

# CARACTERIZACIÓN DE E3KARP COMO COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES

Enrique Sánchez , Alfonso León, Elizabeth Langley.

INCMNSZ, Vasco de Quiroga 15 colonia sección XVI C.P. 14000. Fax 56550011. langley@servidor.unam-mx

Palabras clave: *Receptores nucleares, coactivadores, factores de transcripción*

**Introducción.** Las hormonas esteroides, por mediación de sus receptores nucleares, son responsable de la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que se incluyen la reproducción, el desarrollo y crecimiento así como el control de variados procesos metabólicos. Los receptores nucleares se definen como factores de transcripción que regulan la actividad transcripcional en forma dependiente de ligando (1). La actividad transcripcional de las receptores nucleares se encuentra modulada por las funciones de activación AF-1 y AF-2, ubicadas en las regiones amino y carboxilo, respectivamente, de los receptores nucleares. La actividad de las regiones AF-1 y AF-2 de los receptores nucleares se origina por la interacción con proteínas conocidas como coreguladores, los cuales pueden inducir (coactivadores) o reprimir (correpresores) la actividad transcripcional (2). E3KARP es una proteína regulatoria del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_3$  (3), la cual fue aislada por su capacidad de unión a la región amino terminal del receptor de estrógenos alfa en un ensayo de doble híbrido.

En este trabajo se presenta la caracterización de la proteína E3KARP como coactivador de los receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos y se demuestra que es capaz de interactuar *in vitro* con los dominios amino terminal y carboxilo terminal de dichos receptores.

**Metodología.** Para determinar como E3KARP afecta la transcripción, se midió la expresión de un gen reportero cuya transcripción es mediados por diferentes receptores hormonales en presencia de E3KARP en la línea celular CV-1. Se cotransfectaron diferentes construcciones plasmídicas que contenían la secuencia del receptor nuclear, de E3KARP, un reportero de luciferasa cuya transcripción es mediada por receptores nucleares y como control interno un reportero constitutivo de  $\beta$ -galactosidasa. Se midió la actividad de luciferasa en un ensayo de luminiscencia, la cual fue normalizada con la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Como control se cotransfectó a los receptores nucleares con un coactivador previamente reportado, SRC-1. Para comprobar que existe una unión directa entre E3KARP y los receptores nucleares, se realizó un ensayo de interacción *in vitro* entre E3KARP, marcado con  $^{35}\text{S}$ , y las regiones amino y carboxilo de los receptores nucleares, fusionadas con GST. La visualización de la interacción se realizó por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) seguido por autoradiografía (4).

**Resultados y discusión.** La transfección de los receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ), andrógenos (AR) y progesterona (PR) con E3KARP, muestra que E3KARP es capaz de incrementar la expresión del gen reportero de luciferasa en 40% con ER $\alpha$ , 1300% con AR y 400% con PR. La interacción *in vitro* de los diferentes dominios de los receptores con E3KARP marcado con  $^{35}\text{S}$  nos muestra que E3KARP interactúa con el dominio amino terminal de los receptores ER $\alpha$ , AR y PR. Por otro lado se determinó que E3KARP interactúa con la región carboxilo terminal de los receptores en ausencia de hormona, pero dicha interacción se pierde cuando se adiciona la hormona correspondiente a cada uno de los receptores. Los niveles de activación obtenidos en las transfecciones y la interacción *in vitro* de E3KARP con los dominios de ER $\alpha$ , PR y AR nos permiten afirmar que se trata de coactivadores de los receptores nucleares mencionados. Queda por definir el mecanismo que siguen para incrementar los niveles de activación, sin embargo por la evidencia obtenida en el ensayo de interacción *in vitro* se puede especular acerca de un mecanismo en el cual los dominios actúen en forma coordinada.

**Conclusiones.** De los resultados obtenidos se desprende que E3KARP es un coactivador de los AR, ER $\alpha$  y PR. E3KARP es capaz de interactuar con las regiones amino terminal y carboxilo terminal de los receptores ER $\alpha$ , AR y PR, lo que sugiere un mecanismo en el cual ambos dominios actúen de forma coordinada

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT).

## Bibliografía.

1. Beato M, y Klug J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update* 6(3):225-236.
2. McKenna NJ, Lanz RB, y O'Malley BW. (1999). Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology, *Endocrine Reviews* 20(3): 321-344.
3. Poulat F, Santa Barbara P, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B y Berta P. (1997). The human testis determining factor *SRY* binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem.* 272(11): 7167-7172.
4. Langley E, Zhou Z y Wilson EM. (1995). Evidence for anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *J. Biol. Chem.* 270(50):29983-29990.