



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Tesis de licenciatura

Efecto de la sobreexpresión de la proteína ISG12 sobre la localización de receptores nucleares para hormonas esteroideas

Que para obtener el título de biólogo

Presenta:

Marlene Herrera Ramírez

Directora de Tesis:

Dra. Angeles C. Tecalco Cruz

Asesor interno:

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez



México, D. F. 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.

---

## **Agradecimientos académicos**

Al **Dr. Alfonso León del Río** por permitirme trabajar en su laboratorio y a la **Dra. Angeles C. Tecalco Cruz** por asesorarme, apoyarme y guiarme en la realización de este proyecto, así como por enseñarme las técnicas empleadas para el mismo. Agradezco las contribuciones y críticas a favor de mi crecimiento académico y profesional.

A la **M. en C. Bibiana Ortega Domínguez** por su contribución en las técnicas experimentales empleadas en este trabajo, por resolver muchas de mis dudas y por corregir mis errores técnicos para la correcta realización del proyecto.

Al **Dr. Miguel Tapia Rodríguez** responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por las fotografías obtenidas de los ensayos de inmunofluorescencias.

Al laboratorio de la Dra. Marina Macias Silva por sus contribuciones en este trabajo. A la **Biól. Marcela Sosa Garrocho** y al **Dr. Jesús Ramírez Santos** por su asesoría en la técnica de inmucitoquímica.

Al **Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín** y a la **Dra. Cristina Castañeda Patlán** por su asesoría técnica y su apoyo en la discusión de este trabajo.

## Comunicado oficial del examen profesional



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna HERRERA RAMÍREZ MARLENE, con número de cuenta 308123698, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de noviembre 2015** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
VOCAL	Dra. ANGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ*
SECRETARIO	M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ
SUPLENTE	Biól. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ
SUPLENTE	M. en C. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

El título de la tesis que presenta es: Efecto de la sobreexpresión de la proteína ISG12 sobre la localización de receptores nucleares para hormonas esteroideas.

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D. F. a 03 de noviembre de 2015  
DR. VÍCTOR MANGEL MENDOZA NÚÑEZ  
DIRECTOR  
DIRECCIÓN

RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

---

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Angeles C. Tecalco Cruz, en el laboratorio B-046 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

---

## Abreviaturas

<b>RNs</b>	Receptores Nucleares
<b>FT</b>	Factor Transcripcional (s)
<b>DBD</b>	DNA Binding Domain
<b>LBD</b>	Ligand Binding Domain
<b>ER</b>	Estrogen Receptor
<b>PR</b>	Progesterone Receptor
<b>AR</b>	Androgen Receptor
<b>RHE</b>	Receptor de Hormonas Esteroideas
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>NES</b>	Nuclear Export Signal
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>F.S.</b>	Fraccionamiento Subcelular
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación de proteínas
<b>WB</b>	Western Blot

---

## Resumen

Los receptores nucleares (RN) son factores de transcripción (FT) inducibles por ligando que participan en procesos como la proliferación y diferenciación celular, por lo que una desregulación en sus mecanismos de control conllevan a patologías como el cáncer. La regulación de la actividad de estos FT está dada por mecanismos diversos entre los que se encuentra la modulación de su localización nuclear. La exportación nuclear de estos FT repercute directamente en sus funciones genómicas, y a pesar de su importancia hasta la fecha es un mecanismo que no ha sido completamente dilucidado. Además, la discusión sobre la existencia o no de una secuencia de exportación canónica para los RN permite la posibilidad de la participación de otras proteínas con función adaptadora para este proceso, al respecto, ISG12 recientemente ha sido postulada como una proteína que participa en la modulación de la localización de un receptor nuclear huérfano, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de la sobreexpresión de ISG12 sobre la localización de otros RN como lo son ER $\alpha$ , PR y AR. La sobreexpresión de ISG12 provocó la disminución de los niveles de estos tres receptores en el núcleo celular en un contexto de cáncer de mama.

---

---

## Índice

<b>I.</b>	<b>Portada</b>	
<b>II.</b>	<b>Agradecimientos</b>	
<b>III.</b>	<b>Comunicado oficial del examen profesional</b>	
<b>IV.</b>	<b>Sitio de elaboración</b>	
<b>V.</b>	<b>Abreviaturas</b>	
<b>VI.</b>	<b>Resumen</b>	
<b>1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>10</b>
1.1	Receptores Nucleares.....	10
1.2	Receptores nucleares para hormonas esteroideas y su vía de señalización genómica.....	12
1.3	Mecanismos de regulación de los RHE.....	15
<b>2.</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>16</b>
2.1	Regulación de la actividad de los RHE a través de su exportación nuclear.....	16
2.2	Los RHE en el contexto de células de cáncer de mama.....	17
2.3	ISG12 como regulador de la actividad de los RN.....	18
2.4	ISG12 y su efecto sobre la actividad de RN.....	19
<b>3.</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>5.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>22</b>



---

---

<b>5.1 Objetivo general.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2 Objetivos particulares.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Estrategia experimental.....</b>	<b>23</b>
<b>7. Material y Métodos.....</b>	<b>25</b>
7.1 Construcción EGFP.....	25
7.2 Línea celular estable.....	28
7.3 Inmunofluorescencia.....	28
7.4 Extractos de proteínas e inmunoprecipitación.....	29
<b>8. Resultados .....</b>	<b>31</b>
8.1 Construcción EGFP-ISG12.....	32
8.2 Línea celular estable.....	36
8.3 Localización subcelular de ISG12 endógena y EGFP-ISG12.....	38
8.4 EGFP-ISG12 afecta la localización nuclear de ER $\alpha$ , PR y AR endógenos de las células MCF7.....	40
8.5 EGFP-ISG12 colocaliza con los tres RHE.....	43
<b>9. Discusión de resultados .....</b>	<b>45</b>
9.1 Construcción EGFP-ISG12.....	46
9.2 MCF7/EGFP-ISG12.....	46
9.3 Localización subcelular de ISG12 endógena y sobreexpresada...	47
9.4 Evaluación de la sobreexpresión de EGFP-ISG12 sobre la abundancia y localización subcelular de RHE ER $\alpha$ , PR y AR.....	47

---

<b>10. Conclusión.....</b>	<b>49</b>
<b>11. Perspectivas.....</b>	<b>50</b>
<b>12. Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
<b>13. Apéndices.....</b>	<b>56</b>
<b>14. Artículo de revisión.....</b>	<b>61</b>

---

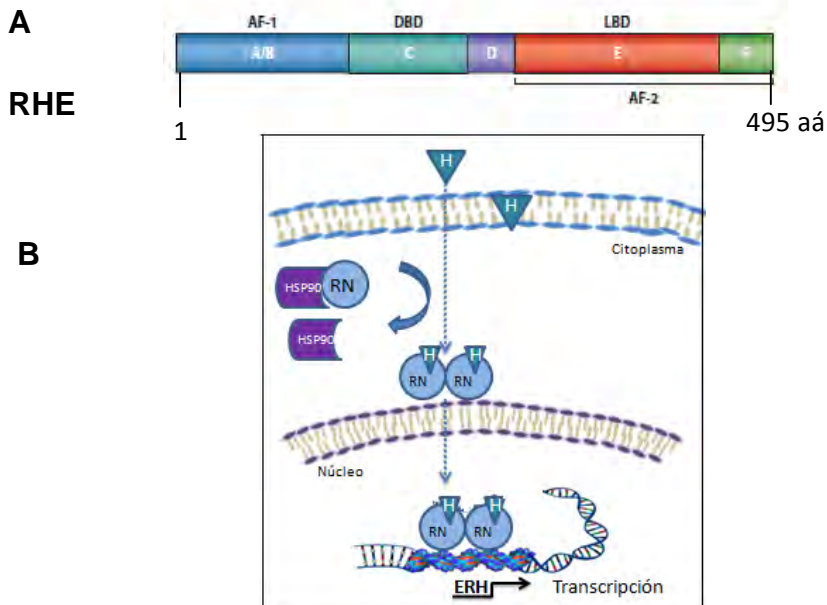
---

# 1. Introducción

## 1.1 Receptores Nucleares

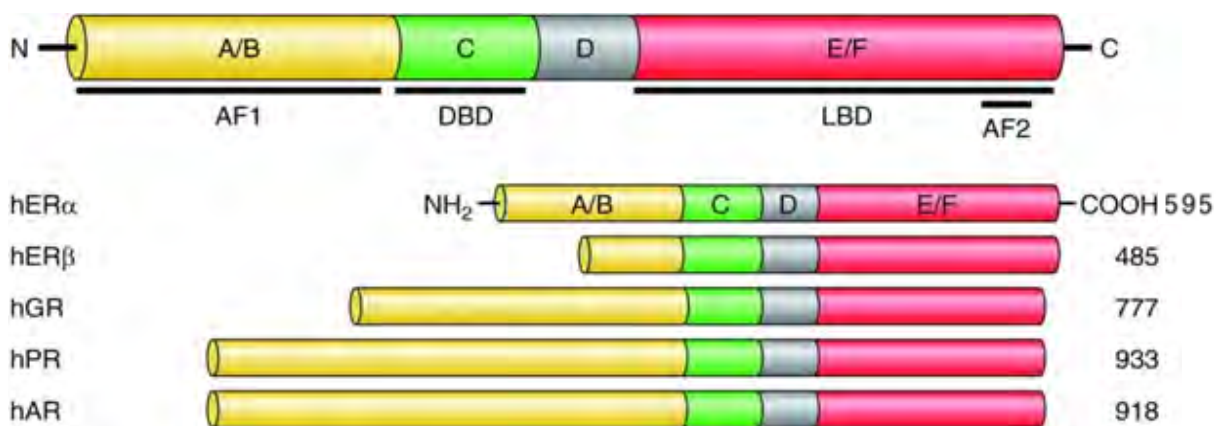
Los receptores nucleares (RN) comprenden una amplia familia de factores transcripcionales (FT) activados por ligandos, los cuales regulan la expresión de un gran número de genes involucrados en el metabolismo, proliferación y diferenciación celular (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003; Bhasin & Raghava, 2004). La expresión de los RN no es ubicua, sino específica de tejido, por lo que, las funciones de los RN dependen del tipo y contexto celular (Wierman, 2007). Los ligandos que reconocen los RN son de naturaleza lipofílica y algunos ejemplos de ellos son las prostaglandinas, las hormonas esteroideas, tiroideas, entre otros, las cuales son transcendentales durante el desarrollo y la homeostasis (Imai *et al.*, 2013; Gadaleta *et al.*, 2015).

Los RN están estructuralmente caracterizados por tener en común 6 dominios denominados con letras de la A a la F, que a su vez, conforman 4 principales dominios, dos de activación transcripcional (AF-1 y AF-2), el dominio de unión a ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD). La actividad del dominio AF-1 es independiente de la unión con el ligando, mientras que la actividad del dominio AF-2 es dependiente del mismo (Figura 1 A) (Bai & Gust, 2009; Liang & Shang, 2013; Sever & Glass, 2013).



**Figura 1. A)** Estructura general de los receptores nucleares de hormonas (RHE). Los RN contienen seis regiones estructural y funcionalmente distintas (A-F), entre las que se encuentran el dominio de unión al ligando (LBD), DBD, AF-1 y AF-2. **B)** Vía de señalización genómica de los RHE. La hormona (H) por su naturaleza lipofílica es capaz de atravesar la membrana plasmática e interactuar con su receptor nuclear, la unión ligando-receptor provoca la disociación de proteínas chaperonas como HSP90, así como la dimerización y translocación al núcleo para su posicionamiento sobre ERH.

Dentro de la estructura general de éstos RN el dominio A/B es el evolutivamente menos conservado, y tiene una longitud variable desde menos de 50 hasta 500 aminoácidos y su estructura tridimensional aún permanece desconocida. El DBD es el dominio evolutivamente más conservado entre los RN y contiene dos dedos de zinc formados por cuatro residuos de cisteína que participan en la unión del dominio al ADN (los receptores nucleares se unen como heterodímeros, homodímeros o monómeros según el tipo de receptor) (Escriva *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010) (Figura 2). El LBD que es el más largo, se encuentra moderadamente conservado y su estructura tridimensional ha sido determinada en varios receptores nucleares, se conforma de 12  $\alpha$ - hélices que forman una hendidura donde se alberga el ligando. Por último el dominio E y F son responsables de muchas funciones principalmente inducidas por el ligando y es una región muy variable dentro de la superfamilia de RN (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003; Vanden, 2009).



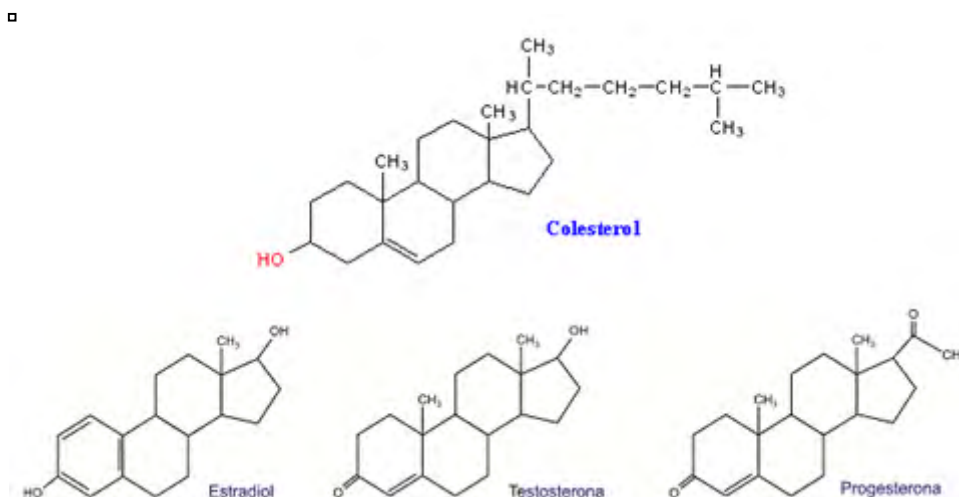
**Figura 2. Dominios de RHE.** El dominio de unión al ADN (verde) se encuentra altamente conservado entre los receptores nucleares (modificado de Imai *et al.*, 2013) y podría estar involucrado en procesos de exportación nuclear para estos receptores

---

---

## 1.2 Receptores nucleares para hormonas esteroideas y su vía de señalización genómica

La superfamilia de RN está organizada en cinco grupos de acuerdo a su tipo de ligando, dentro de los cuales se encuentra el grupo 3 que corresponde a los receptores para hormonas esteroideas (RHE) que incluye a los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR), andrógenos (AR), glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) (Germain *et al.*,2006). Los ligandos de estos RHE son hormonas esteroideas las cuales son lípidos que se sintetizan en diversas glándulas a partir del colesterol (Figura 3, Tabla 1). El estudio de este grupo de RN resulta ser muy importante debido a la cantidad de procesos que regulan en el desarrollo y en la homeostasis así como en diversas enfermedades incluyendo distintos tipos de cáncer (Maruvada *et al.*, 2003). En el presente trabajo, nos enfocaremos al estudio de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR en el contexto de células derivadas de cáncer de mama, ya que estos RHE son importantes en ésta patología como se discutirá más adelante.



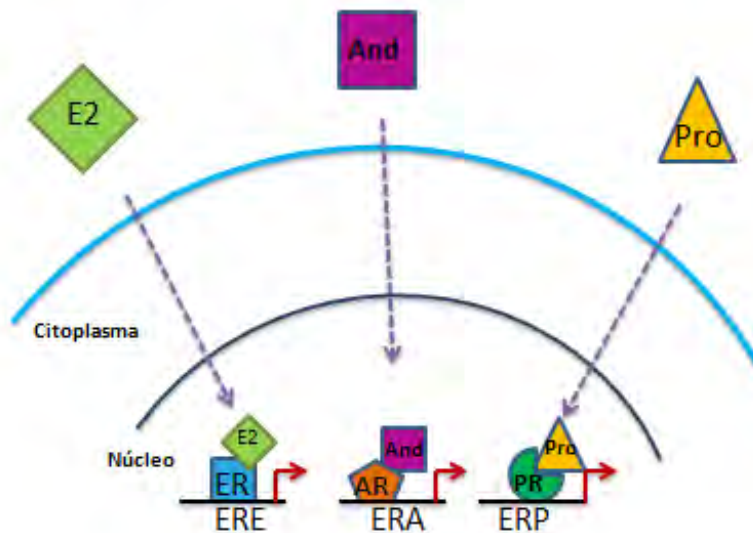
**Figura 3.** Hormonas esteroideas derivadas del colesterol.

Grupo	Receptor Nuclear	Ligandos naturales
<b>Grupo No 3</b> Receptores esteroideos	Estrogen Receptor (ER $\alpha$ )	17 $\beta$ - Estradiol
	Progesterone Receptor (PR)	Progesterona
	Androgen Receptor (AR)	Testosterona
	Glucocorticoid Receptor (GR)	Hidrocortisona
	Mineralocorticoid Receptor (MR)	Aldosterona

**Tabla 1.** Grupo de receptores nucleares para hormonas esteroideas (RHE) y los ligandos naturales de estos RHE

ER $\alpha$ , PR y AR son activados por su ligando específico que corresponde a las siguientes hormonas: 17- $\beta$  estradiol, progesterona y andrógenos respectivamente. Estas hormonas, debido a su naturaleza lipofílica son capaces de atravesar la membrana plasmática e interactuar con su respectivo RN en el citoplasma. La activación de cada RHE por su hormona específica induce cambios conformacionales del RHE, así como su disociación de proteínas chaperonas, dimerización y translocación nuclear (Jin & Li, 2010) (Figura 1B). La acumulación de estos RHE en el núcleo en respuesta a su ligando es un evento crucial en la regulación de la expresión de un gran número de genes debido a que en este compartimento los RHE se unen al ADN en elementos de secuencias palindrómicas conocidos como Elementos de Respuesta a Hormonas esteroideas (ERH) para regular la expresión de sus genes blanco (Olefsky, 2001; Vanden, 2009; Bai & Gust, 2009; Liang & Shang, 2013) (Tabla 2, Figura 4).

□



**Figura 4.** Los ligandos del receptor de estrógenos (E2), Progesterona (Pro) y Andrógenos (And) se unen a su receptor específico que se transloca al núcleo celular donde interactúa con los elementos de respuesta a estrógeno (ERE), progesterona (ERP) y andrógenos (ERA).

Receptor	Secuencia palindrómica
ER $\alpha$	5'AGGTCAnnnTGACCT 3'
PR	5'-AGAACAnnnTGTTCT-3'
AR	5'AGAACA 3'

**Tabla 2.** Elementos de respuesta para hormonas esteroideas (ERH) localizadas en las regiones regulatorias de sus genes blanco

---

### **1.3 Mecanismos de regulación de los RHE**

La actividad de los RHE como FT es regulada a lo largo de la vía de señalización genómica por varios mecanismos, sin embargo, el mecanismo que ha sido más ampliamente estudiado consiste en la modulación de la actividad transcripcional a través de correguladores transcripcionales.

Los correguladores (coactivadores y correpresores) requieren asociarse a los dominios AF-1 o AF-2 para ser reclutados a los ERH localizados en el ADN de sus genes blanco y así contribuir en la modulación de la actividad transcripcional de los RHE (Lonard & O'Malley, 2012). Por un lado, los coactivadores promueven la actividad transcripcional de los RHE a través de su actividad como acetiltransferasas de histonas (HATs, Histone acetyltransferase) debido a que la acetilación es un mecanismo que permite la relajación de la cromatina y la entrada de la maquinaria transcripcional. Por otra parte, los correpresores están asociados al mecanismo opuesto, es decir, a la deacetilación de histonas por las enzimas HDACs (Histone Deacetylase) lo que ocasiona una mayor compactación de la cromatina y una represión en la actividad de estos FT (Bai & Gust, 2009; Jin & Li, 2010).

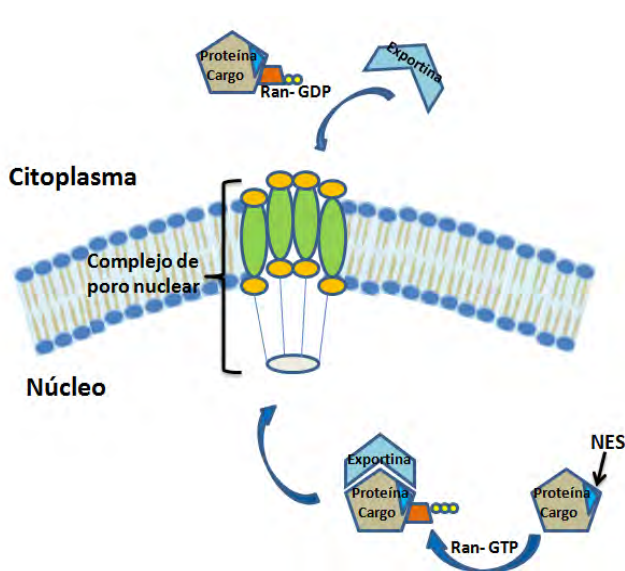
Existen otros mecanismos importantes en regulación transcripcional, por ejemplo las modificaciones postraduccionales como lo son: la fosforilación, ubiquitinación y sumoilación (Anbalagan *et al.*, 2012). La adición de grupos fosfato o la unión de la proteína ubiquitina o sumo a los RHE puede afectar su estabilidad y su función como FT (Sever & Glass, 2013). La salida de los RHE del núcleo al citoplasma es un mecanismo que ha sido poco estudiado y se presume es importante en la modulación de la intensidad y la duración de la actividad transcripcional de éstos RN.



## 2. Antecedentes

### 2.1 Regulación de la actividad de los RHE a través de su exportación nuclear

El recambio de proteínas entre los compartimentos núcleo-citoplasma es un mecanismo importante que controla la función de diversos FT. Generalmente las proteínas para ser transportadas del núcleo al citoplasma requieren presentar secuencias de exportación nuclear o NES consenso, que consisten en una secuencia de 3 a 4 residuos hidrofóbicos ricos en leucina (Black *et al.*, 2001; Kanwai *et al.*, 2002), aunque también existen NES con variaciones pero con función similar denominadas NES no consenso. Estas secuencias permiten la interacción de los RHE con transportadores llamados exportinas que median la exclusión nuclear (Pemberton & Paschal, 2005; Cautain *et al.*, 2015). La formación de un complejo trimérico entre la proteína cargo, la exportina y RanGTP, conduce a la salida de las proteínas del núcleo al citoplasma a través de canales proteicos conocidos como poros nucleares que se localizan en la envoltura nuclear. En el citoplasma, tras la hidrólisis de RanGTP a RanGDP ocurre el desensamble del complejo, liberando a la proteína cargo (Fig 5) (Nguyen *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2012).



**Figura 5. Mecanismo de exportación nuclear.** El proceso de exportación nuclear es dinámico y está mediado por un complejo trimérico entre la Exportina / la proteína cargo y RanGTP. Este complejo interactúa con las proteínas NUPS y atraviesa el CPN (complejo de poro nuclear), una vez en el citoplasma ocurre la hidrólisis de RanGTP a RanGDP y en consecuencia se disocia en complejo y la exportina regresa al núcleo celular.

---

La relevancia del proceso de exportación nuclear en la regulación de la actividad de los receptores ER $\alpha$ , PR y AR no ha sido del todo estudiada. Se sabe que en respuesta a la unión ligando-receptor éstos se localizan principalmente en el núcleo, sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos que controlan la salida de dichos receptores hacia el citoplasma. Los RHE contienen la secuencia de exporte nuclear (NES) no canónicas, que permiten su interacción con exportinas. Las principales exportinas conocidas para estos RHE son CRM-1 y Calreticulina (CRT) (Holaska *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2012; Castoria *et al.*, 2012). La localización de los NES en los RHE es un tema debatido, debido a que existen discrepancias en cuanto a su localización, siendo el LBD y principalmente el DBD los dominios que se presume contienen estas secuencias (Castoria *et al.*, 2012; Kosugi *et al.*, 2014). Debido a la controversia que existe sobre el establecimiento de las secuencias NES consenso que son reconocidas por las exportinas, algunos estudios sugieren la existencia de proteínas adaptadoras que pueden participar junto a las exportinas para favorecer la exportación nuclear. Los RHE parecen también tener una exportación nuclear diferencial, por ejemplo mientras que GR y PR se asocian a CRT, ER $\alpha$  y AR se asocian con la exportina CRM-1 (Holaska *et al.*, 2001; Vandevyver *et al.*, 2012). Aunque la exportación nuclear de los RHE por CRM-1 y CRT requiere más estudios, es clara la implicación que tienen en la regulación de la actividad transcripcional de RHE debido a que al abatir la presencia de éstos en el núcleo, se afecta la expresión de sus genes blanco.

## **2.2 Los RHE en el contexto de células de cáncer de mama**

En el tejido mamario se ha identificado la expresión de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR. En el núcleo celular, estos receptores tienen funciones transcendentales regulando genes que se asocian con proliferación y diferenciación celular en dicho tejido, por lo que la desregulación de su expresión y su función se relaciona con el desarrollo de cáncer de mama (Missmer *et al.*, 2004; Lombardi *et al.*, 2008). Se estima que más del 70% de los casos de cáncer de mama son positivos a la expresión de ER $\alpha$  y de éstos más del 65% además coexpresan a PR (Globocan, 2012).

---

AR es co-expresado en más del 80% de los tumores que son positivos a ER $\alpha$  (Cochrane *et al.*, 2014).

La sobreexpresión de estos RHE está asociada con una alta actividad transcripcional de los mismos dentro del núcleo, y en consecuencia con la expresión de sus genes blanco implicada en proliferación y sobrevivencia celular. Por ello, es importante estudiar e identificar los mecanismos que regulan la actividad transcripcional de los RHE en el tejido mamario, considerando que su cambio de localización subcelular, podría representar un importante mecanismo que influye directamente sobre la expresión génica.

### **2.3 ISG12 como regulador de la actividad de los RN**

**ISG12 (Interferon Stimulated Gene 12).** Es una proteína altamente hidrofóbica de 122 aminoácidos y con un peso molecular de 12 kDa, conocida también como p27 e IFI27. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el locus 14q32 y se clonó y secuenció por primera vez a partir de células MCF7 derivadas de cáncer de mama ER $\alpha$ +. En este estudio mediante Northern Blot se determinó que la expresión de ISG12 es incrementada en respuesta al estímulo de estradiol en las células MCF7 (Rasmussen *et al.*, 1993) pero el mecanismo responsable de dicho incremento aún se desconoce. Además del estradiol, se ha reportado que las STAT activadas por interferones se unen al promotor de ISG12 para inducir su expresión (Gjermændsen *et al.*, 2000; Martensen *et al.*, 2001).

En cuanto a su abundancia y localización se sabe que se encuentra presente en mitocondria, retículo endoplasmático y en envoltura nuclear (Tabla 3). Por su naturaleza hidrofóbica, no resulta sorprendente el que su localización este dada en orgánulos membranosos, sin embargo las funciones que cumple en éstos compartimentos han sido poco claras. Se ha sugerido que ISG12 en mitocondria podría participar en el proceso de apoptosis (Rosebeck & Leaman, 2008) y en la

envoltura nuclear en el mecanismo de exportación nuclear de proteínas (Papac-Milicevic *et al*, 2012).

Endógeno	Sobre-expresado	Contexto celular	Extractos	Localización	Referencia
X		HeLa	Fracción nuclear	Envoltura nuclear	Martensen <i>et al</i> , 2001.
	X	HT1080	Predominante en fracción mitocondrial	Membrana mitocondrial	Rosebeck & Leaman, 2008.
	X	293	Envoltura nuclear	Envoltura nuclear Retículo endoplasmático	Papac-Milicevic <i>et al</i> , 2012.

**Tabla 3.** Estudios sobre la localización subcelular de la proteína ISG12 endógena o sobreexpresada en diversos contextos celulares

#### 2.4 ISG12 y su efecto sobre la actividad de RN

ISG12 ha sido involucrado en la regulación de la actividad transcripcional de algunos RN. La actividad transcripcional de PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  así como RXR, disminuye en respuesta a la sobreexpresión de ISG12 (Papac-Milicevic *et al*, 2012). En nuestro laboratorio se ha corroborado que ISG12 incrementa a nivel de ARNm y proteína en respuesta a un estímulo con estradiol en las células MCF7. Además, se ha identificado a ISG12 como una proteína asociada al ER $\alpha$ . La sobreexpresión de ISG12 también regula negativamente la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en un contexto de cáncer de mama, sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la regulación negativa de la actividad de los RN por la sobreexpresión de ISG12 aun no son conocidos.

---

Por otra parte, en células endoteliales se reportó una importante función de la proteína ISG12 en el mecanismo de exportación nuclear de NR4A1, un receptor nuclear huérfano cuyo ligando es desconocido, pero que se conoce ejerce efectos antiinflamatorios (Papac-Milicevic *et al.*, 2012). En primer lugar se reportó que ISG12 interacciona con NR4A1 y en segundo lugar que ISG12 se localiza en la envoltura nuclear y participa en la salida del núcleo de NR4A1 de manera dependiente de la exportina CRM1. Además, se ha demostrado que ratones deficientes de ISG12 no presentaron inflamación aguda, lo cual puede ser explicado en parte por un incremento de la actividad anti-inflamatoria de NR4A1. En conjunto, estos resultados sugieren que ISG12 es un modulador negativo de la actividad transcripcional del receptor NR4A1 por favorecer su exportación nuclear (Papac-Milicevic *et al.*, 2012; Uhrin *et al.*, 2013).

---

### 3. Planteamiento del problema

La localización subcelular de RHE como ER $\alpha$ , PR y AR influye directamente sobre sus funciones genómicas. El cambio de localización de estos receptores del núcleo al citoplasma es un mecanismo importante para regular negativamente sus funciones transcripcionales. Este mecanismo de regulación ha sido poco evaluado, y aunque se sugiere la participación de exportinas como CRM1 para ER $\alpha$  y AR y Calreticulina para PR no se conocen a detalle los mecanismos moleculares que regulan dicho proceso celular. Dadas las características de ISG12, su función descrita como proteína mediadora de la exportación nuclear de NR4A1 por CRM-1 y su efecto como regulador negativo de su actividad transcripcional de otros RN incluido ER $\alpha$ , en este trabajo se pretende estudiar el efecto de la sobreexpresión de ISG12 sobre la localización de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR en un contexto de células derivadas de cáncer de mama. Estos RHE tienen importantes implicaciones en la regulación de genes relacionados con proliferación y diferenciación celular. Si ISG12 afecta la localización nuclear de ER $\alpha$  y/o AR y/o PR podría ser un importante modulador negativo de RHE a través de un mecanismo no convencional para estas proteínas.

---

## 4. Hipótesis

La sobreexpresión de la proteína ISG12 podría afectar la localización subcelular de RHE tales como ER $\alpha$ , PR y AR en células derivadas de cáncer de mama.

## 5. Objetivos

### 5.1 *Objetivo general*

- Determinar el efecto de la sobreexpresión ISG12 sobre la localización de receptores nucleares como ER $\alpha$ , AR y PR en células de cáncer de mama.

### 5.2 *Objetivos particulares*

- Generar una construcción de EGFP-ISG12
- Generar una línea celular estable que exprese a la proteína EGFP-ISG12
- Estudiar la localización subcelular de ISG12
- Analizar el efecto de la sobreexpresión de ISG12 sobre la localización de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR.

## 6. Estrategia experimental

1. Generar una construcción de EGFP-ISG12

Obtención de ADNc (RT)

Diseño de oligonucleótidos

Obtención del Inserto ISG12

Clonación en el vector EGFP

Secuenciación

IP + WB + IF

2. Generar una línea celular estable que exprese la proteína EGFP-ISG12

Transfección

Selección con G418

IF

IP/WB

Estudiar la localización subcelular de ISG12

Determinar los niveles de ER $\alpha$ , PR y AR en núcleo de las células que expresan EGFP-ISG12.

Analizar el efecto de la sobreexpresión de ISG12 sobre la localización de los

receptores ER $\alpha$ , PR y AR

IF

WB



---

## **Material y Métodos**

---

## **7. Material y Métodos**

### **7.1 Construcción EGFP-ISG12**

#### **7.1.1 Diseño de oligonucleótidos de la región codificante de ISG12**

Los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de la región codificante de ISG12 (400 pb) se diseñaron con los sitios de restricción para la enzima XhoI en el extremo 5´ y para la enzima EcoRI en el extremo 3´ y considerando la secuencia codificante para ISG12 obtenida de la base de datos de NCBI (NM\_001130080.2).

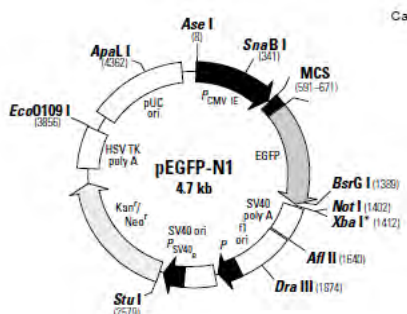
#### **7.1.2 Obtención del inserto ISG12**

Se realizó una extracción de ARN total a partir de células MCF7 mediante el método de Trizol<sup>TM</sup> (INVITROGEN). Posterior a la extracción se realizó un ensayo RT-PCR. Inicialmente se obtuvo el ADNc, el cual sirvió de molde para la amplificación por PCR de la región codificante de ISG12 utilizando los oligonucleótidos diseñados (Apéndice, Tabla 1 y 2). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La banda correspondiente al tamaño esperado (400 pb) se cortó y se purificó mediante el kit EZ10 Spin column DNA gel extraction kit de BIO BASIC INC y se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop.

Debido a que los oligonucleótidos diseñados para la región codificante de ISG12 contenían las regiones de reconocimiento para las enzimas de restricción XhoI y EcoRI se realizó la digestión del producto de PCR (Apéndice, Tabla 3).

### 7.1.3 Vector de expresión

El vector pEGFP-N1 (CLONTECH) (figura 6) se empleó en la clonación de ISG12. Este vector es una variante de GFP que fue optimizado para una mejor fluorescencia y alta expresión en células de mamífero. Dicho vector se eligió por las ventajas que confiere al facilitar el reconocimiento y la localización de la proteína ISG12. El vector pEGFP-N1 contiene el gen de resistencia a Kanamicina y Neomicina así como múltiples sitios de restricción entre los que se encuentran para enzimas XhoI y EcoRI. El vector se digirió con las enzimas antes mencionadas y posteriormente se sometió a defosforilación. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % se obtuvo la banda de 3000 pb (vector) que se purificó mediante el EZ10 Spin column DNA gel extraction kit de BIO BASIC.



**Figura 6.** Mapa del vector pEGFP-N1 de CLONTECH

### 7.1.4 Ligación

Al realizar la doble digestión tanto en el vector como el inserto, quedaron expuestos los extremos cohesivos de ambos, los cuales fueron ligados por la enzima ADN ligasa que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el 3' de otro.

Para la ligación se realizaron diluciones 1:4, 1:8 y 1:10 relación vector/inserto (Apéndice, Tabla 4) y como control negativo la reacción del vector sin el inserto.

---

Con las ligaciones se realizó la transformación de células competentes de la cepa *E. coli DH5alfa*.

### **7.1.5 Transformación**

Bajo condiciones de esterilidad se colocaron las células competentes *E. coli DH5alfa* en un tubo cónico de 1.5 ml y mediante choque térmico se realizó la incorporación del ADN resultante de la construcción a la cepa bacteriana (Apéndice, tabla 5). Luego del choque térmico se agregó 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C y 500 rpm en agitación. Posteriormente, se sembró en cajas petrí con medio agar LB que contenía el antibiótico kanamicina (25 µg/ml). Estas cajas se incubaron a 37 °C durante toda la noche y al siguiente día se analizó el crecimiento de colonias en las diluciones y la ausencia de colonias en el control negativo.

Se eligieron colonias al azar de cada una de las placas y se incubaron en medio LB líquido para la purificación de la construcción EGFP-ISG12 mediante el Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge de Qiagen. El ADN se sometió a un análisis de digestión y electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y a partir de ello se eligió una sola clona de acuerdo a la liberación del inserto clonado. Con esta clona se realizaron los siguientes experimentos.

Para comprobar la clonación de ISG12 en el vector EGFP, se envió una muestra de este ADN plasmídico a Laragen sequencing & genotyping para su secuenciación.

### **7.1.6 Transfección**

Las transfecciones transitorias y para la línea celular estable de EGFP-ISG12 se realizaron en células MCF7 (8.8 millones de células) mediante el método de lipofectamina<sup>®</sup>(INVITROGEN), de acuerdo al protocolo del fabricante. Para ello, se incubaron 10 µg de EGFP-ISG12 en 0.5 ml de medio Opti-MEM<sup>®</sup> (Life Technologies) con 15 µL de lipofectamina en 0.5 ml de medio Opti-MEM<sup>®</sup>(Life Technologies) durante

---

25 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación, esta mezcla de 1 ml se adicionó a 2 ml de medio  $\alpha$ -MEM<sup>®</sup> (Life Technologies) sin suero y se agregó a las células que previamente fueron lavadas con PBS para retirar células muertas y residuos de su medio de cultivo habitual así como de suero fetal bovino. Las células se incubaron con la mezcla de transfección por 4 h a 37 °C y transcurrido el tiempo la mezcla se retiró y se reemplazó por medio  $\alpha$ -MEM al 10% de SFB, 48 h posteriores a la transfección, las células se procesaron para la obtención de lisados celulares para el análisis de proteínas o inmunofluorescencias.

### **7.2 Línea celular estable**

En el caso particular de la transfección para establecer la línea celular MCF7/EGFP-*ISG12* 48 h posteriores a la transfección con la construcción, se comenzó la selección con el antibiótico G418 o sal disulfato (Sigma-aldrich), que es un antibiótico aminoglicosídico similar a gentamicina que induce la muerte de las células MCF7 pero no de las MCF7 que expresan la construcción EGFP-*ISG12* que tienen resistencia a los efectos de dicho antibiótico

### **7.3 Inmunofluorescencia**

Para esta técnica se usaron placas de 6 pozos, en los que se colocaron cubreobjetos, los cuales se trataron con polilisina 30 min bajo luz UV (Apéndice, Tabla 6). Después de dicho tratamiento, las células se sembraron y al siguiente día se realizó el tratamiento con o sin las hormonas  $17\beta$ -estradiol para ER $\alpha$ , progesterona para PR y andrógenos para AR en una concentración 100 nM durante 2 h. En seguida, se realizó la fijación con paraformaldehído (1%/ 5 min), la permeabilización con tritón (0.1 %/ 8 min) y el bloqueo con albumina (1 %/ 1 h) o un doble bloqueo, primero con albumina y posteriormente con SFB (5 %/ 1 h).

---

Posteriormente se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes y al siguiente día con los anticuerpos secundarios durante 1 h (Apéndice, Tabla 7).

Después de la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron lavados con PBS y se montó el cubreobjetos en un portaobjetos con 5  $\mu$ L de reactivo DAPI para la tinción nuclear. Finalmente las células fueron analizadas en el microscopio Olympus Bx51-WI y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Image J.

#### **7.4 Extractos de proteínas e inmunoprecipitación**

Los extractos totales de 8 millones de células MCF7 y MCF7/EGFP-ISG12 se obtuvieron con 1 ml de buffer de lisis RIPA 1X+ 25  $\mu$ L de inhibidor de proteasas. Con un gendarme se colectaron las células y se rotaron por 1 h a 4 °C. Después se centrifugaron a 14 000 rpm / 5 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a otros tubos cónicos de 1.5 ml y por último se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop.

Para la obtención de la porción nuclear y citoplasmática se utilizaron 2 cajas p100 cada una con 8 millones de células MCF7 y la misma cantidad de células MCF7/EGFP-ISG12 ambos en condiciones basales. Las células se lavaron con PBS frío, en seguida se agregó 1 ml de buffer de homogenización + 25  $\mu$ L inhibidor de proteasas y se raspó con el gendarme. Las células se mantuvieron en todo momento a 4 °C y se colectaron en un tubo cónico de 1.5 ml, en donde se resuspendieron con una aguja de 22G por 15 veces. Luego se realizó una centrifugación a 3400 rpm /10 min a 4 °C y el sobrenadante de cada cultivo fue transferido a otro tubo etiquetado como fracción citoplasmática, mientras que el pellet se etiquetó como fracción nuclear. El pellet nuclear se lisó con RIPA 1X durante 1 h en rotación a 4 °C. Después del tiempo de lisado, las muestras de la fracción nuclear se sometieron a centrifugación a 14 000 rpm / 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que fue el resultado final de la fracción nuclear.

---

A partir de las muestras de extractos totales o fraccionamiento subcelular se tomaron 30 µg para el desarrollo de esta técnica.

A cada tubo se agregó 1 µL de anticuerpo específico contra ISG12 y se incubó durante toda la noche a 4 °C en rotación. Al siguiente día, se agregaron 50 µL de proteína G (A)- sefarosa y se incubó por una hora a 4 °C en rotación, los tubos fueron centrifugados a 14 000 rpm por 10 seg y se decantó el sobrenadante. Se lavó el pellet 3 veces con 1 ml de buffer TNTE 0.1 % frío y entre cada lavado se centrifugó a 14 000 rpm por 10 seg desechando el sobrenadante. En el último lavado se centrifugó los tubos a 14 000 rpm por 10 seg, se decantó el sobrenadante y se agregó Laemmli 2X. Las muestras fueron hervidas y guardadas para su posterior utilización.

Para el análisis de las proteínas ISG12 y los RHE mediante WB se utilizó lámina B como control de la fracción nuclear y tubulina como control de la fracción citoplasmática. Se usaron 30 µg de proteínas en solución Laemmli 6X. En el caso de las IP se adicionó la solución Laemmli 2X y se hirvieron durante 5 min a 95 °C. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida SDS (SDS PAGE) al 10 % y se transfirieron a una membrana PVDF de 0.2 micras.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % por 1 h e incubadas durante toda la noche con los anticuerpos primarios específicos (Apéndice, tabla 8), y posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa, que se detectó empleando el sustrato de quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Pico, de Life Technologies).

---

## Resultados

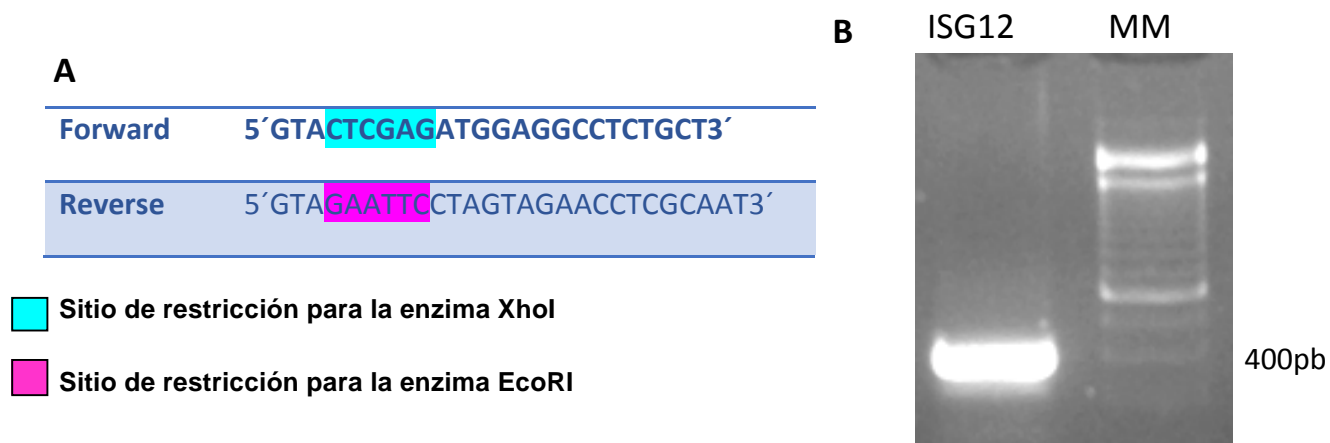


## 8. Resultados

### 8.1 Construcción EGFP-ISG12

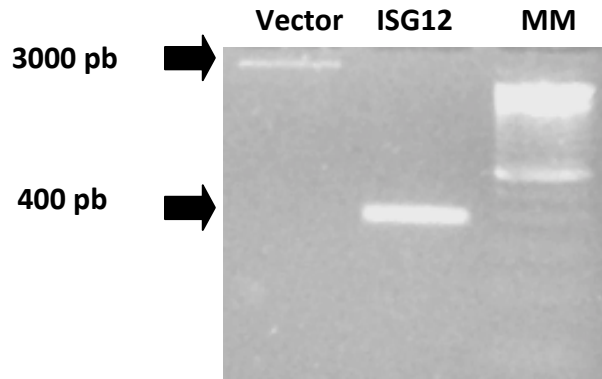
Para generar la construcción EGFP-ISG12 se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la región codificante de la proteína ISG12 con el sitio de restricción para las enzimas XhoI y EcoRI. Con estos oligonucleótidos utilizando como molde ADNc obtenido a partir de células MCF7 y mediante la técnica de PCR se obtuvo el fragmento de ISG12 de 400 pb (Fig 7 A y B), el cual se purificó y se sometió a una doble digestión con las enzimas XhoI y EcoRI. Esta doble digestión también se efectuó para el vector pEGFP-N1, el cual es un vector de expresión que presenta al fluoróforo EGFP (Fig 8).

#### 8.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la región codificante de ISG12.



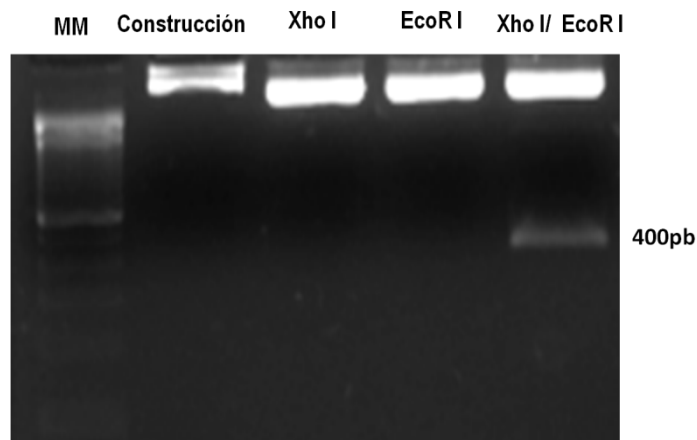
**Figura 7. Obtención del inserto ISG12.** En la figura A se representan los oligonucleótidos que fueron diseñados para amplificar la región codificante de ISG12, los cuales contenían dos sitios de restricción para las enzimas Xho I y EcoR I. B) se observa el resultado de la amplificación de ISG12 (400 pb) en un gel de agarosa al 1.5 %.

### 8.1.2 Clonación del ISG12 en el vector pEGFP-N1



**Figura 8.** Ensayo de doble digestión del vector pEGFP-N1 y del inserto de ISG12 con las enzimas XhoI/EcoRI para su posterior ligación. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

Posteriormente, se realizó la ligación del inserto en el vector pEGFP-N1 y el producto de esta ligación se transformó, para lo cual se utilizó la cepa competente de *E. coli DH5alpha*. Se eligió una de de las clonas que contenía el inserto de ISG12 de acuerdo a los ensayos de doble digestión realizados con las enzimas utilizadas para la clonación (Fig 9).



**Figura 9.** Comprobación de la clonación de ISG12 en el vector pEGFP- N1 mediante ensayos de restricción. Electroforesis de las digestiones de EGFP-ISG12 con la enzima Xho I o EcoR I y con ambas. La digestión con XhoI o EcoRI resulta en la linealización del vector, mientras que la doble digestión con ambas enzimas libera el inserto clonado de ISG12 de 400 pb.

Mediante la secuenciación se confirmó la clonación de ISG12 en el vector pEGFP-N1. Se mando secuenciar una muestra del ADN producto de la clonación y con el resultado se realizó un alineamiento con la secuencia de ISG12 obtenida de NCBI, el resultado obtenido indicó el 100 % de identidad entre ambas (Fig 10), con lo cual, se confirmó que la generación de la construcción EGFP-ISG12 fue satisfactoria.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
582 bits(315)	2e-170	315/315(100%)	0/315(0%)	Plus/Minus
ISG12 1	CTCTCACCTCATCAGCAGTGACCAAGTGTGGCCAAAAGTGGTCAGGGTGGCCTCTGGCTCTG			60
Inserto 1293	CTCTCACCTCATCAGCAGTGACCAAGTGTGGCCAAAAGTGGTCAGGGTGGCCTCTGGCTCTG			1234
ISG12 61	CCGTAGTTTTGCCCTGGCCAGGATTGCTACAGTTGTGATTGGAGGAGTTGTGGCCATGG			120
Inserto 1233	CCGTAGTTTTGCCCTGGCCAGGATTGCTACAGTTGTGATTGGAGGAGTTGTGGCCATGG			1174
ISG12 121	CGGCTGTGCCCATGGTGCTCAGTGCCATGGGCTTCACTGCGGCGGGAATCGCCTCGTCCT			180
Inserto 1173	CGGCTGTGCCCATGGTGCTCAGTGCCATGGGCTTCACTGCGGCGGGAATCGCCTCGTCCT			1114
ISG12 181	CCATAGCAGCCAAGATGATGTCCGCGGCGGCCATTGCCAATGGGGGTGGAGTTGCCCTCGG			240
Inserto 1113	CCATAGCAGCCAAGATGATGTCCGCGGCGGCCATTGCCAATGGGGGTGGAGTTGCCCTCGG			1054
ISG12 241	GCAGCCTTGTGGCTACTCTGCAGTCACTGGGAGCAACTGGACTCTCCGGATTGACCAAGT			300
Inserto 1053	GCAGCCTTGTGGCTACTCTGCAGTCACTGGGAGCAACTGGACTCTCCGGATTGACCAAGT			994
ISG12 301	TCATCCTGGGCTCCA	315		
Inserto 993	TCATCCTGGGCTCCA	979		

**Figura 10. Resultado de la secuenciación del DNA plasmídico.** Al realizar un alineamiento entre la secuencia de nucleótidos de ISG12 de NCBI (NM\_001130080.2) y el resultado de la secuenciación la construcción EGFP-ISG12 se observa un 100 % de identidad.

El siguiente estudio consistió en analizar la expresión de ISG12 fusionada a EGFP en las células MCF7. Para ello, la construcción EGFP-ISG12 generada, se transfirió transitoriamente en las células MCF7 y 48 h posteriores a la transfección se obtuvieron los extractos totales, con los cuales se realizó la inmunoprecipitación de la proteína EGFP-ISG12 seguido de un WB con un anticuerpo específico para ISG12 (Fig 11 B). Los resultados obtenidos demuestran que ISG12 se expresa en las células MCF7 transfectadas (MCF7/EGFP-ISG12) como una banda de 37 kDa que equivale a la fusión de ISG12 con la EGFP (12+25=37kDa) pero no en las células MCF7 no transfectadas empleadas como control.

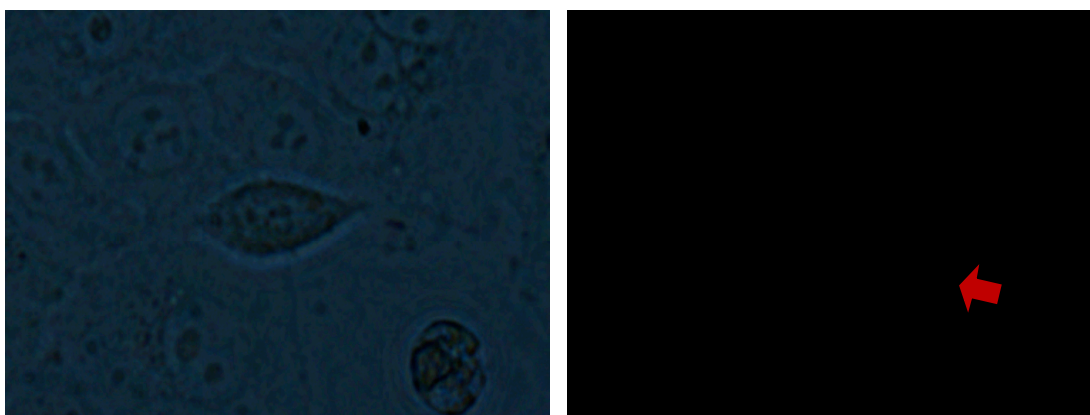
---

Además, se observó la expresión de la proteína EGFP en las células transfectadas MCF7/EGFP-ISG12 mediante microscopia de fluorescencia pero no en las células control MCF7 (Fig 11 A). Estos resultados indican que la construcción generada es capaz de expresarse y detectarse en las células MCF7 por lo cual se utilizó para la generación de la línea celular estable.

**A**

MCF7

EGFP



**B**

MCF7 MCF7/EGFP-ISG12

**WB:**  
EGFP-ISG12



37 kDa

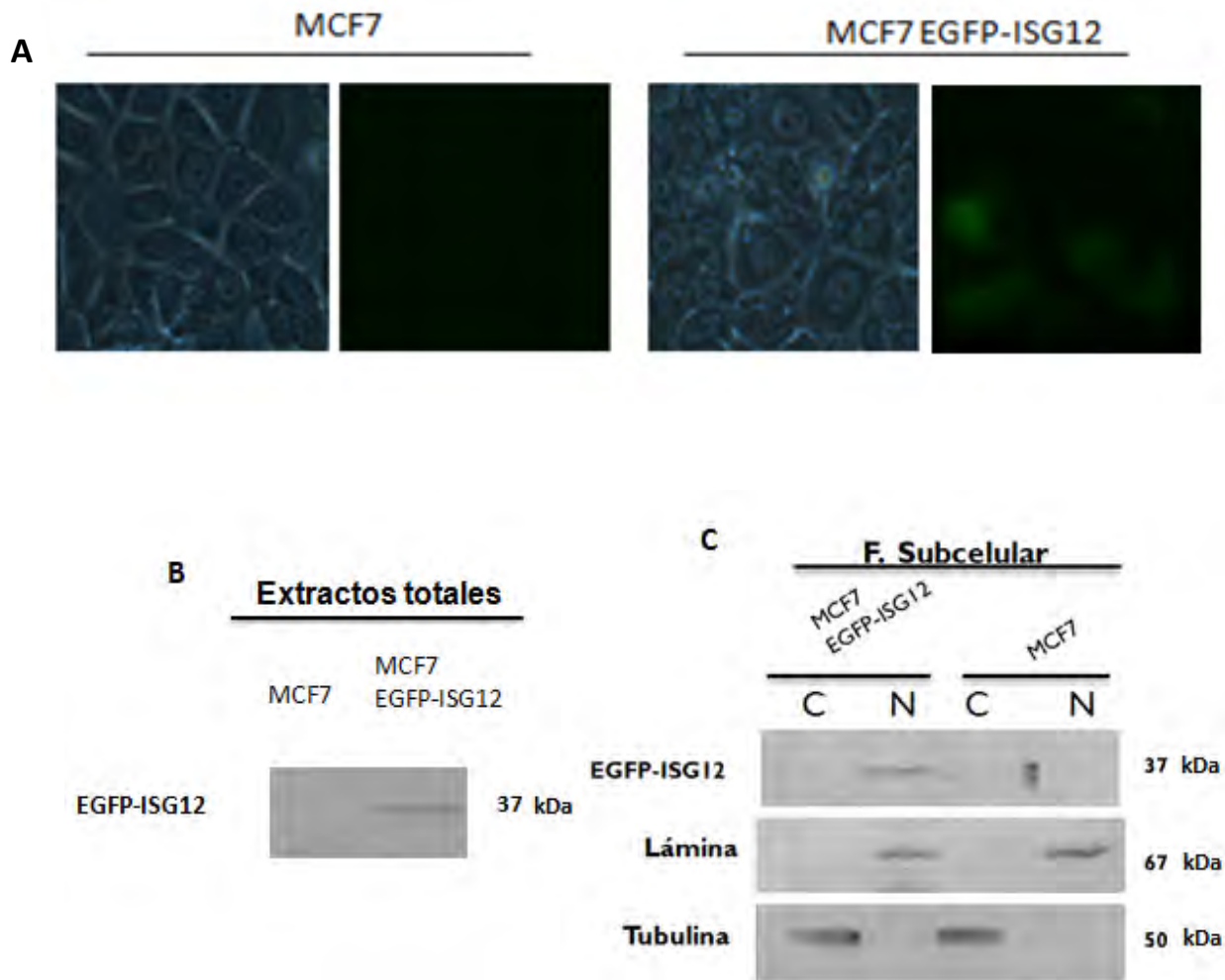
**Figura 11. Expresión de EGFP-ISG12 en cultivo celular MCF7. A)** Imagen tomada a las células MCF7 mediante microscopio invertido donde se observa en el panel del lado derecho la expresión de la proteína EGFP. **B)** Detección por WB de la proteína EGFP-ISG12 únicamente en MCF7/EGFP-ISG12 y no así en el control MCF7.

---

## **8.2 Línea celular estable (MCF7 / EGFP-ISG12)**

Para el estudio del efecto de la sobreexpresión de EGFP-ISG12 sobre la abundancia y localización de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR se generó una línea celular estable que sobreexpresa la construcción **EGFP-ISG12**. En células MCF7 se transfectó dicha construcción y 48 h posterior a la transfección las células se trataron con el antibiótico de selección G418 por un periodo de 1 mes y medio. Luego de la subsecuente selección se generó la línea celular que se nombró como **MCF7/EGFP-ISG12**.

La expresión estable de EGFP-ISG12 en la línea celular generada se confirmó mediante la obtención de extractos totales y de la fracción nuclear y citoplasmática de dichas células, como control se usaron los extractos de células MCF7, con los cuales se realizó la inmunoprecipitación (IP) de EGFP-ISG12 seguido de un WB usando un anticuerpo específico para ISG12 (Fig 12 B). Los resultados demuestran que la línea celular MCF7/EGFP-ISG12 generada expresa a ISG12 fusionada a la EGFP como una proteína de 37 kDa en comparación con las células control. Además, ISG12-EGFP únicamente se detectó en la porción nuclear de la línea celular estable pero no en las células control. Los controles de la porción citoplasmática (tubulina) y nuclear (lámina), indican el adecuado fraccionamiento subcelular. Este resultado se corroboró por microscopia invertida, a través de la cual, se observó la expresión de EGFP-ISG12 en la línea celular estable (Fig 12 A). En conjunto, los resultados mostraron que la línea celular estable expresa exitosamente la construcción generada **EGFP-ISG12** y por lo tanto, esta línea se utilizó como modelo de estudio para el análisis de la función de ISG12 sobre los RHE.

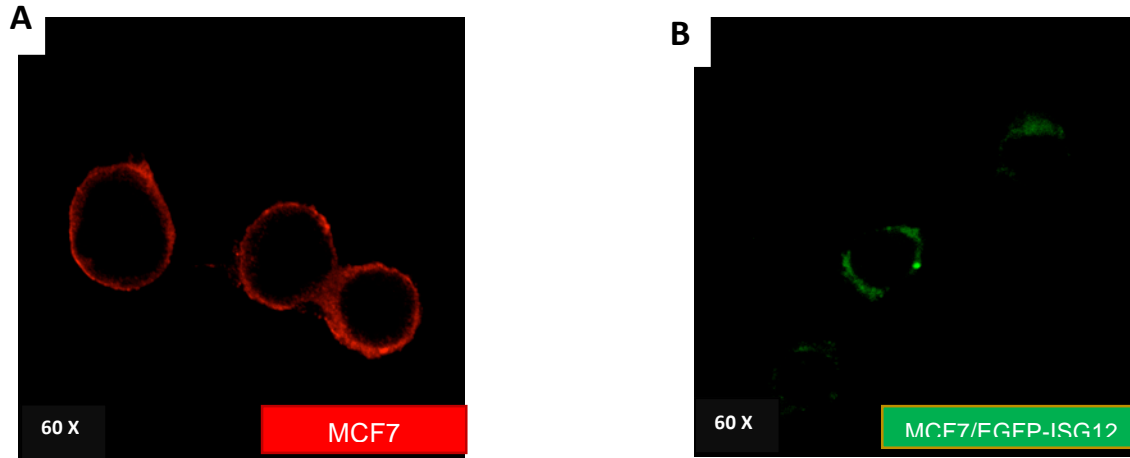


**Figura 12. Expresión y detección de EGFP-ISG12 en la línea celular estable MCF7/ EGFP-ISG12.** **A)** la expresión de la proteína EGFP se detectó por microscopía invertida. **B)** IP de EGFP-ISG12 seguido de WB contra ISG12. **C)** Se aprecia la detección y localización de EGFP-ISG12 únicamente en el núcleo (N) de la línea celular estable y no así en el citoplasma (C). Los controles del fraccionamiento subcelular fueron Lámina para fracción nuclear y tubulina para fracción citoplasmática.

---

### 8.3 Localización subcelular de ISG12 endógena y EGFP-ISG12

La localización subcelular endógena de ISG12 y EGFP-ISG12 en las células MCF7 y MCF7/EGFP-ISG12 se estudió mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se observó que tanto ISG12 endógena como EGFP-ISG12 se localizan principalmente en la periferia nuclear y no se observan localizadas en el interior del núcleo. Estos resultados muestran que la localización subcelular de ISG12 no cambia, aún cuando dicha proteína es sobreexpresada (Fig 13 A y B).

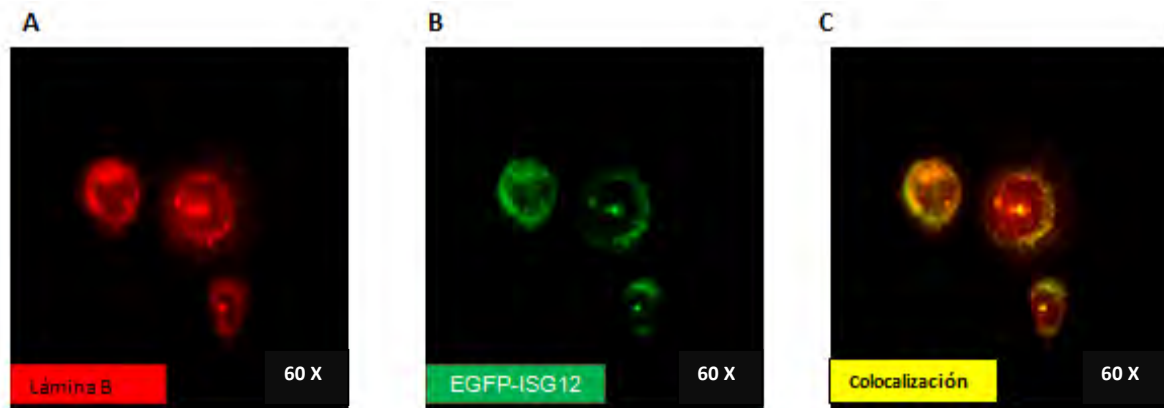


**Figura 13. Inmunofluorescencia de la localización de ISG12 endógena y sobreexpresada. A)** Se observa a la proteína ISG12 endógena en color rojo. **B)** Se observa a EGFP-ISG12 en color verde.

Dado que ISG12 se observó al parecer en la periferia nuclear, se analizó la posibilidad de que ISG12 se localizará en la envoltura nuclear. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia usando un anticuerpo para identificar a la proteína lámina B como marcador de la envoltura nuclear. Se observó que la proteína lámina B se localiza en la envoltura nuclear como se esperaba y que EGFP-ISG12 tiene una localización similar. La sobreposición de los canales verde y rojo (“merge”) indicó que ambas proteínas (EGFP-ISG12 / Lámina B) colocalizan en el mismo espacio

---

subcelular y por lo tanto los resultados demuestran que la proteína EGFP-ISG12 se localiza en envoltura nuclear de las células MCF7 (Fig 14 A, B y C).



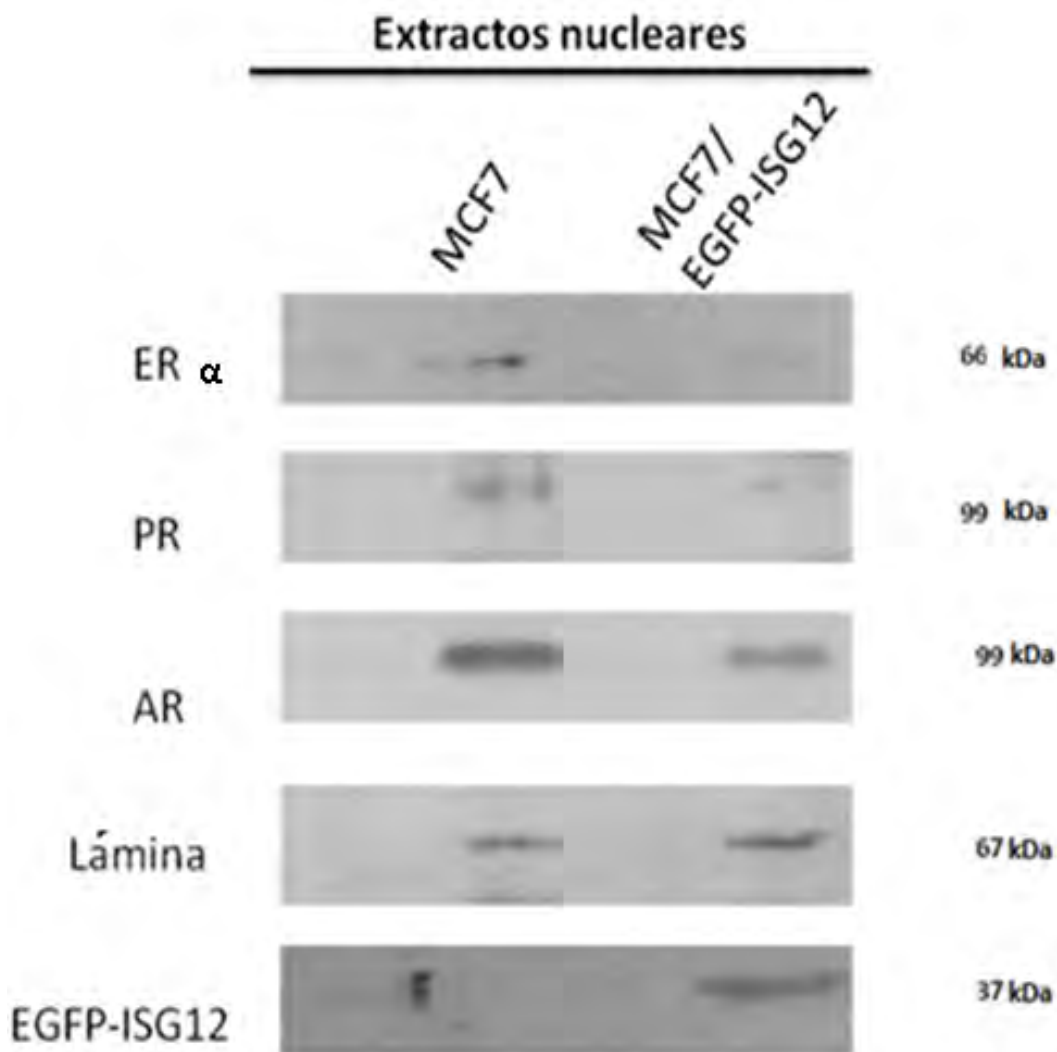
**Figura 14. EGFP-ISG12 se localiza en envoltura nuclear.** Se comprobó la localización de EGFP-ISG12 en envoltura nuclear, se realizó una inmunofluorescencia donde se observa: **A)** Detección de la proteína de envoltura nuclear (rojo) **B)** EGFP-ISG12 (en verde) y **C)** La composición de estos dos paneles en el que se aprecia una colocalización entre EGFP-ISG12 y lámina B (amarillo).

Para analizar el efecto de EGFP-ISG12 sobre la abundancia de RHE en el núcleo celular se obtuvieron los extractos nucleares de las células MCF7/ EGFP-ISG12 y las células MCF7 como control. La fracción nuclear de estos extractos se analizó mediante WB usando anticuerpos específicos para ER $\alpha$ , PR y AR, así como EGFP como control de las células MCF7/EGFP-ISG12, lámina B como control de carga de la fracción nuclear y tubulina como control de la fracción citoplasmática para comprobar la pureza de los extractos nucleares realizados. Los resultados indican que los niveles de la proteína lámina B son comparables en los extractos nucleares de las células MCF7/EGFP-ISG12 así como en las células MCF7. Además, no se detecta la presencia de tubulina en las fracciones nucleares obtenidas de dichas células. Dado que los controles resultaron como se esperaba, se procedió al análisis de los niveles de los RHE estudiados.

Se observó una menor abundancia nuclear de los receptores ER $\alpha$ , PR y AR en las células MCF7/EGFP-ISG12 en comparación con los niveles de estas proteínas en



las células MCF7 control. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de EGFP-ISG12 disminuye los niveles de estos RHE en el núcleo celular (Fig 15).



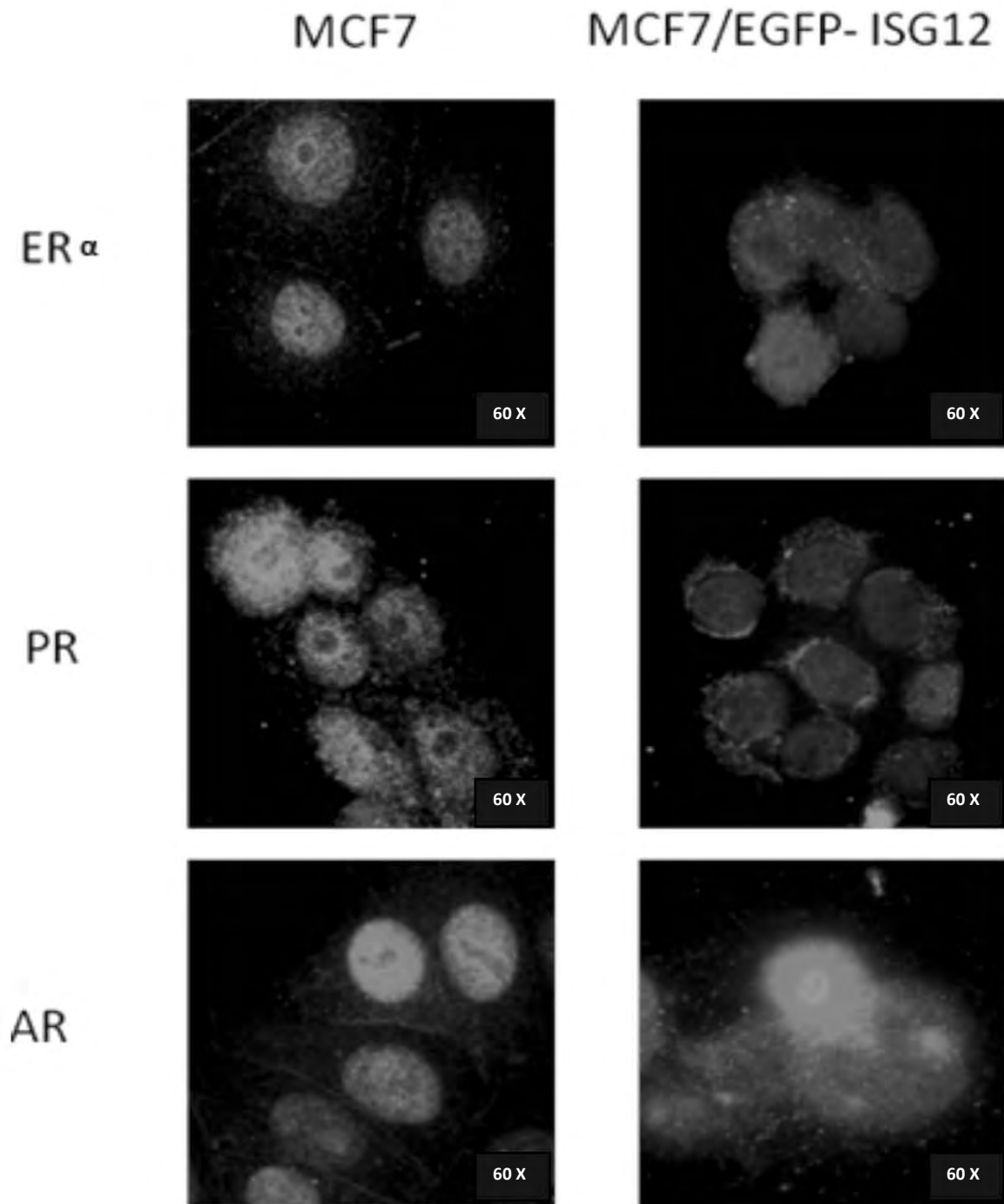
**Figura 15. EGFP-ISG12 disminuye los niveles de RHE en el núcleo celular.** Se realizó un fraccionamiento subcelular en condiciones basales de las células MCF7/EGFP-ISG12 y MCF7. Las fracciones nucleares fueron corridas en gel SDS (SDS-PAGE) al 10 % y mediante WB fueron detectados los receptores ER $\alpha$ , PR y AR así como el marcador de envoltura nuclear (Lámina B) y EGFP-ISG12 como control de transfección. En la imagen se observa una disminución de los niveles de los tres receptores cuando se sobreexpresa ISG12.

---

#### **8.4 EGFP-ISG12 afecta la localización nuclear de ER $\alpha$ , PR y AR endógenos de las células MCF7**

Para corroborar que la sobreexpresión de EGFP-ISG12 afecta la acumulación nuclear de RHE en las células MCF7 se realizó una serie de inmunofluorescencias para detectar la localización subcelular de RHE en células MCF7/EGFP-ISG12 y en las control células MCF7.

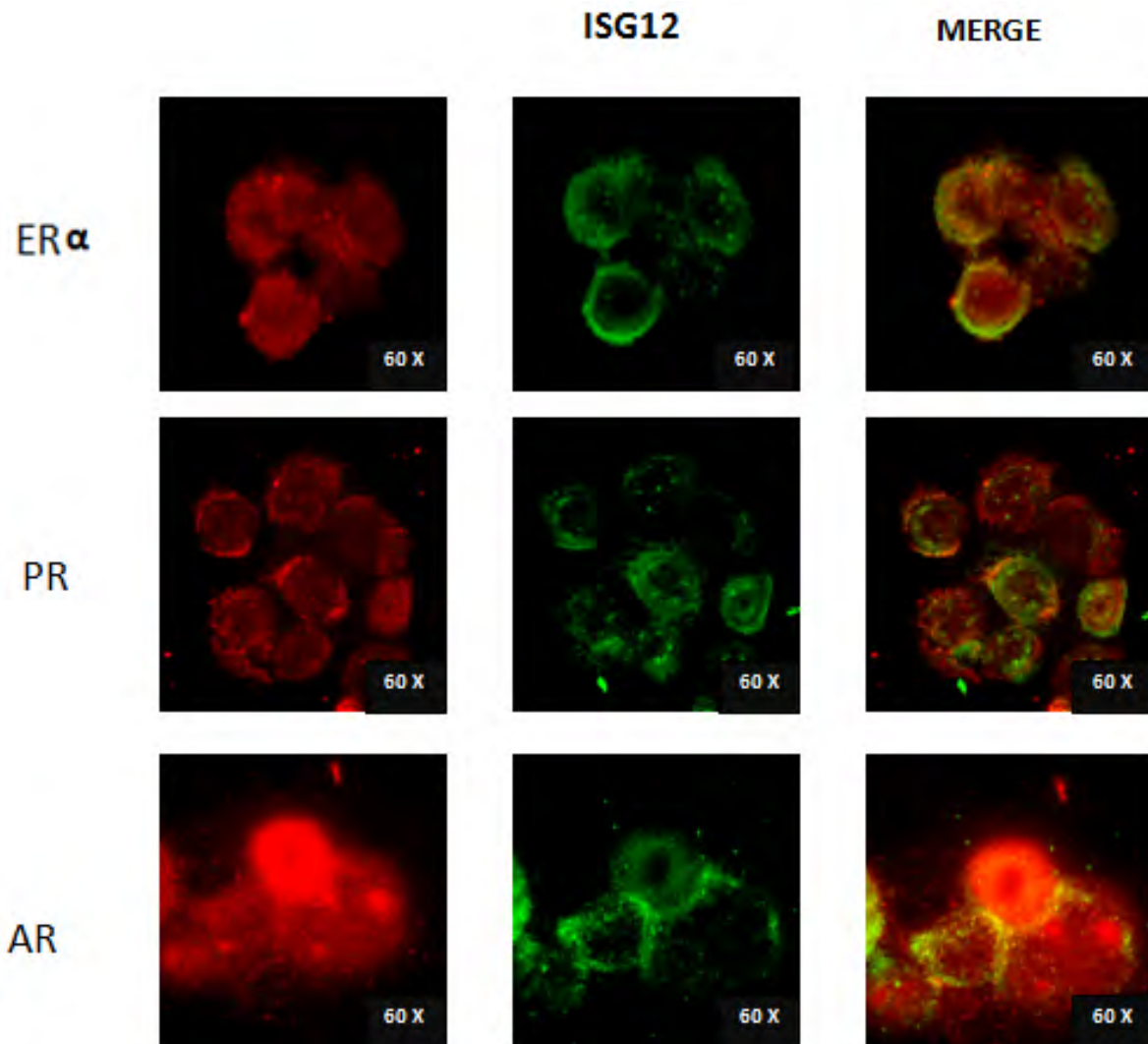
Los resultados de las inmunofluorescencias muestran una disminución en la abundancia nuclear de los tres RHE en las células MCF7/EGFP-ISG12 en comparación con las células control MCF7, sin embargo, esta disminución fue más evidente en el caso de ER $\alpha$  y PR. Por otra parte, de manera interesante, se aprecia un notorio enriquecimiento de los RHE en el citoplasma de las células que sobreexpresan ISG12 (Fig 16). En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EGFP-ISG12 disminuye la localización nuclear y al parecer, enriquece la localización citoplasmática de RHE tales como ER $\alpha$ , PR y AR en las células derivadas de cáncer de mama MCF7.



**Figura 16. EGFP-ISG12 afecta la localización nuclear de los receptores ER $\alpha$ , PR y AR.** Inmunofluorescencias de células MCF7 y de la línea celular estable donde previamente a la técnica se estimuló con el ligando de cada receptor para una acumulación nuclear. Se puede apreciar que en los tres paneles de MCF7, tras el estímulo con su ligando los receptores se concentran en el compartimento nuclear; mientras que al sobreexpresar ISG12 ocurre una disminución en la abundancia nuclear de estos receptores nucleares a pesar del estímulo con el ligando.

### 8.5 EGFP-ISG12 colocaliza con los RHE

La probable colocalización entre EGFP-ISG12 y los RHE se estudió mediante la sobreposición o “merge” de los canales verde que muestran a la proteína EGFP-ISG12 y rojo que identifica a cada uno de los RHE analizados. Los resultados señalan que EGFP-ISG12 colocaliza con los RHE lo que sugiere que ISG12 podría participar en un mecanismo de exportación nuclear de los RHE para abatir su abundancia en el núcleo celular (Fig 17).



**Figura 17. EGFP-ISG12 co-localiza con ER, PR y AR en células MCF7/EGFP-ISG12.** Como resultado del ensayo de inmunofluorescencia donde se observa una disminución de estos tres receptores en los núcleos de las células que sobreexpresan ISG12 se realizó una separación de los filtros de receptores nucleares (color rojo), EGFP-ISG12 (verde) y la combinación de ambos en color amarillo. Se observa que existe una colocalización de estas dos proteínas en la envoltura nuclear.

---

## Discusión

---

---

## 9. Discusión de resultados

Los RHE, son FT inducibles por hormonas esteroideas que están implicados en procesos celulares como son la proliferación y diferenciación celular en tejido mamario normal, por ello, la desregulación en su expresión y/o actividad está asociadas a cáncer de mama.

La regulación de la actividad transcripcional de RHE está dada a diferentes niveles a lo largo de su vía de señalización genómica, por ejemplo, modificaciones postraduccionales, así como la regulación de su estabilidad y localización subcelular, pero éstos no han sido ampliamente evaluados. Un proceso que hasta la fecha ha sido el menos estudiado es la exportación nuclear. Si bien se sabe que en respuesta a la unión ligando-receptor éste se transloca al núcleo (Maruvada et al., 2003), no se ha dilucidado completamente los mecanismos que rigen la salida de los RHE del núcleo al citoplasma. La exportación núcleo-citoplasma de los RN, regula su función genómica, considerando que son proteínas cuya actividad ocurre en el núcleo. Por lo tanto cambios en su localización subcelular repercuten sobre su actividad transcripcional.

Recientemente se ha sugerido la participación de otras proteínas en el proceso de exportación nuclear de RHE. ISG12 es una proteína altamente hidrofóbica que al ser sobreexpresada en un contexto de inflamación crónica modula negativamente la actividad transcripcional de un receptor nuclear huérfano mediante un cambio en su localización subcelular de núcleo a citoplasma (Papac-Milicevic *et al.*, 2012).

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la función de ISG12 sobre la localización subcelular de los receptores nucleares ER $\alpha$ , PR y AR. Se realizó la clonación de la proteína ISG12 en el vector de expresión pEGFP-N1 y se estableció una línea celular que sobreexpresa constitutivamente ISG12 para mejorar la evaluación de su función sobre la abundancia y localización de los RHE antes mencionados.

---

### **9.1 Construcción EGFP-ISG12**

Debido a que ISG12 es una proteína de 12 kDa su pequeño tamaño dificulta su análisis mediante WB. Considerando este aspecto, para diferenciar la proteína ISG12 sobreexpresada de la endógena y para evaluar el efecto de la sobreexpresión de ISG12 sobre los RHE, se realizó una construcción con ISG12 y el vector de expresión pEGFP-N1 el cuál expresa a la proteína EGFP que es un fluoróforo detectable bajo microscopia de fluorescencia. De esta forma, la construcción generada facilitó la identificación de ISG12 por WB, dado que el peso resultado de la construcción corresponde a 37 kDa. También la fusión de la proteína ISG12 a la EGFP resultó de gran utilidad al permitir distinguir y analizar la proteína sobreexpresada de la endógena y la evaluación del efecto de su sobreexpresión sobre los RHE.

### **9.2 MCF7/EGFP-ISG12**

Las transfecciones transitorias son un método efectivo para sobreexpresar una proteína y evaluar algún efecto de interés, sin embargo muchas veces un bajo rendimiento en la transfección genera cultivos heterogéneos que ocasionan discrepancias en los resultados obtenidos. Con el objetivo de facilitar el análisis de la sobreexpresión de ISG12 se estableció una línea celular que sobreexpresará de manera constitutiva EGFP-ISG12.

Mediante el antibiótico G418 fue posible seleccionar únicamente las células que incorporaron exitosamente la construcción EGFP-ISG12 como lo indican los resultados del WB que detecta a EGFP-ISG12 como una proteína de 37 kDa en la línea celular estable pero no en las células control, así como las observaciones con el microscopio invertido que detectan fluorescencia únicamente en la línea celular estable. La línea celular generada que expresa establemente a la proteína

---

ISG12 fusionada a la EGFP se denominó **MCF7/EGFP-ISG12** la cual facilitó en lo sucesivo los análisis efectuados con esta proteína.

### **9.3 Localización subcelular de ISG12 endógena y sobreexpresada**

La sobreexpresión de algunas proteínas puede afectar su localización subcelular. Con el objetivo de identificar la localización subcelular de ISG12 endógena y de EGFP-ISG12 en la línea celular estable, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia.

La localización de ISG12 endógena como sobreexpresada resultó similar en la envoltura nuclear, lo que indica que la sobreexpresión de ISG12 no modifica su localización.

De manera interesante, el resultado de la localización de ISG12 en envoltura nuclear, es el primer dato que se conoce sobre la localización endógena y sobreexpresada de esta proteína en un contexto de cáncer de mama. Con los datos obtenidos, resultó interesante entender si una proteína localizada en envoltura nuclear podría tener un efecto sobre la abundancia de los RHE en el núcleo, dado que un estudio previo asoció la salida del factor NR4A1 del núcleo hacia citoplasma con la proteína ISG12.

### ***9.4 Evaluación de la sobreexpresión de EGFP-ISG12 sobre la abundancia y localización subcelular de RHE ER $\alpha$ , PR y AR***

Dado que ISG12 se identificó como una proteína de envoltura nuclear en las células derivadas de cáncer de mama MCF7, se analizó la trascendencia de este resultado, debido a que la función de ISG12 sobre la localización nuclear de RHE en células derivadas de cáncer de mama nunca había sido explorada.



---

---

La localización subcelular de los RHE es principalmente nuclear en las células MCF7 control, sin embargo, la abundancia estas proteínas disminuyó en los núcleos de las células MCF7/ EGFP-ISG12 sobre todo en el caso del receptor de andrógenos.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de EGFP-ISG12 tiene un efecto sobre la abundancia de los RHE en el núcleo celular y sugieren a ISG12 como una proteína con la capacidad de controlar la abundancia o la acumulación de RHE en el núcleo. Con base en estos resultados, se evaluó si este mismo efecto podría detectarse a través de la técnica de inmunofluorescencia.

Los RHE se detectaron en el núcleo de las células MCF7 control pero en las células MCF7/EGFP-ISG12 se observó una disminución en la abundancia nuclear de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR. Todos los resultados indican que ISG12 participa en el cambio de localización subcelular de RHE. Al parecer, ISG12 favorece la salida del núcleo de los RHE hacia el citoplasma, sin embargo, los mecanismos implicados en este proceso deben ser dilucidados. Los ensayos de inmunofluorescencia, también indican que ISG12 comparte la misma localización subcelular de los RHE estudiados, por lo que es probable exista una interacción entre ambas proteínas.

De este modo, la generación de la construcción EGFP-ISG12 y el establecimiento de la línea celular MCF7/EGFP-ISG12 resultaron herramientas útiles en el estudio de la función de la sobreexpresión ISG12 sobre los RHE. Los resultados en conjunto, demuestran que ISG12 es una proteína importante en la modulación de la localización subcelular de RHE en el contexto de cáncer de mama. Dado que los RHE realizan su función como FT en el núcleo, la regulación de su localización subcelular por ISG12 es trascendental puesto que repercute directamente sobre la expresión de sus genes blanco. Además, de acuerdo con estos resultados, la expresión de ISG12 también es crítica sobre la función de los RHE. Por lo tanto, son necesarios más estudios para detallar y concretar todos estos aspectos, no obstante, este trabajo resulta una base fundamental para estudios posteriores.

---

## **10. Conclusiones**

Se generó la construcción EGFP-ISG12 y la línea celular derivada de cáncer de mama que expresa establemente a ISG12 (MCF7/EGFP-ISG12), con la cual se demostró que ISG12 se localiza en la envoltura nuclear y modula la localización nuclear de los RHE ER $\alpha$ , PR y AR en un contexto de cáncer de mama.

---

## 11.                    **Perspectivas**

- Determinar el mecanismo molecular implicado en la modulación de la localización nuclear de los RHE por ISG12
- Estudiar la posible interacción de ISG12 con los RHE y las exportinas CRM1 y Calreticulina
- Estudiar la regulación de la expresión de ISG12 en cáncer de mama
- Mediante siRNAs específicos, analizar la importancia de la expresión endógena de ISG12 en células derivadas de cáncer de mama.
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión o depleción de ISG12 en un modelo *in vivo*.

---

## 12. Bibliografía

- Anbalagan, M., Huderson, B. Murphy, L. & Rowan, B.G. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Sign.* 2012; 10: e001.
- Bai Z. & Gust R. Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci. Germany.* 2009; 342:133-149.
- Bhasin M. & Raghava P. S. Classification of Nuclear Receptors Based on Amino Acid Composition and Dipeptide Composition. *JBC.* 2004; 279: 23262-23266.
- Black B.E., *et al.* DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Current Biol.* 2001; 11: 1749-1758.
- Cautain B., *et al.* Review: Components and regulation of nuclear transport processes. *The FEBS Journal.* 2015; 282: 445-462.
- Castoria G., Giovanelli P., Lombardi M., De Rosa C., Giraldi T., De Falco A., Barone MV., Abbondanza C., Migliaccio A. & Auricchio F. Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells. *Oncogene.* 2012; 31(46):4868-77.
- Cochrane, D. R., *et al.* Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res.* 2014; 16: R7.
- Escriva H., Bertrand S. & Laudet V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* 2004; 40:11-26.

- Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M. & Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(4):685-704.
- Gjermansen, I.M., Justesen, J. & Martensen, P.M. The interferon-induced gene ISG12 is regulated by various cytokines as the gene 6-16 in human cell lines. *Cytokine.* 2000; 12 (3): 233-238.
- Globocan, 2012. International Agency for Research on Cancer. Recuperado el 03 de abril 2015.
- Gong Y, Wang D, Dar JA, Singh P, Graham L, Liu W, Ai J, Xin Z, Guo Y, Wang Z. Nuclear export signal of androgen receptor (NESAR) regulation of androgen receptor level in human prostate cell lines via ubiquitination and proteasome-dependent degradation. *Endocrinology.* 2012; 153(12):5716-25.
- Holaska J. M., et al. Calreticulin Is a Receptor for Nuclear Export. *JBC.* 2001; 152: 127-140.
- Huang, P., Chandra, V. & Rastinejad, F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 247-272.
- Jin L. & Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(13):1218-26.
- Kanwai, C., Li, H. & Lim, C.S. Model System to Study Classical Nuclear Export Signals. *AAPS Pharm Sci.* 2002; 4 (3): 1-7.
- Kosugi, S., Yanagawa, H., Terauchi, R. & Tabata, S. NESmapper: Accurate Prediction of Leucine-Rich Nuclear Export Signals Using Activity-Based Profiles. *PLoS Comput Biol.* 2014; 10(9): e1003841.

- Martensen P. M., et al. The interferon alpha induced protein ISG12 is localized to the nuclear membrane. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 5947- 5954.
- Maruvada, P., Baumann, C.T., Hager, G.L. & Yen, P. M. Dynamic Shuttling and Intranuclear Mobility of Nuclear Hormone Receptors. *J.B.C.* 2003; 278(14): 12425-12432.
- Missmer, S.A., Eliassen, A.H., Barbieri, R.L. & Hankinson, S.E. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(24): 1856-1865.
- Nguyen, T. K., Holloway, M. P. & Altura, R. A. The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J. Biochem. Mol. Biol.* 2012; 3(2): 137-151.
- Liang, J. & Shang, Y. Estrogen and Cancer. *Annual Rev of Physiol.* 2013; 75:225-240.
- Lombardi, M., Castoria, G., Migliaccio, A., Barone, M.V., Stasio, R.D., Ciocaciola, A., Boltero, D., Yamaguchi, H., Appella, E. & Auricchio, F. Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J. Cell. Biol.* 2008; 182 (2): 327-340.
- Lonard, D. M. & O'Malley B.W. Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8(10): 598-604.
- Olefsky J.M. Minireview Prologue: Nuclear Receptor Minireview Series. *JBC.* 2001; 276: 36863- 36864.

- Ordóñez-Morán P. & Muñoz, A. Nuclear receptors: Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 2009; 8(11): 1675-1680.
- Papac-Milicevic, N., et al. The Interferon Stimulated Gene 12 Inactivates Vasculoprotective Functions of NR4A Nuclear Receptors. *Circ Res*. 2012; 110: e50-e63.
- Pemberton, L.F. & Paschal, B.M. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*. 2005; 6(3):187-198.
- Rasmussen, U.B., et al. Identification of a new interferon- alpha-inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma. *Cancer Res*. 1993; 53 (17):4096-4101.
- Robinson- Recheavi, M. Escriba H. & Laudent, V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. 2003: 585-586.
- Rosebeck, S. & Leaman, D.W. Mitochondrial localization and pro-apoptotic effects of the interferon-inducible protein ISG12a. *Apoptosis*. 2008; 13: 562-572.
- SchÜtz, S.V., Cronauer, M.V. & Rinnab, L. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase- 3 $\beta$  Promotes Nuclear Export of the Androgen Receptor Through a CRM1- Dependent Mechanism in Prostate Cancer Cell Lines. *J.B.C*. 2010; 109: 1192-1200.
- Sever R. & Glass C.K. Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013; (5): a016709.
- Turner J. G., Dawson J. & Sullivan D.M. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. 2012; 83(8): 1021–1032.

- Tyagi, R.K., Amazit, L., Lescop, P., Milgrom, E. & Guiochon-Mantel, A. Mechanisms of Progesterone Receptor Export from Nuclei: Role of Nuclear Localization Signal, Nuclear Export Signal, and Ran Guanosine Triphosphate. *Mol. Endo.* 1998; 12 (11): 1684-1695.
- Uhrin P., Perkmann T., Binder B. & Schabbauer G. ISG12 is a critical modulator of innate immune responses in murine models of sepsis. *Immunology.* 2013; 218: 1207- 1216.
- Vanden J. P. Nuclear Receptors: A Brief Overview. *Nucl Recep Resource.* 2009: 1-9.
- Vandevyver S., et al. On the trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic.* 2012; 13: 364- 374.
- Wierman, M. E. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Edu.* 2007(31): 26-33.




## 13. Apéndices

### 1. Retrotranscripción

Cantidad	Indicación
2µg	RNA total en un volumen de 10 µL de H <sub>2</sub> O DPCE
1 µL	dNTP's 10 Mm
1 µL	Random primers
4 µL	Buffer 5X first strand
2 µL	DTT 0.1M
1 µL	Enzima M-MLV

 Se calentó esta mezcla a 65 °C x 5 minutos y se colocó en hielo

 Estos 2 reactivos se mezclaron y agregaron al tubo previo

 La enzima finalmente se agregó a la mezcla previa

Temperatura	Tiempo (minutos)
25 °C	10
50 °C	50
70 °C	15
4 °C	∞

Condiciones para la retrotranscripción el tiempo indicado es por cada ciclo, en total fueron 27 ciclos.

## 2. Reacción en cadena de la polimerasa

Reactivo	1X
<b>cDNA</b>	1 $\mu$ L
<b>Fwt</b>	0.5 $\mu$ L
<b>Rev</b>	0.5 $\mu$ L
<b>DNTP's 10mM</b>	0.5 $\mu$ L
<b>MgCl<sub>2</sub> 30 mM</b>	1 $\mu$ L
<b>PCR B10X</b>	2 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	13.5 $\mu$ L
<b>Taq amplificasa</b>	1 $\mu$ L
<b>vol final</b>	20 $\mu$ L

**Tabla 7.** Reacción empleada para la amplificación de la región codificante de ISG12

Temperatura	Tiempo
<b>94 °C</b>	5 min
<b>94 °C</b>	30 seg
<b>60 °C</b>	30 seg
<b>72 °C</b>	40 seg
<b>72 °C</b>	5 min
<b>4 °C</b>	$\infty$

**Tabla 8.** Programa utilizado para la amplificación de ISG12, la reacción fue sometida a 27 ciclos.

### 3. Digestión del inserto

Reactivo	Volumen
DNA	5 $\mu$ L
Buffer	1 $\mu$ L
BSA	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3.5 $\mu$ L
Enzima Xho I	0.5 $\mu$ L
Enzima EcoR I	0.5 $\mu$ L
Vol final	10 $\mu$ L

Reacción utilizada para la digestión del Inserto. Después de agregar todos los reactivos se llevo a 37 °C mínimo durante 1 hora.

### 4. Ligación ISG12-EGFP

	Control	1:4	1:8	1:10
<b>Vector</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Inserto</b>	-	5 $\mu$ L	9.5 $\mu$ L	6 $\mu$ L
<b>Buffer 10X</b>	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Enzima</b>	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>vol final</b>	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	15 $\mu$ L	10 $\mu$ L

**Tabla 10.** Diluciones utilizadas para la clonación EGFP-ISG12. La ligación se mantuvo a 16 °C durante 4 días

---

---

## 5. Transformación de células competentes *E. coli*

50 $\mu$ L de células competentes- 50 $\mu$ L de KCM	
2 min a 42°C en termomixer	
3 min en hielo	
1mL de medio LB durante 500 rpm/37°C/1h	
Centrifugar a 4000 rpm x 3 min	
Decantar sobrenadante	
Resuspender con el resto del sobrenadante y plaquear en caja petrí con medio que agar LB/kanamicina	
Incubación de la placa a 37°C durante toda la noche	

Tabla 11. Reacción utilizada para la transformación de las células competentes con cada producto de la ligación

## 6. Tratamiento para cubreobjetos en la técnica de inmunofluorescencia

Colocar cubreobjetos en placa multipozos	
Lavar de 3 a 4 veces con E+OH puro	
Lavar una vez con PBS estéril y retirar	
Colocar Poli-L-lisina 10 minutos (1 mL- 5mg/50 $\mu$ L) (Sigma-aldrich) 0.1% (W/V) en H <sub>2</sub> O. Retirar.	
Lavar dos veces con H <sub>2</sub> O estéril y retirar	
Dejar 30 minutos bajo luz UV	
Sembrar células MCF7	

## 7. Anticuerpos empleados en Inmunofluorescencias

	MCF7	MCF7/EGFP-ISG12
<b>α- primario</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• α-ER α 1:100 rabbit</li> <li>• α-PR 1:300 rabbit</li> <li>• α.AR 1:100 rabbit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• α-ER α 1:100 rabbit + α -EGFP 1:500</li> <li>• α-PR 1:300 rabbit + α-EGFP 1:500</li> <li>• α-AR 1:100 rabbit + α-EGFP 1:500</li> </ul>
<b>α- secundario</b>	α-Alexa 647 1:1200	α-Alexa 647 1:1200 + α-Alexa 488 1:1200

**Tabla 12.** Anticuerpos utilizados para la localización de los receptores nucleares ER, PR y AR en cultivo control y en línea celular estable bajo un estímulo con su respectivo ligando. Las células MCF7 o MCF7/EGFP-ISG12 fueron incubadas durante una hora con el anticuerpo primario luego se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario.

## 7. Anticuerpos empleados en la detección de proteínas por WB

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Peso esperado
<b>ERα 1:1000</b>	rabbit 1:10 000	66 kDa
<b>PR 1:2000</b>	rabbit 1:10 000	99 kDa
<b>AR 1:1000</b>	rabbit 1:10 000	99 kDa
<b>Lámina B 1: 1000</b>	α –mouse 1:10 000	67 kDa
<b>ISG12 1:1000</b>	α –rabbit 1:10 000	37 kDa (12 kDa de ISG12+ 25 kDa de EGFP)

**Tabla 13.** Anticuerpos utilizados para la detección de los niveles de receptores nucleares en el fraccionamiento subcelular. Las diluciones de los anticuerpos fueron realizadas en TBS-Twin.

## RECEPTORES NUCLEARES: DEL NÚCLEO AL CITOPLASMA

**Bibiana Ortega-Domínguez, Marlene Herrera-Ramírez  
y Angeles C. Tecalco-Cruz\***

Programa de Investigación de Cáncer de Mama y Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.

\*E-mail: atecalco@ibiomedicas.unam.mx

### RESUMEN

Los receptores nucleares (RN) constituyen una familia de factores transcripcionales activados por ligando que regulan la expresión de un gran número de genes de forma dependiente del tipo y contexto celular. La localización subcelular de los RN es altamente dinámica y repercute sobre sus funciones como factores transcripcionales. En presencia de su ligando específico, los RN se acumulan en el núcleo para modular la expresión de sus genes blanco. Por ende, la salida desde el núcleo a citoplasma de los RN disminuye su acumulación nuclear y abate su actividad transcripcional. Por lo tanto, la exportación nuclear constituye un importante mecanismo de regulación de la actividad de los RN. A pesar de su importancia, el proceso de exportación nuclear de los RN no ha sido completamente explorado, sin embargo, los estudios que se tienen hasta ahora sugieren la participación de las proteínas CRM-1 y la Catreliculina (CRT) como mediadoras de este proceso. En esta revisión se destaca la exportación nuclear como un mecanismo regulador de las funciones de los RN y se discuten las características estructurales y funcionales de las exportinas CRM-1 y CRT.

**Palabras Clave:** CRM-1, CRT, exportación nuclear, receptores nucleares, regulación transcripcional.

### Nuclear receptors: from the nucleus to the cytoplasm

### ABSTRACT

Nuclear receptors (RN) are a family of transcription factors activated by ligand which regulate the expression of many genes dependent on the cellular type and context. The subcellular localization of RNs is highly dynamic and affects its function as transcriptional factors. In the presence of its specific ligand, the RNs increase in the nucleus to modulate the expression of their target genes. Thus, the exit from nucleus to cytoplasm of RNs decreases its nuclear accumulation and its transcriptional activity. Therefore, nuclear export is an important mechanism regulating the activity of RNs. Despite its importance, the process of nuclear export of RNs has not been fully studied. However, the studies made so far suggest the involvement of the CRM-1 and Catreliculin (CRT) proteins as mediators of this process. In this review, we highlight the nuclear export as a regulatory mechanism to control the functions of RNs and the structural and functional characteristics of CRM-1 and CRT exportins are discussed.

**Key Words:** CRM-1, CRT, nuclear export, nuclear receptors, transcriptional regulation.

## INTRODUCCIÓN

Los receptores nucleares (RN) son factores de transcripción (FT) activados por ligando, que modulan la expresión de diferentes genes implicados en la diferenciación, apoptosis, crecimiento y el metabolismo, entre otros<sup>[1,2]</sup>. La expresión de los RN es dependiente del tipo de tejido y contexto celular, y la desregulación de su expresión está involucrada en diversas enfermedades como cáncer, alteraciones cardiovasculares y diabetes<sup>[3,4]</sup>. Se han identificado 48 miembros que conforman una superfamilia de RNs que transducen señales de ligandos específicos de naturaleza lipofílica, como las hormonas esteroideas, tiroideas y ácidos grasos o ligandos no naturales, como los fármacos tiazolidinedionas<sup>[1,5]</sup> (Figura 1A). De acuerdo a las características de sus ligandos, los RNs se subdividen en seis grupos (Tabla I), dentro de los cuales sobresalen por su relevancia en la homeostasis, el primer grupo de receptores para hormonas tiroideas y el tercer grupo integrado por receptores para las hormonas esteroideas. Existe también un grupo de RNs denominados huérfanos, debido a que sus ligandos aún no se identifican<sup>[6,7]</sup>.

La estructura de los RNs está conformada por dominios conservados denominados A, B, C, D, E y F, partiendo del extremo N-terminal al C-terminal. La región A/B comprende el primer dominio de activación transcripcional (AF-1), posteriormente se encuentra la región C que presenta el dominio de unión al ADN (DBD). La región D además de contener una secuencia de localización nuclear (NLS), actúa como una estructura "bisagra" entre la región C y E involucrada en los cambios conformacionales de los RNs. La región E contiene el dominio de unión al ligando (LBD) y un segundo dominio de función de activación transcripcional (AF-2)<sup>[1]</sup>. Algunos RNs presentan una región F relacionada con la modulación de su actividad (Figura 1B)<sup>[8]</sup>.

## VÍA DE SEÑALIZACIÓN GENÓMICA DE LOS RNs

La vía de señalización genómica o clásica de los RNs, comienza cuando el ligando se une al dominio LBD de su RN específico. Como resultado de esta interacción ocurre un cambio conformacional en los RNs, que permite la disociación de proteínas que los mantienen en un estado inactivo en el citoplasma, como es el caso de la chaperona HSP90 y favorece su acumulación en el núcleo celular<sup>[9]</sup>. En el interior nuclear, los RNs como monómeros, homodímeros o heterodímeros se pueden unir a secuencias específicas en el ADN y reclutar proteínas correguladoras para dirigir la transcripción génica (Figura 1C)<sup>[9]</sup>. Los correguladores transcripcionales, no se unen directamente al ADN, sino que son reclutados por los RNs a través de sus dominios de transactivación (AF-1 y AF-2) y se dividen en coactivadores y correpresores<sup>[10]</sup>. Los coactivadores están asociados a la relajación de la estructura de la cromatina por poseer o reclutar proteínas con actividad de acetilación de histonas, mientras que los correpresores están asociados

a la compactación de la cromatina por poseer actividad de desacetilación de histonas. De esta forma, los correguladores de los RNs modulan la compactación o descompactación de la cromatina para reprimir o inducir, respectivamente, la expresión génica<sup>[9]</sup>.

A pesar de que los RN son conocidos por sus funciones genómicas o clásicas como FT, algunos de ellos como los receptores para hormonas esteroideas, también han sido localizados en la membrana celular y pueden desencadenar cascadas de señalización intracelulares, activando diversos segundos mensajeros que conllevan a la activación de cinasas o vías dependientes de calcio para generar diversas respuestas biológicas. Estas vías rápidas de transducción de los RNs no relacionadas con sus funciones transcripcionales son conocidas como vías no genómicas o no clásicas<sup>[10,11]</sup>.

La actividad de los RNs es regulada por mecanismos como la degradación<sup>[12]</sup>, estabilidad<sup>[13]</sup> y bloqueo de la dimerización<sup>[14]</sup>, así como por exportación nuclear<sup>[15,16]</sup>. Este último mecanismo podría ser crucial en la actividad de los RNs considerando que regulan la expresión génica<sup>[14,17]</sup>. A continuación se describen los aspectos que hasta ahora se han estudiado sobre la exportación nuclear de los RNs.

## ENVOLTURA NUCLEAR Y PORO NUCLEAR

La envoltura nuclear es una doble membrana que separa el compartimento citoplasmático del nuclear y permite el transporte bidireccional a través de los complejos proteicos del **poro nuclear**. A través de estos canales que miden de 100–150 nm de diámetro<sup>[18]</sup>, se da el intercambio pasivo de iones, y de pequeñas moléculas y proteínas menores a 20kDa<sup>[19]</sup>. El complejo del poro nuclear está constituido por aproximadamente 100 proteínas llamadas nucleoporinas (NUPS), diez de ellas con residuos repetidos FG (Fenilalanina-Glicina) que participan en el transporte de proteínas como los RNs entre núcleo y citoplasma<sup>[20]</sup> (Figura 2A).

## IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LOS RNs

Tanto la localización subcelular de los RNs como la de otros FT, es altamente dinámica entre los compartimentos del citoplasma y el núcleo. La entrada de los RNs al interior del núcleo es un proceso conocido como **importación nuclear**<sup>[19]</sup>. Para que se lleve a cabo este proceso se requiere de transportadores identificados como "importinas  $\alpha$  y  $\beta$ " las cuales se unen con los RNs que se denominan proteínas "carga"<sup>[21]</sup>. El transporte subcelular requiere de la interacción de las importinas con secuencias específicas de los RNs denominadas secuencia de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal)<sup>[21]</sup>. Diversos estudios demuestran que los RNs activados por su ligando, presentan cambios conformacionales y su translocación hacia el núcleo celular<sup>[14,17]</sup>. Es por ello que el estímulo con su ligando específico conduce a la acumulación

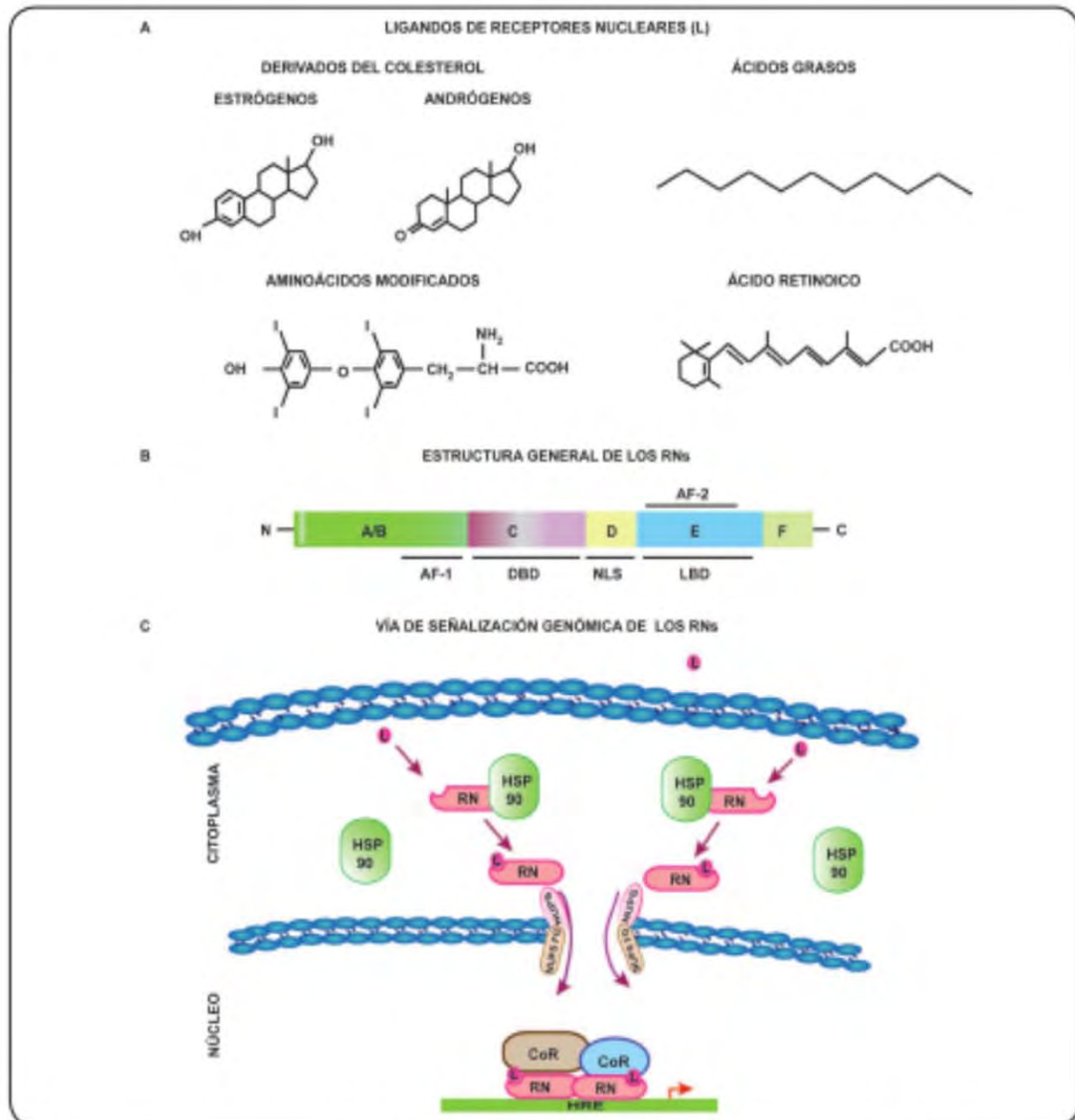


Figura 1. Receptores nucleares (RN) y su vía de señalización genómica. A. Ligandos representativos de los RNs. Los ligandos de los RNs son de diversa naturaleza, algunos ejemplos de ellos son los derivados del colesterol (estrógenos, progesterona, andrógenos, glucocorticoides), ácidos grasos (como las prostaglandinas), aminoácidos modificados (hormonas tiroideas) y el ácido retinoico. B. Dominios funcionales de los RNs. Los RNs poseen de cinco a seis dominios funcionales denominados con letras de la A-F. La región N-terminal o A/B contiene el dominio de activación transcripcional AF-1. La región C consiste en el dominio de unión al ADN (DBD) que es altamente conservado entre los RNs. La región D o "bisagra" conecta al DBD con la región E y además contiene la secuencia de localización nuclear (NLS). La región E conforma el dominio de unión al ligando o LBD y el segundo dominio de transactivación AF-2. El dominio F está presente sólo en algunos RNs. C. Vía de señalización genómica de los RNs. Los RNs son activados por su ligando específico en el citoplasma. La activación de los RNs conduce a su cambio conformacional, su disociación con proteínas chaperonas (HSP90), dimerización y translocación al núcleo. En este compartimento, los RNs se unen a sus elementos de respuesta a la hormona (HRE) e interactúan con coreguladores (CoR) (coactivadores o corepresores) para modular la expresión de sus genes blanco.



Grupo	Receptor nuclear	Algunos ligandos
Grupo 1 Receptores de Hormona Tiroidea	Receptor de hormona tiroidea (TR) Receptor de ácido retinoico (RAR) Receptor de la vitamina D (VDR) Receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR)  Receptor pregnano X (PXR) CAR/MB67 Receptor X del hígado (LXR) Receptor X farnesoide (FXR) REveRB RZR/ROR	Hormona tiroidea Ácido retinoico 1-25 (OH) <sub>2</sub> Vitamina D <sub>3</sub> Ácidos grasos, Benzotrienos, Eicosanoides, Prostaglandinas J <sub>2</sub> , Tiazolidinedionas. Xenobióticos Androstanos Oxisteroles Ácidos biliares Desconocido Desconocido
Grupo 2 Receptores de Retinoide X	Receptor Retinoide X (RXR) COUP-TF HNF-4 TLX PNR TR2	9-cis ácido retinoico Desconocido Tioéster acil-CoA Desconocido Desconocido Desconocido
Grupo 3 Receptores esteroideos	Receptor de estrógeno (ER) Receptor de progesterona (PR) Receptor de andrógeno (AR) Receptor de glucocorticoide (GR) Receptor de mineralocorticoide	17β-Estradiol Progesterona Testosterona Hidrocortisona Aldosterona
Grupo 4 Receptores Huérfanos	NGF1-B (NR4A-1) NURR1 (NR4A-2) NOR1 (NR4A-3)	Desconocido Desconocido Desconocido
Grupo 5 Receptores Huérfanos	SF-1 /NR5A-1 Receptores Relacionados a <i>Drosophila</i> FTZ-F1	Desconocido Desconocido
Grupo 6 Receptores Huérfanos	GNF1 (NR4A6)	Desconocido

Tabla I. Clasificación de los RNs.

nuclear de los RNs y favorece sus funciones como FT regulando la expresión génica.

Los RNs también requieren de transportadores denominados "exportinas" para salir del núcleo hacia el citoplasma. Este proceso se conoce como **exportación nuclear** y se lleva a cabo tras la interacción de las exportinas con las secuencias denominadas secuencias de exportación nuclear (NES, Nuclear Export Signal) de sus proteínas cargo. Las NES consideradas típicas o consenso se caracterizan por contener de 3 a 4 residuos hidrofóbicos ricos en leucinas, sin embargo existen modificaciones en esta secuencia denominada NES no

consenso<sup>[20]</sup>. De forma interesante, en la mayoría de los RNs se han identificado NES no consenso, y algunos autores proponen que el DBD también podría funcionar como NES para que se lleve a cabo la exportación nuclear<sup>[22]</sup>, como se discutirá más adelante. Este proceso requiere la asociación del RN cargo, la exportina y Ran GTP para formar un complejo trimérico (RNcargo/exportina/RanGTP), que interactúa con repetidos FG de las NUPS del poro nuclear. Lo anterior, facilita la salida del complejo trimérico del núcleo y una vez en el citoplasma se efectúa la hidrólisis de RanGTP a RanGDP y consecuentemente el desensamble de dicho complejo (Figura 2B)<sup>[20,21]</sup>. Bajo estas consideraciones, el proceso de exportación nuclear resulta

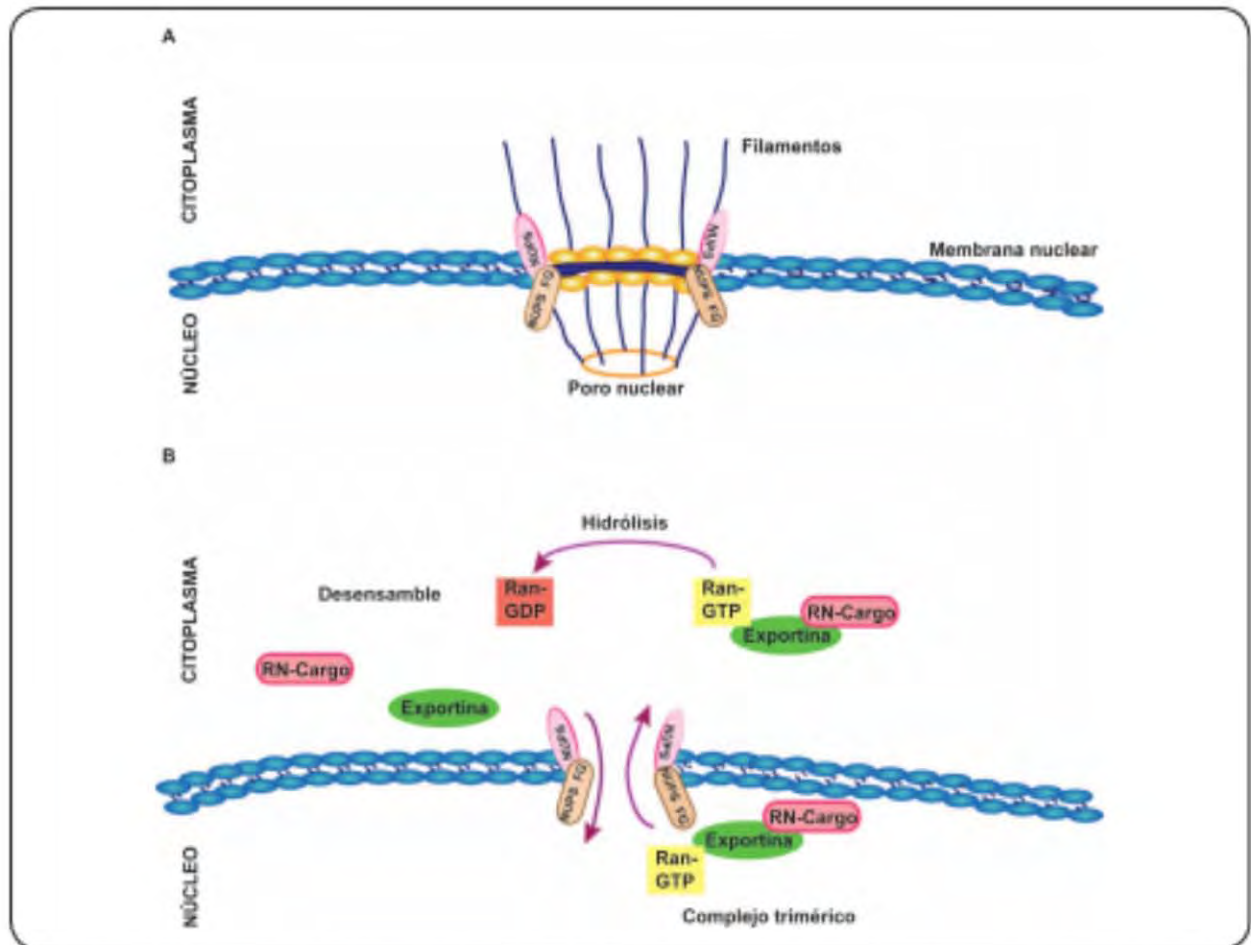


Figura 2. Envoltura nuclear y la exportación nuclear. A La envoltura nuclear separa el citoplasma del núcleo celular y está constituida por poros nucleares conformados por nucleoporinas que contienen repeticiones ricas en Fenilalanina y Glicina (NUPS FG) y filamentos proteicos nucleares y citoplasmáticos. B A través de los poros nucleares se lleva a cabo el proceso de exportación nuclear. Este proceso es dinámico y requiere la formación de un complejo trimérico entre la exportina, el RN cargo y RanGTP. El complejo trimérico interactúa con las NUPS F y G y atraviesa el poro nuclear, una vez que en el citoplasma ocurre la hidrólisis de RanGTP a RanGDP y en consecuencia la disociación del complejo, liberando al RN cargo y facilitando el regreso de la exportina al núcleo celular.

una importante estrategia para regular la función de los RNs. Sin embargo, son pocos los estudios y la información que se conoce sobre la exportación nuclear de los RNs y las exportinas implicadas en este proceso.

**NES Y EXPORTINAS DE LOS RNs**

Mientras que ya se ha identificado y caracterizado ampliamente la NLS de los RNs necesaria para su acumulación en el núcleo celular, no está del todo dilucidada la presencia de NES en los RNs<sup>[22,24]</sup>. De toda la superfamilia de los RNs, sólo en algunos de ellos se han identificado NES canónicos<sup>[4]</sup>, y en la mayoría de ellos NES no canónicos<sup>[22,24]</sup>, e incluso,

algunos autores proponen la ausencia de NES en los RNs<sup>[22]</sup>. Además, para algunos RNs, como por ejemplo el receptor de estrógenos (ER $\alpha$ ), existe discrepancia entre los NES no canónicos funcionales identificados por diversos grupos de investigación<sup>[22,24,25]</sup>. Otro aspecto interesante es que algunos autores sugieren que los dominios DBD altamente conservados entre los RNs podrían ser los responsables de su exportación nuclear<sup>[22]</sup>. También existen algunos grupos de investigación que consideran que otras proteínas podrían actuar como mediadoras junto a las exportinas para la salida de los RNs del núcleo<sup>[24]</sup>. Dentro de la complejidad que existe en la exportación nuclear de los RNs, se incluyen las

exportinas. Aunque existen varias exportinas, para los RNs se han reportado principalmente dos: La exportina CRM-1 (Chromosome Region Maintenance 1)<sup>[24,25]</sup> y la Calreticulina (CRT)<sup>[26]</sup>. Estas proteínas representan las dos principales vías de exportación nuclear documentadas para RNs. El conocer las características estructurales y funcionales de la CRM-1 y la CRT contribuye a entender la importancia de la exportación nuclear en la regulación de la actividad de los RNs.

### CRM-1 y CRT

La proteína CRM-1 llamada también exportina 1, es un miembro de la superfamilia de las carioferinas. La CRM-1 es una proteína codificada por el gen localizado en el cromosoma humano 2p15, la cual está conservada entre diferentes especies como *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*<sup>[24]</sup>. La exportina CRM-1 tiene un peso molecular de 112 kDa (Tabla II) y estructuralmente tiene forma de anillo constituido de 21 repetidos HEAT (Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A and TOR1), formando dos  $\alpha$ -hélices anti paralelas conectadas con asas de varios tamaños<sup>[24]</sup>. En el fragmento C-Terminal se localiza una región denominada CTR donde sugieren que se une con un asa de unión a Ran-GTP<sup>[24]</sup>. El dominio CRIME

(CRM-1, Importina  $\beta$ , Etc) de la región N-terminal junto con el asa acidica ubicada en la región intermedia interactúan con Ran-GTP. Entre los repetidos 11 y 12 se forma un surco hidrofóbico capaz de reconocer las NES de las proteínas cargo (Figura 3A)<sup>[24]</sup>.

En lo que respecta a la CRT o Calreticulina (Calcium binding protein localized to the endoplasmic/sarcoplasmic Reticulum membranes), es una proteína de 46 kDa conformada por tres dominios estructurales y funcionales (Tabla II). La región N-terminal (dominio N) altamente conservada<sup>[21,22]</sup>, el dominio P rico en prolina que contiene una secuencia NLS putativa<sup>[23]</sup> y la Región C-terminal (dominio C) de interacción con otras proteínas chaperonas que contienen la secuencia de retención en el retículo endoplasmático KDEL (Lys, Asp, Glu, Leu)<sup>[21,22,24,25]</sup>. Tanto el dominio P y C tienen afinidad de unión y la capacidad de unirse diferencialmente al calcio, mientras que el dominio N tiene importantes implicaciones en la unión con integrinas y con los RNs (Figura 3B).

### LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA CRM-1 Y LA CRT

Diversos estudios han mostrado que la CRM-1 es nuclear, localizándose principalmente en la membrana nuclear<sup>[24,26,28]</sup>.

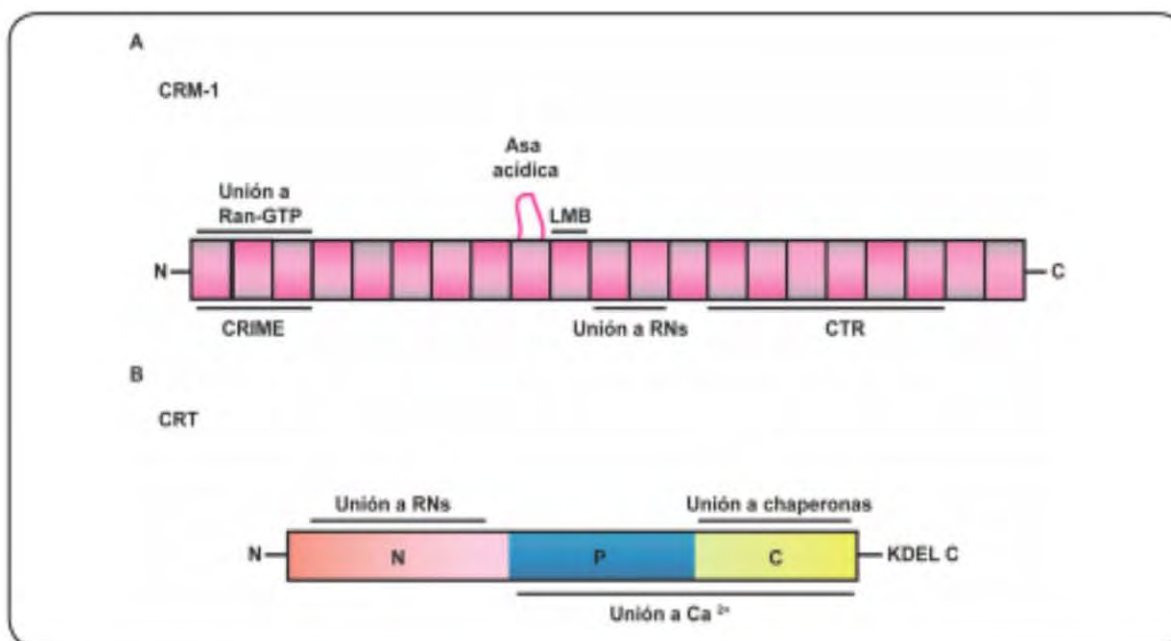


Figura 3. Dominios estructurales de la CRM-1 y la CRT. La CRM1 es una proteína que está estructuralmente constituida por 21 repetidos HEAT. El dominio CRIME corresponde a la región N-terminal, mientras que la región CRT corresponde al dominio C-terminal. Confiene una asa acidica que interactúa con RanGTP y entre los repetidos HEAT 11 y 12 ocurre el reconocimiento con los RNs. B. Calreticulina o la CRT está estructuralmente dividida en tres dominios (N, P y C). El dominio N tiene importantes implicaciones en la unión a los RNs. Los dominios P y C contienen sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> con afinidad diferencial. En el dominio C además se localiza la señal peptídica KDEL de localización en retículo endoplasmático.

Esto se identificó por primera vez en *Schizosaccharomyces pombe*, donde participa en mantener organizada la estructura del cromosoma<sup>[26,27]</sup>. Katrin Statde *et al.*, en 1997, identificaron a la CRM-1 como una exportina en *Saccharomyces cerevisiae* y la renombraron como exportina 1<sup>[28]</sup>. En ese mismo año se identificó que la CRM-1 de humano podía interactuar con componentes del poro nuclear como las NUPS<sup>[28]</sup>. La proteína CRM-1 puede llevar a cabo la exportación nuclear de diferentes proteínas, entre ellas los RNs pero también de ARN como es el caso de la subunidad pequeña y grande del ribosoma, sin embargo, la exportación nuclear de ARN por la CRM-1 requiere de proteínas adaptadoras<sup>[28]</sup>.

Mientras que la CRM-1 es una proteína nuclear, la CRT es una proteína que se localiza en diversos compartimentos celulares. Se identificó por primera vez en el retículo sarcoplasmático del músculo esquelético del conejo<sup>[40]</sup>, como una proteína de unión a  $Ca^{2+}$ <sup>[41]</sup>. Las funciones de la CRT son diversas, modula las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  y actúa como una chaperona al facilitar el plegamiento de las proteínas<sup>[42]</sup>. Aunque en un inicio se consideró una proteína exclusiva del retículo endoplasmático estudios posteriores documentaron su localización en el núcleo y el citoplasma de células no musculares<sup>[28,42-49]</sup> (Tabla II). Al respecto, la CRT tiene una importante y novedosa función en el núcleo como exportina<sup>[28]</sup>. No obstante, esta nueva función de la CRT se ha reportado sólo para la proteína inhibidora de proteínas cinasas (PKI) y para algunos RNs<sup>[27,28,49]</sup>. El mecanismo de la CRT como exportina parece ser similar al de la CRM-1, debido a que se asocia para formar un complejo trimérico con una NES presente en PKI y RanGTP (PKI/CRT/RanGTP)<sup>[28]</sup>. Adicional a esta función, también se ha reportado como una exportina específica para el Receptor de glucocorticoides (GR) y como una exportina que podría tener un efecto sinérgico a la función de la exportina CRM-1 para los otros RNs<sup>[27]</sup>.

Los estudios que han establecido que la CRM-1 y la CRT actúan como exportinas de diferentes proteínas han requerido el uso de inhibidores que bloqueen su actividad<sup>[28,50,51]</sup>. En el caso de la CRT no se tienen inhibidores farmacológicos para controlar sus funciones y la estrategia con la que se cuenta es la reducción de su expresión mediante un sistema de ARN interferente<sup>[51]</sup>. En cuanto a la CRM-1, se ha usado un inhibidor que actúa a través de su unión covalente a residuos de cisteína de la CRM-1 para bloquear su unión a las NES de las proteínas cargo, conocido como Leptomycin B (LMB)<sup>[50]</sup>. Es relevante identificar nuevos inhibidores de estas exportinas, las cuales tienen importantes funciones en condiciones normales y también han sido asociadas con la deslocalización de diversas proteínas en algunas enfermedades (Tabla III).

La desregulación de la CRM-1 se ha reportado en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, altos niveles de la CRM-1 conducen a la deslocalización de supresores tumorales p53 y FOXO para afectar sus funciones en células de distintos tipos de cáncer<sup>[52-54]</sup>. Por esta razón, algunos estudios se están enfocando en el diseño de inhibidores específicos y no tóxicos de la actividad de la CRM-1<sup>[55]</sup>. La CRT, en cambio, es una proteína multifuncional, importante para la homeostasis. La expresión de la CRT es crucial para el desarrollo embrionario y en el adulto regula las concentraciones de calcio, actúa como chaperona y como exportina de la proteína PKI y los RNs y posiblemente de otras proteínas aún no descubiertas<sup>[28]</sup>. En algunas enfermedades se ha visto una desregulación de la expresión de la CRT, una de ellas en cáncer de distintos tejidos (Tabla III)<sup>[55,56]</sup>. La inhibición de la actividad de la CRM-1 y la CRT resulta por lo tanto importante para el estudio de sus proteínas cargo y de los factores y señales implicados en la exportación nuclear. Además, es interesante considerar que los inhibidores de la actividad de exportinas de la CRM-1 y la CRT en contextos determinados pueden tener implicaciones dentro de las estrategias terapéuticas asociadas con la deslocalización de FT en distintos padecimientos.

Proteína	Características	Localización	Funciones
CRM-1 Exportina 1	Locus 2p15 aa: 1071 PM: 112 kDa	Núcleo	Mantenimiento de la organización estructural del cromosoma Exportación nuclear
Calreticulina Proteína de alta afinidad de unión a $Ca^{2+}$ Calregulina CRP55	Locus 19p13.2 aa: 417 PM: 46 kDa	Reticulo endoplasmático  Citosol  Núcleo	Homeostasis de $Ca^{2+}$ Proteína chaperona  Adhesión celular Regulación de la estabilidad de ARNm  Unión al DBD de los RNs Exportación nuclear

Tabla II. Principales características y funciones de la CRM1/CRT.

Proteína	Enfermedad	Mecanismo/Efecto	Referencia
CRM-1	Cáncer	Deslocalización de p53 y FOXO	(Lain, Xirodimas <i>et al.</i> 1999)
Calreticulina	Cáncer	Incremento en los niveles de ARNm y proteína en diversos tipos de cáncer como el de mama y páncreas en asociación con el desarrollo y la progresión de la enfermedad. En cáncer de mama se ha propuesto como potencial biomarcador de la enfermedad.	(Lwin <i>et al.</i> , 2010) (Sheng <i>et al.</i> , 2014)
	Hiperparatiroidismo secundario	Su incremento impide la regulación negativa de la expresión de la hormona paratiroidea (PTH) por la unión al DBD del receptor VDR.	(Sela-Brown <i>et al.</i> , 1998)
	Cardiomiopatía dilatada	La sobreexpresión disminuye la transcripción de genes relacionados con el balance de Ca <sup>2+</sup> y con las uniones tipo gap.	(Lee <i>et al.</i> , 2013)
	Alzheimer	Disminución de la CRT en suero de pacientes con estadios más avanzados. Posible biomarcador para el diagnóstico temprano.	(Lin <i>et al.</i> , 2014)

Tabla III. La CRM-1 y la Calreticulina en procesos fisiopatológicos.

### CRM-1 Y CRT COMO LAS PRINCIPALES EXPORTINAS DE LOS RNs

Como se ha mencionado, la CRM-1 es la exportina más estudiada que está implicada en la salida de diversas proteínas del núcleo. La exportación nuclear de la mayoría de los RNs evaluados es también dependiente de la actividad de la CRM-1 (Figura 4A y B). A pesar de las discrepancias en la identificación de las NES de los RNs, el uso del inhibidor LMB, establece la participación de la CRM-1 como la exportina requerida para el transporte del núcleo al citoplasma de un gran número de RNs, entre ellos el ERα<sup>[24]</sup>, el Receptor de andrógenos (AR)<sup>[27]</sup> y el NR4A1<sup>[28]</sup>, entre otros.

En otros RNs las NES se han identificado y probado experimentalmente comprobando su funcionalidad (Figura 4B-1)<sup>[19]</sup>, mientras que otros sólo han sido identificados mediante estudios bioinformáticos siendo consideradas como las NES putativas<sup>[20]</sup>. En algunos otros casos existe divergencia sobre la ubicación de las NES funcionales entre el LBD o DBD de los RNs por diversos grupos de investigación (Figura 4B II, III). En el caso del ERα, un estudio identificó una NES en la región del DBD<sup>[21]</sup>, mientras que otros dos estudios diferentes reportaron una NES localizada en el LBD<sup>[22]</sup>. No obstante, todos estos estudios establecen que para la exportación nuclear de los RNs se requiere de la exportina CRM-1.

El proceso de exportación nuclear dependiente de la CRM-1 de algunos RNs puede estar acoplado a modificaciones postraduccionales de los mismos (Figura 4B IV), un ejemplo importante es el AR. En un estudio se determinó que la inhibición de la cinasa de serina treonina GSK-3, bloquea la fosforilación

del AR para facilitar su exportación nuclear<sup>[23]</sup>. Otros RNs, parecen requerir una proteína para la formación de un complejo con CRM-1 y favorecer el proceso de su exportación nuclear. Ejemplo de ello es el RN huérfano NR4A1, el cual requiere a una pequeña proteína denominada ISG12 para favorecer la salida de NR4A1 del núcleo al citoplasma<sup>[24]</sup>. También se ha propuesto que los RNs que carecen de NES podrían usar proteínas adaptadoras con secuencias NES para su exportación nuclear por CRM-1 (Figura 4B V)<sup>[24]</sup>.

La CRT es la otra exportina utilizada por los RNs para llevar a cabo su salida del núcleo (Figura 4A). La función de la CRT como una exportina de los RNs resulta relevante debido a que únicamente se ha mostrado su participación en la exportación nuclear de la proteína PKI y de algunos RNs. De forma interesante, la proteína PKI contiene una NES a través de la cual se asocia con la CRT para ser transportada al exterior del núcleo, en contraste, no todos los RNs a los que se asocia la CRT, presentan NES (Figura 4C)<sup>[21]</sup>. Burns *et al.* en 1994 reportaron que interactúa, mediante su dominio N, con una secuencia de aminoácidos KXFFKR situada en el DBD de los RNs, como GR, AR y el receptor de la vitamina D (VDR)<sup>[21]</sup>. La interacción de la CRT con estos RNs bloquea su reclutamiento a sus elementos de respuesta situados en el ADN de sus genes blanco. Además, en el mismo estudio, la sobreexpresión de la CRT conduce a la disminución de la actividad transcripcional de estos RNs.

Es interesante como otro estudio mostró que la CRT es capaz de regular la exportación nuclear de los RNs mediante la formación de un complejo con la proteína Ran GTP, por un mecanismo

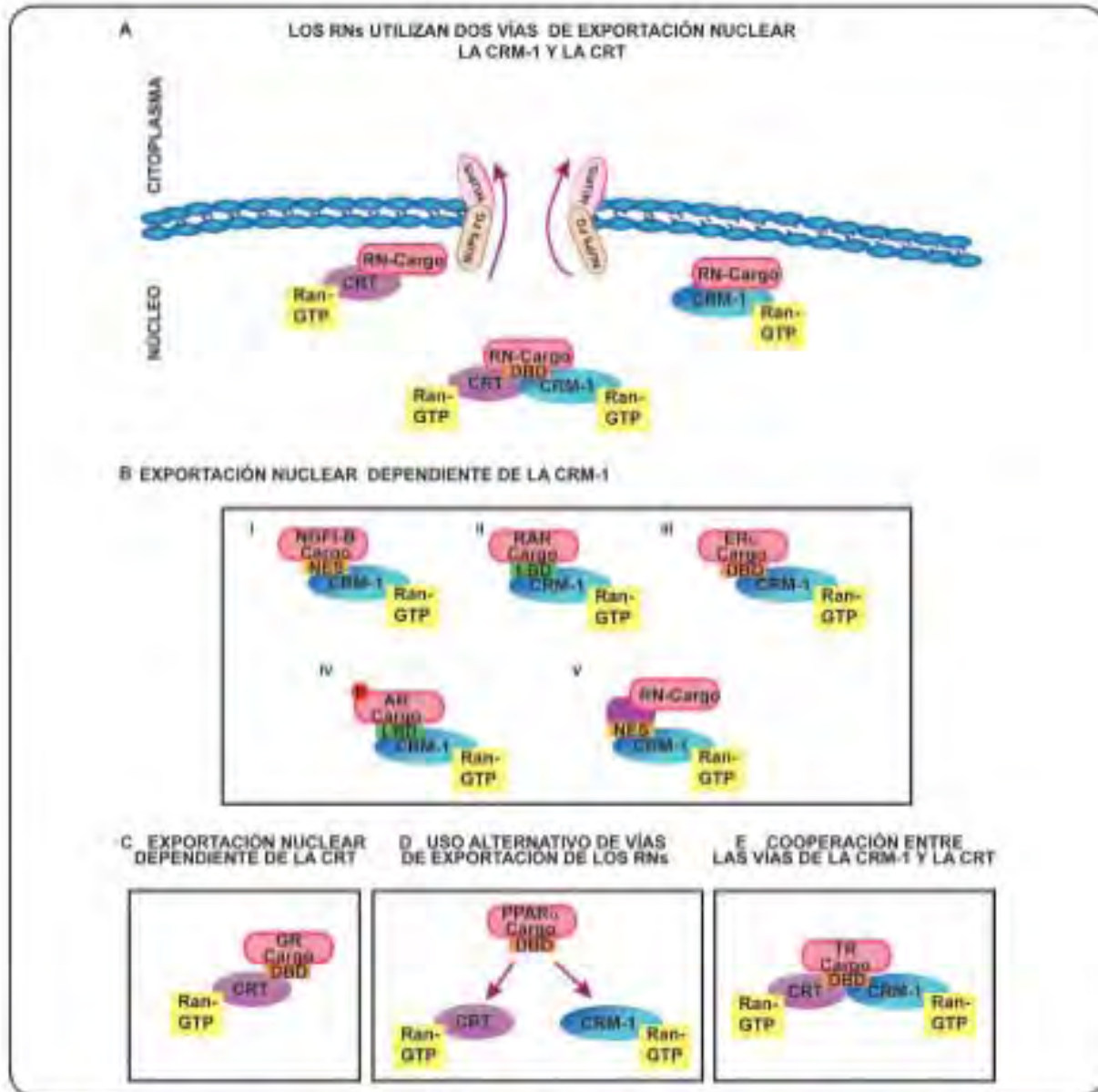


Figura 4. Vías de exportación nuclear de los RNs. A. Los RNs utilizan dos vías de exportación nuclear, la CRM-1 y la CRT. Algunos RNs son dependientes de la CRM1, otros lo son de la CRT y algunos otros RNs pueden usar alternativamente una u otra exportina, o bien usar de forma cooperativa ambas exportinas para salir del núcleo celular. B. La exportación nuclear dependiente de la CRM-1. Esta vía de exportación nuclear puede efectuarse a través de la asociación de la CRM-1 con los NES canónicos (I) o los NES no canónicos localizados en el LBD (II) o DBD (III) de los RNs. También se ha propuesto que modificaciones postraduccionales de los RNs podrían afectar su exportación nuclear (IV). Además, proteínas adaptadoras pueden ser requeridas para la interacción de la CRM-1 con los RNs (V). C. La exportación nuclear dependiente de la CRT. E DBD de los RNs se asocia a la CRT para su salida del núcleo. D. Uso alternativo de vías de exportación de los RNs. Bajo ciertas condiciones los RNs pueden ser exportados por una u otra exportina. E. Cooperación entre las vías de la CRM-1 y la CRT. Para incrementar la eficiencia de la salida de los RNs del núcleo, ambas vías pueden acoplarse de forma cooperativa. Receptor de hormona tiroidea (TR); Receptor de estrógenos (ER); receptor de glucocorticoides (GR); receptor de andrógenos (AR). Gen B inducible por el factor de crecimiento neuronal (NGF)-B Receptor de ácido retinoico (RAR), Receptor Activado por Proliferador de Peroxisoma (PPAR).

similar a la exportina CRM-1<sup>281</sup>. De esta forma, se evidenció que la CRT participa en la salida del núcleo al citoplasma del GR. Por lo tanto, la CRT parece requerir interactuar con secuencias como las NES localizadas dentro del DBD del GR para inducir su salida del núcleo celular<sup>280</sup>. Dado que el DBD es conservado en la superfamilia de los RNs, muchos otros miembros de esta familia podrían cambiar su localización subcelular de manera dependiente de la CRT. Estos datos sugieren que el DBD podría representar una atípica NES de los RNs reconocida por la exportina CRT<sup>281</sup>.

Por otra parte, se mostró que el heterodímero VDR/receptor  $\alpha$  retinoide (RXR) se une al promotor de la hormona paratiroidea (PTH) para regular negativamente su expresión. En la enfermedad de hiperparatiroidismo, los altos niveles de la proteína CRT bloquean la actividad de VDR<sup>280</sup>. La CRT se une al motivo KXFF(K/R)R localizado en el DBD del VDR para bloquear su asociación al ADN y así controlar su actividad, teniendo como consecuencia la desrepresión de la PTH<sup>280</sup>. Este estudio sugiere que la CRT podría unirse al DBD de otros RNs para bloquear su unión a sus elementos de respuesta a la hormona (HRE) y posteriormente promover su salida del núcleo celular<sup>280</sup>.

La CRT parece ser muy importante en la exportación nuclear de algunos RNs insensibles al efecto del inhibidor LMB, pero además también se han identificado los RNs cuya salida del núcleo es promovida por la colaboración de ambas exportinas, CRT y CRM-1<sup>105,165,276</sup>. Dos ejemplos son: el Receptor Activado por Proliferador de Peroxisoma (PPAR $\alpha$ ) y PPAR $\gamma$  que contienen una NES en el DBD reconocida por la proteína CRT para su exportación nuclear<sup>282</sup>. En contraste, mutantes de las NES de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  bloquean su exportación nuclear por la CRT<sup>282</sup>. Sin embargo, estos receptores también contienen una NES localizada en la región LBD que es sensible a la LMB. Por lo tanto, la exportación nuclear de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  es dependiente de la CRT y la CRM-1, por su interacción con diferentes NES, localizadas en el DBD y LBD, respectivamente. En este estudio se propone que la CRT es la principal exportina de ambos PPARs y que la CRM-1 podría ser una exportina auxiliar que se utiliza bajo condiciones específicas (Figura 4D)<sup>282</sup>.

Ambas exportinas de los NRs también podrían actuar no sólo como una vía alternativa una de la otra, sino en conjunto para lograr el objetivo en común de la exportación nuclear de ciertos RNs, como ocurre con el Receptor tiroideo (TR)<sup>277</sup>. Este RN modifica su localización nuclear al citoplasma a través de la acción cooperativa entre la CRT y la CRM-1. Se propone que la cooperación entre ambas vías de exportación nuclear permite una eficiente translocación núcleo-citoplasma de algunos RNs (Figura 4E)<sup>277</sup>. Cabe señalar que recientemente en un solo reporte se mencionan que otras exportinas participan en la exportación nuclear de TR, sin embargo, más estudios aún son necesarios para dilucidar si éstas podrían también asociarse con otros RNs.

### LA IMPORTANCIA DE LA EXPORTACIÓN DE LOS RNs

Los RNs en respuesta a su ligando se acumulan en el núcleo para llevar a cabo sus funciones transcripcionales. Cómo y cuándo son transportados al exterior del núcleo luego de la estimulación con su ligando no es conocido. No obstante, la exportación nuclear de estas proteínas resulta un mecanismo crucial en el control de la intensidad y duración de su vía de señalización genómica en contextos celulares específicos.

Mientras que se describe un mecanismo general para la importación nuclear de prácticamente todos los RNs, su exportación nuclear se lleva a cabo principalmente por dos diferentes vías, la CRM-1 y la CRT (Figura 4A). A pesar de que las vías de exportación nuclear para los RNs realizan la misma función, las proteínas CRM-1 y CRT no están relacionadas a nivel de secuencia, ni estructura (Figura 3). El contar con dos vías de exportación para los RNs podría sugerir la importancia de este mecanismo en la regulación de la transcripción de sus genes. También, las vías de la CRM-1 y la CRT indican la trascendencia de promover la salida de RNs del núcleo y sugieren una posible regulación o coordinación entre ambas exportinas para lograr su función en condiciones específicas (Figura 4D, E)<sup>277</sup>. Así, la exportación nuclear de los RNs podría representar un mecanismo evolutivamente conservado para regular su actividad como FT.

El concepto del DBD como un dominio necesario para la vía de la CRM-1 y la CRT principalmente, indica que el proceso de exportación nuclear podría ser un mecanismo general para controlar la función de todos los RNs<sup>22,29</sup>. En los estudios que se han realizado, más de 10 RNs requieren el DBD para ser transportados del núcleo al citoplasma (Tabla IV). El DBD es altamente conservado y estructuralmente similar entre los RNs y aunque se asocia con la exportina CRT, también se reportan algunos tipos de NES en el DBD asociados con la CRM-1. De esta manera, el DBD es suficiente para el cambio de localización del núcleo al citoplasma de los RNs y podría definir un nuevo tipo de señal de exportación nuclear. El requerimiento del DBD para la exportación nuclear de los RNs presume que todos éstos podrían competir por las exportinas para ser llevados al exterior del núcleo y que por ende deben existir otras señales que modulen dicha competencia y confieran especificidad.

En forma global, se puede entender la exportación nuclear como un mecanismo absoluto y trascendental de apagado del proceso de transcripción génica, considerando que los RNs son FT y que el núcleo celular es su sitio de acción. Sin embargo, las consecuencias de la exportación nuclear no sólo conllevan a la inhibición de la actividad transcripcional de los RNs por relocalizarlos en el citoplasma, sino además podría tener efectos secundarios dentro de la vía de señalización de los RNs. Por ejemplo, al ser llevados los RNs fuera del núcleo se podrían desfavorecer sus funciones genómicas, pero favorecer sus

Exportación de receptores nucleares						
Exportina	Receptor nuclear	NES putativo	NES funcional	DBD	LBD	Referencia
CRM-1	ER $\alpha$		X	X	X	(Black <i>et al.</i> , 2001; Lombardi <i>et al.</i> , 2008)
	AR				X	(Schutz <i>et al.</i> , 2010)
	NR4A-1					(Papac-Milicevic <i>et al.</i> , 2012)
	NGFI-B		X	X		(Katagiri <i>et al.</i> , 2000)
CRT	GR		X	X		(Holaska <i>et al.</i> , 2001)
¿CRT?	PR	X			X	(Tyagi <i>et al.</i> , 1998)
	RXR			X		(Black <i>et al.</i> , 2001)
	LXR			X		(Black <i>et al.</i> , 2001)
	RAR $\alpha$			X		(Black <i>et al.</i> , 2001)
	CAR			X		(Xia & Kemper, 2007)
CRM-1 o CRT	PPAR $\alpha$		X	X		(Umemoto & Fujiki, 2012).
	PPAR $\gamma$		X	X		(Umemoto & Fujiki, 2012)
	VDR			X		(PrÜefer & Barsony, 2002)
	RXR		X		X	(PrÜefer & Barsony, 2002).
CRM-1 y CRT	TR			X		(Grespin <i>et al.</i> , 2008)

CRM-1 o CRT: Los RNs incluidos en este apartado pueden ser exportados por cualquiera de estas exportinas.  
 CRM-1 y CRT: Ambas exportinas están implicadas en la exportación de dicho receptor nuclear y trabajan cooperativamente.  
 ¿CRT? Se ha sugerido que esos RNs son dependientes de la CRT.

Tabla IV. Vías de exportación nuclear/NES para algunos RNs reportados.

funciones no genómicas, las cuales han sido descritas para algunos RNs en ciertos contextos celulares. También, tras la salida del núcleo de los RNs es probable que muchos de ellos puedan ser degradados para mantener un balance en sus niveles y en sus funciones, como ocurre con el GR<sup>(98)</sup> y el AR<sup>(93)</sup> que tras la inducción de su exportación nuclear hay un incremento en su ubiquitinación y degradación por el sistema de ubiquitina proteosoma<sup>(96,97)</sup>.

En diversas enfermedades se sabe que la actividad transcripcional de algunos RNs está desregulada por diferentes mecanismos moleculares, uno de ellos, podría ser la salida desde el núcleo al citoplasma de los RNs<sup>(95,98)</sup>. Muchas enfermedades asociadas con los RNs como el cáncer de diversos tejidos implican un incremento de su actividad transcripcional en el núcleo de las células<sup>(9)</sup>. Es probable que en estos padecimientos el transporte de los RNs por los compartimentos celulares esté afectado, influyendo en su función. La identificación de las

bases moleculares de la dinámica de la exportación nuclear de los RNs en condiciones normales y en alteraciones particulares de tejidos específicos, ayudará a entender mejor la importancia de este proceso y dicho conocimiento pueda ser usado para el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas. Es por tanto, un campo de investigación abierto que vislumbra importantes hallazgos dentro del estudio de los RNs.

#### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Dentro del compartimento nuclear de las células, los RNs modulan la expresión de sus genes blanco. La salida de los RNs del núcleo constituye un mecanismo control de sus vías de señalización genómica. El transporte de los RNs del núcleo al citoplasma es un proceso dependiente de las exportinas CRM-1 y CRT. Algunos RNs parecen ser preferenciales para una u otra exportina, o bien para ambas. En algunos casos, la exportación nuclear de los RNs puede verse afectada por modificaciones postraduccionales de los RNs, así como de la asociación con



otras proteínas adaptadoras de las exportinas. Tanto la CRM-1 como la CRT pueden reconocer secuencias NES canónicas y/o no canónicas que pueden encontrarse principalmente en el LBD y DBD. El DBD conservado entre los RNs se postula importante en el proceso de exportación nuclear. Aún falta detallar los mecanismos implicados en la exportación nuclear de los RNs e identificar las señales que regulan este proceso, sin embargo, a pesar de su complejidad, es clara su trascendencia en la regulación negativa de la actividad transcripcional de los RNs en los tejidos y contextos específicos donde se expresan estos RNs. En adelante, es importante determinar si las exportinas CRM-1 y CRT son las únicas exportinas implicadas en la regulación de los RNs, además de entender por qué algunos RNs son dependientes solamente de la CRM-1, si existen más RNs únicamente dependientes de la CRT, y bajo qué circunstancias existe una cooperación entre ambas exportinas o cuándo y por qué actúan como exportinas alternativas una de la otra o cooperativamente. Otro aspecto a dilucidar es la implicación de las NES y/o el DBD de los RNs en la exportación nuclear. Además, aún se requiere conocer si existen para todos los RNs proteínas adaptadoras que puedan facilitar su transporte del núcleo al citoplasma. El clarificar los mecanismos moleculares de la exportación nuclear de cómo un proceso de regulación de la localización y actividad de los RNs podría conducir a la identificación de nuevos blancos terapéuticos en las diversas enfermedades asociadas a la desregulación de los RNs.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Investigación de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradecemos al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por su apoyo técnico para la revisión del manuscrito. A Edgar Ortiz Hernández por sus contribuciones en esta revisión. Bibiana Ortega Domínguez es becaria CONACyT del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

#### REFERENCIAS

1. Germain, P., *et al.* Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 58(4), 685-704 (2006).
2. Sonoda, J., Pei, L. & Evans, R.M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett.* 582(1), 2-9 (2008).
3. Lonard, D.M. & O'Malley, B.W. Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8(10), 598-604 (2012).
4. Roshan-Moniri, M., *et al.* Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treat. Rev.* 40(10), 1137-1152 (2014).
5. Polvani, S., *et al.* Nuclear receptors and pathogenesis of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 20(34), 12062-12081 (2014).
6. Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 12(6), 486-504 (2012).
7. Tata, J.R. Signalling through nuclear receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(9), 702-710 (2002).
8. Burris, T.P., *et al.* Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol. Rev.* 65(2), 710-778 (2013).
9. Sever, R. & Glass, C.K. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(3), a016709 (2013).
10. Wang, C., Liu, Y. & Cao, J.M. G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int. J. Mol. Sci.* 15(9), 15412-15425.
11. Losel, R. & Wehling, M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(1), 46-56 (2003).
12. Callige, M. & Richard-Foy, H. Ligand-induced estrogen receptor alpha degradation by the proteasome: new actors? *Nucl. Recept. Signal.* 4, e004 (2006).
13. Wei, X., Xu, H. & Kufe, D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol. Cell* 21(2), 295-305 (2006).
14. Oh, Y. & Chung, K.C. Zinc finger protein 131 inhibits estrogen signaling by suppressing estrogen receptor alpha homodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430(1), 400-405 (2013).
15. Tyagi, R.K., *et al.* Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Mol. Endocrinol.* 12(11), 1684-1695 (1998).
16. Katagiri, Y., *et al.* Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat. Cell Biol.* 2(7), 435-440 (2000).
17. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81(3), 1269-1304 (2001).
18. Werner, S.R. & Rout, M.P. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(10), 562 (2010).
19. Chook, Y.M. & Blobel, G. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(6), 703-715 (2001).
20. Humen, S. & Kehlenbach, R.H. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 17(4), 193-201 (2007).
21. Goldfarb, D.S., *et al.* Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14(9), 505-514 (2004).
22. Black, B.E., *et al.* DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr. Biol.* 11(22), 1749-1758 (2001).
23. Bagley, S., *et al.* The nuclear pore complex. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 22), 3885-3886 (2000).
24. Lombardi, M., *et al.* Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J. Cell. Biol.* 182(2), 327-340 (2008).
25. Castoria, G., *et al.* Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells. *Oncogene* 31(46), 4868-4877 (2012).
26. Papac-Milicevic, N., *et al.* The interferon stimulated gene 12 inactivates vasculoprotective functions of NR4A nuclear receptors. *Circ. Res.* 110(8), e50-63 (2012).
27. Grespin, M.E., *et al.* Thyroid hormone receptor alpha1 follows a cooperative CRM1/calreticulin-mediated nuclear export pathway. *J. Biol. Chem.* 283(37), 25576-25588 (2008).
28. Holaska, J.M., *et al.* Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell. Biol.* 152(1), 127-140 (2001).
29. Saito, N. & Matsuura, Y. A 2.1-Å-resolution crystal structure of unliganded CRM1 reveals the mechanism of autoinhibition. *J. Mol. Biol.* 425(2), 350-364 (2013).

30. Petosa, C., *et al.* Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol. Cell.* 16(5), 761-175 (2004).
31. Krause, K.H. & Michalak, M. Calreticulin. *Cell* 88(4), 439-443 (1997).
32. Michalak, M., Robert Parker, J.M. & Opas, M. Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 32(5-6), 269-278 (2002).
33. Michalak, M., *et al.* Calreticulin. *Biochem. J.* 285(Pt 3), 681-692 (1992).
34. Michalak, M., *et al.* Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 344(Pt 2), 281-292 (1999).
35. Lu, Y.C., Weng, W.C. & Lee, H. Functional Roles of Calreticulin in Cancer Biology. *Biomed. Res. Int.* 526524 (2015).
36. Stade, K., *et al.* Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90(6), 1041-1050 (1997).
37. Gerace, L., Ottaviano, Y. & Kondor-Koch, C. Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 95(3), 826-837 (1982).
38. Fornerod, M., *et al.* The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* 16(4), 807-816 (1997).
39. Siddiqui, N. & Borden, K.L. mRNA export and cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3(1), 13-25 (2012).
40. MacLennan, D.H., Yip, C.C., Iles, G.H. & Seeman P. Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 37, 469-477 (1972).
41. Fliegel, L., *et al.* Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264(36), 21522-21528 (1989).
42. Ostwald, T.J. & MacLennan, D.H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249(3), 974-979 (1974).
43. Waisman, D.M., Salimath, B.P. & Anderson, M.J. Isolation and Characterization of Cab-63, a Novel Calcium-Binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 260(3), 1652-1660 (1985).
44. Smith, M.J. & Koch, G.L. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 8(12), 3581-3586 (1989).
45. Mueller, C.F., *et al.* Differential phosphorylation of calreticulin affects AT1 receptor mRNA stability in VSMC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370(4), 669-674 (2008).
46. Nakamura, K., *et al.* Functional specialization of calreticulin domains. *J. Cell Biol.* 154(5), 961-972 (2001).
47. Villagómez, M., *et al.* Calreticulin and focal-contact-dependent adhesion. *Biochem. Cell Biol.* 87(4), 545-556 (2009).
48. Opas, M., *et al.* Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells. *J. Cell Physiol.* 149(1), 160-171 (1991).
49. Liu, J. & DeFranco, D.B. Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol. Endocrinol.* 14(1), 40-51 (1985).
50. Kudo, N., *et al.* Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp. Cell. Res.* 242(2), 540-547 (1998).
51. Nguyen, M.M., *et al.* Cytoplasmic localization of the androgen receptor is independent of calreticulin. *Mol. Cell Endocrinol.* 302(1), 65-72 (2009).
52. Senapedis, W.T., Baloglu, E. & Landesman, Y. Clinical translation of nuclear export inhibitors in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 27, 74-86 (2014).
53. Gravina, G.L., *et al.* XPO1/CRM1-selective inhibitors of nuclear export (SINE) reduce tumor spreading and improve overall survival in preclinical models of prostate cancer (PCa). *J. Hematol. Oncol.* 7, 46 (2014).
54. Freedman, D.A. & Levine, A.J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell Biol.* 18(12), 7288-7293 (1998).
55. Sheng, W., *et al.* Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J. Cell Physiol.* 229(7), 887-897 (2014).
56. Lwin, Z.M., *et al.* Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma. *Mod. Pathol.* 23(12), 1559-1566 (2010).
57. Schutz, S.V., Cronauer, M.V. & Rinnab, L. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta promotes nuclear export of the androgen receptor through a CRM1-dependent mechanism in prostate cancer cell lines. *J. Cell Biochem.* 109(6), 1192-1200 (2010).
58. Kanwal, C., Li, H. & Lim, C.S. Model system to study classical nuclear export signals. *AAPS PharmSci.* 4(3), E18 (2002).
59. Burns, K., *et al.* Calreticulin: from Ca<sup>2+</sup> binding to control of gene expression. *Trends Cell Biol.* 4(5), 152-154 (1994).
60. Sela-Brown, A., *et al.* Calreticulin inhibits vitamin D's action on the PTH gene in vitro and may prevent vitamin D's effect in vivo in hypocalcemic rats. *Mol. Endocrinol.* 12(8), 1193-1200 (1998).
61. Prufer, K. & Barsony, J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol. Endocrinol.* 16(8), 1738-1751 (2002).
62. Umemoto, T. & Fujiki, Y. Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPARalpha and PPARgamma. *Genes Cells* 17(7), 576-596 (2012).
63. Gong, Y., *et al.* Nuclear export signal of androgen receptor (NESAR) regulation of androgen receptor level in human prostate cell lines via ubiquitination and proteasome-dependent degradation. *Endocrinology* 153(12), 5716-5725 (2012).