



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación transcripcional del transportador de aminoácidos neutros cortos dependiente de sodio (SNAT2) por 17  $\beta$ -estradiol.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Laura Alejandra Velázquez Villegas

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando R. Tovar Palacio

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adolfo García Sainz                      Instituto de Fisiología Celular

Dr. Ángel Zaráin Herzberg                      Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. Enero 2015



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.

# ÍNDICE

IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	1
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 <i>TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS</i>	9
1.1.1 Sistema de transporte de alanina, serina y cisteína (ASC)	9
1.1.2 Sistema de transporte de aminoácidos neutros (N)	10
1.1.3 Sistema de transporte de aminoácidos catiónicos (CAT)	10
1.1.4 Sistema de transporte de aminoácidos aniónicos (X <sup>-</sup> )	10
1.1.5 Sistema de transporte de aminoácidos neutros de cadena ramificada (L)	11
1.1.6 Sistema de transporte de glicina (Gli)	11
1.1.7 Sistema de transporte beta (β)	11
1.2 <i>SISTEMA A DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS</i>	13
1.2.1 Clonación de las proteínas del sistema A	13
1.2.1.1 <u>SNAT1</u>	15
1.2.1.2 <u>SNAT2</u>	16
1.2.1.3 <u>SNAT4</u>	16
1.2.2 Características del Sistema A	17
1.2.2.1 <u>Características Cinéticas</u>	17
1.2.2.2 <u>Iones</u>	18
1.2.2.3 <u>Regulación adaptativa</u>	18
1.2.2.4 <u>Regulación por hormonas</u>	19
1.2.2.5 <u>Regulación del RNAm de SNAT2 por estrógenos</u>	20

1.3	RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	21
1.3.1	Receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ )	22
1.3.2	Receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ )	22
1.4	MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	25
1.4.1	Respuestas genómicas	25
1.4.1.1	<u>Señalización clásica dependiente de ligando</u>	25
1.4.1.2	<u>Señalización independiente de ligando</u>	27
1.4.1.3	<u>Señalización independiente del elemento de respuesta a estrógenos (ERE)</u>	28
1.4.2	Correguladores de los receptores de estrógenos	28
1.4.3	Respuestas no genómicas	31
1.4.4	Receptor de estrógenos membranal GPR30	31
1.5	ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE SNAT2	33
2.	JUSTIFICACIÓN	35
3.	PREGUNTA DE INVESTIGACION	36
4.	HIPÓTESIS	36
5.	OBJETIVOS	36
5.1	<i>Objetivo General</i>	36
5.2	<i>Objetivos Específicos</i>	37
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	38

6.1 MATERIALES	38
6.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	38
6.3 MÉTODOS	39
6.3.1 Cultivo celular, transfección transitoria y ensayos utilizando al gen reportero de luciferasa.	39
6.3.2 Preparación de extractos nucleares y ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).	40
6.3.3 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).	40
6.3.4 Precipitación del complejo e Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS <sup>E</sup> ).	41
6.3.4.1 <u>Precipitación del complejo ERE-ER-<math>\alpha</math> con oligonucleótidos de las secuencias ERE de SNAT2 y ERE consenso</u>	41
6.3.4.2 <u>Separación de las muestras y digestión con tripsina</u>	41
6.3.5 Análisis por Western blot	42
6.3.6 Inmunohistoquímica.	42
6.3.7 Análisis estadístico	43
7. RESULTADOS	44
7.1 La región promotora del gen de SNAT2 contiene un ERE que es activado por 17 $\beta$ -estradiol.	44
7.2 La activación de la transcripción del gen de SNAT2 por 17 $\beta$ -estradiol es dependiente del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ).	44
7.3 El receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) se une <i>in vitro</i> al Elemento de Respuesta a Estrógenos (ERE) en el promotor del gen de SNAT2.	47

7.4 El receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) se une <i>in vivo</i> al sitio ERE en el promotor del gen de SNAT2 de rata.	47
7.5 PARP1, Ku70 y GAPDH se unen a la secuencia ERE del promotor del gen de SNAT2 en conjunto con el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ).	50
7.6 La GAPDH se acumula en el núcleo, se une <i>in vivo</i> al promotor del gen de SNAT2 del epitelio mamario durante la gestación y es específico para la activación de la transcripción del gen de SNAT2.	53
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	60
10. PERSPECTIVAS	61
11. BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	72

## IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Durante la gestación, ocurren diversas adaptaciones metabólicas para preparar a la glándula mamaria para la lactancia, un proceso esencial cuyo objetivo es cubrir las necesidades nutricias del recién nacido. Así, la capacidad de la glándula mamaria para sintetizar activamente proteínas es dependiente del suministro de amino ácidos regulado por los transportadores de aminoácidos entre los que se encuentra el transportador de aminoácidos neutros cortos dependiente de sodio 2 (SNAT2). Estos hallazgos revelan que el  $17\beta$ -estradiol activa la expresión del gen *SLC38A2* de la proteína SNAT2 durante la gestación a través de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) ubicado en la región promotora del gen de SNAT2 en el cual, se recluta un complejo proteico conformado por las proteínas polimerasa de poli ADP ribosilación 1 (PARP1), proteína Ku 70 (Ku70) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en presencia del receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ). En consecuencia, los estrógenos regulan la expresión del transportador a través de  $ER\alpha$ , utilizando un mecanismo transcripcional en el cual GAPDH, una enzima metabólica asociada con el metabolismo de carbohidratos, funciona como un coactivador migrando del citoplasma al núcleo de las células del epitelio mamario durante la gestación para mantener activa la transcripción del gen de SNAT2.

## ABREVIATURAS

AARE	Elemento de respuesta a aminoácidos (Amino acid response element)
AIB	Amino isobutirato (2-Aminoisobutyric acid)
AF-1	Activador de la función 1 (Activation function 1)
AF-2	Activador de la función 2 (Activation function 2)
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico (Cyclic adenosine monophosphate)
AP-1	Proteína activadora 1 (Activator protein 1)
ASCT1	Transportador de alanina, serina y cisteína 1 (Alanine/Serine/Cysteine Transporter 1)
ASCT2	Transportador de alanina, serina, cisteína y treonina 2 (Alanine/Serine/Cysteine/Threonine Transporter 2)
Asn-82	Asparagina 82 (Asparagine 82)
Asn-251	Asparagina 251 (Asparagine 251)
Asn-257	Asparagina 257 (Asparagine 257)
ATA1	Transportador de aminoácidos del sistema A 1 (System A amino acid transporter 1)
ATA2	Transportador de aminoácidos del sistema A 2 (System A amino acid transporter 2)
ATA3	Transportador de aminoácidos del sistema A 3 (System A amino acid transporter 3)
BCH	Ácido 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico (2-amino biciclo-(2.2,1)-heptane-2-carboxylic acid)



CAT	transportador de aminoácidos catiónicos (Cationic amino acid transporter)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (Complementary desoxirribonucleic acid)
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina (Chromatin immunoprecipitation)
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico (cAMP response element)
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (cAMP response element-binding protein)
DBD	Dominio de unión al DNA (DNA binding domain)
DMEM	Medio de águila modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's médium)
DTT	Ditiotreitol (Dithiothreitol)
E2	Estradiol (estradiol)
EAATs	Transportadores excitatorios de aminoácidos (Excitatory amino acid transporters)
ECL	Quimioluminiscencia inducida (Enhanced Chemiluminescence)
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	Factor de crecimiento epidermal (Epidermal growth factor)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal (Epidermal growth factor receptor)
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (Electrophoretic mobility shift assay)
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa (Estrogen receptor alpha)
ER $\beta$	Receptor de estrógenos beta (Estrogen receptor beta)
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos (Estrogen response element)
EREs	Elementos de respuesta a estrógenos (Estrogen response elements)
ERs	Receptores de estrógenos (Estrogen receptors)

GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GLYT 1	Transportador del glicina 1 (Glycine transporter 1)
GLYT 2	Transportador del glicina 2 (Glycine transporter 2)
GPR30	Receptor acoplado a proteínas G 30 (G protein-coupled receptor 30)
HB-EGF	Factor de crecimiento epidermal unido a heparina (Heparin-binding EGF-like growth factor)
HMGB1/2	Proteínas del grupo de alta movilidad B 1y 2 (High mobility group protein B 1/2)
HRP	Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)
HRPE	Células epiteliales de pigmento retinal de humano (Human retinal pigment epithelial cells)
hsp 56	Proteína de choque térmico 56 (Heat shock protein 56)
hsp 70	Proteína de choque térmico 70 (Heat shock protein 70)
hsp 90	Proteína de choque térmico 90 (Heat shock protein 90)
ICI 182780	Fulvestrant (Fulvestrant)
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (Insulin-like growth factor 1)
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (Insulin-like growth factor 1 receptor)
IP3	Inositol trifosfato (Inositol trisphosphate)
Ku70	Proteína Ku 70 (Ku 70 protein)
Ku80	Proteína Ku 80 (Ku 80 protein)
LBD	Dominio de union al ligando (Ligand binding domain)
LC-MS <sup>E</sup>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Liquid chromatography mass spectrometry)

MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)
MeAIB	(Metilaminobutirato (Methylaminoisobutyric acid)
MMP	Matriz de metaloproteinasas (Metaloproteinasas matrix)
mTOR	Blanco mecanístico de rapamicina (Mechanistic target of rapamycin)
Na <sup>+</sup>	Sodio (Sodium)
NO	Óxido nítrico (Nitric oxide)
PARP1	Polimerasa de poli ADP ribosilación (Poly [ADP-ribose] polymerase 1)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PI3K	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato 3 cinasa (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PKA	Proteína cinasa A (Protein kinase A)
PKB	Proteína cinasa B (Protein kinase B)
PKC	Proteína cinasa C (Protein kinase C)
PLC	Fosfolipasa C (Phospholipase C)
PMA	12-miristato-13-acetato de forbol (Phorbol 12-myristate 13-acetate)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene difluoride)
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero (Messenger ribonucleic acid)
SAAT	Transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (Sodium dependent neutral amino acid transporter)
SD	desviación estándar (Standard deviation)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfates)
SLC38	Familia acarreadora de solutos 38 (Solute carrier family 38)
SNAT1	Transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 1 (Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1)

SNAT2	Transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 2 (Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2)
SNAT4	Transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 4 (Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4)
SWI/SNF	Interrupción de sacarosa no fermentable (Switch/Sucrose NonFermentable)
SP-1	Proteína específica 1 (Specificity protein 1)
SRC-1	Co-activador de receptor de esteroides 1 (Steroid receptor coactivator 1)
c-Src	Proteína cinasa de tirosinas de oncogen Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)
TBP	Proteína de unión a caja TATA (TATA binding protein)
TBS	Buffer de Tris/Glicina/SDS (Tris/Glycine/SDS buffer)
TEG	Trietileno glicol (Triethylene glycol)
TGF	Factor de crecimiento de transformación (Transforming growth factor)
Thr-384	Treonina 384 (Threonine 384)
Topo I	Topoisomerasa 1 (Topoisomerase I)
Topo II $\beta$	Topoisomerasa 2 beta (Topoisomerase II beta)

## RESUMEN

**Introducción:** El transportador de aminoácidos SNAT2 se encarga de la captación de aminoácidos neutros cortos en la glándula mamaria para promover la proliferación celular durante la gestación. Se sabe por estudios previos que hay un incremento en la expresión del gen de SNAT2 durante la gestación inducido por  $17\beta$ -estradiol; sin embargo no se conoce el mecanismo mediante el cual sucede esta activación y las proteínas que forman parte del complejo transcripcional. Un análisis *in silico* de la región promotora del gen de SNAT2 reveló la presencia de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) putativo.

**Objetivo:** Dilucidar el mecanismo por el cual el  $17\beta$ -estradiol regula la transcripción del gen de SNAT2 así como las proteínas coactivadoras del complejo transcripcional.

**Resultados:** En los ensayos utilizando al gen reportero de luciferasa se demostró un incremento en la actividad transcripcional del gen de SNAT2 cuando su promotor es co-transfectado junto con el receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y estimulado con  $17\beta$ -estradiol. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostraron que  $ER\alpha$  se une al ERE *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente se observó que la migración del complejo  $ER\alpha$ -ERE en el promotor del gen de SNAT2 es diferente a la del  $ER\alpha$ -ERE consenso, indicando una diferencia en las proteínas que forman parte de cada complejo. Los ensayos de precipitación e identificación con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS<sup>E</sup>) y western blot revelaron que el complejo  $ER\alpha$ -ERE del gen de SNAT2 contiene a la polimerasa de poli ADP ribosilación 1 (PARP1), a la proteína Ku 70 (Ku70) y a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); y el silenciamiento de cada una de estas proteínas abolió el efecto activador de  $17\beta$ -estradiol en la transcripción del gen de SNAT2 utilizando su promotor y el gen reportero de luciferasa. La GAPDH, una enzima metabólica, se une *in vivo* a la región promotora del gen de SNAT2 durante la gestación en glándula mamaria de rata en los días 5, 14 y 20; coincidiendo con un incremento progresivo en la concentración nuclear de ésta proteína en el epitelio mamario de ratas gestantes. Adicionalmente la unión de GAPDH en el ERE del gen de SNAT2 es nucleótido-específica debido a que una mutación en la región 5' de esta secuencia, asemejando el ERE consenso, así como de las bases de la región 5', evitan la unión de GAPDH.

**Conclusión:** Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre cómo el tejido mamario se adapta para controlar la captación de aminoácidos a través de la regulación de la transcripción del transportador SNAT2 mediada  $17\beta$ -estradiol. En donde GAPDH actúa como un coactivador específico de éste gen migrando al núcleo de las células del epitelio mamario durante la gestación para mantener activa la transcripción del transportador de aminoácidos SNAT2.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una característica fundamental y particular de los mamíferos es la facultad que poseen para sintetizar alimento para sus crías. La glándula mamaria, encargada de la producción de leche materna, atraviesa por diferentes etapas de maduración en las cuales logra adquirir la conformación necesaria para cubrir las demandas energéticas de los nuevos seres.

Las proteínas son parte importante de la composición total de la leche y para su formación, se requiere de la presencia de transportadores de aminoácidos que controlan la entrada de estos nutrimentos al interior de las células.

Se sabe que diversos factores como la concentración de hormonas encargadas del desarrollo de la glándula mamaria y la producción de leche juegan un papel importante en la expresión de los genes de algunos de estos transportadores, en particular del gen *SLC38A2* que codifica para la proteína SNAT2. También es conocido que la expresión de dicho transportador se ve modificada durante los periodos de gestación para la proliferación del epitelio mamario y durante la lactancia para la síntesis de proteínas de la leche.

El 17  $\beta$ -estradiol es una hormona esteroidea que incrementa la expresión del gen de SNAT2 en explantes de glándula mamaria de rata. Esta hormona, poseen múltiples mecanismos de acción a través de sus receptores nucleares específicos alfa y beta ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ), el receptor membranal acoplado a proteínas G (GPR30), así como la activación de vías de señalización que incrementan la formación de segundos mensajeros, o fosforilan a los receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ . El presente estudio tiene como objetivo dilucidar el mecanismo mediante el cual el 17  $\beta$ -estradiol activa la transcripción del gen de SNAT2 durante la gestación en la glándula mamaria.

A continuación se presenta información relevante de los sistemas de transporte de aminoácidos, en especial del sistema A al cual pertenece el SNAT2; se explican los mecanismos de acción de los estrógenos a través de los diferentes receptores y vías de señalización y se menciona la caracterización mediante un análisis *in silico* del promotor del gen de SNAT2.

## **1.1 TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS**

El movimiento de aminoácidos hacia el interior de las células está mediado por sistemas de transporte. Los sistemas de transporte son complejos proteínicos que atraviesan las membranas celulares y presentan las siguientes características: 1) asemejan a las enzimas en sentido que aceleran catalíticamente el paso de aminoácidos a través de las membranas; 2) tienen baja especificidad de sustratos pero alta capacidad de transporte; 3) son estereoespecíficos por lo que reconocen a los L-aminoácidos y excluyen a los D-aminoácidos; y 4) tienen diferentes mecanismos de operación (transporte simple, transporte paralelo, y transporte antiparalelo)(1).

Diversos estudios confirman la existencia de una amplia variedad de sistemas de transporte de aminoácidos (2, 3) y se clasifican dependiendo de la carga neta de los sustratos en neutros, catiónicos y aniónicos. También pueden clasificarse de acuerdo a su dependencia o independencia por el sodio (Fig.1). Los principales sistemas de aminoácidos conocidos son:

### **1.1.1 Sistema transporte de alanina, serina y cisteína (ASC)**

Es un sistema de transporte dependiente de sodio que se encarga de transportar aminoácidos neutros como alanina, cisteína, y serina, así como el aminoácido sintético aminoisobutirato (AIB). Discrimina sustratos N-metilados. Presenta un incremento en su actividad conforme aumenta la concentración de sustratos intracelulares, es relativamente sensible al pH extracelular y no presenta regulación adaptativa. Se han encontrado tres isoformas de este sistema de transporte: transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio (SAAT) encontrado en músculo esquelético, riñón, cerebro, páncreas, hígado y placenta de humanos; el transportador de alanina, serina, cisteína y treonina 1 (ASCT1) encontrado en músculo esquelético, riñón, cerebro, páncreas, corazón, hígado y placenta de humanos; y el transportador de alanina, serina, cisteína y treonina 2 (ASCT2) encontrado en músculo esquelético, riñón, intestino, testículo, tejido adiposo de ratón y glándula mamaria de rata (4).

### **1.1.2 Sistema de transporte de aminoácidos neutros (N)**

Es un sistema de transporte dependiente de sodio que transporta aminoácidos neutros con átomos de nitrógeno en su cadena lateral como son la histidina, glutamina y asparagina. Interviene en la regulación de la concentración de glutamina y la eliminación de amonio por el ciclo de la urea. Se ha demostrado su presencia en hepatocitos, placenta humana, linfocitos, músculo y estómago de rata. Su actividad se incrementa por hormonas, por disponibilidad de sustratos, en la diabetes y por estrés osmótico. Cuenta con dos tipos de respuesta adaptativa: una rápida (1-3 horas), inhibida por altas concentraciones de potasio; y otra larga (12-18 horas), que requiere la síntesis de *novo* proteínas (4).

### **1.1.3 Sistema de transporte de aminoácidos catiónicos (Y<sup>+</sup>)**

Es un sistema de transporte no dependiente de sodio que transporta aminoácidos catiónicos como la lisina y arginina. También interactúa con algunos aminoácidos neutros los cuales pueden inhibir la captación de lisina y arginina; por lo tanto la captación de estos aminoácidos depende de las concentraciones intra y extracelulares de aminoácidos neutros. Se conocen cuatro isoformas de este sistema conocidos como los transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT) 1,2,3 Y 4 (5).

### **1.1.4 Sistema de transporte de aminoácidos aniónicos (X<sup>-</sup>)**

Es un sistema de transporte dependiente de sodio que transporta aminoácidos aniónicos como el aspartato y glutamato. Existen dos formas de este sistema; el sistema X<sup>-AG</sup> que se encarga de la captación de aspartato y glutamato, y el sistema X<sup>-C</sup> encargado de la captación de cistina. El glutamato introducido por el sistema X<sup>-AG</sup> es utilizado por el sistema X<sup>-C</sup> como intercambio para poder introducir cistina a las células. Las proteínas que se conocen del sistema de aminoácidos aniónicos X<sup>-AG</sup> son los transportadores excitatorios de aminoácidos (EAAT) 1 al 5 y pertenecen también a la familia de transportadores de neurotransmisores (5).



### **1.1.5 Sistema de transporte de aminoácidos neutros de cadena ramificada (L)**

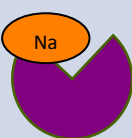
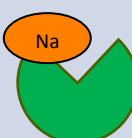

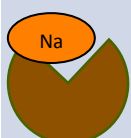


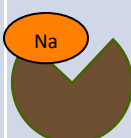

Es un sistema de transporte independiente de sodio que se encarga de transportar aminoácidos neutros de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina, además de fenilalanina, metionina y triptófano. También favorece la utilización del ácido 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico (BCH). Se han distinguido dos componentes de este sistema de transporte el L1 y el L2. Los aminoácidos neutros de cadena larga ingresan al sistema presente en las membranas de las células endoteliales de los capilares cerebrales. La actividad de este sistema se incrementa cuando hay bajas concentraciones de leucina (4).

### **1.1.6 Sistema de transporte de glicina (Gly)**

Es un sistema de transporte dependiente de sodio y cloro que transporta glicina y sarcosina (N-metilglicina) (6). Es electrogénico y está regulado negativamente por glucocorticoides. Se han encontrado dos subtipos: uno de ratón y otro de humano denominados transportador de glicina 1 (GLYT1), y transportador de glicina 2 (GLYT2). El GLYT1 se expresa en la médula espinal, tallo cerebral, cerebro, bulbo olfatorio y en menor proporción en la placenta y en otras regiones cerebrales (7). El GLYT2 se localiza en la médula espinal, el tallo cerebral y el cerebelo. La glicina, principal aminoácido transportado por este sistema, es un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso de los vertebrados (6).

### **1.1.7 Sistema de transporte beta ( $\beta$ )**

Es un sistema de transporte que moviliza  $\beta$ -aminoácidos como la taurina la  $\beta$ -alanina e hipotaurina. El mecanismo de operación de este sistema es por cotransporte de sodio y cloro. La taurina es un aminoácido involucrado en una gran variedad de funciones biológicas como la síntesis de sales biliares, es un neuroinhibidor y está involucrado en el metabolismo de calcio y zinc (5).

Tipo de aminoácido Nombre del Sistema	Neutros				Aniónicos	Catiónicos		
	ASC	A	L	N	X <sup>-</sup>	Y <sup>+</sup>	Gly	β
<b>Proteínas</b>	ASCT 1, 2	SNAT 1, 2, 4	LAT 1, 2	SN 1, 2	EAAT-1, 2, 3, 4, 5	CAT 1, 2, 3, 4	GLIT 1, 2	GAT 1, 2, 3 Rb16a
<b>Aminoácidos que transporta</b>	Alanina, cisteína, serina, treonina, AIB	Alanina, serina, cisteína, glicina, prolina, glutamina, treonina, MeAIB	Leucina, isoleucina, valina (phe, met, triptofano)	Histidina, glutamina, asparagina.	Aspartato, glutamato y cistina	Lisina y arginina	Glicina, sarcosina	Taurina, β-alanina, hipotaurina
<b>Sustrato preferido</b>	cisteína	alanina	leucina	histidina	cisteato	lisina	glicina	taurina
<b>Características</b>								
<b>Regulación hormonal / adaptativa</b>	No No	Sí Sí	Sí Sí	Sí SÍ	No ?	Sí No	No No	

**Figura 1.** Sistemas de transporte de aminoácidos en la glándula mamaria. Los sistemas de transporte de aminoácidos se clasifican de acuerdo al tipo de sustrato que transportan. Por su carga se clasifican en transportadores de aminoácidos neutros, aniónicos y catiónicos. Por su dependencia por el sodio (Na) se clasifican en transportadores dependientes e independiente de sodio. A pesar de que cada sistema de transporte de aminoácidos se encarga de la captación de dos o más sustratos; poseen un sustrato preferido que es el aminoácido al cual se favorece su captación. Muchos de los sistemas de transporte de aminoácidos poseen mecanismos de regulación mediados por hormonas o por el fenómeno de regulación adaptativa en el cual hay carencia de sus aminoácidos sustrato.

## **1.2 SISTEMA A DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS**

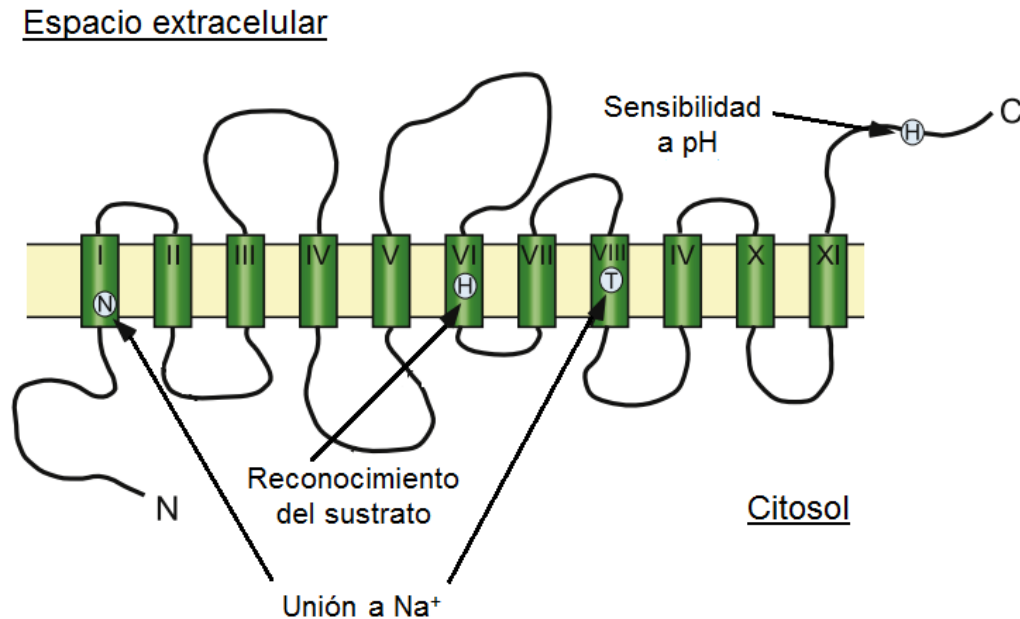
El sistema A es una familia de transportadores de aminoácidos dependientes de sodio que se encargan de transportar aminoácidos neutros de cadena corta como son la alanina, glicina, serina, prolina, cisteína, metionina, treonina, histidina y glutamina. Fue el primer transportador de aminoácidos dependiente de sodio en ser estudiado siendo descrito en 1963 en células Ehrlich de ascitis de ratón (8). Este sistema de transporte es capaz de mediar el transporte de aminoácidos-N-metilados no metabolizables como el metilaminobutirato (MeAIB) que es el sustrato modelo (9); y el aminoácido sintético AIB.

### **1.2.1 Clonación de las proteínas del sistema A**

El sistema A, pertenece a la familia de acarreadores de solutos 38 (SLC38) a la cual también pertenece el sistema N. El aislamiento y clonación de la proteína del sistema A se obtuvieron en la presente década. Se ha demostrado que existen tres isoformas de este sistema de transporte designadas como: transportador de aminoácidos del sistema A 1 (ATA1) o transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 1 (SNAT1) que se expresa principalmente en sistema neuronal; transportador de aminoácidos del sistema A 2 (ATA2) o transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 2 (SNAT2) que se expresa de forma ubicua a excepción de los eritrocitos; y transportador de aminoácidos del sistema A 3 (ATA3) o transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 4 (SNAT4) que se expresa principalmente en hígado y músculo(10). La isoforma ATA2 o SNAT2 presenta características específicas de regulación que se describirán más adelante como la regulación adaptativa, respuesta a hormonas, activación por estimulación en un medio hipertónico; por lo tanto se le asoció a esta isoforma como la que representa el sistema A clásico (11). La isoforma ATA1 o SNAT1 fue la primera en describirse; sin embargo al no poseer todas las características del sistema A clásico, se continuaron los estudios para encontrar a la proteína poseedora del sistema de regulación clásico de esta familia que como se indicó es el ATA2 o SNAT2.

Los SNATs son co-transportadores para  $\text{Na}^+$  y aminoácidos, su captación es impulsada por el gradiente de  $\text{Na}^+$  dirigido hacia el espacio intracelular o citosol a través de la membrana plasmática. La mayor parte de la información bioquímica que se conoce sobre la estructura de la proteína de los miembros de esta familia de transportadores proviene

de estudios de la proteína SNAT2. La estructura general de estos transportadores consiste en 11  $\alpha$ -hélices transmembranales con el dominio C-terminal situado en el exterior de la célula y el dominio N-terminal intracelular (10, 12) (Fig. 2).



**Figura 2.** Estructura propuesta para los miembros de la familia SLC38. Las proteínas están compuestas por 11  $\alpha$ -hélices transmembranales con el extremo amino terminal (N) ubicado en el citosol de las células y el extremo carboxilo terminal (C) en el espacio extracelular. Los residuos de asparagina (N) y treonina (T) ubicados en las  $\alpha$ -hélices transmembranales 1 y 8 respectivamente, son responsables de la unión del sodio ( $\text{Na}^+$ ) mientras que el residuo de histidina (H) en la  $\alpha$ -hélice transmembranal 6 se encarga del reconocimiento del sustrato más no de la unión. Gran parte del extremo C-terminal, en donde se encuentran diversos residuos de histidina (H), es responsable de la sensibilidad al pH en la actividad de esta familia de transportadores de aminoácidos. Adaptada de H.B. Schiöth et al. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013.

Estudios de mutagénesis han revelado que la unión a  $\text{Na}^+$  en la proteína SNAT2 requiere (13)del residuo de treonina 384 en la  $\alpha$ -hélice transmembranal 8 (TM8) (14) así como la asparagina 82 en  $\alpha$ -hélice transmembranal 1 (TM1) (15) y de acuerdo con un modelo de homología, estos residuos están cerca entre sí para formar un posible sitio de unión a  $\text{Na}^+$ . La posición de la treonina en TM8 no se conserva plenamente en la hélice, pero

todos los miembros SLC38 tienen un residuo de treonina en una posición similar. La asparagina en TM1 está perfectamente conservada en todos los miembros de la familia SLC38. Recientemente se demostró que una gran parte del dominio C-terminal en SNAT2 está involucrado en la sensibilidad al pH (16) Por otra parte, se conoce muy poco sobre los mecanismos de reconocimiento de sustrato en estas proteínas. Se ha demostrado que el residuo de histidina 304 en la  $\alpha$ -hélice transmembranal 6 (TM6) en SNAT2 se requiere para el transporte alanina, pero no para la unión y este residuo se conserva en todos los miembros SLC38. Aparte de la alanina en TM6, el sitio de reconocimiento de sustrato no se ha mapeado para el miembros de la familia humana SLC38 (Fig. 2).

A continuación se describirán las principales características de los genes y las proteínas de las tres isoformas del sistema A.

#### 1.2.1.1 SNAT1

Fue clonado por primera vez por el grupo de Varoqui et al (17) a partir de cerebro de rata. La secuencia del gen del SNAT1 (*SLC38A1*) humano se encuentra en el cromosoma 12q13.11 y está formada por 3004 pares de bases. La región codificadora es de 1464 pares de bases que codifican para una proteína de 487 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del SNAT1 humano tiene una homología de 93% con el SNAT1 de rata y del 52% con el SNAT2 de ratón. Adicionalmente se encontraron 2 sitios potenciales de glicosilación entre las  $\alpha$ -hélices transmembranales 5 y 6 (aminoácidos asparagina 251 y asparagina 257); así como sitios potenciales de fosforilación en dominios citoplasmáticos (18).

El SNAT1, al igual que el SNAT2 es capaz de mediar el transporte dependiente de sodio de aminoácidos neutro cortos como la alanina, histidina, metionina y serina; aunque presenta una mayor afinidad por la glutamina. En rata su expresión es exclusiva de las neuronas introduciendo a estas células el precursor necesario del neurotransmisor glutamato. Sin embargo en humano se ha detectado en diversos tejidos predominantemente en corazón y placenta, en menor proporción pulmón, cerebro, músculo esquelético, bazo, estómago y en mucho menor proporción en colon, intestino delgado, riñón e hígado (19). El SNAT1 es sensible al pH, su actividad se detecta difícilmente en un pH del medio de 6.5 y se va incrementando gradualmente a medida que el pH del medio se hace más alcalino (18).

### 1.2.1.2 SNAT2

El SNAT2 fue inicialmente clonado a partir de células epiteliales pigmentosas de la retina de humanos (HRPE por sus siglas en inglés human retinal pigment epithelial cells) (20). El ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) humano consiste en 4479 pares de bases que codifican una proteína de 506 aminoácidos con 11 dominios o  $\alpha$ -hélices transmembranales. El gen de la proteína SNAT2, el *SLC38A2*, se encuentra en el cromosoma 12q en humano y 7q34 en rata. El SNAT2 humano presenta una homología del 93% con el SNAT2 de rata el cual está compuesto por 504 aminoácidos, dos menos que el del humano que se localizan en la sexta  $\alpha$ -hélice transmembranal. Como se mencionó anteriormente, esta isoforma representa el sistema A clásico presentando dependencia por el sodio, siendo sensible a cambios de pH del medio (16), y con preferencia por los aminoácidos neutros de cadena corta como la alanina, glicina, serina, prolina, metionina, histidina, treonina y glutamina, así como el aminoácido no metabolizable MeAIB que se utiliza para estudios de funcionalidad del transportador (11). Adicionalmente es regulado por hormonas y por ausencia de aminoácidos sustrato en el medio (regulación adaptativa) (21). Es ubicuo en células de mamífero a excepción de los eritrocitos y juega diversos papeles en diferentes tejidos y bajo condiciones fisiológicas específicas (5-3). Los principales tejidos donde se expresa son: cerebro, colon, corazón, riñón, hígado, pulmón, placenta, intestino delgado, bazo, estómago, músculo (22), tejido adiposo (11) y glándula mamaria (23).

El SNAT2 también provee un flujo de sustratos utilizados por otros sistemas de transporte de aminoácidos, como el intercambiador o transportador de leucina 1 (LAT1) perteneciente al sistema L. El LAT1 utiliza al aminoácido glutamina, introducido por el SNAT2, y lo intercambia por sus aminoácidos sustrato. De esta manera se facilita la captación de aminoácidos de cadena ramificada, particularmente leucina el cual activa la vía de mTOR involucrada en síntesis de proteínas y proliferación celular (2).

### 1.2.1.3 SNAT4

La clona humana del SNAT4 está compuesta por 3965 pares de bases que codifican una proteína de 547 aminoácidos. Tiene una homología del 88% con el SNAT4 de rata y del 47% y 57% con el SNAT1 y SNAT2 de humano, respectivamente. El gen de SNAT4 se

localiza en el cromosoma 12q13, consiste de 16 exones y 15 intrones, y es de aproximadamente 40 kb (24).

En contraste con el SNAT1 y SNAT 2 que están presentes en las neuronas, la expresión del SNAT4 en el cerebro está confinado a los astrocitos (11). El análisis por Northern blot utilizando diversos tejidos humanos demostraron que el SNAT4 se expresa exclusivamente en el hígado y es ligeramente detectable en el riñón (25). Sin embargo, en estudios posteriores se demostró la presencia del SNAT4 en placenta de rata (26) y humano (27). El SNAT4 puede mediar la captación del MeAIB aunque con menos efectividad que el SNAT1 y 2 debido a su baja afinidad por este sustrato ( $K_t$  20 veces mayor); adquiere su máxima actividad en un pH de 8.5 y depende necesariamente de la presencia de sodio. A pesar de que el SNAT4 transporta aminoácidos neutros cortos como alanina, glicina, serina, prolina, glutamina y asparagina, la afinidad de estos aminoácidos por el SNAT4 es menor en comparación con el SNAT1 y el SNAT2. Sin embargo se demostró que este transportador es capaz de transportar aminoácidos catiónicos como la lisina y arginina de una manera independiente de sodio (24).

## **1.2.2 Características del Sistema A tomando como modelo al SNAT2**

Debido a que, como se mencionó anteriormente, la isoforma 2 del sistema A o SNAT2 es la que representa de mejor manera a este sistema de transportadores y cuya regulación es estudiada en el presente trabajo, se detallarán a continuación diversas características de este sistema de transporte así como lo que se conoce sobre su regulación a nivel transcripcional y en su actividad.

### 1.2.2.1 Características cinéticas

La actividad de este transportador se afecta por el pH del medio, siendo inhibida en un gran porcentaje por un pH menor a 6.5. La acumulación de sus aminoácidos sustrato dentro de las células también reduce su actividad (9).

Existen datos de que el SNAT2 interactúa con proteínas del citoesqueleto y participa activamente en procesos como la duplicación celular y la regulación del volumen celular (28). En el hígado el SNAT2 transporta alanina que provee átomos de carbono para la

gluconeogénesis y nitrógeno para la producción de urea, y se ha considerado que el transporte de alanina a través de este sistema es el paso limitante para su utilización como sustrato en la síntesis de glucosa en este tejido (4). En el intestino, el SNAT2 está localizado en la membrana basolateral de los enterocitos y juega un papel importante en la generación de  $\alpha$ -cetoglutarato que es el metabolito preferido por estas células (20).

El nivel de actividad de los transportadores del sistema A, particularmente del SNAT2, influencia de manera importante la concentración de la poza de aminoácidos intracelulares. La glutamina y la alanina representan una porción significativa de la poza total de aminoácidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Una vez acumulados los aminoácidos la glutamina puede ser convertida a glutamato, el cual a su vez puede ser intercambiado por cistina a través del sistema X<sup>C</sup>. La glutamina también puede interactuar con los sistemas intercambiadores como el ASC y L, estimulando la entrada de isoleucina y valina a las células (2). Estos fenómenos se presentan de manera continua en las células; sin embargo, se potencian cuando se requiere una síntesis activa de proteínas en condiciones de proliferación celular.

#### 1.2.2.2 Iones

El SNAT2 es electrogénico y tiene la capacidad de responder al potencial de la membrana (29), es un transportador de aminoácidos dependiente de sodio. Como se mencionó anteriormente, se identificaron dos aminoácidos, asparagina 82 (Asn-82) localizada en la primera  $\alpha$ -hélice transmembranal, y la treonina 384 (Thr-384) localizada en la octava  $\alpha$ -hélice transmembranal, como los residuos encargados de modular la afinidad del transportador por el sodio (Na<sup>+</sup>). Utilizando modelos de homología se confirmó que el sitio de unión al Na<sup>+</sup> se encuentra en el centro de las hélices transmembranales 1 y 8, coincidiendo con la ubicación de los aminoácidos involucrados en la unión de este ión al transportador (14).

#### 1.2.1.4 Regulación adaptativa

La disponibilidad de aminoácidos en el medio regula la fisiología celular mediante la modulación en la expresión génica y las vías de señalización. Los transportadores de aminoácidos del sistema A tienen la capacidad de actuar no solo como transportadores, sino como receptores de las condiciones extracelulares. Se ha demostrado que la



ausencia extracelular de sustratos de SNAT2 incrementa la actividad de este sistema y a este fenómeno se le conoce como regulación adaptativa (21).

La regulación adaptativa de la actividad del sistema A ocurre en conjunto con un incremento en la expresión del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) y la abundancia de dicho transportador en la membrana. El incremento en la expresión del RNAm de SNAT2, ocasionado por la deprivación de aminoácidos sustrato de este sistema, se suprime al añadirse al medio el sustrato no metabolizable MeAIB o alguno (s) de los aminoácidos sustrato (19). El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la regulación adaptativa a nivel transcripcional es dependiente de un elemento de respuesta a aminoácidos (AARE) localizado en el primer intrón del gen de SNAT2 al cual se une el factor de transcripción ATF4 activado por el sensor de aminoácidos conocido como control general no reprimible 2 (GCN2) (30). La deprivación de aminoácidos también puede ser detectada por una reducción en el volumen celular, ocasionado por el efecto osmótico que provoca la disminución en la captación de aminoácidos. Del mismo modo la exposición de la célula a medios hipertónicos reducirá la actividad del SNAT2 y su expresión génica (31).

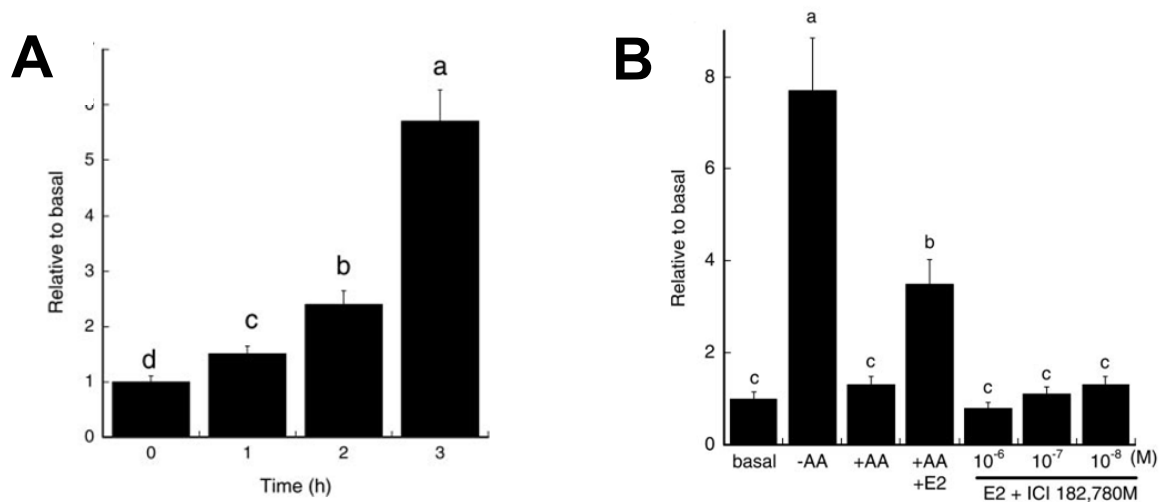
#### 1.2.2.4 Regulación por hormonas

El glucagon estimula la actividad del sistema A a través de la formación del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (32). En el hígado el SNAT2 es activado por glucagon vía AMPc y proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila al factor de transcripción o proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB), permitiendo su unión al elemento de respuesta a AMPc (CRE) en la región promotora del gen de SNAT2 (33). En glándula mamaria, está demostrado que la expresión de SNAT2 se induce en respuesta al estímulo con forskolina y 12- miristato -13- acetato de forbol (PMA), inductores de las vías de señalización proteínas cinasas A y C, respectivamente, y esta activación es reprimida parcialmente por inhibidores de estas vías. Adicionalmente, la actividad del SNAT2 es inducida por diversas hormonas entre las que se encuentran la insulina y los glucocorticoides (34-36). La insulina promueve la migración de éste transportador de los compartimentos endosomales a la membrana celular en células de músculo esquelético (35); así como la migración de este transportador del aparato de Golgi a la membrana plasmática en adipocitos (34). Los glucocorticoides también incrementan la expresión y actividad del sistema A en la línea celular de placenta BeWo (36). En la glándula mamaria, la prolactina es una hormona necesaria para el funcionamiento óptimo de este

sistema de transporte ya que un suministro de bromocriptina (inhibidor de la prolactina) disminuye significativamente las concentraciones de aminoácidos dependientes de este sistema (37). La actividad transcripcional del SNAT2 también es regulada por 17  $\beta$ -estradiol (23).

### 1.2.2.5 Regulación del RNAm de SNAT2 por estrógenos

Durante la gestación, hay un aumento progresivo en los niveles de RNAm de SNAT2 en la glándula mamaria. Interesantemente, se ha demostrado que la expresión de RNAm de SNAT2 es inducida mediante la incubación de explantes de glándula mamaria de rata en presencia de 17  $\beta$ -estradiol, efecto que es reprimido por la adición del inhibidor específico del receptor de estrógenos ICI182780 (Fig. 3) (23).



**Figura 3.** Efecto del 17  $\beta$ -estradiol en la expresión de RNAm de SNAT 2 en explantes de glándula mamaria de rata. A) Expresión relativa del RNAm de SNAT2 en diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2 y 3 horas) con 17  $\beta$ -estradiol en explantes de glándula mamaria de rata. B) Expresión relativa del RNAm de SNAT2 en un medio sin aminoácidos (-AA) simulando el fenómeno de regulación adaptativa, un medio con aminoácidos (+AA), un medio con aminoácidos y 17  $\beta$ -estradiol (+AA E2), y un medio con aminoácidos, 17  $\beta$ -estradiol y el inhibidor fulvestrant (ICI 182780) en diferentes concentraciones ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M) todos los estímulos fueron por un periodo de 3 horas. Esta figura es representativa de 3 experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas,  $a > b > c$ .  $P < 0.05$ . López A et al Am J Physiol Endocrinol Metab 2006.

De igual manera, Bhat y colaboradores (38) encontraron que la actividad y expresión de SNAT2 están incrementados en líneas celulares de carcinoma mamario que expresan el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) (MCF-7, T47D, H-301) y no en aquellas que no lo expresan (MCF-10, MDA-MB-231, SKBR-3) después de 48 h de estimulación con 17 $\beta$ -estradiol. Este efecto es reprimido al utilizar el inhibidor de los receptores de estrógenos ICI182780.

Por otra parte, un estudio previo realizado en ratones hembra con el *knockout* condicional para el ER $\alpha$  en glándula mamaria demostró que las crías amamantadas por estas hembras que carecen el receptor de estrógenos en la glándula mamaria, presentan una menor ganancia de peso comparadas con las crías amamantadas por ratones silvestres (39). Es posible que esta menor ganancia de peso se deba a la reducción en el consumo de sustratos para la producción de leche en la glándula mamaria, incluyendo los aminoácidos transportados por el SNAT2.

Los efectos del 17  $\beta$ -estradiol en las células son mediados a través de receptores específicos conocidos como receptores de estrógenos. A continuación se describirán las principales características de estos receptores y los mecanismos de acción de los estrógenos a través de la activación de receptores y vías de señalización.

### **1.3 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS**

El estrógeno es una hormona de la familia de los esteroides que lleva a cabo funciones reproductivas y no reproductivas en los mamíferos. Ejerce una gran variedad de efectos biológicos en numerosos sino es que en casi todos los tejidos entre los que destacan los aparatos reproductores femenino y masculino, la glándula mamaria, y los sistemas inmunológico, cardiovascular, esquelético y nervioso (40). El estrógeno es sintetizado principalmente en los ovarios, aunque también se ha descrito su síntesis local en diversos tejidos (41). Debido a su naturaleza lipídica, atraviesa libremente las membranas celulares por difusión pasiva.

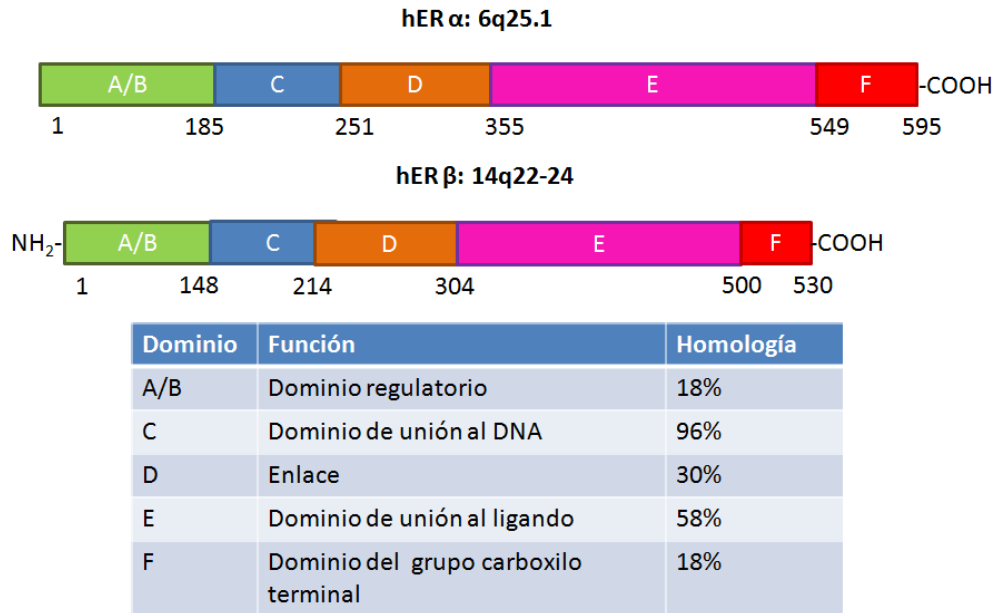
Los receptores de estrógenos (ERs) pertenecen a la familia de receptores nucleares. Existen diversos receptores de estrógenos; sin embargo los más conocidos son los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  que se caracterizan por ser factores de transcripción activados por ligando que median los efectos del estrógeno en el crecimiento, desarrollo, y mantenimiento de diversos tejidos en los mamíferos. Además actúan como activadores o represores de la transcripción, intervienen en la activación de vías de señalización intracelulares y controlan la progresión del ciclo celular (42).

### **1.3.1 Receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ )**

El gen del ER $\alpha$  de humano está compuesto por más de 140 kb, contiene ocho exones y se localiza en el cromosoma 6q25.1. La proteína consiste de 595 aminoácidos y pesa 66 kDa (40). El ER $\alpha$  de ratón tiene una homología de 88% con el de humano. Fue descrito por primera vez en 1973 en extractos de útero y vagina de rata (43). Su secuencia en el DNA fue determinada en 1986 (44); y la primera estructura en cristalografía de dominio de unión al ligando se describió en 1997 (45) Se expresa en diversos tejidos como son útero, ovario, vagina, glándula mamaria, próstata, hueso, sistema cardiovascular y sistema nervioso central (42).

### **1.3.2 Receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ )**

El ER $\beta$  fue descubierto en 1996 en rata (46) y en humano (47). El ER $\beta$  difiere en longitud y secuencia con el ER $\alpha$ . En el humano el gen de ER $\beta$  se encuentra en el cromosoma 14q 22-24 y la proteína está compuesta por 530 aminoácidos con un peso de 60 kDa (40). En roedores se expresa ampliamente en próstata, ovario y pulmones, tejidos cuyo contenido de ER $\alpha$  es mucho menor en proporción con ER $\beta$ . También se ha localizado en ovario, glándula mamaria, hueso, sistema cardiovascular y sistema nervioso central; sin embargo su proporción en comparación con el ER $\alpha$  es menor (45).



**Figura 4.** Organización modular y dominios funcionales de los receptores de estrógenos humanos alfa y beta (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ). Los ER $\alpha$  y ER $\beta$  están conformados por cinco dominios: el dominio A/B, es un dominio regulatorio que va del aminoácidos 1 al 185 en ER $\alpha$  y del 1 al 148 en ER $\beta$  y se encarga de la activación de la transcripción de sus genes blanco independiente de la unión del ligando; el dominio C, es el dominio de unión al DNA que va del aminoácidos 186 al 251 en ER $\alpha$  y del 149 al 214 en ER $\beta$  y se une a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados en sus genes blanco; el dominio D es un dominio de enlace que va del aminoácido 252 al 355 en ER $\alpha$  y del 215 al 304 en ER $\beta$  y se encarga de la dimerización del receptor; el dominio E, es el dominio de unión al ligando que va del aminoácido 356 al 549 en ER $\alpha$  y del 305 al 500 en ER $\beta$ , es el dominio más grande en ambos receptores responsable de la activación de la transcripción dependiente de ligando de sus genes blanco; finalmente el dominio F, es el dominio del grupo carboxilo terminal que va del aminoácido 550 al 595 en ER $\alpha$  y del 501 al 530 en ER $\beta$  y se caracteriza por interactuar con proteínas co-reguladoras. Adaptada de: Charitidi J, et al. Hearing Research 2009.

Los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  denominados comúnmente ERs están compuestos por cinco dominios (Fig. 4):

- Dominio A/B o amino terminal (N-terminal): es el más variable en tamaño y secuencia. Contiene un dominio de activación transcripcional (AF-1) la cual es una

región involucrada en la interacción de ER con proteínas y activadores transcripcionales de la expresión de genes blanco. En los ER $\alpha$  el dominio AF-1 es muy activo a la estimulación del gen blanco como elementos de respuesta a estrógenos. Existen diferencias en este dominio entre los ER $\alpha$  y los ER $\beta$ . En los ER $\alpha$  se requieren dos partes AF-1 para ejercer el efecto agonista del estradiol (E2). En los ER $\beta$  esta parte dual de los AF-1 es faltante (48).

- Dominio C o de unión al DNA (DBD): es el que se une con gran afinidad a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en el promotor de los genes blanco. Contiene dos estructuras de zinc que juegan un papel importante en la dimerización del receptor y en la unión de éste a secuencias específicas del DNA. Contiene dos secuencias importantes la P-box o caja P (proximal) que es responsable de reconocer al ERE, y la D-box o caja D (distal) encargada de la dimerización del receptor. Este dominio también posee una extensión C-terminal importante para la unión de monómeros de ERE y la interacción con proteínas reguladoras como las proteínas del grupo de alta movilidad B (HMGB) (49).
- Dominio D o región de unión: su papel es interconectar los dominios C y E manteniendo una distancia entre ellos para que puedan realizar sus funciones. Actualmente se cree que está involucrado no solo en la localización nuclear del receptor; sino también en la modulación de la interacción de coactivadores y modificaciones post-transcripcionales regulando la potencia transcripcional de los ERs.
- Dominio E o de unión al ligando (LBD): se une específicamente al ligando y activa la transcripción dependiente del ligando mediante el dominio de activación de la función 2 (AF-2) el cual se localiza en el carboxilo terminal (C-terminal). También contienen sitios de dimerización para la interacción con proteínas de choque térmico y señales de localización nuclear. Los LBD de los ER $\alpha$  y los ER $\beta$  varían mucho; sin embargo conservan la misma afinidad por el estradiol como ligando modelo. Estudios de cristalografía revelaron que el AF-2 de los ER $\alpha$  y los ER $\beta$  están compuestos por aminoácidos en hélice 3,4,5 y 12 y específicamente la posición de la hélice 12 se altera por los ligandos. Si el ligando es un agonista como el E2, la hélice 12 se posiciona sobre el ligando y forma la superficie para el reclutamiento y la interacción de co-activadores (47).

- Dominio F: se localiza en el C-terminal del receptor y se caracteriza por tener una gran variación en cuanto a su longitud y secuencia. Por varios años se creyó que no tenía alguna función específica; sin embargo recientemente se sabe que tiene la capacidad de modificar la unión al ligando e interactuar con proteínas co-reguladoras incluyendo el co-activador de receptores de esteroides 1 (SRC-1) con activación transcripcional (49).

#### **1.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS**

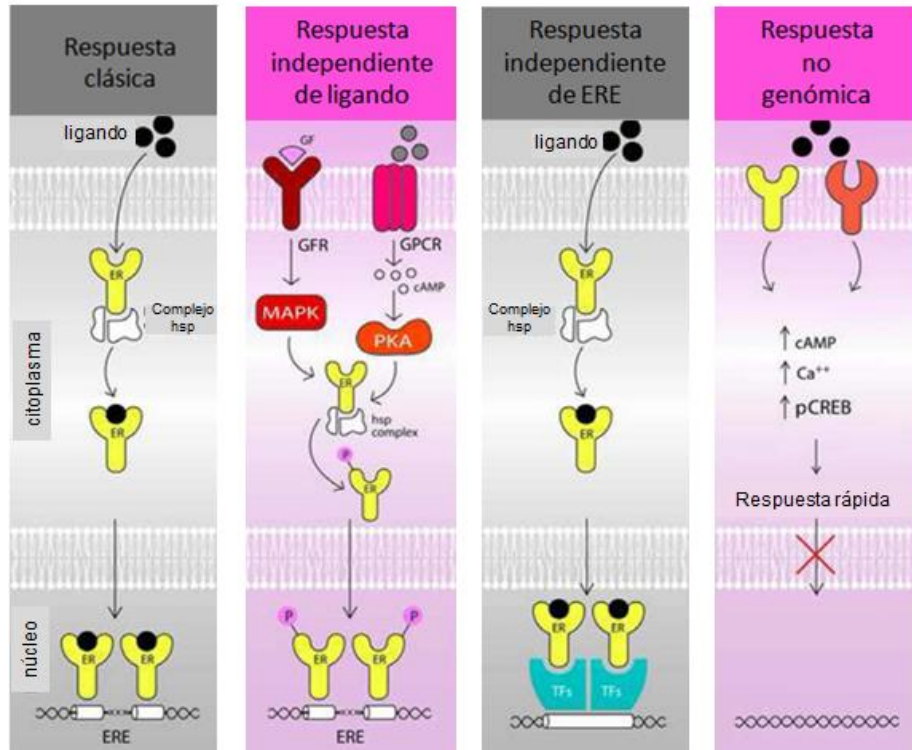
Las respuestas celulares de los estrógenos son mediadas por los ERs los cuales se encargan de desencadenar una serie de eventos celulares. Estos tipos de respuesta se dividen en dos categorías: respuestas genómicas, caracterizadas por cambios en la transcripción de genes que usualmente ocurren en lapsos de horas a días; y respuestas no genómicas o respuestas rápidas que ocurren en minutos o incluso segundos de estimulación celular que activan vías de señalización pero no influyen directamente la expresión de genes (50). Estos mecanismos se describen a continuación y se ejemplifican en la Fig. 5.

##### **1.4.1 Respuestas genómicas**

Como se mencionó anteriormente, este tipo de respuestas involucran la transcripción de genes y se caracterizan por ser respuestas lentas con duración de horas e incluso días. Dentro de este tipo de respuestas se han identificado diversos mecanismos de acción de los receptores de estrógenos descritos a continuación.

###### 1.4.1.1 Señalización clásica dependiente de ligando

Los ERs inactivos se encuentran en el núcleo y citoplasma de las células formando un complejo con diversas proteínas de choque térmico o heat shock proteins (hsp) que actúan como chaperonas cuando la célula no está expuesta a estrógenos. Estas proteínas, hsp90, hsp70 y hsp56, forman un complejo con el ER previniendo su unión a elementos de respuesta en el DNA ya que se unen al DBD del receptor; sin embargo este complejo mantiene la capacidad del ER de unirse a sus ligandos con gran afinidad.



**Figura 5.** Mecanismos de señalización de los estrógenos. Se conocen cuatro mecanismos de acción de las hormonas esteroideas. El primero conocido como respuesta genómica se refiere a la respuesta clásica en donde el ligando atraviesa la membrana plasmática y se une al receptor de estrógenos (ER) liberándolo del complejo de las proteínas de choque térmico (hsp), el ER unido al ligando se internaliza en el núcleo, se dimeriza y se une al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) ubicado en su gen blanco. El segundo mecanismo es la respuesta independiente de ligando en donde un factor de crecimiento activa a su receptor y la vía de señalización que desencadena en la fosforilación y activación del ER el cual se internaliza en el núcleo, se dimeriza y se al ERE ubicado en su gen blanco. El tercer mecanismo es la respuesta independiente de ERE en donde el ligando atraviesa la membrana plasmática y se une al ER liberándolo del complejo hsp, el ER unido al ligando se internaliza en el núcleo, se dimeriza y se une a otro factor de transcripción por lo que funciona como un co-regulador de la transcripción. El cuarto mecanismo es la respuesta no genómica en donde el ligándose une a un receptor membranal y desencadena de la activación de una vía de señalización favoreciendo el incremento de segundos mensajeros como AMP cíclico (cAMP), calcio (Ca<sup>++</sup>) u otro factor de transcripción. Adaptada de: Charitidi J, et al. Hearing Research 2009.



Cuando los estrógenos se difunden a través de la membrana celular y nuclear interactúan con el ER separándolo del complejo de proteínas hsp. Una vez activados los ER pueden formar homodímeros o heterodímeros y unirse a los EREs en el DNA (40).

Los EREs están compuestos por dos pentámeros palindrómicos invertidos espaciados por tres bases variables (5'-GGTCAnnnTGACC-3'). La secuencia de aminoácidos que conforma la caja P o P-box del DBD de la primera subunidad, se une a la secuencia palindrómica del ERE. De igual modo, caja P de la segunda subunidad de ER (dímero) se une a la segunda secuencia palindrómica y de esta manera las dos subunidades se unen en sus secuencias de aminoácidos de cajas D o D-boxes para formar el dímero.

Existen dos activadores de la transcripción indispensables para iniciar la transcripción de los genes blanco de ER: el primero es el AF-1 o dominio de activación constitutivo y el AF-2 o dominio de activación dependiente de ligando. Ambos facilitan el proceso de transcripción reclutando proteínas co-activadoras como la TBP (TATA-binding protein) o miembros de la familia de p160 (49).

#### 1.4.1.2 Señalización independiente de ligando.

Es posible activar a los ERs en ausencia de sus ligandos mediante la activación de vías de señalización que conlleva en un incremento de segundos mensajeros intracelulares. Los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-I), factor de crecimiento de transformación (TGF), algunas citosinas, neurotransmisores o reguladores del ciclo celular pueden activar a los ERs en ausencia de estradiol por otras vías de señalización como la vía de la PKA, PKC y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (41).

Este tipo de activación se da mediante la fosforilación de los receptores de estrógenos. Se han identificado diversos sitios de fosforilación. La PKA activa ejerce efectos funcionales en los ERs mediante la fosforilación directa de residuos de serina conservados en el LBD de los receptores. El DBD de los ERs puede ser fosforilado por la PKC y también existen sitios consenso de fosforilación para cinasas dependientes de ciclinas (CDK), activadas por las MAPK y las cinasa Jun N-terminal (JNK) (51-53).

### 1.4.1.3 Señalización independiente de ERE

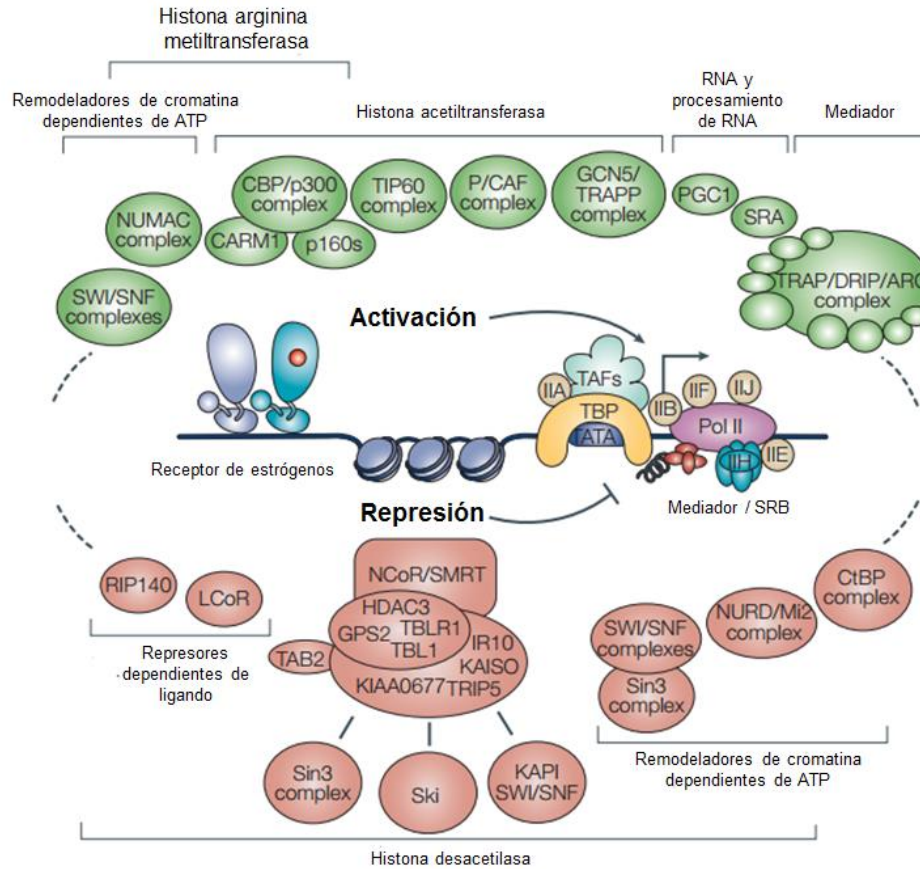
No todos los genes activados por estrógenos poseen EREs lo que sugiere que existe una respuesta a estrógenos indirecta de estas secuencias en algunos genes blancos activados por los ERs. En este mecanismo los ERs actúan como correguladores más que como factores de transcripción. Uno ejemplo de mecanismos de activación de los estrógenos independiente de ERE es a través de interacciones proteína-proteína entre los ERs y otros factores de transcripción tales como la proteína activadora 1 (AP-1) (54).

El factor de transcripción AP-1 se compone de miembros de las familias Jun, Fos, ATF (factor activador de la transcripción), y MAF (fibrosarcoma musculoaponeurótico), estas proteínas forman dímeros después de su activación para regular la expresión génica (55-57).

Estudios previos han proporcionado evidencia de que existe una interacción directa entre los ERs y c-Jun y c-Fos los cuales son los componentes predominantes del factor de transcripción AP1 (58-60). De esta manera el estradiol activa a los ERs y esta señalización permite su interacción con factores de transcripción del complejo Fos/Jun que a su vez reconocen y se unen a elementos de respuesta a AP-1 en el promotor de los genes blanco. Los ER $\alpha$  y ER $\beta$  difieren en su capacidad de interacción con AP1 ya que en presencia de 17- $\beta$  estradiol los ER $\alpha$  inducen al factor de transcripción AP-1, favoreciendo la activación de sus genes blanco; mientras que los ER $\beta$  tienen un efecto inhibitorio reprimiendo la transcripción mediada por AP1 (54).

### **1.4.2 Correguladores de los receptores de estrógenos**

Los mecanismos dependiente e independientes de ligando, e independiente de ERE descritos previamente pueden mediar la activación, represión y trans-represión (cuando regulan negativamente la transcripción a través de otro factor de transcripción al cual se unen) de genes dependiendo de las proteínas coreguladoras que recluten. Se han descrito una amplia gama de proteínas coactivadoras y correpresoras que participan en conjunto con ER $\alpha$  y ER $\beta$  para regular la transcripción de sus genes blanco (Fig. 6)



**Figura 6.** Complejos de coactivación y correpresión requeridos para la regulación transcripcional mediada por los receptores de estrógenos. La regulación de una unidad general transcripcional a través de receptores nucleares entre los que se encuentran los receptores de estrógenos requiere de la participación de un amplio número de complejos correguladores que ejercen diferentes funciones y actividades enzimáticas. Los complejos coactivadores (verde) incluyen factores con actividad de remodelamiento de cromatina dependiente de ATP, histona arginina metiltransferasa, histona acetiltransferasa, factores involucrados en el procesamiento del RNA y componentes conocidos como mediadores que permiten la interacción con la maquinaria de la RNA polimerasa II. De manera opuesta, los correpresores (rojo) incluyen factores de remodelamiento de la cromatina dependientes de ATP, correpresores basales como el correpresor de receptores nucleares (NCoR) y el mediador de silenciamiento del receptor del ácido retinoico y la hormona tiroidea (SMRT) los cuales funcionan como plataformas para el reclutamiento de diversos subcomplejos con actividad de desacetiladores de histonas. Adicionalmente existen correpresores específicos como el represor de receptores nucleares dependiente de ligando (LCoR) y la proteína 140 de interacción del receptor (RIP140) los cuales

reclutan correpresores generales bajo inducción con ligando. Esta figura representa los diferentes complejos reguladores que participan en los eventos mediados por los receptores nucleares entre los que se encuentra los receptores de estrógenos. Adaptada de Perissi V y Rosenfeld MG. Nature Reviews, 2005.

Estos cofactores reguladores no son exclusivos de los receptores nucleares ya que se utilizan de una manera similar por otros factores de transcripción de unión al DNA. En general, los receptores nucleares sin ligando preferentemente interactúan con correpresores para mediar la represión, mientras que los receptores unidos a ligando son activadores de la transcripción debido a su capacidad para reclutar proteínas coactivadoras (61). Sin embargo, algunas excepciones se han identificado, como algunos correpresores tales como el correpresor de receptor nuclear dependiente de ligando (LCoR), la proteína 140 de interacción del receptor (RIP140) y el represor de la actividad de los receptores de estrógenos (REA) (62, 63), los cuales se unen a los receptores nucleares en una forma dependiente de ligando y compiten con los coactivadores desplazándolos.

Además, existen factores correguladores, tales como los remodeladores de la cromatina dependientes de ATP que comprenden los complejos SWI / SNF, los cuales se han asociado con la activación y represión de genes (64-67).

Alternativamente, los correguladores también se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo a su modo de acción. El primer grupo contiene factores que modifican covalentemente a las histonas (por ejemplo, mediante acetilación / desacetilación, metilación / desmetilación, la fosforilación / desfosforilación o Ubiquitinación / deubiquitinación). El segundo grupo incluye a los factores de remodelación de la cromatina dependientes de ATP que modulan la accesibilidad de los factores de transcripción y la maquinaria de transcripción basal, al promotor de sus genes blanco (68-70).

Sin embargo, la regulación transcripcional no puede ser considerada como un proceso independiente, basado en la cromatina, sino que debe ser considerado como un proceso acoplado a muchos otros eventos celulares que se llevan a cabo por diferentes proteínas

y factores de transcripción. Existe una lista numerosa de correguladores conocidos para los receptores nucleares y de manera específica para los receptores de estrógenos (71-73).

### **1.4.3 Respuesta no genómica**

Los procesos anteriormente mencionados son procesos relativamente largos (con duración de varias horas o incluso días) de transcripción y traducción de mRNA que no nos explican los efectos a corto plazo de los estrógenos que pueden suceder en cuestión de minutos o incluso segundos que conllevan a la activación de vías de señalización pero no regulan directamente la expresión de genes.

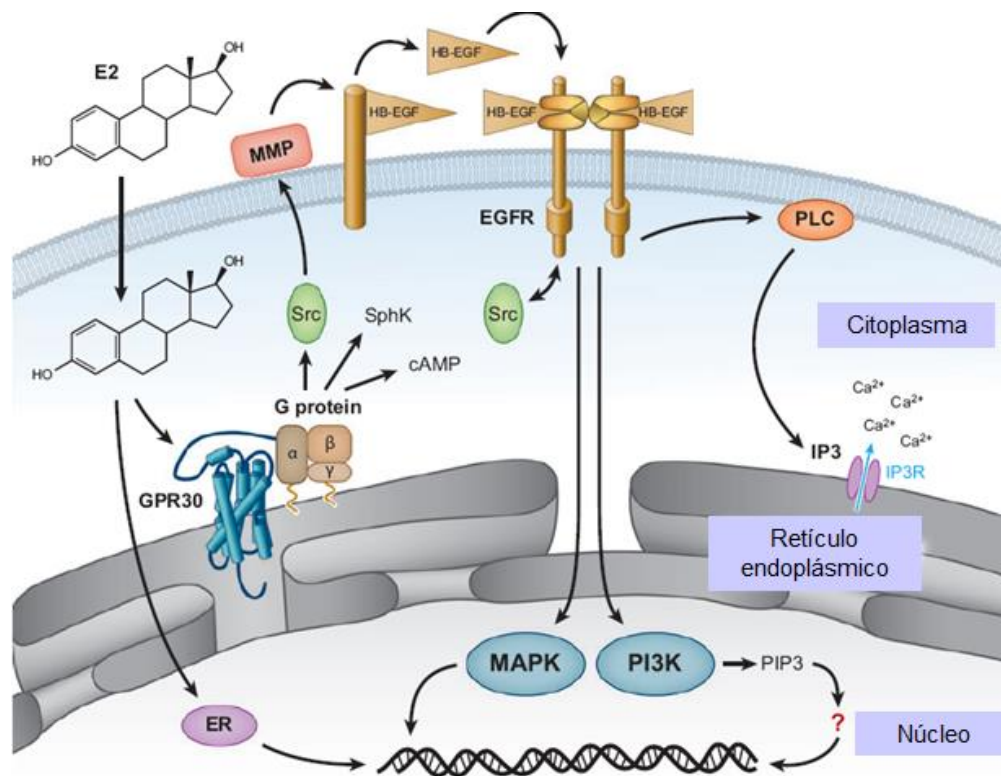
Este tipo de respuestas rápidas incluyen la generación de segundos mensajeros como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), AMPc y óxido nítrico (NO), así como la activación de receptores tirosina-cinasa como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R), y cinasas como la fosfatidil inositol 4,5 bifosfato 3 cinasa (PI3K), proteína cinasa B (PKB), miembros de la familia de las MAPK, miembros de la familia de c-Src, y de las vías de la PKA y PKC (74-78). En diversos estudios se ha atribuido a los ERs ( $\alpha$  y  $\beta$ ) las respuestas no genómicas. También se encontraron la formación de complejos entre los ERs y proteínas G, y PI3K (79).

Gracias a estos ejemplos se comprueba que los estrógenos pueden mediar múltiples eventos de activación rápida en la célula. Sin embargo no todas estas respuestas pueden ser atribuidas a los ERs. En los últimos años se encontró un miembro de la familia de los receptores transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR), el receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30) el cual también es capaz de mediar los dos tipos de respuesta de los estrógenos, la respuesta rápida y la transcripcional (50).

### **1.4.3 Receptor de estrógenos membranal GPR30.**

Fue identificado por primera vez como un receptor huérfano de la familia de los receptores con siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G en los 90's (80-82). Sin

embargo su funcionalidad como un receptor de estrógenos no fue descubierta hasta el año 2000 (83). Tiene un homología con los GPCRs del 30%. Su afinidad por el estrógeno es menor que la del ER $\alpha$  con una constante de disociación (Kd) 10 veces mayor. A diferencia del ER $\alpha$ , los antagonistas para este receptor como son el ICI-182780 y el tamoxifen, funcionan como agonistas del GPR30 (84).



**Figura 7.** Mecanismos de señalización del estrógeno a través de GPR30. Los estrógenos se unen al receptor de estrógenos ER o al receptor GPR30 activando la formación de segundos mensajeros como AMP cíclico (cAMP) o la proteína cinasa de tirosinas de oncogen Src (Src). La vía de la Src está involucrada en la activación de la matriz de metaloproteinasas (MMPs) las cuales favorecen la liberación del factor de crecimiento epidermal unido a heparina (HB-EGF) el cual activa a los receptores de factores de crecimiento epidermales (EGFRs). La activación de los EGFRs desencadena respuestas múltiples incluyendo la activación de la fosfolipasa C (PLC) para la liberación de calcio (Ca<sup>2+</sup>) del retículo endoplásmico; las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3Ks). La activación de las MAPK y las PI3Ks resultan en la activación de vías de señalización que regulan factores de transcripción. Adaptada de: Prossnitz E, et al. *Annu. Rev. Physiol* 2008.

Utilizando marcadores subcelulares, se encontró que el GPR30 se localiza principalmente en la membrana del retículo endoplásmico aunque también se encuentra en la membrana plasmática. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de las proteínas G son disociadas de la subunidad  $\alpha$  para iniciar la maquinaria de señalización del GPR30 (85).

El estrógeno atraviesa la membrana plasmática y se une al ER iniciando la respuesta clásica activando la transcripción. Por otra parte, el estrógeno puede unirse al GPR30 iniciando la vía de señalización de las proteínas G que activan a diversos efectores como la adenilato ciclasa resultando en la producción de AMPc y Src. La vía de la Src está involucrada en la activación de la matriz de metaloproteinasas (MMPs) las cuales actúan en el precursor del factor de crecimiento epidermal unido a heparina (pro-HB-EGF) liberando al factor de crecimiento epidermal unido a heparina (HB-EGF) el cual activa a los receptores de factores de crecimiento epidermales (EGFRs) (83). La activación de los EGFRs desencadena múltiples eventos incluyendo la activación de la fosfolipasa C (PLC), las MAPK (86) y las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3Ks) (87, 88). La PLC desencadena la movilización de calcio intracelular, a través de la acción del inositol-3-fosfato (IP3). La activación de las MAPK y las PI3Ks resultan en la activación de vías de señalización que regulan factores de transcripción, de esta manera los estrógenos pueden activar la transcripción de genes cuyos promotores no contienen EREs. Recientemente también se sabe que el GPR30 puede activar la vía de PKC(89). La combinación de los efectos citosólicos y nucleares promueven en conjunto la proliferación celular (Fig. 7).

### **1.5 ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE SNAT2**

En un trabajo previo realizado por Ortiz V. y colaboradores (33), se analizó la región promotora del gen de SNAT2 con el software MatInspector (Genomatix) y se identificaron elementos de respuesta putativos a diferentes vías de señalización entre los que destacan sitios AP-1, activados por las vías de señalización de PKC y MAPK; sitios CREB activados por la vía de PKA, y sitios SP-1, activados por la vía de MAPK. El análisis *in silico* de la región promotora del gen de SNAT2 también reveló la presencia de un ERE putativo entre las bases -1486 y -1471 río arriba del sitio de inicio de transcripción (Fig. 8A).

**A**

```

-1531 TGAGAGGAGCTGCTCGGATGTTACTGGGGTGAGCATTGGAAAGAAGGTAATCAAGACTT
                                             ERE
-1291 TGAGGGGGGGGGGGCTTTAATCAAGGGAGGCTGAAAAAGGGCGTTCCTGGTTCTTAAAT
      SP-1
-1231 CTAAAGCGACAGTGGCACTTGAGAGGGGGCAGGGGACGTGCAGCATTAATGTAAGACTAT
      SP-1
-1171 TGTTTAAGTGTGGCTGGCGGGACCAAAGGTTTAGGATGAGGAACAGTGTGTAAGGGGAA
      SP-1
-931 GAAGAGAGCACTAGGTCAAACTCGTTGTTTATTCCATCAAGCAGCATTTTTCTCT
      RAR-α
-811 AATATCTAGTCTCAGGGGCTCCCGGGTGCCTCGACTCTGCAAGACCACAGCTCCACCG
      NF-kappa B
-691 GGAAGCTGGAGGAGCGCTAACACCAGGGGTGGGGTGGAGGCAGGAGGGAAAGTGTGGG
      SP-1/GC-box, KLF3
-631 CAAGAGGGAACAGGGCGCCCTAGGCGGCCTCGGAAGGGCTGGGTCTCCATCCCCGAAAC
      AP-2
-571 CCCTTTTAAGGGCTTGCTGGTCCAACGCAACCGTCCCTAGTACGCTGTGACCACGTGCAAC
      AP-1
-511 CCCAAAGTCTATCCCGCCACGGAACTGCGAGCCGCCCTCATTACCAGGCTAGTTGTGG
      SP-1, KLF6 AP-1
-391 TGGCAGCGCTGGCTCAAGTTCTGCGGGAGAAAAACCTTAACGTAAATCTTAAAGTGGCGG
      AP-1 CREB
-331 GCTGGGGGTGGTGGGGTGTCTGGGGTGTAGGGTACCGCACACACGCCGGATGTGTCC
      AML3, SP-1 RXR
-271 CCGAAACCGCAGCGTTGGAGACCGCTGGGAGGGAATCTAAGGAGCTGGCTCCTTACGGC
      EGR3 AP-1
-211 AGCCGCGGGTGGCGGCCACCCACGGGGCTGCGGTGCCACGGCAGCCGGAGCCACGGGAAA
      ATF6, AP-2 ChREBP
-151 GCGGGGTGCGGCTGGCCCCGACTCGGGGTGCGGGGCAGCAGCAGGGAGCGGAGCCCA
      AP-2 TBP, TFIID SP-1/GC box
-91 GGTGCTGTGATACACAAAGACGAACGCCCGCGCCCCGCCACTGACGCGGCTCCAGGCC
      AP-1 SP-1 CREB/AP-1
-31 GCTATAACTCGCGTCCGGAGGCAGCTCCACAACCGGCCACGCCGTGCCCCGCGCCACCA
      TATA +1
+30 CCCCTTAGTCTCTGCTGGAGGATCGTGACCGCCATTCCCGCTTTTTTTTTTTTATA

```

**B**

```

Rata (Rattus norvegicus) ACTTGAAAGAAGGTAATCAAGACT TTCTAGTTATTGTT
Ratón (Mus musculus) ACTTGAAAGAAGG-TATCGAGACT TTCTAGTTATTGTT
Humano (Homo sapiens) ACTTGAAAGATGGTAATCAAGACT TTCTACTTATTGTT
*****.***.***.******

```

**Figura 8.** A: Análisis de la región promotora del gen de SNAT2 de rata. Se realizó un análisis *in silico* utilizando el software de MatInspector de Genomatix en donde se introdujo una secuencia de 2000 pb correspondiente a la región promotora del gen de SNAT2 de rata y las primeras 90 bases río abajo del sitio de inicio de la transcripción. Se presentan los elementos de respuesta putativos a diversos factores de transcripción los cuales presentaron un score mayor a 0.7 entre los que destacan elementos a los factores de transcripción AP1, SP1, KLFs, RXR, CREB, AP2, KFKappaB y un elemento de respuesta a hidratos de carbono ChREBP. En el análisis computacional también se encontró un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) putativo entre las bases -1486 y -1471 río arriba del sitio de inicio de transcripción. Adaptada de: Ortiz V et al. Am J Physiol



Endocrinol Metab, 2011. B: Análisis de conservación de la secuencia ERE en el promotor de gen de SNAT2 de rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*) y humano (*Homo Sapiens*). Con un % de identidad de 95.73% entre rata y ratón, de 91.0% entre rata y humano y de 89.71% entre ratón y humano. Análisis *in silico* realizado con ClustalW2.

Posteriormente se llevó a cabo un alineamiento entre las secuencias en donde se encontró el ERE en el promotor del gen de SNAT2 de rata y se comparó con los promotores del gen de SNAT2 de ratón y humano utilizando el software ClustalW2. Se obtuvo un porcentaje de identidad (% de identidad) de 95.73% entre rata y ratón, de 91.0% entre rata y humano y de 89.71% entre ratón y humano (Fig. 8B). Esto demuestra que la región en donde se localiza el ERE putativo en la región promotora del gen de SNAT2 está muy conservada entre especies por lo que resulta interesante analizar la funcionalidad de dicha región y caracterizar el mecanismo mediante el cual el 17 $\beta$ -estradiol activa la transcripción de este gen a través posiblemente de este elemento de respuesta.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La glándula mamaria presenta una gran demanda de aminoácidos durante los periodos de gestación y lactancia en los cuales se requiere la captación de aminoácidos para la proliferación celular y la formación de células epiteliales durante la gestación en preparación del tejido mamario para la lactancia. Durante la lactancia se incrementa considerablemente la síntesis de proteínas para formar las proteínas de la leche por lo que la captación de aminoácidos se mantiene muy activa y es mediada por sistemas de transporte. En estudios previos en donde se analizaron las diferencias arteriovenosas de aminoácidos en la glándula mamaria se ha demostrado que la glutamina y alanina, principales sustratos del transportador de aminoácidos SNAT2, son los aminoácidos preferentemente transportados hacia la glándula mamaria al inicio de la lactancia (1) por lo que este transportador de aminoácidos presenta gran relevancia durante estos periodos en la glándula mamaria. Se sabe que la expresión del SNAT2 se incrementa progresivamente durante la gestación. Adicionalmente se ha confirmado que el 17 $\beta$ -estradiol incrementa la transcripción del RNAm de SNAT2 en explantes de glándula

mamaria, así como en diversas líneas celulares que expresan el ER $\alpha$ . Un análisis *in silico* de la región promotora de este gen reveló la presencia de un ERE putativo río arriba del sitio de inicio de la transcripción entre las bases -1486 y -1471, sugiriendo que la región promotora del gen de SNAT2 es regulado por 17 $\beta$ -estradiol y que su regulación es activada durante la gestación cuando las concentraciones de esta hormona (15) y los requerimientos de aminoácidos se (16) incrementan, ayudando a la proliferación del tejido mamario.

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El elemento de respuesta a estrógenos putativo encontrado entre las bases -1486 y -1471 río arriba del sitio de inicio de transcripción en el promotor del gen de SNAT2 es responsable de la activación de la transcripción de este gen mediada por el 17 $\beta$ -estradiol?

### **4. HIPÓTESIS**

El 17 $\beta$ -estradiol regula la actividad transcripcional del gen de SNAT2 a través de un elemento de respuesta a estrógenos putativo encontrado entre las bases -1486 y -1471 río arriba del sitio de inicio de transcripción en el promotor de este gen y este mecanismo es dependiente de proteínas coactivadoras.

### **5. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General:**

- Dilucidar el mecanismo mediante el cual el 17 $\beta$ -estradiol regula la transcripción del gen de SNAT2 así como las proteínas coactivadoras que participan en este proceso.

#### **4.2 Objetivos específicos:**

- Determinar si el 17- $\beta$  estradiol regula la actividad transcripcional del gen de SNAT2.
- Identificar el elemento de respuesta responsivo en la región promotora del gen de SNAT2 en respuesta a 17- $\beta$  estradiol.
- Determinar si el efecto del 17 $\beta$ - estradiol en la activación de la región promotora de SNAT2 es dependiente de ER $\alpha$ .
- Determinar el mecanismo a través del cual el 17- $\beta$  estradiol regula la actividad transcripcional del gen de SNAT2.
- Determinar las proteínas coactivadoras que forman parte del complejo transcripcional a través del cual el 17- $\beta$  estradiol activa la transcripción del gen de SNAT2.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 MATERIALES**

El Sistema Dual de Luciferasa, Sistema de Retardamiento en Gel, vector de expresión pRL-TK Renilla y vector pGL3-basic con el gen reportero de luciferasa fueron obtenidos de Promega (Madison, WI, USA). El kit para la obtención de extractos nucleares fue de Pierce Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). El coctel de inhibidores de proteasas Complete Mini y el Master Mix LightCycler® 480 SYBR Green fueron obtenidos de Roche Applied Science (Mannheim, Germany). El medio de cultivo Dulbecco's modified eagle's médium (DMEM) sin rojo de fenol fue de Invitrogen-GIBCO (Grand Island, NY, USA). El suero fetal bovino (FBS) tratado con carbón y dextran fue obtenido de HyClone Laboratories, Inc. (Logan, UT, USA). El reactivo de transfección PolyFect fue de Qiagen. La línea celular de adenocarcinoma de cervix HeLa fue obtenida de la American Type Culture Colection (Rockville, MD, USA). Las perlas de proteína A/G agarosa con DNA de esperma de salmón 50% slurry fueron de Upstate Biotechnology (Temecula, CA, USA). Los anticuerpos (anti-ER $\alpha$ , anti-Topoisomerasa II $\beta$ , anti-Topoisomerasa I, anti-PARP1, anti-GAPDH, anti- $\beta$ -Tubulin, anti-ratón IgG-HRP, anti-conejo IgG-HRP, y anti-cabra IgG-HRP) y los plásmidos-sh PARP1, Ku70, GAPDH y Control A fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos anti-Ku80 y anti-Ku70 se obtuvieron de Cell Signaling (Beverly, MA, USA). El anticuerpo anti-RNA polimerasa II se obtuvo de Merck Millipore (Temecula, CA, USA). El 17 $\beta$ -estradiol se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **5.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Las ratas Wistar hembras pesando entre 200-250 g se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El suero y glándulas mamarias fueron colectados de ratas control vírgenes y ratas gestantes durante los días 5, 14 y 20 y tratados de acuerdo a lo descrito previamente (90). Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán de acuerdo con los lineamientos internacionales para el uso de animales de experimentación.

## 5.3 MÉTODOS

### 5.3.1 Cultivo celular, transfección transitoria y ensayos utilizando al gen reportero de luciferasa.

Las células HeLa se crecieron en DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) a 37°C en un incubador a 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos de transfección, las células HeLa (150,000 células/pozo) se sembraron en placas de 12 pozos en medio DMEM sin rojo de fenol, suplementado con 5% de suero fetal bovino tratado con carbón activado y dextrán, 24 h antes de la transfección. Se utilizaron 0.25 µg de cada construcción del promotor de SNAT2 con el gen reportero de luciferasa (33). Se llevó a cabo una cotransfección con 0.5 µg de plásmido de expresión (pCMV5-hESR1, obtenido del laboratorio del Dr. Larrea) y 0.01 µg de vector de expresión Renilla pRL-TK (Promega), el cual se usó como control interno para normalizar la eficiencia de la transfección. El efecto del plásmido con el RNA de interferencia para el ERα (sh-ERα, obtenido del laboratorio del Dr. Gustafsson) se evaluó en células HeLa cotransfectadas con 0.25 µg de la construcción completa del promotor de SNAT2, utilizando 0.5 µg de plásmido sh-ERα o Superior (vector vacío), 0.5 µg de plásmido de expresión de ERα (pCMV5-hESR1) y 0.01 µg del vector de expresión Renilla pRL-TK (Promega). El efecto de los plásmidos con el RNA de interferencia para las proteínas PARP1, Ku70 y GAPDH (sh-PARP1, sh-Ku70 y sh-GAPDH respectivamente) se evaluó en células HeLa cotransfectadas con 0.25 µg de construcción completa del promotor de SNAT2, o el plásmido son el sitio ERE consenso (EREelbLUC); 0.5 µg de plásmido de expresión de ERα (pCMV5-hESR1); 0.5 µg de sh-PARP1, sh-Ku70 o sh-GAPDH o el vector vacío y 0.01 µg de vector de expresión Renilla pRL-TK (Promega). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron para determinar la actividad de luciferasa utilizando el Luciferase Assay Dual System, las medidas luminométricas se analizaron con el luminómetro de microplacas Veritas (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA). Cada transfección se realizó por triplicado, y tres experimentos independientes fueron se llevaron a cabo para cada construcción.

### **5.3.2 Preparación de extractos nucleares y ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).**

Los extractos nucleares de células HeLa y de glándula mamaria de rata se prepararon con el Nuclear Extract Kit de Pierce de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los ensayos de retardo de la movilidad electroforética se realizaron usando el sistema Gel Shift (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, cada reacción contenía 5  $\mu\text{g}$  de extracto nuclear de células HeLa, 17.5 fmol de sonda u oligonucleótido de doble cadena marcado (ANEXOS Tabla 1), 0.5 – 1  $\mu\text{g}$  de poly(dI-dC) y buffer de unión. Las reacciones se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Para la competencia en el EMSA, se adicionaron 50, 100, 150 o 200 veces de exceso molar de sonda sin marca (fría) a la reacción de unión. Para el análisis de super retardamiento, 4  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-ER $\alpha$  se preincubó por 30 minutos con el extracto nuclear. Las reacciones de unión se detuvieron con la adición de buffer de cargado. El complejo se separó en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 4% (peso/volumen) y se visualizó por autoradiografía del gel seco.

### **5.3.3 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).**

Se utilizaron glándulas mamarias congeladas de ratas control vírgenes y gestantes durante los días 5, 14 y 20. Se llevó a cabo la reacción de cross-linking con 1% de formaldehído por 10 min a temperatura ambiente la cual se detuvo agregando 125 mM de glicina por 5 minutos. El tejido fue lavado dos veces en buffer salino de fosfatos (PBS) frío y centrifugado por 5 min a 500 *g*. Para la inmunoprecipitación de cromatina, los anticuerpos anti-ER $\alpha$  o anti- GAPDH fueron incubados a 4°C toda la noche. El análisis por PCR fue realizado utilizando oligonucleótidos específicos (ANEXOS Tabla 1) que flanquean el sitio putativo de unión para el ERE en el promotor de SNAT2, usando el siguiente programa: 95°C por 5 min; 30 ciclos a 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, y 72°C por 2 min; y una extensión final a 72°C por 10 min. Como control negativo, se utilizó el anticuerpo anti-IgG para cada muestra. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5%. Para el PCR en tiempo real, se utilizó 2  $\mu\text{l}$  de cada muestra purificada con 1 pmol de los primers que flanquean el sitio y 5  $\mu\text{l}$  de SYBR Green Master

Mix provisto por Roche. El esquema de PCR usado fue 48°C por 30 min, 95°C por 10 min, y después 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. La amplificación y detección de productos específicos se realizó con un termociclador Light Cycler 480 (Roche). Las cantidades relativas de unión de ER $\alpha$  y GAPDH fueron calculadas usando el método comparativo de CT usando el input de cada muestra para normalizar.

### **5.3.4 Precipitación del complejo e Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS<sup>E</sup>).**

#### 5.3.4.1 Precipitación del complejo ERE-ER- $\alpha$ con oligonucleótidos de las secuencias ERE de SNAT2 y ERE consenso.

Los oligonucleótidos unidos a la molécula desthiobiotin-TEG (2  $\mu$ g) (ANEXOS Tabla 1) se incubaron con extractos nucleares (500  $\mu$ g) de células HeLa previamente transfectados con ER $\alpha$ , poli (dIdC) (2  $\mu$ g), y  $1 \times 10^{-8}$  M de 17 $\beta$ -estradiol a 4°C toda la noche en un equipo rotatorio. Los volúmenes se ajustaron a 400  $\mu$ l con buffer de unión (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l poly(dIdC), 20% glicerol). Cada muestra se incubó con 20  $\mu$ l de perlas magnéticas de estreptavidina por 2 h a 4°C y se lavó 3 veces con el mismo buffer de unión por 10 min en un equipo rotatorio. Después de los lavados, el complejo proteína-oligonucleótido precipitado se eluyó de las perlas magnéticas con biotina 5 mM por 1 h a 25°C. Posterior a la elución, las muestras se corrieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (10%) para su análisis por western blot o su preparación para la identificación mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS<sup>E</sup>). Los ensayos de precipitación utilizando los sitios ERE de SNAT2 mutados se realizaron como se describió previamente y se analizaron mediante western blot.

#### 5.3.4.2 Separación de las muestras y digestión con tripsina.

Las muestras precipitadas se llevaron a una concentración final de 6 M GuHCl y se mezclaron para disociar cualquier proteína de los oligonucleótidos de DNA. Posteriormente, las muestras se desalaron con filtros 10 kD MWCO (Amicon Ultracel) y se lavaron exhaustivamente con bicarbonato de amonio 50 mM para evitar que el GuHCl pudiera intervenir con el sistema LC/MS<sup>E</sup>. Las proteínas retenidas en los filtros de 10 kD MWCO se mezclaron con el reactivo RapiGest al 0.1% de bicarbonato de amonio 50 mM.

Las muestras se procesaron mediante digestión de tripsina después de su reducción, y alquilación de los residuos de cisteína realizado con ditioneitol (DTT) 5 mM por 30 min a 60°C, y seguido de un tratamiento con ácido 3-indolacético 15 mM por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. La tripsina (100 ng) se adicionó y las muestras se sometieron a digestión a 37°C por 4 horas. Se agregó una segunda cantidad de tripsina (100 ng), y la digestión continuó por 15 h adicionales a 37 °C. Las muestras se centrifugaron a 15,000 g por 10 min, y el sobrenadante se colocó en tubos de microcentrifuga de baja unión a proteínas.

### **5.3.5 Análisis por western blot.**

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham GE Healthcare) usando un buffer Tris/Glicina/SDA (TBS). Después de la transferencia, las membranas se lavaron dos veces en agua desionizada y se bloquearon con leche descremada al 5% con TBS 1X y 0.1% Tween 20 por 1 h. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-Topoisomerasa II $\beta$  (sc-365071), anti-Topoisomerasa I (sc-32736), anti-PARP1 (sc-8007), anti-Ku80 (C48E7 2180), anti-Ku70 (D10A7 4588), anti-ER $\alpha$  (sc-8002), anti-GAPDH (sc-365062), anti-RNA polimerasa II (05-623) o anti- $\beta$ -tubulina (sc-9104), los cuales se diluyeron en TBS 1X y leche descremada al 1% y 0.1% de Tween 20. Posteriormente se lavaron con buffer TBS 1X y 0.1% de Tween 20. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-ratón IgG-HRP (sc-2005), anti-conejo IgG-HRP (sc-2004), o anti-cabra IgG-HRP (sc-2768) diluidos en TBS 1X, 1% de leche descremada y 0.1% de Tween 20. La quimioluminiscencia producida se determinó usando los reactivos de detección Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) y el sistema ChemiDoc MP Imaging (BioRad).

### **5.3.6 Inmunohistoquímica.**

Para los experimentos de inmunohistoquímica se utilizaron glándulas mamarias de rata del día 20 de gestación. Se realizaron cortes de tejido de 4 mm de grosor, se embebieron en parafina y se montaron en laminillas polarizadas. Las laminillas con los cortes de tejido



mamario se desparafinaron a 60°C por 30 min y se sumergieron por 3 min en xileno y diferentes porcentajes de etanol (100, 95 y 70%) y finalmente en agua destilada. Los cortes se bloquearon con solución de peroxidasa/metanol por 10 min y se lavaron con PBS 1X y 0.05% de Tween 20. Las laminillas se bloquearon por 30 min utilizando el reactivo Background Sniper Solution (Biocare Medical). El anticuerpo primario utilizado fue anti-GAPDH monoclonal de ratón diluido a una concentración 1:100 en el reactivo Background Sniper Solution. También se utilizó el mismo reactivo de bloqueo como control negativo. El anticuerpo primario se incubó toda la noche a 25°C. Después de la incubación, los cortes se lavaron con PBS 1X y 0.05% de Tween 20 y se incubaron por 30 min con el reactivo Mouse Immunodetector Biotin Link (Biocare Medical), seguidos por un lavado con PBS 1X y 0.05% de Tween 20 e incubados con el reactivo Mouse Immunodetector HRP Label (Biocare Medical). Después de lavar los cortes usando PBS 1X y 0.05% de Tween 20, la reacción se reveló con diaminobenzidina (DAKO) por aproximadamente 1 min. Las laminillas se lavaron con agua desionizada y se tiñeron con solución de hematoxilina. Las laminillas se analizaron usando el software de imagen Leica Qwin en un microscopio Leica DML.

### **5.3.7 Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos en este estudio son presentados como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Los datos se evaluaron mediante la prueba de t de Student y se consideraron significativos con una  $P < 0.05$ . Los datos se analizaron con el software Prism 5 para Mac OS X.

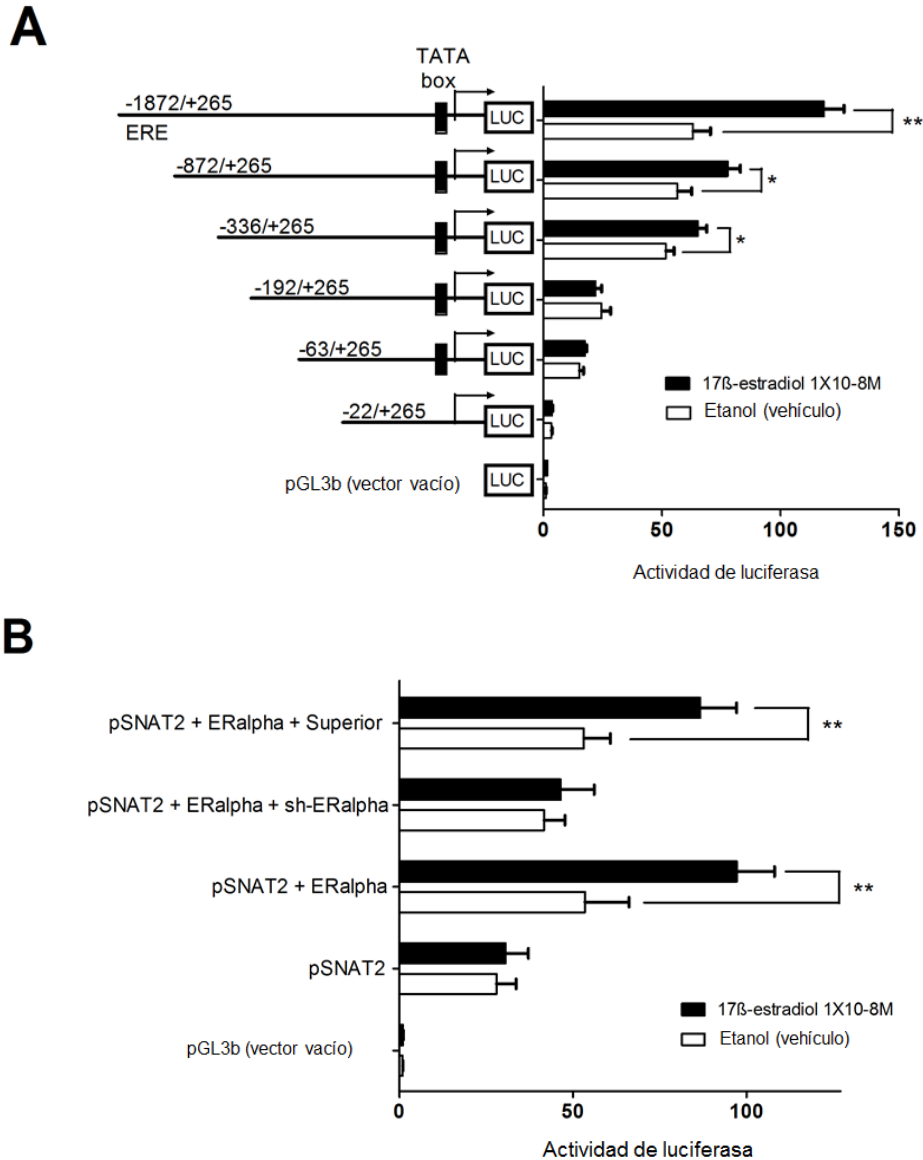
## **7. RESULTADOS**

### **7.1 La región promotora del gen de SNAT2 contiene un ERE que es activado por 17 $\beta$ -estradiol.**

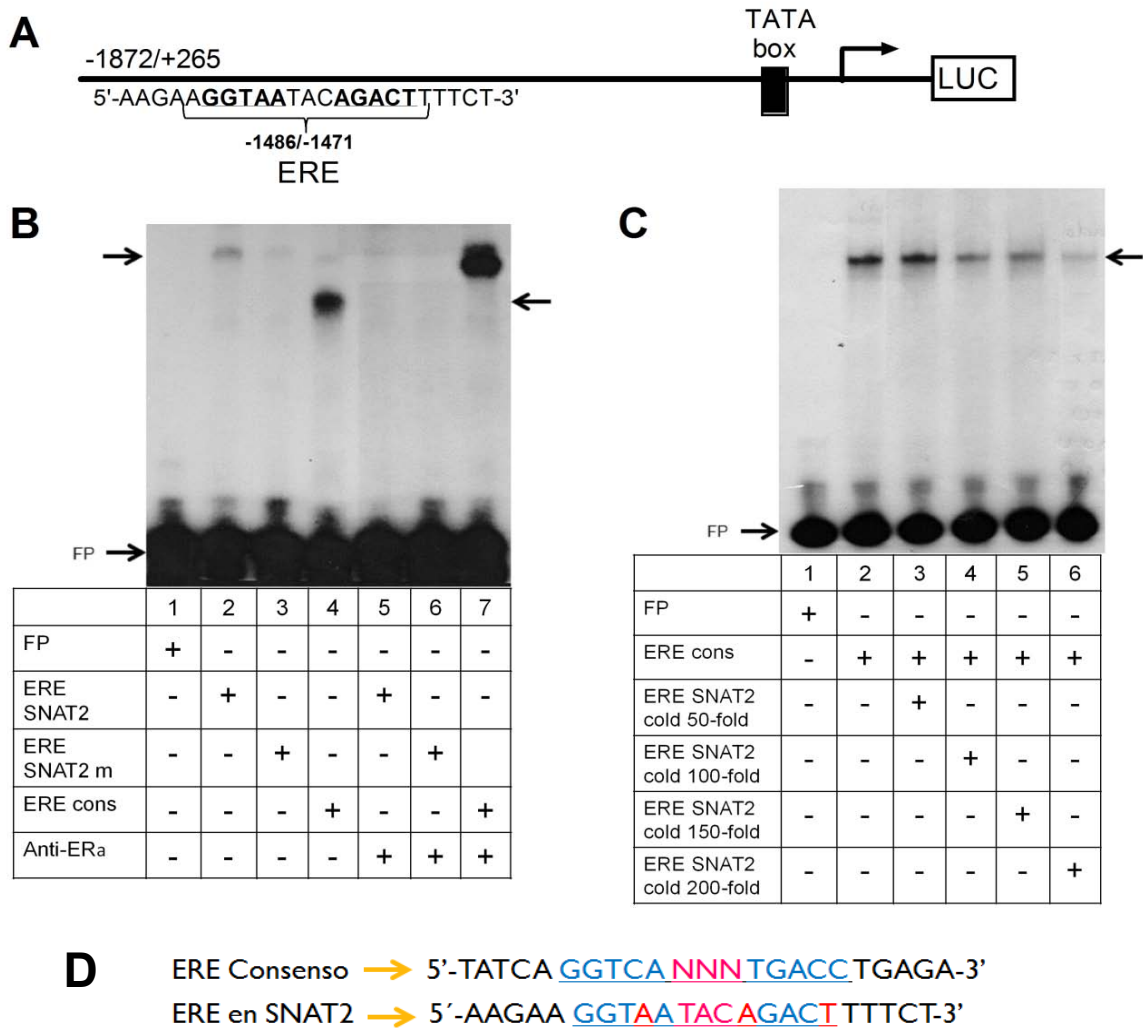
Para determinar si el ERE putativo encontrado en la región promotora del gen de SNAT2 era funcional, se realizaron ensayos utilizando construcciones de este promotor con el gen reportero de luciferasa. Se observó (Fig. 9A) que 1X10<sup>-8</sup> M de 17 $\beta$ -estradiol incrementan la actividad de luciferasa aproximadamente dos veces cuando están presentes los pares de bases de -1872 a +265 de la región promotora del gen de SNAT2. Para corroborar si la pérdida del ERE entre las bases -1486 y -1471 disminuía el efecto de la hormona, se utilizaron una serie de construcciones con deleciones unidireccionales 5' para la secuencia completa. La actividad de luciferasa inducida por el 17 $\beta$ -estradiol se redujo aproximadamente un 63% y 75% con las construcciones de -872 a +265 y -336 a +265 pares de bases, respectivamente. La deleción del promotor a -192 pares de bases resultó en la pérdida de la actividad inducida por 17 $\beta$ -estradiol.

### **7.2 La activación de la transcripción del gen de SNAT2 por 17 $\beta$ -estradiol es dependiente del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ).**

Para determinar si la activación de la transcripción del gen de SNAT2 mediada por 17 $\beta$ -estradiol es dependiente del receptor de estrógenos, se utilizó un plásmido que codifica para el RNA de interferencia del ER $\alpha$  (sh- ERalpha). Como se presenta en la Fig. 9B, el silenciamiento del ER $\alpha$  previene la activación de la transcripción por 17 $\beta$ -estradiol utilizando al promotor del gen de SNAT2 y el gen reportero de luciferasa. No se observó reducción en la actividad de luciferasa utilizando el promotor del gen de SNAT2 inducido por 17 $\beta$ -estradiol en las células control transfectadas con un plásmido vacío (Superior). Estos resultados corroboran la importancia de la regulación por ER $\alpha$  del promotor SNAT2 en respuesta al 17 $\beta$ -estradiol.



**Figura 9.** Análisis funcional del sitio ERE en el promotor del gen de SNAT2 de rata. A: Efecto de  $1 \times 10^{-8}$  M de  $17\beta$ -estradiol sobre la actividad transcripcional del gen de SNAT2 utilizando al promotor del gen de SNAT2 y el gen reportero de luciferasa. Se presenta la actividad de luciferasa de diversas construcciones del promotor del gen de SNAT2 en presencia y ausencia del ERE. B: Efecto del RNA de interferencia para  $ER\alpha$  (sh-ERalpha) sobre la actividad transcripcional del gen reportero de luciferasa con el promotor del gen de SNAT2. Se utilizó como vector vacío (Superior) un plásmido sin el RNA de interferencia. Los resultados son promedio  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por construcción. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; diferencia significativa comparada con su control respectivo.



**Figura 10.** Unión *in vitro* del receptor de estrógenos alpha (ER $\alpha$ ) al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el promotor de SNAT2. A: Localización de la secuencia ERE en el promotor de SNAT2 entre las bases -1486 y -1471 río arriba del sitio de inicio de transcripción. B: Análisis de retardo de la movilidad electroforética de extractos nucleares de células HeLa previamente transfectadas con ER $\alpha$  usando oligonucleótidos (ANEXOS Tabla 1) marcados conteniendo el sitio SNAT2 ERE wild type (carril 2), el SNAT2 ERE mutado (carril 3), o el ERE consenso (carril 4). El bloqueo de la unión para el sitio SNAT2 ERE (carril 5), sitio SNAT2 ERE mutado (carril 6) o ERE consenso (carril 7). C: Ensayos de competencia usando la secuencia de ERE consenso marcada y un exceso de SNAT2 ERE no marcado (SNAT2 ERE frío) a 50, 100, 150 y 200 veces de exceso molar mostrados en los carriles 3, 4, 5 y 6, respectivamente. D: Secuencias de los oligonucleótidos ERE consenso y ERE SNAT2 utilizados en los EMSA. FP: free probe o sonda libre.

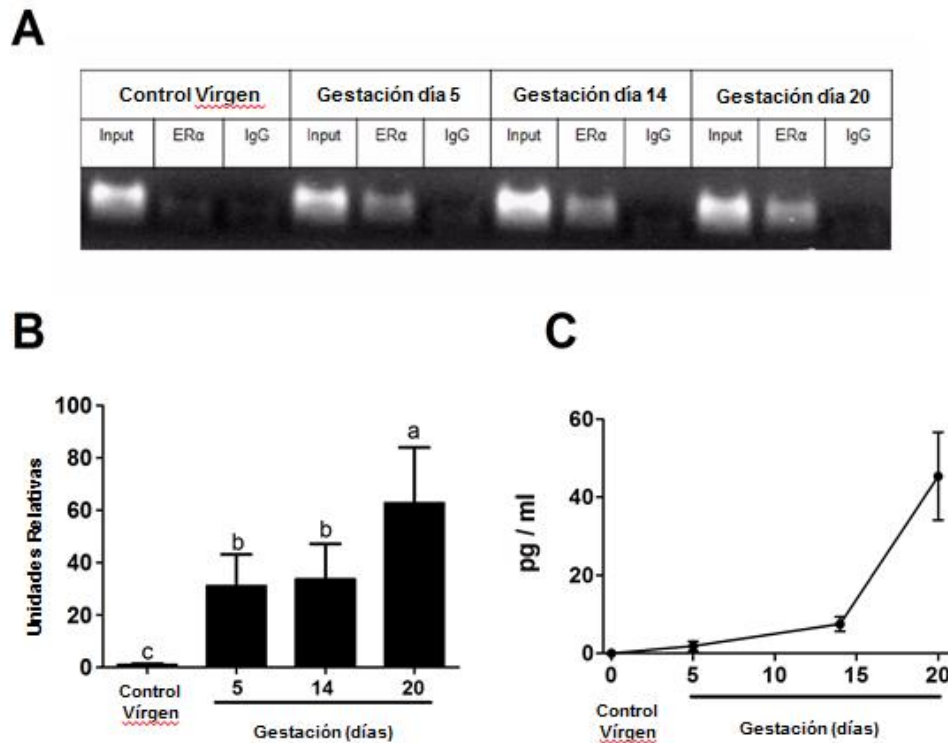
### **7.3 El receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) se une *in vitro* al Elemento de Respuesta a Estrógenos (ERE) en el promotor del gen de SNAT2.**

El siguiente paso fue corroborar si el ER $\alpha$  puede unirse al sitio ERE encontrado en la región promotora del gen de SNAT2 (Fig. 10A). Como se presenta en la Fig. 10B carril 2, el análisis mediante EMSA del sitio ERE en SNAT2 usando extractos de células HeLa transfectadas con ER $\alpha$  indicaron la unión al presentarse una banda de retardamiento. La mutación del sitio ERE del SNAT2 evitó la formación de este complejo (Fig. 10B, carril 4). Interesantemente, la banda de retardo del ERE consenso migró más en comparación con la banda de retardo del ERE de SNAT2, sugiriendo que diferentes cofactores se unen a cada uno de los complejos. Para demostrar si el ER $\alpha$  se une a la secuencia ERE de SNAT2, se utilizó el anticuerpo específico anti-ER $\alpha$ . En la Fig. 10B carril 5 se observa que la preincubación con el anticuerpo abolió la formación del complejo, posiblemente por un bloqueo en el sitio de unión a ADN del ER $\alpha$ . Por otra parte, se observó la formación de una banda de súper retardamiento (Fig. 10B carril 7) con la secuencia ERE consenso, indicando nuevamente que la unión del ER $\alpha$  y las proteínas involucradas en la formación del complejo difieren entre el ERE de SNAT2 y el ERE consenso. Adicionalmente, la secuencia del ERE de SNAT2 compitió con la secuencia del ERE consenso por la unión de ER $\alpha$  debido a que la adición de un exceso molar de 200 veces de la secuencia ERE de SNAT2 no marcada (fría) prácticamente impide la unión de la secuencia del ERE consenso (Fig. 10C).

### **7.4 El receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) se une *in vivo* al sitio ERE en el promotor del gen de SNAT2 de rata.**

La funcionalidad del sitio ERE de SNAT2 también se demostró *in vivo*. El incremento de los niveles de 17 $\beta$ -estradiol durante la gestación favorece la unión de ER $\alpha$  al sitio ERE de SNAT2 en la glándula mamaria de rata de acuerdo a lo evaluado por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en donde se demostró un producto de amplificación en los días 5, 14 y 20 de gestación (Fig. 11A, B). Se llevó a cabo PCR en tiempo real para cuantificar la unión de ER $\alpha$  al sitio ERE en el promotor del gen de SNAT2 de rata. Se encontró un incremento progresivo en la unión durante el período de

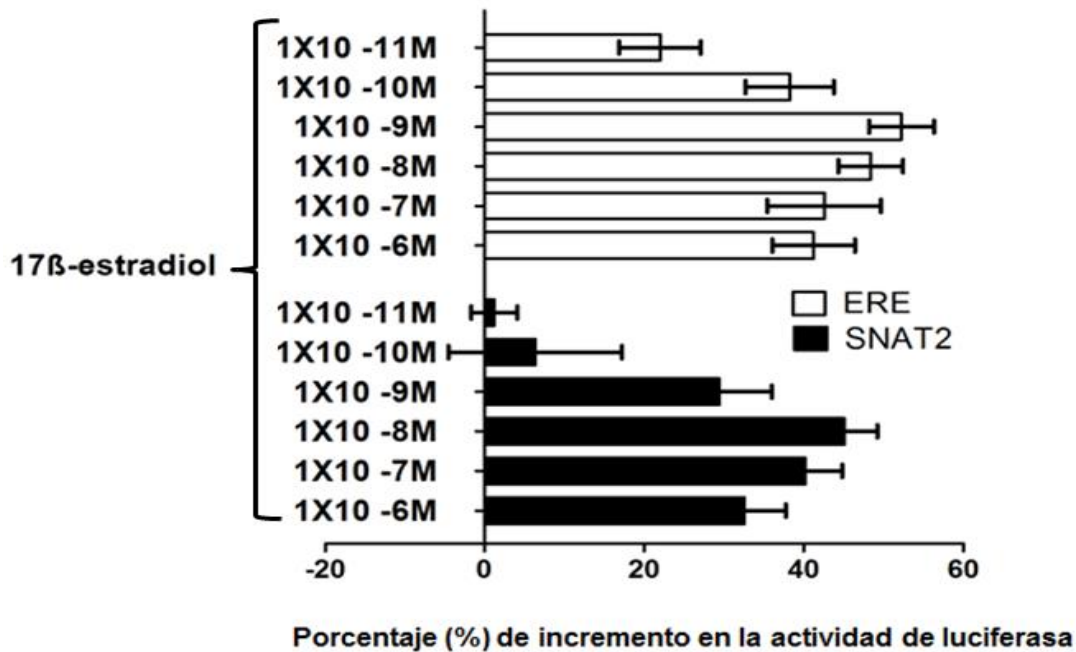
gestación, el cual corresponde al incremento en los niveles séricos de estradiol de las ratas (Fig. 11B y C, respectivamente).



**Figura 11.** El ER $\alpha$  se une *in vivo* al sitio ERE encontrado en el promotor del gen SNAT2 en glándula mamaria de rata. A: inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) evidenciando la unión del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en los días 5, 14 y 20 de gestación. Se utilizó como control positivo (Input) cromatina sin inmunoprecipitar y como control negativo anticuerpo anti IgG. B: Análisis de PCR en tiempo real amplificando los productos correspondientes al sitio de unión de ER $\alpha$  sobre ERE en la región promotora del gen de SNAT2. Los resultados fueron normalizados con las cromatinas sin inmunoprecipitar (Input). Esta figura es representativa de 3 experimentos independientes. n=5 ratas por grupo. C: Niveles séricos de 17 $\beta$ - estradiol en ratas control vírgenes y ratas gestantes en los días 5, 14 y 20 de gestación. n=5 ratas por grupo. Las letras diferentes indican diferencias significativas, a>b>c. P < 0.05.

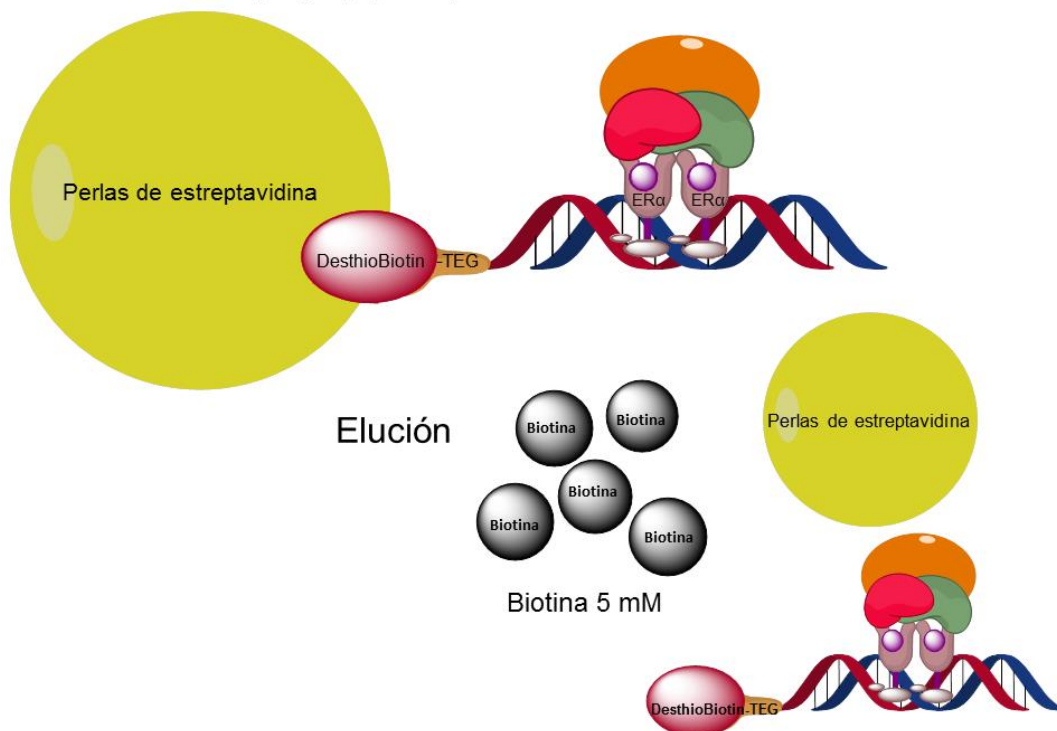
En este ensayo se utilizaron como controles ratas vírgenes en el período di-estro las cuales presentan muy bajas concentraciones de 17- $\beta$  estradiol circulante.

Interesantemente, no se observó unión del ER $\alpha$  al promotor del gen de SNAT2 en este grupo experimental por lo que se necesita de una alta concentración de hormona para activar la transcripción del gen de SNAT2, y por lo tanto este gen es regulado por estradiol exclusivamente durante el periodo de gestación y posiblemente durante la fase de proestro de la rata hembra en donde las concentraciones séricas de 17- $\beta$  estradiol incrementan considerablemente. Adicionalmente, el uso de diferentes concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-11}$  M) demostraron que el promotor de SNAT2 requiere una mayor concentración de hormona para inducir la transcripción comparada con la secuencia del ERE consenso (Fig. 12). Mientras que las concentraciones  $10^{-11}$  y  $10^{-10}$  M de 17 $\beta$ -estradiol activaron fuertemente la construcción de ERE consenso, el ERE de SNAT2 requirió mayores concentraciones de hormona para activarse al mismo nivel.



**Figura 12.** Efecto de diferentes concentraciones de 17 $\beta$ - estradiol ( $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M, and  $1 \times 10^{-11}$  M) sobre la actividad de luciferasa utilizando un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) consenso y el ERE encontrado en el promotor del gen de SNAT2. Se presentan los resultados como el porcentaje del incremento en la actividad de luciferasa con diferentes concentraciones de 17 $\beta$ - estradiol comparado con el vehículo (etanol). Los resultados son el promedio  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por construcción y están expresados como porcentaje (%) de actividad de luciferasa comparado con el vehículo (etanol).

## Unión del complejo y precipitación



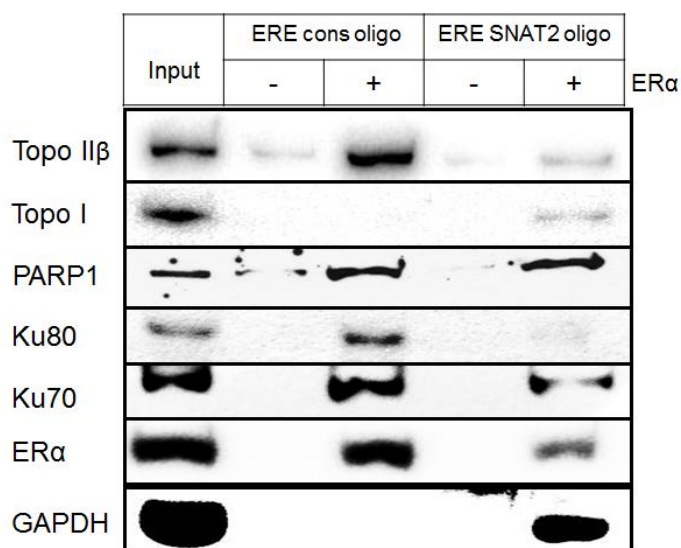
**Figura 13.** Purificación del complejo ER $\alpha$ -ERE. Los complejos ER $\alpha$ -ERE consenso y ER $\alpha$ -ERE SNAT2 se precipitaron usando oligonucleóticos marcados con desthiobiotina-TEG y se incubaron con extractos nucleares de células HeLa previamente transfectadas con ER $\alpha$ , poli dIdC y  $1 \times 10^{-8}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. Cada muestra se incubó con perlas magnéticas de estreptavidina por 2 h a 4°C. El complejo oligonucleótido-proteína precipitado se eluyó con biotina 5 mM por 1 h a 25 °C. El eluido se utilizó para análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas o se corrió por electroforesis en un gel SDS-PAGE para análisis por western blot.

### 7.5 PARP1, Ku70 y GAPDH se unen a la secuencia ERE del promotor del gen de SNAT2 en conjunto con el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ).

Se utilizó una técnica basada en un oligonucleótido unido a la molécula desthiobiotina-trietilenglicol (TEG) y perlas magnéticas de estreptavidina para precipitar el complejo ERE- ER $\alpha$  e identificar las otras proteínas unidas a la región promotora del gen de SNAT2 en donde el 17 $\beta$ -estradiol activa su transcripción. Para este ensayo, oligonucleótidos de

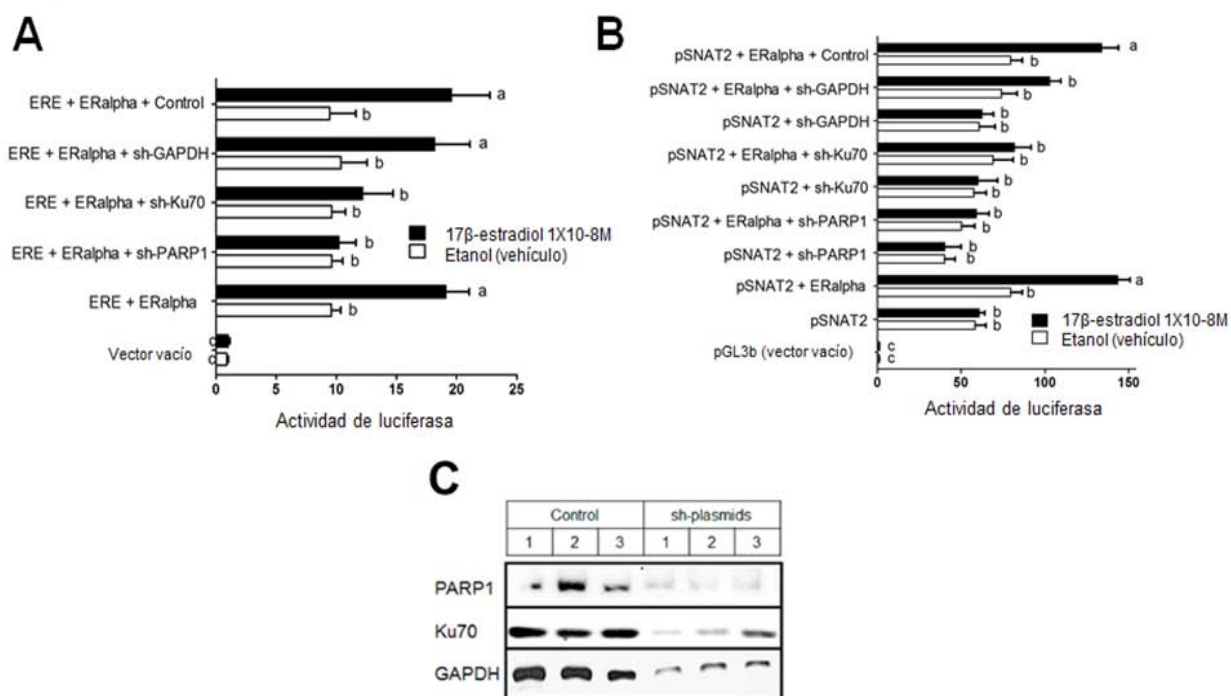


ADN de cadena doble con los sitios ERE de SNAT2 (oligo ERE SNAT2) y la secuencia del ERE consenso (Oligo ERE cons) (ANEXOS Tabla1) se incubaron con extractos nucleares de células HeLa transfectadas con ER $\alpha$ . Se usaron extractos nucleares de células HeLa sin transfectar como control negativo para cada oligonucleótido. El complejo ER $\alpha$ -ERE se precipitó con perlas magnéticas de estreptavidina y se eluyó con biotina a una concentración 5 mM (Fig. 13). El análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS<sup>E</sup>) (ANEXOS Tabla 2) y western blot (Fig. 14), reveló la presencia de las proteínas PARP1, Ku80, Ku70 y topoisomerasa II $\beta$  (Topo II $\beta$ ) en conjunto con el ER $\alpha$  en el sitio ERE consenso; y PARP1, Ku70 y GAPDH, así como topoisomerasa I (Topo I) y II $\beta$  en presencia del ER $\alpha$  sobre el sitio ERE SNAT2.



**Figura 14.** Unión de las proteínas topoisomerasa II beta (Topo II $\beta$ ), polimerasa de poli ADP ribosilación 1 (PARP1), proteína Ku 80 (Ku80), proteína Ku70 (Ku70), receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) al elemento de respuesta a estrógenos ERE consenso y ERE SNAT2. Se utilizó como control positivo (Input) extracto nuclear de células Hela transfectado con ER $\alpha$  sin precipitar y se utilizó como control negativo extractos nucleares de células HeLa sin transfección con ER $\alpha$  para cada oligonucleótido. Los extractos nucleares se incubaron en presencia de los oligonucleótidos con las secuencias ERE consenso y ERE SNAT2 y 17 $\beta$ -estradiol  $1 \times 10^{-8}$  M de toda la noche a 4°C. La precipitación se realizó con perlas magnéticas de estreptavidida por 2 h a 4°C. Los oligonucleótidos unidos a proteínas se eluyeron con una solución de biotina 5mM por 1h a 25°C. El eluido se analizó por western blot utilizando anticuerpos específicos para cada proteína.

A pesar de que la proteína PARP1 se unió en igual magnitud a las dos secuencias ERE, la intensidad de algunas de las bandas unidas al sitio ERE SNAT2 fue menor en comparación con el sitio ERE consenso, particularmente Ku70 y Topo II $\beta$ , posiblemente debido a que ER $\alpha$  tiene menor afinidad por el ERE SNAT2 que por el ERE consenso. Interesantemente las proteínas Topo I y GAPDH se unen exclusivamente al sitio ERE encontrado en el promotor del gen de SNAT2. La unión de estas proteínas fue dependiente de la unión del ER $\alpha$  debido a que no precipitaron en ausencia de ER $\alpha$  (Fig. 14).



**Figura 15.** Efecto del silenciamiento del RNAm de las proteínas polimerasa de poli ADP ribosilación 1 (PARP1), proteína Ku70 (Ku70) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) sobre la actividad transcripcional utilizando al gen reportero deluciferasa y los promotores A: ERE consenso y B: SNAT2 después de la estimulación por 24 h con 17 $\beta$ -estradiol 1 X 10<sup>-8</sup> M o etanol (vehículo). Las células fueron co-transfectadas con ER $\alpha$  (ERalpha) y los RNAs de interferencia para las proteínas PARP1 (sh-PARP1), Ku70 (sh-Ku70) y GAPDH (sh-GAPDH), o un vector vacío como control (Control). C: Inmunoblot representativo de la eficiencia del silenciamiento de las proteínas PARP1, Ku70 y GAPDH en células después de ser transfectadas con los plásmido con los RNAs de interferencia

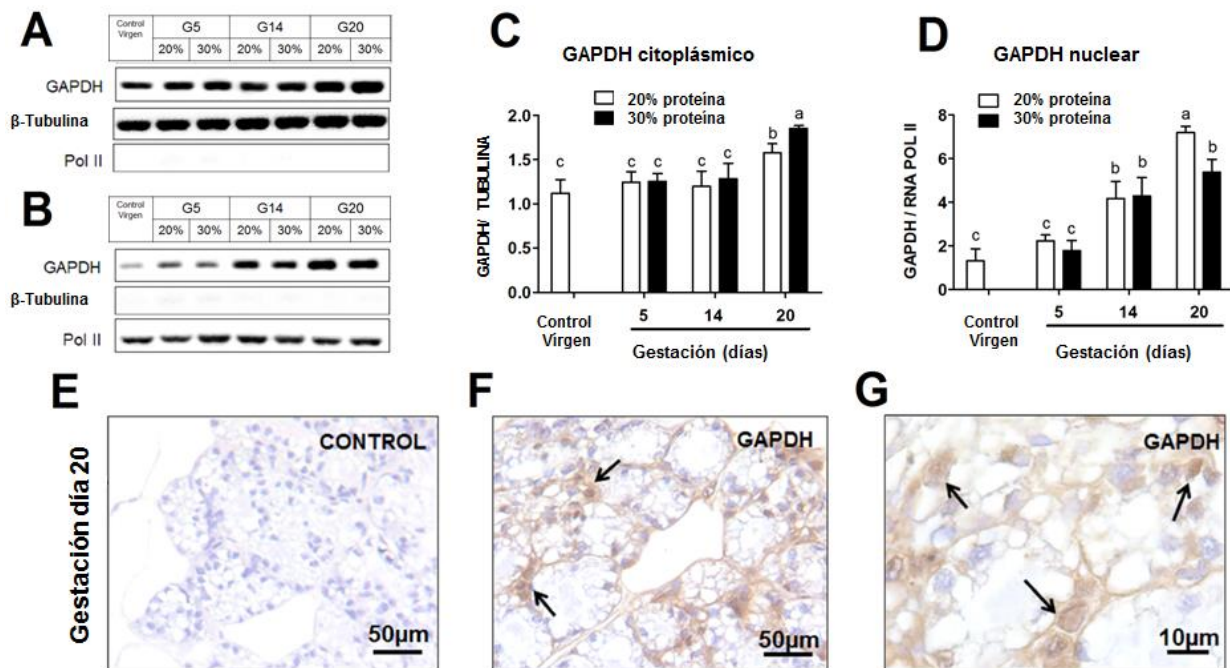
(sh-plásmidos). Los resultados son promedio  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por construcción. Las letras diferentes indican diferencias significativas,  $a>b>c$ .  $P < 0.05$ .

También se observó que la actividad de luciferasa con la secuencia del ERE consenso en células co-transfectadas con ER $\alpha$  y estimuladas con 17 $\beta$ -estradiol disminuyó significativamente cuando se co-transfecta con los plásmidos que codifican para el RNA de interferencia de PARP1 y Ku70 (Fig. 15A). Interesantemente, la actividad de luciferasa utilizando la región promotora que contiene el ERE en el gen de SNAT2 y el vector de expresión de ER $\alpha$  demostraron una disminución significativa en respuesta a la estimulación con 17 $\beta$ -estradiol cuando se interfirió la traducción de los RNA mensajeros de GAPDH, PARP1 y Ku70 (Fig. 15B).

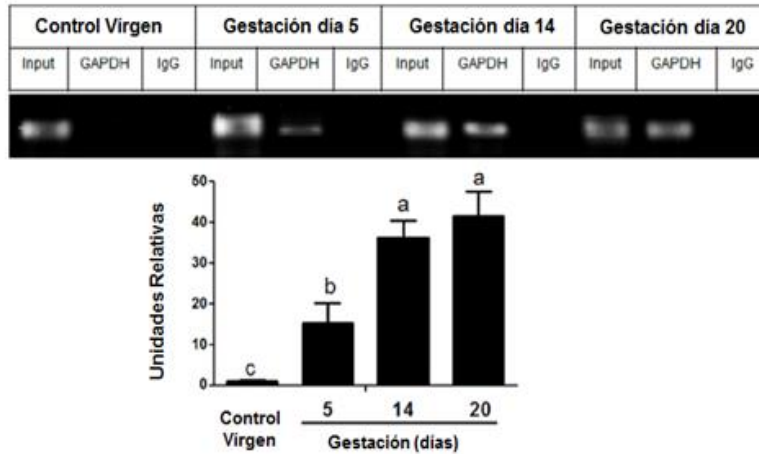
#### **7.6 La GAPDH se acumula en el núcleo, se une *in vivo* al promotor del gen de SNAT2 del epitelio mamario durante la gestación y es específico para la activación de la transcripción del gen de SNAT2.**

La GAPDH es una enzima metabólica involucrada en los procesos de glucólisis, gluconeogénesis y gliceroneogénesis. Interesantemente, la mayoría de los aminoácidos transportados por el SNAT2 son considerados substratos gluconeogénicos. El consumo de una dieta alta en proteína (30%), que contiene un exceso de aminoácidos gluconeogénicos, incrementó significativamente la expresión citoplásmica de GAPDH en glándula mamaria de rata en el día 20 de gestación comparado con el consumo de una dieta adecuada en proteína (20%) (Fig. 16A, C). Adicionalmente, se observó un incremento progresivo en la abundancia de la GAPDH nuclear durante la gestación en tejido mamario de rata, alcanzando un pico máximo en el día 20 de gestación como se muestra por análisis de western blot e inmunohistoquímica (Fig. 16B, D, E – G).

Por otra parte, el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostró que GAPDH se une *in vivo* al ERE encontrado en el promotor del gen de SNAT2 en glándula mamaria de rata durante la gestación, principalmente en los días 14 y 20, mientras que en los controles vírgenes no se observó unión al sitio ERE del promotor del gen de SNAT2 (Fig. 17). Toda esta evidencia demuestra que GAPDH se transloca al núcleo de las células del tejido mamario durante la gestación para mantener activa la expresión del gen de SNAT2.



**Figura 16.** Expresión de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en glándula mamaria de rata. Inmunoblot representativo de A: GAPDH,  $\beta$ -tubulina y RNA polimerasa II (Pol II) en extractos citoplásmicos y B: GAPDH,  $\beta$ -tubulina y RNA polimerasa II (Pol II) en extractos nucleares de glándulas mamarias de ratas alimentadas con 20% o 30% de proteína en la dieta. Se utilizaron ratas vírgenes en periodo di-estro como control y ratas gestantes en los días 5, 14 y 20. Análisis de densitometría del western blot de C: GAPDH/Tubulina citoplásmica y D: GAPDH/RNA polimerasa II nuclear de glándula mamaria de ratas alimentadas con 20% o 30% de proteína en la dieta. Los resultados son el promedio  $\pm$  SD de 3 diferentes blots. Inmunohistoquímica de GAPDH en glándula mamaria de rata durante el día 20 de gestación. E: Control Negativo, F and G: GAPDH. Las flechas indican la presencia de GAPDH en el núcleo de células del epitelio mamario. Barras de escala de E y F 50  $\mu$ m, G 10  $\mu$ m. Esta figura es representativa de 3 experimentos independientes. n=5 ratas por grupo. Las letras diferentes indican diferencias significativas, a>b>c. P < 0.05.



**Figura 17.** La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se une al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el promotor del gen de SNAT2 en los días 5, 14 y 20 de gestación demostrado por ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Se utilizó como control positivo (Input) cromatina sin inmunoprecipitar y como control negativo anticuerpo anti IgG. El análisis de PCR en tiempo real se presenta gráficamente amplificando los productos correspondientes al sitio de unión de GAPDH sobre el ERE en la región promotora del gen de SNAT2. Los resultados fueron normalizados con las cromatinas sin inmunoprecipitar (Input). Esta figura es representativa de 3 experimentos independientes. n=5 ratas por grupo. Las letras diferentes indican deferencias significativas,  $a>b>c$ .  $P < 0.05$ .

Para determinar la especificidad de la unión de GAPDH al ERE de SNAT2, se realizaron ensayos de precipitación utilizando oligonucleótidos (ANEXOS Tabla 1) con el sitio ERE de SNAT2 mutado así como mutaciones en las regiones 5' y 3' flanqueantes. Los resultados claramente demuestran que la unión de GAPDH al ERE de SNAT2 es exclusivamente dependiente de la secuencia palindrómica 5'-AGGTAATACAGACTT-3'; ya que no se presentó unión a la secuencia mutada 5'-AGGTCATACAGACTT-3'. De igual manera, GAPDH se une a la región 5' que flanquea la secuencia palindrómica 5'-**AAGA** AGGTAA TAC AGACTT TTCT-3' debido a que no se observó unión en la secuencia mutada 5'- **TATC** AGGTA TAC AGACTT TTCT-3' (Fig. 18)



**Figura 18.** La unión de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) ubicado en el promotor del gen de SNAT2 es dependiente de la secuencia palindrómica 5'-AGGTAATACAGACTT-3' y la región flanqueante 5'. Inmunoblot representativo de la precipitación de GAPDH en el sitio ERE SNAT2 y en sitios ERE SNAT2 mutados usando oligos biotinilados incubados con extractos nucleares de células HeLa transfectadas con ER $\alpha$  y precipitados con perlas de estreptavidina para su posterior análisis por western blot utilizando el anticuerpo específico anti-GAPDH. Esta figura es representativa de 3 experimentos independientes.

## 8. DISCUSIÓN

Durante la gestación y lactancia, ocurren una serie de mecanismos complejos que tienen como función proveer alimento al recién nacido. Para activar estos mecanismos, la glándula mamaria lleva a cabo la activación de genes específicos para preparar al tejido para cubrir las demandas energéticas del recién nacido. Dentro de los genes que son activados durante este período en la glándula mamaria se encuentran genes de proliferación y diferenciación del epitelio mamario para adquirir la morfología necesaria durante la lactancia (91-96).

Para activar los mecanismos de expresión génica que regulan este proceso en la glándula mamaria durante la gestación, el entorno hormonal se encarga de controlar la transcripción de diversos genes blanco (95). En particular se ha demostrado que el 17 $\beta$ -

estradiol es un activador muy potente de genes involucrados en la diferenciación celular y proliferación (97-100) del tejido mamario. Los efectos del 17 $\beta$ -estradiol en la glándula mamaria son llevados a cabo a través de los receptores de estrógenos alfa y beta (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), ambos expresados de manera natural en la glándula mamaria (49, 101). Un estudio previo de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-seq) del ER $\alpha$  en líneas celulares de glándula mamaria MCF-7 y ZR75-1 demostraron 44,942 eventos de unión del receptor encontrados en numerosos genes blanco, la mayoría de ellos involucrados en crecimiento y supervivencia celular así como en la proliferación de tumores mamarios (102). El gen *SLC38A2* correspondiente al transportador de aminoácidos SNAT2 no aparece en ningún estudio de ChIP-seq reportado hasta el momento por lo que la unión de ER $\alpha$  al promotor de este gen no había sido reportada anteriormente y resulta una novedad en este trabajo. De hecho el ERE encontrado en el análisis *in silico* en el promotor del gen del SNAT2 presentó un score de asociación con un sitio ERE consenso de 0.72, valor que es inferior al obtenido por otros elementos de respuesta como AP1 y SP1 también asociados a la respuesta por estrógenos y presentes en el promotor de este gen.

Existen pocos datos que demuestran que el 17 $\beta$ -estradiol está involucrado en los mecanismos asociados con el suministro de nutrimentos hacia la glándula mamaria, y menos se conoce acerca de los posibles mecanismos moleculares. Los aminoácidos son nutrimentos esenciales para la síntesis de proteínas, y requieren la presencia transportadores específicos para ser incorporados a las células. La actividad de algunos de estos transportadores es estimulada por estrógenos en la glándula mamaria (103-105).

En este estudio se demuestra que el 17 $\beta$ -estradiol activa la expresión del transportador de aminoácidos SNAT2 a través del ERE presente en la región promotora de este gen y que requiere la formación de un complejo específico que contiene a las proteínas PARP1, Ku70 y GAPDH.

Los resultados obtenidos concuerdan con hallazgos previos en donde el complejo topoisomerasa II $\beta$ /PARP-1 media una ruptura transitoria en el ADN que es requerida para que el 17 $\beta$ -estradiol estimule la activación génica. La proteína PARP1 utiliza a la histona H1 (caracterizada por ser un represor transcripcional) como sustrato para la poli ADP-ribosilación. La Histona H1 es remplazada por una proteína del grupo de alta movilidad B

1/2 (HMGB1/2) el cual actúa como un activador de la transcripción después de la estimulación con  $17\beta$ -estradiol. En este proceso, las proteínas topoisomerasa II $\beta$ , PARP-1, Ku80 y Ku70 son reclutadas los sitios ERE en el nucleosoma después del tratamiento con dicha hormona (106). En otro estudio reciente se demostró que PARP1 interactúa con el ER $\alpha$ , promoviendo la poli ADP-ribosilación y transactivación del receptor, indicando que PARP1 es un regulador crucial de la transcripción génica dependiente del receptor de estrógenos (13).

De manera novedosa, en este estudio se demuestra que la proteína GAPDH forma parte del complejo ERE-ER $\alpha$  en el promotor del gen de SNAT2. Adicionalmente, se observó que su unión es dependiente de nucleótidos específicos presentes en la secuencia palindrómica y la región flanqueante del sitio ERE encontrado en la región promotora del gen de SNAT2. Esta secuencia difiere de la secuencia ERE consenso por tres nucleótidos y es única entre otros EREs presentes en diferentes genes, entre los que se encuentran diversos genes metabólicos los cuales también poseen palíndromos imperfectos con, al menos, un cambio de pares de bases (107). Las diferencias entre las secuencias ERE y su localización en los promotores modulan la actividad transcripcional del receptor de estrógenos reclutando diferentes proteínas coactivadoras (108). También, se ha demostrado que EREs ubicados en regiones distales del inicio de la transcripción, reclutan complejos con las proteínas histona acetil transferasa y/o SWI/SNF, mientras que solo las secuencias del promotor proximal pueden ser capaces de reclutar coactivadores mediadores (109). Interesantemente, en nuestro estudio se observó que el cambio de un solo nucleótido (“A” por “C”) en la secuencia palindrómica 5’ y la región que flanquea este mismo extremo 5’ evita el reclutamiento de GAPDH al complejo. Como consecuencia, la activación transcripcional del gen de SNAT2 en la glándula mamaria, necesaria para cubrir con la elevada demanda de aminoácidos durante la gestación, se presenta únicamente en esta condición fisiológica en donde las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol se encuentran elevadas para contrarrestar la baja afinidad del receptor de estrógenos hacia el ERE de SNAT2 el cual une específicamente a la enzima metabólica GAPDH como coactivador.

Así como es específica la secuencia de nucleótidos necesaria para la unión de la GAPDH al promotor del gen de SNAT2, es probable que la unión de esta proteína al ER $\alpha$  requiera la participación de dominios específicos de ambas proteínas. A pesar de que en este



estudio no se determinó el sitio de unión entre el ER $\alpha$  y la GAPDH, del ensayo de ChIP llevado a cabo en este estudio en donde se demuestra la unión de GAPDH al promotor del gen de SNAT2, se puede predecir que no esté involucrada la región amino terminal debido a que el anticuerpo utilizado en este ensayo reconoce específicamente esta región de la GAPDH y no hubiera podido ser inmunoprecipitada. Sin embargo esta interacción debe ser analizada en un futuro utilizando un sistema de doble híbrido acoplado a un gen reportero de luciferasa en donde se requiera la unión de cierto dominio de la GAPDH al ER $\alpha$  para llevar a cabo la activación de la transcripción medida a través del gen reportero.

Se ha descrito recientemente a la GAPDH como un cofactor de diversos complejos transcripcionales (110, 111). Zheng Lei y colaboradores (112) demostraron que p38/GAPDH es un coactivador esencial que se une al sitio Oct-1 para activar la transcripción de la histona-2B (H2B). Algunos otros estudios han descrito de igual manera la participación de GAPDH en diferentes complejos transcripcionales y se sabe que la participación de esta proteína en el núcleo es en su forma monomérica, a diferencia de su participación como enzima metabólica en el proceso de glucólisis en el cual necesita estar en forma tetramérica (113-115). A pesar de los hallazgos reportados de la participación de GAPDH en complejos transcripcionales, ninguno de los estudios previos involucra el reclutamiento de esta proteína a un complejo ERE-ER $\alpha$ , lo que posiblemente indica que existe un crosstalk con eventos metabólicos como se sugiere en este estudio en el cual se observó un incremento en la abundancia de GAPDH nuclear, particularmente entre los días 15-20 de gestación, así como en las concentraciones citoplásmicas de esta proteína con el consumo de una dieta alta en proteína.

Los patrones de expresión de otros transportadores de aminoácidos durante la gestación son diferentes a los del SNAT2 (116). Esto implica que el efecto regulador de los estrógenos sobre la expresión del gen de SNAT2 es una característica única en el transporte de aminoácidos hacia la glándula mamaria durante este periodo. Se ha postulado que la inhibición del Sistema A por una infusión sistémica del MeAIB, durante la gestación resulta en una menor ganancia de peso del feto (117). Esto sugiere que el SNAT2 juega un papel significativo en el suministro de aminoácidos, una función importante en el epitelio mamario para la diferenciación y proliferación de estas células para su preparación para el periodo de lactancia.

## 9. CONCLUSIONES

El presente trabajo proporciona nuevos conocimientos sobre cómo el tejido mamario se adapta para controlar la captación de aminoácidos a través de la regulación de la transcripción del transportador SNAT2 mediada por 17 $\beta$ -estradiol durante el periodo de gestación. Éste mecanismo se activa por un incremento en las concentraciones de la hormona la cual se une al ER $\alpha$  y favorece su activación.

En este periodo fisiológico, la GAPDH migra al núcleo de las células del epitelio mamario y actúa como un coactivador específico de éste gen para mantener activa la transcripción del transportador de aminoácidos SNAT2.

El complejo ERE-ER $\alpha$  también está formado por las proteínas PARP1 y Ku70 involucradas posiblemente en el reconocimiento del ERE en el nucleosoma en donde se encuentra el gen de SNAT2.

La unión de GAPDH al ERE encontrado en la región promotora del gen de SNAT2 es nucleótido específica, ya que cambios en la secuencia ERE y la región flanqueante 5' evitan la unión de este coactivador.

El estudio de la regulación transcripcional de este transportador de aminoácidos involucrado en los procesos de proliferación celular de la glándula mamaria durante el periodo de gestación, permiten conocer la mecánica de adaptación de este tejido ante el incremento en la demanda de sustratos, en este caso de aminoácidos. Así, la capacidad de la glándula mamaria para sintetizar activamente proteínas es dependiente del suministro de aminoácidos regulado por los transportadores de aminoácidos entre los que se encuentra el SNAT2.

La activación de la transcripción del gen de SNAT2 mediada por el 17  $\beta$ -estradiol durante la gestación es posiblemente una de las principales adaptaciones metabólicas que ocurren en el tejido mamario para prepararlo para la lactancia, un proceso esencial cuyo objetivo es cubrir las necesidades nutricias del recién nacido.

## 10. PERSPECTIVAS

Del presente trabajo pueden desencadenar nuevos objetivos que enriquezcan el entendimiento del mecanismo encontrado mediante el cual el 17  $\beta$ -estradiol activa la transcripción del gen de SNAT2. Como parte de estos nuevos planteamientos se encuentran los siguientes:

- Determinar la funcionalidad de las mutantes del ERE encontrado en el promotor del gen de SNAT2 que permiten y evitan la unión de la GAPDH mediante ensayos utilizando al gen reporte de luciferasa.
- Corroborar la interacción de la GAPDH con el ER $\alpha$  determinando el dominio de unión específico, y su funcionalidad en la activación de la transcripción mediante un sistema de doble híbrido.
- Determinar la participación de otros sitios potenciales activados por 17  $\beta$ -estradiol diferentes a ERE, encontrados en el promotor del gen de SNAT2 responsables de la actividad transcripcional restante a la conferida por el ERE.

Dentro de los hallazgos más importantes encontrados en este trabajo se encuentra la participación de la GAPDH en el complejo transcripcional del gen de SNAT2, resulta interesante conocer si esta enzima también participa en la transcripción de otros genes metabólicos activados en la glándula mamaria durante el periodo de gestación en donde se incrementa la concentración nuclear de esta proteína.

Finalmente considero relevante continuar con la caracterización de elementos potenciales de regulación del gen de SNAT2 encontrados en el análisis *in silico* de su región promotora ya que se ha demostrado que este transportador de aminoácidos posee una importancia fisiológica dependiente de tejido y estado fisiológico.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Avila-Chavez E, Torres-y-Torres N, Tovar-Palacio A. [Transport of zwitterionic amino acids in mammalian cells]. *Rev Invest Clin.* 1997 Jul-Aug;49(4):323-38.
2. Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J.* 2003 Jul 1;373(Pt 1):1-18.
3. Kilberg MS, Stevens BR, Novak DA. Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu Rev Nutr.* 1993;13:137-65.
4. Trottier NL. Nutritional control of amino acid supply to the mammary gland during lactation in the pig. *Proc Nutr Soc.* 1997 Jul;56(2):581-91.
5. Shennan DB, Millar ID, Calvert DT. Mammary-tissue amino acid transport systems. *Proc Nutr Soc.* 1997 Mar;56(1A):177-91.
6. Adams RH, Sato K, Shimada S, Tohyama M, Puschel AW, Betz H. Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *J Neurosci.* 1995 Mar;15(3 Pt 2):2524-32.
7. Linzell JL, Peaker M. Mechanism of milk secretion. *Physiol Rev.* 1971 Jul;51(3):564-97.
8. Oxender DL, Christensen HN. Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell. *J Biol Chem.* 1963 Nov;238:3686-99.
9. Tovar AR, Avila E, DeSantiago S, Torres N. Characterization of methylaminoisobutyric acid transport by system A in rat mammary gland. *Metabolism.* 2000 Jul;49(7):873-9.
10. Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):784-95.
11. Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, et al. Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jul 31;1467(1):1-6.
12. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol.* 2004 May 14;338(5):1027-36.
13. Zhang F, Wang Y, Wang L, Luo X, Huang K, Wang C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is a key regulator of estrogen receptor alpha-dependent gene transcription. *J Biol Chem.* Apr 19;288(16):11348-57.

14. Zhang Z, Albers T, Fiumera HL, Gameiro A, Grewer C. A conserved Na(+) binding site of the sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). *J Biol Chem*. 2009 Sep 11;284(37):25314-23.
15. Zhang Z, Gameiro A, Grewer C. Highly conserved asparagine 82 controls the interaction of Na<sup>+</sup> with the sodium-coupled neutral amino acid transporter SNAT2. *J Biol Chem*. 2008 May 2;283(18):12284-92.
16. Zhang Z, Zander CB, Grewer C. The C-terminal domain of the neutral amino acid transporter SNAT2 regulates transport activity through voltage-dependent processes. *Biochem J*. Mar 1;434(2):287-96.
17. Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem*. 2000 Feb 11;275(6):4049-54.
18. Wang H, Huang W, Sugawara M, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, et al. Cloning and functional expression of ATA1, a subtype of amino acid transporter A, from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 14;273(3):1175-9.
19. Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Palii SS, Leach KM, Kilberg MS. The mechanism for transcriptional activation of the human ATA2 transporter gene by amino acid deprivation is different than that for asparagine synthetase. *J Nutr*. 2002 Oct;132(10):3023-9.
20. Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA, et al. A novel system A isoform mediating Na<sup>+</sup>/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):22790-7.
21. Gazzola RF, Sala R, Bussolati O, Visigalli R, Dall'Asta V, Ganapathy V, et al. The adaptive regulation of amino acid transport system A is associated to changes in ATA2 expression. *FEBS Lett*. 2001 Feb 9;490(1-2):11-4.
22. Hyde R, Christie GR, Litherland GJ, Hajduch E, Taylor PM, Hundal HS. Subcellular localization and adaptive up-regulation of the System A (SAT2) amino acid transporter in skeletal-muscle cells and adipocytes. *Biochem J*. 2001 May 1;355(Pt 3):563-8.
23. Lopez A, Torres N, Ortiz V, Aleman G, Hernandez-Pando R, Tovar AR. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Nov;291(5):E1059-66.
24. Hatanaka T, Huang W, Ling R, Prasad PD, Sugawara M, Leibach FH, et al. Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and

liver-specific subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Feb 9;1510(1-2):10-7.

25. Busque SM, Wagner CA. Potassium restriction, high protein intake, and metabolic acidosis increase expression of the glutamine transporter SNAT3 (Slc38a3) in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Aug;297(2):F440-50.

26. Novak D, Lehman M, Bernstein H, Beveridge M, Cramer S. SNAT expression in rat placenta. *Placenta*. 2006 Apr-May;27(4-5):510-6.

27. Desforges M, Mynett KJ, Jones RL, Greenwood SL, Westwood M, Sibley CP, et al. The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. *J Physiol*. 2009 Jan 15;587(Pt 1):61-72.

28. Lopez-Fontanals M, Rodriguez-Mulero S, Casado FJ, Derijard B, Pastor-Anglada M. The osmoregulatory and the amino acid-regulated responses of system A are mediated by different signal transduction pathways. *J Gen Physiol*. 2003 Jul;122(1):5-16.

29. Palii SS, Chen H, Kilberg MS. Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3463-71.

30. Palii SS, Thiaville MM, Pan YX, Zhong C, Kilberg MS. Characterization of the amino acid response element within the human sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem J*. 2006 May 1;395(3):517-27.

31. Franchi-Gazzola R, Dall'Asta V, Sala R, Visigalli R, Bevilacqua E, Gaccioli F, et al. The role of the neutral amino acid transporter SNAT2 in cell volume regulation. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006 May-Jun;187(1-2):273-83.

32. Hatanaka T, Huang W, Martindale RG, Ganapathy V. Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. *FEBS Lett*. 2001 Sep 14;505(2):317-20.

33. Ortiz V, Aleman G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F, Torres N, Tovar AR. Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jun;300(6):E1092-102.

34. Hatanaka T, Hatanaka Y, Tsuchida J, Ganapathy V, Setou M. Amino acid transporter ATA2 is stored at the trans-Golgi network and released by insulin stimulus in adipocytes. *J Biol Chem*. 2006 Dec 22;281(51):39273-84.

35. Hyde R, Peyrollier K, Hundal HS. Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2002 Apr 19;277(16):13628-34.

36. Jones HN, Ashworth CJ, Page KR, McArdle HJ. Cortisol stimulates system A amino acid transport and SNAT2 expression in a human placental cell line (BeWo). *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Sep;291(3):E596-603.
37. Vina J, Puertes IR, Saez GT, Vina JR. Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. *FEBS Lett.* 1981 Apr 20;126(2):250-2.
38. Bhat HK, Vadgama JV. Role of estrogen receptor in the regulation of estrogen induced amino acid transport of System A in breast cancer and other receptor positive tumor cells. *Int J Mol Med.* 2002 Mar;9(3):271-9.
39. Feng Y, Manka D, Wagner KU, Khan SA. Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 11;104(37):14718-23.
40. Charitidi K, Meltser I, Tahera Y, Canlon B. Functional responses of estrogen receptors in the male and female auditory system. *Hear Res.* 2009 Jun;252(1-2):71-8.
41. Baquedano MS, Saraco N, Berensztein E, Pepe C, Bianchini M, Levy E, et al. Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun;92(6):2215-22.
42. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* 2001 Sep;2(9):775-81.
43. Jensen EV, DeSombre ER. Estrogen-receptor interaction. *Science.* 1973 Oct 12;182(4108):126-34.
44. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986 Mar 7;231(4742):1150-4.
45. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):753-8.
46. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5925-30.
47. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996 Aug 19;392(1):49-53.
48. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001 Oct;81(4):1535-65.

49. Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16;101(11):3739-46.
50. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:165-90.
51. Adam-Stitah S, Penna L, Chambon P, Rochette-Egly C. Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):18932-41.
52. Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly JM, Chambon P, Rochette-Egly C. TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):21896-904.
53. Gianni M, Bauer A, Garattini E, Chambon P, Rochette-Egly C. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J*. 2002 Jul 15;21(14):3760-9.
54. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):905-31.
55. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov;3(11):859-68.
56. Newman JR, Keating AE. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science*. 2003 Jun 27;300(5628):2097-101.
57. van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2453-64.
58. Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Penolazzi L, Gambari R, Piva R. ERalpha and AP-1 interact in vivo with a specific sequence of the F promoter of the human ERalpha gene in osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2008 Jul;216(1):101-10.
59. Qi X, Borowicz S, Pramanik R, Schultz RM, Han J, Chen G. Estrogen receptor inhibits c-Jun-dependent stress-induced cell death by binding and modifying c-Jun activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):6769-77.
60. Teyssier C, Belguise K, Galtier F, Chalbos D. Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36361-9.



61. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):321-44.
62. Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):35848-56.
63. White JH, Fernandes I, Mader S, Yang XJ. Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm.* 2004;68:123-43.
64. Chiba H, Muramatsu M, Nomoto A, Kato H. Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* 1994 May 25;22(10):1815-20.
65. Fryer CJ, Archer TK. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature.* 1998 May 7;393(6680):88-91.
66. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell.* 2003 Dec 12;115(6):751-63.
67. Underhill C, Qutob MS, Yee SP, Torchia J. A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22;275(51):40463-70.
68. Dilworth FJ, Chambon P. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene.* 2001 May 28;20(24):3047-54.
69. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
70. Travers A. An engine for nucleosome remodeling. *Cell.* 1999 Feb 5;96(3):311-4.
71. Cosma MP. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):227-36.
72. Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Mar;13(2):55-60.
73. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:315-60.
74. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):36869-72.

75. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2001 May-Jun;12(4):152-6.
76. Levin ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol (1985).* 2001 Oct;91(4):1860-7.
77. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* 2002 May;67(6):471-5.
78. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2701-12.
79. Simoncini T, Rabkin E, Liao JK. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb 1;23(2):198-203.
80. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997 Nov 1;45(3):607-17.
81. Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Nov 12;228(2):285-92.
82. Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Nov 26;240(3):737-41.
83. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 2000 Oct;14(10):1649-60.
84. Bologna CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006 Apr;2(4):207-12.
85. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb;265-266:138-42.
86. Ruan SQ, Wang ZH, Wang SW, Fu ZX, Xu KL, Li DB, et al. Heregulin-beta1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 6;420(2):385-90.

87. Petrie WK, Dennis MK, Hu C, Dai D, Arterburn JB, Smith HO, et al. G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth. *Obstet Gynecol Int.*2013;472720.
88. Tsai CL, Wu HM, Lin CY, Lin YJ, Chao A, Wang TH, et al. Estradiol and tamoxifen induce cell migration through GPR30 and activation of focal adhesion kinase (FAK) in endometrial cancers with low or without nuclear estrogen receptor alpha (ERalpha). *PLoS One.*8(9):e72999.
89. Dong WH, Chen JC, He YL, Xu JJ, Mei YA. Resveratrol inhibits K(v)2.2 currents through the estrogen receptor GPR30-mediated PKC pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* Sep;305(5):C547-57.
90. Velazquez-Villegas LA, Tovar AR, Lopez-Barradas AM, Torres N. The dietary protein/carbohydrate ratio differentially modifies lipogenesis and protein synthesis in the mammary gland, liver and adipose tissue during gestation and lactation. *PLoS One.*8(7):e69338.
91. Baratta M, Grolli S, Poletti A, Ramoni R, Motta M, Tamanini C. Role of androgens in proliferation and differentiation of mouse mammary epithelial cell line HC11. *J Endocrinol.* 2000 Oct;167(1):53-60.
92. Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Dec;2(12):a003178.
93. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2007 Dec;50(4):938-48.
94. Lemay DG, Neville MC, Rudolph MC, Pollard KS, German JB. Gene regulatory networks in lactation: identification of global principles using bioinformatics. *BMC Syst Biol.* 2007;1:56.
95. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002 Jan;7(1):49-66.
96. Roh SG, Baik MG, Choi YJ. The effect of lactogenic hormones on protein synthesis and amino acid uptake in rat mammary acinar cell culture at various physiological stages. *Int J Biochem.* 1994 Apr;26(4):479-85.
97. Deroo BJ, Hewitt SC, Collins JB, Grissom SF, Hamilton KJ, Korach KS. Profile of estrogen-responsive genes in an estrogen-specific mammary gland outgrowth model. *Mol Reprod Dev.* 2009 Aug;76(8):733-50.

98. Ding L, Zhao Y, Warren CL, Sullivan R, Eliceiri KW, Shull JD. Association of cellular and molecular responses in the rat mammary gland to 17beta-estradiol with susceptibility to mammary cancer. *BMC Cancer*.13:573.
99. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 2006;7(8):497-508.
100. Shang ZZ, Li X, Sun HQ, Xiao GN, Wang CW, Gong Q. Differentially expressed genes and signalling pathways are involved in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to 17-beta estradiol. *Int J Oral Sci*. Feb 21:0.
101. Stingl J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm Cancer*. Apr;2(2):85-90.
102. Mohammed H, D'Santos C, Serandour AA, Ali HR, Brown GD, Atkins A, et al. Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep*. Feb 21;3(2):342-9.
103. Cimarosti H, Jones NM, O'Shea RD, Pow DV, Salbego C, Beart PM. Hypoxic preconditioning in neonatal rat brain involves regulation of excitatory amino acid transporter 2 and estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*. 2005 Sep 2;385(1):52-7.
104. Hissin PJ, Hilf R. Effects of estrogen to alter amino acid transport in R3230AC mammary carcinomas and its relationship to insulin action. *Cancer Res*. 1979 Sep;39(9):3381-7.
105. Riggs TR, Pan MW, Feng HW. Transport of amino acids into the estrogen-primed uterus. I. General characteristics of the uptake in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1968 Jan 3;150(1):92-103.
106. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, et al. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*. 2006 Jun 23;312(5781):1798-802.
107. Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, et al. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol*. 2004 Jun;18(6):1411-27.
108. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol*. 2004 Oct;33(2):387-410.
109. Topalidou I, Thireos G. Gcn4 occupancy of open reading frame regions results in the recruitment of chromatin-modifying complexes but not the mediator complex. *EMBO Rep*. 2003 Sep;4(9):872-6.

110. Colell A, Green DR, Ricci JE. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ*. 2009 Dec;16(12):1573-81.
111. Sirover MA. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem*. 2005 May 1;95(1):45-52.
112. Zheng L, Roeder RG, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):255-66.
113. Claeysens S, Gangneux C, Brasse-Lagnel C, Ruminy P, Aki T, Lavoinne A, et al. Amino acid control of the human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene transcription in hepatocyte. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Nov;285(5):G840-9.
114. Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y, Yamaji R, Fujimoto K, Moss J, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2007 Aug 3;282(31):22651-61.
115. Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, deRiel JK, Sirover MA. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 1;88(19):8460-4.
116. Aleman G, Lopez A, Ordaz G, Torres N, Tovar AR. Changes in messenger RNA abundance of amino acid transporters in rat mammary gland during pregnancy, lactation, and weaning. *Metabolism*. 2009 May;58(5):594-601.
117. Cramer S, Beveridge M, Kilberg M, Novak D. Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jan;282(1):C153-60.

## ANEXOS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')
<i>Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de EMSA</i>	
SNAT2 ERE forward	AAGAAGGTAATACAGACTTTTCT
SNAT2 ERE reverse	AGAAAAGTCTGTATTACCTTCTT
SNAT2 ERE m forward	AAGAAGATAATACAACTTTTCT
SNAT2 ERE m reverse	AGAAAAGTITGTATTACTTCTT
ERE consensus forward	TATCAGGTCAGAGTGACCTGAGA
ERE consensus reverse	TCTCAGGTCACTCTGACCTGATA
<i>Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de ChIP</i>	
ChIP oligo 1 forward	GATTTTATCAGTTGAAACCC
ChIP oligo 1 reverse	TACAGTCCTCAGATTGTTCAA
<i>Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de precipitación del complejo ER<math>\alpha</math>-ERE</i>	
DesthioBio-SNAT2 ERE forward	DesthioBio-AAGAAGGTAATACAGACTTTTCT
SNAT2 ERE reverse	AGAAAAGTCTGTATTACCTTCTT
DesthioBio-ERE consensus forward	DesthioBio-TATCAGGTCAGAGTGACCTGAGA
ERE consensus reverse	TCTCAGGTCACTCTGACCTGATA
<i>Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de mutagénesis del ERE de SNAT2</i>	
Bio-SNAT2 ERE Mut 1 forward	Bio-AAGAAGGTCATACAGACTTTTCT
SNAT2 ERE Mut 1 reverse	AGAAAAGTCTGTATGACCTTCTT
Bio-SNAT2 ERE Mut 2 forward	Bio-AAGAAGGTAATACTGACTTTTCT
SNAT2 ERE Mut 2 reverse	AGAAAAGTCAGTATTACCTTCTT
Bio-SNAT2 ERE Mut 3 forward	Bio-AAGAAGGTAATACAGACCTTTCT
SNAT2 ERE Mut 3 reverse	AGAAAGGTCTGTATTACCTTCTT
Bio-Flanking region Mut 1 forward	Bio-TATCAGGTAATACAGACTTTTCT
Flanking region Mut 1 reverse	AGAAAAGTCTGTATTACCTGATA
Bio-Flanking region Mut 2 forward	Bio-AAGAAGGTAATACAGACTTGAGA
Flanking region Mut 2 reverse	TCTCAAGTCTGTATTACCTTCTT

Tabla 2. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MSE) en las secuencias ERE consenso y ERE SNAT2.

Oligo	Extracto nuclear	Acceso	Descripción	Peso molecular (Da)	pI (pH)	Cobertura (%)
ERE cons	ER $\alpha$	P62081	40S ribosomal protein S7 OS Homo sapiens GN RPS7 PE 1 SV 1	22113	10.58	11.86
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P62081	40S ribosomal protein S7 OS Homo sapiens GN RPS7 PE 1 SV 1	22113	10.58	17.01
ERE cons		P62081	40S ribosomal protein S7 OS Homo sapiens GN RPS7 PE 1 SV 1	22113	10.58	29.38
ERE SNAT2		P62081	40S ribosomal protein S7 OS Homo sapiens GN RPS7 PE 1 SV 1	22113	10.58	25.26
ERE cons	ER $\alpha$	P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS Homo sapiens GN RPLP1 PE 1 SV 1	11506	4.00	66.67
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS Homo sapiens GN RPLP1 PE 1 SV 1	11506	4.00	51.75
ERE cons		P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS Homo sapiens GN RPLP1 PE 1 SV 1	11506	4.00	67.54
ERE SNAT2		P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS Homo sapiens GN RPLP1 PE 1 SV 1	11506	4.00	66.67
ERE cons	ER $\alpha$	P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS Homo sapiens GN SUB1 PE 1 SV 3	14386	10.07	40.94
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS Homo sapiens GN SUB1 PE 1 SV 3	14386	10.07	18.90
ERE cons		P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS Homo sapiens GN SUB1 PE 1 SV 3	14386	10.07	14.96
ERE SNAT2		P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS Homo sapiens GN SUB1 PE 1 SV 3	14386	10.07	25.20
ERE cons	ER $\alpha$	P29372	DNA 3 methyladenine glycosylase OS Homo sapiens GN MPG PE 1 SV 3	32847	9.85	41.61
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P29372	DNA 3 methyladenine glycosylase OS Homo sapiens GN MPG PE 1 SV 3	32847	9.85	21.14
ERE cons		P29372	DNA 3 methyladenine glycosylase OS Homo sapiens GN MPG PE 1 SV 3	32847	9.85	44.63
ERE SNAT2		P29372	DNA 3 methyladenine glycosylase OS Homo sapiens GN MPG PE 1 SV 3	32847	9.85	22.48
ERE cons	ER $\alpha$	P18887	DNA repair protein XRCC1 OS Homo sapiens GN XRCC1 PE 1 SV 2	69434	5.97	15.64
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P18887	DNA repair protein XRCC1 OS Homo sapiens GN XRCC1 PE 1 SV 2	69434	5.97	13.59
ERE cons		P18887	DNA repair protein XRCC1 OS Homo sapiens GN XRCC1 PE 1 SV 2	69434	5.97	17.54
ERE SNAT2		P18887	DNA repair protein XRCC1 OS Homo sapiens GN XRCC1 PE 1 SV 2	69434	5.97	9.00
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P11387	DNA topoisomerase 1 OS Homo sapiens GN TOP1 PE 1 SV 2	90668	9.71	37.52
ERE cons	ER $\alpha$	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS Homo sapiens GN HNRNPD PE 1 SV 1	38410	7.90	12.11
ERE SNAT2	ER $\alpha$	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS Homo sapiens GN HNRNPD PE 1 SV 1	38410	7.90	23.94
ERE cons		Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS Homo sapiens GN HNRNPD PE 1 SV 1	38410	7.90	15.77
ERE SNAT2		Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS Homo sapiens GN HNRNPD PE 1 SV 1	38410	7.90	14.65
ERE cons	ER $\alpha$	Q8WWI1	LIM domain only protein 7 OS Homo sapiens GN LMO7 PE 1 SV 3	192575	8.03	21.15
ERE SNAT2	ER $\alpha$	Q8WWI1	LIM domain only protein 7 OS Homo sapiens GN LMO7 PE 1 SV 3	192575	8.03	17.83
ERE cons		Q8WWI1	LIM domain only protein 7 OS Homo sapiens GN LMO7 PE 1 SV 3	192575	8.03	18.89
ERE SNAT2		Q8WWI1	LIM domain only protein 7 OS Homo sapiens GN LMO7 PE 1 SV 3	192575	8.03	19.31
ERE cons	ER $\alpha$	P06748	Nucleophosmin OS Homo sapiens GN NPM1 PE 1 SV 2	32554	4.44	21.77
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P06748	Nucleophosmin OS Homo sapiens GN NPM1 PE 1 SV 2	32554	4.44	43.20

ERE cons		P06748	Nucleophosmin OS Homo sapiens GN NPM1 PE 1 SV 2	32554	4.44	53.74
ERE SNAT2		P06748	Nucleophosmin OS Homo sapiens GN NPM1 PE 1 SV 2	32554	4.44	49.66
<b>ERE cons</b>	<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>P09874</b>	<b>Poly ADP ribose polymerase 1 OS Homo sapiens GN PARP1 PE 1 SV 4</b>	<b>113012</b>	<b>9.16</b>	<b>65.78</b>
<b>ERE SNAT2</b>	<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>P09874</b>	<b>Poly ADP ribose polymerase 1 OS Homo sapiens GN PARP1 PE 1 SV 4</b>	<b>113012</b>	<b>9.16</b>	<b>51.87</b>
ERE cons		P09874	Poly ADP ribose polymerase 1 OS Homo sapiens GN PARP1 PE 1 SV 4	113012	9.16	48.22
ERE SNAT2		P09874	Poly ADP ribose polymerase 1 OS Homo sapiens GN PARP1 PE 1 SV 4	113012	9.16	51.18
ERE cons	ER $\alpha$	P35251	Replication factor C subunit 1 OS Homo sapiens GN RFC1 PE 1 SV 4	128174	9.75	19.34
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P35251	Replication factor C subunit 1 OS Homo sapiens GN RFC1 PE 1 SV 4	128174	9.75	20.56
ERE cons		P35251	Replication factor C subunit 1 OS Homo sapiens GN RFC1 PE 1 SV 4	128174	9.75	21.86
ERE SNAT2		P35251	Replication factor C subunit 1 OS Homo sapiens GN RFC1 PE 1 SV 4	128174	9.75	19.25
ERE cons	ER $\alpha$	P40938	Replication factor C subunit 3 OS Homo sapiens GN RFC3 PE 1 SV 2	40529	8.28	19.10
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P40938	Replication factor C subunit 3 OS Homo sapiens GN RFC3 PE 1 SV 2	40529	8.28	13.20
ERE cons		P40938	Replication factor C subunit 3 OS Homo sapiens GN RFC3 PE 1 SV 2	40529	8.28	37.08
ERE SNAT2		P40938	Replication factor C subunit 3 OS Homo sapiens GN RFC3 PE 1 SV 2	40529	8.28	16.57
ERE cons	ER $\alpha$	P35249	Replication factor C subunit 4 OS Homo sapiens GN RFC4 PE 1 SV 2	39656	8.00	25.62
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P35249	Replication factor C subunit 4 OS Homo sapiens GN RFC4 PE 1 SV 2	39656	8.00	14.60
ERE cons		P35249	Replication factor C subunit 4 OS Homo sapiens GN RFC4 PE 1 SV 2	39656	8.00	34.99
ERE SNAT2		P35249	Replication factor C subunit 4 OS Homo sapiens GN RFC4 PE 1 SV 2	39656	8.00	32.23
<b>ERE cons</b>	<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>P12956</b>	<b>X ray repair cross complementing protein 6 OS Homo sapiens GN XRCC6 PE 1 SV 2</b>	<b>69799</b>	<b>6.20</b>	<b>43.35</b>
<b>ERE SNAT2</b>	<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>P12956</b>	<b>X ray repair cross complementing protein 6 OS Homo sapiens GN XRCC6 PE 1 SV 2</b>	<b>69799</b>	<b>6.20</b>	<b>17.41</b>
ERE cons	ER $\alpha$	Q7Z2E3	Aprataxin OS Homo sapiens GN APTX PE 1 SV 2	40714	9.51	10.39
ERE cons		Q7Z2E3	Aprataxin OS Homo sapiens GN APTX PE 1 SV 2	40714	9.51	19.94
ERE SNAT2		Q7Z2E3	Aprataxin OS Homo sapiens GN APTX PE 1 SV 2	40714	9.51	22.47
ERE cons	ER $\alpha$	Q96T60	Bifunctional polynucleotide phosphatase kinase OS Homo sapiens GN PNKP PE 1 SV 1	57040	8.51	10.17
ERE cons		Q96T60	Bifunctional polynucleotide phosphatase kinase OS Homo sapiens GN PNKP PE 1 SV 1	57040	8.51	26.68
ERE SNAT2		Q96T60	Bifunctional polynucleotide phosphatase kinase OS Homo sapiens GN PNKP PE 1 SV 1	57040	8.51	13.63
ERE cons	ER $\alpha$	P49916	DNA ligase 3 OS Homo sapiens GN LIG3 PE 1 SV 2	112834	9.25	28.05
ERE cons		P49916	DNA ligase 3 OS Homo sapiens GN LIG3 PE 1 SV 2	112834	9.25	26.76
ERE SNAT2		P49916	DNA ligase 3 OS Homo sapiens GN LIG3 PE 1 SV 2	112834	9.25	21.01
ERE cons	ER $\alpha$	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS Homo sapiens GN HNRNPA1 PE 1 SV 5	38723	9.37	33.33
ERE cons		P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS Homo sapiens GN HNRNPA1 PE 1 SV 5	38723	9.37	21.24
ERE SNAT2		P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS Homo sapiens GN HNRNPA1 PE 1 SV 5	38723	9.37	33.33
ERE cons	ER $\alpha$	P10412	Histone H1 4 OS Homo sapiens GN HIST1H1E PE 1 SV 2	21852	11.5 2	32.88
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P10412	Histone H1 4 OS Homo sapiens GN HIST1H1E PE 1 SV 2	21852	11.5 2	15.53



ERE cons		P10412	Histone H1 4 OS Homo sapiens GN HIST1H1E PE 1 SV 2	21852	11.5 2	24.66
ERE cons	ER $\alpha$	Q06830	Peroxisredoxin 1 OS Homo sapiens GN PRDX1 PE 1 SV 1	22096	8.24	19.60
ERE cons		Q06830	Peroxisredoxin 1 OS Homo sapiens GN PRDX1 PE 1 SV 1	22096	8.24	27.14
ERE SNAT2		Q06830	Peroxisredoxin 1 OS Homo sapiens GN PRDX1 PE 1 SV 1	22096	8.24	29.15
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P35250	Replication factor C subunit 2 OS Homo sapiens GN RFC2 PE 1 SV 3	39132	6.01	29.10
ERE cons		P35250	Replication factor C subunit 2 OS Homo sapiens GN RFC2 PE 1 SV 3	39132	6.01	27.97
ERE SNAT2		P35250	Replication factor C subunit 2 OS Homo sapiens GN RFC2 PE 1 SV 3	39132	6.01	37.01
ERE cons	ER $\alpha$	P13010	X ray repair cross complementing protein 5 OS Homo sapiens GN XRCC5 PE 1 SV 3	82652	5.44	28.96
ERE cons		P62277	40S ribosomal protein S13 OS Homo sapiens GN RPS13 PE 1 SV 2	17211	10.9 4	13.91
ERE SNAT2		P62277	40S ribosomal protein S13 OS Homo sapiens GN RPS13 PE 1 SV 2	17211	10.9 4	13.91
ERE cons		P62263	40S ribosomal protein S14 OS Homo sapiens GN RPS14 PE 1 SV 3	16262	10.5 3	28.48
ERE SNAT2		P62263	40S ribosomal protein S14 OS Homo sapiens GN RPS14 PE 1 SV 3	16262	10.5 3	31.79
ERE cons		P62269	40S ribosomal protein S18 OS Homo sapiens GN RPS18 PE 1 SV 3	17707	11.4 1	34.21
ERE SNAT2		P62269	40S ribosomal protein S18 OS Homo sapiens GN RPS18 PE 1 SV 3	17707	11.4 1	27.63
ERE cons		P15880	40S ribosomal protein S2 OS Homo sapiens GN RPS2 PE 1 SV 2	31304	10.6 5	21.50
ERE SNAT2		P15880	40S ribosomal protein S2 OS Homo sapiens GN RPS2 PE 1 SV 2	31304	10.6 5	10.58
ERE cons		P62847	40S ribosomal protein S24 OS Homo sapiens GN RPS24 PE 1 SV 1	15413	11.2 3	25.56
ERE SNAT2		P62847	40S ribosomal protein S24 OS Homo sapiens GN RPS24 PE 1 SV 1	15413	11.2 3	28.57
ERE cons		P61247	40S ribosomal protein S3a OS Homo sapiens GN RPS3A PE 1 SV 2	29925	10.1 8	19.32
ERE SNAT2		P61247	40S ribosomal protein S3a OS Homo sapiens GN RPS3A PE 1 SV 2	29925	10.1 8	43.56
ERE cons		P62701	40S ribosomal protein S4 X isoform OS Homo sapiens GN RPS4X PE 1 SV 2	29579	10.5 9	15.21
ERE SNAT2		P62701	40S ribosomal protein S4 X isoform OS Homo sapiens GN RPS4X PE 1 SV 2	29579	10.5 9	9.89
ERE cons		P62753	40S ribosomal protein S6 OS Homo sapiens GN RPS6 PE 1 SV 1	28663	11.2 9	8.03
ERE SNAT2		P62753	40S ribosomal protein S6 OS Homo sapiens GN RPS6 PE 1 SV 1	28663	11.2 9	20.48
ERE cons		P62241	40S ribosomal protein S8 OS Homo sapiens GN RPS8 PE 1 SV 2	24190	10.7 2	48.08
ERE SNAT2		P62241	40S ribosomal protein S8 OS Homo sapiens GN RPS8 PE 1 SV 2	24190	10.7 2	47.60
ERE cons		P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS Homo sapiens GN RPLP0 PE 1 SV 1	34251	5.60	32.81
ERE SNAT2		P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS Homo sapiens GN RPLP0 PE 1 SV 1	34251	5.60	24.61
ERE cons		P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS Homo sapiens GN RPLP2 PE 1 SV 1	11657	4.18	89.57
ERE SNAT2		P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS Homo sapiens GN RPLP2 PE 1 SV 1	11657	4.18	93.04
ERE cons		P30050	60S ribosomal protein L12 OS Homo sapiens GN RPL12 PE 1 SV 1	17807	9.90	43.03
ERE SNAT2		P30050	60S ribosomal protein L12 OS Homo sapiens GN RPL12 PE 1 SV 1	17807	9.90	50.30
ERE cons		P26373	60S ribosomal protein L13 OS Homo sapiens GN RPL13 PE 1 SV 4	24246	12.0 6	24.64
ERE SNAT2		P26373	60S ribosomal protein L13 OS Homo sapiens GN RPL13 PE 1 SV 4	24246	12.0 6	21.33

ERE cons		P50914	60S ribosomal protein L14 OS Homo sapiens GN RPL14 PE 1 SV 4	23417	11.4 0	15.35
ERE SNAT2		P50914	60S ribosomal protein L14 OS Homo sapiens GN RPL14 PE 1 SV 4	23417	11.4 0	20.93
ERE cons		P61313	60S ribosomal protein L15 OS Homo sapiens GN RPL15 PE 1 SV 2	24131	12.0 1	20.59
ERE SNAT2		P61313	60S ribosomal protein L15 OS Homo sapiens GN RPL15 PE 1 SV 2	24131	12.0 1	16.18
ERE cons		P18621	60S ribosomal protein L17 OS Homo sapiens GN RPL17 PE 1 SV 3	21383	10.6 0	34.24
ERE SNAT2		P18621	60S ribosomal protein L17 OS Homo sapiens GN RPL17 PE 1 SV 3	21383	10.6 0	13.59
ERE cons		Q07020	60S ribosomal protein L18 OS Homo sapiens GN RPL18 PE 1 SV 2	21621	12.1 3	26.60
ERE SNAT2		Q07020	60S ribosomal protein L18 OS Homo sapiens GN RPL18 PE 1 SV 2	21621	12.1 3	19.15
ERE cons		P84098	60S ribosomal protein L19 OS Homo sapiens GN RPL19 PE 1 SV 1	23451	11.8 9	9.69
ERE SNAT2		P84098	60S ribosomal protein L19 OS Homo sapiens GN RPL19 PE 1 SV 1	23451	11.8 9	16.33
ERE cons		P35268	60S ribosomal protein L22 OS Homo sapiens GN RPL22 PE 1 SV 2	14777	9.61	50.78
ERE SNAT2		P35268	60S ribosomal protein L22 OS Homo sapiens GN RPL22 PE 1 SV 2	14777	9.61	53.13
ERE cons		P62829	60S ribosomal protein L23 OS Homo sapiens GN RPL23 PE 1 SV 1	14856	10.9 4	37.14
ERE SNAT2		P62829	60S ribosomal protein L23 OS Homo sapiens GN RPL23 PE 1 SV 1	14856	10.9 4	26.43
ERE cons		P83731	60S ribosomal protein L24 OS Homo sapiens GN RPL24 PE 1 SV 1	17767	11.6 9	24.20
ERE SNAT2		P83731	60S ribosomal protein L24 OS Homo sapiens GN RPL24 PE 1 SV 1	17767	11.6 9	19.75
ERE cons		P61353	60S ribosomal protein L27 OS Homo sapiens GN RPL27 PE 1 SV 2	15787	10.9 8	13.24
ERE SNAT2		P61353	60S ribosomal protein L27 OS Homo sapiens GN RPL27 PE 1 SV 2	15787	10.9 8	22.06
ERE cons		P46776	60S ribosomal protein L27a OS Homo sapiens GN RPL27A PE 1 SV 2	16551	11.4 2	22.30
ERE SNAT2		P46776	60S ribosomal protein L27a OS Homo sapiens GN RPL27A PE 1 SV 2	16551	11.4 2	14.19
ERE cons		P39023	60S ribosomal protein L3 OS Homo sapiens GN RPL3 PE 1 SV 2	46079	10.6 2	25.31
ERE SNAT2		P39023	60S ribosomal protein L3 OS Homo sapiens GN RPL3 PE 1 SV 2	46079	10.6 2	25.06
ERE cons		P62888	60S ribosomal protein L30 OS Homo sapiens GN RPL30 PE 1 SV 2	12775	9.95	52.17
ERE SNAT2		P62888	60S ribosomal protein L30 OS Homo sapiens GN RPL30 PE 1 SV 2	12775	9.95	46.09
ERE cons		P62899	60S ribosomal protein L31 OS Homo sapiens GN RPL31 PE 1 SV 1	14453	10.9 7	33.60
ERE SNAT2		P62899	60S ribosomal protein L31 OS Homo sapiens GN RPL31 PE 1 SV 1	14453	10.9 7	26.40
ERE cons		P36578	60S ribosomal protein L4 OS Homo sapiens GN RPL4 PE 1 SV 5	47667	11.5 0	25.53
ERE SNAT2		P36578	60S ribosomal protein L4 OS Homo sapiens GN RPL4 PE 1 SV 5	47667	11.5 0	23.89
ERE cons		Q02878	60S ribosomal protein L6 OS Homo sapiens GN RPL6 PE 1 SV 3	32707	11.0 2	16.32
ERE SNAT2		Q02878	60S ribosomal protein L6 OS Homo sapiens GN RPL6 PE 1 SV 3	32707	11.0 2	20.83
ERE cons		P18124	60S ribosomal protein L7 OS Homo sapiens GN RPL7 PE 1 SV 1	29207	11.0 6	24.19
ERE SNAT2		P18124	60S ribosomal protein L7 OS Homo sapiens GN RPL7 PE 1 SV 1	29207	11.0 6	23.39
ERE cons		P62424	60S ribosomal protein L7a OS Homo sapiens GN RPL7A PE 1 SV 2	29977	11.0 6	16.92
ERE SNAT2		P62424	60S ribosomal protein L7a OS Homo sapiens GN RPL7A PE 1 SV 2	29977	11.0 6	16.92

ERE cons	ER $\alpha$	P46063	ATP dependent DNA helicase Q1 OS Homo sapiens GN RECQL PE 1 SV 3	73409	7.79	25.89
ERE cons		P62158	Calmodulin OS Homo sapiens GN CALM1 PE 1 SV 2	16826	3.88	61.75
ERE SNAT2		P62158	Calmodulin OS Homo sapiens GN CALM1 PE 1 SV 2	16826	3.88	40.94
ERE cons		Q8N726	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A isoform 4 OS Homo sapiens GN CDKN2A PE 1 SV 1	17994	12.55	41.62
ERE SNAT2		Q8N726	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A isoform 4 OS Homo sapiens GN CDKN2A PE 1 SV 1	17994	12.55	47.40
ERE cons		O15446	DNA directed RNA polymerase 1 subunit RPA34 OS Homo sapiens GN CD3EAP PE 1 SV 1	54951	8.80	34.90
ERE SNAT2		O15446	DNA directed RNA polymerase 1 subunit RPA34 OS Homo sapiens GN CD3EAP PE 1 SV 1	54951	8.80	20.39
ERE cons		Q9NX24	H ACA ribonucleoprotein complex subunit 2 OS Homo sapiens GN NHP2 PE 1 SV 1	17189	8.26	41.18
ERE SNAT2		Q9NX24	H ACA ribonucleoprotein complex subunit 2 OS Homo sapiens GN NHP2 PE 1 SV 1	17189	8.26	24.84
ERE cons		Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1 binding protein 3 OS Homo sapiens GN HP1BP3 PE 1 SV 1	61169	10.10	10.85
ERE cons		Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1 binding protein 3 OS Homo sapiens GN HP1BP3 PE 1 SV 1	61169	10.10	21.34
ERE SNAT2		Q32P51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 like 2 OS Homo sapiens GN HNRNPA1L2 PE 2 SV 2	34204	9.28	15.31
ERE SNAT2		Q32P51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 like 2 OS Homo sapiens GN HNRNPA1L2 PE 2 SV 2	34204	9.28	31.88
ERE cons	ER $\alpha$	P16403	Histone H1 2 OS Homo sapiens GN HIST1H1C PE 1 SV 2	21351	11.43	22.07
ERE cons		P16403	Histone H1 2 OS Homo sapiens GN HIST1H1C PE 1 SV 2	21351	11.43	25.35
ERE cons		P16402	Histone H1 3 OS Homo sapiens GN HIST1H1D PE 1 SV 2	22336	11.51	17.19
ERE SNAT2		P16402	Histone H1 3 OS Homo sapiens GN HIST1H1D PE 1 SV 2	22336	11.51	19.46
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P16401	Histone H1 5 OS Homo sapiens GN HIST1H1B PE 1 SV 3	22566	11.40	14.60
ERE cons		P16401	Histone H1 5 OS Homo sapiens GN HIST1H1B PE 1 SV 3	22566	11.40	23.89
ERE cons	ER $\alpha$	P04908	Histone H2A type 1 B E OS Homo sapiens GN HIST1H2AB PE 1 SV 2	14126	11.47	21.54
ERE SNAT2		P04908	Histone H2A type 1 B E OS Homo sapiens GN HIST1H2AB PE 1 SV 2	14126	11.47	21.54
ERE cons		Q9Y608	Leucine rich repeat flightless interacting protein 2 OS Homo sapiens GN LRRFIP2 PE 1 SV 1	82121	6.51	17.34
ERE SNAT2		Q9Y608	Leucine rich repeat flightless interacting protein 2 OS Homo sapiens GN LRRFIP2 PE 1 SV 1	82121	6.51	23.72
ERE cons		P67809	Nuclease sensitive element binding protein 1 OS Homo sapiens GN YBX1 PE 1 SV 3	35902	10.13	22.22
ERE SNAT2		P67809	Nuclease sensitive element binding protein 1 OS Homo sapiens GN YBX1 PE 1 SV 3	35902	10.13	19.14
ERE cons		Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS Homo sapiens GN DDX21 PE 1 SV 5	87290	9.68	26.05
ERE SNAT2		Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS Homo sapiens GN DDX21 PE 1 SV 5	87290	9.68	35.25
ERE cons		P40937	Replication factor C subunit 5 OS Homo sapiens GN RFC5 PE 1 SV 1	38472	6.81	33.82
ERE SNAT2		P40937	Replication factor C subunit 5 OS Homo sapiens GN RFC5 PE 1 SV 1	38472	6.81	43.82
ERE cons		P35637	RNA binding protein FUS OS Homo sapiens GN FUS PE 1 SV 1	53393	9.49	22.43
ERE SNAT2		P35637	RNA binding protein FUS OS Homo sapiens GN FUS PE 1 SV 1	53393	9.49	8.17
ERE cons		Q92804	TATA binding protein associated factor 2N OS Homo sapiens GN TAF15 PE 1 SV 1	61792	8.05	11.15
ERE SNAT2		Q92804	TATA binding protein associated factor 2N OS Homo sapiens GN TAF15 PE 1 SV 1	61792	8.05	8.11
ERE cons		Q86V81	THO complex subunit 4 OS Homo sapiens GN THOC4 PE 1 SV 3	26871	11.56	31.91

ERE SNAT2		Q86V81	THO complex subunit 4 OS Homo sapiens GN THOC4 PE 1 SV 3	26871	11.5 6	16.73
ERE cons	ER $\alpha$	Q00059	Transcription factor A mitochondrial OS Homo sapiens GN TFAM PE 1 SV 1	29078	10.0 9	29.67
ERE cons		Q00059	Transcription factor A mitochondrial OS Homo sapiens GN TFAM PE 1 SV 1	29078	10.0 9	8.94
ERE SNAT2		P62906	60S ribosomal protein L10a OS Homo sapiens GN RPL10A PE 1 SV 2	24815	10.3 6	14.75
ERE cons		P62913	60S ribosomal protein L11 OS Homo sapiens GN RPL11 PE 1 SV 2	20239	9.95	29.78
ERE cons		P62750	60S ribosomal protein L23a OS Homo sapiens GN RPL23A PE 1 SV 1	17684	10.8 9	13.46
ERE cons		P61254	60S ribosomal protein L26 OS Homo sapiens GN RPL26 PE 1 SV 1	17247	10.9 8	12.41
ERE cons		P47914	60S ribosomal protein L29 OS Homo sapiens GN RPL29 PE 1 SV 2	17741	12.0 8	14.47
ERE SNAT2	Q9Y3U8	Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36 OS Homo sapiens GN RPL36 PE 1 SV 3	12245	12.0 0	32.38
ERE cons		P62917	60S ribosomal protein L8 OS Homo sapiens GN RPL8 PE 1 SV 2	28007	11.4 5	26.46
ERE cons	ER $\alpha$	Q02880	DNA topoisomerase 2 beta OS Homo sapiens GN TOP2B PE 1 SV 3	183151	7.98	16.17
ERE SNAT2	ER $\alpha$	Q02880	DNA topoisomerase 2 beta OS Homo sapiens GN TOP2B PE 1 SV 3	183151	7.98	9.86
ERE cons	ER $\alpha$	P03372	Estrogen receptor OS Homo sapiens GN ESR1 PE 1 SV 2	66173	7.97	56.93
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P03372	Estrogen receptor OS Homo sapiens GN ESR1 PE 1 SV 2	66173	7.97	36.35
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P04406	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase OS Homo sapiens GN GAPDH PE 1 SV 3	36030	8.70	29.55
ERE cons	ER $\alpha$	P17066	Heat shock 70 kDa protein 6 OS Homo sapiens GN HSPA6 PE 1 SV 2	70984	5.73	17.88
ERE cons	ER $\alpha$	Q9UGN 5	Poly ADP ribose polymerase 2 OS Homo sapiens GN PARP2 PE 1 SV 2	66163	9.09	8.92
ERE cons		Q13310	Polyadenylate binding protein 4 OS Homo sapiens GN PABPC4 PE 1 SV 1	70738	9.57	27.33
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P0CG47	Polyubiquitin B OS Homo sapiens GN UBB PE 1 SV 1	25745	7.40	12.66
ERE cons		P0CG48	Polyubiquitin C OS Homo sapiens GN UBC PE 1 SV 2	76981	7.76	3.65
ERE cons	ER $\alpha$	P27694	Replication protein A 70 kDa DNA binding subunit OS Homo sapiens GN RPA1 PE 1 SV 2	68095	6.97	16.56
ERE cons		O76021	Ribosomal L1 domain containing protein 1 OS Homo sapiens GN RSL1D1 PE 1 SV 3	54938	10.6 0	16.94
ERE cons		Q16629	Serine arginine rich splicing factor 7 OS Homo sapiens GN SRSF7 PE 1 SV 1	27350	12.2 2	18.91
ERE SNAT2		Q9NY57	Serine threonine protein kinase 32B OS Homo sapiens GN STK32B PE 2 SV 1	47852	7.55	23.67
ERE cons	ER $\alpha$	Q04837	Single stranded DNA binding protein mitochondrial OS Homo sapiens GN SSBP1 PE 1 SV 1	17249	9.91	38.51
ERE SNAT2	ER $\alpha$	P22532	Small proline rich protein 2D OS Homo sapiens GN SPRR2D PE 2 SV 2	7899	8.31	66.67

--- ERE cons ER $\alpha$

--- ERE cons

--- ERE SNAT2 ER $\alpha$

--- ERE SNAT2

Identificación de las proteínas precipitadas y unidas a los oligonucleótidos con las secuencias ERE consenso y ERE SNAT2 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS<sup>E</sup>). En la tabla se presenta el oligonucleótido utilizado y el extracto nuclear de células HeLa transfectado con el receptor de estrógenos alfa (ER) o extracto sin transfectar como control negativo. También se especifica el número de acceso de la proteína identificada, su descripción, peso molecular, punto isoeléctrico y el porcentaje (%) de cobertura encontrado de cada proteína en la muestra analizada. Las proteínas en letra bold fueron analizadas posteriormente por western blot y presentaron un porcentaje de cobertura adecuado para indicar su presencia en la muestra analizada.

# **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

# Transcriptional regulation of the sodium-coupled neutral amino acid transporter (SNAT2) by 17 $\beta$ -estradiol

Laura A. Velázquez-Villegas<sup>a,b</sup>, Víctor Ortiz<sup>b</sup>, Anders Ström<sup>c</sup>, Nimbe Torres<sup>b</sup>, David A. Engler<sup>d</sup>, Risë Matsunami<sup>d</sup>, David Ordaz-Rosado<sup>e</sup>, Rocío García-Becerra<sup>e</sup>, Adriana M. López-Barradas<sup>b</sup>, Fernando Larrea<sup>e</sup>, Jan-Åke Gustafsson<sup>c,f,1</sup>, and Armando R. Tovar<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México; <sup>b</sup>Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000 México D.F., México; <sup>c</sup>Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling, University of Houston, Houston, TX 77204; <sup>d</sup>Proteomics Programmatic Core, Houston Methodist Hospital Research Institute, Houston, TX 77030; <sup>e</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000 México D.F., México; and <sup>f</sup>Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, 14186 Stockholm, Sweden

Contributed by Jan-Åke Gustafsson, June 27, 2014 (sent for review May 27, 2014; reviewed by Maria Hatzoglou)

**The sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) translocates small neutral amino acids into the mammary gland to promote cell proliferation during gestation. It is known that SNAT2 expression increases during pregnancy, and in vitro studies indicate that this transporter is induced by 17 $\beta$ -estradiol. In this study, we elucidated the mechanism by which 17 $\beta$ -estradiol regulates the transcription of SNAT2. In silico analysis revealed the presence of a potential estrogen response element (ERE) in the SNAT2 promoter. Reporter assays showed an increase in SNAT2 promoter activity when cotransfected with estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ) after 17 $\beta$ -estradiol stimulation. Deletion of the ERE reduced estradiol-induced promoter activity by 63%. Additionally, EMSAs and supershift assays showed that ER- $\alpha$  binds to the SNAT2 ERE and that this binding competes with the interaction of ER- $\alpha$  with its consensus ERE. An in vivo CHIP assay demonstrated that the binding of ER- $\alpha$  to the SNAT2 promoter gradually increased in the mammary gland during gestation and that maximal binding occurred at the highest 17 $\beta$ -estradiol serum concentration. Liquid chromatography-elevated energy mass spectrometry and Western blot analysis revealed that the SNAT2 ER- $\alpha$ -ERE complex contained poly(ADP-ribose) polymerase 1, Lupus Ku autoantigen protein p70, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins and that the silencing of each of these proteins nearly abolished 17 $\beta$ -estradiol-stimulated SNAT2 promoter activity. Nuclear levels of GAPDH increased progressively during gestation in the mammary gland, and GAPDH binding was nucleotide-specific for the SNAT2 ERE. Thus, this study provides new insights into how the mammary epithelium adapts to control amino acid uptake through the transcriptional regulation of the SNAT2 transporter via 17 $\beta$ -estradiol.**

coactivator | amino acid transport

The mammary gland has a high demand for amino acids during the gestation and lactation periods. It requires the uptake of amino acids for cell proliferation during pregnancy and for milk protein synthesis during lactation. Studies examining arteriovenous differences have demonstrated that glutamine and alanine are efficiently transported into the mammary gland at the start of lactation (1). These amino acids are primarily transported by amino acid transport system A, which is comprised of three subtypes known as sodium-coupled neutral amino acid transporter (SNAT) 1, 2, and 4 (2). SNAT2 is characterized as the classical system A transporter, is ubiquitous in mammalian cells, and plays various roles in different tissues and depending on specific physiological conditions (3–5). SNAT2 also provides efflux substrates for other amino acid transport systems, like the amino acid heteroexchanger system L, facilitating the uptake of branched-chain amino acids, particularly leucine that activates the TOR pathway involved in protein synthesis and cell

proliferation (6). Up-regulation of SNAT2 gene expression is mediated by different signal transduction pathways. In the liver, it is activated by glucagon via cAMP/PKA, which phosphorylates the transcription factor CREB, allowing it to bind to the CRE site in the SNAT2 promoter region (7). In addition, system A activity is induced by insulin and glucocorticoids (8–11).

During pregnancy, there is a progressive increase in SNAT2 mRNA levels in the mammary gland. Interestingly, it has been shown that SNAT2 mRNA expression is induced by incubating rat mammary gland explants in the presence of 17 $\beta$ -estradiol, an effect repressed by the addition of the estrogen receptor (ER) inhibitor ICI-182780 (12). Similarly, Bhat and Vadgama (13) found that the activity and expression of SNAT2 are increased in mammary carcinoma cell lines that express ER alpha (ER- $\alpha$ ) after 48 h of stimulation with 17 $\beta$ -estradiol.

A previous study in female mice with ER- $\alpha$  knocked out conditionally in the mammary gland demonstrated that pups born and nursed by these dams during lactation exhibited reduced body weight gain compared with pups born and fed by wild-type dams (14), possibly due to a reduction in the uptake of

## Significance

During gestation, several metabolic adaptations occur to prepare the mammary gland for lactation, a process essential to sustain the nutritional needs of the newborn. Thus, the capacity of the gland to actively synthesize proteins is dependent on the supply of amino acids regulated by specific amino acid transporters, including the sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). Our findings reveal that 17 $\beta$ -estradiol activates the expression of SNAT2 during gestation via an estrogen response element in the SNAT2 promoter that binds to a specific complex containing poly(ADP-ribose) polymerase 1, Lupus Ku autoantigen protein p70, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins in the presence of estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ). Accordingly, estrogens regulate the expression of SNAT2 via ER- $\alpha$ , utilizing a transcriptional mechanism in which GAPDH, a metabolic enzyme associated with carbohydrate metabolism, is a coactivator.

Author contributions: L.A.V.-V., A.S., N.T., J.-Å.G., and A.R.T. designed research; L.A.V.-V., V.O., A.S., D.A.E., R.M., D.O.-R., R.G.-B., and A.M.L.-B. performed research; L.A.V.-V., N.T., D.A.E., R.M., R.G.-B., F.L., J.-Å.G., and A.R.T. analyzed data; and L.A.V.-V., J.-Å.G., and A.R.T. wrote the paper.

Reviewers included: M.H., Case Western Reserve University.

The authors declare no conflict of interest.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Email: jgustafsson@uh.edu.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1412099111/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1412099111/-DCSupplemental).



substrates for milk production, including the amino acids transported by SNAT2.

In silico analysis of the SNAT2 promoter region revealed the presence of a putative estrogen response element (ERE) between bases  $-1,486$  and  $-1,471$  upstream of the transcriptional start site, suggesting that the promoter region of the SNAT2 gene is regulated by  $17\beta$ -estradiol and that this regulation is activated during gestation when the levels of this hormone (15) and amino acid requirements (16) increase, supporting the proliferation of the mammary tissue. The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism by which  $17\beta$ -estradiol regulates the transcription of the SNAT2 gene.

## Results

### SNAT2 ERE-Containing Promoter Region Is Activated by $17\beta$ -Estradiol.

To determine whether the putative ERE found in the SNAT2 promoter region was functional, we performed assays using SNAT2 promoter constructs and the luciferase reporter gene. We observed (Fig. 1A) that  $1 \times 10^{-8}$  M  $17\beta$ -estradiol increased luciferase activity approximately twofold when using base pairs  $-1,872$  to  $+265$  of the SNAT2 promoter region. To corroborate that loss of the ERE site

between bases  $-1,486$  and  $-1,471$  diminished the effect of the hormone, we used a series of unidirectional 5' deletion constructs generated from the complete sequence. The  $17\beta$ -estradiol-induced luciferase activity was reduced by  $\sim 63\%$  and  $75\%$  with the constructs encoding base pairs  $-872$  to  $+265$  and  $-336$  to  $+265$ , respectively. The remaining activity was not generated by a direct interaction of ER- $\alpha$  with a specific ERE because there are no other putative EREs in the SNAT2 promoter. Deletion of base pairs  $-1,872$  to  $-192$  resulted in the loss of  $17\beta$ -estradiol-induced activity.

### SNAT2 Promoter Activation by $17\beta$ -Estradiol Is ER- $\alpha$ -Dependent.

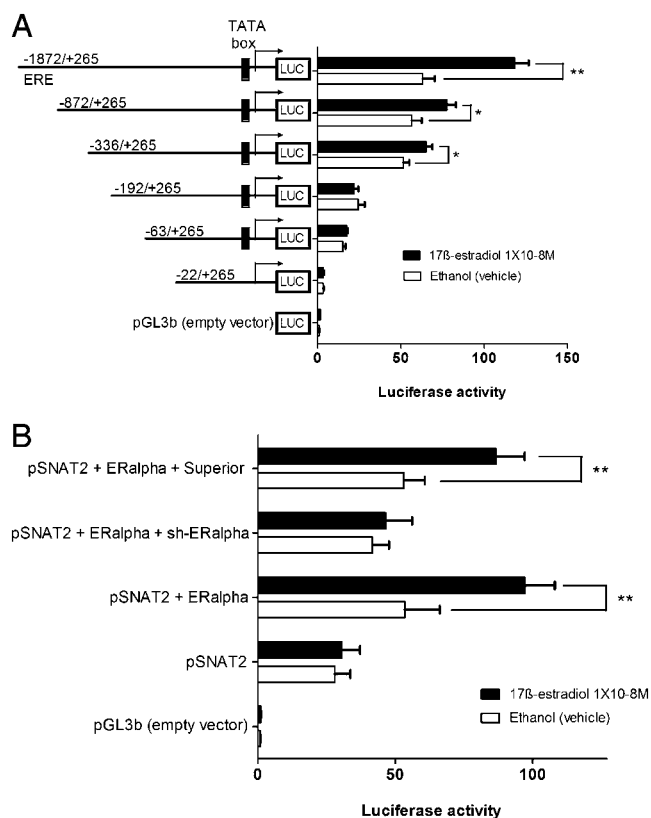
To determine whether the SNAT2 promoter activation mediated by  $17\beta$ -estradiol is ER- $\alpha$ -dependent, we used an ER- $\alpha$ -sh plasmid to knock down the ER- $\alpha$  protein. As shown in Fig. 1B, ER- $\alpha$  knockdown prevented SNAT2 promoter activation by  $17\beta$ -estradiol. There was no reduction in SNAT2 promoter activity induced by  $17\beta$ -estradiol in control cells transfected with an empty plasmid. These results corroborate the importance of ER- $\alpha$  regulation of the SNAT2 promoter in response to  $17\beta$ -estradiol and suggest that the remaining activity observed in the promoter constructs containing base pairs  $-872$  to  $+265$  and  $-336$  to  $+265$  could be ER- $\alpha$ -dependent.

### ER- $\alpha$ Binds to the ERE in the SNAT2 Promoter in Vitro.

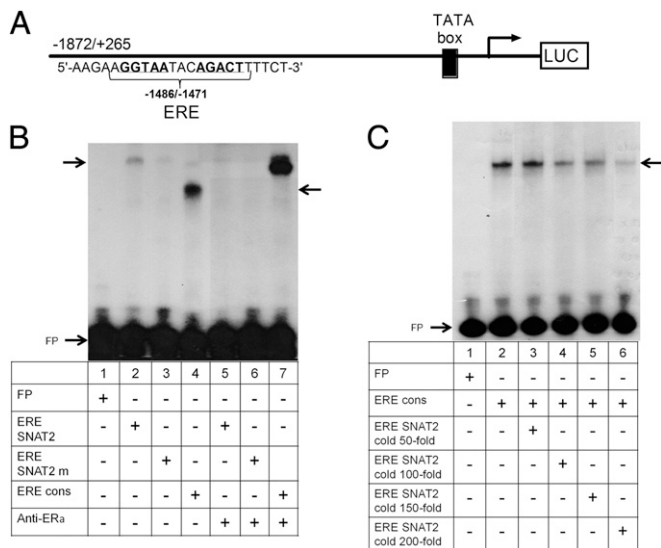
Because it has been established that ER- $\alpha$  activated by  $17\beta$ -estradiol binds to the ERE sites of target genes, the next step was to corroborate whether ER- $\alpha$  could bind to the ERE site found in the SNAT2 promoter region. As shown in Fig. 2A, lane 2, electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) analysis of the SNAT2 ERE site using extracts from HeLa cells transfected with ER- $\alpha$  indicated binding with a retarded band. Mutation of the SNAT2 ERE site (Table S1) abolished the formation of this complex (Fig. 2A, lane 3), suggesting that this site binds to ER- $\alpha$ . As a positive control, we used the ERE consensus sequence, which produced a very intense retarded band (Fig. 2A, lane 4). Interestingly, the ERE consensus band traveled further than the SNAT2 ERE complex in the gel, suggesting that different cofactors might bind to each complex. To demonstrate whether ER- $\alpha$  was bound to the SNAT2 ERE sequence, we used an anti-ER- $\alpha$  antibody. Fig. 2A, lane 5, demonstrates that preincubation with the antibody abolished the formation of the complex, possibly by blocking the ER- $\alpha$  DNA-binding site. The formation of a super-shifted band was observed (Fig. 2A, lane 7) with the consensus ERE sequence, indicating that the proteins involved in the formation of the complex might vary between the SNAT2 ERE and the ERE consensus sequence. In fact, liquid chromatography-elevated energy mass spectrometry (LC-MS<sup>E</sup>) analysis confirmed the difference between both complexes (see below). The SNAT2 ERE sequence competed with the ERE consensus sequence for ER- $\alpha$  binding because the addition of a 200-fold molar excess of unlabeled (cold) SNAT2 ERE sequence nearly obliterated binding to the ERE consensus sequence (Fig. 2C).

### ER- $\alpha$ Binds to the SNAT2 ERE Site in the Rat SNAT2 Promoter in Vivo.

The functionality of the SNAT2 ERE site was also demonstrated in vivo. The increase of  $17\beta$ -estradiol levels during gestation favored the binding of ER- $\alpha$  to the SNAT2 ERE site in the mammary gland as assessed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, demonstrating an amplification product on days 5, 14, and 20 of gestation (Fig. 3A and B). Quantitative PCR was performed to quantify the binding of ER- $\alpha$  to the SNAT2 ERE site in the rat SNAT2 promoter. There was a progressive increase in binding during the gestation period, which corresponded to the increase in serum estradiol levels in the rat (Fig. 3B and C, respectively). Virgin control rats in the diestrus period have very low levels of the hormone, and no ER- $\alpha$  binding was observed. A high level of hormone is needed to activate SNAT2



**Fig. 1.** Functional analysis of the ERE site in the rat SNAT2 promoter. (A) Effect of  $1 \times 10^{-8}$  M  $17\beta$ -estradiol on SNAT2 promoter activity. HeLa cells were cotransfected with each promoter-reporter construct, the ER- $\alpha$  expression vector, and pRL-TK and incubated in the presence of  $1 \times 10^{-8}$  M  $17\beta$ -estradiol or vehicle (ethanol). Luciferase activities were measured 24 h after transfection. The results are the mean  $\pm$  SE of three independent experiments per construct. (B) Effect of the ER- $\alpha$ -sh plasmid on SNAT2 promoter activity. HeLa cells were cotransfected with the ER- $\alpha$ -sh plasmid or empty vector (Superior), the SNAT2 promoter-reporter construct (pSNAT2), or empty vector (pGL3b), the ER- $\alpha$  expression vector, and pRL-TK and incubated in the presence of  $1 \times 10^{-8}$  M  $17\beta$ -estradiol or vehicle (ethanol). Luciferase activities were measured 24 h after transfection. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments per construct. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (significant difference compared with their respective control).



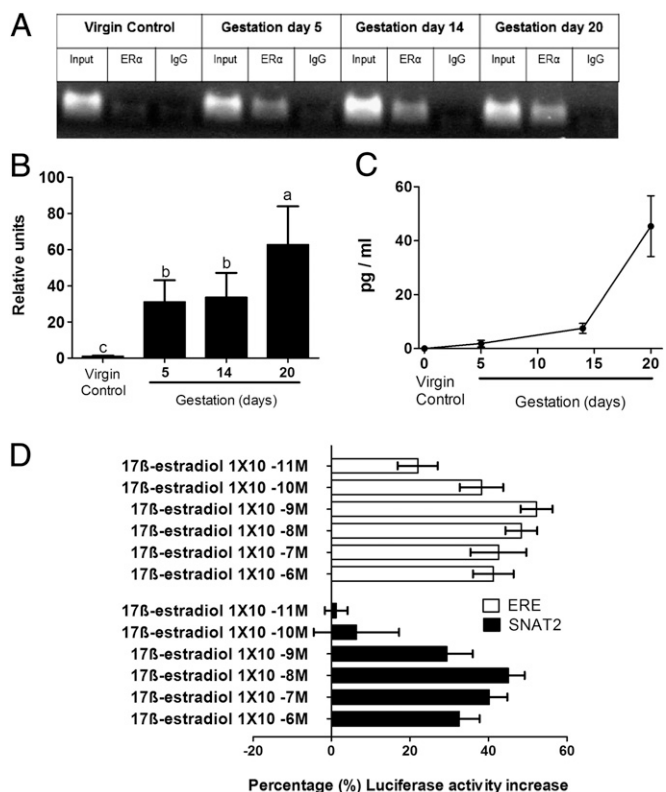
**Fig. 2.** Binding of ER- $\alpha$  to the ERE in the SNAT2 promoter in vitro. Double-stranded DNA oligonucleotides containing the SNAT2 ERE site (ERE SNAT2), the SNAT2 ERE mutated site (ERE SNAT2 m), or the ERE consensus sequence (ERE cons) were incubated with HeLa nuclear extracts from cells previously transfected with ER- $\alpha$ . The DNA sequences of the oligonucleotides used are indicated in Table S1. (A) Localization of the ERE sequence in the SNAT2 promoter region between the bases  $-1,486$  and  $-1,471$  upstream of the transcriptional start site. (B) EMSA analysis of the HeLa nuclear extracts previously transfected with ER- $\alpha$  using labeled oligonucleotides containing the wild-type SNAT2 ERE site (lane 2), the SNAT2 ERE mutated site (lane 3), or the ERE consensus site (lane 4). The supershift assay was performed by preincubating  $1 \mu\text{g}$  of anti-ER- $\alpha$  antibody with the HeLa nuclear extracts from cells previously transfected with ER- $\alpha$ . Probes for the labeled SNAT2 ERE site (lane 5), the SNAT2 ERE mutated site (lane 6), or the consensus ERE sequence (lane 7) were added. (C) Competitive assays using the labeled ERE consensus sequence and an excess of unlabeled SNAT2 ERE sequence (SNAT2 ERE cold) at 50-, 100-, 150-, and 200-fold molar excess are shown in lanes 3, 4, 5, and 6, respectively. FP, free probe.

transcription, and therefore SNAT2 is up-regulated exclusively during the gestation period and possibly during the proestrus phase of the female rat. Additionally, the use of different concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (from  $1 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-11}$  M) demonstrated that the SNAT2 promoter requires a higher concentration of hormone to induce transcription compared with the consensus ERE sequence (Fig. 3D). For instance, whereas  $10^{-11}$  and  $10^{-10}$  M 17 $\beta$ -estradiol robustly activated the consensus ERE construct, the SNAT2 ERE required higher hormone concentrations to be activated to the same degree.

**PARP1, Ku70, and GAPDH Bind to the SNAT2 Promoter ERE Sequence with ER- $\alpha$ .** We used a technique based on a desthiobiotin-triethylene glycol (TEG) oligo and streptavidin beads to precipitate the ER- $\alpha$ -ERE complex and identify the other proteins bound to the SNAT2 promoter region following activation by 17 $\beta$ -estradiol. For this assay, double-stranded DNA oligonucleotides containing the SNAT2 ERE site (ERE SNAT2 oligo) and the ERE consensus sequence (ERE cons oligo) were incubated with nuclear extracts from HeLa cells transfected with ER- $\alpha$ . HeLa nuclear extracts from untransfected cells were used as negative controls for each oligo. The ER- $\alpha$ -ERE complex was precipitated with streptavidin beads and eluted with 5 mM biotin (Fig. 4A). LC-MS<sup>E</sup> (Table S2) and Western blot analysis (Fig. 4B) revealed the presence of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), Lupus Ku autoantigen protein p86 (Ku80), Ku70, and topoisomerase II $\beta$  with ER- $\alpha$  on the ERE consensus oligo and PARP1, Ku70, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) as well as topoisomerase I and II $\beta$  with ER- $\alpha$  on the SNAT2 ERE oligo. Although PARP1 bound equally well to both ERE sequences, the intensity of some of the bands bound to the SNAT2 ERE oligo was lower than to the ERE consensus oligo, particularly Ku70 and topoisomerase II $\beta$ , possibly because ER $\alpha$  has a lower affinity for the SNAT2 ERE than the consensus ERE. Interestingly, topoisomerase I and GAPDH bind exclusively to the SNAT2 ERE site. Binding of these proteins was dependent on ER- $\alpha$  binding because most of them did not precipitate in the absence of ER- $\alpha$  (Fig. 4B).

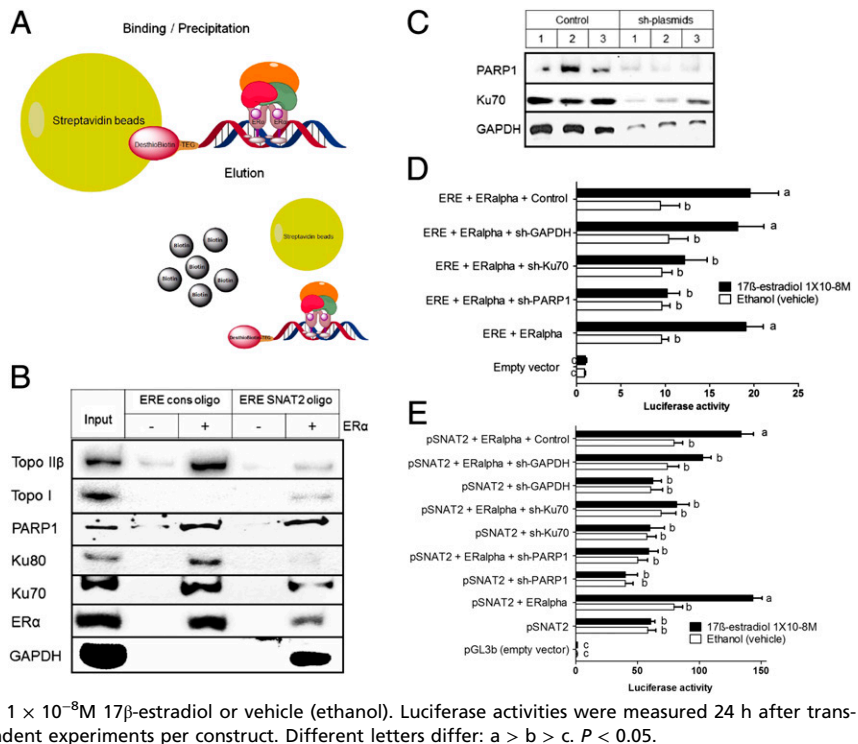
The activity of the luciferase reporter plasmid encoding the consensus ERE sequence in cells cotransfected with ER- $\alpha$  and stimulated with 17 $\beta$ -estradiol decreased significantly when cotransfected with PARP1 and Ku70 sh-plasmids (Fig. 4C). Interestingly, the luciferase reporter plasmid encoding the SNAT2 ERE sequence and the ER- $\alpha$  expression vector showed a significant decrease in activity in response to 17 $\beta$ -estradiol when GAPDH, PARP1, or Ku70 was knocked down (Fig. 4D).



**Fig. 3.** ER- $\alpha$  binds to the SNAT2 ERE site in the rat SNAT2 promoter in vivo. (A) ChIP showing ER- $\alpha$  binding. ChIP assays were conducted on mammary glands from virgin control rats and 5-, 14-, or 20-d pregnant rats. Soluble chromatin was immunoprecipitated with  $4 \mu\text{g}$  of anti-ER- $\alpha$  antibody or negative control IgG and subjected to PCR with a specific primer to the SNAT2 ERE site (Table S1). (B) Real-time PCR analysis of amplified products corresponding to ER- $\alpha$  binding to the SNAT2 ERE. This graph is representative of three independent experiments ( $n = 5$  rats per group). (C) Serum 17 $\beta$ -estradiol levels in virgin control rats and 5-, 14-, and 20-d pregnant rats ( $n = 5$  rats per group). (D) Effect of different concentrations of 17 $\beta$ -estradiol ( $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ , and  $1 \times 10^{-11}$  M) on the ERE consensus promoter-reporter construct and the SNAT2 promoter reporter construct activity. HeLa cells were cotransfected with each promoter-reporter construct, the ER- $\alpha$  expression vector, and pRL-TK and incubated in the presence of 17 $\beta$ -estradiol or vehicle (ethanol). Luciferase activities were measured 24 h after transfection. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments per construct and are expressed as percentage (%) of luciferase activity increase compared with the vehicle (ethanol). Different letters differ:  $a > b > c$ .  $P < 0.05$ .



**Fig. 4. ER- $\alpha$ -ERE complex purification.** (A) ER- $\alpha$ -ERE consensus and ER- $\alpha$ -SNAT2 ERE complexes were precipitated by using desthiobiotin-TEG oligos for the ERE consensus and the SNAT2 ERE sites (Table S1). The desthiobiotin-TEG oligos (2  $\mu$ g) were incubated with HeLa nuclear extracts or HeLa nuclear extracts from cells previously transfected with ER- $\alpha$ , poly(dI-dC) (2  $\mu$ g) and  $1 \times 10^{-8}$  M 17 $\beta$ -estradiol at 4  $^{\circ}$ C overnight in a rotation device. The volume was adjusted to 400  $\mu$ L with binding buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L poly(dI-dC), 20% glycerol]. Each sample was incubated with streptavidin magnetic beads for 2 h at 4  $^{\circ}$ C and washed three times with the same binding buffer in a rotation device. After the washes, the precipitated oligo-complex was eluted with 5 mM biotin and run on an SDS/PAGE for Western blot analysis. (B) Occupancy of Topo II $\beta$ , Topo I, PARP1, Ku80, Ku70, ER- $\alpha$ , and GAPDH on the ERE consensus and SNAT2 ERE sequences. HeLa nuclear extracts without ER- $\alpha$  transfection were used as negative controls for each oligo. (C) Representative immunoblot of the knockdown sh-plasmids (PARP1, Ku70, and GAPDH) efficiency. (D) Effect of the PARP1, Ku70 and GAPDH sh-plasmids on ERE consensus activity. (E) Effect of the PARP1, Ku70, and GAPDH sh-plasmids on SNAT2 promoter activity. HeLa cells were cotransfected with PARP1, Ku70, or GAPDH sh-plasmids, with or without the ER- $\alpha$  expression vector, each promoter-reporter construct, and pRL-TK and incubated in the presence of  $1 \times 10^{-8}$  M 17 $\beta$ -estradiol or vehicle (ethanol). Luciferase activities were measured 24 h after transfection. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments per construct. Different letters differ: a > b > c.  $P < 0.05$ .



**GAPDH Accumulates in the Nucleus, Binds in Vivo to the SNAT2 Promoter of Mammary Epithelium During Gestation, and Is Specific for SNAT2 ERE Activation.** GAPDH is a metabolic enzyme involved in glycolysis, gluconeogenesis, and glyceroneogenesis. Intriguingly, most of the amino acids transported by SNAT2 are considered gluconeogenic substrates. Feeding dams a high-protein diet (30%) that contains an excess of gluconeogenic amino acids significantly increased the expression of cytoplasmic GAPDH in the rat mammary gland during gestation on day 20 compared with those fed an adequate-protein (20%) diet (Fig. 5A and C). In addition, there was a progressive increase in the nuclear abundance of GAPDH during gestation in rat mammary tissue, reaching a peak on day 20 of gestation as shown by Western blot and immunohistochemical analysis (Fig. 5B and D–G). Moreover, ChIP assays demonstrated that GAPDH binds in vivo to the SNAT2 ERE in rat mammary gland during gestation, especially on days 14 and 20, whereas virgin control rats lack this binding (Fig. 5H). All these data show that GAPDH is translocated to the nucleus during gestation to actively maintain SNAT2 gene expression. To determine the specificity of GAPDH binding to the SNAT2 ERE, we performed a precipitation assay using single-nucleotide mutations and flanking regions similar to the SNAT2 consensus sequence. Our results clearly demonstrated that GAPDH binding to the SNAT2 ERE is exclusively dependent on the palindromic sequence 5'-AGGTAATACAGACTT-3'; 5'-AGGTCATACAGACTT-3' does not bind. Likewise, GAPDH binds to the 5' flanking region of the palindromic sequence 5'-AAGA AGGTAA TAC AGACTT TTCT-3' but not to 5'-TATC AGGTAA TAC AGACTT TTCT-3' (bold type letters indicate the nucleotide or nucleotides that were changed in the sequence) (Fig. 5I).

## Discussion

During gestation and lactation, a series of complex mechanisms function to provide food to the newborn. To activate these mechanisms, the mammary gland initiates a specific program to prepare the tissue to be a secretory organ for feeding the newborn. Therefore, several genes are turned on for the proliferation and differentiation of the mammary epithelium during

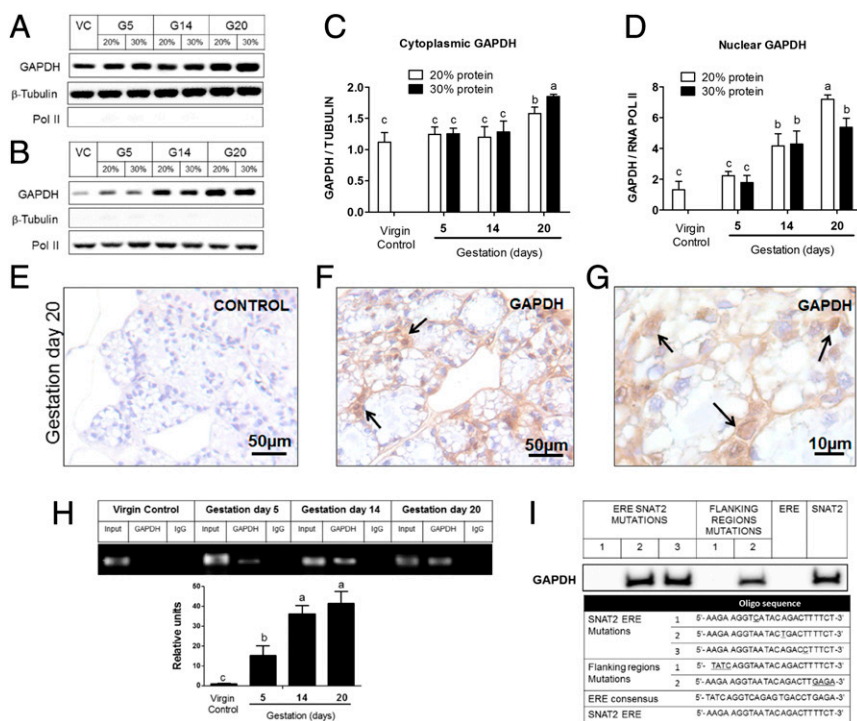
the gestation period for the synthesis of nutrients to fulfill the requirements of the newborn (17–21).

To trigger the mechanisms of gene expression in the mammary gland during gestation that regulate these processes, the hormonal milieu during this stage (20) controls the transcription of several genes. In particular, 17 $\beta$ -estradiol has been demonstrated to be a powerful activator of genes involved in the cell differentiation and proliferation (22–25) of the lactation process. The effects of 17 $\beta$ -estradiol in the mammary gland take place via ER- $\alpha$  and - $\beta$  (26, 27).

There are little data examining whether 17 $\beta$ -estradiol is involved in the mechanisms associated with the supply of nutrients for the mammary gland, and less is known about the molecular mechanisms. Amino acids are essential nutrients for protein synthesis, and they are incorporated into cells by specific transporters. It is known that the activities of some of these transporters in the mammary gland are stimulated by estrogens (28–30). In this study, we demonstrated that 17 $\beta$ -estradiol activates the expression of the SNAT2 amino acid transporter via the ERE present in the SNAT2 promoter region and requires the formation of a specific complex containing PARP1, Ku70, and GAPDH proteins.

Our results agree with previous findings that the topoisomerase II $\beta$ /PARP-1 complex mediates the transient formation of a DNA break that is required for 17 $\beta$ -estradiol-stimulated gene activation. PARP-1 uses histone H1 (known to be a transcriptional repressor) as a substrate for poly(ADP ribosylation). Histone H1 is replaced by a high mobility group B 1/2 protein that acts as an activator upon 17 $\beta$ -estradiol stimulation. In this process, topoisomerase II $\beta$ , PARP-1, DNA-PK, Ku80, and Ku70 are recruited to the ERE in the nucleosome after 17 $\beta$ -estradiol treatment (31). Another recent study has demonstrated that PARP1 interacts with ER- $\alpha$ , promoting poly(ADP ribosylation) and transactivation of the receptor, indicating that PARP1 is a crucial regulator of ER-dependent gene transcription (32).

Intriguingly, we demonstrated that GAPDH is part of the SNAT2 ER- $\alpha$ -ERE complex. In addition, we observed that its binding to the SNAT2 ERE depends on specific nucleotides present in the palindromic sequence and flanking region of the



**Fig. 5.** The expression of GAPDH in rat mammary glands. (A and B) A representative immunoblot of GAPDH,  $\beta$ -tubulin, and RNA polymerase II (Pol II) in cytoplasmic extract (A) and GAPDH,  $\beta$ -tubulin, and Pol II in the nuclear extract of mammary glands from rats fed 20% or 30% dietary protein (B). (C and D) Western blot densitometric analysis of cytoplasmic GAPDH/tubulin (C) and nuclear GAPDH/RNA polymerase II of the mammary glands from rats fed 20% or 30% dietary protein (D). The results are the mean  $\pm$  SD of three different blots. (E) GAPDH immunohistochemistry in rat mammary gland during gestation on day 20. (F and G) Negative control (F) and GAPDH (G). The arrows indicate the presence of GAPDH in the nucleus of mammary epithelium cells. [Scale bars: 50  $\mu$ m (E and F); 10  $\mu$ m (G).] (H) ChIP showing GAPDH binding to the SNAT2 ERE. ChIP assays were conducted on mammary glands from virgin control rats and 5-, 14-, and 20-d pregnant rats. Soluble chromatin was immunoprecipitated with 4  $\mu$ g of anti-GAPDH antibody or negative control IgG and subjected to PCR with a specific primer to the SNAT2 ERE site (Table S1). Results shown are representative of three independent experiments ( $n = 5$  rats per group). Different letters differ:  $a > b > c$ .  $P < 0.05$ . (I) A representative immunoblot of GAPDH precipitation in SNAT2 ERE and SNAT2 ERE mutated sequences using biotinylated oligos incubated with ER- $\alpha$  transfected nuclear extracts from HeLa cells.

ERE found in the SNAT2 promoter region. This sequence differs from the consensus by three nucleotides and is unique among other EREs present in several genes, including metabolic genes that also have imperfect palindromic sequences with at least one base pair change (33). Differences between the ERE sequences and their promoter localizations modulate ER transcriptional activity, recruiting different patterns of coactivators (34). Additionally, it has been demonstrated that upstream EREs recruit histone acetyltransferase and/or SWI/SNF complexes, whereas only proximal promoter sequences may be able to recruit mediator complexes (35). Interestingly, in our study of the SNAT2 ERE, we observed that change of the nucleotide “A” to “C” in the 5' palindromic sequence and of the 5' flanking region, to make it resemble that of the consensus ERE, resulted in the loss of GAPDH recruitment to the complex. Thus, transcriptional activation of the SNAT2 gene in the mammary gland to fulfill the elevated demand of amino acids occurs during gestation, a physiological condition with elevated levels of 17 $\beta$ -estradiol to overcome the lower affinity of ER- $\alpha$  to the SNAT2 ERE, which specifically binds the metabolic enzyme GAPDH as a coactivator.

GAPDH was recently found to be a cofactor of transcriptional complexes (36, 37). Zheng Lei et al. demonstrated that p38/GAPDH is an essential Oct-1 CoActivator in S phase specific for histone-2B transcription and that it is modulated by NAD<sup>+</sup>/NADH ratio (38). Several other studies have described the participation of GAPDH in different transcriptional complexes (39–41). However, none of them involves the recruitment of this protein to an ERE-ER- $\alpha$  complex, perhaps indicating a cross-talk with metabolic events as suggested in the present study. Interestingly, we observed an increase in the nuclear abundance of GAPDH, particularly between days 15 and 20 of gestation, and at least cytoplasmic GAPDH concentration depended on the amount of dietary protein consumed.

The expression pattern of other amino acid transporters during gestation is different from SNAT2 (42). The data obtained in this work imply that the regulatory effect of estrogens on the expression of the SNAT2 gene is a unique feature in the transport of amino acids into the mammary gland during this period. It

has been postulated that the inhibition of system A by a systemic infusion of an amino acid analog that cannot be metabolized, 2-(methylamino) isobutyric acid, during gestation resulted in a decrease in fetal weight (43). This previous evidence in addition to the results obtained in this study suggest that SNAT2 plays a significant role in the supply of amino acids, an important function in the mammary epithelium for the differentiation and proliferation of these cells to prepare the gland for lactation.

## Materials and Methods

**Animals.** Female Wistar rats were obtained from the animal research facility at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. The animals were housed and fed as reported (16). For experimental procedure details, see *SI Materials and Methods*.

**Cell Culture, Transient Transfection, and Luciferase Reporter Assays.** HeLa cells were transfected by using the PolyFect transfection reagent according to the manufacturer's manual. Details for the cell-growing conditions and transfection assays are given in *SI Materials and Methods*.

**Preparation of Nuclear Extracts and EMSA.** Nuclear extracts from HeLa cells and rat mammary gland tissue were prepared with the Pierce nuclear extract kit according to the manufacturer's instructions. DNA mobility-shift assays were performed by using the gel shift assay system according to the manufacturer's instructions. For experimental details, see *SI Materials and Methods*.

**ChIP Assay.** Frozen rat mammary glands from virgin control and pregnant rats on days 5, 14, and 20 were used for ChIP assays. Fragmented chromatin from each sample was immunoprecipitated with anti-ER- $\alpha$  or anti-GAPDH antibodies. Details of the technique are given in *SI Materials and Methods*.

**Complex Precipitation and Protein Identification by LC/MS<sup>E</sup>.** ER- $\alpha$ -ERE consensus and ER- $\alpha$ -SNAT2 ERE complexes were precipitated by using desthiobiotin-TEG oligos for the ERE consensus and SNAT2 ERE sites (Table S1). The precipitated proteins were digested with trypsin and prepared for identification by LC/MS<sup>E</sup> or Western blot analysis. Details of the techniques can be found in *SI Materials and Methods*.

**Western Blot Analysis.** Proteins from the complex purification assay or proteins extracted from rat mammary gland using a described method (16) were separated by electrophoresis, transferred onto a poly(vinylidene difluoride)

membrane (Amersham GE Healthcare), and blotted with specific antibodies for protein detection. Details are given in *SI Materials and Methods*.

**Immunohistochemistry.** For the immunohistochemistry experiments, rat mammary gland was obtained from gestation day 20. Tissue sections 4 mm thick, embedded in paraffin, were mounted on polarized slides for immunohistochemistry detection (details are in *SI Materials and Methods*). The slides were analyzed by using the Leica QWin image-analyzer system on a Leica DMLS microscope.

- Viña J, Puertes IR, Saez GT, Viña JR (1981) Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. *FEBS Lett* 126(2):250–252.
- Mackenzie B, Erickson JD (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflügers Arch EJP* 447(5):784–795.
- Hatanaka T, et al. (2000) Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 1467(1):1–6.
- Tovar AR, Avila E, DeSantiago S, Torres N (2000) Characterization of methylaminoisobutyric acid transport by system A in rat mammary gland. *Metabolism* 49(7):873–879.
- Yao D, et al. (2000) A novel system A isoform mediating Na<sup>+</sup>/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem* 275(30):22790–22797.
- Hyde R, Taylor PM, Hundal HS (2003) Amino acid transporters: Roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J* 373(Pt 1):1–18.
- Ortiz V, et al. (2011) Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(6):E1092–E1102.
- Hatanaka T, Hatanaka Y, Tsuchida J, Ganapathy V, Setou M (2006) Amino acid transporter ATA2 is stored at the trans-Golgi network and released by insulin stimulus in adipocytes. *J Biol Chem* 281(51):39273–39284.
- Hatanaka T, Huang W, Martindale RG, Ganapathy V (2001) Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. *FEBS Lett* 505(2):317–320.
- Hyde R, Peyrollier K, Hundal HS (2002) Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 277(16):13628–13634.
- Jones HN, Ashworth CJ, Page KR, McArdle HJ (2006) Cortisol stimulates system A amino acid transport and SNAT2 expression in a human placental cell line (BeWo). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(3):E596–E603.
- López A, et al. (2006) Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(5):E1059–E1066.
- Bhat HK, Vadgama JV (2002) Role of estrogen receptor in the regulation of estrogen induced amino acid transport of System A in breast cancer and other receptor positive tumor cells. *Int J Mol Med* 9(3):271–279.
- Feng Y, Manka D, Wagner KU, Khan SA (2007) Estrogen receptor- $\alpha$  expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(37):14718–14723.
- Brisken C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12):a003178.
- Velázquez-Villegas LA, Tovar AR, López-Barradas AM, Torres N (2013) The dietary protein/carbohydrate ratio differentially modifies lipogenesis and protein synthesis in the mammary gland, liver and adipose tissue during gestation and lactation. *PLoS ONE* 8(7):e69338.
- Baratta M, et al. (2000) Role of androgens in proliferation and differentiation of mouse mammary epithelial cell line HC11. *J Endocrinol* 167(1):53–60.
- Lain KY, Catalano PM (2007) Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 50(4):938–948.
- Lemay DG, Neville MC, Rudolph MC, Pollard KS, German JB (2007) Gene regulatory networks in lactation: Identification of global principles using bioinformatics. *BMC Syst Biol* 1:56.
- Neville MC, McFadden TB, Forsyth I (2002) Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(1):49–66.
- Roh SG, Baik MG, Choi YJ (1994) The effect of lactogenic hormones on protein synthesis and amino acid uptake in rat mammary acinar cell culture at various physiological stages. *Int J Biochem* 26(4):479–485.
- Shang ZZ, et al. (2014) Differentially expressed genes and signalling pathways are involved in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to 17- $\beta$ -estradiol. *Int J Oral Sci*, 10.1038/ijos.2014.2.
- Ding L, et al. (2013) Association of cellular and molecular responses in the rat mammary gland to 17 $\beta$ -estradiol with susceptibility to mammary cancer. *BMC Cancer* 13:573.
- Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7(8):497–508.
- Deroo BJ, et al. (2009) Profile of estrogen-responsive genes in an estrogen-specific mammary gland outgrowth model. *Mol Reprod Dev* 76(8):733–750.
- Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA (2004) Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(11):3739–3746.
- Stingl J (2011) Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm Cancer* 2(2):85–90.
- Riggs TR, Pan MW, Feng HW (1968) Transport of amino acids into the estrogen-primed uterus. I. General characteristics of the uptake in vitro. *Biochim Biophys Acta* 150(1):92–103.
- Cimarosti H, et al. (2005) Hypoxic preconditioning in neonatal rat brain involves regulation of excitatory amino acid transporter 2 and estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 385(1):52–57.
- Hissin PJ, Hilf R (1979) Effects of estrogen to alter amino acid transport in R3230AC mammary carcinomas and its relationship to insulin action. *Cancer Res* 39(9):3381–3387.
- Ju BG, et al. (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312(5781):1798–1802.
- Zhang F, et al. (2013) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is a key regulator of estrogen receptor  $\alpha$ -dependent gene transcription. *J Biol Chem* 288(16):11348–11357.
- Bourdeau V, et al. (2004) Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 18(6):1411–1427.
- Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J (2004) Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 33(2):387–410.
- Topalidou I, Thireos G (2003) Gcn4 occupancy of open reading frame regions results in the recruitment of chromatin-modifying complexes but not the mediator complex. *EMBO Rep* 4(9):872–876.
- Sirover MA (2005) New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 95(1):45–52.
- Colell A, Green DR, Ricci JE (2009) Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ* 16(12):1573–1581.
- Zheng L, Roeder RG, Luo Y (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114(2):255–266.
- Claeysens S, et al. (2003) Amino acid control of the human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene transcription in hepatocyte. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(5):G840–G849.
- Harada N, et al. (2007) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 282(31):22651–22661.
- Meyer-Siegler K, et al. (1991) A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(19):8460–8464.
- Alemán G, López A, Ordaz G, Torres N, Tovar AR (2009) Changes in messenger RNA abundance of amino acid transporters in rat mammary gland during pregnancy, lactation, and weaning. *Metabolism* 58(5):594–601.
- Cramer S, Beveridge M, Kilberg M, Novak D (2002) Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(1):C153–C160.



# The Dietary Protein/Carbohydrate Ratio Differentially Modifies Lipogenesis and Protein Synthesis in the Mammary Gland, Liver and Adipose Tissue during Gestation and Lactation

Laura A. Velázquez-Villegas, Armando R. Tovar, Adriana M. López-Barradas, Nimbe Torres\*

Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México, D.F., México

## Abstract

During gestation and lactation, a series of metabolic changes that are affected by the diet occurs in various organs of the mother. However, little is known about how the dietary protein (DP)/carbohydrate (DCH) ratio regulates the expression of metabolic genes in the mother. Therefore, the purpose of this work was to study the effect of consuming different percentages of DP/DCH, specifically 10/73, 20/63 and 30/53%, on the expression of genes involved in lipogenesis and protein synthesis in the mammary gland, liver and adipose tissue during gestation and lactation in dams. While the amount of weight gained during gestation was similar for all groups, only dams fed with 30/53% DP/DCH maintained their weight during lactation. In the mammary gland, the expression of the genes involved in lipogenesis, specifically SREBP1 and FAS, was dramatically increased, and the expression of the genes involved in protein synthesis, such as mTOR1, and the phosphorylation of its target protein, S6K, were also increased throughout pregnancy and lactation, regardless of the concentration of DP/DCH. In the liver and adipose tissue, the expression of the genes and proteins involved in lipid metabolism was dependent on the proportion of DP/DCH. The consumption of a low-protein/high-carbohydrate diet increased the expression of lipogenic genes in the liver and adipose tissue and the amount of lipid deposition in the liver. Conversely, the consumption of a high-protein/low-carbohydrate diet increased the expression of genes involved in amino acid oxidation in the liver during gestation. The metabolic adaptations reflected by the changes in the expression of metabolic genes indicate that the mammary gland has a priority for milk synthesis, whereas the adaptations in the liver and adipose tissue are responsible for providing nutrients to the mammary gland to sustain milk synthesis.

**Citation:** Velázquez-Villegas LA, Tovar AR, López-Barradas AM, Torres N (2013) The Dietary Protein/Carbohydrate Ratio Differentially Modifies Lipogenesis and Protein Synthesis in the Mammary Gland, Liver and Adipose Tissue during Gestation and Lactation. PLoS ONE 8(7): e69338. doi:10.1371/journal.pone.0069338

**Editor:** Miguel López, University of Santiago de Compostela School of Medicine - CIMUS, Spain

**Received:** February 20, 2013; **Accepted:** June 8, 2013; **Published:** July 16, 2013

**Copyright:** © 2013 Velázquez-Villegas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: nimbester@gmail.com

## Introduction

Several morphological and physiological changes occur in the mammary gland during the processes of gestation and lactation [1–4]. During gestation, there is an increase in the formation of the epithelial cells, which are involved in milk synthesis, from mammary fat cells [5]. During this stage, several hormones are involved in the regulation of the expression of specific genes to prepare the mammary gland for a successful lactation period [6–12]. During lactation, there is a sharp increase in the synthesis of the components of the milk, particularly proteins, lipids and lactose, in the epithelial cells in the mammary gland [13].

To sustain all the metabolic adaptations that occur during gestation and lactation in the mammary gland, the supply of nutrients to the dam is essential. It has been demonstrated that food restriction during these periods can modify the outcome of lactation. Food deprivation or the consumption of a low-energy diet during gestation and lactation has been shown to reduce or stop milk synthesis and secretion [14–16]. Therefore, the amount and quality of the diet have profound effects on milk synthesis [17]. In addition to the diet, during short periods of time, the body

organs of the dam can also supply nutrients to the mammary gland for the differentiation of cells during gestation, mainly for the synthesis of milk components during lactation. It is known that the liver and the adipose tissue can actively participate in the supply of nutrients to the mammary gland [18–22].

To prepare the mammary gland for gestation and lactation, it is known that the regulation of the expression of genes coding for the transcription factors and enzymes involved in anabolic and catabolic processes is required [13,23–27]. In particular, these include genes involved in lipogenesis (SREBP-1c and fatty acid synthase FAS) [28], protein synthesis (mTOR) [29], glyceroneogenesis (PEPCK) [30], and fatty acid oxidation (CPT-1) [26]. In addition, the supply of nutrients may also regulate the phosphorylation state of proteins involved in the activation of protein synthesis (S6K) via mTOR [31,32] and the energy status of the cell via adenosine monophosphate kinase (AMPK) [33,34]. The correct activation of these pathways leads to optimal milk synthesis and secretion. This has been confirmed by numerous studies that have demonstrated that these and other genes are actively regulated during the gestation and lactation stages [13,23–27]. In addition, the expression of several of these genes is regulated in

**Table 1.** Composition of the experimental diets used in this study.

Ingredients	Percentage (%) of dietary protein/dietary carbohydrates			
	g/kg diet	10/73	20/63	30/53
Casein <sup>a</sup>		100.0	200.0	300.0
Dextrose <sup>a</sup>		152.5	132.0	107.3
Sucrose		115.3	100.0	100.0
Starch <sup>a</sup>		460.0	397.5	322.1
Soy oil		70.0	70.0	70.0
Mineral mix <sup>b</sup>		35.0	35.0	35.0
Vitamin mix <sup>c</sup>		10.0	10.0	10.0
L-cystine		3.0	3.0	3.0
Choline citrate		2.5	2.5	2.5
Cellulose		50.0	50.0	50.0

<sup>a</sup>Teklad test diets.

<sup>b</sup>Rogers-Harper, Teklad test diets.

<sup>c</sup>Vitamin mix, Teklad 40060 (milligrams per kilogram diet): p-aminobenzoic acid, 110; ascorbic acid, 991; biotin, 0.4; vitamin B12, 30; calcium pantothenate, 66; choline dihydrogen citrate, 3497; folic acid, 2; inositol, 110; menadione, 50; niacin, 99; pyridoxine HCl, 22; riboflavin, 22; thiamin HCl, 22; vitamin A palmitate, 40; cholecalciferol, 4; and vitamin.

doi:10.1371/journal.pone.0069338.t001

a different manner in the liver, adipose tissue and mammary gland [19,21,22].

However, there is scarce evidence regarding whether the proportion of dietary protein (DP) and dietary carbohydrates (DCH) can regulate the expression, protein abundance and the phosphorylation state of proteins involved in the metabolic adaptations that take place in the mammary gland, the liver and adipose tissue and their subsequent effects on protein synthesis and lipid and amino acid metabolism during gestation and lactation. Thus, the aim of this work was to study these adaptations in the mammary gland, liver and adipose tissue of dams fed diets containing different percentages of DP/DCH, 10/73%, which does not meet the protein requirement, 20/63%, which constitutes an adequate protein requirement [35], or 30/53%, which is a high-protein diet that contains an excess of amino acids, during gestation and lactation. Our results demonstrate that the regulation of some processes are responsive to the proportion of DP/DCH, particularly in the liver and adipose tissue, whereas the mammary gland is an anabolic organ that expresses most of the metabolic genes in a similar fashion, independent of the DP/DCH ratio.

**Materials and Methods**

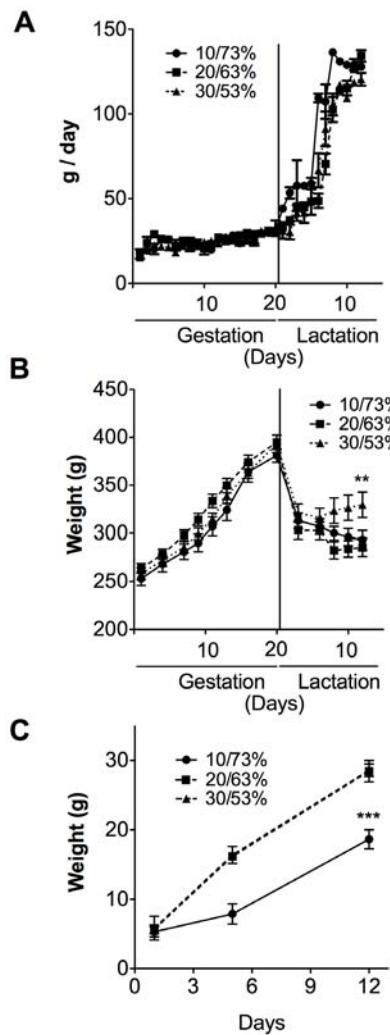
**Animals**

Female Wistar rats weighing 200 to 250 g were obtained from the animal research facility at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. The animals were housed in individual stainless steel cages at 18°C with a 12:12 h light-dark cycle. The animals were allowed free access to water and low-protein/high-carbohydrate (10/73%), normal-protein/normal-carbohydrate (20/63%) or high-protein/low-carbohydrate (30/53%) diets (Table 1). Gestational age was determined by vaginal smear to detect spermatozoa. Adipose tissue, liver and mammary gland tissues were obtained from virgin rats, rats that had been pregnant for 5, 14 and 20 days, and rats that had been lactating for 5 and 12

days. After normal pregnancy and delivery, the litter size was adjusted to 8 pups per dam. The food intake of the dam was recorded daily, and the dams and pups were weighed every 3 days. Non-pregnant, non-lactating rats were used as control and were killed in their diestrus 2 period, to have no relevant hormonal changes between animals inside the group and are referred to as “virgin rats.” This study was approved by the Animal Care Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México, in accordance with international guidelines for the use of animals in research.

**Quantitative Real-Time PCR**

Total RNA was extracted from mammary gland, liver and adipose tissue by the guanidinium thiocyanate-cesium chloride method [36]. The RNA concentrations were measured using a Nanodrop spectrophotometer 1000 (ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA (3 µg) was reverse-transcribed to cDNA by the use of Moloney murine leukemia virus (MMLV)



**Figure 1.** Food intake, body weight of dams fed different proportions (10/73, 20/63 or 30/53%) of dietary protein/dietary carbohydrate (DP/DCH) during gestation and lactation, as well as the pups’ weight gain. (A) The food intake, (B) weight gain of dams and (C) weight gain of pups from dams fed different proportions of DP/DCH (10/73, 20/63 or 30/53%) during gestation and lactation. The Values are mean ± SEM. n = 5. \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0069338.g001

reverse transcriptase (Invitrogen). For the real-time quantitative PCR analyses, 300 ng of cDNA was used in a final reaction volume of 10  $\mu$ l per reaction. Predesigned TaqMan Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) probes for fatty acid synthase (FAS Rn00569117\_m1), hormone-sensitive lipase (HSL Rn00689222\_m1), mechanistic target of rapamycin (mTOR Rn00571541\_m1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK Rn01529014\_m1), pyruvate kinase (PK1 Rn00561764\_m1), serine dehydratase (SDH Rn00588631\_m1), and sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1 Rn01495769\_m1) were used. The Taqman Universal Master Mix was also provided by Applied Biosystems. The PCR scheme used was 48°C for 30 min, 95°C for 10 min, and then 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. The amplification and detection of specific products was performed with the ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). The mRNA levels of the genes analyzed were normalized to the Hprt (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) or beta-actin genes using the TaqMan probes Rn01527840\_m1 and Rn00667869\_m1, respectively, which were also obtained from Applied Biosystems. The relative amounts of all mRNAs were calculated using the comparative CT method (User Bulletin no. 2; PE Applied Biosystems).

### Western Blot

Proteins were extracted from the tissues using RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Lysis Buffer containing the following: 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoxycholate, and 1 mM PMSF. We added 1x Roche complete mini protease inhibitors. The protein concentration was measured in duplicate using the Bradford method. Before being loaded, the samples were prepared by mixing 40  $\mu$ g of protein with Laemmli buffer in a 1:1 ratio and heated at 80°C for 5 min.

The proteins were separated by electrophoresis on a polyacrylamide gel (8%), and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham GE Healthcare). For gel electrophoresis and semi-dry transfer, we used a Tris/Glycine buffer. After transfer, the membranes were blocked with 5% non-fat milk blocking solution with 1x Tris-buffered saline (TBS) and 0.1% Tween 20 for one hour. The membranes were then incubated overnight at 4°C with the different primary antibodies as follows: FAS (Santa Cruz Biotechnology, sc-20140, 1:2000), p70 S6 kinase  $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-230, 1:1000), p-p70 S6 kinase  $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-11759, 1:500), AMPK  $\alpha$ 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-25792, 1:1000), P-AMPK  $\alpha$ 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-33524, 1:500), and actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-1615, 1:1000), which were all diluted in 4 ml 1x TBS, 5% non-fat milk and 0.1% Tween 20. We used different secondary HRP (Horseradish peroxidase) conjugated antibodies as follows: anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004, 1:2000) and anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2768, 1:2000) diluted in 4 ml 1x TBS, 5% non-fat milk and 0.1% Tween 20. The chemiluminescence produced was measured using Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) detection reagents by exposure to X-ray film.

### Hematoxylin Eosin (H/E) Staining

The slides were deparaffinized at 70°C for 10 min. The tissue sections were rehydrated with two changes of xylene for 5 min each, xylene-alcohol (50–50), absolute alcohol and 96% alcohol. The sections were stained in a Harris hematoxylin solution for 8 min and washed in running tap water for 1 min. The slides were differentiated in 1% acid alcohol for 30 sec and washed in running tap water for 1 min, followed by an immersion in saturated lithium carbonate solution for 30 sec to 1 min. After being washed, the

tissue sections were counterstained in eosin solution for 30 seconds to 1 min, dehydrated through 96% alcohol, absolute alcohol, xylene-alcohol (50–50) and xylene, and mounted with a xylene-based mounting medium.

### Statistical analysis

The results are reported as the means  $\pm$  SEM. For biochemical parameters, the effect of time  $\times$  % protein interaction was analyzed using a repeated-measures ANOVA to assess the main effects (Prism 5 for Mac OS X). The body weight and gene expression data were tested using a 1-way ANOVA, and significant differences among groups were analyzed by Bonferroni adjustments. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

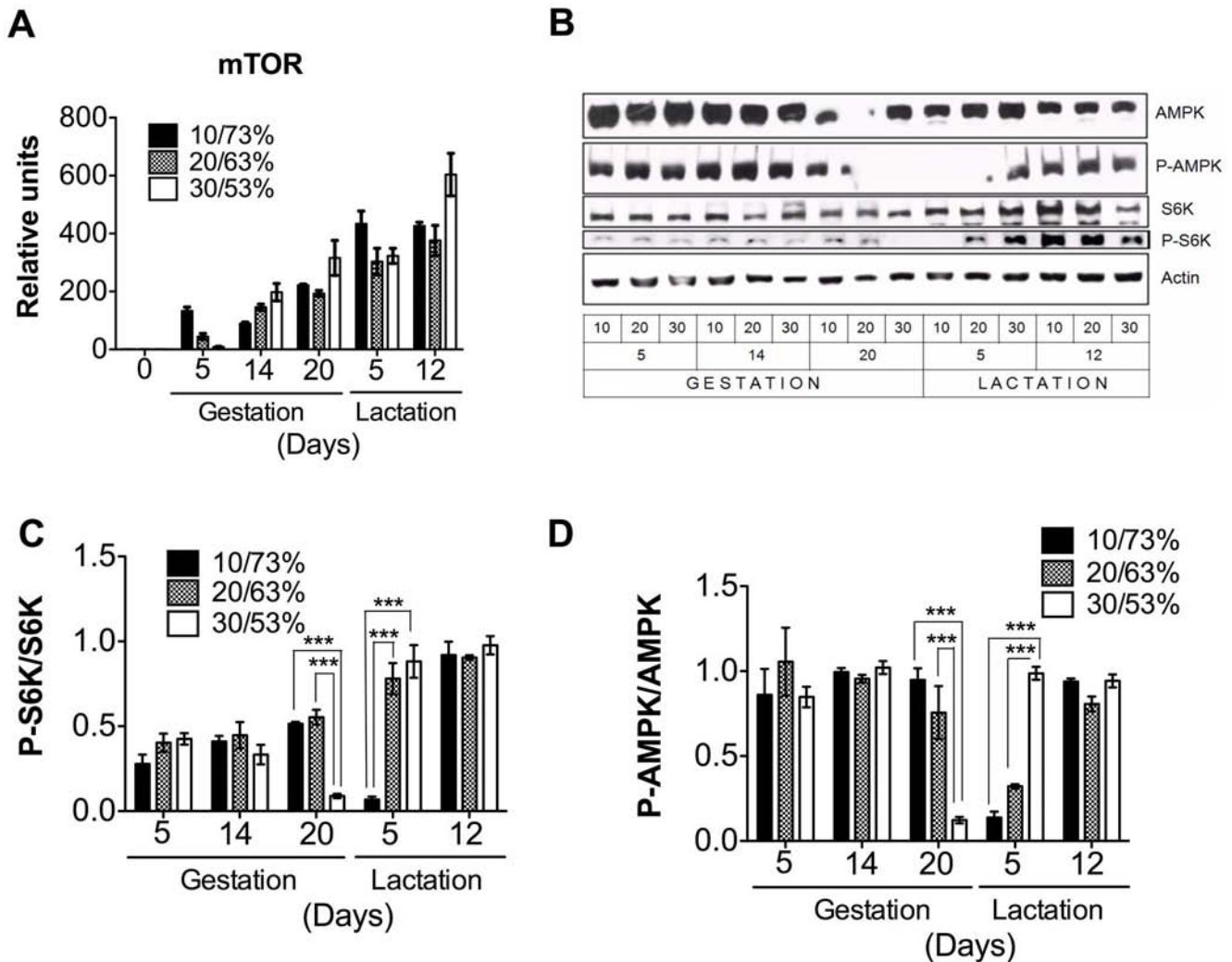
## Results

### Serum Glucose and Insulin but no Leptin Concentrations during Gestation and Lactation are Modified by DP/DCH Ratio

During gestation and lactation, there were fluctuations in the serum glucose and insulin concentrations that depended of the DP/DCH ratio and the stage of gestation and lactation. This pattern was very irregular and did not show a specific trend for either gestation or lactation. On the other hand, only serum leptin concentration showed a significant change with the stage of gestation or lactation. During gestation, rats fed 10/73, 20/63 and 30/53% DP/DCH showed normal serum leptin concentrations that were increasing and reaching a peak at gestation day 20 (10  $\mu$ g/L), subsequently leptin values decreased during lactation returning to normal concentrations. However, the serum leptin concentration was not significantly affected by the proportion of DP/DCH consumed by the dams (data not shown).

### The Proportion of Dietary Protein/Dietary Carbohydrate Affects the Weight Gain of Dams during Lactation and the Weight Gain of Offspring

To study the effect of the proportion of DP/DCH on the metabolic adaptations in the dams, food intake and weight gain were monitored during pregnancy and lactation. Food intake consumed during gestation was not significantly different among the groups (**Fig. 1a**), although there was a significant difference in the amount of DP/DCH consumed. There were no significant differences in weight gain among the groups fed 10/73, 20/63 and 30/53% DP/DCH during gestation, even on the last day of this period (**Fig. 1b**). These data suggest that the proportion of DP/DCH consumed with either diet was sufficient to sustain the weight gain of the dam during pregnancy (**Fig. 1b**). There was no difference in the body weights of the pups from any dietary group (**Fig. 1c**). However, pups from rats fed 10/73% DP/DCH gained significantly less weight than those fed 20/63 or 30/53% DP/DCH (**Fig. 1c**). Although the dams were consuming 30/53% DP/DCH, which provides an excess of amino acids, the pups gained the same amount of weight compared to pups from dams fed 20/63% DP/DCH. During the lactation period, the difference in the amount of DP had an impact on the dams' and pups' body weight. Rats fed 10/73 or 20/63% DP/DCH continued losing body weight during lactation, whereas dams fed 30/53% DP/DCH maintained their body weight (**Fig. 1b**) ( $p < 0.01$ ). This difference in body weight between the groups during lactation was associated with the amount of protein ingested. By day 12 of lactation, which corresponds to the peak of milk production, the dams fed 10/73, 20/63, and 30/53% DP/DCH consumed  $9.98 \pm 1.06$ ,  $16.13 \pm 2.27$ , and  $24.31 \pm 3.23$  g protein/d, respectively.



**Figure 2. The genes and proteins involved in protein synthesis in the mammary gland of dams fed different proportions (10/73, 20/63 or 30/53%) of dietary protein/dietary carbohydrates (DP/DCH) during gestation and lactation.** (A) The relative mRNA levels of mechanistic target of rapamycin (mTOR). (B) A representative immunoblot of AMP-activated protein kinase (AMPK), threonine phosphorylation of AMP-activated protein kinase (P-AMPK), p70 S6 kinase (S6K), threonine phosphorylation of S6 kinase (P-S6K), and actin. Western blot densitometric analysis of (C) P-S6K/S6K. (D) P-AMPK/AMPK. Values are the mean  $\pm$  SEM of three different blots. n=5. \*\*\*p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0069338.g002

**The Phosphorylation Status of S6K and AMPK is Modulated during Gestation and Lactation**

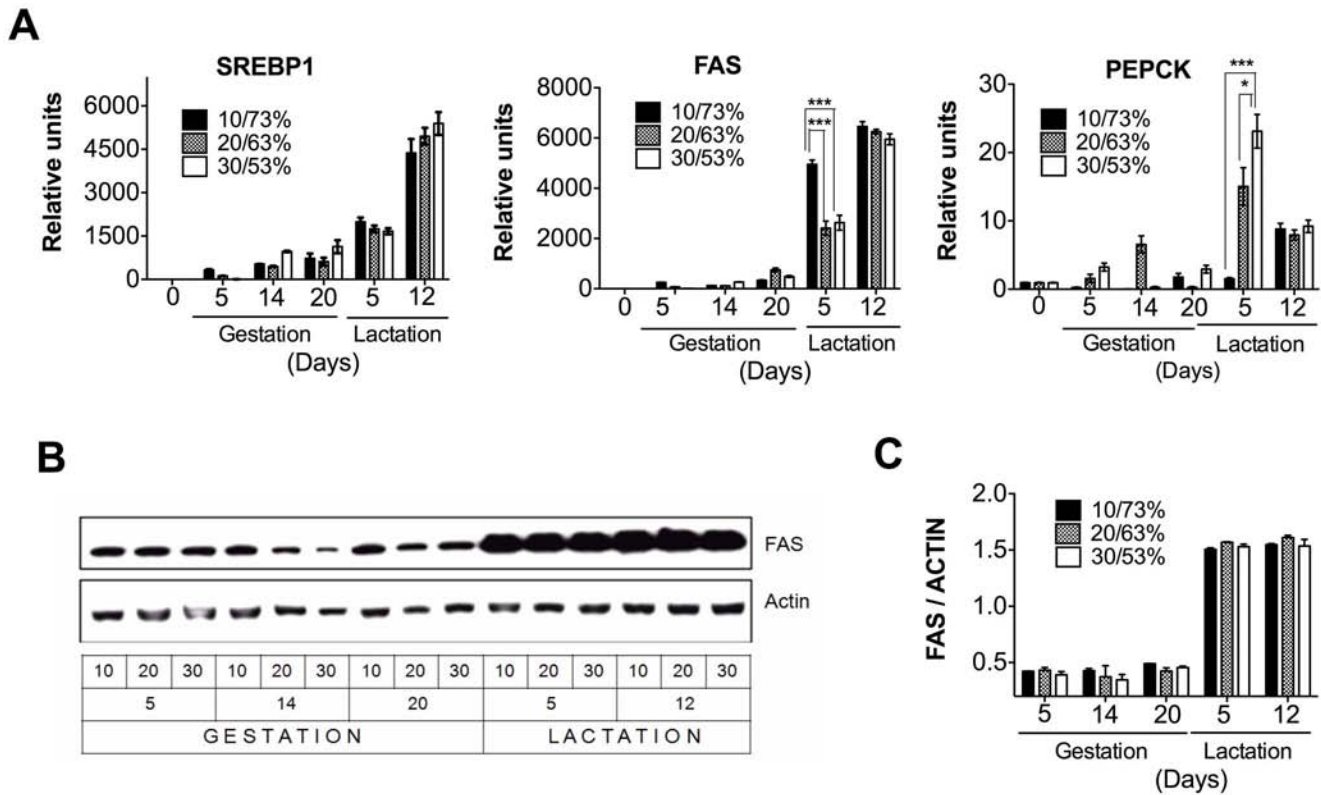
We were interested in studying how the DP/DCH ratio could affect the expression of the key enzyme involved in protein synthesis, mTOR, in the mammary gland. We found that mTOR mRNA levels (Fig. 2a) showed a steady increase from gestation to lactation. Interestingly, despite the differences in the proportion of DP/DCH consumed, there was no significant difference among the groups in both stages. In addition, we measured the level of phosphorylation of S6K, a target protein of mTOR. We found that the phosphorylation levels of S6K significantly decreased in the transition from gestation to lactation, and it depended on the proportion of DP/DCH, the higher the amount of DP the sooner the decrease in S6K phosphorylation. We do not have a clear explanation for why the phosphorylation state of S6K in the mammary gland of rats fed 20/63% DP/DCH did not change. Nonetheless, at the peak of lactation, the levels of phosphorylated S6K was independent of the proportion of DP/DCH and was at its highest level, indicating, as expected, that the rate of protein

synthesis was highest during this period (Fig. 2b, c). Furthermore, we examined whether the energy status of the mammary gland changed during gestation or lactation in response to the proportion of DP/DCH consumed. Thus, we measured the phosphorylation state of the AMPK. Interestingly, the phosphorylation status of AMPK was quite constant during both periods, with a sharp decrease around delivery. However, by day 12 of lactation, the phosphorylation status of AMPK reached a steady level, indicating a plateau in the energy state of the mammary gland (Fig. 2b, d). This is in agreement with previous studies that have shown that the phosphorylation of AMPK, which supports anabolic processes such as lipogenesis and lactose synthesis, is not increased during lactation [34].

**The Expression of Lipogenic Genes is not Affected by the Proportion of DP/DCH during Lactation but PEPCK Expression in the Mammary Gland is Modified**

Our data (Fig. 3a, b, c) clearly show the importance of the regulation of lipogenesis in the mammary gland. During gestation,





**Figure 3. The genes and proteins involved in lipogenesis in the mammary gland of dams fed different proportions (10/73, 20/63 or 30/53%) of dietary protein/dietary carbohydrate (DP/DCH) during gestation and lactation.** (A) The relative mRNA levels of sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FAS), and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). (B) Representative immunoblot of FAS and actin. (C) Western blot densitometric analysis of FAS/ACTIN. Values are the mean  $\pm$  SEM of three different blots. n=5. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0069338.g003

the expression of the sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), a key transcription factor involved in fatty acids biosynthesis, was slightly increased. Conversely, during lactation, SREBP1 was dramatically increased by 5000 fold (Fig. 3a). Fatty acid synthase (FAS), the target gene of SREBP1, also showed a dramatic increase in mRNA and protein abundance during lactation (Fig. 3a, b, c). Although we find a significant increase in FAS mRNA levels in the 10/73% DP/DCH group, we did not find significant differences in protein abundance among the three groups indicating that the response was independent of the proportion of DP/DCH. The highest expression of these lipogenic genes occurred at day 12, during the peak of lactation in which we did not find significant difference in mRNA levels and protein abundance among the three groups. Interestingly, we observed significant differences in the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) on day 5 of lactation as the amount of DP increased (Fig. 3a).

**An Excess of DP Increased CPT-1 mRNA Expression in the Mammary Gland only during Gestation**

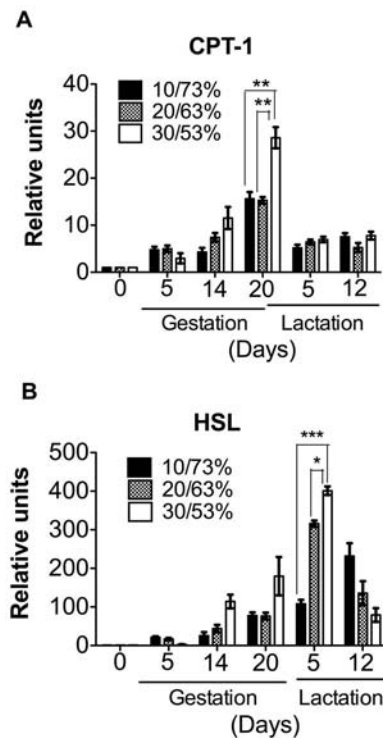
We then explored whether the consumption of different proportions of DP/DCH could change the expression of genes involved in fatty acid oxidation. Our data showed that the expression of carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) showed a gradual increase during gestation, reaching a peak at delivery in the three different experimental groups (Fig. 4a). However, rats fed 30/53% DP/DCH showed a significant increase in the expression of CPT-1 with respect to groups fed 10/73 or 20/63%

DP/DCH. After delivery, CPT-1 expression rapidly decreased at day 5 of the lactation period (Fig. 4a), indicating that a high-protein/low-carbohydrate diet (30/53% DP/DCH) exceeds the amino acid requirements during gestation but not during lactation. In addition, the expression of hormone-sensitive lipase (HSL) significantly increased during gestation in the rats fed 30/53% DP/DCH reaching its maximal peak of expression on day 5 of lactation and then rapidly decreased on day 12 of lactation (Fig. 4b).

**Expression of Genes Involved in Lipogenesis and Protein Synthesis in the Liver and Adipose Tissue did not Increase in a Similar Manner to the Mammary Gland**

We did not know whether these adaptations observed in the mammary gland occurred in other organs during the gestation and lactation periods. During gestation and lactation, the liver of rats showed a different pattern of expression of metabolic genes compared to the mammary gland. Glycolytic (PK) and lipogenic (FAS) enzymes and SREBP1 were highly expressed after the consumption of a low-protein diet, most likely due to the composition of the diet that was 10% protein and 73% carbohydrates. However, during the consumption of adequate proportion (20/63% DP/DCH) or high proportion of protein (30/53% DP/DCH) diets, the expression of these genes remained constant (Fig. 5a). Similarly, protein abundance of FAS was higher in the group fed 10/73% DP/DCH than those fed 20/63 or 30/53% DP/DCH (Fig. 5b,c) The elevated expression of lipogenic genes in the liver of rats fed 10/73% DP/DCH was





**Figure 4. The expression of genes involved in lipid oxidation and lipolysis in the mammary gland of dams fed different proportions (10/73, 20/63 or 30/53%) of dietary protein/dietary carbohydrates (DP/DCH) during gestation and lactation.** (A) The relative mRNA levels of carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1) and (B) hormone sensitive lipase (HSL). Values are the mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0069338.g004

associated with the development of fatty liver during lactation (Fig. 5d). S6K phosphorylation that is one of the target proteins of mTOR1 was largely unchanged during gestation and lactation by the different proportions of DP/DCH (Fig. 5b, e). The energy status of the liver cells, as represented by the phosphorylated AMPK (P-AMPK)/total AMPK ratio, was slightly increased during lactation (Fig. 5b, f). During gestation, but not during lactation, the expression of the amino acid degrading enzymes, such as serine dehydratase (SDH), was significantly increased only when rats consumed a high protein diet in the group of 30/53% DP/DCH diet (Fig. 5g).

The metabolic adaptations that occur during gestation and lactation in adipose tissue were very similar to those observed in the liver. The expression of lipogenic genes, as well as that of HSL, only increased when rats consumed a low-protein/high-carbohydrate diet (Fig. 6a). In fact, FAS abundance decreased with the progression of gestation and lactation (Fig. 6b, c). During gestation, S6K is fully active after phosphorylation at Thr<sup>389</sup>. At delivery, the phosphorylation of S6K almost disappeared but rapidly increased again during the lactation period, reaching values similar to those observed during gestation (Fig. 6b, d). During the gestation period, AMPK is partially activated by phosphorylation at Thr<sup>172</sup>, but this phosphorylation decreased rapidly during delivery and fully restored during lactation (Fig. 6b, e).

## Discussion

Several studies have shown that nutritionally adverse conditions during pregnancy can lead to physiologic adaptations, including changes in gene expression, to cope with the limited availability of amino acids. However, little is known about the metabolic adaptations that occur in the different organs of the mother during pregnancy and lactation under different proportions of DP/DCH.

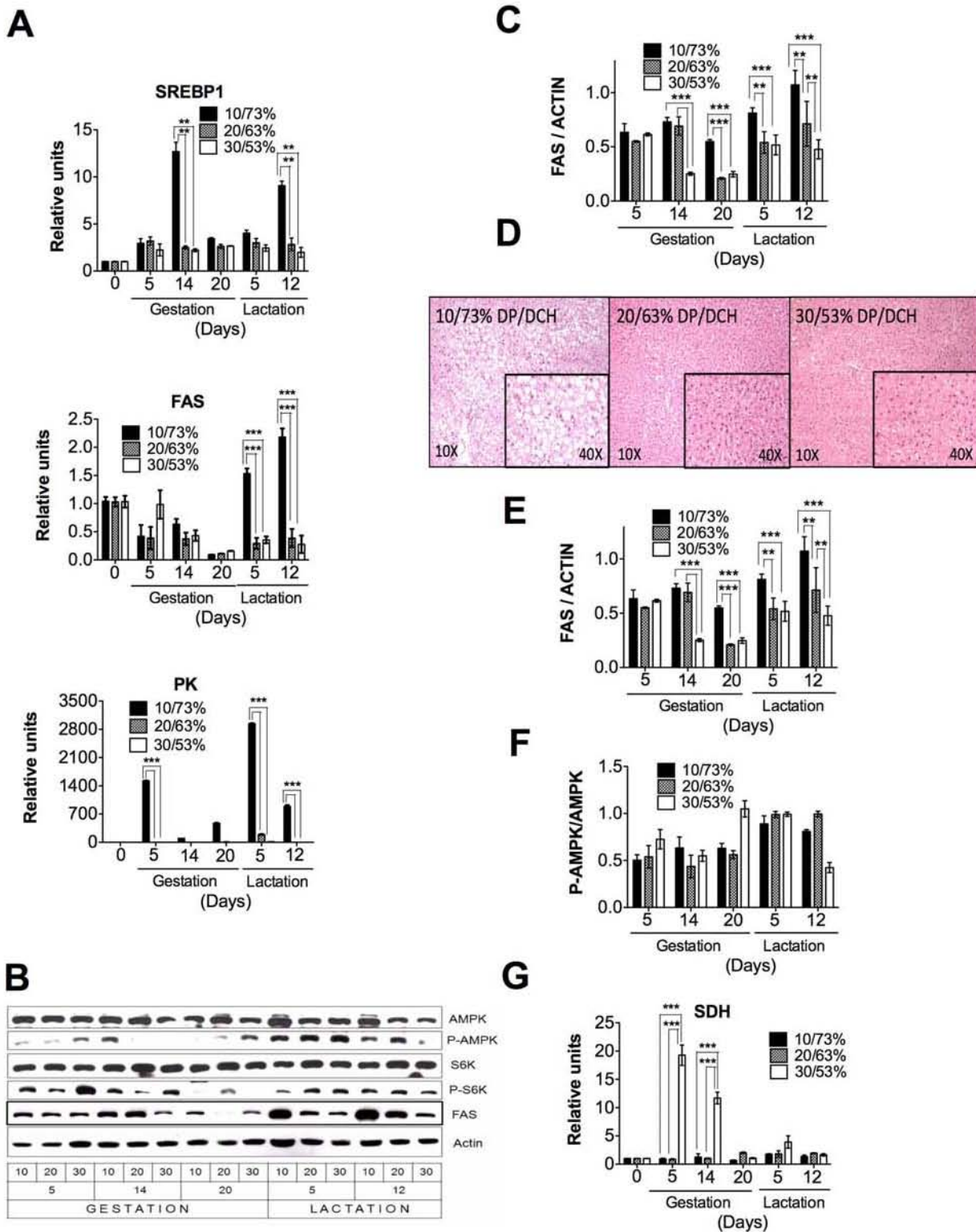
One of the most profound adaptations is in energy homeostasis, where the mother faces the competing needs of meeting her own energy demands, supplying nutrients to the growing fetus, and also establishing a positive energy balance to promote the storage of energy resources in preparation for the large metabolic demands of lactation. The results in the present study show that only dams fed 30/53% DP/DCH have a prompt recovery in their body weight at day 12 of lactation.

In mammary tissue, the onset of gestation promotes the activation of anabolic processes, such as protein synthesis mediated by mTOR1 and the phosphorylation of its target protein S6K, which are barely affected by the DP/DCH ratio, however, it is clear that a low protein 10% DP even when energy is compensated with carbohydrates was not enough to sustain body weight of the dam during lactation.

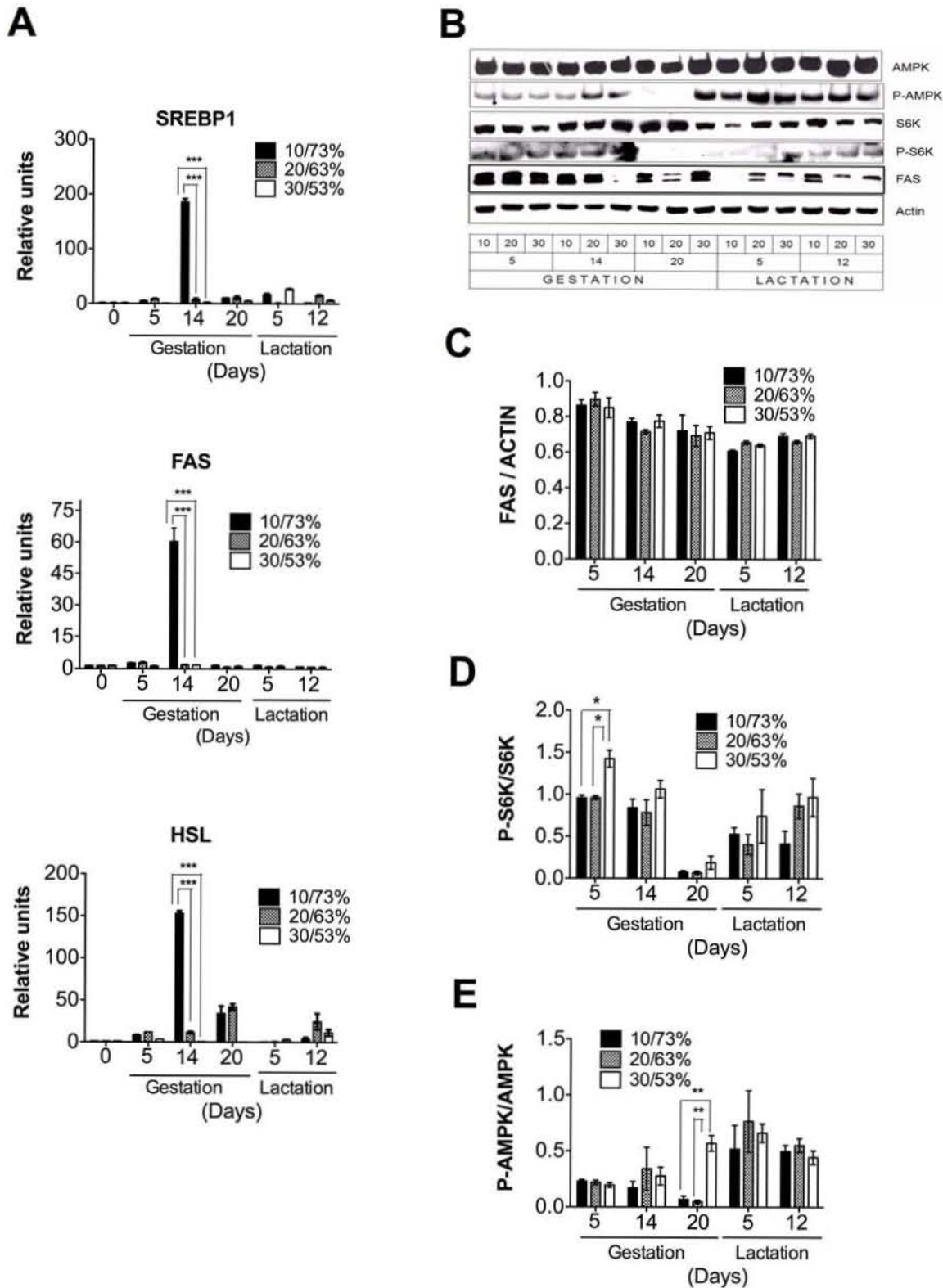
The onset of the lactation period dramatically increases the expression of the lipogenic enzyme FAS mediated by the transcription factor SREBP1, and reduces the expression of the CPT-1 involved in fatty acid oxidation. These results suggest that there is a significant supply of fatty acid to form triglycerides for milk production that will help the newborn gain energy and maintain body temperature [37]. The increase in the expression of lipogenic genes in this tissue was not affected by the proportion of DP/DCH.

The lactating mammary gland is one of the most active triglyceride-synthesizing organs in the body and requires glyceroneogenesis mediated by PEPCK [30]. In the mammary gland, PEPCK may contribute to the milk content by providing the backbone for triglyceride synthesis [30]. Interestingly, our data showed that during lactation, PEPCK expression depends on the DP concentration, which suggests that although the fatty acid synthesis is not affected by the DP/DCH ratio (Fig. 3a), fatty acid esterification may be the limiting step in rats fed the 10% casein diet due to a reduction in the production of glycerol. This, in turn, may result in a decrease in triglyceride formation and therefore, affect the growth rate of the offspring (Fig. 1a).

In contrast, during gestation, we observed a gradual increase in the expression of CPT-1 in the mammary gland reaching a peak of expression immediately before birth, when estradiol levels are the lowest [38]. This suggest that estradiol levels during pregnancy suppress the expression of genes involved in lipid oxidation and promote those of triglyceride synthesis in the mammary gland. However, immediately before birth, the decrease in estradiol levels is associated with a concomitant increase in CPT-1 mRNA expression. Interestingly, our data showed that a high-protein/low-carbohydrate diet results in a more significant CPT-1 mRNA abundance in the mammary gland, (Fig. 4a). In addition, the *in silico* analysis of the rat CPT-1 promoter region that we performed with the MatInspector program for transcription factor binding sites (unpublished observations) showed several putative estrogen response elements (ERE), suggesting that estrogens may directly regulate the transcription of CPT-1. During lactation, there is a decrease in the expression of CPT-1 and these changes are related to the sharp increase in mammary gland lipogenesis, which is needed to synthesize large amounts of triglycerides for milk



**Figure 5. The expression of metabolic genes in the liver of dams fed different proportions (10/73, 20/63 or 30/53%) of dietary protein/dietary carbohydrates (DP/DCH) during gestation and lactation.** (A) The relative mRNA levels of sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FAS), and pyruvate kinase (PK). (B) A representative immunoblot of AMP-activated protein kinase (AMPK), threonine phosphorylation of AMP-activated protein kinase (P-AMPK), p70 S6 kinase (S6K), threonine phosphorylation of S6 kinase (P-S6K), fatty acid synthase (FAS) and actin. (C) Western blot densitometric analysis of FAS/ACTIN. (D) A representative histology picture of the liver of rats fed 10/73, 20/63 or 30/53% DP/DCH at day 5 of lactation. Western blot densitometric analysis of (E) P-S6K/S6K, (F) P-AMPK/AMPK. (G) The relative mRNA levels of serine dehydratase (SDH). Values are the mean  $\pm$  SEM of three different blots.  $n=5$ . \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0069338.g005



**Figure 6. The expression of metabolic genes in the adipose tissue of dams fed different proportions (10/73, 20/63 or 30/53%) of dietary protein/dietary carbohydrates (DP/DCH) during gestation and lactation.** (A) The relative mRNA levels of sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FAS), and hormone sensitive lipase (HSL). (B) A representative immunoblot of AMP-activated protein kinase (AMPK), threonine phosphorylation of AMP-activated protein kinase (P-AMPK), p70 S6 kinase (S6K), threonine phosphorylation of S6 kinase (P-S6K), fatty acid synthase (FAS) and actin. Western blot densitometric analysis of (C) FAS/ACTIN, (D) P-S6K/S6K and (E) P-AMPK/AMPK. Values are the mean  $\pm$  SEM of three different blots. n=5. \*p<0.05, \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0069338.g006

production. Our results are in agreement with a previous microarray analysis study that reported a decrease in the expression of enzymes of fatty acid oxidation during lactation [26,37].

Interestingly, in the mammary gland, we also observed a steady increase in the expression of hormone-sensitive lipase (HSL) from gestation to lactation, which is important for the hydrolysis of triglycerides in the intestine of the newborn, because HSL is secreted into the milk [39]. Our study also showed that the increase of HSL depended also of the proportion of DP/DCH consumed.

The AMPK has emerged as a key nutrient sensor with the ability to regulate whole-body metabolism. Upon activation, AMPK turns on catabolic pathways to restore ATP levels. However, in situations such as gestation, birth and lactation, fatty acid oxidation and lipogenesis seem to be independent of AMPK regulation in the mammary gland, which is in an accelerated anabolic state.

In contrast to the response observed in the mammary gland, it has been reported that other organs of the dam show metabolic adaptations in response to periods of restriction of specific nutrients. In the liver during gestation, the hepatic amino acid degrading enzymes, such as SDH, rapidly increased when rats consumed a high-protein/low-carbohydrate diet to oxidize the excess of amino acids, however, during lactation when the amino acid requirement increases, the oxidation of amino acids decreases to conserve body nitrogen.

Our results also showed that a low-protein/high-carbohydrate diet during pregnancy favors the synthesis of lipids in the liver and adipose tissue, as evidenced by an increase in the expression of SREBP1 and FAS. During lactation, the expression of SREBP1, FAS and PK genes, as well as the protein abundance of FAS, remained elevated in the livers of dams fed a low-protein/high-carbohydrate diet. This favors lipid accumulation, as observed in the histological analysis of the liver on day 5 of lactation. This response may be due to the excess of carbohydrates in the diet,

which activates lipogenesis. In addition, the deficiency of amino acids might reduce Apoprotein synthesis limiting the export of triglycerides into the circulation. This leads to the accumulation of triglycerides caused by the abnormal secretion of very low-density lipoproteins (VLDL) [40], producing a fatty liver.

In adipose tissue, there was a decrease in the expression of FAS and SREBP-1 during lactation (Fig. 6a). During lactation, the expression of lipoprotein lipase (LPL) increased in the mammary gland and decreased in adipose tissue [41]. LPL hydrolyzes chylomicrons and VLDL to remove triglycerides from the circulation and provide fatty acids to different tissues. The net result of the changes of LPL activity during lactation is that the triglycerides available in the circulation are directed to the mammary gland, rather than to adipose tissue to support milk production [42].

Although both the liver and the adipose tissue are capable of de novo fatty acid synthesis, the mammary gland is the main producer of fatty acids in this physiological period [26].

Additionally, the pattern of phosphorylation of AMPK is increased during lactation in this tissue. These results suggest that the role of adipose tissue in this period is to activate the process of lipolysis in order to provide fatty acids to the mammary gland for the synthesis of triglycerides in milk.

In conclusion, although the mammary gland performs a metabolic “switch” in the transition from gestation to lactation, regardless of the DP/DCH ratio, other organs, such as the liver and adipose tissue, do respond to the different proportions of DP/DCH consumed and make the necessary adaptations to supply nutrients to the mammary gland to sustain milk synthesis during lactation.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ART NT. Performed the experiments: LAVV AMLB. Analyzed the data: LAVV ART AMLB NT. Wrote the paper: LAVV ART NT.

## References

- Dulbecco R, Unger M, Armstrong B, Bowman M, Syka P (1983) Epithelial cell types and their evolution in the rat mammary gland determined by immunological markers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1033–1037.
- Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5: 165–185.
- Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM (2000) An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5: 227–241.
- Rudolph MC, McManaman JL, Hunter L, Phang T, Neville MC (2003) Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 287–307.
- Morroni M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De Matteis R, et al. (2004) Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16801–16806.
- Bachelot A, Binart N (2007) Reproductive role of prolactin. *Reproduction* 133: 361–369.
- Baratta M, Grolli S, Poletti A, Ramoni R, Motta M, et al. (2000) Role of androgens in proliferation and differentiation of mouse mammary epithelial cell line HC11. *J Endocrinol* 167: 53–60.
- Baratta M, Grolli S, Tamanini C (2003) Effect of leptin in proliferating and differentiated HC11 mouse mammary cells. *Regul Pept* 113: 101–107.
- Brisken C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003178.
- Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA (2004) Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3739–3746.
- Neville MC, McFadden TB, Forsyth I (2002) Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 49–66.
- Roh SG, Baik MG, Choi YJ (1994) The effect of lactogenic hormones on protein synthesis and amino acid uptake in rat mammary acinar cell culture at various physiological stages. *Int J Biochem* 26: 479–485.
- Lemay DG, Neville MC, Rudolph MC, Pollard KS, German JB (2007) Gene regulatory networks in lactation: identification of global principles using bioinformatics. *BMC Syst Biol* 1: 56.
- Farid M, Baldwin RL, Yang YT, Osborne E, Grichting G (1978) Effects of age, diet and lactation on lipogenesis in rat adipose, liver and mammary tissues. *J Nutr* 108: 514–524.
- Geursen A, Carne A, Grigor MR (1987) Protein synthesis in mammary acini isolated from lactating rats: effect of maternal diet. *J Nutr* 117: 769–775.
- Grigor MR, Allan JE, Carrington JM, Carne A, Geursen A, et al. (1987) Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. *J Nutr* 117: 1247–1258.
- Rius AG, Appuhamy JA, Cyriac J, Kirovski D, Becvar O, et al. (2010) Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids. *J Dairy Sci* 93: 3114–3127.
- Lain KY, Catalano PM (2007) Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 50: 938–948.
- Rawson P, Stockum C, Peng L, Manivannan B, Lehnert K, et al. (2012) Metabolic proteomics of the liver and mammary gland during lactation. *J Proteomics* 75: 4429–4435.
- Smith JL, Lear SR, Forte TM, Ko W, Massimi M, et al. (1998) Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res* 39: 2237–2249.
- Vernon RG (2005) Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res* 72: 460–469.
- Vernon RG, Pond CM (1997) Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2: 231–241.
- Bionaz M, Looor JJ (2008) Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9: 366.
- Bionaz M, Looor JJ (2011) Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. *Bioinform Biol Insights* 5: 83–98.
- Ollier S, Robert-Granic C, Bernard L, Chilliard Y, Leroux C (2007) Mammary transcriptome analysis of food-deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. *J Nutr* 137: 560–567.

26. Rudolph MC, McManaman JL, Phang T, Russell T, Kominsky DJ, et al. (2007) Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol Genomics* 28: 323–336.
27. Shu DP, Chen BL, Hong J, Liu PP, Hou DX, et al. (2012) Global transcriptional profiling in porcine mammary glands from late pregnancy to peak lactation. *OMICS* 16: 123–137.
28. Rudolph MC, Monks J, Burns V, Phistry M, Marians R, et al. (2010) Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E918–927.
29. Appuhamy JA, Knoebel NA, Nayananjalie WA, Escobar J, Hanigan MD (2012) Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *J Nutr* 142: 484–491.
30. Hsieh CW, Huang C, Bederman I, Yang J, Beidelschies M, et al. (2011) Function of phosphoenolpyruvate carboxykinase in mammary gland epithelial cells. *J Lipid Res* 52: 1352–1362.
31. Burgos SA, Dai M, Cant JP (2010) Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Dairy Sci* 93: 153–161.
32. Toerien CA, Trout DR, Cant JP (2010) Nutritional stimulation of milk protein yield of cows is associated with changes in phosphorylation of mammary eukaryotic initiation factor 2 and ribosomal s6 kinase 1. *J Nutr* 140: 285–292.
33. Jiang W, Zhu Z, Thompson HJ (2008) Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. *Cancer Res* 68: 5492–5499.
34. McFadden JW, Corl BA (2009) Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 388–393.
35. Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127: 838S–841S.
36. Lopez A, Torres N, Ortiz V, Aleman G, Hernandez-Pando R, et al. (2006) Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1059–1066.
37. Rudolph MC, Neville MC, Anderson SM (2007) Lipid synthesis in lactation: diet and the fatty acid switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12: 269–281.
38. Weinstein I, Cook GA, Heimberg M (1986) Regulation by oestrogen of carnitine palmitoyltransferase in hepatic mitochondria. *Biochem J* 237: 593–596.
39. Martin-Hidalgo A, Huerta L, Alvarez N, Alegria G, Del Val Toledo M, et al. (2005) Expression, activity, and localization of hormone-sensitive lipase in rat mammary gland during pregnancy and lactation. *J Lipid Res* 46: 658–668.
40. Kwon DH, Kang W, Nam YS, Lee MS, Lee IY, et al. (2012) Dietary protein restriction induces steatohepatitis and alters leptin/signal transducers and activators of transcription 3 signaling in lactating rats. *J Nutr Biochem* 23: 791–799.
41. Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO (1970) Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim Biophys Acta* 210: 473–482.
42. Ling C, Svensson L, Oden B, Weijdegard B, Eden B, et al. (2003) Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1804–1808.