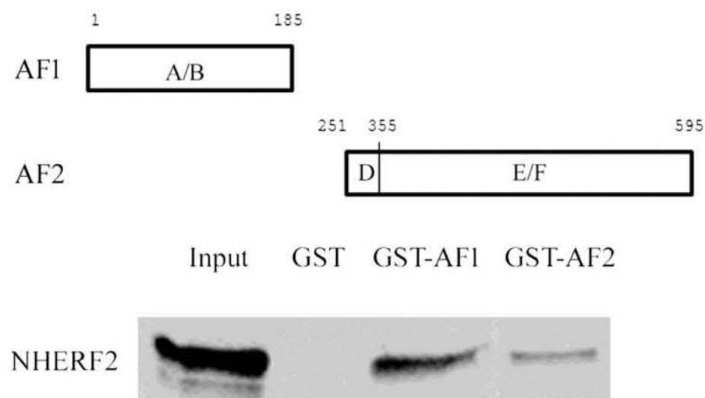


Fig. 6 Experimentos de GST pull-down. Se demuestra la interacción física directa entre NHERF2 y los dominios AF-1 y AF-2 del receptor de estrógenos, interactuando notoriamente NHERF2 con el dominio amino-terminal del RE α .

Nuestros resultados sugieren la interacción física directa entre el dominio PDZ2 del carboxilo-terminal de NHERF2 con el dominio AF-1 en amino-terminal del receptor de estrógenos. En ambos experimentos de GST-Pulldown se usó la proteína GST sola como control negativo, confirmando la especificidad en las interacciones.

NHERF2 interactúa con el receptor a estrógenos *in vivo*.

Hasta el momento nuestros resultados con proteínas de fusión a GST sugerían la interacción física directa entre NHERF2 y el receptor de estrógenos, lo que se corroboró en un contexto celular. Se inmuno-precipitó el RE α de un extracto de células de cáncer de mama MCF7 y a través de PAGE y Western blot se analizó la presencia por co-inmuno-precipitación de NHERF2 (Fig. 7). Los resultados nos confirman la interacción del receptor de estrógenos con NHERF2 en un ambiente intracelular.

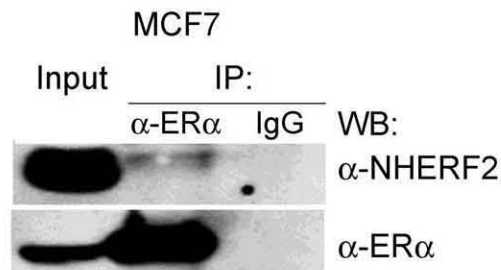


Fig. 7 Ensayo de co-inmuno-precipitación en células MCF7, que muestra la interacción endógena de NHERF2 con el RE α . Se hizo una inmuno-precipitación control con IgG para determinar que la interacción fuera específica.

NHERF2 aumenta la actividad transcripcional del RE α .

Al validar la interacción entre NHERF2 y el receptor de estrógenos en un ambiente celular se decidió corroborar si modificaba de alguna manera la función transcripcional de dicho receptor hormonal. Se llevaron a cabo experimentos de transfección transitoria en dos líneas celulares con expresión positiva del receptor a estrógenos (MCF7 y HepG2) y una línea celular que no expresa al receptor (CV-1). En estos ensayos se sobre-expresó a NHERF2 transfectando el vector de expresión pcDNA3.1-NHERF2 y se midió la actividad del RE α usando el vector reportero 2xERE-TK-Luc. Las células CV-1 además fueron transfectadas con pcDNA3.1- RE α para recuperar la expresión del receptor de estrógenos.

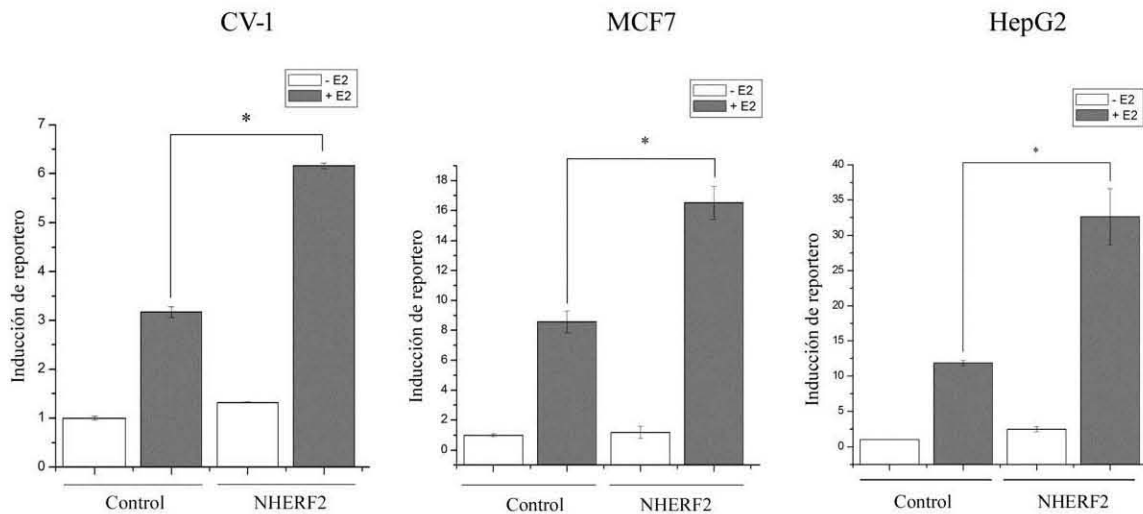


Fig. 8 NHERF2 es un co-activador fuerte del receptor de estrógenos. Resultados de transfección transitoria de NHERF2 y el RE α , en tres líneas celulares, muestran que la sobre-expresión de NHERF2 aumenta la actividad transcripcional dependiente del receptor de estrógenos. Se transfectó el vector pCMV LacZ como control de eficiencia de transfección y se usó la actividad de b-galactosidasa para normalizar la expresión del reportero de luciferasa.

En los experimentos realizados en las tres líneas celulares, se muestra una actividad basal del reportero de luciferasa, la cual puede ser incrementada por la estimulación con estradiol del receptor de estrógenos (Fig. 8, Control). Con la sobre-expresión de NHERF2 en las tres líneas celulares, se hace evidente un aumento significativo en la estimulación del RE α dependiente de estrógenos (Fig. 8, NHERF2) lo que permite proponer que la interacción de NHERF2 con el RE α aumenta su actividad transcripcional.

El silenciamiento de la expresión de NHERF2 afecta la actividad del RE α .

Para determinar la relevancia biológica de NHERF2 como un co-activador del receptor de estrógenos, se utilizó el silenciamiento mediante ARN interferente (ARNi). Se utilizaron células MCF7 para analizar el efecto de la reducción de NHERF2 endógeno en la actividad transcripcional del RE α . Primero se determinó la eficiencia del ARNi para disminuir los niveles de proteína de NHERF2 por Western blot, usando extractos de células MCF7 transfectadas con el ARNi específico para NHERF2 o con un ARNi control. Los resultados mostraron una reducción significativa en los niveles de la proteína NHERF2 en las células tratadas con el ARNi específico comparadas con las

células transfectadas con el control (Fig. 9, NHERF2). Para determinar si el silenciamiento de NHERF2 afectaba la expresión del receptor de estrógenos se determinaron (Western blot) los niveles de proteína de RE α en las células MCF7, y se observó que no se vieron afectados por la transfección del ARNi control o por el ARNi específico para NHERF2 (Fig. 9, ER α). En estos experimentos los niveles de GAPDH se usaron como control de carga (Fig. 9, GAPDH).

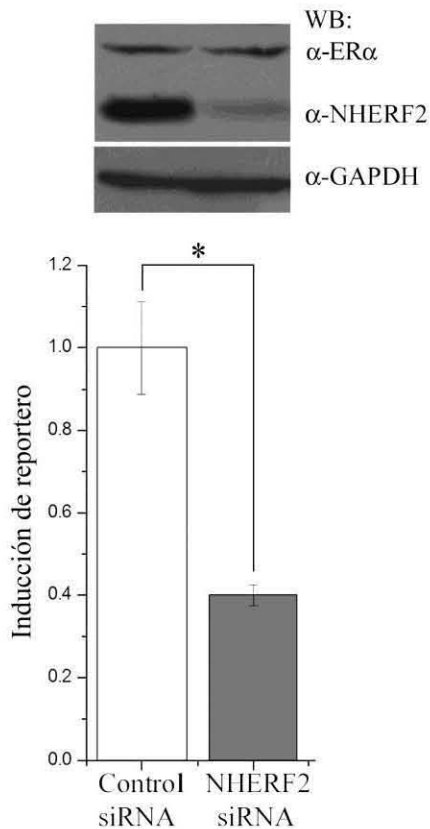


Fig. 9 El silenciamiento de la expresión de NHERF2 mediado por ARNi afecta de la manera negativa la actividad transcripcional dependiente de estrógenos mediada por el RE α . Se determinó por Western blot una alta eficiencia de silenciamiento del ARNi específico contra NHERF2 comparado contra el ARNi control. El silenciamiento de la expresión de NHERF2 disminuye significativamente la actividad transcripcional del RE α pero sin afectar sus niveles de proteína. Se utilizó al vector pCMV LacZ como control de eficiencia de transfección para estandarizar los resultados del reportero de luciferasa.

Después se determinó la actividad del RE α en células MCF7 estimuladas con estradiol y transfectadas con ARNi control o el específico contra NHERF2. Estos resultados muestran que el silenciamiento en la expresión de NHERF2 mediado por ARNi en células MCF7, produjo una reducción del 60% en la actividad transcripcional del receptor de estrógenos estimulado con E2 comparado contra las células control (Fig. 9). Podemos inferir que esta disminución en la actividad del receptor de estrógenos no es debido a una menor expresión de la proteína, ya que el resultado anterior de Western blot nos muestra que el silenciamiento de NHERF2 no afecta la expresión del RE α , lo que sugiere un

papel importante de NHERF2 dentro de la regulación transcripcional mediada por el receptor de estrógenos.

NHERF2 presenta actividad transcripcional intrínseca.

Previamente se han reportado otros co-activadores de tipo PDZ que presentan actividad transcripcional intrínseca, es decir, que al ser reclutados a un promotor son capaces por sí mismos de activar su transcripción. Para comenzar a caracterizar el mecanismo por el cual NHERF2 funciona como un fuerte co-activador del receptor de estrógenos, investigamos la posibilidad de que NHERF2 fuera capaz de presentar actividad transcripcional intrínseca. NHERF2 se expresó como proteína de fusión al dominio de unión a ADN del factor de transcripción de levadura Gal4 (Gal4-DBD-NHERF2) y se co-transfectó en células MCF7 con el vector reportero dotado del gen de luciferasa bajo el control de cinco secuencias de unión para GAL4 (Fig. 10, esquema).

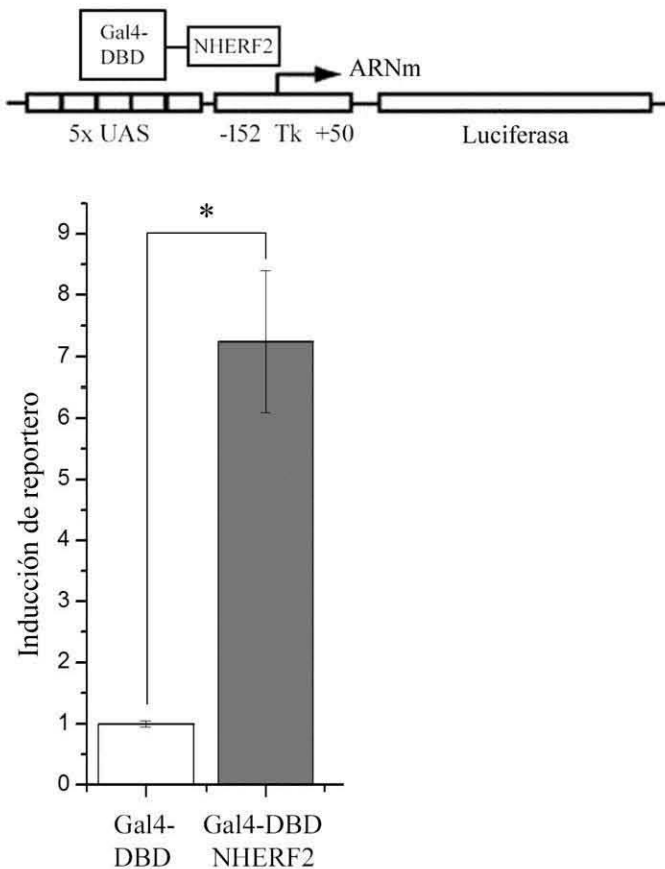


Fig. 10 El reclutamiento de NHERF2 a un promotor activa su transcripción. Representación esquemática del reportero de luciferasa utilizado, donde se representa el reclutamiento de NHERF2, mediante el dominio de unión a ADN de Gal4, al promotor de timidina-cinasa (Tk) para la expresión del gen de luciferasa.

Representación gráfica del resultado de la expresión de Gal4-DBD-NHERF2 en células MCF7, donde se hace evidente la activación del gen reportero en respuesta al reclutamiento de NHERF2. Se estandarizó la expresión de luciferasa respecto a la actividad de β -galactosidasa del vector usado como control.

La actividad del reportero de luciferasa en las células que fueron transfectadas con Gal4-DBD-NHERF2 fue comparada contra la actividad registrada en las células que expresaron solamente el dominio de unión a ADN de Gal4 (Gal4-DBD). La expresión de la proteína de fusión Gal4-DBD-NHERF2 aumentó la actividad del reportero siete veces con respecto al control de Gal4-DBD (Fig. 10). Este resultado muestra que el reclutamiento de NHERF2 a un promotor es suficiente para activar su transcripción, cualidad que puede formar parte del mecanismo por el cual NHERF2 funciona como un fuerte co-activador del receptor de estrógenos.

NHERF2 es reclutado al promotor del gen regulado por estrógenos pS2 en células MCF7.

Para determinar si el co-activador NHERF2 participa en el complejo transcripcional del receptor de estrógenos, que se ensambla directamente en la cromatina de los genes diana, se llevaron a cabo ensayos de inmuno-precipitación de cromatina (ChIP) del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) del gen pS2, en células MCF7 control y estimuladas con estradiol por 45 minutos, tiempo previamente reportado para el reclutamiento del RE α durante la activación de dicho gen.

Se hizo la inmuno-precipitación de cromatina utilizando un anticuerpo contra el RE α y se analizó la cromatina precipitada del lisado de células MCF7 control, con un set de cebadores específicos para la región -355 a -192 del promotor de pS2, amplificando positivamente un fragmento de 163 pares de bases. Cuando se hizo la amplificación de la cromatina precipitada de las células estimuladas con estradiol, se obtuvo mayor cantidad de amplificado, lo que se interpreta como una mayor ocupación del promotor por parte del RE α en respuesta a un estímulo por E2 (Fig. 11, α -ER α). La inmuno-precipitación de cromatina utilizando un anticuerpo específico contra NHERF2 nos muestra que este co-activador también es reclutado al ERE de pS2 en ausencia de E2, pero aumenta su reclutamiento en respuesta al estímulo por estrógeno (Fig. 11, α -NHERF2).

La especificidad de la unión del RE α y de NHERF2 al ERE de pS2 se confirmó cuando se usó un set de cebadores, específicos para una región de ADN localizada río arriba del ERE (-3947 a -3639), que fallaron en producir amplificado, a partir de la cromatina inmuno-precipitada usando los anticuerpos específicos contra el RE α y NHERF2 (Fig.

11, región control). Así mismo se anexó un control de inmuno-precipitación, usando un anticuerpo inespecífico (suero control), el cual no produjo amplificado, corroborando la unión específica de RE α y NHERF2 al ERE de pS2 (Fig. 11, Mock).

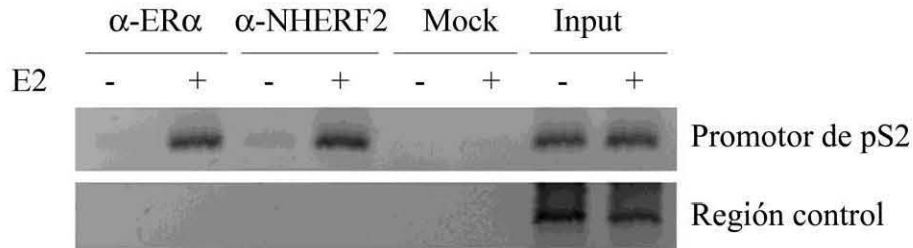


Fig. 11 Inmuno-precipitación de cromatina con anticuerpos específicos contra: RE α , NHERF2 y un control de IgG. Se obtuvo un extracto a partir de células MCF7 control y tratadas por 45 min con estradiol, después de la inmuno-precipitación, se utilizó la cromatina enriquecida para reacciones de PCR con cebadores específicos para el ERE de pS2 y una zona no relacionada al promotor. El resultado sugiere el reclutamiento del RE α y NHERF2 sobre el ERE del gen de pS2 en respuesta a un estímulo agonista para el receptor.

NHERF2 afecta los niveles de ARN mensajero de genes regulados por el RE α .

Para conocer el efecto de NHERF2 sobre la transcripción de genes de respuesta a estrógenos, se determinaron los niveles de ARN mensajero de pS2, en células MCF7 control y células que sobre-expresan de manera estable NHERF2. Células MCF7 fueron transfectadas con la construcción del vector pCMV-3Tag-NHERF2, que dirige la expresión de la proteína NHERF2 marcada en su extremo amino-terminal con 3 epítopes del péptido FLAG (FLAG-NHERF2). La sobre-expresión de NHERF2 fue confirmada por Western blot usando un anticuerpo específico contra NHERF2 (Fig. 12). En las células MCF7 control se ve una banda correspondiente a NHERF2 endógeno, comparando contra las células FLAG-NHERF2-MCF7 que presentan dos bandas, la más baja corresponde a NHERF2 y la superior a la proteína FLAG-NHERF2 (Fig. 12, Input). La inmuno-precipitación con un anticuerpo contra FLAG en un extracto de células FLAG-NHERF2-MCF7, seguida de PAGE y Western blot con un anticuerpo contra NHERF2, nos confirman la expresión estable de FLAG-NHERF2 (Fig. 12, IP: α -FLAG).

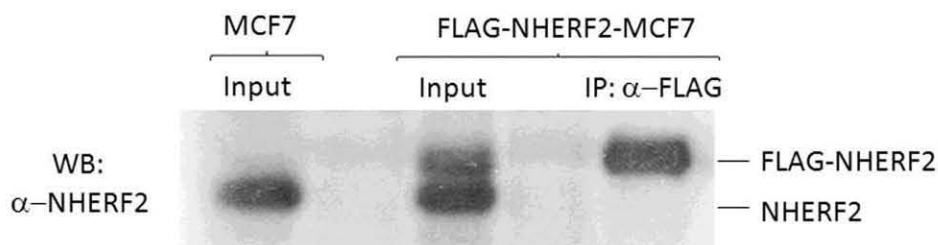


Fig. 12 Inmuno-detección de NHERF2 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 y la línea celular de sobre-expresión estable FLAG-NHERF2-MCF7. La inmuno-precipitación con un anticuerpo contra FLAG y posterior inmuno-blot con un anticuerpo contra NHERF2, nos demuestran la sobre-expresión de FLAG-NHERF2 en la línea de sobre-expresión estable FLAG-NHERF2-MCF7.

Se utilizó la línea celular de sobre-expresión estable FLAG-NHERF2-MCF7, para analizar el efecto de la sobre-expresión de la proteína NHERF2, sobre los niveles de ARNm del gen regulado por estrógenos pS2, en presencia y en ausencia de un estímulo con estradiol. En ausencia de estradiol, el nivel de ARNm de pS2 en las células FLAG-NHERF2-MCF7 fue aproximadamente 90% más alto con respecto a las células control MCF7 (Fig. 13, E2-). Después de un estímulo con estradiol los niveles de ARNm de pS2 aumentaron en las células control MCF7 y en la línea de sobre-expresión estable FLAG-NHERF2-MCF7 (Fig. 13, E2+). Sin embargo el nivel del ARNm de pS2, en las células FLAG-NHERF2-MCF7 fue 46% más alto, con respecto a las células control MCF7, después del estímulo con estradiol (Fig. 13).

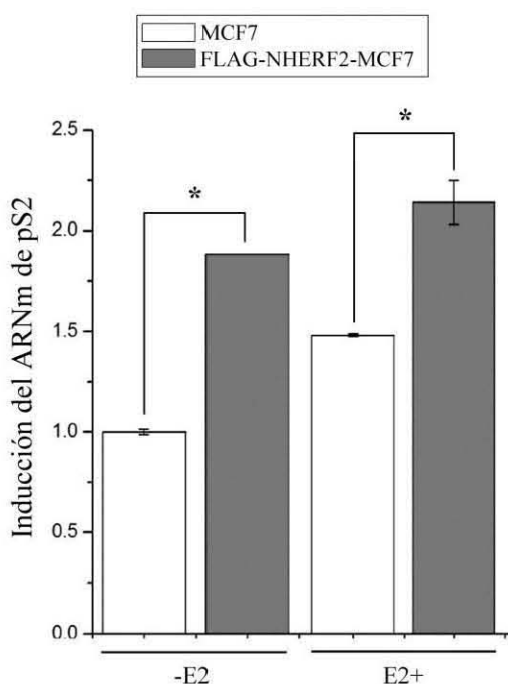


Fig. 13 Análisis por RT-PCR del efecto de la sobre-expresión de NHERF2 sobre la transcripción de pS2. Células MCF7 que sobre-expresan de manera estable FLAG-NHERF2 presentan una mayor transcripción basal de pS2, con respecto a células MCF7 control. La estimulación del RE α por estradiol produce un aumento en la transcripción de pS2 en las células MCF7, aunque el aumento es mayor en las células que sobre-expresan FLAG-NHERF2. Los resultados se muestran normalizados respecto a la expresión de β -actina.

Para determinar la importancia de la proteína NHERF2, en la regulación transcripcional mediada por el receptor de estrógenos, se evaluó por RT-PCR el efecto del silenciamiento en la expresión de NHERF2, mediado por ARN de interferencia, en la expresión endógena de los siguientes genes regulados por estrógenos: CatD, pS2, Adora1 y CXCR4. Los resultados de RT-PCR obtenidos muestran que la transfección del RNAi específico contra NHERF2, en células MCF7, reduce en un 55% la presencia del transcrito de NHERF2 (Fig. 14, siRNA NHERF2), comparado con células transfectadas con un ARNi inespecífico (Fig. 14, siRNA Ctrl). De manera interesante el silenciamiento del transcrito de NHERF2 por ARNi en las células MCF7 redujo de manera importante los niveles de ARN de los genes de respuesta a estrógenos analizados: CatD (22%), pS2 (25%), Adora1 (16%) y CXCR4 (22%) (Fig. 14).

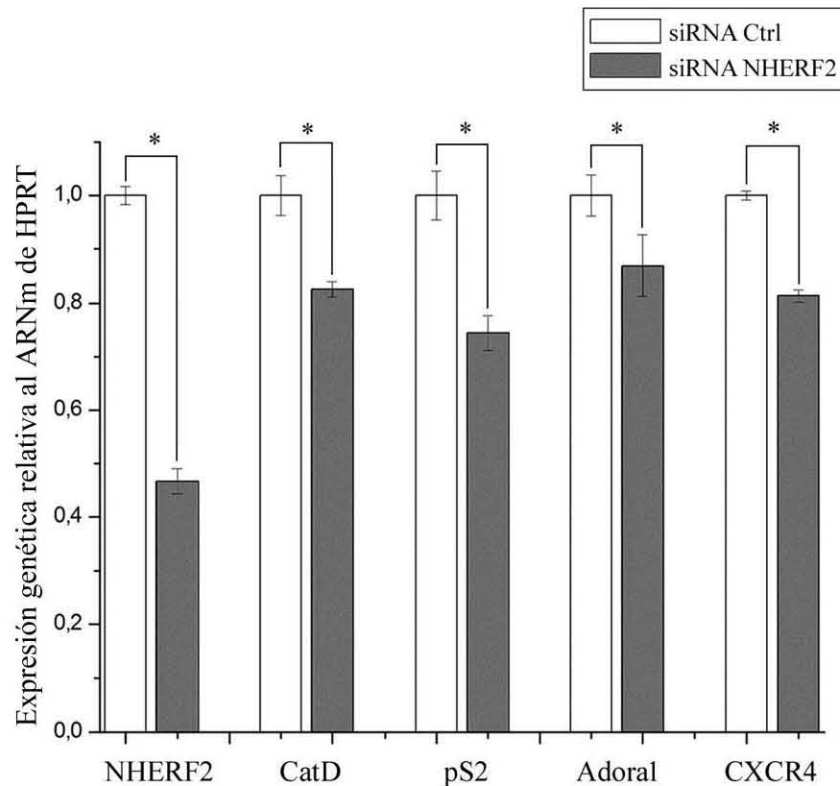


Fig. 14 Análisis por RT-PCR del efecto del silenciamiento de NHERF2 sobre la expresión de genes regulados por el RE α . La disminución en un 55% del ARN de NHERF2 afecta de manera notoria la transcripción de genes regulados por el receptor de estrógenos, en comparación a los resultados obtenidos en células MCF7 transfectadas con un ARNi inespecífico.

Los resultados de transfección transitoria muestran que la sobre-expresión de NHERF2 produce un aumento significativo en la actividad transcripcional del RE α en las líneas celulares utilizadas. Por el contrario, la reducción del transcrito de NHERF2 mediado por ARNi, disminuye la actividad del receptor de estrógenos sobre un gen reportero de luciferasa y de manera más relevante reduce la expresión endógena de genes regulados por el RE α (CatD, pS2, Adora1 y CXCR4) en la línea celular MCF7, lo que sugiere que NHERF2 participa de manera importante en la actividad transcripcional del receptor de estrógenos en células de cáncer de mama.

NHERF2 aumenta la actividad del co-activador de receptores a esteroides SRC-1.

La caracterización molecular y funcional de los diferentes receptores nucleares a esteroides, ha mostrado que la actividad transcripcional total es resultado de la interacción funcional entre los dominios AF-1 y AF-2 del receptor. Esta relación sinérgica en el RE α es mediada en parte por los co-activadores SRC-1 y p300, que actúan como moléculas puente entre los dos dominios de activación transcripcional. Proteínas reclutadas sobre el dominio amino-terminal AF-1 podrían servir de conexión con factores asociados al dominio carboxilo-terminal, facilitando la interacción sinérgica entre ambos dominios.

Para determinar el mecanismo de acción de NHERF2 como un co-activador de la actividad transcripcional del receptor de estrógenos, se decidió evaluar la posibilidad de que la presencia de NHERF2 modificara la actividad de co-activadores asociados al dominio AF-2, como SRC-1. Se comparó el efecto de la transfección transitoria de SRC-1 sobre la actividad transcripcional del RE α en las células MCF7 control y en FLAG-NHERF2-MCF7.

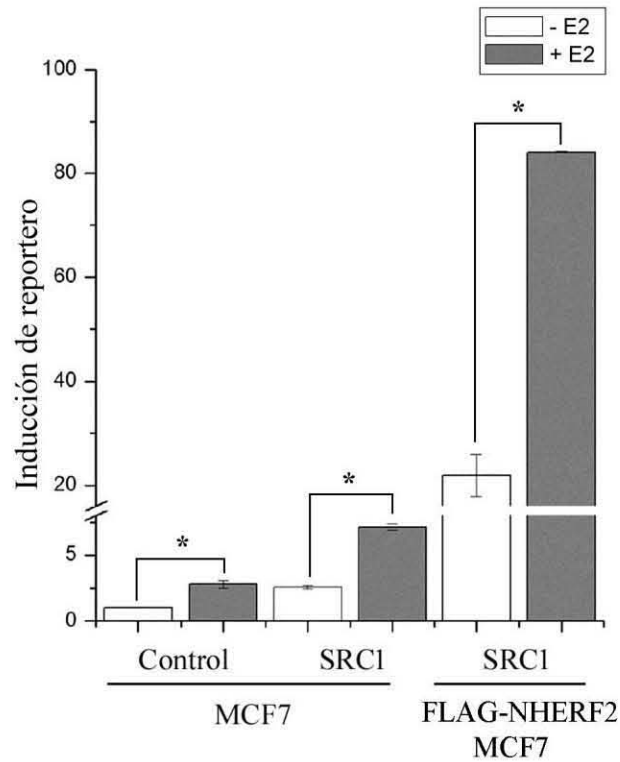


Fig. 15 Transfección transitoria del co-activador SRC-1 en células MCF7 control y FLAG-NHERF2-MCF7. Los resultados muestran un efecto sinérgico de ambos co-activadores sobre la actividad del RE α . La inducción de reportero se determinó normalizando la expresión de luciferasa con la actividad de β -gal.

La sobre-expresión del co-activador SRC-1 en las células MCF7 control aumentó la respuesta del receptor estimulado con estradiol de 3 a 7 veces (Fig. 15, MCF7), lo que demuestra que es un fuerte co-activador del RE α . De manera interesante, la sobre-expresión de SRC-1 en las células que sobre-expresan de manera estable el co-activador NHERF2, aumentó la actividad basal del receptor a 25 veces el control y de manera sinérgica incrementó la respuesta del RE α a un estímulo de E₂ hasta 90 veces (Fig. 15, FLAG-NHERF2-MCF7) lo que nos sugiere que ambos co-activadores podrían llevar a cabo sus funciones a través de una vía común o complementaria.

Para confirmar la posible interacción funcional entre NHERF2 y SRC-1 se determinó el efecto de reducir el nivel endógeno de NHERF2, sobre la actividad de SRC-1 en la transactivación mediada por el RE α . La actividad positiva de SCR-1 en la transactivación del receptor de estrógenos dependiente de ligando, no se vio afectada por la transfección de un ARNi inespecífico (Fig. 16, Control siRNA), sin embargo al silenciar el transcrito

de NHERF2 con un ARNi específico se ve afectada la influencia positiva del co-activador SRC-1 sobre la actividad transcripcional del RE α en respuesta a estradiol (Fig. 16, NHERF2 siRNA), disminuyendo casi en su totalidad.

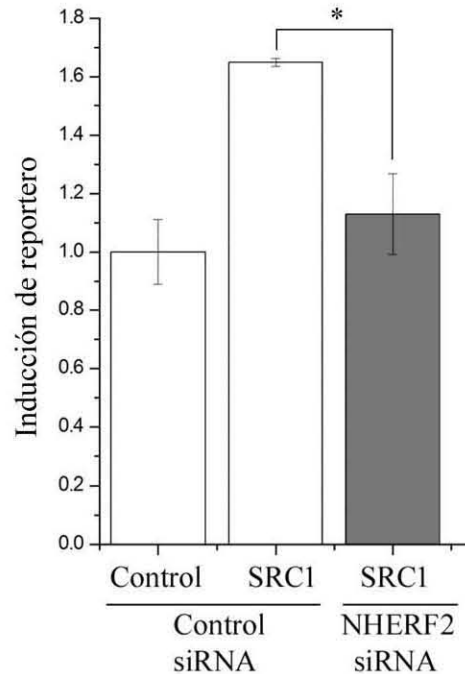


Fig. 16 Transfección transitoria del co-activador SRC-1, en condiciones de silenciamiento de NHERF2 se disminuye notoriamente su efecto positivo sobre la transactivación mediada por el RE α . La inducción de reportero se determinó normalizando la expresión de luciferasa con la actividad de β -gal.

Estos resultados nos sugieren que una reducción en los niveles de expresión de NHERF2 atenúa el efecto co-activador de SRC-1 sobre la transactivación mediada por el receptor de estrógenos en células de cáncer de mama.

NHERF2 interactúa con el co-activador SRC1 *in vivo*.

Para investigar el mecanismo responsable de la cooperación funcional entre los co-activadores NHERF2 y SRC-1, se exploró la posibilidad de que ambas proteínas pudieran asociarse en células de cáncer de mama, formando parte del mismo complejo co-activador. Se hicieron extractos de la línea celular de cáncer de mama ZR-75-1 y se hizo la inmuno-precipitación con un anticuerpo específico contra SCR-1, se analizaron las proteínas co-inmunoprecipitadas por PAGE y Western blot con un anticuerpo específico para determinar la presencia de NHERF2. Los resultados nos muestran una clara

presencia de NHERF2 en las proteínas inmuno-precipitadas con SRC-1 en ausencia de E2 (Fig. 17, WB: α -NHERF2 -E2) y un enriquecimiento de NHERF2 asociado a SRC-1 en respuesta a un estímulo por estrógeno (Fig. 17, WB: α -NHERF2 +E2). Se hizo la inmuno-precipitación con un anticuerpo inespecífico y falló en precipitar a NHERF2, lo que nos muestra una asociación específica entre NHERF2 y SRC-1 (Fig. 17, IgG).

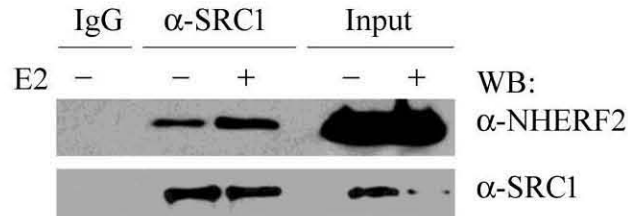


Fig. 17 Análisis por Western blot de las proteínas inmuno-precipitadas en complejo con SRC-1, a partir de un extracto de células ZR-75-1. Se confirmó la presencia de NHERF2 en complejos proteicos asociados a SRC-1 en ausencia de E2 y un incremento de la asociación de NHERF2 y SRC-1 en respuesta a un estímulo agonista del RE α .

Estos resultados sugieren la posibilidad de que NHERF2 aumenta la transactivación mediada por el RE α , a través de su unión con el dominio AF-1 del receptor nuclear y la interacción con co-activadores asociados al dominio AF-2, como SRC-1.

NHERF2 forma parte del complejo RE α /SRC-1 que se ensambla en el promotor de genes regulados por estrógenos.

Al haber demostrado la interacción física y funcional entre NHERF2, el co-activador SRC-1 y el RE α , se decidió averiguar si forman parte del mismo complejo de transactivación. La evaluación del complejo NHERF2/SRC-1/RE α se realizó estudiando los promotores de Catepsina D (CTSD) y pS2, activados por estrógenos, a través de ensayos de inmuno-precipitación secuencial de cromatina (Re-ChIP). Se obtuvo cromatina de células MCF7 tratadas por 45 min con el agonista E2 y se realizó una primer inmuno-precipitación con anticuerpos específicos para el RE α o contra SRC-1, y después a estos complejos inmuno-precipitados se les sometió a otra ronda de inmuno-precipitación, esta vez con anticuerpos específicos contra NHERF2 y el RE α , a partir de esta cromatina se determinó por PCR si estaba enriquecida con los ERE de los promotores de CTSD y pS2 (Fig. 18).

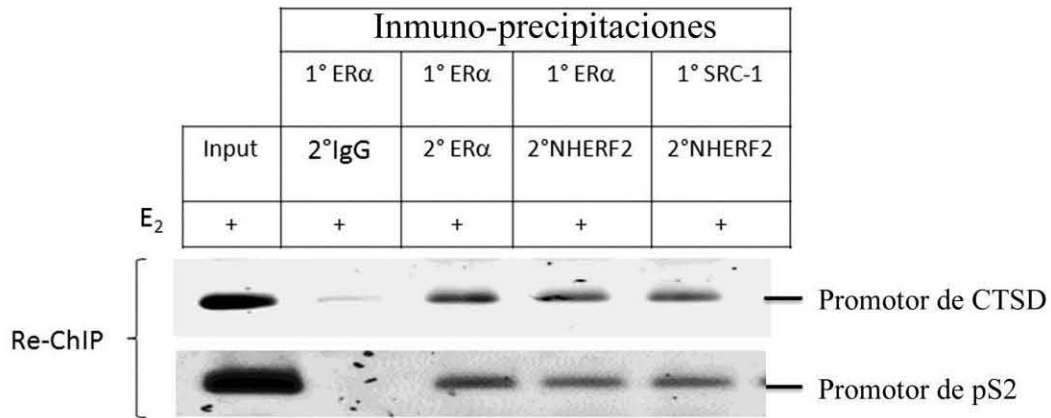


Fig. 18 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, de secuencias ERE del promotor de los genes activados por estrógenos CTSD y pS2, a partir de cromatina inmuno-precipitada secuencialmente con anticuerpos específicos contra RE α , NHERF2 y SRC-1.

En el primer Re-ChIP se hizo la primer inmuno-precipitación contra el RE α y la segunda con un anticuerpo inespecífico a manera de control negativo, esta cromatina precipitada falló en amplificar ambos promotores estudiados. Como un control positivo de la técnica se inmuno-precipitó en ambas rondas con un anticuerpo específico contra el RE α , lo que dio amplificado positivo para ambos promotores. Para averiguar si NHERF2 y el RE α interactúan como parte del mismo complejo transcripcional, se hizo la primer inmuno-precipitación contra el RE α y los complejos precipitados se sometieron a una segunda precipitación con un anticuerpo contra NHERF2, la cromatina asociada a estos complejos se analizó para determinar la presencia de los promotores de CTSD y pS2, los resultados muestran el ensamblaje simultáneo del RE α y NHERF2 sobre el promotor de los genes de respuesta a estrógenos estudiados. De acuerdo a los resultados previos se sugiere como mecanismo de acción de NHERF2 su interacción con el co-activador, de tipo acetil-transferasa de histonas SRC-1, mediante Re-ChIP se analizó si en el complejo transcripcional de SRC-1 se encontraba asociado también NHERF2. Se hizo la primer inmuno-precipitación con un anticuerpo específico contra SRC-1 y los complejos precipitados se analizaron precipitando con un anticuerpo contra NHERF-2, la cromatina obtenida se analizó por PCR con cebadores específicos para el ERE del promotor de los genes CTSD y pS2, los resultados muestran la interacción de NHERF2 y SRC-1 sobre el promotor de genes activados por el RE α , lo que sugiere la participación simultánea de ambos co-activadores en la actividad transcripcional del receptor de estrógenos.

La sobre-expresión de NHERF2 favorece el reclutamiento del co-activador SRC-1 sobre el promotor de genes regulados por estrógenos.

La sobre-expresión de la proteína NHERF2 aumenta considerablemente la actividad del co-activador SRC-1 sobre el RE α (Fig. 15). Para averiguar si NHERF2, como parte de su mecanismo de acción, facilitaba el reclutamiento de SRC-1 sobre el promotor de genes regulados por el RE α , se llevaron a cabo ensayos de inmuno-precipitación de cromatina a partir de células MCF7 estimuladas con estradiol y transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pCMV-3Tag-NHERF2 o con el vector vacío pCMV-3Tag.

Para confirmar la expresión y reclutamiento de FLAG-NHERF2 sobre el promotor de Catepsina D (CTSD) se hizo la inmuno-precipitación con un anticuerpo contra el epítipo FLAG y se analizó la cromatina precipitada con cebadores específicos para el promotor de CTSD, el resultado nos corrobora la presencia de NHERF2 en el promotor de un gen regulado por estrógenos (Fig. 19, α -FLAG).

Para determinar si el reclutamiento del RE α se veía afectado por la sobre-expresión de NHERF2 se hizo esta vez la inmuno-precipitación con un anticuerpo contra el RE α , el resultado nos sugiere que la sobre-expresión de NHERF2 produce un incremento moderado en el reclutamiento del receptor al promotor de CTSD (Fig. 19 α -ER α).

Al realizar la inmuno-precipitación con un anticuerpo específico contra el co-activador SRC-1 y analizar la cromatina, el resultado obtenido nos muestra un incremento en el reclutamiento de SRC-1, en el promotor de Catepsina D de las células que sobre-expresaron a NHERF2 (Fig. 19, α -SRC1).

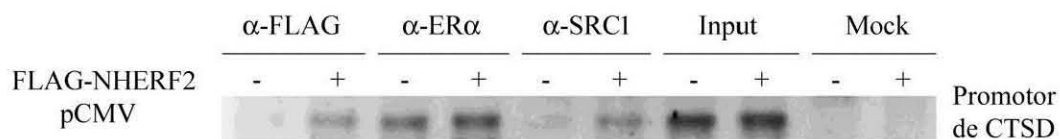


Fig. 19 Análisis por inmuno-precipitación de cromatina, de la influencia de la sobre-expresión de NHERF2, en la ocupación del promotor de Catepsina D por FLAG-NHERF2, RE α y SRC-1. La sobre-expresión de NHERF2 aumenta el reclutamiento de SRC-1 en el promotor del gen estudiado.

Los resultados obtenidos sugieren que la sobre-expresión de NHERF2 incrementa la actividad de co-activador de SRC-1 sobre el RE α (Fig. 15), mediante un aumento en el reclutamiento de SRC-1 sobre el promotor de genes regulados por estrógenos (Fig. 19, α -SRC1), resultado que podría explicar por qué el silenciamiento en la expresión de NHERF2, disminuye el efecto positivo de SRC-1 sobre la transactivación mediada por el RE α (Fig. 16).

La sobre-expresión de NHERF2 aumenta la tasa de proliferación en células MCF7.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que NHERF2 es un fuerte co-activador del RE α , el mecanismo sugerido es aumentando el reclutamiento del co-activador con función de acetil-transferasa de histonas SRC-1, a los promotores de genes regulados por estrógenos, lo que produce un incremento importante en la actividad transcripcional del RE α . En células de cáncer de mama se ha relacionado la actividad del RE α con proliferación celular. Para determinar si la sobre-expresión de NHERF2 modifica la tasa de proliferación, se utilizó el ensayo de marcaje celular con el reactivo fluorescente CFSE. Células MCF7 control y células FLAG-NHERF2-MCF7 fueron marcadas con CFSE y se dejaron proliferar por 48 hrs, se analizó la señal de fluorescencia en las células por citometría de flujo a las 24 y a las 48 hrs.

Los resultados muestran que las células FLAG-NHERF2-MCF7 presentan una menor señal de fluorescencia con respecto a las células MCF7 control, debido a una mayor frecuencia de proliferación (Fig. 20).

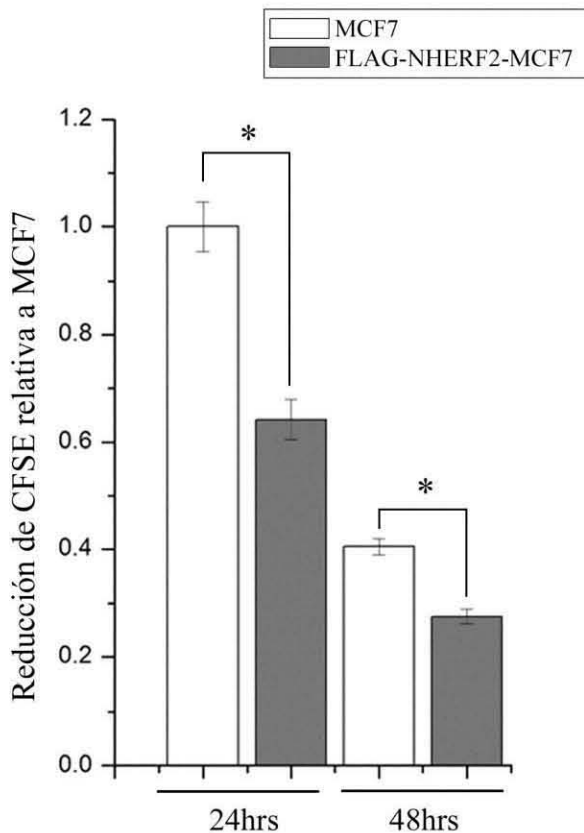


Fig. 20 Gráfica que representa la intensidad de fluorescencia por CFSE, medida por citometría de flujo en células FLAG-NHERF2-MCF7 y MCF7 durante 24 y 48hrs de proliferación. Las células que sobre-expresan de manera estable a FLAG-NHERF2 presentan menor fluorescencia, debido a una mayor tasa de proliferación, con respecto a las células MCF7 control.

La sobre-expresión de NHERF2 incrementa el crecimiento tumoral en un modelo murino.

NHERF2 aumenta la tasa de proliferación de células de cáncer de mama en cultivo celular, se determinó si NHERF2 también podría influenciar el crecimiento tumoral *in vivo*. Se analizó el potencial tumorigénico de las células FLAG-NHERF2-MCF7 comparado contra las células MCF7 control, al inyectarlas subcutáneamente en ratones *desnudos* de 5 semanas de edad y estimulando con estradiol de manera semanal durante siete semanas, al final los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos y pesados.

Los resultados obtenidos muestran que las células MCF7 control indujeron la formación de tumores sólo en 3 de los 8 ratones utilizados (Fig. 21, MCF7). En comparación las células que sobre-expresan de manera estable a NHERF2 produjeron tumores en 7 de 8 ratones inoculados (Fig. 21, FLAG-NHERF2-MCF7).

Al extraer los tumores y pesarlos se encontró que los tumores formados por células FLAG-NHERF2-MCF7 presentaban un mayor peso, en comparación con los desarrollados a partir de células MCF7 control (Fig. 21).

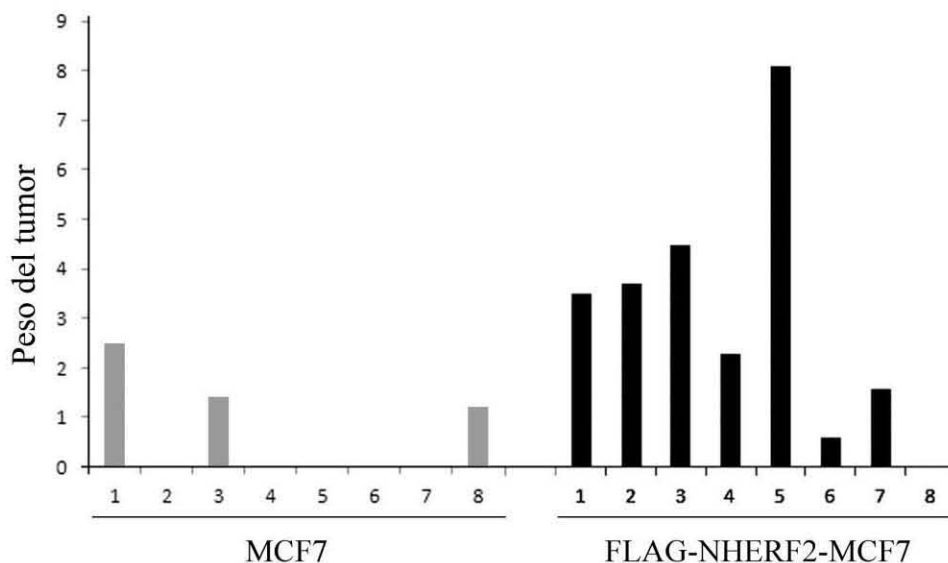


Fig. 21 Dos grupos de 8 ratones fueron inoculados subcutáneamente con células MCF7 control y FLAG-NHERF2-MCF7, después de 7 semanas los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos y pesados. La gráfica muestra la presencia y peso de los tumores obtenidos por cada ratón analizado. Las células que sobre-expresan de manera estable a NHERF2 mostraron mayor capacidad tumorigénica y tumores con mayor peso, en comparación a los obtenidos a partir de células MCF7 control.

Análisis de la expresión del ARNm de NHERF2 en muestras de cáncer de mama.

Numerosos estudios han asociado cambios en los niveles de expresión de diferentes co-reguladores del RE α con la progresión de cáncer, invasividad, mal pronóstico o resistencia a tratamiento anti-hormonal (Zhao et al. 2003; Girault et al. 2003; Leygue et al. 1999; Fox et al. 2004; Bouras et al. 2001). Con el fin de explorar si cambios en los niveles de expresión de NHERF2 podrían encontrarse en muestras de cáncer de mama, se obtuvieron 20 muestras de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama positivo para RE α y en etapas IIA y IIB, en el Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México. Se determinaron los niveles de expresión del ARNm de NHERF2 y β -actina en muestras de tejido tumoral mamario y muestras de mama normal, ambos tejidos obtenidos de la misma paciente mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y muestran que en 10 de las 22 pacientes analizadas, la expresión del ARNm de NHERF2 es mayor en el tumor con respecto al tejido normal de la mama. Las 12 pacientes restantes presentan niveles similares o menores de ARNm de NHERF2 en el tejido tumoral (Fig. 22).

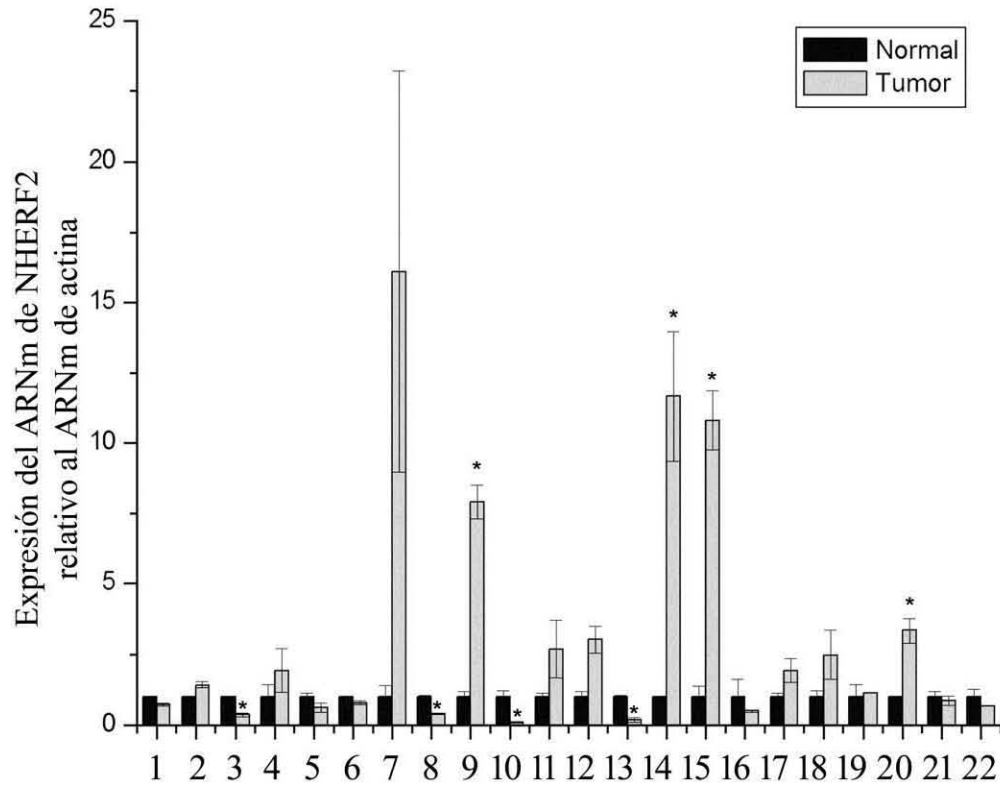


Fig. 22 Representación gráfica de los niveles de ARNm de NHERF2 presente en tejido tumoral y normal mamario, obtenido de 22 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, RE α positivo y en estadios primarios, en el Instituto Nacional de Cancerología. Los resultados muestran una sobre-expresión de NHERF2 en el 45% de las muestras de cáncer de mama analizadas.

Correlación entre la expresión del ARNm de NHERF2 y cáncer de mama.

Para confirmar la relación entre altos niveles de expresión de NHERF2 y carcinoma mamario, se compararon los niveles de ARNm de NHERF2 en tejido normal y tumores de mama, usando la base pública de datos de micro-arreglos de ARN, *Oncomine* (www.oncomine.org). Se consultaron y analizaron 12 bases de datos de micro-arreglos, realizados a partir de muestras de tumores y tejido normal de mama. Se encontró sobre-expresión del ARNm de NHERF2 en tejido de carcinoma mamario, comparado contra su expresión en tejido normal en 6 de las bases consultadas.

En la Fig. 23 se muestran resultados representativos, obtenidos del análisis de dos bases de datos independientes (Curtis et al. 2012; Radvanyi et al. 2005).

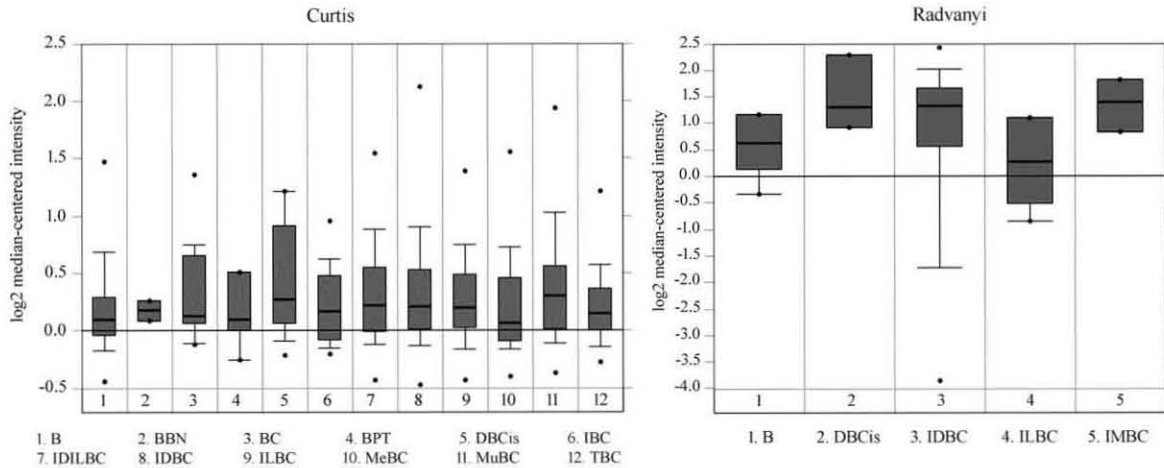


Fig. 23 Gráficas de la expresión del ARNm de NHERF2 en tejido normal y diferentes tipos de carcinoma mamario. Base de datos de *Curtis*: 1. B, mama normal; 2. BBN, neoplasia benigna de mama; 3. BC, carcinoma de mama; 4. BPT, tumor phyllodes de mama; 5. DBCis, carcinoma ductal de mama *in situ*; 6. IBC, carcinoma de mama invasivo; 7. IDILBC, carcinoma de mama invasivo ductal e invasivo lobular; 8. IDBC, carcinoma de mama invasivo ductal; 9. ILBC, carcinoma de mama invasivo lobular; 10. MeBC, carcinoma medular de mama; 11. MuBC, carcinoma mucinoso de mama y 12. TBC, carcinoma tubular de mama. Base de datos de *Radvanyi*: 1. B, mama normal; 2. DBCis, carcinoma ductal de mama *in situ*; 3. IDBC, carcinoma de mama invasivo ductal; 4. ILBC, carcinoma de mama invasivo lobular y 5. IMBC, carcinoma de mama invasivo mixto.

Los resultados obtenidos sugieren de manera consistente la sobre-expresión del ARNm de NHERF2 en muestras de carcinoma ductal de mama *in situ* con respecto a su expresión en tejido normal de mama o neoplasia benigna de mama.

Utilizando la misma base de datos se analizó la expresión del ARNm de NHERF2 en muestras de cáncer de mama, positivas o negativas al receptor de estrógenos. Los resultados obtenidos de analizar 9 bases de datos, nos muestran que en 7 se reporta sobre-expresión de NHERF2, en muestras de cáncer de mama positivas para el RE α .

Las gráficas representativas de dos bases de datos se muestran en la Fig. 24 (Zhao et al. 2004; Richardson et al. 2006).

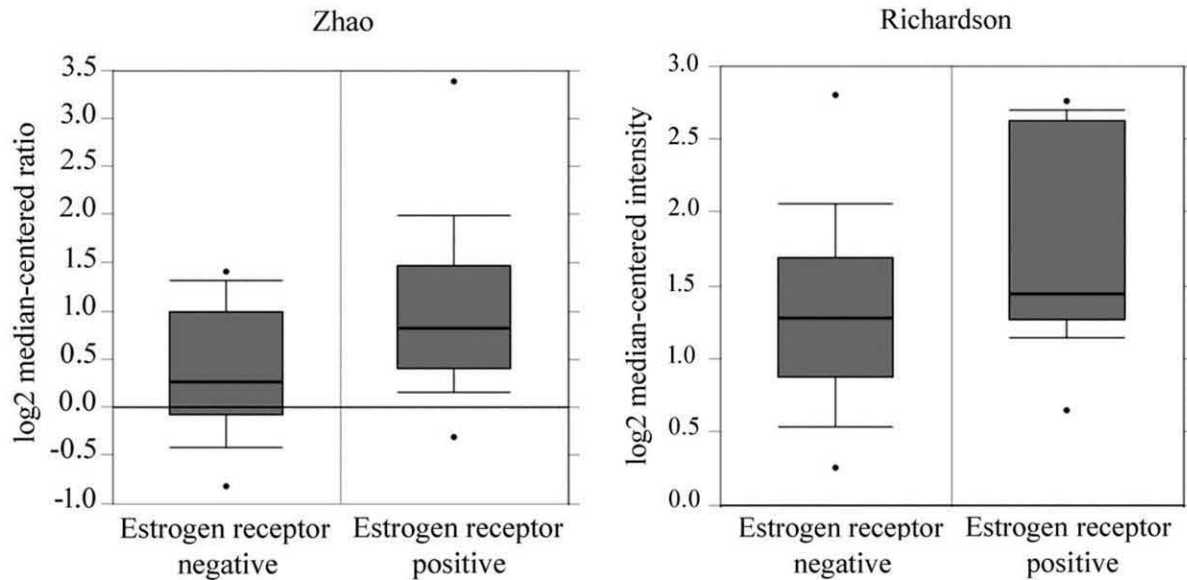


Fig. 24 Gráficas de la expresión del ARNm de NHERF2 en muestras de cáncer de mama (negativas y positivas a la expresión del RE α). Se muestran los resultados del análisis de dos bases públicas de datos de micro-arreglos, que sugieren una expresión moderadamente mayor de NHERF2 en tumores de mama positivos para el receptor de estrógenos.

Los resultados obtenidos nos sugieren una sobre-expresión del co-activador NHERF2, en muestras de cáncer de mama que expresan también al receptor de estrógenos, comparado contra muestras de tumores que no expresan dicho receptor.

Discusión

El trabajo presentado en esta tesis nos permite proponer a NHERF2 como un nuevo e importante co-activador del receptor de estrógenos, así como describir su mecanismo de acción y resaltar su importancia en la proliferación celular del cáncer de mama.

Trabajos previos han descrito a NHERF2 como una proteína con actividad en el citoplasma caracterizada por la regulación de diferentes receptores asociados a membrana y proteínas transportadoras (Harris & Lim 2001). Hasta el momento sólo existe un reporte sobre su papel nuclear como co-regulador del factor de determinación testicular SRY (Poulat et al. 1997). Los resultados obtenidos en el desarrollo de este proyecto ayudan a describir el papel funcional de NHERF2 en el núcleo, específicamente su participación como regulador de la actividad transcripcional del receptor a estrógenos.

Se demostró mediante experimentos de inmuno-localización, GST-Pulldown, ensayo de captura con proteína de fusión a GST y co-inmuno-precipitación, la interacción física directa del extremo carboxilo-terminal de NHERF2 con el dominio amino-terminal del receptor de estrógenos, tanto *in vitro* como en un ambiente celular. A través de ensayos de transfección transitoria, en tres diferentes entornos celulares, se demostró que la sobreexpresión de NHERF2 aumenta de manera significativa la actividad transcripcional del RE α en respuesta a estrógenos, medida a través de la activación de un plásmido reportero de luciferasa y a través de la cuantificación por RT-PCR de la expresión endógena de un gen regulado por estrógenos. La interacción física directa entre ambas proteínas y el aumento en la actividad transcripcional dependiente de estrógenos, nos permiten sugerir la participación de NHERF2 como un co-activador primario del RE α .

Previamente se habían descrito en la literatura varios co-reguladores transcripcionales con dominios PDZ, que son un tipo de dominio estructural de 80-90 aminoácidos que se encuentra en proteínas de señalización y andamiaje, y que al igual que NHERF2 poseen actividad de activación transcripcional intrínseca, pero NHERF2 es hasta el momento el único de estos co-activadores PDZ reportados que regula la actividad de un receptor hormonal nuclear. La importancia de NHERF2 en la activación completa del RE α , se

hizo evidente por los resultados obtenidos del silenciamiento de la expresión de NHERF2 por RNAi, donde se demuestra que una disminución sensible en la cantidad de proteína de NHERF2, reduce drásticamente la actividad del RE α en respuesta a un estímulo hormonal, y disminuye la expresión de varios genes, cuya transcripción depende de estrógenos.

Durante la elucidación del mecanismo de acción, notamos que NHERF2 es capaz de unirse al dominio amino-terminal AF-1 del RE α , con función de activación transcripcional independiente de ligando, pero nuestros resultados muestran que la mayor influencia de NHERF2 sobre la actividad del RE α , se da en respuesta a un estímulo hormonal, el cual se desencadena en el extremo carboxilo-terminal, a través de la activación de AF-2 por su ligando. Se ha demostrado que la máxima actividad del RE α se obtiene de la participación de ambos dominios (Kraus et al. 1995a; Zwart et al. 2010) y se ha descrito previamente que proteínas de la familia p160, principalmente el co-activador SRC1, son capaces de interactuar con ambas regiones, funcionando como intermediarios, mediando y potenciando el efecto sinérgico entre AF-1 y AF-2 (Benecke et al. 2000; Webb et al. 1998; Métivier et al. 2001; McInerney et al. 1996a; Onate et al. 1998). Varios co-reguladores que son capaces de modificar la actividad del RE α , mediante su participación en complejos transcripcionales con proteínas de la familia p160, han sido reportados hasta el momento (Wei et al. 2006) pero de manera especial los co-activadores GAS, p68/p72, CoCoA y SRA, que activan al RE α a través de su interacción con AF-1, lo hacen a través de complejos integrados por SRC1 (Liang et al. 2008; Watanabe et al. 2001; Kim et al. 2003; Lanz et al. 1999).

En el caso de NHERF2 demostramos, a través de ensayos de co-transfección transitoria de SRC1 en un fondo de sobre-expresión estable de NHERF2, que existe un efecto sinérgico entre ambos co-activadores, sobre la activación transcripcional mediada por el RE α , un comportamiento previamente reportado para la interacción de SRC1 con el co-activador CBP (Smith et al. 1996) y para la asociación de SRC1 con el complejo formado por los co-activadores SRA y p68/p72 (Watanabe et al. 2001). Los resultados obtenidos de experimentos de co-inmuno-precipitación, CHIP y Re-CHIP, confirman que NHERF2 forma parte de un complejo con SRC1, que se ensambla en los promotores de genes

regulados por el RE α en respuesta a un estímulo hormonal. Debido a la naturaleza de NHERF2, que es una proteína adaptadora y con base en los resultados obtenidos de silenciamiento de NHERF2 con RNAi, donde demostramos que la disminución de NHERF2 reduce la actividad de co-activación de SRC1 sobre el RE α , y que la sobre-expresión de NHERF2 aumenta el reclutamiento del co-activador SRC1 sobre un promotor activado por estrógenos, sugerimos que NHERF2 funciona facilitando la interacción de SRC1 con el dominio AF-1 del RE α , generando de esta manera un mayor número de complejos RE α -NHERF2-SRC1 transcripcionalmente exitosos y un incremento en la transcripción de genes activados por estrógenos (Fig. 25).

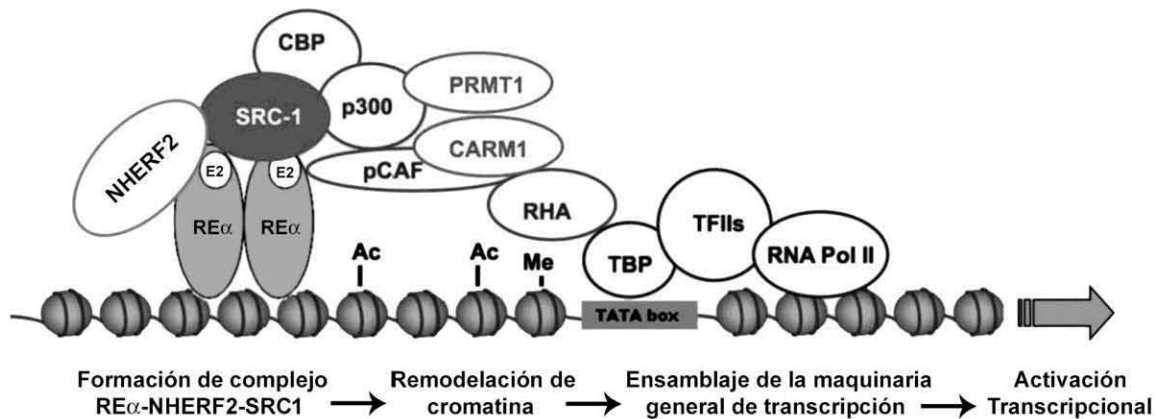


Fig. 25 Representación gráfica del mecanismo de acción sugerido para el aumento en la transactivación del RE α , mediado por NHERF2 y SRC1 (modificado de Walsh et al. 2012).

La sobre-expresión de NHERF2 en células de cáncer de mama produce un aumento en la activación transcripcional dependiente del RE α , y los resultados obtenidos usando una línea celular de cáncer de mama y un modelo murino, demuestran que la sobre-expresión de NHERF2 provoca un incremento notable en la tasa de proliferación celular *in vitro*, así como un aumento de la tumorigenesis *in vivo*. Estos resultados denotan una posible importancia fisiológica de la sobre-expresión de NHERF2 en células de cáncer de mama.

Existen varios reportes que relacionan la sobre-expresión de co-activadores del RE α con tumores de cáncer de mama (Leygue et al. 1999; Bouras et al. 2001; Fox et al. 2004; Zhao et al. 2003). Para ayudar a determinar la prevalencia de una sobre-expresión de

NHERF2 en muestras de tumores de mama en humanos, se determinaron los perfiles de expresión de NHERF2 en 22 muestras de cáncer de mama, obtenidas en el Instituto Nacional de Cancerología. Los resultados obtenidos muestran una sobre-expresión de NHERF2 en el 45% de las tumores analizados, comparados con la expresión de NHERF2 en el tejido de mama control obtenido de la misma paciente. Al consultar bases públicas de datos de micro-arreglos, los datos obtenidos muestran una sobre-expresión de NHERF2 en tumores de mama, positivos a la expresión del RE α y particularmente en el tipo carcinoma ductal *in situ*.

Los efectos positivos de NHERF2 sobre la proliferación celular y formación de tumores de células de cáncer de mama y el hecho que el ARNm de NHERF2 se encuentre sobre-expresado en un porcentaje significativo de tumores malignos de mama, abre la posibilidad de que NHERF2 pueda ser un participante importante en el desarrollo de esta patología. Más estudios serán necesarios para explorar el potencial de NHERF2 como un marcador tumoral en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico de cáncer de mama.

Metodología

- I. Cultivo de líneas celulares
- II. Inmunofluorescencia
- III. Obtención y purificación de proteínas de fusión a GST
- IV. Ensayo de captura por proteína de fusión a GST
- V. GST pulldown
- VI. Co-inmunoprecipitación
- VII. Maxiprep y purificación de plásmidos por gradiente de cloruro de cesio
- VIII. Transfecciones transitorias y estable.
- IX. Silenciamiento mediado por ARN interferente
- X. Sistema heterólogo de activación transcripcional
- XI. Inmuno-precipitación de cromatina (ChIP y Re-ChIP)
- XII. Western blot
- XIII. Extracción de ARN y RT-PCR
- XIV. Ensayo de proliferación por CFSE
- XV. Modelo murino para tumorigenesis
- XVI. PCR en tiempo real con sondas TaqMan
- XVII. Uso de la base pública de datos de micro-arreglos Oncomine

I. Cultivo de líneas celulares.

Las líneas celulares MCF7, HepG2 y CV-1, fueron mantenidas rutinariamente en medio MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a 37 °C. Para los experimentos de estimulación hormonal se utilizó medio MEM libre de rojo de fenol y se suplementó con suero fetal de bovino, tratado por 24 hrs con una solución de 0.5% de carbón activado y 0.1% de dextrán.

II. Inmunofluorescencia.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos en cajas de cultivo de 35 mm por 48 hrs, después se retiró el medio de cultivo y se fijaron por 10 min con una solución recién preparada de paraformaldehído al 3%. Las células se incubaron primero con los

anticuerpos primarios, para la determinación del RE α se utilizó el anticuerpo HC-20 de Santa Cruz y para NHERF2 se utilizó un anticuerpo donado por el Dr. M. Donowitz, ambos a una dilución 1:250. Se hicieron lavados y se incubó con el anticuerpo secundario conjugados con Alexa-546 (rojo) y Alexa-488 (verde). Se utilizó el medio de montaje con DAPI *prolong-Gold antifade* y se selló con barniz transparente. Se analizaron las señales de fluorescencia usando un microscopio confocal de escaneo laser MRC600.

III. Obtención y purificación de proteínas de fusión a GST.

Se obtienen bacterias de *Escherichia coli* transformadas con la secuencia codificante para la proteína a expresar clonada en el vector pGEX-4T-1 y se crece un cultivo toda la noche en 2 ml de medio LB líquido con 200 mg/L de ampicilina con agitación y a una temperatura de 37 °C. Al otro día se inoculan 20 ml de LB con 200 μ L del cultivo de toda la noche y se permite crecer a una temperatura de 30 °C hasta una densidad óptica de aproximadamente 0.4 - 0.6 a 600 nm y después se induce la producción de la proteína con 0.25 - 0.5 mM de IPTG por 4 hrs, se colectan las bacterias centrifugando las células 5 min a 4000 rpm y se congela la pastilla celular a -70 °C. Al otro día se descongela la pastilla celular en hielo y se resuspende en 5 mL de buffer de extracción (50 mM tris base pH 8.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, inhibidores de proteasas y 1:500 de una solución de PMSF saturado agregado al momento) se agrega lisozima 1 mg/ml final y se incuba 30 min 4° C con rotación, después se agrega sarkosyl 1% final y se incuba 30 min más en frío y con rotación. Después de la incubación se agrega Tritón x-100 1% final y se mezcla por inversión, después se sonica hasta que la solución tenga fluidez (3-4 pulsos de 15 s). Se centrifuga 20 min a 15,000 rpm en un rotor JA20 en tubos corex a 4 °C, después se recupera el sobrenadante con la proteína de fusión a GST en solución.

Para purificar la proteína de fusión a GST se usan perlas de glutatión-agarosa hidratadas en una mezcla al 50% con buffer de extracción, se agregan 500 μ L de la mezcla de perlas a los 5 mL de extracto celular de *E.coli* y se incuba de 2-4 hrs con rotación a 4 °C, después se lavan 4-6 veces con 10 -12 ml de buffer de extracción con 0.5% de Triton X-100, y se resuspenden las perlas en un volumen final de 500 μ L y se guardan a 4 °C.

IV. Ensayo de captura por proteína de fusión a GST.

Se prepara el extracto total a partir de células MCF7, se lisan aproximadamente 8 millones de células con 1.5 mL de TBS con 0.2% de Tritón X-100 suplementado con inhibidor de proteasas y PMSF, se colecta el lisado y se sónica con 3 pulsos de 10 s. Se centrifuga el extracto por 10 min a 4 °C y 14,000 rpm, se recupera el sobrenadante y se interactúa con 30 µL de perlas de glutatión-agarosa adsorbidas con la proteína de fusión a GST, durante dos horas. Se hacen 4 lavados con 1.5 mL de TBS-0.2% Tritón X-100 y PMSF. Se concentran las perlas y se resuspenden en 30 µL de TBS, se agrega solución de Laemmli y se hierven por 10 min, se hace electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y Western blot.

V. GST pulldown.

La proteína de fusión a GST adsorbida en perlas de glutatión-agarosa se lava y se equilibra en buffer de pulldown (20 mM Hepes pH7.9, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.04% NP-40, 10% glicerol y 1:500 PMSF saturado), después se bloquea incubando con albúmina sérica de bovino 1 mg/ml final por 30 min a 4 °C. Se hace la reacción de transcripción y traducción *in vitro* usando el kit de TnT de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se agrega el producto marcado radiactivamente a las perlas de glutatión agarosa con la proteína de fusión a GST adsorbida y se incuba 3-4 hrs a 4 °C, después se confina el sobrenadante como desecho radiactivo y se lavan las perlas con buffer de pulldown 7 veces con 60 veces el volumen de perlas, se hierven las perlas con buffer de Laemmli y se hace SDS-PAGE, el gel de poliacrilamida se seca al vacío y se expone en pantalla sensible al menos 8 hrs, después se lee la pantalla en el equipo FX de BioRad.

VI. Co-inmunoprecipitación.

Se prepara un extracto celular total lisando las células adheridas al plato de cultivo, se aspira el medio y se lavan dos veces con PBS frío, se aspira bien el PBS y se lisan con buffer de extracto total (100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, EDTA pH 8.0, 1% NP40 e inhibidores de proteasas) incubando en hielo por una hora, se colecta el sobrenadante y se centrifugan 30 min a 4 °C y 14,000 rpm, se recupera el sobrenadante

en tubos nuevos y se cuantifica la cantidad de proteínas totales usando el método de Bradford.

Se utilizan 2 mg de proteínas en extracto total por cada inmuno-precipitación, se incuba el extracto con 40 μ L de proteína G-agarosa por una hora a 4 °C, se centrifuga y se recupera el sobrenadante, se agregan 2 μ g de anticuerpo específico contra la proteína a precipitar y se incuba a 4 °C toda la noche con rotación. Se agregan 30 μ L de proteína G-agarosa y se incuba una hora a 4 °C con rotación, se centrifuga y se lavan las perlas 4 veces con 60 volúmenes de buffer de extracto total y se resuspenden las perlas en buffer de Laemmli y se hace SDS-PAGE y Western blot.

VII. Maxiprep y purificación de plásmidos por gradiente de cloruro de cesio.

La obtención de plásmidos en gran cantidad se denomina maxiprep, se inicia con un cultivo de 150 mL de medio LB con antibióticos y se crece el cultivo con agitación a 30 °C por toda la noche, después se centrifugan las bacterias y se resuspende la pastilla celular en 2 mL de buffer ETRL (100 mM de Tris pH 8.0, 5 mM de EDTA pH 8.0, 20% sacarosa y 0.003% de rojo de fenol) suplementado con 10 μ l de RNAsa A (10 mg/mL) y 20 μ l de lisozima (200 mg/mL) se mezcla brevemente con ayuda de un vórtex. Se agregan 5mL de agua miliQ estéril y se mezcla por inversión, se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 6 mL de una solución con 0.2 M de LiOH y 2% SDS (de preferencia recién preparada) y 1 mL de cloroformo, mezclar bien por inversión. Después se agregan 6 mL de una solución fría de 3 M KAc y 2 M de ácido acético glacial y se mezcla por inversión, se incuba por 5 min en hielo-agua (0°C), se centrifuga 10 min a 4°C y 14,000 rpm, se pasa el sobrenadante a tubos limpios, se agregan 13 mL de tert-ButOH: EtOH (98:2) se mezcla por inversión y se centrifuga por 15 min a 14,000 rpm a 4°C. El pellet se seca y se resuspende en 4 ml de TE estéril, se agregan 4.2 gr de CsCl y se disuelven completamente. Se pasan a tubo falcon estéril de 15 mL y se agregan 75 μ l de BrEt (10 mg/mL). Se agregan a tubos sellables para ultracentrífuga y se centrifuga en la ultracentrífuga Beckmann por 3.5 hrs a 80,000 rpm y 22 °C.

Se aísla la banda inferior con ayuda de una jeringa de 3 mL estéril y se pasa a un tubo eppendorf, se extrae varias veces con n-butanol hasta que hayan quedado transparentes

ambas fases. Se recupera la fase acuosa y se lleva a 1 mL con agua miliQ estéril y se pasa a un tubo de 40 mL, se agregan 800 µl de agua miliQ estéril, más 200 µL de una solución de NaAc 3M pH 5.2 y 6 mL de etanol 100%, se mezcla bien y se centrifuga, 10 min a 14,000 rpm y 4 °C, se lava la pastilla con 20 mL EtOH al 70%. Se resuspende la pastilla en 400 µL de TE y se pasa a un tubo eppendorf, se agregan 40 µL de una solución de NaAc 3M pH 5.2 y 1mL de EtOH 100%, se centrifuga por 10 min a 14,000 rpm y 4 °C, se lava la pastilla con 1mL de EtOH 70% y se seca. Posteriormente se disuelve en 400 µL de TE, se cuantifica la concentración de ADN por lectura de absorbancia a 260 nm, se hacen alícuotas de 100 µl y se congelan a -20 °C.

VIII. Transfecciones transitorias y estable.

Para la realización de transfecciones transitorias se utilizó la técnica de transfección con fosfato de calcio, se diluye la mezcla de vectores purificados en agua libre de RNAsas y DNAsas, se agrega una solución de cloruro de calcio 2.5M hasta obtener una concentración final de 125 mM, después se agrega gota a gota y con agitación un volumen de buffer HeBS 2x (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl y 12 mM de glucosa) y se incuba por 20 min a temperatura ambiente, se agrega gota a gota sobre las células en cultivo y se incuban a 37 °C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂ por 6 hrs, se lavan dos veces con PBS para quitar el exceso de fosfato de calcio y se agrega medio fresco.

Las transfecciones estables se realizaron con Superfect de Qiagen siguiendo las especificaciones del fabricante, después de permitir la expresión del vector con la proteína de interés por 48 hrs se procedió a la selección de células resistentes al antibiótico G418 por más de un mes, se hizo un concentrado de células resistentes para enriquecer el cultivo y se caracterizaron por Western blot para detectar la sobre-expresión de la proteína de interés. Las células de transfección estable se mantuvieron de manera rutinaria en cultivo con G418.

IX. Silenciamiento mediado por ARN interferente.

Se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology mezclas de cuatro ARN interferentes específicos contra el transcrito de NHERF2 y una mezcla de ARNi inespecíficos usados

como control. Los ARNi se transfectaron en las células usando el reactivo de Roche XtremeGENE *siRNA Transfection Reagent*, tal como lo recomienda el fabricante, se dejaron las células incubadas por 48 hrs y se leyeron los ensayos.

X. Sistema heterólogo de activación transcripcional.

El sistema consta de un gen reportero de luciferasa bajo el control de un promotor mínimo de timidina-cinasa y regulado por cinco sitios de unión específicos para el dominio de unión a ADN del factor de transcripción en levadura Gal4. La proteína NHERF2 fue clonada en el vector PM-Gal4-DBD y co-transfectada con el reportero específico para Gal4. Se transfectó el vector pCMV LacZ como control de eficiencia de transfección y se usó la actividad de β -galactosidasa para normalizar la expresión del reportero de luciferasa.

XI. Inmuno-precipitación de cromatina (ChIP) y Re-ChIP.

Se detalla a continuación el procedimiento para inmuno-precipitación de cromatina a partir de células MCF7. Se analizó por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) la presencia en el inmuno-precipitado de dos regiones, el promotor del gen pS2 (-355 a -192) y de una región río arriba, tomada como control (-3947 a -3639). Se realizó la RCP durante 26 ciclos y los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. La secuencia de los cebadores para el promotor de pS2 es: 5'-ccggccatctctactatgaa-3' y 5'- agatccctcagccaagatgacc-3'. Para la región control: 5'-agctgggtgtccttgtaaag-3' y 5'-gatccaattctcccaaac-3'. El protocolo utilizado se detalla a continuación:

- i. Células: 6 cajas de 15 cm de células MCF7 al 80% de confluencia alcanzan para aproximadamente 6 inmuno-precipitaciones con anticuerpos diferentes, con controles de IgG y dos condiciones (-/+ E2). Las células se siembran a un 40% de confluencia y se dejan al menos 4 días en medio sin rojo de fenol y con FBS tratado con carbón activo-dextrán. (usar al 5%). Las células a ser estimuladas (3 cajas) se les agrega medio con 1 μ M final de E₂ por 45 min.
- ii. Crosslink: Las células deben tener 20 mL de medio y se les agrega 2 mL de *crosslinking mix* (1% final de formaldehído) y se incuban en el *shaker* a temperatura ambiente por 10 min.

- iii. Detener el *crosslink*: Se agrega al medio 1 mL de una solución de glicina 2.5 M (final 125 mM) y se incuba 5 min.
- iv. Lavado con TBS: Se aspira el medio y se lavan las células 3 veces con TBS frío, se le agrega al momento PMSF 1:500 (1 mL de PMSF saturado para 500 mL de TBS)
- v. Lisis: Se aspira muy bien todo el TBS y se agregan 2 mL de buffer de lisis con inhibidor de proteasas, se incuban en hielo 5 min y se colectan las células con un raspador de goma, se concentra la cromatina en tubo estéril de 50 mL.
- vi. Sonicación: Se coloca el tubo en el vástago del sonicador limpio y se dan 6 pulsos continuos de 5 segundos (amplitud 40%), se coloca el tubo en hielo por 30 s, y se repite 5 veces más. No debe hacer espuma, el ruido no debe ser muy agudo, si lo es hay q despegar el vástago del fondo y de las paredes del tubo. Se almacena la cromatina a 4 °C.
- vii. Evaluación de la cromatina: Se toman 60 µl de cada muestra, se centrifugan 10 min a 4 °C y máxima velocidad, se pasa la cromatina a un tubo limpio, se agregan 400 µl de buffer TE y 30 µl de NaCl 5M se agregan 5 µl de RNAsa A (200 mg/mL) y 2.5 µl de proteinasa K (20 mg/mL) y se incuba 2 h a 45 °C, después se incuba a 65 °C toda la noche. Se enfrían las muestras y se hacen 2 extracciones con fenol:cloroformo y una con cloroformo. La fase acuosa se precipita con 1 mL de EtOH 100%. Se lava el pellet, se resuspende en agua y se corre un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño de la cromatina, debe de estar entre 300 y 750 bp
- viii. Preparación de las perlas de proteína A/G agarosa para CHIP: Se toman 500 µl de proteína A agarosa y 500 µl de proteína G agarosa, se agregan 200 µg de ADN de esperma de salmón sonicado y se agrega 400 µl de BSA 10%, se lleva a un volumen de 5 mL con BL-BD (Buffer de Lisis-Buffer de Dilución) 1:9 y se incuba toda la noche a 4 °C con rotación, se centrifuga a 2000 rpm y 4 °C, se lavan con 12 mL de BL-BD 1:9. Se agrega 1 mL del mismo buffer, se hacen 2 alícuotas de 1 mL de las perlas bloqueadas.
- ix. Cuantificación de proteína: Se centrifuga la cromatina a 12 °C y máxima velocidad (4,000 rpm). No debe tener SDS precipitado, se pasa a tubos de 15 mL nuevos y se cuantifica la proteína por Bradford, se hacen diluciones 1:10 de las muestras y del buffer de lisis (servirá como blanco) y se cuantifica 1 µl de las muestras.

- x. Clearing de la cromatina: Se usan 2 mg de extracto por CHIP, se agregan 9 volúmenes de BD con inhibidor de proteasas, se agregan 20 µl de las perlas bloqueadas por CHIP y se incuba toda la noche a 4 °C en rotación (Se puede hacer un pool de cromatina para todos los ChIPs en un falcón de 50 mL)
- xi. Inmunoprecipitación: Al otro día se centrifuga la cromatina 5 min a 3,000 rpm y 4 °C para bajar las perlas, con cuidado se hacen las alícuotas de cromatina en tubos de 15 mL (2 mg por tubo). Se agregan 2-4 µg de anticuerpo y se incuba hasta el otro día a 4 °C con rotación (son casi 24 hrs). Se agregan 10 µl de perlas por cada microgramo de anticuerpo y se incuba 2 hrs a 4 °C.
- xii. Lavado de perlas: Se centrifuga a 1,000 rpm y 4°C por 2 min y se toma del tubo control de IgG el 10% del volumen (400-500 µl), se desecha el resto de sobrenadantes y se guarda a 4 °C la muestra que servirá como Input. Se agrega 14 mL de buffer de lavado con PMSF 1:500 fresco, se centrifugan 2 min a 4 °C y 1,000 rpm, se hacen otros 3 lavados con 14 mL de buffer de lavado, se lava con 14 mL de buffer de lavado final y después se agrega 1 mL de buffer TE, se pasan las perlas a un tubo eppendorf y se centrifugan, se aspira el líquido con mucho cuidado y se agregan 400 µl de buffer TE y 30 µl de NaCl 5M, se incuban las perlas y el tubo con Input (+ 30 µl de NaCl 5M) con 5 µl de RNAsa (200 mg/mL) y 2.5 µl de proteinasa K (20 mg/mL) y se incuba 2h a 45 °C, después se incuba a 65 °C toda la noche (Las incubaciones se hacen en el termomixer con agitación de 800 rpm.)
- xiii. Purificación del DNA: Se centrifugan las perlas e Input 10 min a 4 °C y máxima velocidad y se pasan los sobrenadantes a tubos nuevos, se concentran las muestras a un volumen de 100 µl en un speedvac (aproximadamente 45 min) y se usa el kit de Qiagen *PCR mini-elute* para purificar el ADN. Se agregan 500 µl de buffer PB a cada tubo (la mezcla debe ser amarilla) y se cargan las columnas, se centrifuga 1 min a máx. rpm, se descarta el líquido, se lavan las columnas con 750 µl de buffer PE y se centrifuga 1min, se tira el líquido y se centrifuga 1min, se descarta el líquido y se pasan las columnas a tubos eppendorf nuevos etiquetados, se agregan 40 µl de Buffer EB:H₂O 1:1 a 60 °C directamente a la membrana y se incuba 2 min, se centrifuga 1 min a máx rpm y se descartan las columnas. El DNA obtenido está listo para PCR, se usan 2 µl por PCR. El input se diluye 1:200 para hacer las PCRs.

Soluciones

<i>Crosslinking mix</i>	<i>100 mL</i>	<i>Lysis buffer</i>	<i>100 mL</i>
11% formaldehído	30 mL soln. 37%	1% SDS	5 mL 20%
100 mM NaCl	2 mL 5M	10 mM EDTA	2 mL 0.5M
0.5 mM EGTA	100 µl 0.5M	50 mM Tris pH 8.0	5 mL 1M
50 mM Hepes pH 8.0	5 mL 5M		

<i>Buffer Dilución /</i>	<i>100ml</i>	<i>Buffer de lavado final</i>	<i>100ml</i>
<i>Buffer de lavado</i>	<i>100ml</i>	1% Tritón X-100	1 mL
1% Tritón X-100	1 mL	250 mM NaCl	5 mL 5M
150 mM NaCl	3 mL 5M	2 mM EDTA	400 µl 0.5M
2 mM EDTA	400 µl 0.5M	20 mM Tris pH 8.0	2 mL 1M
20 mM Tris pH 8.0	2 mL 1M		

Glicina 2.5 M

Se pesan 5.625 gr de glicina y se disuelven en 30 ml de agua miliQ (calentar en microondas con lapsos de 12 segundos para facilitar su disolución)

XII. Western blot.

Se obtiene el extracto celular, se cuantifica la concentración de proteína total utilizando el reactivo de Bradford, mediante curva de BSA y lectura de absorbancia a 590 nm. Se corre en gel de poliacrilamida entre 20 y 80 mg de proteína total, se hace transferencia en cámara semi-húmeda a membrana de PVDF de 0.22 µm y se bloquea con una solución de leche al 5% en TBS-Tween 20 al 0.05%. Se incuba con anticuerpo primario en solución de bloqueo por 4 horas en agitación a 4 °C, se lava 6 veces con TBS-T 0.05%, se agrega anticuerpo secundario en solución de bloqueo por una hora a 4 °C con agitación, se hacen 6 lavados con TBS-T y se revela la membrana con reactivo de quimio-luminiscencia de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante.

XIII. Extracción de ARN y RT-PCR.

Se hizo extracción de ARN total utilizando el método de Trizol de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se cuantifica la concentración de ARN y se corre en gel

de agarosa para comprobar su integridad y la ausencia de ADN genómico. Se obtiene el ADNc mediante la enzima de Roche *Transcriptor reverse transcriptase*, a continuación se muestra el esquema clásico para una reacción:

RNA templado	1.8 µg
Oligo (dT) ₁₅	1 µl
Agua miliQ estéril	completar la reacción a 13 µl

Incubar a 65 °C por 10 min, se pasan los tubos inmediatamente a hielo durante 2 min y agregar:

Buffer 5X	4 µl
RNase out	0.5 µl
dNTPs mix(10mM)	2 µl
Enzima RT (<i>transcriptor reverse transcriptase</i>)	0.5 µl

Incubar por 30 min a 55°C

Inactivar la RT a 5 min a 85°C

Después se utiliza 1 µl de ADNc por cada reacción de PCR, utilizando al enzima Taq Platinum de invitrogen de acuerdo a sus especificaciones y con los siguientes cebadores:

CTSD sentido 5'-CGAGGTGCTCAAGAACTACATGGAC-3'	CTSD antisentido 5'-ATCTGGGTCCCTGCTCAGGTAGAAG-3'
CXCR4 sentido 5'-GCAATGGATTGGTCATCCTGGTCATGG-3'	CXCR4 antisentido 5'-GCCAACCATGATGTGCTGAAACTGG-3'
REα sentido 5'-CTGAACCGTCCGCAGCTCAAGATC-3'	REα antisentido 5'-GTCTCCTTGGCAGATTCCATAGCC-3'
pS2 sentido 5'ATGGCCACCATGGAGAACAAGG-3'	pS2 antisentido 5'-CTAAAATTCACACTCCTCTTCTGG-3'
NHERF2 sentido 5'-CGAAGCTGGCAAGAAGGATGTCAGTG-3'	NHERF2 antisentido 5'-ATCCTCAGTGTGCCTTGTCGGAACCAG-3'

HPRT sentido 5'-GGCGTCGTGATTAGTGATGATGAACC-3'	HPRT antisentido 5'CTGGCTTATATCCAACACTTCGTGGG-3'
β -actina sentido 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'	β -actina antisentido 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'

Los productos de PCR se corren en gel de agarosa al 2% y se visualizan por bromuro de etidio, se foto-documentaron y se realizó análisis de densitometría mediante el software de bio-rad *quantity one*, los datos fueron analizados con el programa estadístico Origin 6.0

XIV. Ensayo de proliferación celular por CFSE.

Se realizó la determinación indirecta de la tasa de proliferación mediante el método de fluorescencia con CFSE, se detalla el protocolo utilizado a continuación:

1. Se siembran 300,000 células con el medio apropiado en cajas de 35 mm y se dejan recuperar en cultivo por 24 hrs.
2. Se prepara PBS con FBS al 0.1% (1 mL por cada caja) precalentado a 37 °C y se le agrega CFSE 5mM (2 μ L por cada 1 mL de PBS/FBS) para tener 20 μ M final, en un tubo protegido de la luz.
3. Se retira el medio de las células, se agrega el PBS con CFSE y se incuba por 30 min en la incubadora.
4. Se lavan dos veces las células con 2 mL por caja de PBS/FBS y se incuban con 2 mL medio completo por 30 min en la incubadora.
5. Se lavan las células con 2 mL de PBS/FBS, las células del tiempo Cero se colectan por tripsinización y se resuspenden en 180 μ l de PBS, se fijan con 20 μ l de formadehído 37% (3.7% final) por 15 min a temperatura ambiente y se guardan a 4 °C, las células restantes se incuban con medio completo y los diferentes tratamientos.
6. Las células que cumplan el tiempo de crecimiento programado se colectan por tripsinización y se resuspenden en 180 μ l de PBS, se fijan con 20 μ l de formadehído 37% (3.7% final) por 15 min a temperatura ambiente y se guardan a 4 °C.

Las células sin teñir y las tiempo cero se usan para establecer los parámetros en el citómetro de flujo FACSCalibur, y se toma lectura de fluorescencia para al menos 30,000

células por cada condición y tratamiento. Los datos obtenidos son analizados y graficados con el programa FlowJo.

XV. Modelo murino para tumorigénesis.

Se utilizó un modelo murino para determinar el potencial tumorigénico de las células FLAG-NHERF2-MCF7. Se usaron dos grupos de nueve ratones desnudos con una edad de 25 días obtenidos del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas, a los cuales se les implantaron sub-dérmicamente 3 millones de células, MCF7 control o FLAG-NHERF2-MCF7 resuspendidas en matrigel al 50%. Los ratones fueron estimulados con 30 µg de estradiol de manera semanal durante siete semanas, al final fueron sacrificados y los tumores extraídos y pesados. Todos los procedimientos fueron hechos siguiendo las recomendaciones del Consejo Canadiense de Cuidado Animal y los lineamientos para un tratamiento ético de animales de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

XVI. PCR en tiempo real con sondas TaqMan.

Se llevó a cabo la determinación del ARN mensajero de NHERF2 mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan a partir del ADNc sintetizado usando ARN total de muestras de tumor de mama y tejido de mama control obtenidos en el Instituto Nacional de Cancerología. Las muestras utilizadas fueron caracterizadas por ser positivas para el receptor de estrógenos y progesterona y pertenecer a los estadios tempranos IIA y IIB. Ninguna de las pacientes recibió tratamiento médico antes de la obtención de la muestra. Esta parte del proyecto fue aprobada por los Comités de Ética e Investigación Científica del Instituto Nacional de Cancerología y del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se determinaron los niveles de ARNm de β -actina y NHERF2 usando cebadores específicos y sondas TaqMan optimizadas para la detección de NHERF2 (Hs00191186_m1) y β -actina (Hs99999903_m1), las PCR se hicieron utilizando el producto TaqMan Universal PCR Master Mix en un termociclador para tiempo real Lightcycler 480 de Roche.

XVII. Uso de la base pública de datos de microarreglos Oncomine.

Se consultó la base de datos en línea Oncomine (www.oncomine.org) para resultados de la expresión de NHERF2 en micro-arreglos realizados con ARN de muestras de tumores

y tejido normal y para tumores analizados en grupos de positivo y negativo para la expresión del RE α . Las gráficas fueron generadas en el mismo sitio bajo los criterios antes mencionados.

Referencias

- Acconcia, F. & Kumar, R., 2006. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer letters*, 238(1), pp.1–14. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383505005677?showall=true>.
- Benecke, A., Chambon, P. & Gronemeyer, H., 2000. Synergy between estrogen receptor α activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep*, 1(2), pp.151–157. Available at: <http://embor.embopress.org/highwire/citation/4698/mendeley>.
- Bouras, T., Southey, M.C. & Venter, D.J., 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 Research*, 61 (3), pp.903–907. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/3/903.abstract>.
- Curtis, C. et al., 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), pp.346–352. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10983>.
- Fox, S.B. et al., 2004. Expression of the Forkhead Transcription Factor FOXP1 Is Associated with Estrogen Receptor α and Improved Survival in Primary Human Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 10 (10), pp.3521–3527. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/10/3521.abstract>.
- Girault, I. et al., 2003. Advances in Brief Expression Analysis of Estrogen Receptor α Coregulators in Breast Carcinoma : Evidence That NCOR1 Expression Is Predictive of the Response to Tamoxifen 1. *Clinical Cancer Research*, 9(April), pp.1259–1266.
- Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development*, 14(2), pp.121–141. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/14/2/121.short>.
- Gruber, C.J. et al., 2004. Anatomy of the estrogen response element. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(2), pp.73–78. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276004000098>.
- Han, S.J., Lonard, D.M. & O'Malley, B.W., 2014. Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(1), pp.8–15. Available at: [http://www.cell.com/trends/endocrinology-metabolism/abstract/S1043-2760\(08\)00163-X](http://www.cell.com/trends/endocrinology-metabolism/abstract/S1043-2760(08)00163-X).
- Harris, B.Z. & Lim, W.A., 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of Cell Science*, 114 (18), pp.3219–3231. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/114/18/3219.abstract>.
- Hermanson, O., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G., 2002. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(2), pp.55–60. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276001005276>.
- Kim, J.H., Li, H. & Stallcup, M.R., 2003. CoCoA, a Nuclear Receptor Coactivator which Acts through an N-Terminal Activation Domain of p160 Coactivators. *Molecular Cell*, 12(6), pp.1537–1549. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276503004507>.
- Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, 29 (14), pp.2905–2919. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/14/2905.abstract>.

- Kraus, W.L., McInerney, E.M. & Katzenellenbogen, B.S., 1995a. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (26), pp.12314–12318. Available at: <http://www.pnas.org/content/92/26/12314.abstract>.
- Kraus, W.L., McInerney, E.M. & Katzenellenbogen, B.S., 1995b. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), pp.12314–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 1, 2012].
- Kumar, P., Purbey, P. & Ravi, D., 2005. Displacement of SATB1-bound histone deacetylase 1 corepressor by the human immunodeficiency virus type 1 transactivator induces expression of interleukin-2 and. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), pp.1620–1633. Available at: <http://mcb.asm.org/content/25/5/1620.short> [Accessed October 1, 2012].
- Kumar, R. & Litwack, G., 2009. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids*, 74(12), pp.877–883. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X09001822>.
- Kumar, R. & Thompson, E.B., 2012. Folding of the glucocorticoid receptor N-terminal transactivation function: Dynamics and regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), pp.450–456. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720711001973>.
- Kumar, R. & Thompson, E.B., 2003. Transactivation Functions of the N-Terminal Domains of Nuclear Hormone Receptors: Protein Folding and Coactivator Interactions. *Molecular Endocrinology*, 17(1), pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/me.2002-0258>.
- Langer, G. et al., 2010. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*, 75(8–9), pp.603–610. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X09002712>.
- Lanz, R.B. et al., 1999. A Steroid Receptor Coactivator, SRA, Functions as an RNA and Is Present in an SRC-1 Complex. *Cell*, 97(1), pp.17–27. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400807114> [Accessed May 22, 2014].
- Lavery, D.N. & McEwan, I.J., 2008. Structural Characterization of the Native NH₂-Terminal Transactivation Domain of the Human Androgen Receptor: A Collapsed Disordered Conformation Underlies Structural Plasticity and Protein-Induced Folding†. *Biochemistry*, 47(11), pp.3360–3369. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/bi702221e>.
- Lavery, D.N. & McEwan, I.J., 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochemical Journal*, 391(3), pp.449–464. Available at: <http://www.biochemj.org/bj/391/bj3910449.htm>.
- Lee, J.H. et al., 2005. Interactions with p300 enhance transcriptional activation by the PDZ-domain coactivator Bridge-1. *The Journal of endocrinology*, 187(2), pp.283–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293776> [Accessed October 1, 2012].
- Leygue, E. et al., 1999. Expression of the Steroid Receptor RNA Activator in Human Breast Tumors. *Cancer Research*, 59 (17), pp.4190–4193. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/17/4190.abstract>.

- Liang, J. et al., 2008. GAS, a new glutamate- rich protein, interacts differentially with SRCs and is involved in oestrogen receptor function. , 10(1), pp.51–57. Available at: <http://embor.embopress.org/highwire/citation/6549/mendeley>.
- Lonard, D.M. & O'malley, B.W., 2007. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Molecular cell*, 27(5), pp.691–700. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276507005552> [Accessed March 19, 2014].
- Maggiolini, M. & Picard, D., 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *Journal of Endocrinology* , 204 (2), pp.105–114. Available at: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/204/2/105.abstract>.
- McInerney, E.M. et al., 1996a. Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 93 (19), pp.10069–10073. Available at: <http://www.pnas.org/content/93/19/10069.abstract>.
- McInerney, E.M. et al., 1996b. Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19), pp.10069–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mérot, Y. et al., 2004. The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *The Journal of biological chemistry*, 279(25), pp.26184–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078875> [Accessed October 1, 2012].
- Métivier, R. et al., 2002. A Dynamic Structural Model for Estrogen Receptor- α Activation by Ligands, Emphasizing the Role of Interactions between Distant A and E Domains. *Molecular Cell*, 10(5), pp.1019–1032. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276502007463>.
- Métivier, R. et al., 2000. Function of N-Terminal Transactivation Domain of the Estrogen Receptor Requires a Potential α -Helical Structure and Is Negatively Regulated by the A Domain. *Molecular Endocrinology*, 14(11), pp.1849–1871. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/mend.14.11.0546>.
- Métivier, R. et al., 2001. Synergism Between ER α Transactivation Function 1 (AF-1) and AF-2 Mediated by Steroid Receptor Coactivator Protein-1: Requirement for the AF-1 α -Helical Core and for a Direct Interaction Between the N- and C-Terminal Domains. *Molecular Endocrinology* , 15 (11), pp.1953–1970. Available at: <http://mend.endojournals.org/content/15/11/1953.abstract>.
- Moras, D. & Gronemeyer, H., 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(3), pp.384–391. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506749880015X>.
- Nakata, A. et al., 2004. GRIP1tau, a novel PDZ domain-containing transcriptional activator, cooperates with the testis-specific transcription elongation factor SII-T1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 9(11), pp.1125–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507123> [Accessed October 1, 2012].
- Oate, S.A. et al., 1998. The Steroid Receptor Coactivator-1 Contains Multiple Receptor Interacting and Activation Domains That Cooperatively Enhance the Activation Function 1 (AF1) and AF2 Domains of Steroid Receptors. *Journal of Biological Chemistry* , 273 (20), pp.12101–12108. Available at: <http://www.jbc.org/content/273/20/12101.abstract>.

- Perissi, V. et al., 1999. Molecular determinants of nuclear receptor–corepressor interaction. *Genes & Development* , 13 (24), pp.3198–3208. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/13/24/3198.abstract>.
- Poulat, F. et al., 1997. The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *The Journal of biological chemistry*, 272(11), pp.7167–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054412>.
- Radvanyi, L. et al., 2005. The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 102 (31), pp.11005–11010. Available at: <http://www.pnas.org/content/102/31/11005.abstract>.
- Revankar, C.M. et al., 2005. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* , 307 (5715), pp.1625–1630. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/307/5715/1625.abstract>.
- Richardson, A.L. et al., 2006. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer cell*, 9(2), pp.121–32. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610806000298> [Accessed March 5, 2014].
- Shupnik, M.A., 2004. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene*, 23(48), pp.7979–7989. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208076>.
- Smith, C.L. et al., 1996. CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 93 (17), pp.8884–8888. Available at: <http://www.pnas.org/content/93/17/8884.abstract>.
- Thomas, M.K. et al., 1999. Bridge-1, a novel PDZ-domain coactivator of E2A-mediated regulation of insulin gene transcription. *Molecular and cellular biology*, 19(12), pp.8492–504. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84960&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Thompson, E.B. & Kumar, R., 2003. DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(1), pp.1–4. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03008775>.
- Torchia, J., Glass, C. & Rosenfeld, M.G., 1998. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(3), pp.373–383. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067498800148>.
- Voltz, J.W., Weinman, E.J. & Shenolikar, S., 2001. Expanding the role of NHERF , a PDZ-domain containing protein adapter , to growth regulation. *Oncogene*, 20, pp.6309–6314.
- Walsh, C. a et al., 2012. The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *International journal of biological sciences*, 8(4), pp.470–85. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3303173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 28, 2014].
- Watanabe, M. et al., 2001. A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor [alpha] coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J*, 20(6), pp.1341–1352. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.6.1341>.

- Webb, P. et al., 1998. Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins. *Molecular Endocrinology*, 12(10), pp.1605–1618. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/mend.12.10.0185>.
- Wei, X., Xu, H. & Kufe, D., 2006. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Molecular cell*, 21(2), pp.295–305. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276505019015> [Accessed May 22, 2014].
- Xu, J. & Li, Q., 2003. Review of the in Vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family. *Molecular Endocrinology*, 17(9), pp.1681–1692. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/me.2003-0116>.
- Yu, G. et al., 2001. Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins. *Brain research. Developmental brain research*, 130(2), pp.217–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675124>.
- Zhao, C. et al., 2003. Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer*, 98(1), pp.18–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.11482>.
- Zhao, H. et al., 2004. Different Gene Expression Patterns in Invasive Lobular and Ductal Carcinomas of the Breast. *Molecular Biology of the Cell*, 15 (6), pp.2523–2536. Available at: <http://www.molbiolcell.org/content/15/6/2523.abstract>.
- Zwart, W. et al., 2010. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of cell science*, 123(Pt 8), pp.1253–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332105> [Accessed October 1, 2012].

SIP1/NHERF2 enhances estrogen receptor alpha transactivation in breast cancer cells

Ivan Meneses-Morales^{1,2,†}, Angeles C. Tecalco-Cruz^{1,2,†}, Tonatiuh Barrios-García^{1,2}, Vania Gómez-Romero^{1,2}, Isis Trujillo-González^{1,2}, Sandra Reyes-Carmona^{1,2}, Eduardo García-Zepeda^{1,2,3}, Erika Méndez-Enríquez^{1,2,3}, Rafael Cervantes-Roldán^{1,2}, Víctor Pérez-Sánchez⁴, Félix Recillas-Targa^{1,5}, Alejandro Mohar-Betancourt^{1,4} and Alfonso León-Del-Río^{1,2,*}

¹Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico, ²Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico, ³Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico, ⁴Unidad de investigación biomédica en cáncer, Instituto Nacional de Cancerología and Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, San Fernando No. 22, Col. Sección XVI Delegación Tlalpan, C.P. 14080 México, D.F., Mexico and ⁵Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

Received April 18, 2013; Revised March 27, 2014; Accepted March 31, 2014

ABSTRACT

The estrogen receptor alpha (ER α) is a ligand-activated transcription factor that possesses two activating domains designated AF-1 and AF-2 that mediate its transcriptional activity. The role of AF-2 is to recruit coregulator protein complexes capable of modifying chromatin condensation status. In contrast, the mechanism responsible for the ligand-independent AF-1 activity and for its synergistic functional interaction with AF-2 is unclear. In this study, we have identified the protein Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2 (NHERF2) as an ER α -associated coactivator that interacts predominantly with the AF-1 domain of the nuclear receptor. Overexpression of NHERF2 in breast cancer MCF7 cells produced an increase in ER α transactivation. Interestingly, the presence of SRC-1 in NHERF2 stably overexpressing MCF7 cells produced a synergistic increase in ER α activity. We show further that NHERF2 interacts with ER α and SRC-1 in the promoter region of ER α target genes. The binding of NHERF2 to ER α in MCF7 cells increased cell proliferation and the ability of MCF7 cells to form tumors in a mouse model. We analyzed the expression of NHERF2 in breast cancer tumors finding a 2- to 17-fold increase in its mRNA levels in 50% of the tumor samples com-

pared to normal breast tissue. These results indicate that NHERF2 is a coactivator of ER α that may participate in the development of estrogen-dependent breast cancer tumors.

INTRODUCTION

The hormone estrogen (17 β -estradiol, E2) has a key role in cell proliferation and differentiation. The effects of E2 have been widely analyzed in human mammary gland where it is responsible for normal epithelial growth and for the development of 70–80% of human breast cancer tumors (1). The biological effects of E2 on mammary epithelium are mediated by the estrogen receptor α (ER α), a ligand-activated transcription factor. Structurally, ER α is organized in functionally independent domains that include an N-terminal domain, a DNA-binding domain, formed by two cysteine-rich zinc-finger motifs, and a C-terminal ligand-binding domain (LBD) (2). ER α transactivation is mediated by two transcriptional activating domains, designated AF-1 and AF-2. AF-1 is located at the N-terminal region of ER α and is characterized by a ligand-independent transcriptional activity (3,4). AF-2 is located within the LBD domain of ER α and its transcriptional activity shows a strong ligand-dependency.

Structural and functional studies have shown that ligand binding induces a major conformational change in the LBD domain of ER α . The structural rearrangement creates a new docking interphase that allows AF-2 to interact

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +5255 5622 8940; Email: leon@biomedicas.unam.mx

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

with numerous coregulator proteins (5,6). AF-2-associated coregulators capable of enhancing nuclear receptor transactivation are called coactivators and are characterized by having one or more LXXLL motifs that mediate their interaction with the LBD domain of ER α (7,8). ER α coactivators include SRC-1, SRC-2/GRIP1/TIF2/NCoA2, SRC3/RAC3/p/CIP/ACTR/AIB1, CREB-binding protein (CBP)/p300 and CBP-associated factor (P/CAF). AF-2 coactivators enhance ER α transactivation through different mechanisms. Some coactivators, like TRAP/DRIP, enhance nuclear receptor activity through their interaction with members of the basal transcription machinery (9). Others, like SRC-1 and CBP/p300, modify the condensation status of the chromatin through their intrinsic histone acetyltransferase activity (10,11).

In contrast, the nature of the AF-1 contribution to ER α transcriptional activity is not well understood. Functional and structural analyses of ER α activating domains have shown that AF-1 activity exhibits different promoter and cell specificity from AF-2, indicating that the two transactivating domains function through different mechanisms (12,13). It has been suggested that AF-1 activity is regulated by the recruitment of coactivator proteins that mediate AF-1 transactivation or its direct interaction with the basal transcription machinery (14). The search for AF-1 specific coregulators has identified a number of highly diverse coregulator proteins including the coactivators known as p72/p68 and steroid receptor activator (SRA) (15). These proteins coactivate ER α as part of p72/p68 and p/300 complex (16). The AF-2-associated coactivators SRC-1 and p/300 were also shown to interact with the AF-1 domain of ER α (17,18).

In this work, we sought to identify additional AF-1 coactivators in order to gain better insight into the mechanism responsible for ER α transactivation. We identified a 337 amino acid protein containing two PDZ domains that had been previously identified as a coactivator of nuclear testis differentiation factor SRY (SIP1) (19) and as a regulatory protein of the membrane-bound Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2 (NHERF2) (20). We show that NHERF2 increases ER α transactivation by interacting predominantly with its AF-1 domain. Our results show that NHERF2 transcriptional activity is mediated through its recruitment to the promoter region of ER α target genes and its interaction with the AF-2-associated coactivator SRC-1. Functionally, NHERF2 overexpression increases transcription of endogenous E2-dependent genes and stimulates cell proliferation and tumor formation in mice. We show further that NHERF2 mRNA is overexpressed (2- to 17-fold) in 50% of breast cancer tumors compared to normal breast tissue. These results indicate that NHERF2 is a coactivator of ER α that may participate in the development of estrogen-dependent breast cancer tumors.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Estradiol (17 β -estradiol) and geneticin (G418) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Cell-trace CFSE cell proliferation kit was from Invitrogen (Carlsbad, CA). Antibodies: ER α antibody was purchased from Santa Cruz

Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-FLAG antibody was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SRC-1 antibody was from Pierce, Thermo Scientific and NHERF2 monoclonal antibody was purchased from Cell Signaling Technology. Knockdown assays were performed using NHERF2 siRNA cocktail and control siRNA from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Plasmids

pcDNA3.1-ER α and ERE-TK-Luc were kindly provided by Dr W. Lee Kraus, Cornell University, pcDNA-SRC1 was a gift of Dr R. Kurokawa, Saitama Medical University and MMTV-Luc was provided by Joe Torchia, University of Western Ontario. Human full-length NHERF2 cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) and FLAG-tagged mammalian expression vector pCMV-3Tag-1A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Glutathione S-transferase (GST)-NHERF2 full-length and deletion constructs were generated by subcloning into GST pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The sequences of all constructs were verified by DNA sequencing at LARAGEN Inc. (Culver City, CA).

Yeast two-hybrid screening

A yeast two-hybrid screen was performed using the matchmaker two-hybrid system kit (CLONTECH). Briefly, a cDNA fragment encoding the AF-1 domain (amino acids 1–180) of ER α was subcloned into the pAS2.1 vector. A human mammary gland cDNA library in pACT2 plasmid was screened with bait construct pAS2.1/AF1 using sequential polyethylene glycol/lithium acetate transformation, according to the manufacturer's instructions. Y190 yeast cells harboring pAS2-1/AF1 and transformed with the cDNA library were plated on medium lacking tryptophan, leucine and histidine (SD/-Leu -Trp -His) containing 25 mM 3-amino-1,2,4-triazole(3-AT) and incubated for 2–4 days at 30°C. Resulting colonies were assayed for β -galactosidase activity. The positive AD plasmids were transformed into *Escherichia coli* DH5 α cells for DNA sequencing and identification using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis.

Immunofluorescence and confocal microscopy studies

The cellular location of ER α and NHERF2 was determined by indirect immunofluorescence. Briefly, HepG2 cells were grown on glass coverslips and fixed with freshly prepared 3% paraformaldehyde solution. The cells were incubated first with primary antibodies and then with secondary antibodies conjugated with Alexa-546 (red) and Alexa-488 (green; both from Molecular Probes, Eugene, OR). Prolong-Gold Antifade reagent with DAPI (blue; Invitrogen) was used to counterstain the DNA. Confocal scanning analysis was done using an MRC600 laser-scanning confocal microscope (Bio-Rad, Hercules, CA). Each slide was examined for each stain at three excitation wavelengths (488, 546 and 633 nm).

Cell culture and transfection assays

HepG2, MCF7, ZR-75-1, CV-1 and AD293 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in α -MEM supplemented with 5% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Cells were seeded into tissue culture dishes containing phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% charcoal/dextran-treated FBS and cultured for 24 h before all experimental treatments with hormone. Cells were transfected using the calcium phosphate-DNA coprecipitation method, which typically included 500 ng of ERE-TK-Luc, 200 ng of pCMV β Gal (transfection control), 250 ng of pcDNA3.1-ER α , and 100–500 ng of pcDNA3.1-NHERF2 or other test vector. After 12 h, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and treated with either 100 nM E2 or carrier (ethanol) for 24 h in phenol red-free DMEM supplemented with 5% stripped FBS. Cells were then washed and harvested in potassium phosphate lysis buffer containing 1% Triton X-100. Luciferase and β -galactosidase activities were measured using a monolight 3010 luminometer (Pharmingen). Cell lines stably overexpressing NHERF2 were generated by transfecting MCF7 cells with pCMV-3Tag-NHERF2 using Superfect (Qiagen, Valencia, CA) and, after 48 h, selected in medium containing G418 (500 μ g/mL). For NHERF-2 knockdown assays, siRNA specific cocktail and siRNA control duplexes were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and transfected using X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche). Reduction in NHERF2 expression was determined by western blot (WB) using specific anti-NHERF2 antibody.

GST pull-down assay

In vitro transcription and translation of the NHERF2 and ER α proteins were done using the TNT transcription/translation system (Promega) in the presence of [³⁵S]-methionine. The GST pull-down assays were done by incubating equal amounts of GST, GST-NHERF2 or GST-ER α -domains immobilized on GST beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) with *in vitro*-translated recombinant protein. Bound proteins were isolated by incubating the mixture for 3 h at 4°C and then washing five times with NP40 lysis buffer (20 mmol/l Hepes pH 7.9, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8.0, 4 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l DTT, 0.02% NP40, 10% glycerol and 0.5 mmol/l PMSF). For endogenous ER α pull-down assay, the GST bound proteins were incubated with a whole cell extract of MCF7 cells, resuspended in TBS-0.2% triton X-100 and sonicated. The proteins were eluted with a 2x Laemmli sample buffer, separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and visualized by autoradiography or immunoblot.

Immunoprecipitation and western blot

ZR-75-1 cells were lysed with TNTE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing 0.5%

Triton X-100 plus a mixture of protease and phosphatase inhibitors). MCF7 cells were lysed with RIPA buffer (Tris-HCl pH 7.4, 50 mM, NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, 0.5% DOC (deoxycholic acid, sodium salt), 1% NP-40, 0.1% SDS). Proteins were immunoprecipitated with mouse monoclonal anti-ER α (D-12) or mouse monoclonal anti-SRC-1 (MA1-840, 1135/H4) (Pierce, Thermo Scientific). Immunoprecipitated proteins were separated by PAGE and detected by WB with rabbit monoclonal anti-NHERF2 (D3A5) antibody or rabbit polyclonal anti-ER (HC-20) antibody. Proteins were visualized by incubation with anti-rabbit secondary horseradish-peroxidase-conjugated antibody (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.) and using an enhanced chemiluminescence assay (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific).

Chromatin immunoprecipitation and sequential ChIP (Re-ChIP) assays

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as previously described (21). Before immunoprecipitation, 10% of each chromatin preparation was set aside for use as a control DNA in polymerase chain reaction (PCR) amplification (input). ChIP was carried out at 4°C overnight with 2 μ g of specific antibody. For re-ChIP, the DNA-protein complexes immunoprecipitated with the indicated antibodies were eluted with 10 mM dithiothreitol, diluted 20 \times in re-ChIP buffer (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0), and then reimmunoprecipitated with the indicated antibodies. The pS2 gene promoter region (ERE, -355 to -192) or DNA region located 3 kb upstream of the pS2 promoter (negative control, -3947 to -3639) was amplified by PCR. PCR analysis was also performed for Cathepsin-D (CSTD) promoter region (-568 to -416). PCR products were resolved on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. PCR bands were subjected to densitometry analysis using Molecular Imager FX and Quantity One software (Bio-Rad). The sequences of the primers used are as follows: pS2 promoter: sense 5'-ccggccatctctactatgaa-3', antisense 5'-agatccctcagcaagatgacc-3'; pS2 upstream control region: sense 5'-agctgggtgtctctgtaaag-3', antisense 5'-gatccacttctcccaaac-3'; CSTD promoter: sense 5'-GGTTTCTCTGGAAGCCCTGTAG-3', antisense 5'-TCCTGCACCTGCTCCTCC-3'.

RT-PCR assay

The mRNAs encoding CTSD, CXCR4, pS2, ER α , NHERF2, HPRT and β -actin were amplified by rt-PCR. Total RNA was isolated from MCF7, MCF7-FLAG-NHERF2 or MCF7 NHERF2-siRNA cells using TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer instructions. Total RNA (2 μ g) was used for cDNA synthesis using oligo (dT) primer and SuperScript II (Invitrogen). PCR amplification was carried out using Taq PCR master mix kit (Amplificase-BioTecMol) using the following primers: CTSD sense 5'-CGAGGTGCTCAAGAACTACATGGAC-3', antisense 5'-ATCTGGGTCCCTGCTCAGGTAGAAG-3'; CXCR4 sense 5'-GCAATGGATTGGTCATCCTGGTCATGG-3', antisense 5'-GCCAACCATGATGTGCTGAACTGG-3';

ER α sense 5'-CTGAACCGTCC GCAGCTCAAGATC-3', antisense 5'-GTCTCCTTGGCAGATTCCATAGCC-3'; pS2 sense 5'ATGGCCACCATGGAGAACAAGG-3', antisense 5'-CTAAAATTCACACTCCTCTTCTGG-3'; NHERF2 sense 5'-CGAAGCTGGCAAGAAG GATGTCAGTG-3', antisense 5'-ATCCTCAGTG TCCTTGTC GGAACCAG-3'; HPRT sense 5'-GGCGTCGTGATTAGTGATGATGAACC-3, antisense 5'CTGGCTTATATCCAACACTTCGTGGG-3'; β -actin sense 5'-GGGTCAGAAGGATTCCCTATG-3', antisense 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'. PCR products were separated by PAGE and visualized with ethidium bromide. Estrogen-dependent genes' mRNA levels were normalized with respect to HPRT and β -actin mRNA levels.

CFSE labeling and proliferation assay

MCF7 and MCF7-NHERF2 cells were incubated in serum-free medium for 24 h, and 6×10^5 cells were stained with CFSE reagent (5 mM stock) using the CellTrace™ CFSE cell proliferation kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in a solution of PBS supplemented with 0.1% FBS for 30 min at 37°C. After treatment, cells were washed twice with PBS/0.1% FBS, incubated in MEM/5% FBS for 30 min at 37°C and washed twice more with PBS/1% FBS. The CFSE fluorescence intensity was measured at 24 and 48 h by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis in a FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA). Acquired data were analyzed using the FlowJo software (8.7v, Tree Star, Inc., Ashland, OR). The reduction in fluorescence per unit cell is taken as an indicator of the number of intervening cell divisions.

Mouse xenotransplantation experiments

Two groups of nude mice (age 5–6 weeks, 9 mice/group) (Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas) were implanted with 3×10^6 control MCF7 cells or with 3×10^6 MCF7-NHERF2 cells suspended in 50% matrigel. All animals were subdermally stimulated with estradiol (30 μ g/week) for the duration of the experiment. After 7 weeks the animals were sacrificed and the tumors were extracted and weighed. All animal procedures were done in compliance with the Canadian Council on Animal Care and the guidelines for the ethical treatment of laboratory animals of Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

NHERF2 mRNA expression in breast cancer tumor samples

The total RNA from fragments of breast cancer tumor biopsies obtained at the Instituto Nacional de Cancerología was isolated using Trizol. The samples were from ER α positive/progesterone receptor (PR) positive breast cancer tumors stages IIA and IIB for which neoplasia-free tissue was also collected during biopsies. None of the patients included in this study received medical treatment before the biopsy was obtained and confirmation of the histological type of cancer and immune-histochemistry pattern was defined. This part of the study was approved by the Ethical and Scientific Research Committees of the Instituto

Nacional de Cancerología and Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. The levels of NHERF2 and β -actin mRNA were determined using a Lightcycler 480 real-time PCR system (Roche) and optimized specific primers and probes (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) and TaqMan Universal PCR Master Mix reagents (Applied Biosystems) according to the manufacturer's directions. The assay ID numbers of the TaqMan Gene Expression probes were (for NHERF2) Hs00191186_m1 and (for β -actin) Hs99999903_m1. The mRNA levels were calculated using the comparative CT method and expressed as fold increase relative to normal tissue after normalization using β -actin gene expression level (22,23).

Analysis of NHERF mRNA expression using a cancer microarray database

To validate the relation between NHERF2 mRNA expression levels and breast cancer, we consulted the Oncomine microarray database (www.oncomine.org) for analysis and visualization of the Cancer Genome Atlas (TCGA). The NHERF2 mRNA expression levels were displayed using log₂ median-centered ratio boxplots for breast carcinoma versus normal tissue, and for estrogen receptor negative (ER α -) versus estrogen receptor positive (ER α +).

Statistical analysis

Each transfection and ChIP assay was performed in triplicate in three different experiments using different cell cultures and chromatin preparations, respectively. Data are presented as mean \pm S.E. Statistical significance was analyzed at 0.05 levels of significance using Student's *t*-test.

RESULTS

Identification of NHERF2 as an AF-1 interacting protein

To identify novel coregulators that recognize the activation function AF-1 of ER α , we used this region (amino acids 1–180) as bait in a yeast two-hybrid screen of 5×10^6 independent clones of a human mammary gland cDNA library. Eleven cDNA clones were isolated and sequenced. Two showed almost identical sequences encoding a 337 amino acid protein containing two PDZ domains (Figure 1A). Sequence analysis using the BLAST program of the National Center for Biotechnology Information revealed that the candidate protein had been previously described as the human testis determining factor SRY-interacting protein (SIP-1) and as the regulatory factor of the small intestine brush-border membrane Na⁺/H⁺ exchanger, NHERF2.

NHERF2 colocalize in the cell nucleus with estrogen receptor α

Immunostaining of E2-stimulated HepG2 cells with anti-ER α antibody (green) showed ER α predominantly localized in the cell nucleus (left panel, Figure 1B). Incubation of HepG2 cells with anti-NHERF2 antibody (red, center panel) demonstrated the presence of NHERF2 in the cytoplasm and nucleus but in greater abundance in the nucleus where it colocalizes (yellow, right panel) with ER α (Figure 1B).

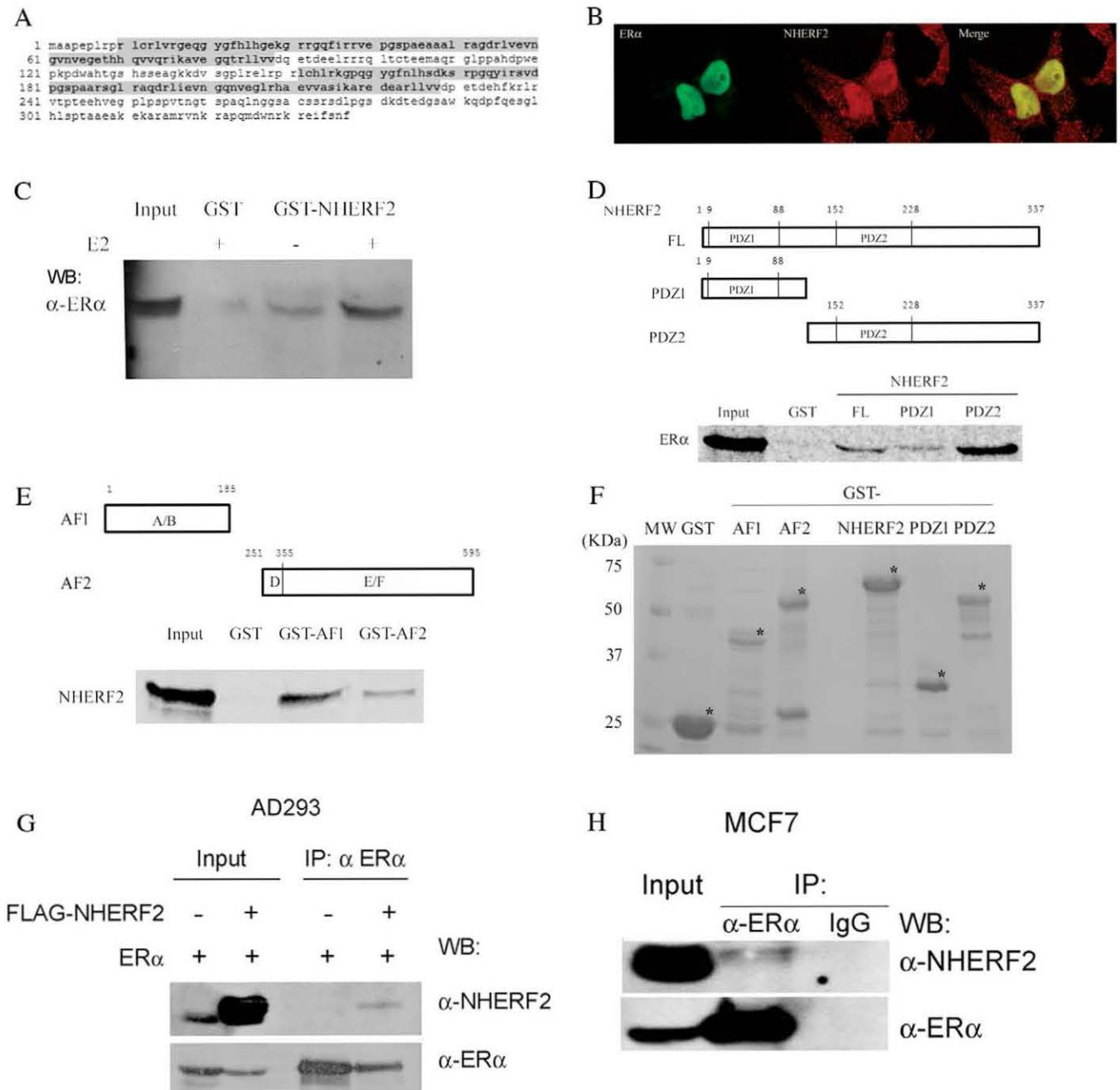


Figure 1. NHERF2 is an ERα associated protein. (A) NHERF2 protein sequence obtained from cDNA clones isolated by yeast two-hybrid screening. The PDZ domain1 (PDZ1, amino acids 10–88) and PDZ domain 2 (PDZ2, amino acids 152–238) are highlighted in gray. (B) Subcellular localization of NHERF2 and ERα. NHERF2 (left panel, green) and ERα (middle panel, red) were visualized using specific antibodies as described in Materials and Methods. Cellular colocalization is shown by merging NHERF2 and ERα images (right panel, yellow). (C) Estradiol (E2) enhances NHERF2 binding to ERα. Nuclear protein extracts from MCF7 cells were incubated with a GST-NHERF2 fusion protein or a GST control protein. Proteins captured in the presence (E2+) or absence (E2–) of estradiol were resolved by PAGE and the presence of ERα was visualized by western blot (WB). Input lane represents 10% of the nuclear extract used in the capture assays. (D) *In vitro* interaction between NHERF2 and ERα. Schematic representation of N-terminal (PDZ1), C-terminal (PDZ2) and full-length NHERF2 GST-fusion proteins used in pull-down assays is shown in the top panel. The bottom image shows [³⁵S]methionine-labeled-ERα resolved by PAGE following capture by GST-NHERF2 full length (FL) or protein fragments (PDZ1, PDZ2) or GST control. Input represents 10% of the labeled ERα used in the assay. (E) NHERF2 interacts predominantly with the AF-1 domain of ERα. Schematic representation of N-terminal (AF-1) and C-terminal AF-2 fragments of ERα used in pull-down assays is shown at the top. The bottom image shows [³⁵S]methionine-labeled-NHERF2 resolved by PAGE following capture by GST-AF1 or GST-AF2 ERα fragments or GST control. (F) Coomassie Brilliant Blue staining showed that equimolar amounts of GST proteins were used for the pull-down assay. (G) NHERF2 interacts with ERα *in vivo*. AD293 cells were transiently transfected with ERα with or without 3× FLAG-NHERF2. AD293 protein extracts were immunoprecipitated with anti-ERα followed by WB to detect FLAG-NHERF2 and ERα. (H) Endogenous NHERF2 interacts with ERα in the MCF7 breast cancer cell line. MCF7 cells were incubated for 45 min with 100 nM E2. Total cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-ERα or IgG (as negative control) followed by WB with anti-ERα or anti-NHERF2.

E2 enhances the interaction between NHERF2 and ER α

We made use of GST pull-down assays to assess the ability of E2 to influence the interaction between immobilized GST-NHERF2 fusion protein and ER α present in nuclear protein extracts from MCF7 cells. The captured proteins were resolved by PAGE and the presence of ER α was determined by WB analysis using an anti-ER α antibody. Our results showed that GST-NHERF2 was able to bind ER α in the absence of E2 (Figure 1C, E2-). However, addition of E2 to the protein extracts augmented substantially the amount of ER α captured by GST-NHERF2 (Figure 1C, E2+). Binding was absent with GST alone suggesting that the interaction between NHERF2 and ER α is specific (Figure 1C, GST).

We next examined the involvement of the N-terminal (PDZ1, amino acids 9–98, M.W. = 35 KDa) and C-terminal (PDZ2, amino acids 107–337, M.W. = 55 KDa) domains of NHERF2 on binding to ER α . Fusions made between GST and full-length NHERF2 or the PDZ1 or PDZ2 fragments were evaluated in GST pull-down assays for the ability to bind [³⁵S]-methionine-labeled ER α (Figure 1D). The experiment showed that ER α interacts with both the PDZ1 and PDZ2 fragments, but the interaction with PDZ2 was better than with PDZ1 or full-length NHERF2. To identify the domains of ER α that interact with NHERF2, GST fusions were made with the AF-1 domain (amino acids 1–202, M.W. = 43 KDa) and with the carboxyl terminal fragment containing the AF-2 domain (amino acids 263–595, ER-AF2, M.W. = 62 KDa). The experiment revealed a greater interaction of the full-length NHERF2 with AF-1 than with AF-2 (Figure 1E). Together, these experiments suggest that NHERF2-ER α interaction may be mediated by the C-terminal PDZ2 domain of NHERF2 and the N-terminal AF-1 domain of ER α . In neither case was there interaction with the GST component of the fusion proteins, confirming the specificity of both binding experiments. As a control, GST-ER α and GST-NHERF2 fusion proteins were separated by PAGE and visualized by Coomassie blue staining to verify their purity and confirm that similar amounts of proteins were used in the pull-down assays (Figure 1F). Although the identity and integrity of all constructs was verified by DNA sequencing, the mobility of the GST-AF2 band was greater than expected (~55 KDa instead of the predicted 62 KDa) and likely represents some structural integrity to the protein despite the presence of SDS.

NHERF2 interacts with ER α *in vivo*

The potential interaction between NHERF2 and ER α was examined by coimmunoprecipitation assays using two different experimental strategies. First, AD293 cells were transiently transfected with pCDNA3.1-ER α (ER α) in the presence or absence of pCMV-3Tag-NHERF2 (FLAG-NHERF2). The cells were stimulated with E2 and immunoprecipitated with anti-ER α antibody. NHERF2 was detected in the ER α pull-down in cells transfected with FLAG-NHERF2 but not in untransfected cells (Figure 1G). The input levels of NHERF2 and ER α were examined by WB, revealing a low level of endogenous NHERF2 and a substantial increase after transfection (Figure 1G, Input). The relatively faint band corresponding to NHERF2 in the

ER α pull-down suggests that the interaction between the two proteins is relatively weak or that the transfected level of expressed ER α was limiting in the experiment, but shows nevertheless that the two proteins interact in AD293 cells. We therefore sought to determine if endogenous NHERF2 and ER α interact in cells. For this experiment, we examined interaction in MCF7 cells stimulated with E2. The immunoprecipitation was conducted with anti-ER α or IgG as control and the blots were probed with anti-NHERF2 or anti-ER α . Our results confirmed that endogenously expressed NHERF2 interacts with ER α in MCF7 cells treated with E2 (Figure 1H). Again the NHERF2 band was faint, despite a high level of endogenous NHERF2 assessed by WB of 10% of the protein extract used in the assay (Figure 1H, Input). While both experiments demonstrate ER α -NHERF2 interaction, together the experiments suggest the interaction is weak or that other components may be required.

NHERF2 enhances ER α transcriptional activity

To test whether NHERF2 affects ER α transactivating activity, we performed transient transfection assays in two ER α -expressing cell lines (MCF7 and HepG2) and in ER α -negative CV-1 cells. In these transfection assays, pCDNA3.1-NHERF2 was the source of NHERF2 overexpression and the vector ERE-TK-LUC was used as the indicator of ER α transcriptional activity. CV-1 cells were also cotransfected with pCDNA3.1-ER α . All three cell lines showed baseline luciferase activity that could be stimulated by the addition of E2 (Figure 2, Control, panels A–C). With overexpression of NHERF2, all three cell lines showed significant E2-dependent stimulation of ER α transactivation activity (Figure 2).

To determine the biological relevance of NHERF2 as a coactivator of ER α , we used siRNA knockdown assays in MCF7 cells to test the effects of reducing endogenous NHERF2 protein expression on E2-dependent transcriptional activation. First, we determined the efficiency of siRNA to reduce NHERF2 protein levels by WB analysis of protein extracts prepared from MCF7 cells transfected with NHERF2-siRNA or with an unrelated control siRNA. Our results showed a significant reduction in NHERF2 protein levels in cells transfected with NHERF2-siRNA compared to MCF7 cells transfected with the control siRNA (Figure 2D, upper panel, α -NHERF2) suggesting that the siRNA-mediated knockdown of NHERF2 expression is specific. ER α protein levels in MCF7 cells were not affected by transfection of control siRNA or siRNA-NHERF2 (Figure 2D, upper panel, α -ER α). In this experiment, the levels of GADPH were used as loading control (Figure 2D, upper panel, GADPH). Next, we determined the activity of ER α in E2-stimulated MCF7 cells transfected with NHERF2-siRNA or the control siRNA. These experiments demonstrated that siRNA-mediated knockdown of NHERF2 expression produced a 60% reduction in the ER α activity compared to control cells (Figure 2D, lower panel).

NHERF2 exhibits intrinsic transcriptional activity

To explore the mechanism by which NHERF2 acts as a coactivator of ER α , we tested whether this protein has intrinsic transcriptional activity. NHERF2 was expressed as

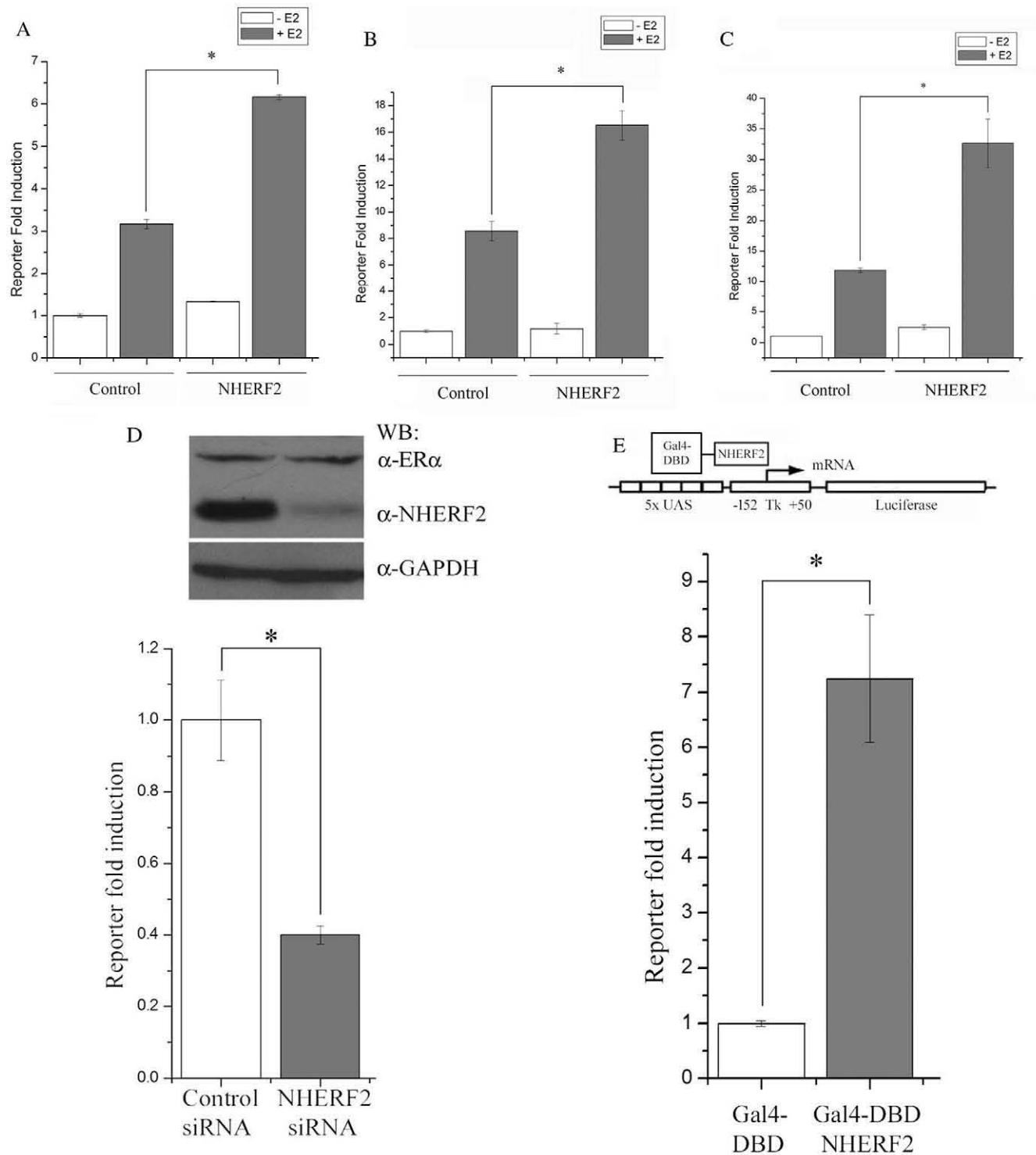


Figure 2. NHERF2 overexpression enhances ER α transactivation. Three cell lines, CV-1 (A), MCF7 (B) and HepG2 (C), were transiently transfected with empty pcDNA vector ('Control') or pcDNA3.1-NHERF2 ('NHERF2') along with ERE-TK-Luc in each case, and the effect on ER α transactivation was determined by assay of luciferase activity, as described in Materials and Methods. Assays were performed in triplicate in three independent experiments in the presence (gray bars) or absence (white bars) of E2 and the results are represented as mean \pm S.E. (D) NHERF2 knockdown impairs ER α transactivation. MCF7 cells were transfected with NHERF2-specific siRNA or with an unrelated siRNA (control), along with ERE-TK-Luc, in the presence of E2. The effect on endogenous NHERF2 protein levels was visualized after 48 h by WB (Top panel), and the effect on ER α transactivation was determined by luciferase assay. Results, in triplicate in three independent experiments, are represented as mean \pm S.E. (E) NHERF2 exhibits intrinsic transcriptional activity. NHERF2 transcriptional activity was assayed using the GAL4-UAS system. MCF7 cells were transfected with Gal4-DBD-NHERF2 (gray bar) or the Gal4-DBD alone (white bar), as the control, and a luciferase reporter containing a promoter with five UAS elements in tandem (5 \times UAS-luciferase, top panel). Luciferase activity, from three experiments assayed in triplicate, was normalized with respect to cells expressing Gal4-DBD and represented as mean \pm S.E.

a fusion protein with the DNA binding domain of the yeast transcription factor GAL4 (GAL4-NHERF2) and cotransfected into MCF7 cells with a vector containing the luciferase reporter gene under the control of five GAL4 responsive elements (Figure 2E, top panel). The luciferase activity of GAL4-DBD-NHERF2 expressing cells was compared to the activity observed in MCF7 cells transfected with the GAL4-DNA-binding domain alone. The expression of GAL4-DBD-NHERF2 fusion protein increased the luciferase activity by about 7-fold with respect to the control GAL4-DNA binding domain (Figure 2E).

NHERF2 is recruited to the promoter of the estradiol-dependent pS2 gene in MCF7 cells

To assess the role of NHERF2, we performed ChIP to identify whether endogenous NHERF2 is recruited to estrogen response element (ERE) at the core promoter of the pS2 gene in MCF7 cells stimulated with 100 nM E2 at 45 min. After ChIP analysis using anti-ER α antibody to enrich for target sequences, a fragment of 163 bp (−355 to −192) of the pS2 promoter could be amplified by PCR from MCF7 cells even before E2 stimulation (Figure 3A, ERE, α -ER α panel). However, the PCR product obtained increased after E2 stimulation indicating, as expected, that occupation of the pS2 promoter by ER α was hormone-dependent (Figure 3A, ERE, α -ER α panel). ChIP analysis of MCF7 cells using anti-NHERF2 antibody showed that this protein was also recruited to the pS2 promoter both in the absence and presence of E2. However, in the presence of E2, recruitment of NHERF2 to ERE was also enhanced (Figure 3A, ERE, α -NHERF2 panel). The specificity of ER α and NHERF2 binding to the pS2 promoter was confirmed when a pair of primers complementary to a DNA region localized upstream of the ERE (−3947 to −3639), failed to produce a PCR product after ChIP using either anti-NHERF2 or anti-ER α antibodies (Figure 3A, control region).

NHERF2 affects pS2 mRNA levels

The effect of NHERF2 on pS2 transcription was explored by determining pS2 mRNA levels in control MCF7 cells and in MCF7 cells that stably overexpress NHERF2. MCF7 cells were transfected with a pCMV-3TAG-NHERF2 construct that directed the expression of NHERF2 containing three FLAG epitopes at its amino-terminus (FLAG-NHERF2). MCF7 were selected in the presence of geneticin as described in Materials and Methods. NHERF2 overexpression was confirmed by immunoblot using anti-NHERF2 antibody (Figure 3B). Control MCF7 cells exhibited one NHERF2 protein band compared to FLAG-NHERF2-MCF7 cells that showed two protein bands corresponding to endogenous NHERF2 (lower band) and FLAG-NHERF2 (upper band) (Figure 3B, input lanes). Immunoprecipitation using anti-FLAG antibody followed by WB using anti-NHERF2 antibody confirmed the expression of FLAG-NHERF2 (Figure 3B, IP: α -FLAG lane). Next, the effect of NHERF2 on pS2 transcription was explored by determining pS2 mRNA levels in control MCF7 cells and in FLAG-NHERF2-MCF7 before and after E2 stimulation. In the absence of E2, the

level of pS2 mRNA in FLAG-NHERF2-MCF7 cells was 90% higher than in control MCF7 cells (Figure 3C, E2−). After E2 treatment, the mRNA levels increased in both control MCF7 and FLAG-NHERF2-MCF7 cells (Figure 3C, E2+). However, the level of pS2 mRNA in FLAG-NHERF2-MCF7 cells was 46% higher than in control MCF7 cells following E2 treatment (Figure 3C).

To assess the relevance of NHERF2 in ER α -mediated transcriptional regulation, we evaluated the effect of siRNA-mediated reduction of NHERF2 expression in the mRNA levels of E2 responsive CTSD, pS2, Adora1 and CXCR4 genes by rt-PCR. Our results showed that transfection of siRNA-NHERF2 into MCF7 cells reduced NHERF2 mRNA by 55% compared to MCF7 transfected with control siRNA (Figure 3D). Further, the presence of siRNA-NHERF2 in MCF7 cells reduced the mRNA levels of the endogenous ER target genes CTSD, pS2, Adora1 and CXCR4 by 22%, 25%, 16% and 22%, respectively (Figure 3D).

NHERF2 enhances the activity of the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1)

To further elucidate the molecular mechanism of the NHERF2 coactivator on ER α activity, we evaluated the possibility that NHERF2 affects the activity of AF-2 recruited coactivators such as SRC-1. We compared the effect of transient expression of SRC-1 on ER α transactivation in control MCF7 and FLAG-NHERF2-MCF7 cells. E2 stimulation of control MCF7 cells transfected with an empty pcDNA vector produced a 3-fold increase in ER α activity (Figure 4A, control). Transfection of SRC-1 into control MCF7 cells in the presence of E2 produced a 7-fold increase in ER α transactivation (Figure 4A, SRC-1). In contrast, the presence of SRC-1 in NHERF2 stably overexpressing cells increased both the basal and E2-dependent ER α activity by 30-fold and 90-fold, respectively (Figure 4A, FLAG-NHERF2-MCF7 cells).

To confirm the functional interaction between NHERF2 and SRC-1, we examined the effect of reducing the endogenous NHERF2 protein levels on SRC-1 coactivator activity acting on ER α . MCF7 cells were transiently cotransfected with SRC-1 and either the control siRNA or the specific NHERF2 siRNA. The ER α activity of MCF7 control cells transfected with empty pcDNA vector was used to normalize the results (Figure 4B). The results showed that MCF7 cells transfected with SRC-1 and the control siRNA exhibited a 65% increase in ER α activity compared with MCF7 cells transfected with the empty pcDNA vector and the control siRNA (Figure 4B, control siRNA). In contrast, transfection of SRC-1 in the presence of the specific NHERF2 siRNA almost completely abolished the coactivating effect of SRC-1 on ER α , producing only a 10% increase in luciferase activity (Figure 4B, NHERF2-siRNA). These results suggest that reduction of NHERF2 expression attenuates the SRC-1 effect on ER α transactivation in breast cancer cells.

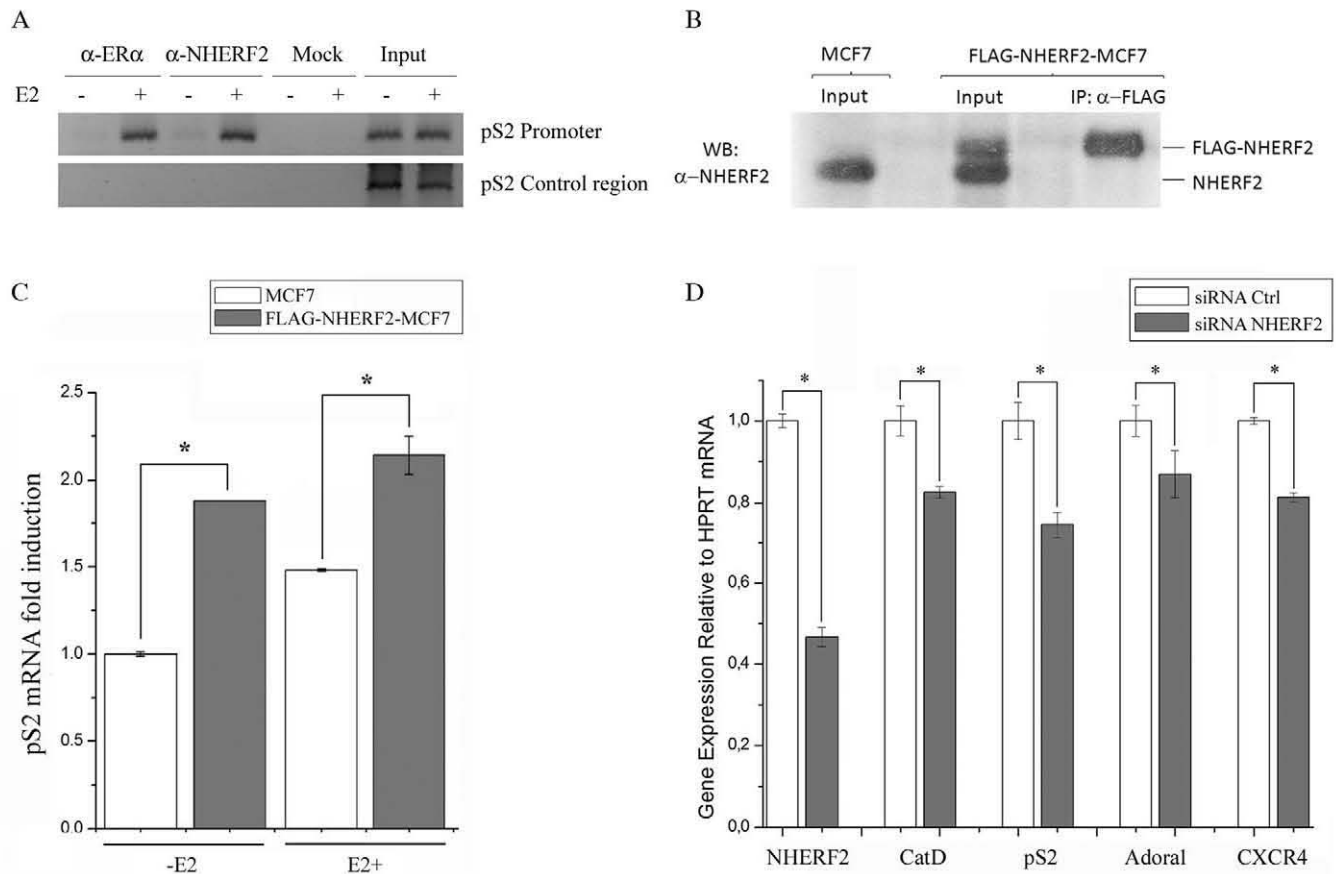


Figure 3. NHERF2 and ER α bind to estrogen response elements (EREs) in target gene promoters to induce transcription. (A) MCF7 cells were treated without or with 100 nM E2 for 45 min. ChIP assays were carried out using anti-ER α , anti-NHERF2 or without antibody (Mock). PCRs were done with primers spanning the ERE region from the endogenous pS2 promoter (pS2 ERE region, 163 bp) or a region 4 kb upstream of pS2 (pS2 Control Region, 358 bp), as negative control. (B) Stable NHERF2 overexpression in MCF7 breast cancer cells line. MCF7 cells were transfected with pCMV-3Tag-NHERF2 and selected using geneticin as described in Materials and Methods. Whole cell protein extracts of MCF7 or FLAG-NHERF2-MCF7 cells were subjected to WB or Immunoprecipitation (IP) with anti-FLAG specific antibody followed by WB with anti-NHERF2. (C) NHERF2 overexpression increases pS2 gene transcription. Total RNA isolated from control MCF7 cells (white bars) or stably transfected FLAG-NHERF2 MCF7 cells (gray bars) was used to determine pS2 mRNA levels by rt-PCR using β -actin mRNA levels to normalize the results. PCR products were resolved in agarose gels and densitometry analysis under UV light was performed. Results are represented as mean \pm S.E. of three different experiments done in triplicate. (D) NHERF2 down-regulation by siRNA reduced the expression of ER α target genes. Total RNA isolated from MCF7 cells treated with siCtrl (white bars) or with siNHERF2 (gray bars) was used to determine mRNA levels of NHERF2, CTSD, pS2, Adora1 and CXCR4 by RT-PCR using HPRT mRNA levels to normalize the results. PCR products were resolved in agarose gels and densitometry analysis under UV light was performed.

NHERF2 interacts with ER α and SRC-1 in breast cancer cells

To investigate the mechanism responsible for the functional cooperation between NHERF2 and SRC-1, we explored the possibility that both proteins are physically associated *in vivo*. Whole protein extracts from ER α -expressing ZR-75-1 breast cancer cells were immunoprecipitated using anti-ER α (Figure 4C, upper panel) or anti-SRC-1 (Figure 4C, lower panel) antibodies followed by immunoblotting using anti-NHERF2 antibody. Our results showed that in ZR-75-1 cells, NHERF2 is associated with ER α (Figure 4C, upper panel) and SRC-1 (Figure 4C, lower panel). These results suggested the possibility that NHERF2 enhances ER α transactivation through its binding to the AF1 domain of the nuclear receptor and its interaction with AF2-associated coactivators like SRC-1. As a control, IP membranes were subjected to immunoblotting using anti-ER α or anti-SRC-1

to evaluate the immunoprecipitation efficiency of the studied proteins (Figure 4C).

The formation of a NHERF2/SRC1/ER α complex on the E2-activated promoters was tested using sequential ChIP assays (Re-ChIP). First, the recruitment of ER α and SRC-1 to the ERE region in the promoters of pS2 and CTSD genes was analyzed by ChIP. These experiments were performed using anti-ER α and anti-SRC-1 antibodies in MCF7 cells before and after 45 min of E2 stimulation. Our results showed that ER α and SRC-1 recruitment to the ERE region of pS2 and CTSD promoters is enriched after E2 stimulation (Figure 4D). Next, the ChIP assay was repeated under the same experimental conditions but this time the DNA-protein complexes, immunoprecipitated with anti-ER α or anti-SRC-1 antibodies, were subjected to a second round of immunoprecipitation using anti-NHERF2 antibody (Figure 4E). This experiment showed that NHERF2 can be detected in the protein complexes as-

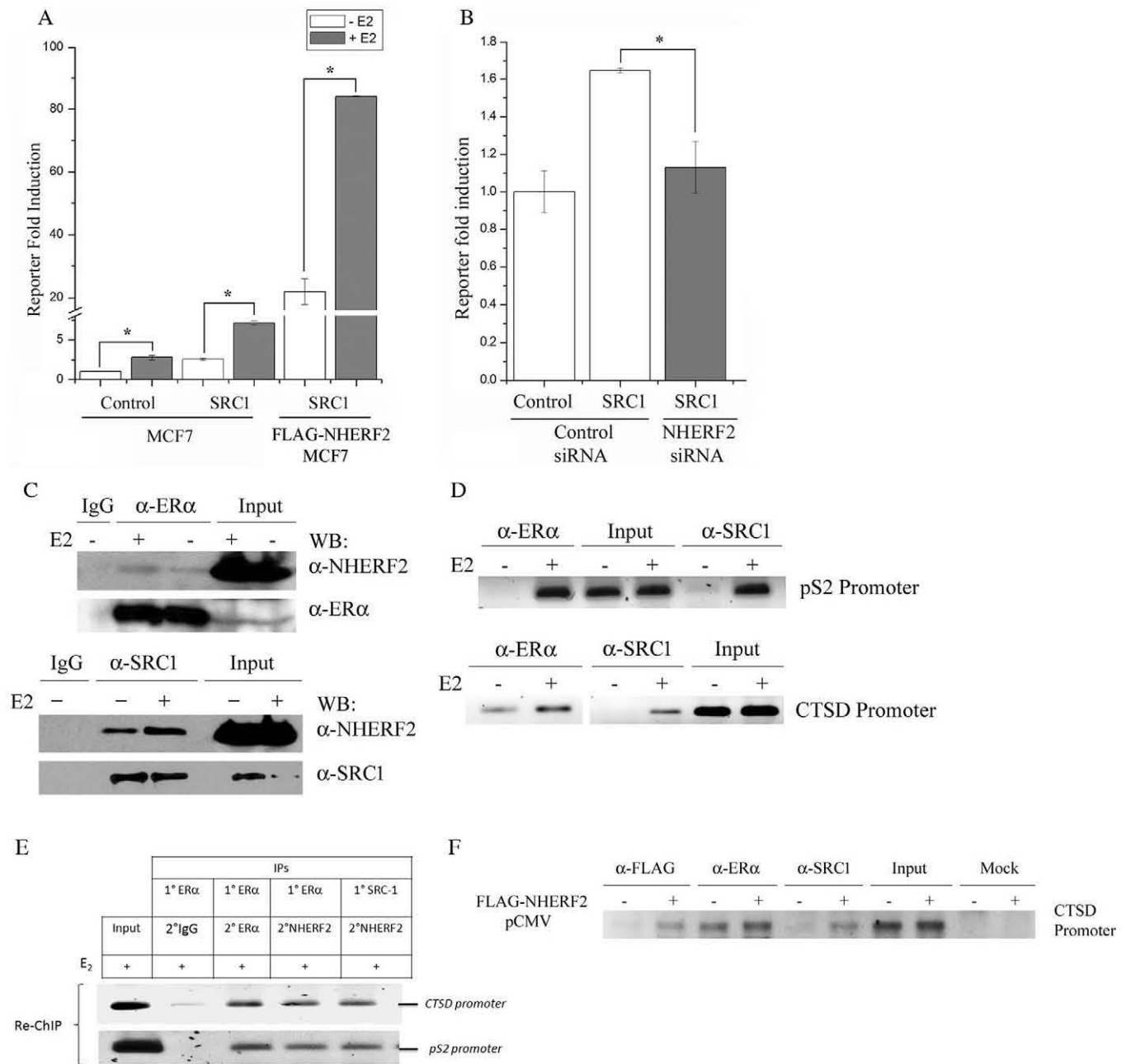


Figure 4. NHERF2 and SRC-1 form a complex to enhance ER α transactivation. (A) NHERF2 enhances the activity of the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1). Control MCF7 cells and FLAG-NHERF2-MCF7 cells were transfected with pcDNA-SRC1 vector and ER α activity was determined by luciferase assay using the ERE-TK-Luc reporter. The cells were grown in the absence (white bars) or presence (gray bars) of E2 for 48 h. All results were normalized to luciferase activity observed in control MCF7 cells transfected with empty pcDNA vector ('Control'). Results were expressed as mean relative luciferase activity \pm S.E. (B) NHERF2 knockdown impairs SRC1 coactivator activity on ER α transactivation. MCF7 cells were transfected with pcDNA-SRC1 in the presence of an NHERF2-specific siRNA (gray bar) or an unrelated control siRNA (white bars) as described in Materials and Methods. ER α activity was determined using the ERE-luciferase reporter in the presence of 100 nM E2. The results were normalized to luciferase activity of control MCF7 cells transfected with empty pcDNA vector and the unrelated control siRNA. (C) NHERF2 interacts with ER α and SRC-1 in ZR-75-1 breast cancer cells. Whole cell protein extracts were subjected to IP using anti-ER α (upper panel), anti-SRC-1 (lower panel) followed by immunoblot using anti-NHERF2, anti-ER or anti-SRC-1 antibodies. As a negative control immunoprecipitation was performed using anti-IgG (IgG, upper and lower panels). (D) ER α and SRC-1 are recruited to CTSD and pS2 promoters in E2-stimulated MCF7 cells. MCF7 cells were treated without or with 100 nM E2 for 45 min. ChIP assays were carried out using anti-ER α or anti-NHERF2 antibodies. PCRs were done with primers spanning the ERE region from the endogenous pS2 promoter (163 bp) or CTSD (152 bp). (E) Presence of a NHERF2/ER α /SRC-1 complex on the pS2 and CTSD promoters. MCF7 cells were treated with E2 for 45 min, and a Re-ChIP assay was carried out using anti-ER α or anti-SRC-1 antibodies for the first IP, and anti-ER, anti-NHERF2 or IgG (as negative control) for the second IP. PCRs were done with primers spanning the ERE region from the endogenous pS2 promoter (163 bp) or CTSD (152 bp). (F) FLAG-NHERF2 overexpression affects the recruitment of SRC-1 to CTSD promoter. MCF-7 were transiently transfected with (+) or without (-) FLAG-NHERF2. ChIP assays were performed using anti-FLAG, anti-ER α , anti-SRC-1 or without antibody (mock). PCR amplifications were done with primers spanning the ERE region from the endogenous CTSD (152 bp).

sociated to the ERE of pS2 and CTSD promoters (Figure 4E). Our ChIP/Re-ChIP experiment suggests that E2 stimulates the assembly of an ER α -NHERF2-SRC-1 complex on the promoter of ER α target genes.

To explore whether NHERF2 affects the recruitment of ER α and SRC-1 to the promoter of E2 responsive genes, we performed ChIP assays in E2-stimulated MCF-7 cells transiently transfected with pCMV-3Tag-NHERF2 or empty pCMV-3Tag vector. The experiments were carried out using anti-FLAG, anti-ER α or anti-SRC-1 antibodies. The presence of FLAG-NHERF2 in the CTSD promoter of MCF-7 cells was confirmed in a control ChIP using anti-FLAG antibody (Figure 4F, Flag-NHERF2+). Our results showed that ER α recruitment to the CTSD promoter was not affected by FLAG-NHERF2. In contrast, the presence of FLAG-NHERF2 enhanced the SRC-1 recruitment to the CTSD promoter (Figure 4F). These results suggest that NHERF2 may facilitate the recruitment of SRC-1 to ER α during the transcriptional activation of E2 responsive genes.

NHERF2 overexpression enhances proliferation of MCF7 cells

In human breast cancer cells the activity of ER α is associated with cell proliferation. To test whether NHERF2 overexpressing cells proliferate at a different rate than control MCF7 cells, we used a cell tracing assay in which cells treated with CFSE are allowed to divide in culture for 24 h or 48 h. After labeling, all cells were uniformly stained with CFSE. However, after 24 h and 48 h in culture NHERF2-MCF7 cells retained less CFSE than control MCF7 cells (Figure 5A–C), indicating a slower rate of cell division by the control cells.

NHERF2 overexpression induces tumor growth in nude mice

Given the stimulatory effect of NHERF2 on MCF7 cell proliferation, we explored whether NHERF2 could also influence tumor growth by comparing the tumorigenic potential of FLAG-NHERF2-MCF7 cells and control MCF7 cells injected subcutaneously in a nude mouse model as described in Materials and Methods. Our results showed NHERF2-overexpressing MCF7 cells produced tumors in seven out of eight mice injected with these cells. In comparison, only three out of eight mice injected with control MCF7 cells were found to have tumors at the end of the experiment (Figure 5D). When the tumors were removed, we found that most of tumors produced by FLAG-NHERF2-MCF7 cells exhibited a larger weight compared to tumors produced by control MCF7 cells (Figure 5D).

NHERF2 mRNA expression levels in breast cancer tumors

In recent years numerous studies have associated changes in the expression levels of different ER α coregulators with cancer progression, invasiveness, poor prognosis or resistance to hormonal treatment (24–28). In order to explore whether changes in NHERF2 expression could be associated with breast cancer, we determined NHERF2 mRNA expression levels in tumor and cancer-free mammary gland tissue samples from 20 patients diagnosed with stages IIA

and IIB of ER α positive breast cancer. Our results showed that in 50% of the breast tumors analyzed (10 patients) NHERF2 mRNA was overexpressed 2- to 17-fold compared to cancer-free tissue mRNA levels (Figure 6). The remaining tumors (10 patients) showed normal or slightly below normal NHERF2 mRNA levels.

Correlation between NHERF2 mRNA expression levels and breast carcinoma using the Oncomine cancer microarray database

To confirm the relationship between NHERF2 expression levels with breast cancer tumorigenesis, we compared the expression levels of NHERF2 in normal tissues and breast carcinomas using the Oncomine database. Our results showed that 6 of the 12 data sets, which contain gene chip profiles classified as normal or breast carcinoma tissues, showed that NHERF2 mRNA expression levels are moderately higher in breast carcinomas than in normal tissue. Representative results of two independent data sets are shown in Figure 7A (29,30). Further analysis of the database showed that in seven of nine data sets NHERF2 expression is modestly elevated in ER α + breast cancer tumors compared to ER α – breast cancer tumors. Two representative results of two independent data sets (31,32) are shown in Figure 7B.

DISCUSSION

In this report we have identified human NHERF2 as an ER α -associated protein in a yeast two-hybrid assay. Previous studies had described NHERF2 as a coregulator of the testis determining factor SRY and as a regulatory protein of different membrane-associated receptors and transporter proteins (33). Structurally, NHERF2 belongs to a class of multiple PDZ domain-containing proteins that function as scaffolds for the formation of multi-protein complexes in cells (34). PDZ domains function as protein–protein interaction modules that recognize specific C-terminal sequences in their target proteins. However, a small group of PDZ proteins has been shown to mediate the recognition of non C-terminal motifs (35–37). NHERF2, in its association with ER α , fits in this latter, less common group of PDZ proteins by using its PDZ2 domain to interact with the N-terminal AF-1 domain of this nuclear receptor. The binding of NHERF2 to ER α is also atypical if we compare it with the binding mechanism used by other coregulators to interact with nuclear receptors. For example, members of the p160 family of coactivators SRC-1, GRIP1/TIF2 and SRC-3/AIB1 possess several LXXLL motifs that mediate their ligand-dependent interaction with the AF-2 region of nuclear receptors. The preferential binding of NHERF2 to AF-1 is consistent with the absence of LXXLL motifs in the sequence of this protein. The association of NHERF2 to ER α *in vivo* was confirmed using different experimental approaches. First exogenously expressed FLAG-NHERF2 and ER α were coimmunoprecipitated from AD293 cells. Second, interaction between endogenous ER α and endogenous NHERF2 was demonstrated by coimmunoprecipitation assays using two different ER α -expressing breast cancer cell lines (MCF7 and ZR-75-1).

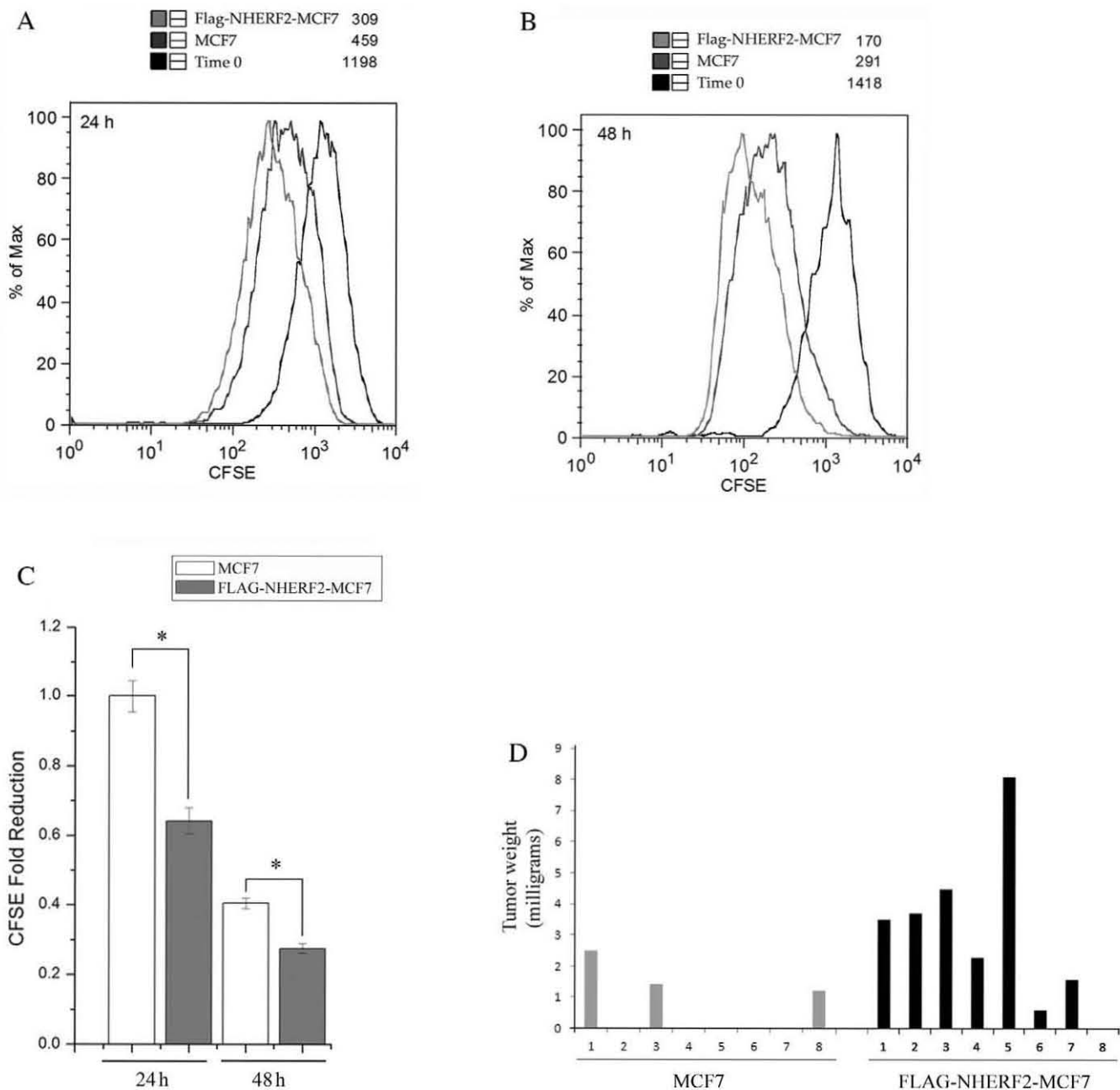


Figure 5. NHERF2 enhances proliferation and tumorigenic potential of MCF7 cells. The effect of NHERF2 overexpression on MCF7 cells proliferation was analyzed using the CFSE assay as described in Materials and Methods. Control MCF7 and FLAG-NHERF2-MCF7 cells were analyzed every 24 h after CFSE labeling by FACS. Representative histograms showing the fluorescence intensity distribution of MCF7 and FLAG-NHERF2-MCF7 transfected cells at 24 h (A) and 48 h (B) after CFSE labeling compared with MCF7 control (time 0) cells. (C) Representative histogram displaying CFSE fold reduction of FLAG-NHERF2-MCF7 cells (gray bars) compared to control MCF7 cells (white bars) at 24 and 48 h after CFSE labeling. (D) NHERF2 overexpression increases the tumorigenic potential of MCF7 cells in a nu/nu mouse model. Two groups of 8 nu/nu mice were injected with 3×10^6 control MCF7 cells or 3×10^6 FLAG-NHERF2-MCF7 cells as described in Materials and Methods. After 30 days the animals were sacrificed and the tumors were isolated and weighted. Tumor weight is represented as mean \pm S.E.

Transient transfection assays showed that NHERF2 overexpression produced a significant increase in ER α transactivation in all cell lines tested. In contrast, siRNA-mediated reduction of endogenous NHERF2 protein levels impaired ER α transactivation and the expression of estrogen target genes (pS2, CTSD, Adora1 and CXCR4) in MCF7 cells, suggesting this protein participates in the regu-

lation of ER α transcriptional activity in breast cancer cells. These results and the recruitment of both NHERF2 and ER α to the promoters of pS2 and CTSD genes after E2 stimulation in ZR-75-1 and MCF7 cells lines confirm the role of NHERF2 as a bona fide ER α coactivator.

Molecular and functional characterization of different nuclear receptors has shown that full nuclear receptor tran-

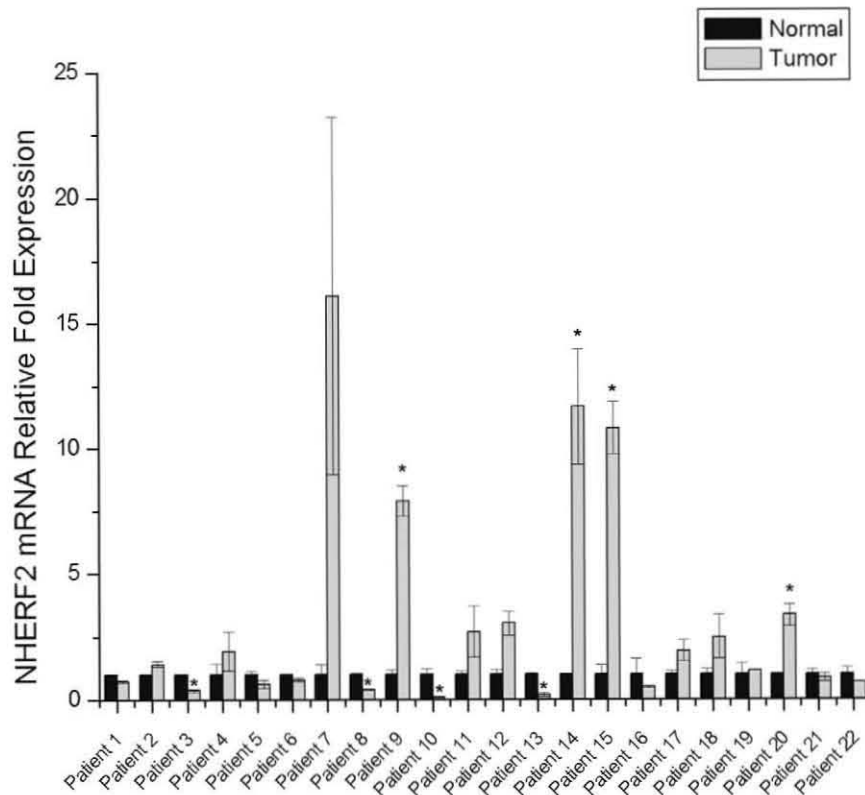


Figure 6. NHERF2 mRNA expression in breast cancer tumors. Total RNA was isolated from breast cancer tumor samples and cancer-free mammary tissue obtained during biopsies of 22 patients diagnosed with ER α + breast cancer. NHERF2 mRNA was amplified by RT- real time quantitative PCR and its relative expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method using β -actin as a reference gene as described in Materials and Methods. NHERF2 mRNA levels in tumor samples were normalized with respect to NHERF2 mRNA levels in normal tissue and represented as mean \pm S.E.

scriptional activity is the result of the synergistic functional interaction between the AF-1 and AF-2 protein regions. This process is mediated at least in part by SRC-1 and p300 acting as bridge molecules between the two activating functions of ER α . It is conceivable that AF-1 associated proteins, such as NHERF2, may functionally interact with SRC-1 and other AF-2 associated coregulators. In this work we tested this hypothesis studying the effect of NHERF2 on the coactivator activity of SRC-1. Our results show that when SRC-1 was transiently transfected into stably NHERF2 overexpressing breast cancer MCF7 cells it synergistically augmented ER α transactivation 10-fold compared to the effect of SRC-1 transfected in control MCF7 cells. Furthermore, the selective knockdown of NHERF2 expression resulted in a significant reduction in the ability of SRC-1 to increase E2-dependent ER α transactivation in these cells. These results suggest the possibility that these coactivators may function through a common or complementary pathway. To investigate the mechanism responsible for the functional interaction of NHERF2 and SRC-1, we performed coimmunoprecipitation experiments in different cells lines. These experiments demonstrated that NHERF2 interacts with SRC-1 in ER α + breast cancer cells *in vivo*. Further, ChIP and reChIP assays show that NHERF2 participates in the assembly of a protein complex including ER α and SRC-1 that is recruited to the promoter region of the E2-responsive genes pS2 and CTSD.

NHERF2 was shown to possess an intrinsic ER α -independent transcriptional activity capable of activating the transcription of a luciferase reporter when expressed as a GAL4-DBD fusion protein. Unlike other coactivator proteins, NHERF2 does not have a histone acetyltransferase domain that could suggest that its activity is achieved via direct chromatin modification. Instead, we propose that the function of NHERF2 as an ER α coactivator is mediated by its binding to AF-1 and by facilitating the recruitment of SRC-1, a coactivator with histone acetyltransferase activity, to promoters of E2-activated genes. The role of NHERF2 as a facilitator of SRC-1 is supported by ChIP assays that showed that NHERF2-expressing MCF-7 cells exhibit an increased occupancy of the CTSD promoter by SRC-1 compared to control MCF7 cells.

The enhancement of ER α transactivation through its direct interaction with SRC-1 is a mechanism that NHERF2 seems to share with other AF-1-associated coactivators like the RNA binding proteins p72/p68. These factors were recently identified as a novel class of ER α coactivators that interact with AF-1 and form a complex with the steroid receptor RNA activator (SRA) and members of the p160 family of proteins including SRC-1 (16). We suggest that NHERF2 binding to AF-1 and its functional and physical interaction with AF-2 coactivator complexes that include SRC-1 may be involved in the mechanism responsible for the functional synergism of the AF-1 and AF-2 domains of ER α .

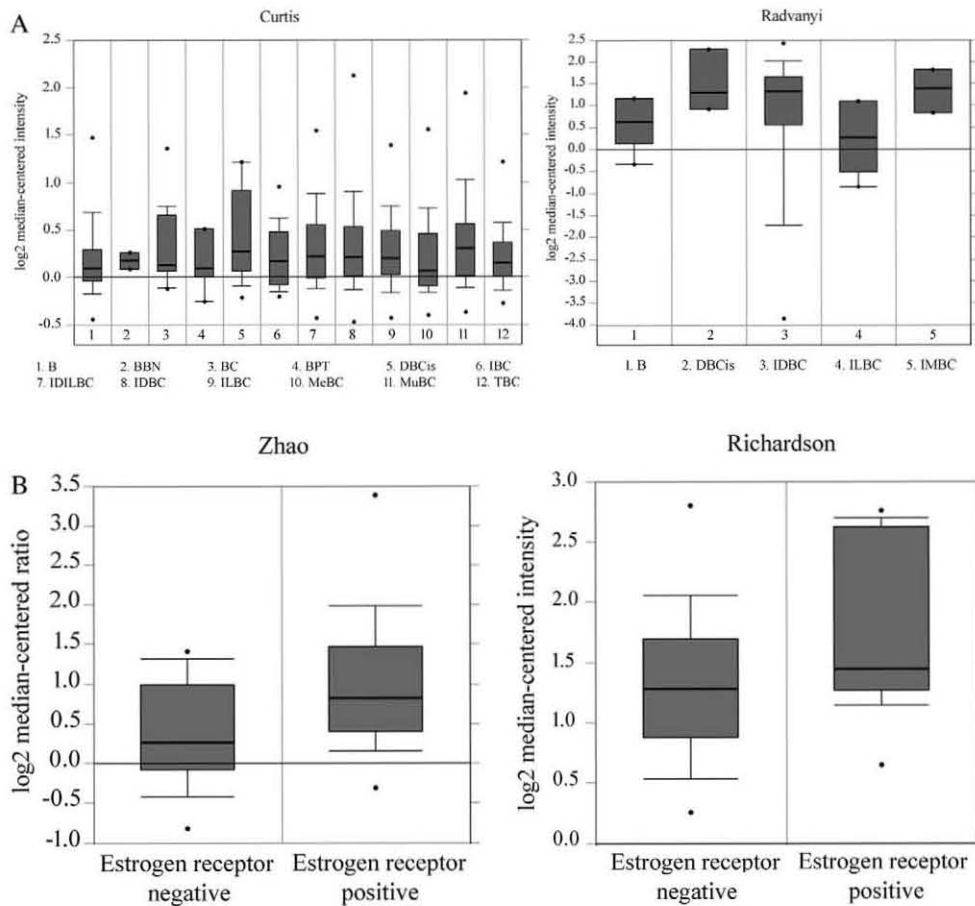


Figure 7. NHERF2 mRNA expression in a breast cancer microarray database. (A) NHERF2 mRNA expression in normal and breast carcinoma tissues was analyzed in 12 different data sets using the Oncomine database. Two representative results obtained from independent data sets (Curtis *et al.* (29) and Radvanyi *et al.* (30)) are shown. The tissues analyzed in Curtis data set are breast (NB), benign breast neoplasm (BBN), breast carcinoma (BC), breast phyllodes tumor (BPT), ductal breast carcinoma *in situ* (DBCis), invasive breast carcinoma (IBC), invasive ductal and invasive lobular breast carcinoma (IDILBC), invasive ductal breast carcinoma (IDBC), invasive lobular breast carcinoma (ILBC), medullary breast carcinoma (MeBC), mucinous breast carcinoma (MuBC) and tubular breast carcinoma (TBC). The tissues analyzed in Radvanyi data set are breast (NB), ductal breast carcinoma *in situ* (DBCis), invasive ductal breast carcinoma (IDBC), invasive lobular breast carcinoma (ILBC) and invasive mixed breast carcinoma (IMBC). (B) NHERF2 mRNA expression in ER α - and ER α + breast carcinomas was compared using nine data sets from the Oncomine database. Two representative results obtained from independent data sets (Zhao *et al.* (31) and Richardson *et al.* (32)) are shown.

It has been suggested that nuclear receptor activity is the result of the cellular balance of coactivators and corepressors (38). ER α coactivators promote cell proliferation and their overexpression has been often associated with different forms of cancer (39). For example, increased protein levels of SRC-1 have been shown to correlate with lymph node metastasis, disease recurrence and poor disease-free survival in breast cancer (40). In this study, we showed that MCF7 cells overexpressing NHERF2 exhibit a significant increase in ER α -dependent transcriptional activation, cell proliferation and tumorigenicity potential in mice. Significantly, NHERF2 mRNA levels were elevated in 50% of the breast cancer tumor samples analyzed. An analysis of a cancer microarray database revealed that NHERF2 mRNA expression levels are modestly elevated in breast carcinoma tumors compared to normal tumors and suggested that NHERF2 expression may correlate with tumor ER α positivity.

Based on NHERF2 strong coactivator activity on ER α and the potentiation of SRC-1 function, we hypothesized

NHERF2 may be an important factor in promoting ER-dependent cell growth in breast cancer tumorigenesis. In summary, this work has identified NHERF2 as a novel AF1-associated protein required for ER α transactivation. The effect of this coactivator in cell proliferation and tumor formation and the finding that NHERF2 mRNA is overexpressed in a significant percentage of breast cancer tumors open the possibility that NHERF2 may also be an important participant in the development of human breast cancer. Further studies will be necessary to explore the potential of NHERF2 as a tumor marker in the development of new diagnostic and therapeutic strategies for breast cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Roy A. Gravel (University of Calgary) and Dr Viviana Valadez-Graham for invaluable discussion and for comments to the manuscript, Colette Michalak, Universidad Nacional Autónoma de México and Ernesto Soto-Reyes' Instituto Nacional de Cancerología for technical as-

sistance. I.M.-M., T.B.-G., V.G.-R., I.T.-G., S.R.-C., E.M.-E. are students of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

FUNDING

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [SALUD-C02-14467, 183069]; Fundación Miguel Alemán [Estímulo a la Investigación Médica]; 1/2012-2013 Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM: Leon-pre. inst. 2013. Funding for open access charge: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [SALUD-C02-14467, 183069]; Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Jordan, V.C. (1995) 'Studies on the estrogen receptor in breast cancer'—20 years as a target for the treatment and prevention of cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **36**, 267–285.
- Gronemeyer, H. (1991) Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 89–123.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. and Chambon, P. (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, **59**, 477–487.
- Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W. and McDonnell, D.P. (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**, 21–30.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927–937.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.*, **14**, 121–141.
- Moras, D. and Gronemeyer, H. (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 384–391.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733–736.
- Ito, M., Yuan, C.-X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J.D., Yamamura, S., Fu, Z.-Y., Zhang, X., Qin, J. and Roeder, R.G. (1999) Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol. Cell*, **3**, 361–370.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J. et al. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194–198.
- Green, K.A. and Carroll, J.S. (2007) Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 713–722.
- Thompson, E.B. and Kumar, R. (2003) DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 1–4.
- Mérot, Y., Métivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O. and Flouriort, G. (2004) The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J. Biol. Chem.*, **279**, 26184–26191.
- Perissi, V. and Rosenfeld, M.G. (2005) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 542–554.
- Colley, S.M., Iyer, K.R. and Leedman, P.J. (2008) The RNA coregulator SRA, its binding proteins and nuclear receptor signaling activity. *IUBMB Life*, **60**, 159–164.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arai, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Yano, T., Yoshikawa, H. et al. (2001) A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor [alpha] coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, **20**, 1341–1352.
- Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J. and Kato, S. (2000) p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645–15651.
- Métivier, R., Penot, G., Flouriort, G. and Pakdel, F. (2001) Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1953–1970.
- Poulat, F., de Santa Barbara, P., Desclozeaux, M., Soullier, S., Moniot, B., Bonneaud, N., Boizet, B. and Berta, P. (1997) The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7167–72.
- Kurashima, K., D'Souza, S., Szász, K., Ramjeesingh, R., Orlowski, J. and Grinstein, S. (1999) The apical Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29843–29849.
- Valadez-Graham, V., Razin, S.V. and Recillas-Targa, F. (2004) CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1354–1362.
- Mitas, M., Mikhitarian, K., Walters, C., Baron, P.L., Elliott, B.M., Brothers, T.E., Robison, J.G., Metcalf, J.S., Palesch, Y.Y., Zhang, Z. et al. (2001) Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int. J. Cancer*, **93**, 162–171.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT Method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Zhao, C., Yasui, K., Lee, C.J., Kurioka, H., Hosokawa, Y., Oka, T. and Inazawa, J. (2003) Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer*, **98**, 18–23.
- Girault, I., Lerebours, F., Amarir, S., Tozlu, S., Tubiana-Hulin, M., Lidereau, R. and Bièche, I. (2003) Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1259–1266.
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P.H. and Murphy, L.C. (1999) Expression of the steroid receptor RNA activator in human breast tumors. *Cancer Res.*, **59**, 4190–4193.
- Fox, S.B., Brown, P., Han, C., Ashe, S., Leek, R.D., Harris, A.L. and Banham, A.H. (2004) Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 3521–3527.
- Bouras, T., Southey, M.C. and Venter, D.J. (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**, 903–907.
- Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y. et al. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, **486**, 346–352.
- Radvanyi, L., Singh-Sandhu, D., Gallichan, S., Lovitt, C., Pedyczak, A., Mallo, G., Gish, K., Kwok, K., Hanna, W., Zubovits, J. et al. (2005) The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 11005–11010.
- Zhao, H., Langerød, A., Ji, Y., Nowels, K.W., Nesland, J.M., Tibshirani, R., Bukholm, I.K., Kåresen, R., Botstein, D., Børresen-Dale, A.-L. et al. (2004) Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2523–2536.

32. Richardson,A.L., Wang,Z.C., De Nicolo,A., Lu,X., Brown,M., Miron,A., Liao,X., Iglehart,J.D., Livingston,D.M. and Ganesan,S. (2006) X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell*, **9**, 121–32.
33. Voltz,J.W., Weinman,E.J. and Shenolikar,S. (2001) Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene*, **20**, 6309–6314.
34. Zhang,J.F.M. (2002) Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals*, **11**, 315–321.
35. Harris,B.Z. and Lim,W.A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.*, **114**, 3219–3231.
36. Fouassier,L., Yun,C.C., Fitz,J.G. and Doctor,R.B. (2000) Evidence for Ezrin-Radixin-Moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25039–25045.
37. Xu,X.-Z.S., Choudhury,A., Li,X. and Montell,C. (1998) Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *J. Cell Biol.*, **142**, 545–555.
38. Smith,C.L. and O'Malley,B.W. (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.*, **25**, 45–71.
39. Anzick,S.L., Kononen,J., Walker,R.L., Azorsa,D.O., Tanner,M.M., Guan,X.-Y., Sauter,G., Kallioniemi,O.-P., Trent,J.M. and Meltzer,P.S. (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Sci.*, **277**, 965–968.
40. Xu,J., Wu,R.-C. and O'Malley,B.W. (2009) Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 615–630.

Original Research Article

EGF regulates claudin-2 and -4 expression through STAT3 and Src in MDCK cells.[†]

Vicky García-Hernández¹, Catalina Flores-Maldonado¹, Ruth Rincon-Heredia^{1,2}, Odette Verdejo-Torres¹, José Bonilla-Delgado⁶, Ivan Meneses-Morales^{4,5}, Patricio Gariglio³ and Rubén G. Contreras^{1*}

¹Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, ²Department of Pharmacology, ³Department of Genetics and Molecular Biology. Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México City 07360, México.

⁴Breast Cancer investigation program, ⁵Department of Molecular Biology and Biotechnology. Biomedical Research Institute, National Autonomous University of México (UNAM), México.

⁶Laboratory of Genetics and Molecular Diagnosis, Research Unit, Hospital Juárez de México, México City 07760, México.

Running title: EGF regulates claudins expression through Src and STAT-3.

***Corresponding author:**

Dr. Rubén G. Contreras

Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México City 07360, México.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508

San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, México, D.F. 07360, México

Phone: +52-(55)-5747-3367

E-mail: rcontrer@fisio.cinvestav.mx

Bullet point keywords: **Claudin-2, Claudin-4, Tight junction, Src, STAT3, EGF.**

Contract grant sponsor: CONACyT; Contract grant numbers: 27335 and P127329.

[†]This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: [10.1002/jcp.24687]

Received 20 March 2014; Revised 16 May 2014; Accepted 22 May 2014

Journal of Cellular Physiology

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

DOI 10.1002/jcp.24687

Tristetraprolin Represses Estrogen Receptor α Transactivation in Breast Cancer Cells*

Received for publication, January 7, 2014, and in revised form, April 9, 2014. Published, JBC Papers in Press, April 15, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.548552

Tonatiuh Barrios-García¹, Angeles Tecalco-Cruz², Vania Gómez-Romero¹, Sandra Reyes-Carmona¹, Iván Meneses-Morales¹, and Alfonso León-Del-Río³

From the Programa de Investigación de Cáncer de Mama and Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510, Mexico

Background: Estrogen receptor α (ER α) mediates the effects of 17 β -estradiol in mammary gland, and it is associated with the development of breast cancer tumors.

Results: Tristetraprolin (TTP) represses ER α transactivation through its interaction with histone deacetylases.

Conclusion: TTP acts as a novel ER α corepressor.

Significance: TTP reduces estradiol-induced cell proliferation and tumor growth, suggesting it may be important in breast cancer development.

Estrogen receptor α (ER α) mediates the effects of 17 β -estradiol (E2) in normal mammary gland, and it is a key participant in breast cancer tumor development. ER α transactivation activity is mediated by the synergistic interaction of two domains designated AF1 and AF2. The function of AF2 is to recruit coactivator and corepressor proteins that allow ER α to oscillate between the roles of transcriptional activator and repressor. In contrast, the mechanism responsible for AF-1 transcriptional activity is not completely understood. In this study, we identified tristetraprolin (TTP) as a novel ER α -associated protein. TTP expression in MCF7 cells repressed ER α transactivation and reduced MCF7 cell proliferation and the ability of the cells to form tumors in a mouse model. We show that TTP transcriptional activity is mediated through its recruitment to the promoter region of ER α target genes and its interaction with histone deacetylases, in particular with HDAC1. TTP expression attenuates the coactivating activity of SRC-1, suggesting that exchange between TTP and other coactivators may play an important role in fine-tuning ER α transactivation. These results indicate that TTP acts as a *bona fide* ER α corepressor and suggest that this protein may be a contributing factor in the development of E2-dependent tumors in breast cancer.

The estrogen receptor α (ER α)⁴ is a ligand-activated transcription factor that mediates the effects of the hormone estro-

gen (17 β -estradiol; E2) on cell proliferation and differentiation in normal mammary gland. However, ER α is also associated with tumor development and progression in 70–80% of breast cancer patients (1). ER α is a 595-amino acid protein characterized by the presence of functionally independent domains that include a DNA-binding domain (DBD), a ligand-binding domain, and two transactivation domains designated AF1 and AF2, respectively (2). AF1 is located at the N-terminal region of ER α , and its transcriptional activity is constitutive. In contrast, AF2 is located at the C-terminal region of the nuclear receptor and exhibits ligand-dependent transcriptional activity (3, 4). Both domains mediate ER α transactivation activity through the synergistic interaction of their unique functional properties.

The mechanism responsible for ER α transactivation is best understood in the context of AF2. This transactivation domain acts as a docking interphase for the recruitment of coactivator or corepressor protein complexes. Mechanistically, the binding of E2 induces a major structural rearrangement in ER α , enabling the ligand-binding domain/AF2 domain to interact with multiple coactivator proteins (5, 6). Coactivators, such as SRC-1, SRC-3, and CBP/p300, possess histone acetyltransferase activity, which enhances transcriptional activation through the relaxation of chromatin structure (7, 8). In the absence of E2, AF2 interacts with repressor protein complexes that include NCoR and SMRT and histone deacetylases (HDACs) (9, 10) that promote chromatin condensation (11, 12). The exchange of coactivators and corepressors constitutes the basis of a sophisticated regulatory mechanism that fine-tunes ER α transactivation activity and allows this transcription factor to oscillate between the roles of activator and repressor of gene expression (13).

In contrast, the mechanism responsible for the E2-independent transcriptional activity of AF1 is not clearly understood. Molecular and functional studies have shown that phosphorylation of several serine residues in AF1, in particular serine 118, plays a key role in the cross-talk between the steroid and growth factor-dependent signal transduction pathways (14, 15). This process is thought to play an important function in the coordinated regulation of multiple genes by mitogenic stimuli in hor-

* This work was supported by Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grants SALUD-CONACYT 14467 and 183069), and Fundación Miguel Alemán (Estímulo a la Investigación Médica 2013-1).

¹ Students of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

² Recipient of a Posdoctoral Scholarship from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México.

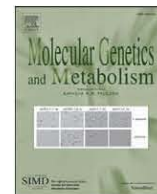
³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 5255-5622-8940; E-mail: leon@biomedicas.unam.mx.

⁴ The abbreviations used are: ER α , estrogen receptor α ; E2, estradiol; DBD, DNA-binding domain; HDAC, histone deacetylase; TTP, tristetraprolin; UAS, upstream activating sequence; TSA, trichostatin A; ERE, estrogen response element(s).



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

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

Holocarboxylase synthetase acts as a biotin-independent transcriptional repressor interacting with HDAC1, HDAC2 and HDAC7



Isis Trujillo-Gonzalez^{a,b}, Rafael Cervantes-Roldan^{a,b}, Alfonso Gonzalez-Noriega^c, Colette Michalak^c, Sandra Reyes-Carmona^{a,b}, Tonatiuh Barrios-García^{a,b}, Ivan Meneses-Morales^{a,b}, Alfonso Leon-Del-Río^{a,b,*}

^a Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

^b Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

^c Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2013

Received in revised form 25 October 2013

Accepted 25 October 2013

Available online 2 November 2013

Keywords:

Holocarboxylase synthetase

Transcriptional repression

Histone deacetylases

H3K9me3

Biotin-ligase

Moonlighting enzyme

ABSTRACT

In human cells, HCS catalyzes the biotinylation of biotin-dependent carboxylases and mediates the transcriptional control of genes involved in biotin metabolism through the activation of a cGMP-dependent signal transduction pathway. HCS also targets to the cell nucleus in association with lamin-B suggesting additional gene regulatory functions. Studies from our laboratory in *Drosophila melanogaster* showed that nuclear HCS is associated with heterochromatin bands enriched with the transcriptionally repressive mark histone 3 trimethylated at lysine 9. Further, HCS was shown to be recruited to the core promoter of the transcriptionally inactive hsp70 gene suggesting that it may participate in the repression of gene expression, although the mechanism involved remained elusive. In this work, we expressed HCS as a fusion protein with the DNA-binding domain of GAL4 to evaluate its effect on the transcription of a luciferase reporter gene. We show that HCS possesses transcriptional repressor activity in HepG2 cells. The transcriptional function of HCS was shown by in vitro pull down and in vivo co-immunoprecipitation assays to depend on its interaction with the histone deacetylases HDAC1, HDAC2 and HDAC7. We show further that HCS interaction with HDACs and its function in transcriptional repression is not affected by mutations impairing its biotin-ligase activity. We propose that nuclear HCS mediates events of transcriptional repression through a biotin-independent mechanism that involves its interaction with chromatin-modifying protein complexes that include histone deacetylases.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In human cells, the enzyme holocarboxylase synthetase (HCS) catalyzes the covalent attachment of the vitamin biotin to five biotin-dependent carboxylases [1–3]. Carboxylase biotinylation occurs as a two-step, ATP-dependent, reaction that generates 5'-biotinyl-AMP as an intermediary product [2]. The relevance of HCS in maintaining metabolic homeostasis was first recognized through the study of the genetic disorder multiple carboxylase deficiency (MCD). MCD patients express a HCS protein with reduced affinity for biotin, with the Km of the mutant enzyme elevated up to 70 times over the normal enzyme [4,5]. The resulting disruption in gluconeogenesis, amino acid catabolism and fatty acid metabolism leads affected individuals to develop life treating ketoacidosis and organic acidemia that requires life-long pharmacological doses of biotin to be resolved [1,2].

Our laboratory demonstrated that HCS also participates in the transcriptional regulation of genes involved in biotin transport and metabolism [6].

Mechanistically, 5'-biotinyl-AMP activates a signal transduction cascade involving soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG) [6–8]. The HCS–cGMP–PKG pathway has a seemingly paradoxical role because under conditions of biotin deficiency it reduces the expression of genes required for biotin utilization in the liver, kidney and muscle but not in the brain [7]. We proposed that this mechanism of regulation is aimed at sparing the essential function of biotin in the brain at the expense of the liver and other organs during biotin deprivation [7]. In cells from MCD patients, we found a reduced expression of genes involved in biotin utilization suggesting that some of the biochemical manifestations of the disease may be associated with down-regulation of biotin utilization in the liver because of the impaired activity of HCS.

In addition to its roles in carboxylase activation and transcriptional expression, HCS has also been found localized in the nucleus of human cells in association with the nuclear lamina [9]. Several studies have proposed that nuclear HCS could affect gene expression through histone biotinylation and modification of chromatin structure [10–13]. However, the participation of biotin in the post-translational modification of

* Corresponding author at: Programa de Investigación de Cáncer de Mama y Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico.

E-mail address: leon@biomedicas.unam.mx (A. Leon-Del-Río).

Impaired Biotinidase Activity Disrupts Holocarboxylase Synthetase Expression in Late Onset Multiple Carboxylase Deficiency*

Received for publication, September 9, 2008 Published, JBC Papers in Press, October 9, 2008, DOI 10.1074/jbc.M806985200

Anylu Pérez-Monjaras^{†1}, Rafael Cervantes-Roldán[‡], Iván Meneses-Morales^{†1}, Roy A. Gravel[§], Sandra Reyes-Carmona[‡], Sergio Solórzano-Vargas[‡], Alfonso González-Noriega[§], and Alfonso León-Del-Río^{†2}

From the [†]Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, and Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México and the [§]Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada

Biotinidase catalyzes the hydrolysis of the vitamin biotin from proteolytically degraded biotin-dependent carboxylases. This key reaction makes the biotin available for reutilization in the biotinylation of newly synthesized apocarboxylases. This latter reaction is catalyzed by holocarboxylase synthetase (HCS) via synthesis of 5'-biotinyl-AMP (B-AMP) from biotin and ATP, followed by transfer of the biotin to a specific lysine residue of the apocarboxylase substrate. In addition to carboxylase activation, B-AMP is also a key regulatory molecule in the transcription of genes encoding apocarboxylases and HCS itself. In humans, genetic deficiency of HCS or biotinidase results in the life-threatening disorder biotin-responsive multiple carboxylase deficiency, characterized by a reduction in the activities of all biotin-dependent carboxylases. Although the clinical manifestations of both disorders are similar, they differ in some unique neurological characteristics whose origin is not fully understood. In this study, we show that biotinidase deficiency not only reduces net carboxylase biotinylation, but it also impairs the expression of carboxylases and HCS by interfering with the B-AMP-dependent mechanism of transcription control. We propose that biotinidase-deficient patients may develop a secondary HCS deficiency disrupting the altruistic tissue-specific biotin allocation mechanism that protects brain metabolism during biotin starvation.

In humans, the vitamin biotin is an essential micronutrient that has two different functions in the cell (1). First, it is the cofactor of five biotin-dependent carboxylases: pyruvate carboxylase (PC),³ propionyl-CoA carboxylase (PCC), methyl-

crotonyl-CoA carboxylase (MCC), and two forms of acetyl-CoA carboxylase (ACC-1 and ACC-2) (2). These enzymes catalyze key reactions in gluconeogenesis, branched chain amino acid catabolism, and fatty acid synthesis and underscore the importance of biotin to metabolic homeostasis (2). Second, biotin is a regulator of the expression of several hepatic proteins that include glucokinase, phosphoenol pyruvate carboxykinase, and most of the proteins involved in biotin metabolism (1, 3–13).

Because of the importance of biotin in cell metabolism, higher organisms face a constant threat to their survival because they are incapable of synthesizing the vitamin. The situation is further complicated by the limited availability of biotin in nature, most of which is protein-bound and not directly accessible (2, 14). During evolution, mammals developed what is known as the biotin cycle, which allows them to cope with the low availability of this critical nutrient (Fig. 1). This system depends on two enzymes; holocarboxylase synthetase (HCS) and biotinidase (1, 2). HCS is responsible for the activation, via biotinylation, of all biotin-dependent carboxylases in human cells. The process takes place in a two-step, ATP-dependent reaction in which biotin is first activated to 5'-biotinyl-AMP (B-AMP) and then transferred to a specific and highly conserved lysine residue in all biotin-dependent carboxylases (2, 15, 16). Biotinidase catalyzes the release of biotin from biotinylated peptides or biocytin (biotinyl-lysine), products generated by intestinal digestion of nutrient proteins or during carboxylase turnover (endogenous biotin recycling) (2, 17).

We recently showed that HCS is an obligate participant in biotin-mediated transcriptional regulation (Fig. 1). The underlying mechanism requires B-AMP, the product of the HCS reaction, which activates a signal transduction cascade involving soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG) (4, 7). In the presence of biotin, the HCS-sGC-PKG pathway induces the expression of the components of the biotin cycle required for its transport and utilization: the sodium-dependent multivitamin transporter, PC, PCC, MCC, ACC, and HCS (3, 5, 13). Paradoxically, biotin deficiency results

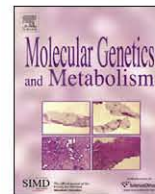
* This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 48862 and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Grant IN220206-3 and funds from the Universidad Nacional Autónoma de México. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Recipients of doctoral scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

² To whom correspondence should be addressed: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel.: 5255-5622-8940; E-mail: leon@biomedicas.unam.mx.

³ The abbreviations used are: PC, pyruvate carboxylase; HCS, holocarboxylase synthetase; MCD, multiple carboxylase deficiency; B-AMP, 5'-biotinyl-

AMP; PCC, propionyl-CoA-carboxylase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; sGC, soluble guanylate cyclase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; ODQ, 1-H(1,2,4)-oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one; 8-Br-cGMP, 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate; PVDF, polyvinylidene difluoride.



Management of a patient with holocarboxylase synthetase deficiency

Johan L.K. Van Hove^{a,*}, Sagi Josefsberg^a, Cynthia Freehauf^a, Janet A. Thomas^a, Le Phuc Thuy^b, Bruce A. Barshop^b, Michael Woontner^a, Donald M. Mock^c, Pei-Wen Chiang^a, Elaine Spector^a, Iván Meneses-Morales^d, Rafael Cervantes-Roldán^d, Alfonso León-Del-Río^d

^a Department of Pediatrics, University of Colorado at Denver, University of Colorado Health Sciences Center at Fitzsimmons, Mail Stop 8313, P.O. Box 6511, Building RC-1 North, Room P18-4132, Aurora, CO 80045, USA

^b Department of Pediatrics, UCSD School of Medicine and Rady Children's Hospital, San Diego, USA

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA

^d Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2008

Accepted 12 September 2008

Available online 29 October 2008

Keywords:

Holocarboxylase synthetase

Carboxylase

Kinetics

Biotin

ABSTRACT

We investigated in a patient with holocarboxylase synthetase deficiency, the relation between the biochemical and genetic factors of the mutant protein with the pharmacokinetic factors of successful biotin treatment. A girl exhibited abnormal skin at birth, and developed in the first days of life neonatal respiratory distress syndrome and metabolic abnormalities diagnostic of multiple carboxylase deficiency. Enzyme assays showed low carboxylase activities. Fibroblast analysis showed poor incorporation of biotin into the carboxylases, and low transfer of biotin by the holocarboxylase synthetase enzyme. Kinetic studies identified an increased K_m but a preserved V_{max} . Mutation analysis showed the child to be a compound heterozygote for a new nonsense mutation Q379X and for a novel missense mutation Y663H. This mutation affects a conserved amino acid, which is located the most 3' of all recorded missense mutations thus far described, and extends the region of functional biotin interaction. Treatment with biotin 100 mg/day gradually improved the biochemical abnormalities in blood and in cerebrospinal fluid (CSF), corrected the carboxylase enzyme activities, and provided clinical stability and a normal neurodevelopmental outcome. Plasma concentrations of biotin were increased to more than 500 nM, thus exceeding the increased K_m of the mutant enzyme. At these pharmacological concentrations, the CSF biotin concentration was half the concentration in blood. Measuring these pharmacokinetic variables can aid in optimizing treatment, as individual tailoring of dosing to the needs of the mutation may be required.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Holocarboxylase synthetase deficiency (OMIM 253270) is a rare autosomal recessive disorder of biotin metabolism leading to multiple carboxylase deficiency [1]. Holocarboxylase synthetase (HLCS; OMIM 609018, E.C. 6.3.4.10) covalently links biotin to the five biotin-dependent carboxylases: the three mitochondrial enzymes propionyl-CoA carboxylase (E.C. 6.4.1.3), 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (E.C. 6.4.1.4), and pyruvate carboxylase (E.C. 6.4.1.1), and both the mitochondrial and the cytosolic acetyl-CoA carboxylases (E.C. 6.4.1.2). Patients with holocarboxylase synthetase deficiency present in the neonatal period or early infancy with metabolic acidosis, hyperammonemia, tachypnea, skin rash, feeding problems, hypotonia, seizures, developmental delay, alopecia, and coma. Diagnosis is suggested by urine organic acids analysis and confirmed by holocarboxylase synthetase enzyme assay or DNA mutation analysis. Treatment with biotin doses ranging between 3 and 200 mg per day has been reported [2,3]. In this case

report, we discuss the pharmacobiologic factors that possibly contributed to the excellent results of treatment.

Case report

After an uncomplicated pregnancy, this girl was born at term by cesarean section for breech position with normal birth weight and Apgar scores. She had a taut, shiny, and thickened skin with a cellophane-like appearance and perioral creases. She developed respiratory distress requiring intubation and ventilation. Chest X-ray showed a ground-glass picture with air bronchogram consistent with respiratory distress syndrome despite 40 weeks gestation and lacking physical signs of prematurity. A brain MRI on day 8 showed immature myelination with slight dilatation of the ventricles. Laboratory evaluation showed metabolic acidosis with pH 7.20, anion gap 28 mEq/L, plasma lactate 15.4 mM (normal 0.5–2.0), pyruvate 0.32 mM (normal 0.034–0.102) with an elevated lactate:pyruvate ratio 48 (normal <25). Blood ammonia was 192 μ M (normal 64–107). Serum amino acids were normal. Urine

* Corresponding author. Fax: +1 303 724 3827.

E-mail address: johan.vanhove@uchsc.edu (J.L.K. Van Hove).