

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INTERACCIÓN DEL COMPLEJO WT1-Par4 CON EL PROMOTOR P1
DE Bcl-2 EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 EN PRESENCIA Y
AUSENCIA DE ESTÍMULO ESTROGÉNICO

Por

ANADULCE HERNÁNDEZ HERRERA

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN
CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Septiembre 2006

INTERACCIÓN DEL COMPLEJO WT1-Par4 CON EL PROMOTOR P1
DE Bcl-2 EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 EN PRESENCIA Y
AUSENCIA DE ESTÍMULO ESTROGÉNICO

Comité de Tesis

Dr. Pablo Zapata Benavides

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Dra. Laura María Trejo Ávila

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales

DEDICATORIA

A Marquitos por apoyarme en la realización de este proyecto profesional, y ser la parte fundamental de todos mis proyectos personales.

A mi papá y mamá por que gran parte de lo que soy ahora, es resultado de todos sus esfuerzos.

A los integrantes de la UBMC, Dr. Pablo, Diana y Chago, por haber sido mis compañeros, mis amigos y mi familia durante mucho tiempo.

A mi Nina Bella y mi prima Ericka por crear para mi un segundo hogar, a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por ser mi padre de la ciencia todos estos años, por toda la paciencia que me brindo, y por su amistad.

A mis compañeros y hermanos Diana y Chago, por acompañarme en este camino.

A la Dra. Laura Trejo por su valiosa colaboración en la revisión de este trabajo.

A Reina, que me ayudo mucho en la parte final de la tesis.

A katita por que aunque ya no estuvimos tan juntas estos 2 años, siempre esta ahí, como mi mejor amiga, le guste o no.

A Gloria Elizondo, Gil Gonzalez, Tati y Roman por aceptarme en su casa siempre, por confiar en mi y hacerme parte de su familia.

Al Dr. Mario Morales Vallarta y al Dr. Carlos Hernández Luna por
haberme mostrado siempre su apoyo.

Al Dr. Ricardo Fuentes Pensamiento y a la Maestra María Luisa Díaz, por
sus valiosas enseñanzas.

A mis amigos del L8, Cayito, Diana, Muñeeccaaa, Melisa, Ixchelt, por
ayudarme a hacer más llevaderos los tiempos de crisis de reactivos y
existentiales.

Al CONACyT por el apoyo que me brindo para la realización de este
proyecto.

A todo el personal del LIV que siempre me ayudó durante mi estancia en el
Laboratorio.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Secuencias de los oligos correspondientes a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor P1 de Bcl-2.....	26
II. Secuencia Blanco en el mensajero de Par4 contra la cual se encuentra dirigido elRNAi B.....	27
III. Secuencia Blanco en el mensajero de Par4 contra la cual se encuentra dirigido el RNAi de Gurumurthy et al.....	27
IV. Secuencias de oligos para su expresión en el plásmido pGSH1-GFP.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática de los dominios de Par4.....	9
2. Estructura del RNAm de WT1 y sus isoformas.....	13
3. Mapa del plásmido pGSH1-GFP.....	28
4. Elementos del vector pGSH1-GFP.....	28
5. Secuencia del plásmido lineal pGSH1-GFP.....	29
6. Prototipo del diseño de los oligos sentidos y antisentidos para su expresión en el plásmido pGSH1-GFP.....	29
7. Expresión Basal de WT1, Bcl-2 y Par4 de la Línea Celular MCF7.....	34
8. Expresión Basal de RE y p53 de la Línea Celular MCF7.....	34
9. Morfología de la Línea Celular MCF7.....	35
10. Cinética de Depleción de Estrógeno en la Línea Celular MCF7.....	36
11. Efecto del Tamoxifen en la Línea Celular MCF7.....	37
12. Localización de Par4 en la línea MCF7 por inmunohistoquímica.....	38
13. Localización de Par4 en la Línea Celular MCF7 por Western blot.....	39
14. Determinación del Complejo WT1-Par4 en la Línea Celular MCF7.....	40
15. Determinación de la unión de WT1 proveniente de la Línea MCF7 a los elementos de respuesta (-1460) y (-1807) de P1.....	41

16. Determinación del Complejo WT1-Par4 en los sitios (-1807) y (-1460) de P1, en condiciones estándar	42
17. Determinación del Complejo WT1-Par4 en los sitios (-1807) y (-1460) de P1, en depleción de estrógeno.....	43
18. Determinación del Complejo WT1-p53 en la Línea MCF7	45
19. Determinación del Complejo WT1-p53 en los sitios (-1807) y (-1460) de P1.....	46
20. Morfología de la Línea MCF7 transfectada con RNAi.....	47
21. Inhibición de la Expresión de Par4 con RNAi A.....	48
22. Inhibición de la Expresión de Par4 con RNAi B.....	49
23. Efecto de la Inhibición de Par4 con RNAi A sobre la expresión de WT1.....	49
24. Efecto de la Inhibición de Par4 con RNAi B sobre la expresión de WT1.....	50
25. Efecto de la Inhibición de Par4 con RNAi A en la expresión de Bcl-2.....	51
26. Efecto de la Inhibición de Par4 con RNAi B en la expresión de Bcl-2.....	51

NOMENCLATURA

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Concentración Micromolar
ALL	Leucemias linfoblásticas agudas
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-2	Proteína 2 de linfoma de células B
BWS	Síndrome Beckwith-Widemann
C	Citosina
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CRE	Elementos de respuesta a AMP cíclico
dH_2O	Agua destilada
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DDS	Síndrome de Denis-Drash
DMEM/F12	Medio de Eagle modificado
DTT	Dithionthreitol
E2	β -estradiol
EDTA	Ácido diamino-tetra-acético

EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
EGTA	Ácido tetra-acético N,N,N',N' etilelglicol-bis-(β aminoetilen eter)
EGRI	Factor de respuesta a crecimiento temprano
ELISA	Ensayo inmunológico ligado a enzima
ERES	Elementos de respuesta a estrógeno
EWS	Gen del sarcoma de Ewing's
G	Guanina
gr	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
HEL	Línea celular de eritroleucemia
HeLa	Línea celular de cáncer de cervix
HEPES	Ácidoetanosulfónico 4-(2 hidroxietil) piperazina 1
hrs	Horas
IGF I	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina II
IGF-IR	Receptor del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
IκB	Inhibidor de κB
IKK β	Quinasa de IκB
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
KOH	Hidróxido de potasio
KTS	Lys-Thr-Ser
L	Litro

LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Lys	Lisina
M	Concentración molar
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
MTS	Sal de tretrazolium 3-(4,5 dimetil thiazol 2-il)-5-(3-caboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolium
MTT	Sal de tatrazolium 3-(4,5 dimetil thiazol 2-il)-2,5 difenil-2H-tetrazolium bromuro
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NF κ B	Factor nuclear κ B
nm	Nanómetro
NP40	Detergente nonionico
P1	Promotor principal de Bcl-2
P2	Promotor secundario de Bcl-2
Par4	Producto del gen de respuesta a apoptosis en próstata
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PC12	Línea celular murina de feocromocitoma.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PKA	Protein Kinasa A

PKC	Protein Kinasa C
PMSF	Fenil metil sulfonil
PS1	Presenilina 1
RAR	Receptor de ácido retinóico
RE	Receptor de estrógenos
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferencia
RNAi A	RNA de interferencia de UBMC
RNAi B	RNA de interferencia de Gurumurthy et al.,2005.
RNAm	Ácido ribonucléico mensajero
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
TBE	Solución amortiguadora de Tris-boratos
TBS	Solución amortiguadora de Tris
TBS-Tween	Solución amortiguadora de Tris 0.5 % de Tween
TE	Solución amortiguadora de Tris-EDTA
TGF- α	Factor Transformador del Crecimiento α
Thr	Treonina
UBMC	Unidad de Biología Molecular del Cáncer LIV. F.C.B. UANL
UV	Luz ultravioleta

VDR	Receptor de la vitamina D
WAGR	Tumor de Wilms', aniridia, malformaciones genitourinarias y retraso mental.
WT1	Tumor de wilms'

RESUMEN

Receptor de estrógeno (RE), Bcl-2 y WT1 son proteínas que se encuentran involucradas en el desarrollo del cáncer de mama. Par4 es una proteína pro-apoptótica, cuya interacción con WT1 ha mostrado ser un factor importante en la regulación de sus genes blanco. En este trabajo nos propusimos determinar la existencia del complejo WT1-Par4, y su capacidad para unirse al promotor de Bcl-2, así como su relación con receptor de estrógeno, en la línea celular MCF7, para lo cual utilizamos las técnicas de cultivo celular, inmunoprecipitación, Pull down y Western blot. Se determinó la expresión basal de WT1, Bcl2, Par4, RE y p53 en la línea MCF7 cultivada en condiciones estándar y en depleción de estrógeno, lo niveles de WT1 y Bcl-2 se redujeron en ausencia del estímulo estrogénico, mientras que los de Par4 aumentaron. Se demostró la existencia del complejo WT1-Par4 y éste fue capaz de unirse al promotor P1 de Bcl-2, esto de manera independiente a la presencia de estrógeno, de manera complementaria se demostró la existencia del complejo WT1-p53, el cual también es capaz de interactuar con P1. La inhibición de la expresión de Par4 causó un incremento en la expresión de WT1, sin embargo no hubo cambios en la expresión de Bcl-2, en base a lo anterior se concluyó que los complejos WT1-Par4 y WT1-p53 son capaces de interactuar con P1 de manera independiente del estímulo estrogénico, y que la inhibición de Par4 no es suficiente para observar cambios en la expresión de Bcl-2.

ABSTRACT

The estrogen receptor ER, Bcl-2 and WT1 are proteins that are involved in the breast cancer development. Par4 is a pro-apoptotic protein whose interactions with WT1 have been demonstrated being an important factor in the regulation of WT1 target genes. In this work we propose to determinate the existence of a WT1-Par4 complex, its ability to bind the Bcl-2 promoter, and a possible relation with RE in the MCF7 cell line model, to aim it we used the cell culture, immunoprecipitation, Pull down and Western blot techniques. The basal expression of WT1, Bcl-2, Par4, ER, and p53 in MCF7 cells cultured in standard conditions and estrogen depletion were determined, the expression of WT1 and Bcl-2 were reduced in the cells cultured without estrogen whereas the expression of Par4 was increased. We demonstrated that there is a WT1-Par4 complex and that is able to bind the P1 promoter in an estrogen independent manner, we also demonstrated the existence of the WT1-p53 complex that is also able to interact with P1. The inhibition of Par4 resulted in a reduction of WT1 expression however the Bcl-2 expression was not affected. We conclude that the WT1-Par4 and WT1-p53 complexes are able to bind P1 in an estrogen independent manner, and that the Par4 inhibition is not enough to down regulate the Bcl-2 expression.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	ix
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPOTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo General	
3.2 Objetivos Específicos	
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Receptor de Estrógeno (RE).....	4
4.2 Bcl-2.....	6
4.2.1 Regulación Transcripcional de Bcl2 por RE.....	8
4.3 Par4.....	8
4.4 WT1.....	12
4.4.1 WT1 y Cáncer.....	14
4.4.2 WT1 y Regulación Transcripcional.....	15
4.4.2.1 WT1 y Regulación Transcripcional de Bcl2.....	18
5. MÉTODOS.....	20
5.1 Cultivo Celular.....	20
5.2 Western blot.....	20
5.2.1 Lisis Celular.....	20
5.2.2 Cuantificación de proteínas.....	21
5.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS.....	21
5.2.4 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	22
5.2.5 Inmunodetección.....	22
5.3 Inmuno-histoquímica.....	23

5.4 Inmunoprecipitación.....	24
5.4.1 Extracción de proteínas nucleares.....	24
5.4.2 Reacción de Inmunoprecipitación.....	24
5.5 Pull down.....	25
5.5.1 Marcaje, Alineamiento y Purificación de las sondas.....	25
5.5.2 Aislamiento de Proteínas Nucleares con Sondas Biotiniladas.....	26
5.6 Diseño y Producción de RNAi Par4.....	27
5.6.1 Diseño del RNAi-Par4.....	27
5.6.2 Producción del RNAi en el plásmido pGSH1-GFP.....	28
5.6.2.1 Características del plásmido pGSH1-GFP.....	28
5.6.2.2 Diseño del inserto del RNAi para Par4.....	29
5.6.2.3 Preparación del Inserto.....	30
5.6.2.4 Ligación de los oligos alineados en el vector lineal.....	30
5.6.3 Transformación.....	31
5.6.4 Midipreparación para la Obtención de los plásmidos.....	31
5.7 Transfección.....	32
5.8 Ensayo de Proliferación celular con MTT.....	32
 6. RESULTADOS.....	34
6.1 Expresión Basal de WT1, Bcl2, Par4, RE y p53 de MCF7 cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.....	34
6.1.1 Morfología de la Línea Celular MCF7.....	35
6.1.2 Cinética de Depleción de Estrógeno.....	36
6.1.3 Efecto del Tamoxifen en la Línea Celular MCF7.....	37
6.2 Determinación de la localización de la proteína Par4 en la línea celular MCF7.....	38
6.3 Determinación del complejo proteico WT1-Par4 en la línea Celular MCF7.....	40
6.4 Determinación del complejo proteico WT1-Par4 en los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1.....	41
6.4.1 Determinación de la unión de WT1 a los elementos de respuesta (-1807) y (-1460) de P1.....	41
6.4.2 Determinación del complejo proteico WT1-Par4 en los elementos de respuesta (-1807) y (-1460) de P1.....	42
6.4.3 Determinación del complejo proteico WT1-RE en los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1.....	44
6.4.4 Determinación del complejo proteico WT1-p53 en la Línea Celular MCF7.....	45

6.4.5 Determinación del complejo proteico WT1-p53 elementos de respuesta (-1807) y (-1460) de P1.....	en los	46
6.5 Determinación del efecto de la inhibición de Par4 en la expresión de Bcl-2.....		47
6.5.1 Inhibición de la Expresión de Par4 por RNAi.....		47
6.5.2 Efecto de la inhibición de la expresión de Par4 expresión de WT1.....	sobre la	49
6.5.3 Efecto de la inhibición de la expresión de Par4 expresión de Bcl2.....	sobre la	50
7. DISCUSIÓN.....		52
8. CONCLUSIONES.....		60
LITERATURA CITADA.....		62
RESUMEN BIOGRÁFICO.....		69

1. INTRODUCCIÓN

En México el cáncer de mama representa la segunda causa de defunción por cáncer en las mujeres.

En cáncer de mama existen diferentes biomarcadores que ayudan al pronóstico y tratamientos de esta neoplasia, entre los que se encuentran: Receptor de estrógeno, (RE) y Bcl-2.

WT1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo del cáncer, se sabe que es capaz de modular la expresión de Bcl-2 de manera dependiente al contexto celular.

Par4 es una proteína pro-apoptótica, cuyos patrones de expresión en varios tipos de tumores como leucemias y cáncer de próstata se encuentran inversamente relacionados con el patrón de expresión de Bcl2, y cuya interacción directa con WT1 en la modulación de la expresión del promotor P1 de Bcl-2 ya ha sido estudiada.

En el presente trabajo nos propusimos determinar si existe un complejo proteico WT1-Par4 capaz de unirse a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor P1 de Bcl2 y su relación con receptor de estrógeno, en un modelo de cáncer de mama-receptor de estrógeno positivo, utilizando la línea celular MCF7.

2. HIPÓTESIS

WT1 y Par4 forman un complejo proteína-proteína capaz de unirse a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor principal P1 de Bcl-2.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Determinar si existe un mecanismo de interacción por medio del cual Par4 y WT1 regulen la expresión del gen Bcl-2 y su relación con receptor de estrógeno.

3.2 Objetivos Específicos.

- Determinar la expresión basal de las proteínas: WT1, Bcl-2, Par4, y p53 en la línea celular MCF7 cultivada en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.
- Determinar la localización de la proteína Par4 en la línea celular MCF7.
- Determinar si existe el complejo WT1-Par4 de manera endógena en la línea celular MCF7 cultivada en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.
- Determinar si el complejo proteico WT1-Par4 es capaz de unirse a los elementos de respuesta para WT1, -1460 y -1807 localizados en el promotor P1 de Bcl-2, en la línea celular MCF7 cultivada en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.
- Determinar el efecto de la inhibición de Par4 en la expresión de Bcl-2.

4. ANTECEDENTES

El cáncer de mama es una neoplasia de etiología multifactorial causante de gran mortalidad dentro de la población femenina en todo el mundo. Diversos genes se encuentran involucrados en su desarrollo y su expresión ó la falta de la misma, se ha correlacionado con el pronóstico de la enfermedad y la estrategia terapéutica a seguir. Algunos de éstos son: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), Bcl-2, Her-2/Neu, factor transformador de crecimiento alfa (TGF- α), receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) receptor de ácido retinóico (RAR), p53 y c-myc (Wang y Pahng, 1995; Kumar et al., 2000; Donato y Noy, 2005; Ushijima et al., 2006).

4.1 Receptor de Estrógeno (RE).

El receptor de estrógeno (RE) se encuentra codificado en el cromosoma 6 en la localización 6q25.1; su RNA mensajero consta de 8 exones, que codifican a una proteína de 67 kDa con 6 dominios, A/B dominios de co-regulación, C unión al DNA, D/E transactivación dependiente de ligando, F transactivación independiente de ligando (Herynk y Fuqua, 2004).

Los estrógenos controlan la proliferación celular en el epitelio mamario y el útero, modulando la expresión de genes involucrados en la respuesta hormonal (Altucci et al.,

1996; Berthois et al., 1989; Weisz y Bresciani, 1993). Sin embargo, esta hormona esta involucrada en el mantenimiento de huesos, cerebro, sistema cardiovascular y sistema urogenital, tanto en hombres como en mujeres. Los estrógenos regulan sus funciones a través de dos receptores principales, Receptor de estrógeno α y β , los cuales son factores de transcripción dependientes de hormona (Warner et al., 1999; Simpson, 1998; Ogawa et al., 1998; Wenger, 1999; Kuiper et al., 1996).

RE se encuentra expresado en un 70-80% de los tumores mamarios. Los pacientes con tumores positivos para RE presentan una respuesta favorable de más del 50% a la terapia endocrina. RE inhibe la muerte programada en células de cáncer de mama modulando la expresión de genes antiapoptóticos tales como Bcl-2. Se ha observado una correlación positiva entre la expresión de Bcl-2 y RE en las etapas tempranas de la enfermedad; sin embargo, conforme el cáncer progresá, la expresión de ambos genes disminuye (Huan et al., 1997). En etapas tardías de cáncer de mama, la ausencia de expresión de RE se correlaciona con una baja o nula expresión de Bcl-2, acumulación de p53 y pobre diferenciación del tejido, lo que conlleva a un mal pronóstico clínico. (Daidone et al., 1999).

En el modelo de células de cáncer de mama MCF7 se ha demostrado que la depleción del estímulo estrogénico reduce los niveles de Bcl-2 en aproximadamente un 50%; al tratar las células con β -estradiol, el efecto se ve revertido al aumentar hasta 4 veces la expresión de Bcl-2 (Leek et al., 1994; Wang y Phang, 1995; Huang et al., 1997).

Estudios recientes reportan que existe una interacción directa proteína-proteína entre RE y p53, y que esto constituye un mecanismo a través del cual RE modula la función de p53, al suprimir la activación transcripcional de sus genes blanco. (Liu et al., 2006).

4.2 Bcl-2.

El oncogen Bcl-2 ha sido implicado en la oncogenicidad de una amplia variedad de enfermedades hematológicas y tumores sólidos. Bcl-2 prolonga la supervivencia celular bloqueando el proceso de apoptosis. El gen de Bcl-2 se encuentra codificado en el cromosoma 18 en la localización 18q21.3.

El gen fue identificado en el linfoma folicular humano, en el cual presenta una translocación t(14;18) con el gen de la cadena pesada de las immunoglobulinas, generando su sobre-expresión. Se ha demostrado que la expresión de Bcl-2 en esta neoplasia proviene completamente del alelo translocado, y que el alelo normal permanece silenciado (Cleary et al., 1986; Graninger et al., 1987; Heckman et al., 1997).

La expresión normal de Bcl-2 se encuentra involucrada con la supervivencia de células que requieren longevidad, como las neuronas y las células B de memoria. En células que se encuentran en recambio continuo, como las de la piel y las de la glándula mamaria, la expresión de Bcl-2 es baja para permitirle a la célula entrar a apoptosis (Leek et al., 1994).

Se ha encontrado una alta expresión de Bcl-2 en tumores sólidos, incluyendo próstata, ovarios, vejiga, y cáncer de mama. La expresión de Bcl-2 en cáncer de mama se ha asociado a la presencia de marcadores de diferenciación, como altos niveles de receptores de esteroides, y a la ausencia en la acumulación de p53 (Daidone et al., 1999). Se ha reportado que los pacientes que presentan sobre-expresión de Bcl-2 tienen una ventaja, ya que los estudios demuestran que la posibilidad de recurrencia es menor. Además, por su relación con ER, la presencia de Bcl-2 es un indicador favorable para el tratamiento endocrino (Gasparini et al., 1995); por lo anterior su sobre-expresión, junto con la baja proliferación y ausencia de acumulación de p53 contribuyen a un diagnóstico favorable. (Hellemans et al., 1995) Sin embargo, evidencia experimental muestra que la expresión de Bcl-2 confiere resistencia a los agentes anti-cáncer. Esto se ha estudiado en diversas neoplasias incluyendo leucemias, neuroblastomas y cáncer de pulmón de células pequeñas. (Gasparini et al., 1995; Krajewski et al., 1997).

La transcripción de Bcl-2 es controlada por dos promotores: P1, promotor principal dirige la transcripción del 90-95% del gen (Young y Korsmeyer, 1993) y P2, promotor secundario. P1 se encuentra localizado aproximadamente a 1.6 Kb, río arriba de la región codificante; es un promotor rico en GC. En él se han identificado diversos elementos de respuesta, como el elemento de respuesta a cAMP (CRE), a RE, así como sitios de unión para factores transcripcionales como Sp1 y WT1 (Perillo et al., 2000). Sin embargo, todavía no se conocen con exactitud las interacciones que regulan la transcripción del gen.

4.2.1 Regulación Transcripcional de Bcl-2 por RE.

La inducción de la expresión de Bcl-2 por el precursor de estrógeno β -estradiol (E2), en células de cáncer de mama involucra múltiples elementos potenciadores (Dong et al., 1999).

En modelos *in vitro* se estableció que la inducción de Bcl-2 por E2 no se llevaba a cabo a través de elementos de respuesta a estrógeno (ERES) (Dong et al., 1999).

Perillo et al., en el 2000, demostraron que el mecanismo por medio del cual E2 activa al promotor de Bcl-2 es a través de la interacción de ER con dos elementos que se encuentran localizados en la región codificante de Bcl-2: E-3 5'-GGTCGccaGGACC-3' y E-4 3'-GGRCCaccTGACC-5. Éstos son capaces de sobre-regular la expresión exógena de Bcl-2 por tratamiento con E2, en construcciones del promotor de Bcl-2 que carecen de sitios CRE ó ERE.

4.3 Par4.

Par4 (producto del gen de respuesta a apoptosis en próstata) es un factor de transcripción de aproximadamente 38 kDa, perteneciente a los *zipper* de leucina; fue identificado por primera vez en una búsqueda para genes de respuesta temprana durante la inducción de apoptosis en próstata. El gen se encuentra localizado en la posición 12q21.

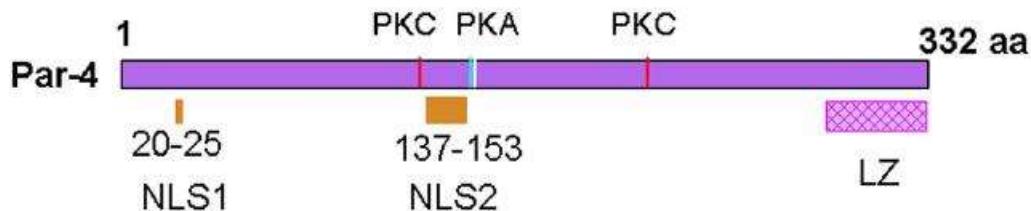


Fig 1. Representación esquemática de los dominios de Par4.

Par4 presenta un dominio de 42 residuos de leucina en el extremo C-terminal, dos secuencias de localización nuclear en el extremo amino terminal y varias regiones consenso para la fosforilación por quinasas, como PKA y PKC. La presencia de todas estas regiones sugiere que la función de Par4 es regulada por modificación post-traduccional, localización y dimerización con otras proteínas, lo que influye en su función biológica. (Ranganathan y Rangnekar, 2005).

La expresión de Par4 se induce durante la apoptosis y no está restringida a las células de próstata, se ha observado en diferentes modelos expresándose tanto en núcleo como en citoplasma (Johnstone et al., 1996; Qiu et al., 1999).

En modelos de enfermedades neurodegenerativas, se ha determinado que Par4 se encuentra involucrada en la inducción de muerte por apoptosis por diversos estímulos como estrés oxidativo, depleción de factor trófico y depleción de glucosa, en donde la expresión de Par4 aumenta aproximadamente 4 veces después de estímulo, y lo hace de manera dosis dependiente, al tratar las células de hipocampo con anti-sentidos contra

Par4. Chan et al, (1999) demostraron que la expresión de Par4 se ve reducida y que la respuesta al estímulo apoptótico disminuye en más del 50%.

Dentro de la etiología del Alzheimer, con un modelo de células PC12 se determinó que la expresión de la proteína Presenilina 1 (PS1) en uno de factores desencadenantes de la enfermedad. Xie et al., (2001) demostraron que el bloqueo de la actividad de Par4 a través de un dominante negativo, suprime la apoptosis inducida por la sobre-expresión de PS1.

En el hipocampo de pacientes con Alzheimer se ha observado un incremento en la expresión de Par4, comparado con pacientes control; *in vitro* la sobre-expresión de Par4 sensibiliza las células a apoptosis al incrementar la expresión de β -amiloide, el cual se ha considerado como uno de los factores importantes en el desarrollo de esta enfermedad (Guo et al., 1998).

Existe una interacción física entre Par4 y WT1, en la que el cuarto dedo de zinc interacciona de manera específica, con la región caboxi-terminal de Par4. Johnstone et al., en 1996, demostraron que esta interacción inhibe la función de activación transcripcional de WT1 y potencia su función represora. La interacción entre p53 y WT1 ya ha sido estudiada, (Maheswaran et al., 1993) por lo tanto, se ha considerado que exista un competencia de p53 y Par4 por la unión con WT1; sin embargo, se ha sugerido un mecanismo en el que se forme un trímero entre éstas proteínas. En un modelo experimental con las líneas celulares HeLa y 239 (células embrionarias de riñón), se

demostró que Par4 puede interaccionar con WT1 de manera específica con las isoformas 17aa+, y que esta interacción se encuentra involucrada en el rescate de las células de apoptosis después de ser tratadas con luz UV (Richard et al., 2001). Esto sugiere un mecanismo de regulación diferencial entre el complejo WT1-Par4 dependiendo de la secuencia a través de la cual estas proteínas se encuentren interaccionando.

En cáncer de próstata, la expresión de Par 4 sensibiliza las células a apoptosis, y los patrones de expresión de Par4 y Bcl-2 se relacionan negativamente. En líneas celulares dependientes de andrógenos, la depleción de éstos produce un aumento de Par4 y una disminución de la expresión de Bcl-2 (Qiu et al., 1999) el mismo efecto fue observado al sobreexpresar WT1, tanto “wild type” como una versión mutante en la que se encuentra alterado un dedo de zinc R394W (Fraizer et al., 2004). Los patrones de expresión mutuamente excluyentes también han sido observados en otros modelos, en líneas linfoblásticas la sobreexpresión de Par4 produce una disminución en la expresión de Bcl-2 y sensibilizaba las células a apoptosis por agentes quimio-terapéuticos (Boehrger et al., 2002).

La regulación negativa de PAR4 se ha relacionado con muchos tipos de cáncer. En la línea celular de eritroleucemia HEL, se ha demostrado que la expresión exógena de Par4 no es suficiente para sensibilizar las células a apóptosis, actuando de manera contraria aumentando los niveles de Bcl-2 (Boehrger et al., 2004).

Cheema et al., en el 2003 demostraron, en un modelo de células de cáncer de próstata, que Par4 es capaz de modular la transcripción de Bcl-2 por medio de la

interacción con el sitio de unión -1460 para WT1 presente en el promotor de Bcl-2. Así mismo dieron evidencia de que WT1 y Par4 se encuentran involucradas en la regulación de la expresión de Bcl-2, en células de cáncer de próstata andrógeno-independientes y que la expresión exógena de Par4 esta involucrada en la represión transcripcional de Bcl-2, sin embargo requiere la presencia de WT1 para poder llevar a cabo esta función.

4.4 WT1.

La proteína WT1 (tumor de Wilms') es un factor de transcripción involucrado en diferenciación celular y apoptosis (Davies et al., 1998; Mayo et al., 1999). El gen *wt1* se localiza en el cromosoma 11p13, y esta constituido por 50 kb. Su estructura incluye 10 exones, originando un RNAm de 3.5 Kb. Posee tres sitios de inicio de la traducción, por lo que existen tres isoformas de acuerdo a su peso molecular, 36-38kDa, 52-54 kDa, y 60-62 kDa, la isoforma predominante es la de 52-54 kDa.

En el extremo amino terminal de la proteína se encuentra un dominio de transactivación rico en prolina y glutamina (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990), un dominio de dimerización y un dominio de represión. En el extremo carboxilo terminal presenta un dominio de unión a DNA formado por 4 dedos de zinc tipo Kruppel, codificados por los exones 7 al 10. Los dedos de zinc 2-4 presentan una alta homología con los presentes en el factor de transcripción EGRI.

En el proceso de maduración el RNA de WT1 sufre dos “splicings” alternativos, el primero en el exón 5, en el que se pueden insertar ó no 17 aminoácidos entre el dominio

de transactivación y el de unión al DNA, el segundo ocurre en el exón 9, entre el tercer y cuarto dedo de zinc, en el que se insertan ó no los aminoácidos Lys-Thr-Ser (KTS) (Call et al., 1990; Kumar et al., 2000; Mrowka et al., 2000).

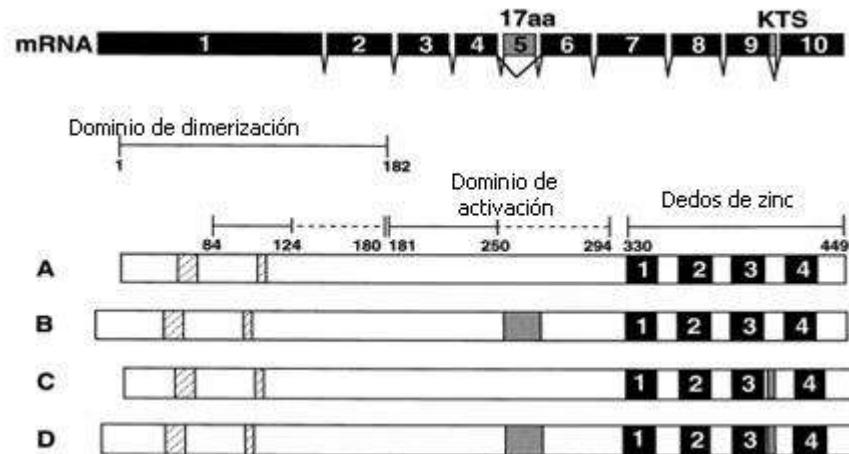


Figura 2. Estructura del RNAm de WT1 y sus isoformas. Las regiones sombreadas indican nucleótidos o aminoácidos insertados. Las áreas rayadas representan regiones de la proteína ricas en prolina. Los exones del RNAm y los dedos de zinc de la proteína se muestran enumerados, así como los aminoácidos presentes en cada dominio de la proteína. A, B, C y D indican las cuatro isoformas de la proteína en base a empalmes alternativos.

La función biológica de las isoformas KTS (+) se ha asociado al procesamiento del RNA y su maduración. Estudios recientes relacionan la presencia de la inserción KTS en las proteínas quiméricas EWS (gen del sarcoma de Ewing's)-WT1 con la capacidad invasiva de los tumores (Reynolds et al., 2003), mientras que las isoformas KTS (-) a regulación transcripcional (Rauscher, 1993).

La proporción entre las diversas isoformas generadas por la combinación de los “splicings” (-/-) : (+/-) : (-/+) : (+/ +), es de 1:2:2:1.(Chen Zing, 2000).

La función biológica de la isoforma 36-38 kDa no se ha esclarecido, esta proteína carece de 127 aminoácidos de la porción amino terminal, lo que genera la pérdida del dominio de dimerización y una porción del dominio de represión; Su presencia se ha determinado en líneas celulares y especímenes de tumor de Wilms', en donde se ha reportado que su función trans-activadora es 1.5 veces mayor que la de la isoforma 52-54 kDa KTS (-) (Scharnhorst et al., 1999).

WT1 modula la expresión de genes que intervienen en los procesos de diferenciación celular, apoptosis y diferenciación sexual; La interacciones que realiza con otras proteínas le permiten tener una función bimodal, como supresor de tumor y como oncogen (Lee 2001).

WT1 se encuentra inactivado en aproximadamente el 15 % de los tumores de Wilms' esporádicos. El desarrollo del tumor se encuentra asociado a otras enfermedades como el síndrome de WARG, Denys-DrasH y Beckwith-Wideman, los cuales son originados por una mutación constitutiva de *wt1* (Kim 1999).

4.4.1 WT1 y Cáncer.

En leucemias linfoblásticas agudas humanas (ALL), WT1 se encuentra sobreexpresado 10 veces más que en células normales, por lo que es considerado antígeno tumoral en este tipo de neoplasia y se ha asociado a un mal pronóstico, y baja sobrevivencia.(Loeb et al., 2001; Schmind et al., 1997; Tamaki et al., 1999).

La sobre-expresión de la proteína en tumores sólidos como glioblastoma, cáncer de colon, útero, y cáncer de mama (Bruening et al., 1993; Davies et al., 1998; Lee et al., 2001; Silberstein et al., 1997) y la inhibición de la proliferación celular por el bloqueo de la expresión del gen con elementos anti-sentidos, revelan su posible acción oncogénica. Sin embargo, WT1 es capaz de reprimir la tumorigenidad de muchas líneas celulares (Zapata et al., 2002). Se cree que el factor determinante de la función oncogénica ó supresora de tumor de WT1 sea el balance entre las diferentes isoformas o la falta del mismo.

4.4.2 WT1 y Regulación Transcripcional.

La regulación transcripcional que WT1 es capaz de ejercer sobre diferentes genes involucrados en proliferación celular, diferenciación sexual y el desarrollo genito-urinario ha sido ampliamente estudiada. WT1 es considerado un gen bimodal, al efectuar funciones tanto de oncogen como de gen supresor de tumor (Swain y Novell-Badge, 1999; Hastie 2001; Sholz y Kirschner 2004)

La ciclina E es un blanco directo de la regulación transcripcional mediada por WT1. El promotor de ciclina E tiene tres sitios de unión a WT1 (-/-) ricos en GC por medio de los cuales WT1 lo regula negativamente. WT1 es considerado regulador transcripcional involucrado en la progresión del ciclo celular. Las isoformas WT1 (+/+) ó algunas formas aberrantes tienen la capacidad de funcionar como dominantes negativos, lo que puede traer por consecuencia una alta expresión de ciclina E. Altas cantidades de

WT1 (+/+) son expresadas en leucemias y tumores sólidos como cáncer de mama. Este puede ser un mecanismo involucrado en la carcinogénesis (Loeb et al., 2002).

WT1 reprime la expresión del gen del Factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II) a través de su interacción con el elemento de repuestas 5'-GCGGGGGAG-3' localizado -87/-63 del promotor P4 de IGF-II.(Lee et al., 1996).

Las isoformas de WT1 KTS (-) son capaces de suprimir la actividad del promotor del Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-IR) en presencia o ausencia de p53 "wild type", pero no cuando esta mutado, ya que p53 modula la habilidad de WT1 para unirse a dicho promotor (Idelman et al., 2003).

La sobre-regulación del receptor de la vitamina D (VDR) media la apoptosis de las células embrionarias renales en respuesta al tratamiento con vitamina D. Los patrones de expresión de WT1 y VDR se encuentran correlacionados durante el desarrollo del riñón, lo que sugiere una activación transcripcional de VDR por WT1 (Johnstone et al., 1996). Se ha demostrado que la activación de VDR por WT1 se lleva a cabo a través del sitio B3 5'-GGGTGGGG-3' (-308/-300) presente en el promotor de VDR. (Lee TH et al., 2001).

WT1 es capaz de regular positivamente al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). La actividad del promotor de EGFR es potenciada por la expresión de WT1, a través de las secuencias repetidas TCC presentes en este promotor, la delección o mutación de las mismas eliminan el efecto transactivador de WT1, (Liu et

al., 2001). Sin embargo existen reportes en los que WT1 suprime la síntesis de EGFR e induce apoptosis, a través de la interacción con las secuencias ricas en TCC en líneas celulares de cáncer (Englert et al., 1997). Lo anterior indica que el ambiente celular es un aspecto esencial que determina la función de WT1 in vivo.

WT1 es necesaria para la regulación transcripcional de genes que proveen sobrevivencia a las células tumorales. Es posible que la naturaleza anti-apoptótica de WT1 potencie la oncogénesis. Se ha demostrado que la pérdida de la expresión de WT1 sensibiliza a las células de leucemia mieloide a apoptosis sugiriendo que su expresión contribuye a la oncogénesis en éste tipo de neoplasia, inhibiendo la muerte celular programada. (Silberstein et al., 1997).

Reizner et al., en el 2005 demostraron que las 4 isoformas predominantes de WT1 (Fig.2) son capaces de reprimir al promotor de IGFIR (Receptor del factor de crecimiento de Insulina I) en un 39-49%, esto en un modelo con la línea celular MCF7 y una clona independiente de estrógeno derivada de la misma. Esta regulación se lleva a cabo por un mecanismo en el que existe una interacción directa proteína-proteína de WT1 con el receptor de estrógeno α . Así mismo, demostraron que existe una regulación de WT1 por RE, al confirmar que existe un incremento en la expresión de WT1 al tratar las células con E2 (Zapata et al., 2002).

4.4.2.1 WT1 y Regulación Transcripcional de Bcl2.

En un modelo con la línea celular HeLa, Heckman et al, (1997) concluyeron que el sitio -1460, 5'-CTCCCGCGC-3', presente en el promotor P1 de Bcl-2, es una secuencia a través de la cual WT1 regula de manera negativa la expresión del alelo normal del gen de Bcl-2 en linfomas con la translocación t(14:18), corroborando los resultados de Hewitt et al., (1995) quienes ya habían demostrado una función represora de WT1 sobre el promotor de Bcl-2.

Sin embargo, Mayo et al., (1999) en tumores de Wilms' esporádicos demostraron que los patrones de expresión de WT1 y Bcl-2 se relacionaban positivamente, en todos aquellos tumores en lo que se encontró una alta expresión de WT1 se detectó también un nivel elevado de Bcl-2, lo que se traduce como un aumento en la vida media de las células. En transfecciones transientes de células rhabdoides y de osteosarcoma con la isoforma WT1 52-54 kDa (+/-), se observó un aumento en los niveles endógenos de Bcl-2, sugiriendo una regulación positiva de Bcl2 por WT1. Así mismo, demostraron que en P1 existe una secuencia en el sitio -1807, 5'-GCGTGGGAGT-3', a través de la cual WT1 es capaz de regular positivamente a Bcl-2. Este sitio es de alta afinidad para WT1, ya que al hacerse una sola substitución en su secuencia, la transactivación se ve inhibida (Brieger et al., 2004).

El aumento en los niveles de Bcl-2 por la acción trans-activadora de WT1 inhibe la apoptosis y aumenta la resistencia a quimioterapia. Esto indica que WT1 podría

potenciar la oncogénesis y la progresión de los tumores por la sobreregulación transcripcional de Bcl-2 a través del sitio -1807 localizado en P1.

5. MÉTODOS

5.1 Cultivo Celular.

La línea celular de cáncer de mama RE-positivo MCF7 fue obtenida del ATCC (American Type Culture Collection, Manassas VA) y propagada en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), Condiciones Estándares , ó en DMEM/F12 sin rojo fenol, suplementado con Suero delipidado, (depleción de estrógeno). La línea fue incubada con 95 % de aire y 5% de CO₂ a 37 °C.

5.2 Western blot.

Para determinar la expresión de las proteínas WT1, Par4, Bcl-2 y β-actina, Receptor de Estrógeno y p53 en la línea MCF7 transfectada y “wild type” se realizaron ensayos de Western blot.

5.2.1 Lisis celular.

Las células fueron cosechadas, lavadas con PBS (Solución 1X : 8 g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.24 g de KH₂PO₄ en 1L de dH₂O a pH = 7.6, y centrifugadas. El paquete celular se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis (Tritón 1%,

150 mM NaCl, Tris 25mM, pH 7.6) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente, fueron centrifugadas (3min 10,000 rpm) y el sobrenadante (extracto proteico) fue transferido a otro tubo y almacenado a -70° C para su posterior cuantificación.

5.2.2 Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó mediante el Kit Bio-Rad DC Protein Assay.

Se realizó una dilución 1:5 de los extractos proteicos utilizando como medio diluyente el buffer de lisis. Siguiendo las instrucciones del Kit se realizó una dilución de 1:20 de los reactivos S y A.

Las muestras de proteínas se colocaron en una placa de 96 pozos (5 μ l de cada muestra) en esta misma placa se colocaron estándares proteicos de una curva de concentración de 0.125 μ g/ μ l- a 2 μ g/ μ l en una escala de 0.25 μ g / μ l, y dos blancos.

A cada muestra, estándar y blanco se les adicionaron 20 μ l de la dilución de reactivos S y A, posteriormente se les adicionaron 175 μ l de reactivo B, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se hizo la lectura en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm.

5.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Cincuenta microgramos de proteína total fue desnaturizada en buffer de carga (0.5 M tris HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoentanol, 0.1% azul de bromofenol, 20% glicerol) y

ebullición por 5 minutos, las muestras se cargaron en un gel de acrilamida-SDS 12%, y se corrieron a 45 volts 20 minutos, posteriormente se incrementó el voltaje a 100 V constantes por 1 hora 30 minutos aproximadamente.

5.2.4 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

Se utilizó un bastidor (Thermo EC 140 Mini Blot Module, EC Aparatus Corporation) para la transferencia de las proteínas.

La secuencia de los componentes en dirección del polo positivo al negativo fue la siguiente: panel de fibra-papel filtro-gel de poliacrilamida-membrana de nitrocelulosa-papel filtro- panel de fibra.

El bastidor se colocó en una cámara de transferencia con buffer de transferencia (10X:30 g de Tris base y 144 g de glicina en 1 L de dH₂O) El tiempo de corrida fue de 2 h a 23 Volts

5.2.5 Inmunodetección.

La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con una solución de TBS-Tween (0.05%)-Leche 5% durante una hora (Solución TBS 10X: 31.5 g de Tris-HCl y 80 g de NaCl en 1L de dH₂O pH7.6).

Después de retirada la solución bloqueadora se agregó una dilución del primer anticuerpo (WT1C19 1:2500, Bcl2 C-2 1:300, Par4 R334 1:1000, Santacruz Biotechnology CA y β-actina de Sigma Aldrich 1:10000) y se incubó a 4°C toda la noche. Terminada la incubación se retiró la solución con el primer anticuerpo y la membrana

fue lavada tres veces por 10 minutos con TBS-Tween, seguido de lo cual se adicionó el segundo anticuerpo en una solución de TBS-Tween-leche (2.5%) y se incubó durante 2hr a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación fue retirada la solución con el segundo anticuerpo y la membrana fue lavada 3 veces por 10 minutos con TBS-Tween. Las proteínas fueron visualizadas mediante un sistema de quimioluminiscencia (Lumi-light Western blotting substrate Roche) al ser expuestas a un film.

5.3 Inmuno-histoquímica.

Las células fueron cultivadas, sobre cubreobjetos estériles, y cuando tuvieron las confluencia necesaria, fueron lavadas con PBS secadas al aire, y fijadas con Metanol:Acetona 50:50 por 20 min a -20°C. Posteriormente fueron secadas nuevamente con aire y almacenadas a 4°C hasta su uso.

Las células fueron hidratadas con PBS por 10 min, posteriormente fueron permeabilizadas con tritón 0.1 % por 10 min y se lavaron con PBS 1 min, dos veces. Las laminillas fueron incubadas con el bloqueador de la peroxidasa endógena, por 5 min. y se lavaron con PBS 2 veces por 1 min e incubadas con el suero bloqueador por 20 min. El anticuerpo se diluyó 1:50 y se incubó por una hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS 3 veces 1 min y se incubó con el segundo anticuerpo 1:50 por una hora, las laminillas se lavaron con PBS y se adicionó el cromógeno, hasta observar la reacción.

5.4 Inmuno-precipitación.

5.4.1 Extracción de proteínas nucleares.

Todo el protocolo se realizó en frío a 4°C. Los paquetes celulares fueron centrifugados durante 1 min y el sobrenadante fue aspirado.

Posteriormente el pellet se resuspendió en 100μl de buffer de lisis frío (solución A: HEPES 10 mM, KCl 10mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 0.1μM), y se incubó en hielo por 15 min. Se adicionaron 3μl de NP40 y se sometieron a agitación con vortex vigoroso, seguido de lo cual la muestra fue centrifugada (10,000 rpm/10min), y el sobrenadante (extractos citoplasmáticos) fue aspirado y guardado a – 70°C. Al pellet que se forma después de esta centrifugación se le adicionaron 50μl de buffer de extracción nuclear frío (solución B: HEPES 20mM, NaCl 400mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM) y fue incubado en hielo 30 min sometiéndose a agitación con vortex intermitente, para ser centrifugado posteriormente (10,000 rpm/10min), el sobrenadante obtenido, es el extracto nuclear el cual fue almacenado a –70°C hasta su cuantificación.

5.4.2 Reacción de Inmunoprecipitación.

Cincuenta microgramos de proteínas fueron solubilizadas en buffer de inmuno-precipitación (20mM Na₃PO₄, 500mM NaCl, 0.1 %SDS, 1% NP40, 0.02% azida de sodio) y se les adicionó un exceso de primer anticuerpo contra la proteína de interés, 5 μg de anti- WT1 C:19. El volumen de la muestra fue ajustado a 0.2 ml con buffer de inmuno-precipitación y se incubaron a 4°C por toda la noche.

Posteriormente, se adicionó a la reacción una cantidad apropiada de proteína A ó G inmovilizada (10 μ l, de un stock 2mg/mL, por cada 1 μ g de anticuerpo) y se incubaron a temperatura ambiente por dos horas con agitación intermitente.

El complejo se lavó con 0.5 ml de buffer de inmunoprecipitación seguido de una centrifugación de 2-3 min. y el sobrenadante fue desecharo. Los lavados se repitieron al menos 6 veces.

El complejo fue incubado 3 min. a 95° C con buffer de carga para Western blot, y posteriormente sometido a electroforesis, transferencia e inmuno-detección.

5.5 Pull down.

5.5.1 Marcaje, Alineamiento y Purificación de las sondas.

Para cada secuencia se pusieron a reaccionar 2.5 μ l del oligo sentido (2 μ g/ μ l) con 2.5 μ l de Biotin 14 dATP, 2 μ l de la enzima Tdt recombinant y 6 μ l del buffer 5 X TdT buffer (Invitrogen life Technologies) y 17 μ l de dH₂O, y se incubaron por 1 h a 30°C. Posteriormente, 30 μ l de la reacción anterior se alineó con 2.5 μ l del oligo anti-sentido (2 μ g/ μ l), 10 μ l de buffer de alineamiento (200mM Tris HCl, 50mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA) y 57.5 μ l de dH₂O y se hirvieron durante 3 min; posteriormente, se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Las sondas fueron purificadas con una columna de celulosa regenerada (Microcon YM-3, Milipore), se colocaron en la columna y se centrifugaron durante 20 min a 4,000 rpm, la columna se colocó de manera

invertida en un tubo de recolección y se centrifugó nuevamente durante 15 min a 4,000 rpm. Los oligos fueron cuantificados a 280 nm.

Secuencia	-1460	-1807
Sentido	ccttcctcccgccgc	gctgggtgt
Antisentido	ggaaggaggcgccgcg	cgcacccaca

Tabla I. Secuencias de los oligos correspondientes a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor P1 de Bcl-2.

5.5.2 Aislamiento de Proteínas Nucleares con Sondas Biotiniladas.

Los oligonucleótidos fueron incubados separadamente con esferas magnéticas cubiertas por estreptavidina por 30 min a temperatura ambiente con Buffer I (Buffer I: 20mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0.1 M NaCl).

Para la reacción de unión, se incubaron 200 µg de proteína de extracto nuclear con 100 µl de complejo oligo-cuentas-magnéticas en Buffer II (Buffer II: 10% glicerol, 12mM HEPES, 5mM MgCl₂, 60mM KCl, 0.1 mM DTT, 0.1mM PMSF) posteriormente las cuentas fueron separadas con una barra magnética y resuspendidas en buffer de Laemmli (Laemmli 2X: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 5% β Mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol, 20% glicreol) y las proteínas fueron desnaturizadas por ebullición a 95°C por 5 min.

Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% y se realizó el Western blot para la identificación de las proteínas que se unieron a los elementos consenso de WT1 en el promotor de Bcl2.

5.6 Diseño y Producción de RNAi Par4.

5.6.1 Diseño del RNAi-Par4.

El RNAi fue diseñado con el RNAm de Par4.

Secuencia Blanco	AATGAAGCTGTAAACTTACTA
Posición en el Gen	887
Contenido de GC	28.6%
siRNA sentido	UGAAGCUGUAAACUUACUAtt
siRNA antisentido	UAGUAAGUUUACAGCUUCAtt

Tabla II. Secuencia Blanco en el mensajero de Par4 contra la cual se encuentra dirigido el RNAi A.

Secuencia Blanco	AA GATGCAATTACACAACAGA
Posición en el Gen	857
Contenido de GC	33.33%
siRNA sentido	UCUGUUGUGUAAUUGCAUCtt
siRNA antisentido	GAUGCAAUUACACAACAGAtt

Tabla III. Secuencia Blanco en el mensajero de Par4 contra la cual se encuentra dirigido el RNAi B de Gurumurthy et al., 2005.

Una de las secuencias de RNAi fue tomada del Artículo de Gurumurthy et al., (1999), en el cual se diseñó y usó de forma sintética.

5.6.2 Producción del RNAi en el plásmido pGSH1-GFP.

5.6.2.1 Características del plásmido pGSH1-GFP:

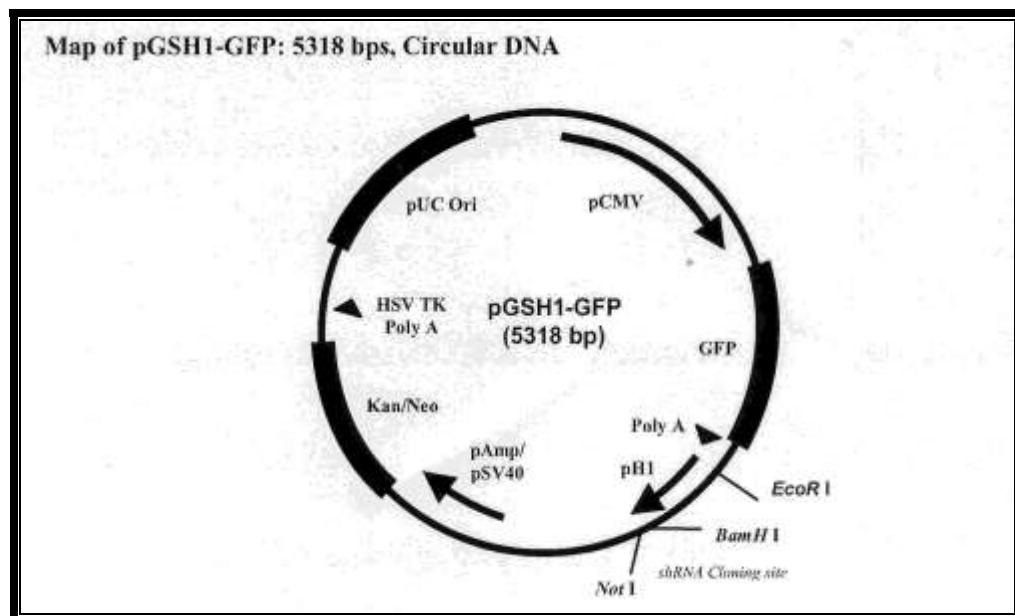


Fig 3. Mapa del plásmido pGSH1-GFP.

Vector Elements		
Element	Start-End	Description
pCMV	59-808	Human CMV promoter sequence
GFP	843-1500	Green Fluorescent Protein gene sequence
Poly A	1572-1801	Transcription stop and polyadenylation sequence
pH1 promoter	1808-1900	H1 RNA Polymerase III promoter
pAmp/pSV40	2689-3030	Ampicillin and SV40 promoters (in tandem)
Kan/Neo	3152-3942	Kanamycin and Neomycin resistance gene sequence
HSV TK Poly A	4182-4200	HSV Thymidine Kinase polyadenylation signal sequence.
pUC Ori	4531-5174	pUC origin of replication sequence.

Fig 4. Elementos del vector pGSH1-GFP.

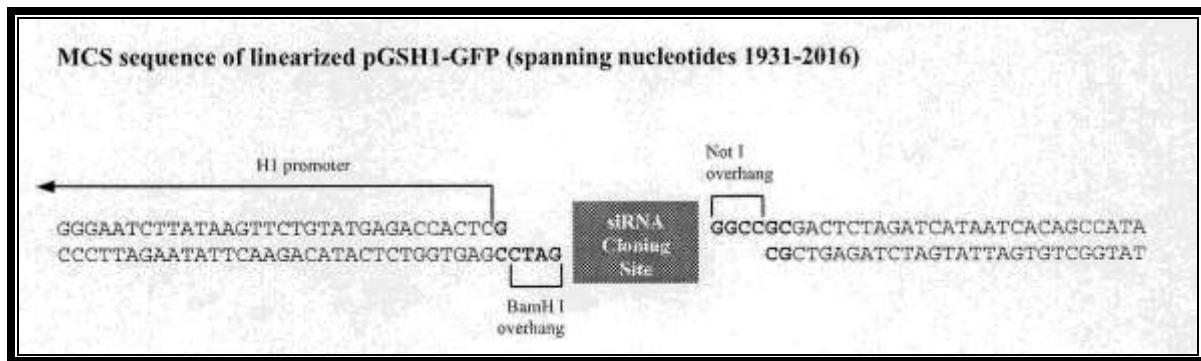


Fig 5. Secuencia del plásmido lineal pGSH1-GFP.

5.6.2.2. Diseño del inserto del RNAi para Par4:

Se mandaron sintetizar 4 oligos (2 sentidos y 2 antisentidos) para dos regiones de Par4, Una de las regiones blanco se eligió a partir del RNAm de Par4 y la otra siguiendo el diseño de Gurumurthy et al. (2005).

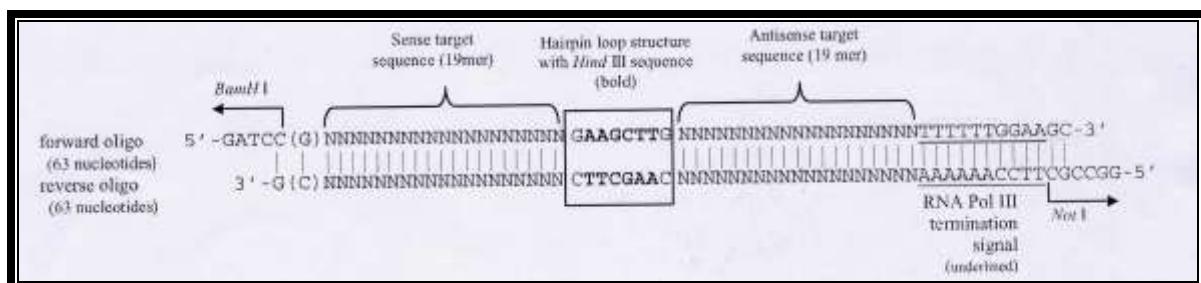


Fig 6. Prototipo del diseño de los oligos sentidos y antisentidos para su expresión en el plásmido pGSH1-GFP.

Las 4 secuencias que se mandaron sintetizar a la casa comercial SIGMA fueron las siguientes:

B1	5'-GATCCTGAAGCTGTAAACTTACTAGAAGCTTAGTAAGTTACAGCTTATTTTTGGAAGC-3'
B2	5'-GGCCGCTTCCAAAAATAAGCTGTAAACTTACTACAAGCTCTAGTAAGTTACAGCTTCAG-3'
A1	5'GATCCGGATGCAATTACACAAACAGAGAAGCTGTCTGTTGTAAATTGCATCTTTTTGGAAGC-3'
A2	5'GGCCGCTTCCAAAAAGATGCAATTACACAAACAGACAAGCTCTGTTGTAAATTGCATCCG-3'

Tabla IV. Secuencias de oligos para su expresión en el plásmido pGSH1-GFP.

5.6.2.3 Preparación del Inserto.

Los oligos se disolvieron con agua inyectable para obtener una concentración de 1 μ g/ μ l y se alinearon 2 μ l de cada oligonucleótido (sentido y antisentido, B1 con B2 y A1 con A2) en 46 μ l de buffer de alineación (100mM de acetato de potasio, 30mM HEPES-KOH pH 7.4 y 2mM de acetato de magnesio), se incubaron las mezclas a 90°C por 3 min. y después a 37°C por 1hr. Se adicionaron 350 μ l de agua grado PCR a la mezcla de reacción de alineación para obtener un volumen final de 400 μ l y una concentración de trabajo de 10 ng/ μ l.

5.6.2.4 Ligación de los oligos alineados en el vector lineal.

Para cada secuencia, la reacción de ligación se llevó a cabo con 1 μ l del vector (50ng/ μ l), 1 μ l de los oligos alineados (10ng/ μ l), 5 μ l del buffer de ligación 2X, 1 μ l de la enzima T4 ligasa (Promega) y 2 μ l de agua para un volumen final de reacción de 10 μ l.

Las reacciones se incubaron a 4°C toda la noche.

5.6.3 Transformación.

Se transformaron 30 μ l de bacterias *E. coli* competentes con 5 μ l del producto de ligación y se plaquearon en cajas petri con agar LB con 50 μ g/mL de kanamicina y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se tomaron de 3-4 colonias de las placas transformadas y se sembraron en medio LB con 50 μ g/ml de kanamicina, fueron incubadas toda la noche a 37°C para posteriormente realizar una minipreparación y obtener el plásmido.

5.6.4 Midi-preparación para la Obtención de los plásmidos.

Para obtener cantidades suficientes de los plásmidos para las transfecciones en las líneas celulares, se procedió a la realización de las midi-preparaciones con el kit comercial de Marligen Biosciences Inc. Se pusieron a sembrar en 25 mL de LB las bacterias transformadas con cada uno de los plásmidos a 37°C toda la noche, posteriormente se centrífugo para obtener el pellet al cual se le adicionó 1.2 mL del buffer de suspensión celular (G1) y se homogenizaron las bacterias, después se adicionaron 1.2 mL de la solución de lisis celular (G2), se mezcló por inversión 5 veces (No vortex) y se incubó a temperatura ambiente por 5min. Posteriormente se adicionó 1.6 mL del buffer de neutralización (G3) y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 5 veces (NO vortex) y se centrífugo a 15,000g por 10min. Se colocó una columna en un tubo de 15ml, se pasó el sobrenadante de la centrifugación anterior por la columna, se centrífugo a 5,000g por 1 min, se descartó el flujo resultante, se monto de nuevo la columna y se adicionaron 3 mL del buffer de lavado (G4), se centrifugó a 5,000 g por

5min. Por último, se colocó la columna en un tubo nuevo de 15mL, se adicionaron 0.8ml del buffer TE caliente directamente al centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1min y después se centrifugó a 5,000 g por 2min.

5.7 Transfección.

Los DNA plasmídicos se transfecaron en las línea celular MCF7 por el método de GenePORTER (Gen Therapy Systems Inc.).

La línea se plaqueó un día antes de la transfección (60-80% de confluencia), el DNA se diluyó con medio libre de suero en el volumen de transfección adecuado (0.5mL). Se diluyó el reactivo GenePORTER con medio libre de suero (8 a 25μl). Se agregó el DNA diluido al GenePORTER, se mezcló rápidamente y se incubó a temperatura ambiente por un periodo de 30min. Se aspiró el medio de cultivo de las células, y se adiciono con cuidado la mezcla de DNA-GenePORTER a las células y se incubó a 37°C por 5 hrs.

Transcurrido este tiempo, se adicionó 1mL de medio de cultivo adicionados con 20% de suero fetal bovino, se continúo con la incubación toda la noche a 37°C. Veinticuatro horas después de la transfección, se adicionó más medio fresco.

5.8 Ensayo de Proliferación celular con MTT.

El ensayo de proliferación celular se realizó con MTT. El MTS y el MTT son sales de tetrasodio utilizadas en ensayos de sensibilidad colorimétrica, estas sales son tomadas por las mitocondrias de las células por la cadena transportadora de electrones, éste

proceso convierte las sales en compuestos de formazan cuya absorbancia se mide a 490 nm para MTS y a 570 nm para MTT.

Las células se plaquearon en cajas de 96 pozos (3000 células por pozo) y se realizaron los tratamientos correspondientes (depleción de estrógeno, tratamiento con Tamxifen), posteriormente se le adicionó a cada pozo 20 μ l de una mezcla de MTT (5 mg por mL de PBS) se homogenizó la mezcla y se dejó incubando a 37° el tiempo necesario para el cambio de color, se retiro el medio y se agregaron 200 μ l de Dimetil Sulfóxido, para solubilizar las sales de formazan, posteriormente se leyó la absorbancia a 570 nm.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión Basal de WT1, Bcl2, Par4, RE y p53 de MCF7 cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.

Los patrones de expresión de WT1, Bcl2, Par4, RE y p53 fueron analizados por la técnica de Western blot, en la línea celular MCF7 cultivada tanto en condiciones estándar como en depleción de estrógeno. La expresión de WT1, Bcl-2 y Par4 se ve afectada por las condiciones de cultivo, los niveles de WT1 y Bcl-2 se reducen en la ausencia de estrógeno, mientras que la expresión de Par4 aumenta (Fig. 7). Los niveles de expresión de receptor de estrógeno y p53 no se vieron afectados por las diferentes condiciones de cultivo (Fig. 8).

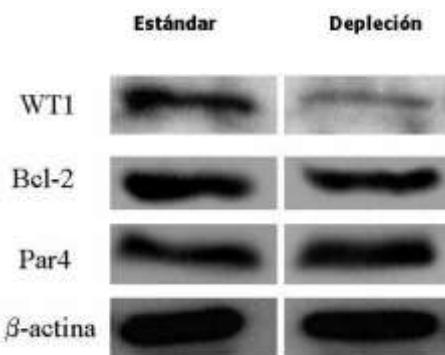


Figura 7. Expresión basal de WT1, Bcl-2 y Par4 de la Línea Celular MCF7. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno y la expresión basal de WT1, Bcl-2 y Par4 fue analizada por Western Blot. Se utilizó β -actina como control de carga.

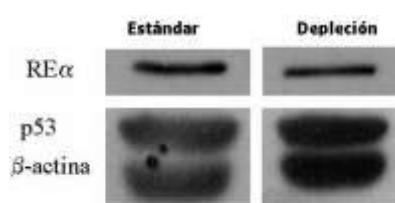


Figura 8. Expresión basal de RE y p53 de la Línea Celular MCF7 en diferentes condiciones de cultivo por Western blot. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno y la expresión basal de RE y p53 fue analizada por Western Blot. Se utilizó β -actina como control de carga.

6.1.1 Morfología de la Línea Celular MCF7.

Las células MCF7 cultivadas en condiciones estándar muestran una morfología epitelial característica y crecimiento en mono-capa, a diferencia de éstas, las células que crecen en depleción de estrógeno adoptan una forma redondeada y forman pequeños tumores (Fig.9).

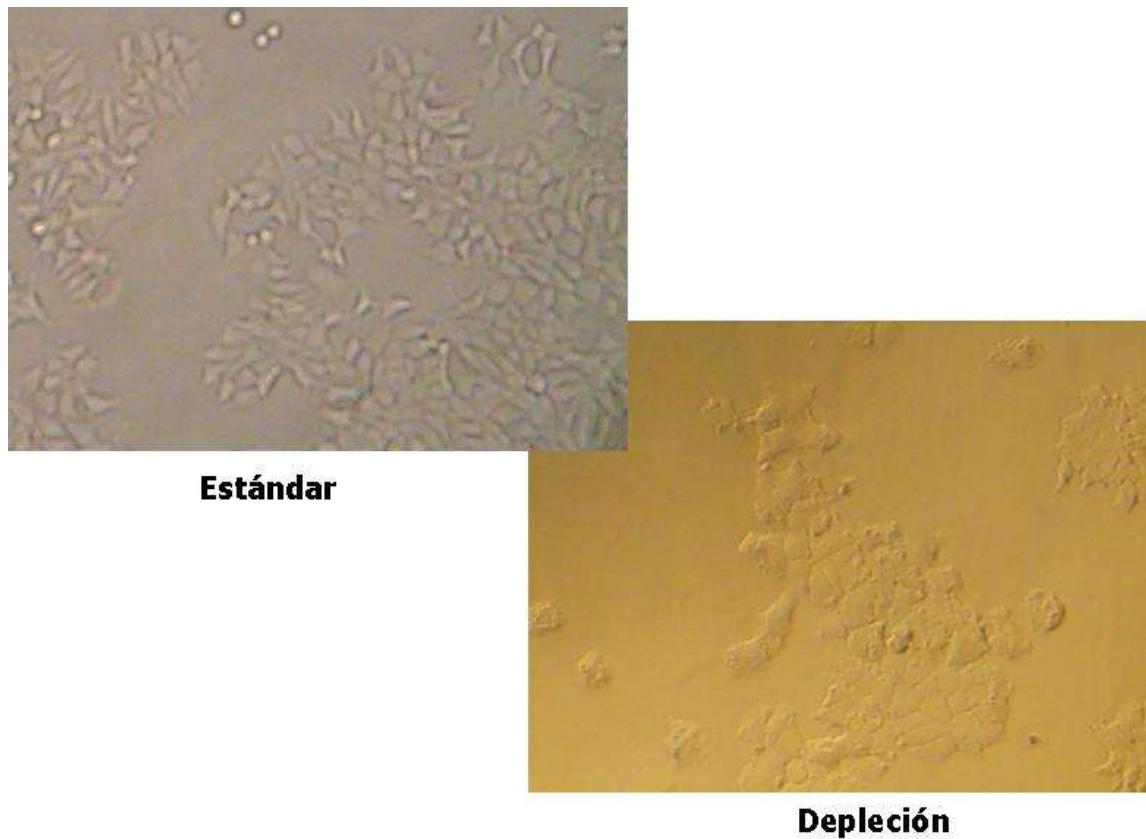


Figura 9. Morfología de la línea celular MCF7. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno por 3 días y las fotografías fueron tomadas en microscopio óptico con luz visible.

6.1.2 Cinética de Deplección de Estrógeno.

Los efectos de la deplección de estrógeno sobre la proliferación celular de la línea MCF7 fueron analizados a través de una cinética. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en deplección de estrógeno y un ensayo de MTT fue realizado en los días 1, 3, y 5.

La proliferación de las células cultivadas en condiciones de deplección de estrógeno es menor en aproximadamente 50% al día 3 y un 40% al día 5, en comparación con la proliferación de las células cultivadas en condiciones estándar (Fig.10).

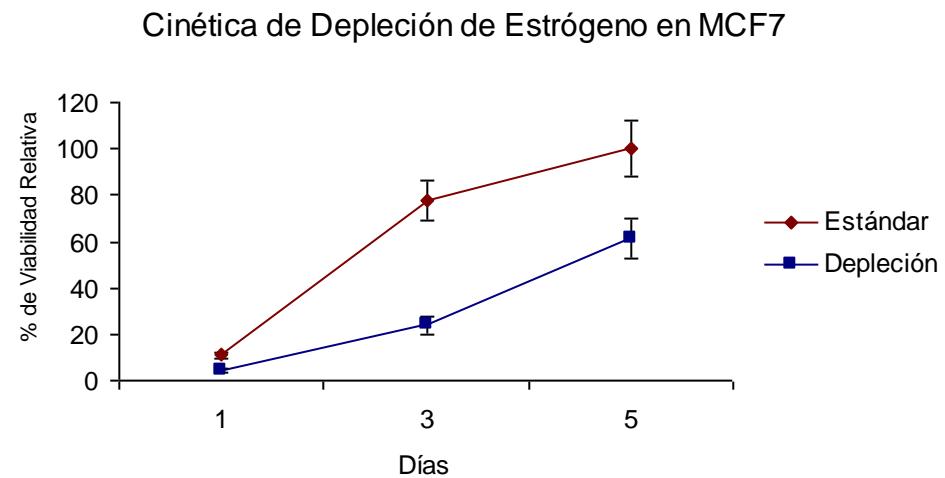


Figura 10. Cinética de deplección de estrógeno en la línea celular MCF7. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en deplección de estrógeno y un ensayo de MTT fue realizado en los días 1, 3 y 5.

6.1.3 Efecto del Tamoxifen en la Línea Celular MCF7.

De manera complementaria al ensayo de depleción de estrógeno se analizó el efecto del Tamoxifen (droga antagonista de receptor de estrógeno) sobre la línea MCF7 por medio de una cinética de proliferación. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar con diferentes dosis de Tamoxifen (0 μ M a 10 μ M), transcurridas 72 hrs. se realizó un ensayo de MTT.

El porcentaje de viabilidad relativa disminuyó de manera dosis dependiente, siendo menor al 70% en la dosis más baja (1 μ M), y de aproximadamente un 15% en la dosis más alta, (10 μ M), con relación al control de células sin tratamiento. (Fig. 11).

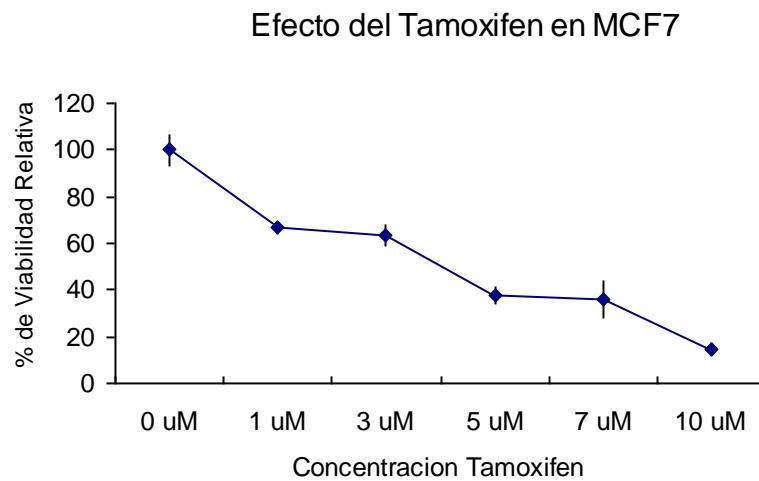


Figura 11. Efecto del Tamoxifen en la línea celular MCF7. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y tratadas con concentraciones de 1 a 10 μ M del antagonista del receptor de estrógeno Tamoxifen y un ensayo de MTT fue realizado a las 72 hrs.

6.2 Determinación de la localización de la proteína Par4 en la Línea celular MCF7.

La localización de Par4 en la línea celular MCF7 fue analizada por medio de inmunohistoquímica y Western blot.

En la inmunohistoquímica es posible observar la marca café, que indica la presencia de Par4, tanto en los núcleos como en el citoplasma de las células, (Fig. 12 A), mientras que en el control negativo se observan las células teñidas con hematoxilina, presentando una coloración morada intensa en los núcleos y más tenue en citoplasma (Fig. 12 B).

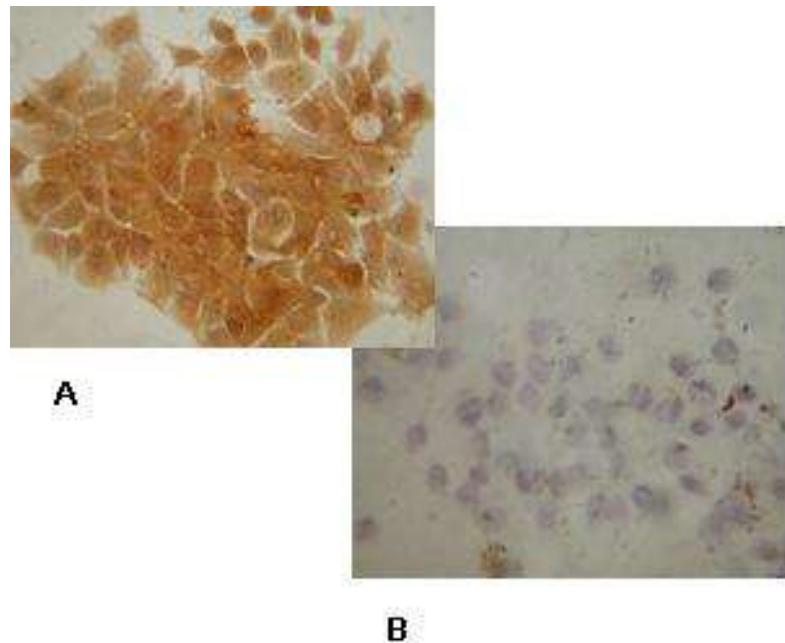


Figura 12. Localización de Par4 en la línea MCF7 por inmuno-histoquímica. A. Localización citoplasmática y nuclear de Par4. B. Control negativo.

Para el Western blot se utilizaron extractos nucleares y citoplasmáticos de células cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno. El resultado del Western blot muestra una expresión tanto nuclear como citoplasmática de Par4. En condiciones de cultivo estándar la expresión de Par4 fue predominantemente citoplasmática, mientras que en condiciones de depleción de estrógeno Par4 se encontró en cantidades similares, tanto en núcleo como citoplasma (Fig. 13 panel superior). En este experimento se utilizó la expresión de Bcl-2 como un control de extractos citoplasmáticos para descartar posibles contaminaciones entre extractos (Fig. 13 panel inferior).

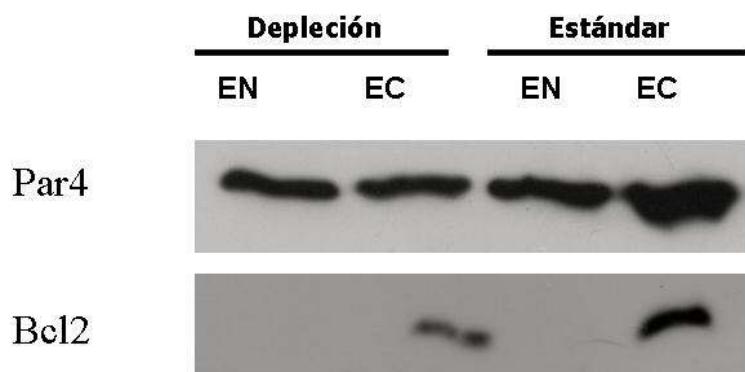


Figura 13. Localización de Par4 en la línea celular MCF7 por Western blot. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno, y la localización de Par4 fue analizada por Western blot, tanto en extractos nucleares (EN) como citoplasmáticos (EC). Se utilizó Bcl-2 como un control de extractos citoplasmáticos.

6.3 Determinación del complejo proteico WT1-Par4 en la Línea Celular MCF7.

La determinación del complejo WT1-Par4, se llevo a cabo por medio de la inmuno-precipitación de WT1 en extractos nucleares y citoplasmáticos de células cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno, las proteínas inmuno-precipitadas fueron analizadas por Western blot.

En el resultado del Western blot es posible observar la presencia de Par4 entre las proteínas inmuno-precipitadas, tanto en extractos citoplasmáticos como nucleares de células cultivadas en condiciones de depleción de estrógeno y condiciones estándar de cultivo. La proteína de fusión purificada Par4 (1-334) (Santa Cruz Biotechnology, CA) fue utilizada como un control positivo de Par4 (C+ Par4) Fig. 14.

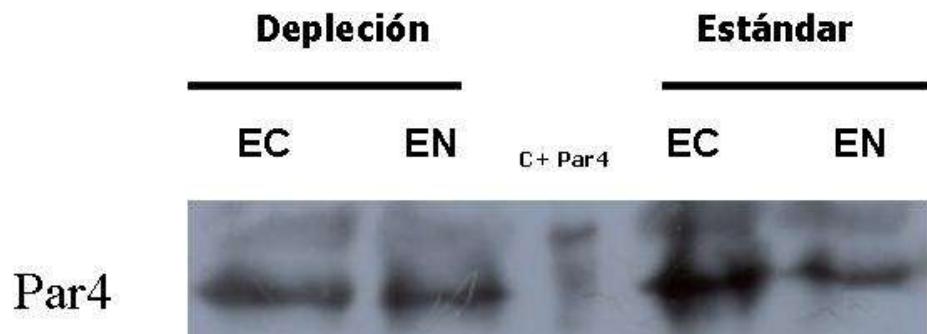


Figura 14. Determinación del complejo WT1-Par4 en la línea celular MCF7. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno y extractos nucleares (EN) y citoplasmáticos (EC) fueron inmuno-precipitados con el anticuerpo anti-WT1, la presencia de Par4 en los inmuno-precipitados se determinó por Western blot.

6.4 Determinación del complejo proteico WT1-Par4 en los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1.

6.4.1 Determinación de la unión de WT1 a los elementos de respuesta (-1807) y (-1460) de P1.

La capacidad de la proteína WT1 proveniente de la línea celular MCF7 para unirse a los elementos de respuesta presentes en P1, fue analizada por medio de un Pull down, las células fueron cultivadas en condiciones estándar y los extractos nucleares fueron sometidos al ensayo de Pull down.

En el resultado del Western blot se observa la presencia de WT1, uniéndose a ambos elementos (-1807) y (-1460), los extractos nucleares (EN), se presentan como controles de la calidad de las proteínas usadas. Fig. 15.



Figura. 15. Determinación de la unión de WT1 proveniente de la línea MCF7 a los elementos de respuesta (-1460) y (-1807) de P1. La línea celular MCF7 fue cultivada en condiciones estándar y extractos nucleares (EN) fueron utilizados para correr un Pull down. La presencia de WT1 fue determinada por Western blot.

6.4.2 Determinación del complejo proteico WT1-Par4 en los elementos de respuesta (-1807) y (-1460) de P1.

La capacidad del complejo WT1-Par4 para unirse a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor P1 de Bcl-2, fue analizada por medio de un ensayo de Pull down, realizado con extractos nucleares de las células MCF7 cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.

En condiciones estándar de cultivo fue posible detectar la presencia de Par4 en los sitios (-1807) y (-1460) (Fig. 16 panel superior), la presencia de WT1 formando parte de este complejo fue detectada de igual manera en ambos sitios (Fig. 16 panel inferior). Los extractos nucleares (EN) con los que este experimento fue llevado a cabo se muestran como un control de la calidad de las proteínas usadas.

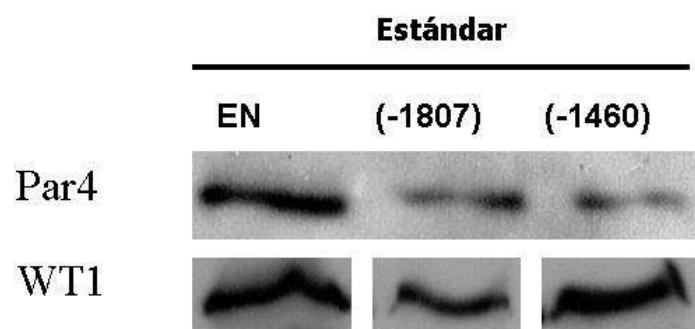


Figura 16. Determinación del complejo WT1-Par4 en los sitios (-1807) y (-1460) de P1, en condiciones estándar. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y extractos nucleares fueron utilizados para correr un Pull down con los oligos de los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1. La presencia

En condiciones de depleción de estrógeno, fue posible determinar la presencia tanto de Par4 (Fig. 17 panel superior) como de WT1 (Fig. 17 panel inferior) en los sitios (-1807) y (-1460) de P1.

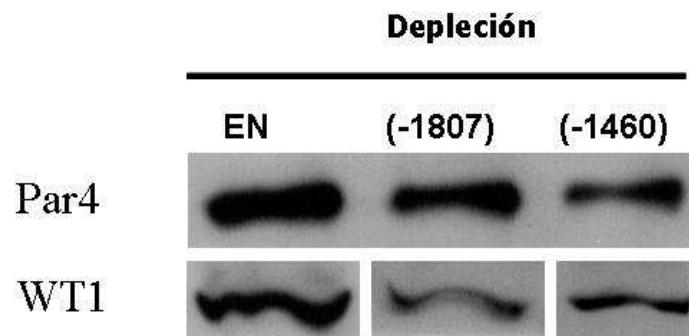


Figura 17. Determinación del complejo WT1-Par4 en los sitios (-1807) y (-1460) de P1, en depleción de estrógeno. Las células fueron cultivadas en condiciones de depleción de estrógeno y extractos nucleares fueron utilizados para correr un Pull down con los oligos de los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1. La presencia de Par4 y WT1 fue determinada por Western blot.

6.4.3 Determinación del complejo proteico WT1-RE en los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1.

De manera adicional se analizó la posibilidad de una interacción física de RE con WT1 como parte del complejo proteico capaz de unirse a los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1, sin embargo no fue posible detectar la presencia de RE por ninguna de las técnicas utilizadas (inmunoprecipitación y Pull down).

6.4.4 Determinación del complejo proteico WT1-p53 en la Línea Celular MCF7.

La línea MCF7 a diferencia de la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama, presenta una expresión “wild type” de p53, por lo que consideramos importante analizar su posible interacción con WT1 dentro del complejo proteico.

La determinación del complejo WT1-p53 en la línea MCF7 se llevo a cabo por medio de una inmunoprecipitación, las células fueron cultivadas en condiciones estándar y extractos nucleares y citoplasmáticos fueron inmuno-precipitados con el anticuerpo anti-WT1, las proteínas inmuno-precipitadas fueron analizadas por Western blot .

En el resultado de Western blot es posible observar la presencia de p53 entre las proteínas inmuno-precipitadas. Fig.18.



Figura 18. Determinación del complejo WT1-p53 en la línea MCF7. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y extractos nucleares (EN) y citoplasmáticos (EC) fueron inmuno-precipitados con el anticuerpo anti-WT1, la presencia de p53 fue determinada por Western blot.

6.4.5 Determinación del complejo proteico WT1-p53 en los elementos de respuesta (-1807) y (-1460) de P1.

La presencia del complejo WT1-p53 en los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1, fue determinada por medio de un Pull down, utilizando extractos nucleares y citoplasmáticos de células cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno.

El análisis del Pull down muestra la presencia de p53 en ambos sitios de unión para WT1 presentes en P1, tanto en condiciones estándar como en depleción de estrógeno (Fig. 19). Los extractos nucleares (EN) con lo que este experimento fue llevado a cabo se muestran como un control de la calidad de las proteínas usadas.

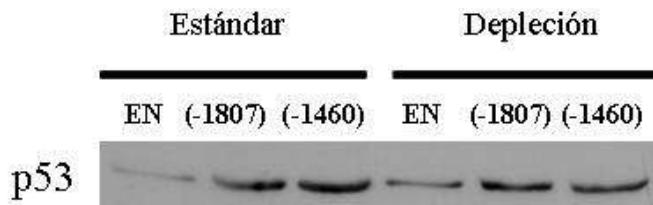


Figura 19. Determinación del complejo WT1-p53 en los sitios (-1807) y (-1460) de P1. Las células fueron cultivadas en condiciones estándar y en depleción de estrógeno y extractos nucleares fueron utilizados para correr un Pull down con los oligos de los elementos de respuesta para WT1 presentes en P1. La presencia de p53 fue determinada por Western blot.

6.5 Determinación del efecto de la inhibición de Par4 en la expresión de Bcl-2.

6.5.1 Inhibición de la Expresión de Par4 por RNAi.

Para inhibir la expresión de Par4 se construyeron dos plásmidos que codifican para RNA de interferencia contra Par4, uno de los plásmidos fue construido con una secuencia de RNAi diseñada por Gurumurthy et al. (2005) (Plásmido **RNAi A**), el segundo plásmido fue construido con una secuencia que fue diseñada en base al RNA mensajero de Par4 con la ayuda de un Software de Ambion, Inc., (Plásmido **RNAi B**).

Las células fueron transfectadas con los plásmidos RNAi A y RNAi B, en la Fig. 20 (A), se observa que la morfología de las MCF7 no se ve alterada por la expresión de los plásmidos. La Fig. 20 (B) muestra la fotografía tomada a las células con microscopio confocal que permite analizar la expresión de la proteína verde fluorescente como un control de eficiencia de la transfección.

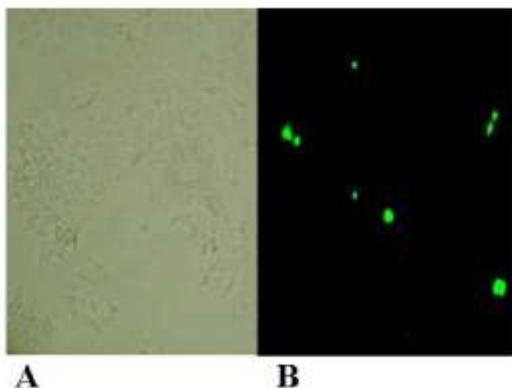


Figura 20. Morfología de la línea MCF7 transfectada con RNAi. Las células fueron transfectadas con el plásmido RNAi B, transcurridas 48 hr se tomaron fotografías con microscopio de luz visible y confocal. A. Morfología de la línea MCF7 transfectada con RNAi B. B. Visualización de la expresión de la proteína verde fluorescente, que sirve como control de eficiencia de transfección.

La inhibición de la expresión de Par4 se analizo por medio de un Western blot.

El resultado muestra una disminución en la expresión de Par4 en las células transfectadas con 1.5 μ g y 1 μ g del plásmido RNAi A, con respecto a las células sin transfectar (MCF7), la mayor inhibición se observó en las células tratadas con 1 μ g, las cuales presentaron mejor eficiencia de transfección. Fig 21. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

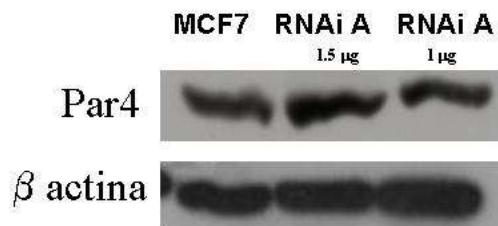


Figura 21. Inhibición de la expresión de Par4 con RNAi A. Las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el RNAi A de Par4, la inhibición de la expresión de Par4 fue analizada por Western blot. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

La inhibición de la expresión de Par4 por el RNAi B, se muestra en la Fig. 22 (panel superior), en donde se observa una disminución en la expresión de Par4 en las células transfectadas con 1 μ g y 1.5 μ g con respecto a las células sin transfectar (MCF7), presentándose una mayor inhibición con la cantidad de 1.5 μ g. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

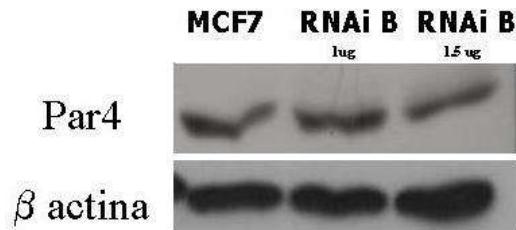


Figura.22. Inhibición de la expresión de Par4 con RNAi B. Las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el RNAi B de Par4, la inhibición de la expresión de Par4 fue analizada por Western blot. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

6.5.2 Efecto de la inhibición de la expresión de Par4 sobre la expresión de WT1.

Para analizar el efecto de la inhibición de Par4 sobre la expresión de WT1, las células fueron transfectadas con los plásmidos RNAi A y RNAi B y la expresión de WT1 fue determinada por Western blot.

La expresión de WT1 aumento en las células que fueron transfectadas con 1.5 μ g y 1 μ g del RNAi A, con respecto a las células sin transfectar (MCF7), Fig. 23 (panel superior), la expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

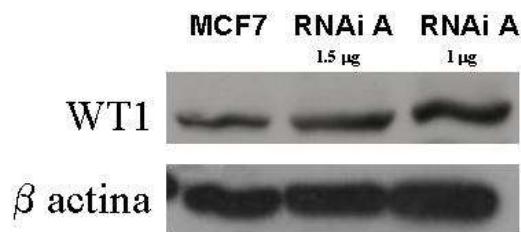


Figura. 23. Efecto de la inhibición de Par4 con RNAi A sobre la expresión de WT1. Las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el RNAi A de Par4, la expresión de WT1 fue analizada por Western blot. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

La expresión de WT1 presento una disminución en las células que fueron transfectadas con 1 μ g y 1.5 μ g del RNAi B con respecto al control de células sin transfectar (MCF7) Fig. 24 (panel superior).



Figura. 24. Efecto de la inhibición de Par4 con RNAi B sobre la expresión de WT1. Las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el RNAi B de Par4, la expresión de WT1 fue analizada por Western blot. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

6.5.3 Efecto de la inhibición de la expresión de Par4 sobre la expresión de Bcl-2.

La expresión de Bcl-2 no se vio afectada por la transfección de las células con el RNAi A, en ninguna de las concentraciones, en la Fig 25 (panel superior) se observa un ligero aumento en los carriles que corresponde a las células transfectadas, sin embargo el control de carga β -actina muestra que la cantidad de proteína fue mayor en esos carriles comparados con los de las células sin transfectar (MCF7), por lo que el aumento que se ve en Bcl-2 no es significativo. Fig. 25 (panel inferior).

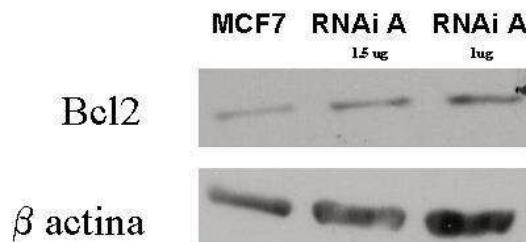


Figura 25. Efecto de la inhibición de Par4 con RNAi A en la expresión de Bcl-2. Las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el RNAi A de Par4, la expresión de Bcl-2 fue analizada por Western blot. La expresión de β -actina se muestra como un

La expresión de Bcl-2 no se vio afectada por la inhibición de Par4 con el plásmido RNAi B.

La Fig. 26 muestra que la expresión de Bcl-2 en las células transfectadas con 1 μ g del plásmido RNAi B no varía significativamente comparada con la expresión que presentan las células sin transfectar (MCF7).

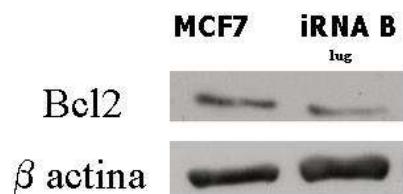


Figura 26. Efecto de la inhibición de Par4 con RNAi B en la expresión de Bcl-2. Las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el RNAi B de Par4, la expresión de Bcl-2 fue analizada por Western blot. La expresión de β -actina se muestra como un control de carga.

7. DISCUSIÓN

Las interacciones proteína-proteína representan uno de los mecanismos de regulación génica más importantes.

Las interacciones físicas de WT1 con p53, RE y Par4 han sido estudiadas en diferentes modelos y forman parte de los mecanismos de regulación de diversos genes involucrados en el desarrollo del cáncer, como IGR-IR, p21 y Bcl2. (Idelman et al., 2003; Reizner et al., 2005; Johnstone et al., 1996).

En este trabajo se analizó la presencia del complejo WT1-Par4 en la línea celular de cáncer de mama receptor de estrógeno positivo MCF7, cultivada en condiciones estándar y en depleción de estrógeno, y su capacidad para unirse a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor P1 de Bcl-2.

Debido a que las interacciones de WT1 son dependientes del contexto celular, y a la importancia del receptor de estrógeno en la regulación de genes involucrados en el desarrollo de cáncer, se realizó un análisis de los patrones de expresión de WT1, Par4, Bcl-2 y p53 de la línea MCF7 cultivada en condiciones estándar y en depleción de estrógeno, los niveles de WT1, Par4 y Bcl-2, se vieron afectados por la ausencia del estímulo estrógenico produciendo una baja en la expresión WT1 y Bcl-2, y una sobre expresión de Par4, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Wang y Phang, 1995; y Huang et al., 1997; que reportan la disminución de la expresión de Bcl-2 ante la

falta del estímulo estrogénico así como con la relación negativa entre Par4 y Bcl-2 reportada en células de cáncer de próstata andrógeno independientes por Qiu et al., en 1999.

De manera complementaria se analizó el efecto de la depleción de estrógeno en la morfología y proliferación celular, la falta del estímulo estrogénico ocasionó la pérdida de la morfología epitelial característica de la células y una disminución en la proliferación de aproximadamente el 50%, así mismo al bloquear al receptor de estrógeno con una droga antagonista (tamoxifen), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó de manera dosis dependiente, de un 70% a un 15% con dosis de 1 μ M y 10 μ M respectivamente, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Zapata et al., en el 2002, en esta misma línea celular.

En líneas celulares de cáncer de próstata se ha reportado la translocación de Par4 hacia el núcleo, después de un estímulo apoptótico (Ranganathan y Rangnekar 2005), en la línea MCF7 la inmunohistoquímica mostró una distribución tanto nuclear como citoplasmática en las células cultivadas en condiciones estándar, mientras que en el Western blot la expresión de Par4 se encontró en cantidades similares en el núcleo y el citoplasma de células cultivadas en depleción de estrógeno, en condiciones estándar la expresión de Par4 fue predominantemente citoplasmática, Par4 realiza diferentes funciones dependiendo de su localización, cuando se encuentra en núcleo promueve la apoptosis al inhibir la fosforilación de NF κ B por IKK β (Díaz-Meco et al., 1999), y actúa como un cofactor de represión en conjunto con otros factores de transcripción (Heckman et al., 1997), en citoplasma inhibe la fosforilación de I κ B evitando así la liberación de

NF κ B (Díaz-Meco et al., 1996) también se ha reportado que es capaz de bloquear a PKC ξ evitando la activación de NF κ B (Chang et al., 2002), Par4 en citoplasma promueve la translocación de Fas-ligando al interior de la célula (Chakraborty et al., 2001).

Hewitt et al., en 1995, reportaron que la sobre expresión de WT1 reprimía la expresión de Bcl-2, y concluyeron que esta regulación formaba parte importante de la tumorigénesis.

Qiu et al., en 1999 demostraron que Par4 es capaz de modular negativamente la expresión de Bcl-2, y que esto concordaba con los patrones de expresión excluyentes de Par4 y Bcl-2 presentes en tumores de próstata.

La interacción de WT1 con elementos de respuesta presentes en el promotor P1 de Bcl-2 ha sido estudiada con anterioridad, Heckman et al., en 1997, reportaron la represión transcripcional de Bcl-2 a través de la unión de WT1 a la secuencia -1460 de P1, en 1999, Mayo et al., reportaron una regulación positiva de Bcl-2 a través de la unión de WT1 con el elemento -1807 de P1.

Las interacciones físicas entre WT1 y Par4 han sido estudiadas en diferentes contextos celulares, Johnstone et al., en 1996, demostraron que Par4 actúa como un represor de la actividad transcripcional de WT1 en un modelo de melanoma humano, Cheema et al., en el 2003, en un modelo de cáncer de próstata, reportaron la presencia de un complejo WT1-Par4, capaz de regular positivamente al promotor P1 de Bcl-2 a través del elemento de respuesta -1460, esto en presencia de WT1 endógena, sin embargo al

aumentar las cantidades de WT1 por vía exógena, la función de WT1 cambia y reprime la expresión de Bcl-2 positivamente.

En la línea MCF7 la presencia del complejo WT1-Par4 fue determinada por medio de una inmuno-precipitación con el anticuerpo anti-WT1 y la posterior detección de Par4 por Western blot entre las proteínas inmuno-precipitadas. El complejo fue encontrado en el núcleo y en el citoplasma, de células cultivadas en condiciones estándar, de igual manera se encontró en ambas localizaciones en las células que fueron cultivadas en depleción de estrógeno.

La unión de la proteína WT1 proveniente de la línea MCF7 a los elementos -1460 y -1807 fue analizada por medio de un Pull down, el resultado muestra que WT1 tienen la capacidad de unirse a los dos elementos de respuesta. Posteriormente se analizó con la misma técnica la unión de complejo WT1-Par4, a los elementos de P1, la presencia del complejo fue detectada en las 2 secuencias -1460 y -1807, la unión es independiente de las condiciones de cultivo lo que sugiere que RE no esta involucrado en la interacción del complejo con el promotor de Bcl-2.

La capacidad del complejo WT1-Par4 para unirse al promotor de Bcl-2 sugiere un mecanismo de regulación transcripcional, por medio del cual Par4 interactúa de manera indirecta con Bcl-2 (Heckman et al., 1997; Mayo et al., 1999; Cheema et al., 2003).

La interacción física entre Par4 y WT1, se da a través del zipper de leucina de Par4, localizado entre los residuos 268-332, con dos dominios de WT1, el primero se

encuentra en el exón 5 entre los aminoácidos 245-297, en donde se lleva a cabo un “splicing” alternativo que inserta 17 aminoácidos, los cuales son necesarios para transactivación de genes por el complejo WT1-Par4 (Richard et al., 2000), el segundo dominio se localiza en el extremo carboxilo, entre los aminoácidos 308-429 que conforman los dedos de zinc, el “splicing” que inserta tres aminoácidos KTS, parece no afectar la unión con Par4, la interacción que se establece por este dominio de WT1 se ha relacionado con una función biológica represora del complejo proteico (Johnstone et al., 1996).

La línea celular MCF7 expresa todas las isoformas de WT1, con un predominio de la isoforma 17 aminoácidos positivo, KTS negativo (+/-), lo que abre la posibilidad de que la interacción WT1-Par4 en este modelo se dé a través de los dos dominios, por lo tanto el tipo de interacción que ejerza sobre sus genes blanco, dependerá de la expresión de las proteínas que interactúan tanto con Par4 como con WT1.

Ya que el estímulo estrogénico es uno de los factores más importantes en la proliferación celular de cáncer de mama y está involucrado en la regulación de Bcl-2 (Huang et al., 1997) y a que estudios recientes han reportado una interacción física entre WT1 y RE en un modelo con la línea MCF7 (Reizner et al., 2005) se analizó la posibilidad de que RE se encontrara en el complejo proteico con WT1, sin embargo con las técnicas utilizadas (inmuno-precipitación y Pull down), no se detectó su presencia, esto se puede deber a que Reizner et al. (2005), detectaron el complejo WT1-ER en células con una expresión exógena de ambas proteínas, debido a que en nuestro modelo se trabajó únicamente con la expresión endógena probablemente la cantidad en que se

encuentra el complejo de manera natural en las células fue el factor que impido la detección de RE.

La proteína p53 es un factor de transcripción que regula ciclo celular, y actúa como supresor de tumor, es considerada el “Guardián del Genoma”, debido a que su función es conservar la estabilidad genética de las células y prevenir mutaciones en el genoma.

Las interacciones físicas entre p53 y WT1 han demostrado ser un factor importante en la regulación de las funciones de WT1, Idelman et al., en el 2003 demostraron que la capacidad de WT1 de reprimir la expresión de IGF-IR, es dependiente del estatus de p53, ya que la represión se aumentaba en ausencia de p53 ó en presencia de p53 “wild type”, sin embargo cuando p53 se encuentra mutado WT1 es incapaz de regular a IGF-IR, además demostraron la existencia del complejo proteico WT1-p53, observando que solo las isoformas KTS negativas son capaces de establecer esta interacción.

A diferencia de la mayoría de las líneas de cáncer de mama la línea MCF7 presenta una expresión “wild type” de p53, la presencia del complejo WT1-p53 fue analizada a través de la inmunoprecipitación de WT1 y la posterior detección de p53 entre las proteínas inmunoprecipitadas, el complejo fue detectado en los extractos nucleares y citoplasmáticos de las células cultivadas en condiciones estándar. Posteriormente se analizó por la técnica de Pull down la presencia del complejo en los sitios -1460 y -1807 de P1 y fue posible su detección en ambas secuencias, de manera independiente de las condiciones de cultivo, lo que confirma que la ausencia del estímulo estrogénico no interfiere con la interacción de los complejos con los elementos de respuesta de P1, en este modelo.

La presencia de p53 en los sitios -1460 y -1807 de P1, sugiere un complejo mecanismo de regulación de P1 en este modelo, ya que al demostrarse que tanto Par4

como p53 se encuentran en P1, puede existir una competencia entre ellos por la unión con WT1, también se ha planteado la posibilidad de que p53 y Par4 se unan a la misma molécula de WT1.

Habiendo demostrado la presencia de Par4 acomplejada con WT1 en los sitios -1460 y -1807 de P1, y con la finalidad de conocer la importancia de Par4 en la regulación de Bcl-2, se analizó el efecto de la inhibición de Par4 sobre la expresión de WT1 y Bcl-2.

Para inhibir la expresión de Par4 se construyeron dos plásmidos (RNAi A y RNAi B) que codifican para RNA de interferencia contra Par4, los cuales fueron usados para transfectar de manera transitoria a las células MCF7, la eficiencia de los RNAi se analizó por Western blot, ambos plásmidos fueron capaces de inhibir la expresión de Par4, sin embargo el plásmido RNAi B tuvo mayor eficiencia.

Posteriormente se analizó la expresión de WT1 y Bcl-2 en las células transfectadas con los plásmidos RNAi A y RNAi B.

Los niveles de expresión de WT1 se incrementaron, esto puede ser debido a que la interacción de Par4 aumenta las capacidades represoras de WT1 sobre su propio promotor ó a la interacción de Par4 con alguna otra proteína represora de WT1.

La expresión de Bcl-2 no sufrió cambios como consecuencia de la inhibición de Par4, a pesar de que en varios estudios se ha demostrado tanto la activación (Cheema et al., 2003) como la represión (Qiu et al., 1999; Boehrer et al., 2002) de Bcl-2 por mecanismos que involucran la interacción de WT1 y Par4, en nuestro modelo, la inhibición de Par4 no fue suficiente para apreciar un cambio en la expresión de Bcl-2, lo que se puede deber a diversos factores:

1.- A que la interacción de p53 modifique la habilidad de WT1-Par4 para regular P1, esta función de p53 de inhibir la activación de los promotores de Bcl-2 ya ha sido descrita en otros modelos (Budhram-Mahadeo et al.,1999).

2.- Al establecimiento de un equilibrio entre las interacciones de Par4 con los 2 dominios a los que se puede unir, ya que para la unión con las isoformas 17 aminoácidos positivos se ha reportado una función co-activadora (Richard et al., 2001), y con las isoformas KTS+ y KTS- una función represora (Johnstone et al.,1996).

3.-A que al afectarse la transcripción dirigida por P1 debido a la presencia de los complejos unidos a sus secuencias reguladoras, la transcripción dirigida por P2 recupere los niveles normales de Bcl-2.

4.-A que el modelo de transfección transitoria no proporcione el tiempo suficiente para ver los efectos en la expresión de WT1.

5.-La literatura que reporta la modulación de promotores por WT1-Par4, lo ha probado en modelos donde la expresión de ambas proteínas es exógena (Johnstone et al., 1996; Richard et al., 2001; Cheema et al., 2003), al trabajar con un modelo donde la expresión de todas la proteínas involucradas es endógena, los niveles de expresión de las proteínas involucradas pueden no ser suficientes para ver los efectos sobre Bcl-2.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la presencia del complejo WT1-Par4 y su capacidad para unirse a los elementos de respuesta para WT1 presentes en el promotor P1 del gen Bcl-2, como mecanismo de regulación de la expresión de Bcl-2 en la línea celular de cáncer de mama receptor de estrógeno positivo MCF7.

Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

1. El estímulo estrogénico es esencial para la proliferación y morfología de la línea celular MCF7.
2. La expresión de las proteínas WT1, Bcl-2 y Par4, esta regulada por un mecanismo en el que receptor de estrógeno se encuentra involucrado, al presentar cambios en sus niveles de expresión ante la falta del estímulo estrogénico.
3. La localización de Par4 en la línea MCF7 es tanto nuclear como citoplasmática y la depleción de estrógeno no causa un cambio significativo en su localización.
4. El complejo WT1-Par4 existe de manera endógena en la línea MCF7 y la depleción de estrógeno no influye en su formación.
5. La proteína WT1 proveniente de la línea MCF7 es capaz de unirse a los elementos -1460 y -1807 presentes en el promotor P1 de Bcl-2.

6. El complejo WT1-Par4 es capaz de unirse a los elementos -1460 y -1807 presentes en el promotor P1 de Bcl-2, de manera independiente a las condiciones de cultivo.
7. En el modelo utilizado no fue posible determinar la presencia de RE acomplejándose con WT1.
8. El complejo WT1-p53 existe de manera endógena en la línea MCF7.
9. El complejo WT1-p53 es capaz de unirse a los elementos -1460 y -1807 presentes en el promotor P1 de Bcl-2, de manera independiente a las condiciones de cultivo.
10. Los RNA de interferencia utilizados inhibieron de manera eficiente la expresión de Par4, causando una disminución en sus niveles de expresión.
11. La transfección de las células MCF7 con los plásmidos que codifican para los RNA de interferencia no causa daño celular, cambio de morfología ni disminución en la proliferación.
12. La inhibición de la expresión de Par4 causó un aumento en la expresión de WT1.
13. La inhibición de la expresión de Par4 no fue suficiente para observar un cambio en la expresión de Bcl-2.

LITERATURA CITADA

- Altucci L., Addeo, Cicatiello, Dauvois, Parker MG, Truss M, Sica V, Bresciani B, and Weisz A. 1996. 17- β estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36-p34 complex activation and p105 phosphorylation during mitogenic stimulation of G1 arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 12:2315-2324.
- Berthois Y, Dong XF, and Martin PM. 1989. Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen and antiestrogen in human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 159:126-131.
- Boehrer S, Brieger A, Schaaf S, Kukoc-Zivojnov N, Nowak D, Ruthardt M, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E, Chow KU. 2004. In the erythroleukemic cell line HEL Prostate-apoptosis-response-gene-4 (par-4) fails to down regulate Bcl-2 and to promote Apoptosis. *Leukemia and Lymphoma* 45 (7): 1445-1451.
- Boehrer S, Chow KU, Beske F, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Ruthardt M, Baum C, Rangnekar VM, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E. 2002. In Lymphatic Cells Par-4 Sesitizes to Apoptosis bye Down-Regulating Bcl-2 and Promoting Disruption of Mitochondrial Membrane Potential and Capase Activation. *Cancer Research* 62: 1768-1775.
- Brieger A, Boehrer S, Schaaf S, Nowak D, Ruthardt M, Kim Soo-Zin, Atadja P, Hoelzer D, Mitrou SP, Weidmann E, Chow KU. 2004. In bcr-abl-positive myeloid cells resistant to conventional chemotherapeutic agents, expression of Par-4 increases sensitivity to imatinib (ST1571) and histone deacetylase-inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 68: 85-93.
- Bruening W, Gros P, Sato T, Stanimir J, Nakamura Y, Housman D, Pelletier J. 1993. Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. *Cancer Investigation* 11:393-399.
- Budhram-Mahadeo V, Morris PJ, Smith MD, Midgley CA, Boxer LM, Latchman DS. 1999. p53 Suppresses the Activation of the Bcl-2 Promoter by the Brn-3a POU Family Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry* 21: 15237-15244.
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H and Lewis WH. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520.
- Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM.. 2001. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and Fasl to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Research* 61: 7255-7263.

Chan SL, Tammariello SP, Estus S, and Mattson MP. 1999. Prostate Apoptosis Response-4 Mediates Trophic Factor Withdrawal-Induced Apoptosis of Hippocampal Neurons: Actions Prior to Mitochondrial Dysfunction and Caspase Activation. *Journal of Neurochemistry* 73: 502-512.

Chang S, Kim JH and Shin J. 2002. p62 forms a ternary complex with PKC ζ and PAR-4 and antagonizes PAR-4 induced PKC ζ inhibition. *FEBS Letters*. 510: 57-61.

Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari AM, Kumar R, and Lopez-Berestein G. 2003. Par-4 Transcriptionally Regulates Bcl-2 through a WT1-binding Site on the bcl-2 Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19995-20005.

Chen Zing. 2000. The Possible Role and Application of WT1 in Human Leukemia. *Journal of Hematology* 73(1):39-46.

Cleary M., Smith S.D., and Sklar J. 1986. Cloning and structural analysis of cDNA for bcl2 and hybrid bcl2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47:19-28.

Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, and Silvestri R. 1999. Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocrine-Related Cancer* 6:61-68.

Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND. 1998. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Development* 12:3217-3225.

Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. 1996. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86: 777-786.

Diaz-Meco MT, Lallena MJ, Monjas A, Frutos S, Moscat J. 1999. Inactivation of the inhibitory kappaB protein kinase/nuclear factor kappaB pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274:19606-19612.

Donato LJ and Noy N. 2005. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Research* 65(18):8193-9.

Dong L, Wang W, Wang F, Stoner M, Reed JC, Harigai M, Samudio I, Kladde MP, Vyhledal C, and Safe S. 1999. Mechanisms of Transcriptional Activation of Bcl-2 Gene Expression by 17 β -Estradiol in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 5:32009-32107.

Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Haber DA. 1997. Induction of p21 by the Wims' Tumor suppressor gene WT1. *Cancer Research* 57(8): 1429-1434.

Fraizer G, Leahy R, Priyadarshini S, Graham K, Delacerda J, and Diaz M. 2004. Suppression of prostate tumor cell growth in vivo by WT1, the Wilms' tumor suppressor gene. International Journal of Oncology 24: 461-471

Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C, Palma PD, Mauri FA, Boracchi O, Bevilacqua P, Caffo O, Morelli L, Verdeio P et al. 1995. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. Cancer Clinical Cancer Research 1(2): 189-198.

Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GAP. 1990. Homozygous deletion in Wilms Tumors of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. Nature 343:774-778.

Graninger WB, Seto M, Bountain B, Goldman P, and Korsmeyer SJ. 1987. Expression of the Bcl-2 and the Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. Journal of Clinical Investigation 80(5):1512-1515.

Guo Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S.F., Geddes , J. W., Bondada, V., Rangnekar, V.M., and Mattson, M.P., (1998) Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. Nature Medicine 4, 957-962.

Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM. 1999. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. Molecular and Cellular Biology 25 (3) 1146-1161.

Hastie ND. 2001. Life, Sex, and WT1 Isoforms-Three Amino Acids Can Make All the Diffrence. Cell 106: 391-394.

Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer LM. 1997. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. Journal of Biological Chemistry 272:19609-19614.

Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P, van Marck E. 1995 . Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. Bristish Journal of Cancer 72 (2): 354-360.

Herynk MH and Fuqua SAW. 2004. Estrogen Receptor Mutations in Human Disease. Endocrine Reviews 25 (6): 869-898.

Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher III FJ, and Saunders GF. 1995. Regulation of the Proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' Tumor Suppressor Gene WT1. Cancer Research 55: 5386-5389.

Huan Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, and Bhalla K. 1997. Estrogen Increases intracellular p26Bcl-2 to p21bax ratio and inhibits taxol-induced

apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 42:73-81.

Huang Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, and Bhalla K. 1997. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 42: 73-81.

Idelman G, Glaser T, Roberts TC, and Werner H. 2003. WT1-p53 Interaction in Insulin-like Growth Factor-I Receptor Gene Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 278 (5): 3474-3482.

Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, and Shi Yang. 1996. A novel Repressor, par-4 Modulates Transcription and Growth Suppression Functions of the Wilms' Tumor Suppressor WT1. *Molecular and Cellular Biology* 16 (12): 6945-6956.

Kim J, Prawitt D, Bardesey N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B, Pelletier J. 1999. The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 19:2289-2299.

Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH, Kraweska M. and Reed JC. 1997. Analysis of bax and bcl-2 expression in p53-inmunopositive breast cancers. *Clinical Cancer Research* 3:199-208.

Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 5925-5930.

Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. 2000. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine- Related Cancer* 4:257-2569

Lee SB and Heaver DA. 2001. Wilm's tumor and the wt1 gene. *Experimental Cellular Research* 264:74-99.

Lee TH, Pelletier J. 2001. Functional characterization of WT1 binding sites within the human vitamin D receptor gene promoter. *Physiological Genomics* 7:187-200.

Lee YI, and Kim SJ. 1996. Transcriptional repression of human insulin-like growth factor-II P4 promoter by Wilms' tumor suppressor WT1. *DNA and Cell Biology*. 15 (2): 99-104.

Leek RD, Kaklamani L, Pezzella F, Gatter KC, and Harris AL. 1994. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor negative tumours *in situ* cancer. *Journal of Cancer* 69:135-139

Liu XW, Gong LJ, Guo LY, Katagiri Y, Jiang H, Wang ZY, Johnson CA, and Guroff G. 2001. The Wilms' Tumor Gene Product WT1 Mediates the Down-regulation of the Rat Epidermal Growth Factor Receptor by Nerve Growth Factor in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 5068-5073.

Liu W, Konduri SD, Bansal S, Nayak BK, Rajasekaran SA, Karuppayil SM, Rajasekaran AK, and Das GM. 2006. Estrogen Receptor- α binds p53 Tumor Suppressor Protein Directly and Represses its Function. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 281 (1): 9837-9840.

Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjan B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, and Sukumar S. 2001. Wilms' Tumor Suppressor Gene (WT1) Is Expressed in Primary Breast Tumors Despite Tumor-specific Promoter Methylation. *Cancer Research* 61:921-925.

Loeb DM, Korz D, Katsnelson M, Burwell EA, Friedman AD, Sukumar S. 2002. Cyclin E is a Target of WT1 transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry* 277 (22):19627-19632.

Maheswaran, S., S.Park., A. Bernard., J.F. Morris, F.J. Rauscher III, D.E. Hill, and D.A. Haber. 1993. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:5100-5104.

Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS. 1999. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *Journal of European Molecular Biology Organization* 18:3990-4003.

Mrowka C and Schedl A. 2000. Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *Journal of the American Society of Nephrology* 16:106-115.

Ogawa S, Washburn TF, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. 1998. Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology* 139: 5058-5069.

Perillo B, Sasso A, Abbondanza C, and Palumbo G. 2000. 17- β -estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Molecular and Cellular Biology* 20:2890-2901.

Qiu G, Ahmed M, Sells SF, Mohiuddin M, Weinstein MH, and Rangnekar VM. 1999. Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4. *Oncogen* 18: 623-631.

Ranganathan P and Rangnekar VM. 2005. Regulation of Cancer Cell Survival by Par-4. *New York Academy of Sciences* 1059: 76-85.

Rauscher FJ 3rd. 1993. Tumor suppressor genes which encode transcriptional repressors: studies on the EGR and Wilms' tumor (WT1) gene products. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 348:23-29.

Reizner N, Maor S, Sarfstein R, Abramovitch, Welshons WV, Curran EM, Lee AV and Werner H. 2005 The WT1 Wilms' tumor suppressor gene product interacts with estrogen receptor- α and regulates IGF-I receptor gene transcription in breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 35:135-144.

Reynolds PA, Smolen GA, Palmer RE, Sgroi D, Yajnik V, Gerald WL, and Haber DA. 2003. Identification of a DNA-binding site and transcriptional target for the EWS-WT1(+KTS) oncoprotein. *Genes and Development* 17: 2094-2107.

Richard DJ, Schumacher V, Royer-Pokora B, and Roberts SGE. 2001. Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes and Development* 15: 328-339.

Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT Jr, Daniel CW. 1997. Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:8135:8137.

Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, Jochemsen AG. 1999. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *Journal of Biological Chemistry* 274:23456-23462.

Schmid D, Heinze G, Linnerth B, et al. A. 1997. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11:639-643.

Scholz H and Kirschner KM. 2005. A role for the Wilms' Tumor Protein WT1 in Organ Development. *Physiology* 20: 54-59.

Simpson ER. 1998. Genetic mutations resulting in estrogen insufficiency in the male. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145: 55-59.

Swiam A and Lovell-Badge R. 1999. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes and Development* 13: 755-767.

Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. 1999. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 3:393-399.

Ushijima T, Abe M, Maekita T, Okochi-Takada E. 2006. Genes involved in breast cancers. *Japanese journal of clinical medicine* 64(3):432-6.

- Wang TTY, and Phang JM. 1995. Effects of Estrogen and Apoptotic Pathways in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Cancer Research* 55: 2487-2489.
- Warner M, Nilsson S, and Gustafsson JA. 1999. The estrogen receptor family. *Current opinion in obstetrics & gynecology*.11: 249-254.
- Weisz A, and Bresciani F. 1993. Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Critical Reviews in Oncogenesis* 4:361-388.
- Wenger NK. 1999. Postmenopausal hormone use for cardioprotection: what we know and what we must learn. *Current opinion in cardiology* 14: 292-297.
- Xie J, Chang X, Zhang X, Guo Q. 2001. Aberrant induction of Par-4 is involved in apoptosis of hippocampal neurons in presenilin-1 M146V mutant knock out mice. *Brain Research* 915: 1-10.
- Young RL and Korsmeyer SJ. 1993. A negative regulatory element in the bcl2 5'-untranslated region inhibits expression from a upstream promoter. *Molecular and Cellular Biology* 13 (6): 3686-3697.
- Zapata-Benavides P, Tuna M, López-Berestein G, Tari AM.2002. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 295:784-790.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Anadulce Hernández Herrera

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: INTERACCIÓN DEL COMPLEJO WT1-Par4 CON EL PROMOTOR P1 DE Bcl-2 EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ESTÍMULO ESTROGÉNICO

Campo de Estudio: Biología Molecular del Cáncer de Mama

Datos Personales: Nacida en San Luís Potosí, San Luís Potosí, el 25 de Octubre de 1982, hija de Francisco Hernández García y Cecilia Herrera Mendoza.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2004, miembro del programa de Búsqueda y Desarrollo de Talentos UANL desde 1998.

Experiencia Profesional: Estudiante de la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del L.I.V., F.C.B., U.A.N.L. desde 2000.