

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ACCIONES DEL ÁCIDO RETINOICO EN LA
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA
HUMANO

SUSANA MASIÁ ADALID

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 4 de Octubre de 2006 davant un tribunal format per:

- D^a. Ana Aranda Iriarte
- D^a. M^a Carmen Caelles Franch
- D. Ángel Nadal Navajas
- D. Pascual Sanz Bigorra
- D^a. Teresa Barber Sanchis

Va ser dirigida per:

D. Domingo Baretino Fraile

©Copyright: Servei de Publicacions
Susana Masiá Adalid

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6641-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Biomedicina de Valencia
Departamento de Patología y Terapia Molecular y Celular
Unidad de Biología de la Acción Hormonal

Acciones del Ácido Retinoico en la Diferenciación de Células de Neuroblastoma Humano

Tesis Doctoral presentada por
Susana Masiá Adalid

Bajo la Dirección de
Dr. Domingo Baretino Fraile

Valencia, Mayo de 2006



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA
Dr. D. Baretino

D. Domingo Baretino Fraile, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

Certifica:

Que **Susana Masiá Adalid**, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado "**Acciones del Ácido Retinoico en la Diferenciación de Células de Neuroblastoma Humano**", el cual posee la suficiente calidad científica para ser presentado en la obtención del grado de Doctor en Biología.

Y para que conste a todos los efectos firma la presente certificación.

En Valencia, a 22 de mayo de 2006

Fdo. Dr. Domingo Baretino Fraile

C/ Jaime Roig, 11
46010 Valencia ESPAÑA
Telf. 96 339 17 69
Fax.: 96 369 08 00
E_mail: dbaretino@ibv.csic.es

Este trabajo de tesis ha sido financiado por las ayudas SAF2003-00311 y PM 1999-0112, de la Dirección General de Investigación; Ministerio de Educación y Ciencia, y por la ayuda AE01-111, Acción Especial OCYT de la Generalitat Valenciana. La autora ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

A mi familia

A Carlos

A Pablo, ese pequeño que llevo dentro y que todavía no conozco

AGRADECIMIENTOS

Como comenzar a agradecer a todas las personas que han estado a mi alrededor y me han apoyado durante todo este tiempo, esa gente que ha hecho que haya sido un placer venir día a día a trabajar...

En primer lugar quiero dar las gracias a Domingo, mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, por sus explicaciones, sus ideas y por todo lo que he aprendido en estos años.

A todos los compañeros que han compartido horas de laboratorio conmigo, por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos y por ser amigos además de compañeros. Gracias a mis primeras compis del labo, Gracia y Rosa, por ser tan increíbles y verdaderas amigas. Y que decir de las alegrías y penas que hemos compartido juntas en todos estos años, tanto dentro como fuera del labo. A los que llegaron después; a Anita por llenar de vida el laboratorio y por seguir disfrutando de su amistad. A Paloma, por sus consejos, su ejemplo de dedicación y por hacerme sentir tan a gusto en el labo. Hugo, tu amistad ha sido muy importante y especial para mí, gracias por tu cariño. A Eva y Christine, por ser tan buenas compañeras. A Dani, por su ánimo en todo momento y por tantos ratos y conversaciones divertidas en el laboratorio. A Carlos por su escandaloso buen humor, por las cervecitas y por los “xoxets”. Y como no a mis compis de ahora, Emilio, Juanma y Salva, por su ayuda en esta recta final de la tesis. Gracias a todos, ha sido una suerte tener unos compañeros de laboratorio como vosotros.

A mis vecinos del tercero, Leo, Sandra, Clara, Mariano, Jose, Lidia, MC, Leda, Rosa, M^aCarmen, Dani, Ada y Jose, por todos esos almuerzos, comidas, risas y buenos momentos compartidos. A Fer por tantos ratos divertidos, por su apoyo incondicional y por estar siempre ahí. Y como no, gracias a mis compis del cuarto, Ana, Anetxu, Salo, JM y Jordi con quienes he compartido muy buenos momentos tanto dentro como fuera del instituto, con esas birris, cenitas, y escapadas.

A las chicas de administración, en especial a M^aLuz, no sólo por su ayuda a nivel de papeleo, sino por esas visitillas a cualquier hora para desconectar. A Nachín por ser como es y por su cariño a lo largo de estos años. A Yoli, por tantas y tantas meriendas y charlas juntas. Y en general, a todos los compañeros del IBV que me

han acompañado en estos años de tesis, por vuestra ayuda y por todas esas sonrisas y esos “holas” que hemos intercambiado por los pasillos.

A todos los que, de una u otra manera, me han ayudado en tantos experimentos de la tesis; al Dr. Toni Díez, por enseñarme y ayudarme con las infecciones; a Gema y María por esos magníficos clonajes; al Dr. H. Gronemeyer, Dra. A. C. Carrera, Dr. P. Crespo, Dra. C. Gallego y Dra. T. Iglesias, por las líneas celulares, anticuerpos y plásmidos que tan amablemente nos han cedido y al Dr. A. R. de Lera, Dr. R. Alvarez, Dr. M. J. Vega y S. Alvarez por todos esos retinoides sintetizados y otros compuestos suministrados.

A todos mis amigos no científicos que, aunque la han vivido un poco más lejos, siempre han mostrado su sincera preocupación por el estado de mi tesis. Y como no, gracias a mi familia que siempre se preocupó por intentar comprender algo de lo que hacía y nunca perdió el interés en escucharme; gracias por todo vuestro apoyo a lo largo de toda mi vida. Y por último, y no por eso menos importante, quiero agradecer a la persona que ha estado a mi lado cada día, que da sentido a mi vida y que es la razón de esto y de todo lo demás. Muchas gracias Carlos. Gracias por tantos buenos momentos compartidos durante estos años, y por todos los que nos quedan juntos. Te quiero.

A todos ellos, GRACIAS.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. La Vitamina A y el Ácido Retinoico	3
1.1 Función biológica de la Vitamina A	3
1.2 Absorción de Vitamina A y síntesis de ácido retinoico	3
1.3 Mecanismo de acción del ácido retinoico	5
1.4 El ácido retinoico como molécula señalizadora	6
1.4.1 Desarrollo embrionario	6
1.4.2 Efectos morfogénéticos	6
1.4.3 Diferenciación neuronal	7
1.4.4 Vitamina A y cáncer	8
2. Receptores Nucleares	10
2.1 Generalidades	10
2.2 Clasificación de los receptores nucleares	11
2.3 Características estructurales	12
2.3.1 Dominio A/B	12
2.3.2 Dominio C o de unión a DNA	13
2.3.3 Dominio D	14
2.3.4 Dominio E o de unión al ligando	15
2.3.5 Dominio F	16
2.4 Elementos de respuesta a hormona	16
2.5 Receptores de retinoides	17
2.6 Regulación transcripcional por los receptores nucleares	18
2.6.1 Mecanismos dependientes de los HRE	20
2.6.1.1 HRE positivos	20
2.6.1.2 HRE negativos	21
2.6.2 Mecanismos independientes de los HRE	22
3. El Ácido Retinoico en neuroblastoma	23

4. Mecanismos no genómicos de acción hormonal	25
4.1 Efectos no genómicos de las hormonas	25
4.2 Efectos no genómicos de los retinoides	27
4.3 Vías de señalización intracelular implicadas en supervivencia y diferenciación neuronal	28
4.3.1 Descripción de la vía PI3K/AKT	28
4.3.2 Descripción de la vía MAPK	30
II. <u>OBJETIVOS</u>	31
III. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	35
1. Productos	37
2. Cultivos celulares	37
2.1 Material	37
2.2 Líneas celulares	38
2.3 Tratamientos	39
2.4 Mantenimiento y congelación de las células	40
3. Plásmidos, clonajes y subclonajes	41
3.1 Plásmidos	41
3.2 Clonajes y subclonajes	43
4. Ensayos de transfección	44
4.1 Transfecciones transitorias	44
4.1.1 Precipitación con fosfato cálcico	44
4.1.2 Electroporación	45
4.2 Transfecciones estables	45
4.2.1 Preparación de retrovirus recombinantes	45
4.2.2 Infección de células NIH-3T3	46

5. Análisis de RNA mediante northern blot	46
5.1 Extracción de RNA	46
5.2 Electroforesis y transferencia	47
5.3 Marcaje de la sonda	47
5.4 Hibridación y lavado de membranas	47
5.5 Autorradiografía	48
6. Obtención de proteínas nucleares	48
7. Análisis de proteínas mediante western blot	49
7.1 Obtención de extractos de proteínas	49
7.2 Geles de acrilamida y transferencia a membrana	49
7.3 Bloqueo e incubación con los anticuerpos	50
8. Fraccionamiento subcelular	51
8.1 Aislamiento de membrana plasmática	51
8.2 Aislamiento de <i>lipid rafts</i>	52
9. Inmunoprecipitación	53
10. Ensayo de Actividad PI3-kinasa	55
11. Microscopía confocal	55
12. Análisis de la expresión de genes con chips de DNA	56
IV. RESULTADOS	57
1. Activación de la vía de señalización de PI3K/AKT y MAPKs ERK1/2 por RA a través de un mecanismo rápido no genómico en células SH-SY5Y	59
2. Activación de PI3K/AKT y fosforilación de las MAPKs ERK1/2 inducida por RA en fibroblastos NIH-3T3	61

3. Implicación del Receptor Nuclear RAR en la activación de PI3K/AKT	64
3.1 Ensayos de sobreexpresión	64
3.2 Ensayos farmacológicos	66
3.3 Ensayos con células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$) ^{L-/L-}	68
3.4 La actividad PI3K está asociada al receptor RAR en presencia de RA	70
4. El papel de la localización intracelular de RARα en la activación de la vía PI3K/AKT	71
4.1 Localización de RAR en la membrana plasmática mediante fusión al dominio de Miristilación de <i>c-Src</i>	71
4.2 La proteína de fusión <i>Myr-RARα</i> se localiza en microdominios de la membrana plasmática (<i>lipid rafts</i>)	72
4.3 La expresión dirigida de RAR α en la membrana plasmática incrementa la activación de la vía de señal PI3K/AKT	73
4.4 La unión de RA induce la translocación del receptor RAR γ a la membrana plasmática	74
4.5 Análisis de la localización intracelular de RAR mediante fusión con GFP y microscopía confocal	75
4.6 La desorganización del citoesqueleto afecta a la activación de PI3K/AKT por RA	76
5. Localización del dominio responsable de la activación de PI3K/AKT en el receptor nuclear RAR	78
5.1 El dominio C-terminal de RAR es necesario para la activación de la vía de señal PI3K/AKT	78
5.2 Mapeo por delección de la región de RAR implicada en la activación de la vía de señal de PI3K/AKT	79
6. Interacciones entre el receptor RARα y las subunidades de PI3K	81
6.1 Interacción entre RAR α y la subunidad reguladora p85 de PI3K	81

6.2 La asociación de p110 al complejo RAR-p85-PI3K es dependiente de ligando	83
6.3 La interacción entre p85-PI3K y RAR no parece ser directa	84
6.4 Ensayo de proteínas candidatas	85
7. Estudio de patrones de expresión génica mediante chips de DNA	88
 V. <u>DISCUSIÓN</u>	 101
1. La activación de la vía de señalización de PI3K/AKT y MAPKs ERK1/2 por RA se produce a través de un mecanismo rápido no genómico	103
2. Implicación del Receptor Nuclear RAR en la activación de la vía de PI3K/AKT	104
3. La unión de RA al receptor RAR promueve su translocación a la membrana plasmática	106
4. La región 206-282 del extremo C-terminal de RARα está implicada en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT	108
5. El receptor RARα interacciona con las subunidades de PI3K	108
6. Modelo para la activación de la vía de PI3K por RA	111
7. La respuesta transcripcional a RA integra tanto las acciones clásicas genómicas como las acciones atípicas no genómicas	113
 VI. <u>CONCLUSIONES</u>	 115
 VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	 119

ABREVIATURAS

AKT	Proteína kinasa B (PKB)
AMD	Actinomicina D
AR	Receptor de andrógenos
CDKs	Kinasas dependientes de ciclinas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHX	Cicloheximida
CO₂	Monóxido de carbono
c-Src	Tirosina kinasa citoplasmática
DBD	Dominio de unión a ADN
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
E₂	17β-Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(B-aminoetiléter)-N,N,N',N'tetra-acético
ER	Receptor de estrógenos
ERK	Kinasa de regulación extracelular
FBS	Suero fetal bovino
GDNF	Factor neurotrófico de origen glial
GR	Receptor de glucocorticoides
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina N'(2-etanosulafanílico)
HRE	Elemento de respuesta a hormona
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
JNK	Kinasa amino terminal de c-jun
LBD	Dominio de unión a ligando
NFκB	Factor de transcripción nuclear κB

Abreviaturas

MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
NCS	Suero de ternera recién nacida
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PIP	Fosfatidil-Inositol-3-Fosfato
PKA	Protein kinasa A
PMSF	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisoma
9-cis RA	Ácido 9-cis-retinoico
13-cis RA	Ácido 13-cis-retinoico
RA	Ácido todo-trans retinoico
RALDH2	Enzima retinaldehído deshidrogenasa-2
RAR	Receptor de ácido retinoico
RARE	Elemento de respuesta a ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	ARN mensajero
RNasa	Riboendonucleasa
RXR	Receptor del retinoide X
SDS	Dodecilsulfato sódico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SNP	Sistema nervioso periférico
T3	3-5-3'-L-triyodotironina
T4	L-tiroxina
TAE	Tampón tris-acético
TBE	Tris-borato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TR	Receptor de hormona tiroidea
VDR	Receptor de vitamina D

Introducción

1. LA VITAMINA A Y EL ÁCIDO RETINOICO

1.1 Función biológica de la Vitamina A

La primera vitamina que se descubrió fue la Vitamina A. En 1913, Davis y Mc Collum y casi al mismo tiempo Osborn y Mendel, observaron que una sustancia contenida en la mantequilla y en la yema de huevo era indispensable para el crecimiento y desarrollo normal de las ratas. Durante los años veinte, se llegó a establecer bien la importancia de su papel biológico. Se hallaron fuentes más ricas de vitamina A, como el aceite de hígado de halibut. Steenbock y Coward demostraron que el β -caroteno, componente normal de las plantas, puede reemplazar en la dieta a la vitamina A. En 1930, Moore demostró la conversión del β -caroteno en vitamina A en las ratas. Se estableció entonces el papel de ciertos carotenoides como provitaminas A. En 1931, Karrer propuso las fórmulas estructurales de ambos compuestos y en 1937 se aisló por primera vez la vitamina A en su forma cristalina. Isler sintetizó en 1947 la vitamina en forma pura cristalina, mientras que el β -caroteno fue sintetizado por primera vez en 1950.

1.2 Absorción de Vitamina A y síntesis de ácido retinoico

La vitamina A o retinol se incorpora en el organismo por la ingesta tanto de productos de origen animal, en forma de retinol y de ésteres de retinol, como de origen vegetal en forma de carotenoides. Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen del intestino delgado a retinol, el cual junto con el retinol proveniente de la dieta y emulsionado con sales biliares y ácidos grasos libres es captado por los enterocitos. Por otro lado los carotenoides, entre los que destaca el β -caroteno como más activo, se absorben por difusión pasiva en el interior del enterocito donde son convertidos en retinol.

Parte de este retinol o vitamina A es destinado a la retina en forma de 11-cis-retinal, donde juega un importante papel en el ciclo visual. Pero nuestro

interés en la vitamina A se centra en su destino hacia la síntesis de ácido retinoico (RA) (Figura 1). La formación de este compuesto, a partir de retinol, implica dos etapas de oxidación. La primera oxidación, de retinol a retinal, es reversible y está catalizada por dos familias de retinol deshidrogenasas. De la familia de alcohol deshidrogenasas (ADH) se han descrito 5 isoformas, siendo la ADH3 la más importante, y las dehidrogenasa-reductasas de cadena corta (SDR) constan de 8 isoformas, siendo la DHRS3, la más importante. El retinaldehído entonces es convertido a su forma activa, el RA, por las aldehído deshidrogenasas (ALDH), siendo la RALDH2, la más importante durante el desarrollo embrionario.

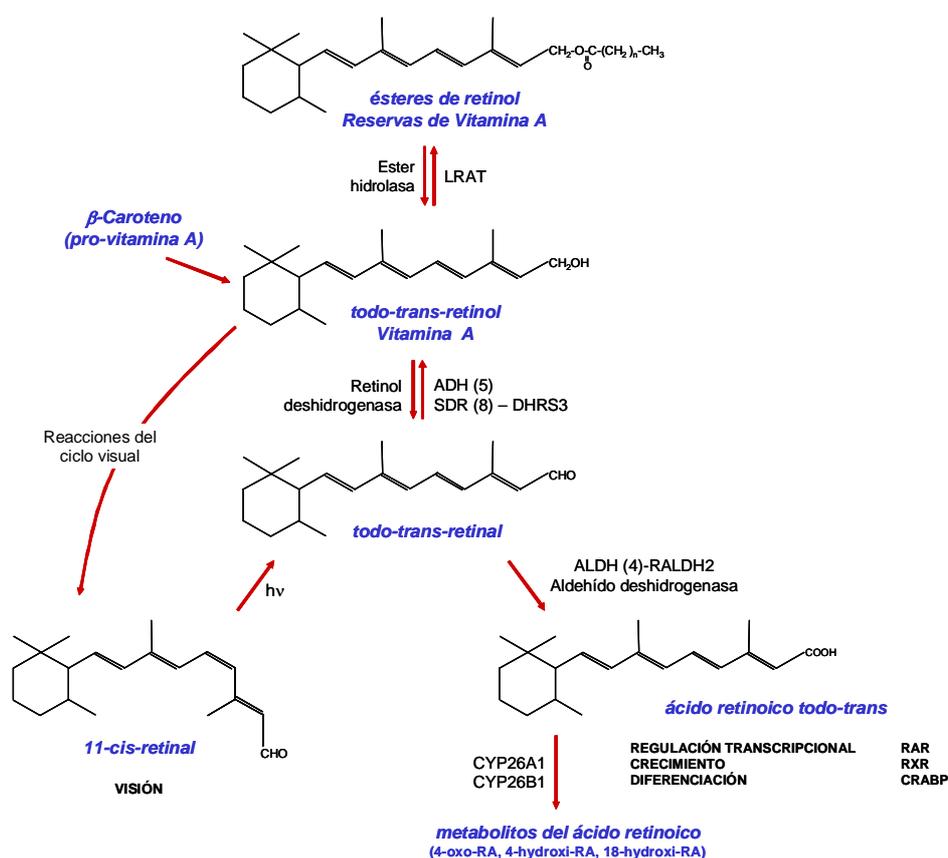


Figura 1. Síntesis de ácido retinoico a partir de Vitaminas A. Los animales no son capaces de sintetizar *de novo* los retinoides, siendo las principales fuentes de retinol en la dieta los carotenoides de los vegetales y las reservas de vitamina A de tejidos animales, en forma de ésteres de retinol.

Mientras que la primera etapa de conversión del retinol hacia retinal es ubícua, la etapa de la formación del RA a partir del retinal es restringida a ciertos tejidos que expresan el enzima. Es en estos tejidos y en los circundantes donde actuará en RA.

El RA interacciona con receptores nucleares (RARs y RXRs) para activar la expresión de genes de respuesta a RA, y con las proteínas celulares que unen RA o CRABPs. Dos enzimas de la familia citocromo P450, CYP26A1 y CYP26B1, metabolizan el RA a formas inactivas y susceptibles de degradación (Duester et al., 2003).

1.3 Mecanismo de acción del ácido retinoico

El ácido retinoico actúa fundamentalmente modificando a nivel transcripcional la expresión de sus genes diana, a través de la activación de los factores de transcripción dependientes de ligando, los receptores de ácido retinoico. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y se clasifican en dos subfamilias: los receptores de ácido retinoico RAR y los receptores X de retinoides RXR. En ambos casos, el receptor está codificado por tres genes α , β y γ , y se generan varias isoformas de cada uno: RAR α 1 y RAR α 2, RAR β 1, RAR β 2, RAR β 3 y RAR β 4, RAR γ 1 y RAR γ 2. Del mismo modo existen tres genes del receptor RXR, que codifican para RXR α , RXR β y RXR γ (Mark et al., 2006).

El ácido retinoico todo-trans es el ligando natural para el receptor RAR y el ácido retinoico 9-cis es el ligando natural del receptor RXR (Mark et al., 2006). La manera de actuar de los receptores es por medio de la formación de heterodímeros (RAR/RXR) que reconocen secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE).

La respuesta celular al ácido retinoico puede estar regulada a varios niveles, como son: a) la ingesta de retinol de la sangre, b) la participación de enzimas que convierten el retinol a ácido retinoico, c) la presencia de receptores RAR y RXR, y d) la colaboración de reguladores y represores que interactúan con RAR y RXR.

1.4 El ácido retinoico como molécula señalizadora

Los retinoides juegan un importante papel como reguladores fisiológicos de un gran número de procesos biológicos, como desarrollo embrionario, visión, reproducción, diferenciación, proliferación y apoptosis (para revisión (Sun y Lotan, 2002)). Sin embargo, son tóxicos cuando se toman en exceso y pueden provocar pérdida de peso y apetito, irritabilidad, disfunciones renales o dolores de huesos y articulaciones.

1.4.1 Desarrollo embrionario

La vitamina A y sus derivados (los retinoides) son esenciales para el desarrollo embrionario, así como para la homeostasis en el organismo adulto (para revisión (Mey y McCaffery, 2004; Lane y Bailey, 2005)). Ya en los años treinta, se descubrió que un déficit materno de vitamina A producía importantes anomalías y malformaciones congénitas que ocasionaban la muerte del feto (Mason, 1935). Posteriormente Wilson y colaboradores definieron anomalías congénitas resultantes de un déficit de vitamina A durante el período de gestación (Wilson et al., 1953; Thompson et al., 1969). Un déficit de ácido retinoico en el desarrollo embrionario produce importantes anomalías en el sistema cardiovascular, en el sistema urogenital, en el sistema respiratorio, en la cabeza, en los ojos, en el sistema nervioso central, en órganos hematopoyéticos y en el tronco (Dersch y Zile, 1993; Twal et al., 1995; Maden et al., 1996; Maden et al., 1998; Zile, 1998). Además la vitamina A desempeña un importante papel como agente protector del daño oxidativo en mitocondrias (Barber et al., 2000). Por otro lado, un exceso de vitamina A, también produce teratogénesis (McCaffery et al., 2003).

1.4.2 Efectos morfogenéticos

El ácido retinoico (RA) desempeña un papel fundamental como regulador de la diferenciación durante la embriogénesis de los vertebrados (Gudas, 1994;

Conlon, 1995; Means y Gudas, 1995; Durston et al., 1997; Irving et al., 1998; Niederreither et al., 1999; Ross et al., 2000).

La importancia de la forma activa de la vitamina A en el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso está demostrada por el hecho de que la exposición a un exceso de retinoides durante las primeras etapas del desarrollo, produce anomalías en el cerebro y en las células derivadas de la cresta neural (Morriss-Kay et al., 1991). Además, se han descrito estas alteraciones en las estructuras a las que contribuyen las células de la cresta neural en embriones humanos expuestos a un exceso de RA en útero en estadios tempranos del desarrollo (Lammer et al., 1985).

El RA actúa fundamentalmente en la determinación de los ejes de polaridad en el embrión. Estudios en *Xenopus laevis* revelan que el RA media una transformación anteroposterior en el sistema nervioso central en desarrollo (Durston et al., 1989). Por otro lado, la exposición a dosis teratogénicas de RA en embriones murinos causa transformaciones homeóticas en las que ciertas estructuras del sistema nervioso desaparecen o se modifican (Kessel y Gruss, 1991). Estudios en pollos muestran que la aplicación ectópica de RA altera la formación de las extremidades (Izpisua-Belmonte et al., 1991).

La enzima retinaldehído deshidrogenasa-2 (RALDH2) es una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD con una alta especificidad por el sustrato retinaldehído. Su patrón de expresión durante el desarrollo murino ha sugerido que puede ser responsable de la síntesis de RA en el embrión. Se han hecho estudios con ratones knock-outs deficientes en RALDH2 que ponen de manifiesto la necesidad de esta enzima para la supervivencia y morfogénesis temprana del embrión (Niederreither et al., 1999).

1.4.3 Diferenciación neuronal

El RA, además de su importancia en la morfogénesis del sistema nervioso, tiene un papel en la regulación de la diferenciación de neuronas durante el desarrollo (Díez del Corral y Storey, 2004; Maden, 2002; Appel y Eisen, 2003).

Así, el RA aumenta la neuritogénesis en cultivos primarios de neuronas de la médula espinal (Wuarin y Sidell, 1991) y es capaz de diferenciar hacia fenotipo neuronal algunas líneas celulares establecidas de carcinoma embrionario (Jones-Villeneuve et al., 1982; Andrews, 1984). La diferenciación está acompañada de cambios en la expresión de genes implicados en diferenciación y proliferación (Miller et al., 1990). Por otra parte, se ha descrito que células madre embrionarias se pueden diferenciar en presencia de RA adquiriendo un fenotipo neuronal (Slager et al., 1993; Bain et al., 1994; Bain et al., 1995).

El RA también es capaz de inducir diferenciación neuronal en algunas líneas derivadas de neuroblastomas humanos. En estas células procedentes de tumores con origen en la cresta neural, el RA produce una parada de la proliferación en la fase G1 del ciclo celular (Thiele et al., 1985). La detención del crecimiento es debida a un incremento de los niveles de p27 y una inhibición de kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Matsuo y Thiele, 1998; Hsu et al., 2000; Matsuo et al., 2001).

1.4.4 Vitamina A y cáncer

La relación entre la Vitamina A y el desarrollo del cáncer se estableció en 1925, cuando Wolbach y Howe observaron el efecto de inhibición de la deficiencia de vitamina A sobre la proliferación y diferenciación de células epiteliales (Wolbach y Howe, 1925). En 1978 Strickland y Mahdavi demostraron que el ácido retinoico podía inducir diferenciación de células de teratocarcinoma *in vitro* e *in vivo* (Strickland y Mahdavi, 1978). Al mismo tiempo, se observó que los retinoides inhibían el crecimiento de células tumorales en cultivo (Lotan y Nicolson, 1977), y producían la diferenciación de células de pacientes con leucemia promielocítica (Breitman et al., 1980).

Mediante estudios epidemiológicos se ha establecido una relación inversa entre los niveles en plasma o ingesta de vitamina A/ β -caroteno y desarrollo de diversos tipos de cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello (Niles, 2004). Una

terapia combinada empleando retinoides y otros agentes en quimioprevención puede ser una atractiva estrategia farmacológica (Hong y Sporn, 1997).

El RA también se utiliza para el tratamiento de leucemias promielocíticas (Soprano et al., 2004) y ha mostrado ser eficiente en el tratamiento de desórdenes de la piel como el acné quístico, psoriasis y otras dermatosis queratinizantes (Windhorst, 1982; Camisa, 1995; Fisher y Voorhees, 1996). El RA se emplea en cosmética para evitar el envejecimiento de la piel por su carácter regulador de la homeostasis de la piel y su capacidad de protección contra los daños producidos por la luz UV (Epstein, 1981; Epstein y Grekin, 1981; Kligman et al., 1984; Chaqour et al., 1997; Tsukahara et al., 1999). Estudios *in vitro* han mostrado la actividad quimiopreventiva de los retinoides en células del epitelio bronquial humano, debido a una parada en el ciclo celular, concretamente en la fase G1, ocasionada por una disminución en la expresión de ciclinas (Dragnev et al., 2003).

La quimioprevención con RA reduce el riesgo de carcinomas de pulmón, laringe, esófago y lengua en más del 50%. El tratamiento de estos tipos de cáncer se lleva a cabo aumentando la dosis de retinoico endógeno mediante el bloqueo de agentes catabolizantes como el citocromo p450. Se emplean agentes bloqueantes del metabolismo del RA (RAMBAs) como es el Liarozole (Miller, 1998). La importancia que tiene el uso de RA en quimioprevención y/o tratamiento del cáncer radica en su capacidad para producir diferenciación y apoptosis. A pesar de las evidencias sobre las propiedades antioxidantes, hay que tener en cuenta que el β -caroteno fue ineficaz como quimioprevención del cáncer de pulmón durante el ensayo de Eficacia de Caroteno y Retinol (CARET) (Omenn et al., 1996) y el Estudio Alfa Tocoferol, Beta Caroteno (ATBC) (Virtamo et al., 2003). Estos estudios pusieron de manifiesto que el β -caroteno, no sólo no protege a los fumadores del cáncer de pulmón, sino que favorece su aparición. Los últimos datos al respecto revelan que, la exposición simultánea al estrés oxidativo y a los productos de transformación del β -caroteno en estos pacientes, favorece los efectos genotóxicos del estrés oxidativo (Alija et al., 2006).

2. LOS RECEPTORES NUCLEARES

2.1 Generalidades

Los receptores nucleares constituyen una superfamilia de factores de transcripción que regulan la expresión génica de forma dependiente de ligando, aunque algunos pueden hacerlo de forma independiente de ligando. Los miembros de la familia de receptores nucleares incluyen receptores para las hormonas esteroideas, tales como estrógenos (ER) y glucocorticoides (GR), así como receptores para hormonas no esteroideas, como la hormona tiroidea (TR), vitaminas como la 1,25-dihidroxi vitamina D (VDR) y el ácido retinoico (RAR y RXR) o receptores que se unen a diversos productos del metabolismo lipídico, tales como ácidos grasos o prostaglandinas (PPAR) (para revisión (Glass y Rosenfeld, 2000; Aranda y Pascual, 2001)). La familia de receptores nucleares, también incluye los llamados receptores huérfanos, cuyo ligando aún no ha sido identificado (Mangelsdorf y Evans, 1995; Giguere, 1999). Este tipo de receptores pueden estar regulados por mecanismos alternativos, tales como la fosforilación (Hammer et al., 1999; Tremblay et al., 2001).

Esta superfamilia de receptores nucleares engloba a más de 200 proteínas que participan en una gran variedad de procesos biológicos como crecimiento, desarrollo, homeostasis, diferenciación y morfogénesis. Los receptores nucleares modifican la transcripción de genes diana, en respuesta a señales extracelulares e intracelulares como hormonas, factores nutricionales... de naturaleza lipofílica. Las hormonas tiroideas (T3 y T4), los retinoides (derivados de la vitamina A) y el calcitriol (derivado hidroxilado en las posiciones 1 y 25 de la vitamina D3) son compuestos de naturaleza lipofílica y bajo peso molecular capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Dentro de la célula se convierten en formas biológicamente más activas uniéndose a su receptor nuclear. Estos receptores se unen a secuencias específicas de DNA, que se llaman elementos de respuesta a hormona (HRE), actuando como factores de transcripción y regulando directamente la expresión de genes diana específicos.

2.2 Clasificación de los receptores nucleares

Los receptores nucleares se clasifican en función de las características del ligando que reconocen, de dimerización y de las propiedades de unión al DNA (Mangelsdorf et al., 1995) (Figura 2).

Los receptores de clase I son los receptores de hormonas esteroideas, entre los que se encuentran los receptores de glucocorticoides, de progesterona, de mineralocorticoides y de estrógenos. En ausencia de ligando se encuentran en el citoplasma asociados a proteínas de choque térmico. La unión de la hormona libera el receptor, que se trasoca al núcleo. Se unen en forma de homodímeros a secuencias de DNA formadas por palíndromos.

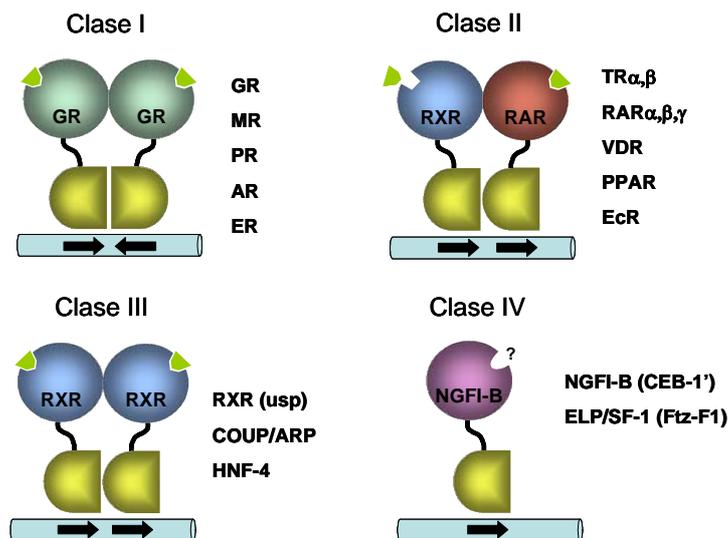


Figura 2. Clasificación de los receptores nucleares. Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares se clasifican en función de las características del ligando que reconocen, de dimerización y de las propiedades de unión al DNA.

Los receptores de clase II son los que heterodimerizan con el RXR (receptor del ácido 9-cis-retinoico), como los receptores de los activadores de peroxisomas (PPARs), los receptores de ácido retinoico (RARs), de hormonas

tiroideas (TRs), de vitamina D (VDRs) y algunos receptores huérfanos. Se unen principalmente a repeticiones directas de DNA que varían en número de nucleótidos espaciadores, aunque también pueden utilizar elementos organizados como palíndromos o palíndromos invertidos. En este grupo, la localización nuclear es independiente de la activación por parte del ligando.

Los receptores de clase III se unen a repeticiones directas de DNA como homodímeros y entre ellos se encuentran RXR y HNF-4 (factor nuclear de hepatocitos). Generalmente, activan o reprimen la transcripción de manera constitutiva.

Los receptores de clase IV se unen como monómeros a hexanucleótidos y activan la transcripción de manera constitutiva. NGFI-B (clon B inducido por NGF) pertenece a este grupo.

2.3 Características estructurales

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares son proteínas que presentan una organización modular, con un dominio central de unión a DNA o dominio C, que está muy conservado y que les caracteriza. En la zona N-terminal se encuentra el dominio A/B, región no conservada y de tamaño e importancia funcional muy variable. El extremo C-terminal engloba al dominio D o región bisagra, al dominio de unión al ligando (dominio E) y en algunos receptores al dominio F de función desconocida (Figura 3).

2.3.1 Dominio A/B

Esta región situada en el extremo amino terminal es muy variable en longitud y en secuencia, y contiene el dominio AF-1, implicado en la activación transcripcional independiente de ligando (Metzger et al., 1990; Nagpal et al., 1993). Aunque se sabe poco acerca del mecanismo molecular por el que el AF-1 inicia la transcripción, se ha observado que la fosforilación de determinados residuos se correlaciona con un aumento de la actividad independiente de ligando

de determinados receptores (Thompson y Evans, 1989). Así, se ha visto que los RARs y otros receptores pueden ser fosforilados por kinasas dependientes de ciclinas y que esta fosforilación es importante para la transactivación dependiente e independiente de ligando (Rochette-Egly, 2003).

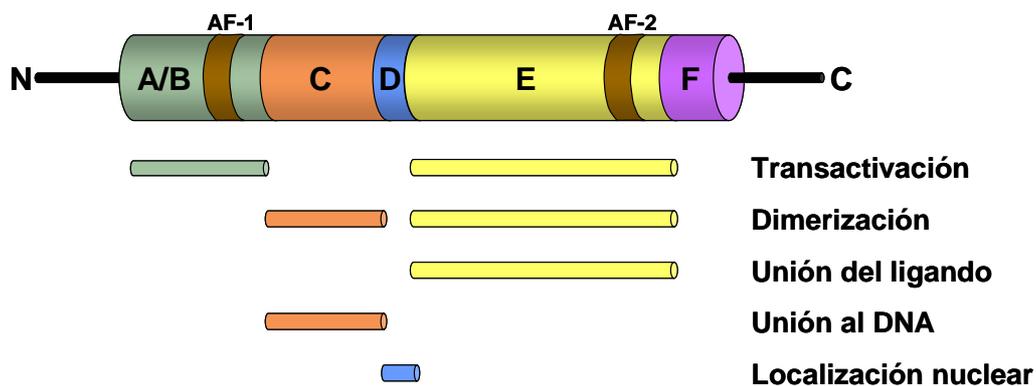


Figura 3. Estructura modular de los receptores nucleares y localización de sus principales funciones. Los receptores nucleares se dividen en seis regiones. La región C contiene el dominio de unión al DNA, las regiones E/F contienen el dominio de unión a ligando. Además existe una región de dimerización en el dominio de unión a ligando y dos dominios de transactivación (denominados AF-1 y AF-2).

2.3.2 Dominio C o de unión a DNA

El dominio de unión a DNA es la región más conservada entre los distintos miembros de la superfamilia de los receptores nucleares. Este dominio es el responsable de la unión de los receptores al DNA y también participa en la formación de dímeros. Está constituido por dos dedos de zinc formados por 60-70 aminoácidos y una extensión C-terminal (CTE) de unos 25 aminoácidos (Zechel et al., 1994). Cada dedo está constituido por un ión de zinc coordinado de forma tetraédrica por cuatro residuos de cisteína. En la base del primer dedo están los residuos necesarios para la unión con el DNA (caja P) y otros residuos en el segundo dedo forman la caja D involucrada en la dimerización (Luisi et al., 1991) (Figura 4).

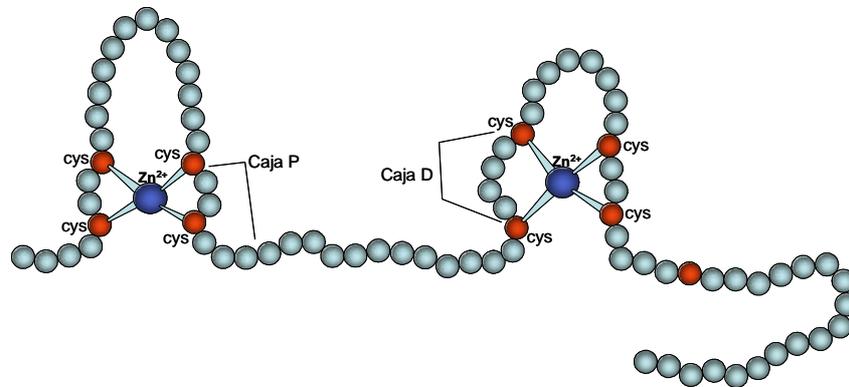


Figura 4. Dedos de Zinc de los receptores nucleares. En cada dedo de zinc existen cuatro cisteínas conservadas, que coordinan tetraédricamente un ión de Zn^{2+} . Los motivos de reconocimiento de la secuencia del DNA están presentes en la base del primer dedo de zinc, y se conocen con el nombre de caja P. Otros residuos de la base del segundo dedo de zinc constituyen la caja D, que está involucrada en la dimerización del receptor o median las interacciones proteína-proteína.

Los dos dedos se pliegan conjuntamente formando una estructura compacta constituida por dos hélices α dispuestas perpendicularmente entre ellas. La primera hélice se une al surco mayor del DNA estableciendo contactos con bases específicas. Finalmente la CTE forma una tercera hélice, la cual está empaquetada con la hélice 1 y también está involucrada en la unión con el DNA (Glass y Rosenfeld, 2000).

2.3.3 Dominio D

Este dominio actúa como bisagra entre el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al ligando proporcionando flexibilidad en la disposición de ambos sobre los elementos de respuesta. Esta región del receptor nuclear es altamente variable tanto en longitud como en secuencia. Contiene la señal de localización nuclear y la denominada caja A, que estabiliza el receptor sobre el DNA contactando con nucleótidos adicionales fuera del hemisitio consenso y extiende la secuencia de reconocimiento (McBroom et al., 1995).

2.3.4 Dominio E o de unión al ligando

El dominio de unión al ligando es el responsable de la unión al ligando así como de la formación de dímeros, de la unión a cofactores y de la transactivación dependiente de ligando. Contiene las superficies de dimerización y la región AF-2, altamente conservada en el extremo C-terminal y con capacidad autónoma para activar la transcripción dependiente de ligando (Danielian et al., 1992; Nagpal et al., 1993; Baretino et al., 1994; Durand et al., 1994). El LBD está formado por unos 250 aminoácidos, los cuales tienen una estructura secundaria compuesta por 12 hélices α (H1 a H12) y un giro β entre las hélices H5 y H6. El LBD se pliega en forma de tres capas de hélices antiparalelas empaquetadas. Este plegamiento origina una cavidad o bolsillo hidrofóbico donde se acomoda el ligando (Wurtz et al., 1996; Moras y Gronemeyer, 1998).

La comparación de las estructuras de los holo (unido a ligando) y apo-LBD (vacío) receptores ha permitido proponer un modelo en el cual la unión del ligando induce cambios conformacionales en el LBD de los receptores nucleares, permitiendo la unión de coactivadores (Renaud et al., 1995). En el caso del receptor no ligado a hormona, la hélice anfipática, que contiene la región AF-2, se proyecta hacia el exterior del cuerpo del LBD (Figura 5).

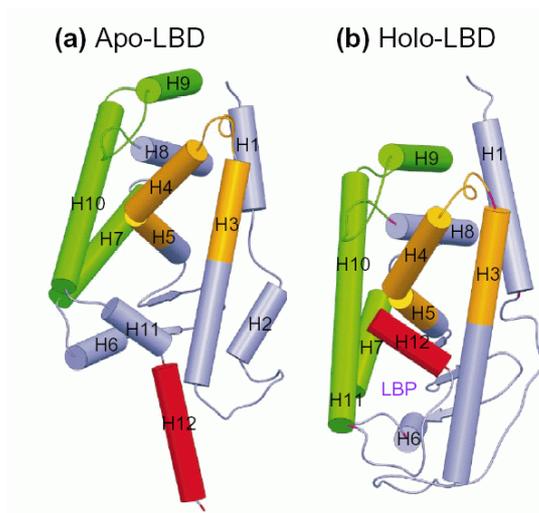


Figura 5. Esquema de dos estados conformacionales del dominio de unión al ligando (LBD) del receptor nuclear. (a) LBD del apo-RXR no unido a ligando. (b) LBD del holo-RAR unido a ligando. Las diferentes regiones del LBD están coloreadas dependiendo de su función: la superficie de dimerización está de color verde, el sitio de unión de coactivadores y correpresores, de color naranja y la hélice H12, donde está situada la región AF-2, está de color rojo; otros elementos estructurales se muestran de color malva. (Bourguet et al., 2000).

Tras la unión del ligando la estructura se empaqueta más y se produce un cambio de conformación. Ello sugiere una función estructural del ligando en la configuración de la superficie de contacto proteína-proteína del LBD.

2.3.5 Dominio F

Este dominio está ausente en el receptor RXR, y todavía se desconoce su papel en el receptor RAR. Sin embargo, este dominio está fosforilado (Rochette-Egly et al., 1997; Bastien et al., 2000) y se postula que podría estar modulando los dominios de activación AF-1 y AF-2 como en el caso del receptor de estrógenos (Montano et al., 1995; Metivier et al., 2002).

2.4 Elementos de respuesta a hormona

Las secuencias de DNA a las que se unen los receptores nucleares para regular la transcripción de sus genes diana específicos se denominan elementos de respuesta a hormona o HRE y se localizan habitualmente en el promotor. Los HRE están compuestos por un núcleo o hexámero de bases que constituye el motivo de reconocimiento por los receptores nucleares, conocido como hemisítio.

Han sido identificados dos motivos consenso: la secuencia AGAACA, que es reconocida preferentemente por los receptores de esteroides, y la secuencia AGGTCA, que sirve como motivo de reconocimiento para el resto de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares.

La especificidad de reconocimiento y la actividad transcripcional mediada por los componentes de esta superfamilia vienen determinadas por pequeñas diferencias en la secuencia y orientación de los hemisítios, en el número de nucleótidos que conforman la secuencia espaciadora o en las características de la región adyacente a los elementos. En los HRE los hemisítios pueden estar dispuestos como palíndromes (PAL), palíndromes invertidos (IP) o repeticiones directas (DR) (Figura 6).

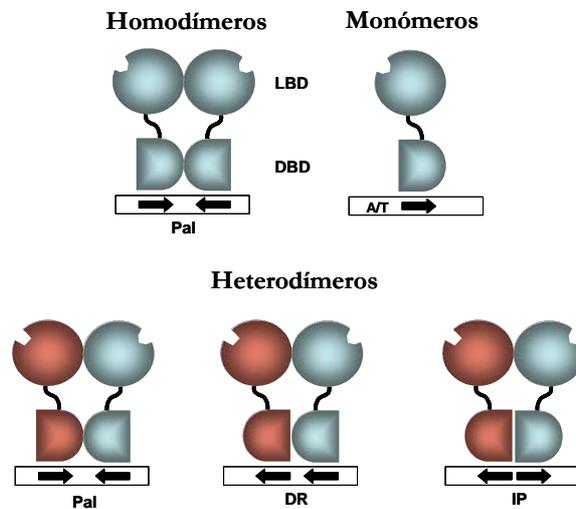


Figura 6. Unión de los receptores nucleares a los elementos de respuesta a hormona (HREs). Los receptores pueden unirse al DNA como monómeros, homodímeros o heterodímeros con RXR.

La mayoría de receptores nucleares se unen al DNA formando diferentes tipos de dímeros. Los receptores de esteroides se unen al DNA formando homodímeros, los cuales reconocen HRE configurados de forma palindrómica. Los receptores nucleares que forman heterodímeros, la mayoría lo hacen utilizando RXR como pareja, aunque hay excepciones. Gran parte de los heterodímeros con RXR se unen al DNA mediante HRE configurados en forma de repeticiones directas, en los que el número de nucleótidos que separan los dos núcleos hexaméricos es clave para la discriminación de las secuencias por los diferentes heterodímeros. En el caso de la unión a DNA como monómeros, residuos de la extensión C-terminal realizan uniones adicionales con bases en 5' de la secuencia de reconocimiento, aumentando así la especificidad de la unión.

2.5 Receptores de retinoides

Hay dos tipos de receptores retinoides: receptores de ácido retinoico (RAR), a los cuales se unen el ácido retinoico todo-trans (RA) y el ácido retinoico 9-cis (9CRA) con afinidad similar, y los receptores de retinoide X (RXR), que unen

9CRA. Existen tres subtipos diferentes de RAR y de RXR: α , β y γ , que son codificados por genes diferentes y muestran patrones de expresión específicos de cada tejido y etapa del desarrollo. Para cada subtipo existen dos o más isoformas generadas por la utilización de promotores alternativos o por *splicing* diferencial. Los RAR y RXR se expresan prácticamente por todo el organismo en el embrión y en el adulto (para revisión, (Lane y Bailey, 2005)).

El RAR α se expresa de manera ubicua, mientras que RAR β y RAR γ presentan un patrón de expresión que varía en función del tejido y etapa del desarrollo. Del mismo modo, RXR β se expresa de manera ubicua, mientras que RXR α y RXR γ tienen un patrón más restringido. La acción del ácido retinoico puede ser regulada a nivel de expresión de RAR y RXR, y se ha visto que la expresión de algunos de estos receptores es regulada por los propios retinoides. Los RXRs pueden formar homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares; por el contrario, los RARs únicamente pueden formar heterodímeros con RXRs, los cuales en presencia de ligando, se unen a promotores de genes diana, modulando su transcripción (para revisión, (Sun y Lotan, 2002)).

2.6 Regulación transcripcional por los receptores nucleares

Existen diversos mecanismos por los cuales los receptores nucleares regulan la expresión génica. Estos mecanismos, que pueden ser dependientes o independientes de la unión de los receptores a los elementos de respuesta a hormona (HRE), conllevan a una activación o represión de la transcripción de dichos genes.

Se ha propuesto un mecanismo de acción molecular del RA en el que en ausencia de ligando (apo RAR-RXR), el heterodímero estaría unido a correpresores (NCoR y SMRT), que forman parte de complejos con actividad desacetilasa de histona (HDAC), por lo que la cromatina alrededor de los promotores blanco del RA, está enriquecida en histonas desacetiladas, es más compacta y está silenciada (McKenna et al., 1999). La llegada de un ligando

agonista, media un cambio alostérico en el dominio de unión al ligando (holo RAR-RXR). La hélice 12 del extremo C-terminal del receptor gira y permite la formación de una superficie de unión de coactivadores como los complejos TRAP/DRIP/SMCC, complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, y complejos con actividad acetilasa (HAT) y metilasa (HMT) de histonas. Por lo tanto, la unión del ligando causará una descondensación de la cromatina que permite la entrada de la maquinaria de transcripción basal y la consiguiente desrepresión transcripcional (Freedman, 1999) (Figura 7).

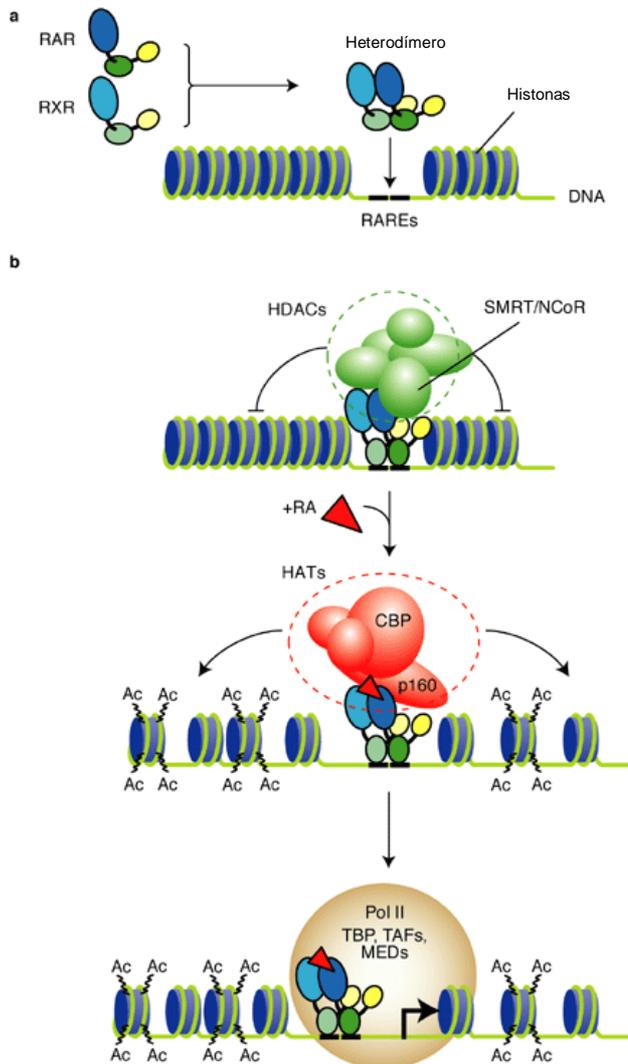


Figura 7. Modo de acción de los heterodímeros RAR-RXR. **a)** Los receptores de ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoide X (RXRs) forman heterodímeros que se unen a la región reguladora de los genes a través de los elementos de respuesta a retinoico (RAREs). **b)** En ausencia de ligando, los heterodímeros RAR-RXR están unidos a los RAREs de los genes diana junto con correpressores transcripcionales que reclutan histona deacetilasas. La unión del ligando induce la liberación del complejo HDAC y la unión de coactivadores como CBP y p160. La consecuente descondensación de la cromatina es necesaria pero no suficiente. Como último paso, se reclutan la RNA polimerasa junto con otras proteínas, activándose la transcripción. Adaptado de Clarke (Clarke et al., 2004).

2.6.1 Mecanismos dependientes de los HRE

2.6.1.1 HRE positivos

La activación de la transcripción por parte de los receptores nucleares requiere como último paso el reclutamiento de la RNA plimerasa II al promotor de los genes diana, modificación de nucleosomas y remodelación de la cromatina (Smith y O'Malley, 2004). Esto acontece mediante la formación del complejo de iniciación de la transcripción a través de los factores generales de la transcripción (GTFs), y la acción general de proteínas correguladoras facilita o se encarga de la comunicación entre el receptor nuclear y la maquinaria transcripcional (Chen et al., 1999; Malik y Roeder, 2000). Según el efecto que produce sobre la transcripción, se distinguen dos clases de proteínas reguladoras, los correpresores y los coactivadores.

Los **correpresores** son proteínas accesorias que interaccionan con los receptores nucleares, en ausencia de ligando o en presencia de antagonistas, mediando la represión de la transcripción de genes con HRE positivos. Mediante ensayos de interacción de doble híbrido en levaduras se identificaron 2 proteínas correpresoras que interaccionaban con receptores nucleares en ausencia de ligando, SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*) y N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) (Chen y Evans, 1995; Horlein et al., 1995). Estas proteínas correpresoras reclutan complejos multiproteicos que contienen desacetilasas de histonas (HDACs). Estos complejos promueven la condensación de la cromatina, haciéndola menos accesible a la maquinaria basal de transcripción y produciendo por tanto una inhibición de la transcripción. Tras la unión del ligando, el receptor cambia su conformación y las proteínas correpresoras son liberadas (Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995; Perissi et al., 1999) permitiendo así el reclutamiento de los coactivadores y la activación de dicha transcripción. Además de este control positivo, los receptores nucleares son capaces de reprimir determinados genes en respuesta al ligando (genes regulados negativamente), mecanismo del que se conoce menos que en el caso de genes inducidos.

Los **coactivadores** son proteínas capaces de potenciar la actividad de los receptores nucleares remodelando la estructura de la cromatina así como reclutando la maquinaria basal de transcripción. Al contrario de los correpresores, la interacción de los coactivadores con los receptores nucleares requiere la unión del ligando. Existen varios tipos de coactivadores: complejos remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP (SWI/SNF, BGR/hBrm), coactivadores con actividad acetiltransferasa de histonas (p/CAF, CBP/p300, p160/SRC y TAF_{II}250), y los complejos tipo TRAP/DRIP/ARC que son reclutados de modo dependiente de ligando por los receptores a través de la subunidad TRAP220 y que pueden jugar un papel en el reclutamiento de la RNA polimerasa II al promotor diana (Lefebvre et al., 2005).

Una característica estructural de la mayoría de los coactivadores es que presentan un motivo altamente conservado LXXLL (donde L es leucina y X es cualquier aminoácido) implicado en su reclutamiento por la región de transactivación AF-2 del dominio de unión a ligando de los receptores nucleares (Bastien y Rochette-Egly, 2004).

2.6.1.2 HRE negativos

A través de la unión a HRE negativos, los receptores nucleares pueden regular negativamente la transcripción de genes de una forma dependiente de ligando. Una característica común de estos elementos es que el receptor vacío estimula la transcripción y la unión del ligando revierte dicha activación. A pesar de que todavía no se han esclarecido los mecanismos implicados en este tipo de regulación, parece que la localización del elemento juega un importante papel. Generalmente, los HRE negativos están localizados muy próximos al sitio de iniciación de la transcripción, situándose algunos por debajo de la caja TATA o incluso en la región 3' no traducida del gen (Aranda y Pascual, 2001).

2.6.2 Mecanismos independientes de los HRE

Los receptores nucleares pueden modular la expresión de genes que no contienen HRE mediante la interferencia o “cross-talk” con otros factores de transcripción o rutas de señalización intracelular.

Una de estas interferencias es el hecho de que algunos receptores tales como TR, RAR o GR son capaces de inhibir, de una manera dependiente de ligando, la actividad de otra clase de factores de transcripción, entre los que se encuentran CREB (proteína de unión al elemento respuesta de AMPc), NFκB y el complejo AP-1. Los heterodímeros RAR-RXR en presencia de ácido retinoico, parece que reprimen la actividad de AP-1 (Jun/Fos) (Schule et al., 1991; Yang-Yen et al., 1991; Li et al., 1996). Fos y Jun son proteínas del componente AP-1 que a niveles elevados regulan negativamente la señal de los retinoides (Altucci y Gronemeyer, 2001). AP-1 regula gran cantidad de genes que aumentan la proliferación celular. Por el contrario, los retinoides generalmente inhiben la proliferación celular e inducen la diferenciación. Por tanto, se piensa que la interacción entre AP-1 y RAR-RXR provoca en las células un cambio de fenotipo proliferativo a diferenciado. El papel de AP-1 en la represión de la expresión génica mediada por retinoides en sistema nervioso de adulto todavía no se ha establecido (Lane y Bailey, 2005).

Otra conexión entre receptores nucleares y otras rutas de señalización se produce por la fosforilación de los propios receptores. De este modo múltiples quinasas activadas por señales extracelulares como las MAPKs, proteína quinasa A (PKA), caseína quinasas o quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) afectan la actividad de ciertos receptores nucleares (Rochette-Egly, 2003). Dependiendo del receptor y del residuo implicado, la fosforilación puede inhibir la activación dependiente de ligando de los receptores nucleares debido a una disminución de su afinidad por el ligando o el DNA. Sin embargo, en otros casos, la fosforilación activa a los receptores en ausencia de ligando.

3. EL ACIDO RETINOICO EN NEUROBLASTOMA

El neuroblastoma es un tumor derivado de las células de la cresta neural que emigran en el embrión para formar los ganglios simpáticos y la médula suprarrenal (Schor, 1999; Alexander, 2000). Puede tener, por tanto, diferentes localizaciones anatómicas, así como características clínicas muy variadas.

Se trata de la neoplasia en que se han demostrado más casos de regresión espontánea (Evans et al., 1976) y diferenciación a tumor benigno, mientras que en el otro extremo, presenta un comportamiento extremadamente agresivo, especialmente en niños mayores de un año con formas metastáticas (Castel et al., 2005). Si el tumor es prenatal, se puede diagnosticar mediante ecografía fetal (Jennings et al., 1993).

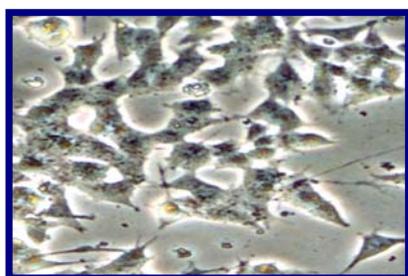
La incidencia del neuroblastoma oscila entre 8 y 10 casos por millón de niños y año. Es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia y supone más del 50% de los cánceres del lactante (Brodeur, 2002). La clasificación de los enfermos en grupos pronósticos ha permitido adaptar la intensidad del tratamiento al “riesgo”. Con el uso de la quimioterapia de inducción, cirugía y megaterapia con trasplante autólogo, la tasa de respuesta oscila entre el 60% y el 80% de todos los pacientes, pero muchos de ellos recaen posteriormente. Las recaídas son locales, pero sobre todo metastáticas y guardan relación con la persistencia de enfermedad residual mínima. Para intentar controlar este fenómeno se están utilizando agentes diferenciadores como los retinoides y anticuerpos monoclonales (para revisión, (Castel et al., 2005)).

Está establecido los efectos que presentan los retinoides sobre diferenciación celular de muchos tipos celulares, entre ellos, leucemia promielocítica (Breitman et al., 1981) y neuroblastoma (Sidell, 1982; Thiele et al., 1985; Reynolds et al., 1991). La diferenciación está caracterizada por alteraciones en morfología, actividad bioquímica y expresión génica. En células de neuroblastoma tratadas con ácido retinoico, estos cambios son similares a los que suceden en la maduración de células de la cresta neural (Tsokos et al., 1987), incluyendo inhibición de la proliferación, extensión de neuritas, formación de

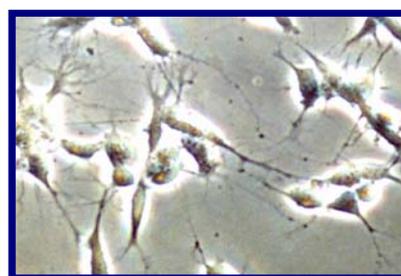
sinapsis con otras células distantes (Sidell et al., 1983), inducción de diversas proteínas específicas de neuronas (Reynolds y Maples, 1985; Melino et al., 1991; Hill y Robertson, 1997) y de genes asociados con ciclo celular, morfología celular y neurotransmisión (Matsuo y Thiele, 1998; Truckenmiller et al., 2001).

Esta capacidad del RA de inducir diferenciación ha permitido que actualmente se esté empleando con éxito, junto con análogos sintéticos, como agente terapéutico para tratar niños afectados de neuroblastoma, en combinación con quimio- y radioterapia (Reynolds et al., 2003). A pesar de que el tratamiento con RA ha demostrado que es capaz de incrementar la tasa de supervivencia libre de enfermedad de pacientes de neuroblastoma de alto riesgo de un 20% hasta algo más del 40% (Matthay et al., 1999), todavía no han sido establecidas las bases moleculares de estos efectos terapéuticos del RA.

Dado que las células de neuroblastoma diferenciadas *in vitro* presentan un fenotipo neural, tanto morfológicamente como funcionalmente, son consideradas como un modelo útil para estudiar las fases iniciales de la diferenciación neuronal (Pahlman et al., 1995; Encinas et al., 2000).



Línea celular de
Neuroblastoma SH-SY5Y



Células SH-SY5Y tratadas
con 1μM RA, 48h

Figura 8. Diferenciación neuronal inducida por RA en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano

4. MECANISMOS NO GENÓMICOS DE ACCIÓN HORMONAL

El mecanismo de acción hormonal clásico de los receptores nucleares es de tipo genómico. Las hormonas esteroideas se unen a receptores presentes en el núcleo o en el citoplasma, y a continuación se transloca el complejo receptor-ligando al núcleo con la consiguiente modulación de la transcripción y síntesis de proteínas. Este es un proceso de tipo genómico y es lento (>30 min.). Sin embargo, en los últimos años se han descrito acciones no genómicas mediadas por hormonas a través de sus receptores (Losel y Wehling, 2003; Simoncini y Genazzani, 2003; Levin, 2005). Estas acciones ocurren en pocos segundos o minutos después de la adición del agente y el uso de inhibidores de la transcripción del DNA como la actinomicina D o de la traducción como la cicloheximida, no son eficientes para inhibir las acciones de tipo no genómico. Las acciones no genómicas implican activación de rutas de señalización molecular, como activación de moléculas de señalización Src, que pueden estar o no mediadas por receptores hormonales. Muchos de estos efectos no genómicos implican a la fosfolipasa C, al calcio y pH intracelular, a la proteína quinasa C y tirosina kinasas.

4.1 Efectos no genómicos de las hormonas

Una acción típica no genómica es la producida por el estradiol sobre el sistema cardiovascular. En células endoteliales, el 17β -estradiol (E2) es un rápido activador de la síntesis de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Chambliss y Shaul, 2002). Esto provoca un aumento de los niveles de óxido nítrico (NO), el cual actúa como vasodilatador. Se ha demostrado que esta activación de eNOS por E2 se produce a través de la vía de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PIK3)/AKT, y que este efecto está mediado por su receptor ER mediante un mecanismo no genómico (Haynes et al., 2000; Simoncini et al., 2000; Hisamoto et al., 2001). Otra de las vías de señalización activadas por E2 es la vía MAPK. Se ha observado una rápida activación de Erk1/2 en células de neuroblastoma humano (Watters et al., 1997), en osteoblastos y en adipositos blancos (Endoh et al., 1997; Dos Santos et

al., 2002). Además en células MCF-7 y Caco-2 también se ha visto una rápida activación de las vías que implican a cSrc, MAPK y PI3K (Di Domenico et al., 1996; Migliaccio et al., 1996; Castoria et al., 2001).

La progesterona también produce acciones no genómicas mediante la activación de la vía de ERK/MAPK. En presencia de progesterona se ha observado una interacción directa entre al receptor de progesterona (PR) y el dominio SH3 de cSrc, la cual era necesaria y suficiente para la activación de cSrc y consiguiente activación de la vía ERK/MAPK. Además, este dominio de PR también interacciona con la subunidad reguladora p85 de PI3K y las kinasas Hck, Fyn y Crk (Boonyaratanakornkit et al., 2001). La progesterona también es capaz de activar la vía de c-Jun amino terminal kinasa (JNK), que desempeña un importante papel en la maduración de oocitos y en la embriogénesis en *Xenopus laevis* (Bagowski et al., 2001). Además de actuar sobre la transcripción génica, la regulación de la actividad de la cascada JNK constituye una alternativa mediante la cual esteroides y retinoides pueden controlar el destino celular y ejercer sus acciones farmacológicas como inmunosupresivos, anti-inflamatorios y antineoplásicos (Caelles et al., 1997).

Además de ER y PR, el receptor de andrógenos (AR) también regula la rápida activación de la vía de señalización MAPK, mediante la interacción con cSrc (Migliaccio et al., 2000). Esta activación de ERK1/2 inducida por andrógenos, quedaba bloqueada en presencia del inhibidor de Src PP1 (Kousteni et al., 2001).

Asimismo, se han descrito acciones rápidas de la aldosterona y la vitamina D3. La aldosterona produce un incremento de la resistencia vascular periférica y de la presión sanguínea en humanos tras la aplicación de 0.5 mg y en 3 minutos (Wehling et al., 1998). La $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-vitamina D}_3$ produce efectos rápidos sobre una gran variedad de sistemas, produce una rápida estimulación del transporte intestinal de calcio (Norman et al., 1997), así como una activación rápida de la proteína kinasa C (Wali et al., 1990; Sylvia et al., 1996; Sylvia et al., 1998) y la MAPK (de Boland y Norman, 1998; Song et al., 1998).

4.2 Efectos no genómicos de los retinoides

En los últimos años ha ido en aumento el interés por las acciones no genómicas de los retinoides y por los mecanismos a través de los cuales ejercen sus efectos. Al igual que para las hormonas esteroideas, concretamente los estrógenos, se ha visto una rápida activación de vías de señalización como las vías ERK y AKT/PKB, recientemente se han descrito mecanismos no genómicos de señalización por RA a través de sus receptores y en los que están implicadas varias vías de señalización intracelular. En células de leucemia promielocítica aguda, los niveles de AMPc aumentan pocos minutos después del tratamiento con ácido retinoico, fenómeno que no se observa en células resistentes a ácido retinoico. La inhibición de la proteína kinasa A, diana molecular del AMPc, bloquea parcialmente el efecto del RA sobre la transcripción y la diferenciación (Zhao et al., 2004). En estas células, se ha observado una regulación por RA de la actividad de la sulfatasa de esteroides (Hughes et al., 2006), y una activación de la kinasa p70S6 (Lal et al., 2005), a través de las vías de señalización de PI3K y MAPK.

En células PC12 y cultivos primarios de células neurales, el tratamiento con RA produce una fosforilación rápida y sostenida de CREB y un incremento de la actividad transcripcional de este factor de transcripción. Esta activación requiere la previa estimulación de ERK que ocurre a los pocos minutos del tratamiento con el RA (Cañón et al., 2004). En células de neuroblastoma SH-SY5Y, el RA induce la activación de Rac1 y MAPK a través de la vía PI3K, mecanismo implicado en la diferenciación neuronal (Pan et al., 2005). El RA activa la producción de NO por fosforilación de eNOS en células de endotelio vascular, a través de la activación de PI3K por RAR (Urano et al., 2005).

En células HL60 y NIH-3T3, se ha observado una regulación de la vía de activación de ERK por RA (Antonyak et al., 2002). En este caso, los retinoides sorprendentemente se comportaban como los estrógenos, es decir, como hormonas proliferativas, comportamiento contradictorio con las funciones bien establecidas antiproliferativas y de diferenciación de los retinoides en estas y otras líneas celulares.

4.3 Vías de señalización intracelular implicadas en supervivencia y diferenciación neuronal

Las neuronas requieren señales mediadas por factores de crecimiento para su supervivencia y proliferación. Muchas de las vías de señalización asociadas a factores de crecimiento están mediadas por receptores transmembrana que poseen un dominio tirosina kinasa intracelular: los receptores tirosina kinasa (RTK) (Zwick et al., 2002). Tras la unión de factores de crecimiento a estos receptores RTK, se activan señales corriente abajo asociadas a activación de las vías de señalización celular MAPK y PI3K/AKT (Kaplan y Miller, 2000; Huang y Reichardt, 2003). Estas vías son una de las más comprometidas en diversos cánceres, ya que su alteración libera a las células de la necesidad de factores de crecimiento externos para su proliferación y supervivencia.

4.3.1 Descripción de la vía PI3K/AKT

Las vías PI3K/AKT y MAPK (Raf/MEK/ERK) son un punto crucial en el cual convergen diversas señales de supervivencia celular (Kandel y Hay, 1999; Kaplan y Cooper, 2001). En las neuronas, la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) y su principal diana, la proteína kinasa B o AKT (PKB/AKT) median señales de supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal (Zhou et al., 1998; Huang y Reichardt, 2001).

PI3K es un complejo heterodimérico que comprende una subunidad reguladora de 85 kDa y una catalítica de 110 kDa que se encarga de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI: PI(3)P, PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3). Éstos se unen a una gran variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular (Leever et al., 1999). La regulación de la supervivencia por PI3K, en particular, está mediada por la activación de AKT (Dudek et al., 1997; Franke et al., 1997), la cual requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473) (Scheid et al., 2002).

Las dianas de AKT son diversas y se han asociado a respuestas metabólicas y de supervivencia celular (Marte y Downward, 1997; Tanti et al., 1997). Los sustratos de AKT incluyen la inactivación de mediadores proapoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK- 3, p53) y la activación de proteínas antiapoptóticas (Bcl- 2, Bcl-xL, IAP y mTOR) (Dudek et al., 1997; Brunet et al., 2001), que en conjunto determinan las diversas funciones de la vía PI3K/AKT.

La vía PI3K/AKT puede ser activada por gran número de hormonas de crecimiento, citoquinas y factores del entorno. Esta vía está asociada con supervivencia celular y patogénesis de gran número de enfermedades incluyendo cáncer (Franke et al., 2003).

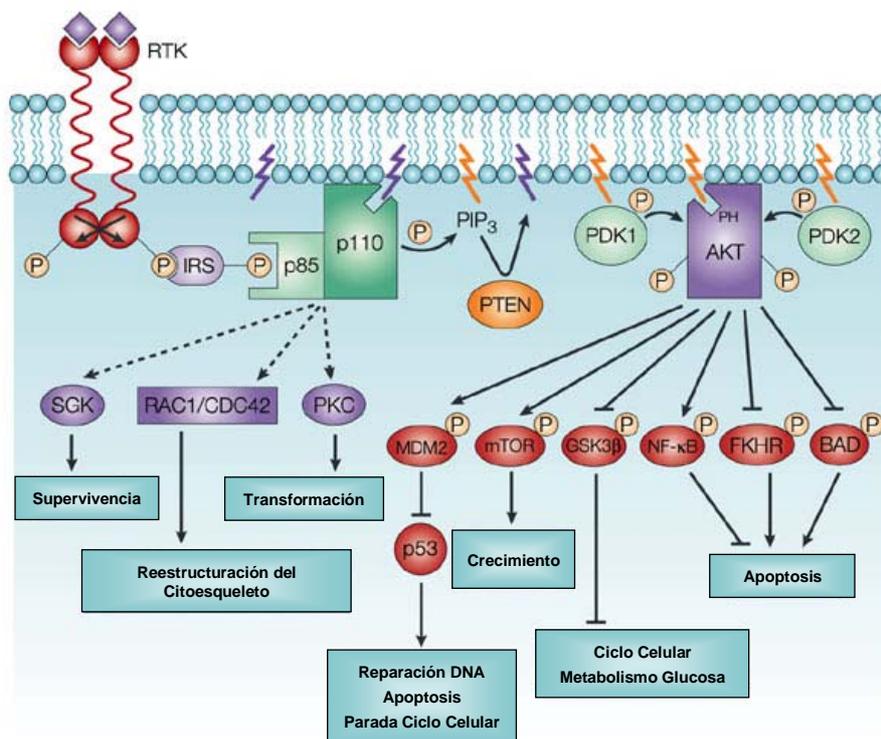


Figura 9. Vía de señalización de PI3K. La activación de AKT por PI3K media la fosforilación de diversos sustratos involucrados en crecimiento celular, supervivencia, proliferación y apoptosis. Adaptado de Vivanco (Vivanco y Sawyers, 2002).

4.3.2 Descripción de la vía MAPK

Las MAPK son enzimas conservadas evolutivamente. Responden a estrés físico y químico, controlando supervivencia y adaptación y están implicadas en procesos de crecimiento y diferenciación. Su actividad está regulada a través de cascadas compuestas por MAPK, MAPK kinasa, (MAPKK, MKK o MEK), y las MAPKK kinasa o MEK kinasas (MAPKKK o MEKK). En mamíferos existen tres grupos de MAPK: ERK, p38 y JNK. Las MAPK participan en multitud de procesos celulares como son diferenciación celular, motilidad, proliferación y apoptosis. ERK 1 y 2 se han relacionado preferentemente con proliferación y diferenciación, y JNK y p38, preferentemente con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis, aunque hay excepciones, y tanto JNK como p38 pueden mediar proliferación (Schaeffer y Weber, 1999).

La vía de señalización de ERK fue la primera vía de señalización de MAPK estudiada en mamíferos. La activación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK gobierna los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia (Kolch, 2000).

Objetivos

El estudio de las acciones del ácido retinoico (RA) en células de neuroblastoma posee dos vertientes de interés. En primer lugar, el RA es una señal que desempeña un papel central en el desarrollo embrionario y la generación de diversos órganos y sistemas, incluyendo el sistema nervioso, y por lo tanto hay un interés científico en conocer los mecanismos moleculares por los cuales ejerce estas acciones. En segundo lugar, el RA y sus derivados sintéticos están siendo ensayados en terapia de enfermedades neoplásicas, debido a su capacidad de regular el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular, con resultados clínicos muy relevantes, como en el caso del neuroblastoma. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que el RA ejerce sus acciones terapéuticas no han sido establecidos claramente. El objetivo general de la tesis propuesta es descifrar los mecanismos moleculares por los que el RA induce la diferenciación de células neurales, utilizando como sistema modelo células de neuroblastoma humano.

El trabajo de esta tesis se inicia a partir de resultados previos obtenidos en el laboratorio que indican que la respuesta a la administración de RA no sólo se produce a nivel transcripcional, sino que también produce la activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT (López-Carballo et al., 2002). Esta activación es necesaria para la inducción de la diferenciación por RA y pensamos que ocupa un lugar central en el control ejercido por RA sobre el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, por lo que proponemos su caracterización con más detalle.

Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo general del presente trabajo es estudiar los aspectos mecanísticos de la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT por RA. Para ello se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar si la activación de la vía de señales de PI3K/AKT se produce a través de un mecanismo no genómico.
2. Comprobar si esta activación es exclusiva de células de neuroblastoma o es un fenómeno más general.

3. Establecer la implicación del Receptor Nuclear RAR en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT.
4. Analizar el compartimento celular donde ocurre la activación de la vía PI3K por RA a través de RAR.
5. Caracterizar los dominios de RAR involucrados en la activación de la vía de PI3K/AKT.
6. Analizar posibles interacciones físicas entre el receptor RAR y algún componente de la vía de transducción de señal PI3K/AKT.
7. Determinar si las acciones no genómicas del RA tienen consecuencias sobre los patrones de transcripción en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

Material y Métodos

1. PRODUCTOS

Los productos y reactivos empleados en el laboratorio fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Amresco, Biorad, Biotools, Gibco, Merck, Pharmacia, Prolabo, Promega, Pronadisa, Scharlau, Serva y Sigma.

Los enzimas fueron suministrados por: Biotools, Fermentas, Invitrogen, New England Biolabs, Promega y Roche. Los cebadores empleados fueron adquiridos en Amersham Pharmacia Biotech, Genset Oligos y MWG.

El material radiactivo empleado, [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP y [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10mCi/ml), fue suministrado por Amersham Pharmacia Biotech y New England Nuclear.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1 Material

El material de plástico utilizado en cultivos celulares fue suministrado por Sarstedt. Los medios de cultivo DMEM, suero bovino fetal (FBS), suero de ternera recién nacida (NCS), Tripsina EDTA, L-glutamina, y antibióticos fueron suministrados por Bio-Whittaker. El DMSO empleado para la congelación de las células se obtuvo de Sigma.

La cicloheximida (CHX), actinomicina D (AMD), puromicina, cloroquina, polibreno, colchicina, nocodazol, citocalasina B, LY294002, el ácido todo-trans retinoico (RA), 9-cis-retinoico (9-c-RA), 13-cis-retinoico (13-c-RA), TTNPB, Am580 y N-(4-Hidroxifenil)-retinamida (4-HPR) se obtuvieron de Sigma. El inhibidor PP1 fue suministrado por Biomol Research labs, Inc.

El AGN193109 (UVI2109) (Johnson et al., 1995), ALRT1550 (UVI2103) (Bennani et al., 1998) y LG100567 (UVI2104) (Zhang et al., 1996) fueron cedidos por el Dr. Angel R. de Lera (Universidad de Vigo).

Los diferentes compuestos fueron disueltos en etanol, DMSO o agua desionizada y se añadieron al medio de cultivo a las concentraciones indicadas.

2.2 Líneas celulares

SH-SY5Y

Línea celular de neuroblastoma humano crecida en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. Esta línea fue amablemente cedida por la Dra. Carme Gallego (Universidad de Lérida).

COS-7

Línea celular de riñón de mono crecida en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. Esta línea fue cedida por la Dra. Teresa Iglesias (IIB-Madrid).

BOSC23

Línea celular de riñón embrionario humano derivada de la línea embrionaria de riñón humano productora de retrovirus 293T. Estas células han sido crecidas en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. Esta línea fue cedida por el Dr. Vicente Andrés (IBV-Valencia).

NIH-3T3

Línea celular de fibroblastos de ratón crecida en medio DMEM, suplementado con 10% de suero de ternera recién nacida, 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin. Estas células fueron cedidas por el Dr. Piero Crespo (IIB-Madrid).

NIH-3T3-LacZ

Línea celular NIH-3T3 transfectada establemente con el cDNA del gen que codifica para LacZ, cedida por el Dr. Antonio Díez (IBV-Valencia). Las condiciones de cultivo son las mismas que las de la línea NIH-3T3.

NIH-3T3-RAR α

Línea celular NIH-3T3 transfectada establemente con el cDNA del gen que codifica para el receptor RAR α .

NIH-3T3-MyrRAR α

Línea celular NIH-3T3 transfectada establemente con el cDNA del gen que codifica para el receptor RAR α unido a la secuencia *Myr*.

MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}

Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón en la que existe una inactivación simultánea de los tres subtipos diferentes del receptor RAR (RAR α , RAR β y RAR γ) (Altucci et al., 2005). Estas células han sido crecidas en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 u/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin. Esta línea fue cedida por el Dr. Hinrich Gronemeyer (IGBMC-Estrasburgo).

MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}-RAR α

Línea celular MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}-RAR α transfectada establemente con el cDNA del gen que codifica para el receptor RAR α .

2.3 Tratamientos

A las células consideradas control se les cambió el medio simultáneamente al cambio por medio tratado del resto de las placas. Los tratamientos con RA,

9-cis RA, 13-cis RA, TTNPB, AM580, 4-HPR, ALRT1550 y LG100567 se hicieron añadiendo el compuesto al medio DMEM completo a una concentración final de 1 μ M.

Los pretratamientos con los inhibidores Actinomicina D (1 μ g/ml), Cicloheximida (10 μ g/ml), PP1 (10 μ M) y LY294002 (10 μ M), se realizaron durante 30 minutos y a continuación se añadió directamente al medio completo 1 μ M RA.

Los pretratamientos con colchicina (1 μ M) y nocodazol (25 μ M) se realizaron durante 2 horas antes del tratamiento con 1 μ M de RA durante 10 minutos. El pretratamiento con Citocalasina D se realizó durante 10 minutos y a continuación se añadió 1 μ M de RA al medio completo.

2.4 Mantenimiento y congelación de las células

Todas las líneas celulares se han mantenido en un incubador a una temperatura de 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Los diferentes tipos celulares se crecieron hasta una densidad de 80-90% en placas de 100/150 mm y al cabo de 2-3 días, se les aspiró el medio, se lavaron con PBS 1X, se tripsinizaron y se diluyeron aproximadamente 1:5.

Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, entre 1-3 millones de células se resuspendieron en 1.5 ml de medio de congelación frío (70% de DMEM, 20% de suero y 10% de DMSO) y fueron pasadas a un criotubo que se congeló lentamente hasta -80°C y que finalmente se almacenó en contenedores de nitrógeno líquido.

La descongelación de las células desde los contenedores de nitrógeno líquido se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37°C hasta la descongelación de su contenido, que rápidamente se diluyó 10 veces en medio DMEM suplementado con 10% de suero para ser centrifugadas y resuspendidas en el medio de cultivo.

3. PLÁSMIDOS, CLONAJES Y SUBCLONAJES

3.1 Plásmidos

- pSG5: Vector de expresión utilizado para completar la cantidad necesaria de DNA en experimentos de transfección transitoria.
- pSG5-RAR α : Contiene el cDNA del gen que codifica para el receptor RAR α subclonado en el plásmido pSG5.
- pSG5-RAR α 390: Contiene el cDNA del mutante de delección RAR α 390 subclonado en el plásmido pSG5.
- pCEFL-Myr-RAR α : Contiene el cDNA de RAR α insertado en el plásmido pCEFL. Al cDNA de RAR α se le ha añadido una secuencia que codifica para los 21 aminoácidos de la señal de miristilación de c-Src de pollo (Cross et al., 1984).
- pCEFL-Myr-RAR α 390: Contiene el cDNA del mutante de delección Myr-RAR α 390 insertado en el plásmido pCEFL.
- pCEFL-Myr-RAR α 345: Contiene el cDNA del mutante de delección Myr-RAR α 345 insertado en el plásmido pCEFL.
- pCEFL-Myr-RAR α 282: Contiene el cDNA del mutante de delección Myr-RAR α 282 insertado en el plásmido pCEFL.
- pCEFL-Myr-RAR α 206: Contiene el cDNA del mutante de delección Myr-RAR α 206 insertado en el plásmido pCEFL.
- pCEFL-Myr-RAR α 153: Contiene el cDNA del mutante de delección Myr-RAR α 153 insertado en el plásmido pCEFL.
- pCEFL-Myr-RAR α (154-462): Contiene el cDNA del mutante de delección Myr-RAR α (154-462) insertado en el plásmido pCEFL.

- pBABE-RAR α : Contiene el cDNA del gen que codifica para el receptor RAR α insertado en el vector retroviral pBABE resistente a puromicina (Morgenstern y Land, 1990).
- pBABE-Myr-RAR α : Esta construcción contiene el cDNA de RAR α unido a la secuencia *Myr* e insertado en el vector retroviral pBABE.
- pBABE-LacZ: Contiene el cDNA de LacZ insertado en el vector retroviral pBABE. Fue cedido por el Dr. Antonio Diez (IBV-Valencia).
- pEGFP-N1: Contiene el cDNA de la proteína GFP (*green fluorescent protein*).
- pEGFP-RAR α : Contiene el cDNA del gen que codifica para el receptor RAR α insertado en el vector de expresión pEGFP-C1.
- Flag-MNAR: Vector de expresión de MNAR con un epítipo Flag. Fue proporcionado por el Dr. Boris Cheskis (Wyeth Research, Philadelphia, USA).

En la figura 10 se representan los diferentes mutantes de delección del receptor RAR α .

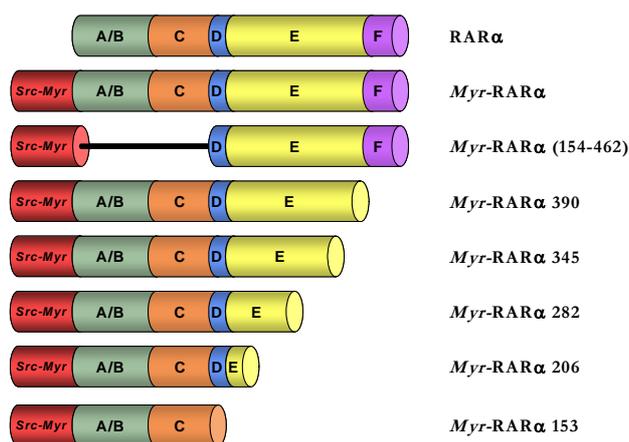


Figura 10. Representación gráfica de los dominios del receptor RAR α y de los diferentes mutantes de delección.

3.2 Clonajes y subclonajes

Las diversas construcciones utilizadas en los diferentes tipos de ensayos fueron generadas mediante procedimientos habituales en biología molecular, que brevemente se describen a continuación.

Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de DNA que no habían sido previamente clonados fueron amplificados, a partir de un plásmido preexistente, por PCR con cebadores específicos en cuyos extremos se añadieron dianas para los enzimas de restricción apropiados. Los fragmentos así amplificados fueron entonces digeridos con los enzimas de restricción pertinentes (Fermentas o Promega) y purificados a partir del kit *Rapid PCR Purification System* de Marligen Biosciences Inc. Cuando se trataba de transferir un inserto desde un vector a otro nuevo, el plásmido original se digirió con los enzimas de restricción adecuados y el inserto deseado se purificó a partir de geles de agarosa mediante el kit *Rapid Gel Extraction System* de Marligen Biosciences Inc.

A continuación, la concentración de los fragmentos purificados, junto con la de los correspondientes vectores cortados y purificados de la misma manera (y sus extremos 5' desfosforilados con fosfatasa alcalina si se habían linearizado con un sólo enzima de restricción), se determinó por comparación con un estándar en un gel de agarosa. Una vez establecidas las concentraciones de los diferentes insertos y vectores, estos se pusieron a ligar con T4 DNA ligasa (Fermentas), siendo la relación molar entre inserto y vector en la mezcla de ligación de aproximadamente 3:1 a favor del inserto. Las ligaciones se realizaron normalmente durante 3 horas a temperatura ambiente y se prepararon también ligaciones control que contenían solamente el vector.

Posteriormente se utilizaron estas reacciones de ligación para transformar bacterias competentes DH5 α por choque térmico (37°C durante 20 segundos), tras lo cual fueron sembradas en placas de medio LB-agar con el antibiótico correspondiente para la selección de cada plásmido. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente se prepararon cultivos líquidos de algunas de las colonias obtenidas en las placas correspondientes a las ligaciones. Tras 12-16 horas de crecimiento, de los cultivos bacterianos se hizo la extracción de DNA

plasmídico mediante el kit *Concert High Purity Plasmid Midiprep system* de Gibco. En todos los casos los plásmidos fueron secuenciados con sus cebadores correspondientes para comprobar la pauta de lectura y la secuencia.

4. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN

Entre los métodos para introducir DNA plasmídico en células eucariotas, hemos utilizado la precipitación con fosfato cálcico y la electroporación. Esta adquisición de material genético por parte de la célula puede ser transitoria o estable. En el primer caso, el DNA tiene una situación extracromosómica y se pierde durante la división celular, mientras que en la transfección estable mediante una presión selectiva con antibiótico se consigue mantenerlo dentro constantemente.

4.1 Transfecciones transitorias

4.1.1 Precipitación con fosfato cálcico

Las células se cultivaron en placas de 60 mm. La noche anterior al día de la transfección se pasaron las células, de modo que al día siguiente alcanzaran una confluencia entre 60-80%. Una hora antes de la transfección se cambió el medio de cultivo. Para la formación de los precipitados de DNA, en primer lugar se añadieron 75 μ l/placa de 2X HBS (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1.5 mM Na₂HPO₄ pH 7.02). A continuación se añadió 3 μ g del DNA, y por último se añadieron 75 μ l de 0.25 M CaCl₂ y se permitió la formación de los precipitados durante 10 minutos a temperatura ambiente. La solución de los precipitados se añadió lentamente al medio y tras 8-14 horas se eliminó y se añadió nuevo medio de cultivo. Tras 24-48 horas, se realizó la extracción de proteínas y se llevó a cabo el análisis mediante western blot.

4.1.2 Electroporación

Al igual que para la transfección por fosfato de calcio, se emplearon células en fase de crecimiento exponencial. Tras centrifugarlas durante 10 minutos a 200g, se resuspendieron en DMEM suplementado con 0.5% FBS, se determinó el número de células y se centrifugaron durante 10 minutos a 200g. A continuación las células se resuspendieron en tampón de electroporación hipoosmolar (Eppendorf) a una concentración final de 1×10^6 células/ml. Para cada transfección se tomaron 400 μ l de la suspensión de células, se mezclaron con 2 μ g del plásmido (o mezcla de plásmidos si se trataba de co-transfección) y se colocaron en una cubeta de electroporación de 2 mm (Eppendorf). Los parámetros de electroporación que se emplearon en el *Multiporator* de Eppendorf fueron 600V y 40 μ s. Después del pulso, las cubetas se mantuvieron durante 5 minutos en hielo, y posteriormente las células se pasaron a una placa de cultivo de 60 mm, en un volumen final de 4 ml de medio. Transcurridas 48 horas, se realizó la extracción de proteínas y se analizó mediante western blot la expresión del plásmido.

4.2 Transfecciones estables

4.2.1 Preparación de retrovirus recombinantes

El proceso de obtención de retrovirus recombinantes se basa en la transfección de un vector retroviral genómico que lleva el gen de interés en una estirpe celular, llamada empaquetadora, que expresa estable y constitutivamente los genes estructurales del retrovirus. Las células obtenidas producen partículas de virus que empaquetan el RNA que contiene la secuencia de interés.

Una hora antes de la transfección se cambió el medio a las células empaquetadoras BOSC23 y se añadió 2,5 μ M de cloroquina. Las células se transfectaron con fosfato cálcico, tal y como se indica en el apartado 4.1.1, y con

10 μg del vector retroviral (pBABE-RAR α y pBABE-Myr-RAR α) por placa. Al cabo de 10 horas de la transfección se cambió el medio a las células y se incubaron 48 horas hasta alcanzar confluencia. Transcurrido este tiempo se procedió a recoger el sobrenadante de las BOSC23, que contenía los retrovirus recombinantes.

4.2.2 Infección de células NIH-3T3

En un segundo paso, y ya obtenidos los retrovirus, se procedió a la infección de las células NIH-3T3, pasadas la noche anterior. Para ello, se filtró el sobrenadante de las BOSC23, se añadió a las NIH-3T3 junto con polibreno (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó toda la noche. A la mañana siguiente, se cambió el medio por DMEM + 10% NCS y a las 48 horas se seleccionó un pool de células con puromicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Como control se emplearon células infectadas con virus que contenían el gen *LacZ*, generosamente cedidas por el Dr. Antonio Díez (IBV-Valencia).

5. ANÁLISIS DE RNA MEDIANTE NORTHERN BLOT

5.1 Extracción de RNA

Para la obtención del RNA total se empleó el método de extracción con isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Una vez extraído, se comprobó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE. La concentración de RNA se estimó espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm, conservando las muestras alicuotadas a -80°C hasta su utilización.

5.2 Electroforesis y Transferencia

Las muestras de RNA total (15 µg) obtenidas de las células SH-SY5Y fueron desecadas y resuspendidas en tampón de carga (50% formamida, 17% formaldehído, 10% MOPS 10X y azul de bromofenol). Una vez desnaturalizadas a 68°C durante 3 minutos las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa-formaldehído y transferidas a membranas de nylon durante 16 horas (Nytran N, Schleicher & Schuell) según protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). El RNA se fijó a la membrana mediante irradiación con 120 mJ/cm² de luz UV a 254 nm en un aparato *Bio-Link BLX-254*. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, así como la igualdad de carga de los diferentes carriles, los filtros se tiñeron con 0.04 % azul de metileno en 0.3 M acetato sódico pH 5.5.

5.3 Marcaje de la sonda

Como sonda se empleó un fragmento de restricción que contiene el cDNA completo de RARβ humano. Se marcaron radiactivamente 10 ng del cDNA utilizando el Kit *RadPrime DNA Labeling System* de Invitrogen Life Technologies. El DNA marcado con [α³²P]-dCTP se separó de los nucleótidos radiactivos no incorporados mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) en columnas preparadas en el laboratorio. La eficiencia de marcaje fue evaluada en un contador de centelleo.

5.4 Hibridación y lavado de membranas

Las membranas se prehibridaron a 65°C, siguiendo una modificación del método de *Church y Gilbert* (Church y Gilbert, 1984), durante al menos 30 minutos en solución de hibridación (14% SDS, 500 nM fostato sódico pH 7.2, 1 mM EDTA) en un horno de rotación *Combi-H* de Finemould Precision Ind. Co. Posteriormente se añadieron 10 ml de solución de hibridación nueva y la sonda radioactiva (10⁶ cpm/ml de solución de hibridación) previamente desnaturalizada a 95°C durante 5 minutos. La hibridación se llevó a cabo durante al menos 16

horas a 65°C. A continuación se lavaron los filtros con una solución 0.5X SSC, 0.1% SDS durante 20-30 minutos a 65°C.

5.5 Autorradiografía

Para detectar las señales radiactivas las membranas hibridadas se expusieron a una película autorradiográfica *Konica X-Ray film AX* (Sakura). Las exposiciones se hicieron a varios tiempos en casetes con pantallas intensificadoras a -80°C. Las películas se revelaron en un aparato *Curix-60* de Agfa.

6. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES

Para obtener los extractos de proteínas nucleares las células se lavaron con PBS 1X frío y se levantaron con la ayuda de un rascador de células. Se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8, 0.5 mM Spermidina, 0.15 mM Spermina, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA) al que se añadió antes de usar 0.5 mM β -mercaptoetanol y 0.3 M sacarosa. Luego se adicionó un volumen del mismo tampón con 0.5% Nonidet P-40, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 1500g a 4°C durante 10 minutos y se lavó con el tampón sin detergente. Posteriormente se volvió a centrifugar y el precipitado se resuspendió en tampón RIPA (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.5% Nonidet P-40) más 1% de deoxicolato sódico y 0.1% de SDS. Se agitó y se incubó durante 10 minutos en hielo. Finalmente se centrifugó a 14.300g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante resultante (extracto proteico nuclear) se guardó a -80°C hasta su utilización.

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

El análisis por Western Blot permite la inmunodetección de proteínas previamente separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

7.1 Obtención de extractos de proteínas

Para obtener los extractos totales de proteínas las células se lavaron con PBS 1X frío y se levantaron con la ayuda de un rascador de células. Se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón RIPA (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.5% Nonidet P-40) al que previamente se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa (10 mM NaF, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 100 µM PMSF, 1 mM ortovanadato sódico). Tras incubar el lisado 10 minutos en hielo, se centrifugó a 14.300g durante 10 minutos a 4°C y la concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante el método colorimétrico Bradford (Kit *Biorad Protein Assay*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se guardaron a -80°C.

7.2 Geles de acrilamida y transferencia a membrana

Los geles de poliacrilamida-SDS para proteínas y la transferencia a membranas se hicieron según protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). La separación de proteínas se realizó en minigeles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes y con un gel empaquetador al 5%, que cumple la función de alinear las proteínas de la muestra antes de ser separadas. Las muestras se incubaron a 95°C durante 8 minutos una vez diluidas con el tampón de carga (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT y azul de bromofenol) y la electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas y 30 minutos a 12mA constantes. A continuación, las proteínas se transfirieron mediante el sistema semiseco, con un aparato *Trans blot SD semi-dry transfer cell* de BioRad, a membranas de nitrocelulosa (*Hybond ECL* de Amersham Biosciences) durante 1

hora a 0.8 mA/cm² con una fuente *Power Pac 3000* de BioRad. Posteriormente se comprobó la eficiencia de la transferencia de proteínas por tinción reversible con rojo-Ponceau (0.5% rojo-ponceau, 1% ácido acético glacial).

Para el análisis de proteínas de alto peso molecular, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia húmeda durante 1 h a 100V constantes utilizando el sistema *Mini-Protean TransBlot Cell* de BioRad.

7.3 Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Para evitar uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana, se realizó un bloqueo de esta última en una solución rica en proteínas (PBS 1X, 0.1% Tween 20, 5 % leche desnatada en polvo) durante al menos una hora con agitación y a temperatura ambiente. A continuación se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo (1:200-1:3500) durante 16 horas a 4°C (Tabla 1). Después de tres lavados de 8 minutos a temperatura ambiente con PBS 1X, 0.1% Tween 20, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa, disuelto en la solución de bloqueo (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron tres lavados de 8 minutos con PBS 1X, 0.1% Tween 20 a temperatura ambiente.

La detección de la señal se hizo por quimioluminiscencia (ECL y ECL-Plus de Amersham Biosciences) y la membrana fue expuesta a películas autorradiográficas Konica X-Ray film AX (Sakura) y revelada en un aparato *Curix-60* de AGFA o adquirida mediante *LAS-3000* de Fujifilm.

Para reutilizar la membrana e incubarla con otros anticuerpos, ésta se sumergió en solución de *stripping* (62.5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM β-mercaptoetanol y 2% SDS) a 55°C durante 15 minutos en agitación suave, para eliminar la señal. Tras varios lavados con abundante PBS 1X, 0.1% Tween 20 a temperatura ambiente, las membranas fueron nuevamente bloqueadas e incubadas con otros anticuerpos.

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Procedencia</i>
Akt 1/2 (N-19)	cabra	1:1000	Santa Cruz
β -Catenina	ratón	1:500	BD Biosciences
Caveolin-1 (N-20)	conejo	1:500	Santa Cruz
c-Src (N-16)	conejo	1:500	Santa Cruz
Erk2	conejo	1:1000	Santa Cruz
Lamina A	conejo	1:500	Cell Signaling
PELP1/MNAR	conejo	1:1000	Bethyl Laboratories, Inc
Phospho-Erk (Tyr204)	ratón	1:500	Santa Cruz
Phospho-Akt (Ser473)	conejo	1:500	Cell Signaling
PI3 Kinase p85	conejo	1:3500	Upstate
PI3 Kinase p110 α	conejo	1:500	Cell Signaling
PI3 Kinase p110 α	ratón	1:10	Dra. Ana Clara Carrera
RAR α	conejo	1:500	Cell Signaling
RAR α (C-20)	conejo	1:500	Santa Cruz
RAR γ (M-454)	conejo	1:500	Santa Cruz
<i>Anticuerpo secundario</i>	<i>Conjugado</i>	<i>Dilución</i>	<i>Procedencia</i>
Anti-Rabbit IgG	Peroxidasa	1:1000	Amersham Biosciences
Anti-Mouse IgG	Peroxidasa	1:1000	Jackson
Anti-Goat IgG	Peroxidasa	1:1000	Jackson
Rabbit Trueblot	Peroxidasa	1:1000	eBioscience

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios. Se indica el nombre del anticuerpo, el origen, la dilución empleada y su procedencia.

8. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

8.1 Aislamiento de membrana plasmática

Las fracciones celulares y las preparaciones de membrana plasmática se aislaron siguiendo un método ya publicado con algunas modificaciones (Suzuki et al., 1989; Kim et al., 1996). Las células se lavaron con PBS 1X frío y se levantaron con la ayuda de un rascador de células. Se centrifugaron y se resuspendieron en buffer TEDK (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.3 M KCl, 1 mM

EDTA, 1 mM DTT) con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 40 µg/ml leupeptina y 40 µg/ml aprotinina) y de fosfatasas (1 mM Na₃VO₃, 1 mM NaF). La suspensión se homogeneizó en un homogeneizador de émbolo y se sometió a centrifugación diferencial, primero a 200g 10 minutos para eliminar los restos celulares y después a 14.300g 20 minutos para obtener la fracción nuclear y mitocondrial, la cual se desechó. El sobrenadante entonces se centrifugó a 100.000g 45 minutos en un rotor SW60 de la Ultracentrífuga Beckman y el pellet resultante (fracción microsomal) se resuspendió en 1.5 ml de sacarosa al 15% en TEDK y se añadió con cuidado para no romper la interfase de las diferentes capas, a un gradiente discontinuo de sacarosa al 30% y 45%. Este gradiente se centrifugó a 76.000g 3 horas y la interfase 15/30% (fracción de membrana plasmática), diluida con TEDK se centrifugó a 100.000g 1 hora. El pellet se resuspendió en TEDK con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y se guardó a -80°C hasta su utilización.

8.2 Aislamiento de *lipid rafts*

Para aislar los microdominios de membrana resistentes a detergente (*lipid rafts*) de células NIH-3T3, se siguió un método de fraccionamiento en gradiente de sacarosa ya descrito (Brown y Rose, 1992; Cabrera-Poch et al., 2004) pero con algunas modificaciones. Para ello, partimos de 2 placas de 150 mm de células, que tras ser lavadas con PBS 1X frío, fueron resuspendidas en 500 ml de tampón de lisis frío (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.25% Tritón X-100) con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 40 µg/ml leupeptina y 40 µg/ml aprotinina) y de fosfatasas (1 mM Na₃VO₃, 1 mM NaF). Tras un periodo de incubación de los lisados de 30 minutos a 4°C, se ajustó la concentración de sacarosa al 41% y se depositó en el fondo de un tubo de centrifuga de 4 ml. Encima se añadieron 2.7 ml de sacarosa al 35% y 0.8 ml de sacarosa al 16%. Las diferentes concentraciones de sacarosa se realizaron con 10 mM Tris-HCl pH 7.4. Este gradiente se centrifugó a 4°C durante 18h a 160.000g en un rotor SW60 y se recogieron 10 fracciones de 0,4 ml, incluyendo el pellet en la fracción 10. Estas fracciones se precipitaron con 0.05% de deoxicolato sódico y

6.5% de ácido tricloroacético, se lavaron con acetona al 80% fría y se resuspendieron en tampón de carga (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT y azul de bromofenol). A continuación las muestras se analizaron por western blot.

9. INMUNOPRECIPITACIÓN

Para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones, en primer lugar, las placas fueron puestas en hielo y las células se lavaron con PBS 1X frío y se levantaron con la ayuda de un rascador de células. Se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) al que previamente se añadieron inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 40 µg/ml leupeptina y 40 µg/ml aprotinina) y de fosfatasas (1 mM Ortovanadato sódico, 1 mM NaF). Tras ser centrifugados a 14.300g durante 15 minutos a 4°C, la concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante el método colorimétrico basado en el método Lowry (Kit *Biorad DC Protein Assay*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 150 µg del extracto de proteínas se utilizaron para cada reacción de inmunoprecipitación.

En el caso de las inmunoprecipitaciones realizadas con los anticuerpos de conejo, p85-PI3K, p110-PI3K, y RAR α se utilizó el kit *Rabbit Trueblot* de eBioscience. Mediante la utilización de este kit, se evita la detección de la cadena pesada (55kDa) y la cadena ligera (23kDa) de las IgG, y por tanto elimina la interferencia con la detección del anticuerpo de interés, en nuestro caso RAR α , cuyo peso molecular (55kDa) coincide con las cadena pesada de las IgG. En primer lugar, los extractos fueron pre-aclarados con 30 µl de beads anti-rabbit IgG durante 30 minutos a 4°C. A continuación, y tras eliminar la resina por centrifugación, los extractos se incubaron con 4 µg del anticuerpo específico durante 60 minutos en hielo. Como control, se realizaron reacciones paralelas con

un anticuerpo no relacionado. Los inmunocomplejos se precipitaron añadiendo 50 μ l de las beads anti-rabbit IgG a la suspensión y dejándola en rotación durante 60 minutos a 4°C. Posteriormente, los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con el tampón de lisis y se resuspendieron en tampón de carga (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glicerol y azul de bromofenol) con 50 mM DTT recién preparado. Tras analizar las muestras por western blot, las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios, utilizando como anticuerpo secundario *Rabbit TrueBlot* conjugado con peroxidasa (eBioscience). Todas las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL de Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante y analizadas con *LAS-3000* de Fujifilm.

Para realizar las inmunoprecipitaciones con β -catenina, anticuerpo monoclonal de ratón, se empleó el kit *ExactaCruzTMC* de Santa Cruz. Este kit proporciona las mismas ventajas que el anterior y se empleó para inmunoprecipitaciones realizadas con anticuerpos monoclonales de ratón. En primer lugar, para la formación del complejo matriz-anticuerpo, se incubó una mezcla con 4 μ g del anticuerpo, 50 μ l de la matriz y 500 μ l de PBS durante 60 minutos a 4°C en rotación. A continuación se centrifugó a 16.000g durante 30 segundos a 4°C y se lavó 2 veces con PBS. En paralelo, 150 μ g de extracto de proteínas fueron pre-aclarados con 25 μ l de la matriz durante 30 minutos. El sobrenadante que resultó de la centrifugación de este extracto se añadió a la matriz unida al anticuerpo obtenida anteriormente, y se incubó durante 60 minutos a 4°C en rotación. Tras la incubación, se centrifugaron los inmunoprecipitados a 16.000g durante 30 segundos, se realizaron varios lavados con el tampón de lisis y se resuspendieron finalmente en tampón de carga (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glicerol y azul de bromofenol) con 50 mM DTT recién preparado. En este caso, para la detección del anticuerpo primario, se utilizó el anticuerpo secundario *Rabbit ExactaCruz* (Santa Cruz).

10. ENSAYO DE ACTIVIDAD PI3-KINASA

A partir de extractos totales de proteínas obtenidos de células SH-SY5Y, se realizaron inmunoprecipitaciones con los anticuerpos frente a RAR α y p110 α , de forma similar al procedimiento descrito en el apartado 9, pero con algunas modificaciones. En este caso se utilizó la proteína A/G PLUS-Agarosa como matriz y los dos últimos lavados de los inmunocomplejos se realizaron con un tampón sin detergente (10 mM HEPES pH 7.5 y 0.1 mM EGTA).

Las reacciones se hicieron mezclando 20 μ l de las inmunoprecipitaciones, 20 μ l de 0.5 mg/ml L- α fosfatidil-inositol (Sigma) en 10 mM HEPES pH 7.4, 0.1 mM EGTA y 10 μ l de 50 mM HEPES pH 7.4, 25 mM MgCl₂ con 10 μ Ci de [γ 32P]-ATP. Como control negativo se añadió en algunas muestras 30 μ M de LY29004. Las reacciones se incubaron 20 minutos a 37°C y se pararon adicionando 60 μ l de 2 M HCl. Los lípidos se extrajeron con 100 μ l de cloroformo:metanol (1:1). Se aplicó la fase orgánica a las placas de cromatografía en capa fina (Silica Gel 60 de Merck), pretratadas con 1% oxalato potásico en agua. La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en cubetas de vidrio saturadas con cloroformo:metanol:amoníaco (9:7:2) y se dejó correr hasta que el frente alcanzó un 80% de la placa.

Para detectar las señales radioactivas las placas de cromatografía en capa fina se expusieron a varios tiempos en casetes con pantallas de captura. La lectura de estas pantallas se efectuó en un analizador de imagen *FLA-5000* de Fujifilm.

11. MICROSCOPIA CONFOCAL

Los ensayos de inmunodetección de GFP se realizaron en la línea celular COS-7. Las células crecidas en placas de 6 pocillos (Cultek) sobre cubreobjetos de vidrio estériles se transfectaron con los plásmidos pEGFP-N1 y pEGFP-RAR α .

Transcurridas 48 horas, las células se trataron con 1 μM de RA durante 10 minutos. A continuación las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4%. Después se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS 1X. A continuación, se procedió al montaje de los cubreobjetos sobre los portaobjetos con un medio especial de montaje para fluorescencia. Las preparaciones fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio confocal invertido *DM IRE2* de Leica.

12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES CON CHIPS DE DNA

Se prepararon 2 placas de células SH-SY5Y control y 2 placas de células tratadas con RA durante 6 horas. La preparación, marcaje e hibridación del RNA con los chips Affymetrix HG-U133A se realizaron según métodos validados por el fabricante. El RNA total fue preparado con TRIZOL (Invitrogen) y el kit *RNAeasy mini* de Quiagen. Para cada muestra se marcaron 2 μg de RNA con biotina-dUCP, mediante el kit de marcaje en un ciclo de Affymetrix. El cRNA biotinilado se hibridó al GeneChip HG-U133A. La hibridación, los lavados posteriores y la tinción del GeneChip se llevaron a cabo con la *Fluidic Station* automatizada de Affymetrix. La señal de la sonda se reveló con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo contra estreptavidina marcado con biotina. La fluorescencia fue detectada con el *Gene Scanner 3000* de Affymetrix.

Los resultados fueron analizados utilizando el *software Affymetrix Microarray Suite 5.0*. Toda la parte experimental se llevó a cabo por el servicio de GeneChips de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Resultados

1. Activación de la vía de señalización de PI3K/AKT y MAPKs ERK1/2 por RA a través de un mecanismo rápido no genómico en células SH-SY5Y

Estudios previos de nuestro laboratorio habían determinado que el tratamiento con RA de células de neuroblastoma SH-SY5Y induce la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT, y se postuló que la activación de PI3K por RA podría producirse a través de una acción no genómica (López-Carballo et al., 2002).

Para estudiar el estado de activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT, se analizó la fosforilación de la kinasa AKT (PKB), una de las principales dianas de PI3K, mediante western blot con un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada en Serina 473. Como control la membrana se reincubó con el anticuerpo AKT, que reconoce tanto la forma fosforilada de AKT como la no fosforilada. Los resultados muestran que la activación de PI3K/AKT se produce muy rápidamente y ya es detectable tras 5 minutos de tratamiento con RA (Figura 11). Esta activación se mantiene hasta los 15 minutos y decae lentamente a partir de los 30 minutos hasta más allá de las 4 horas de tratamiento.

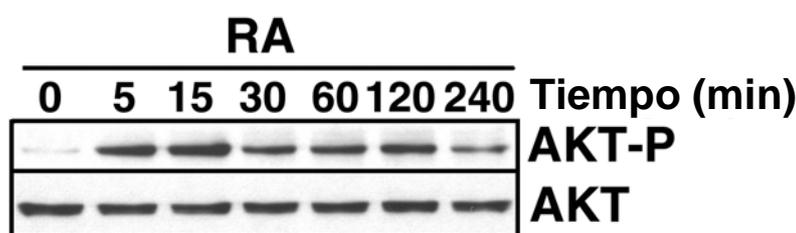


Figura 11. El RA induce la fosforilación de AKT en células de neuroblastoma. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células SH-SY5Y de neuroblastoma tratadas con 1 μ M de RA a los tiempos que se indican en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P, y frente a AKT total (AKT).

Este incremento tan rápido en la fosforilación de AKT sugería fuertemente una acción no genómica como respuesta a la estimulación con RA. Para comprobarlo, se realizaron pretratamientos con Actinomicina D (inhibe la transcripción) y Cicloheximida (inhibe la síntesis de proteínas) 30 minutos antes de la adición del RA a las células. Como se muestra en la figura 12, la presencia de estos dos inhibidores no bloqueó la fosforilación de AKT inducida por RA, confirmando que la activación de PI3K/AKT por RA no requiere ni transcripción de nuevos genes ni proteínas de nueva síntesis, y por lo tanto se produce a través de un mecanismo no genómico.

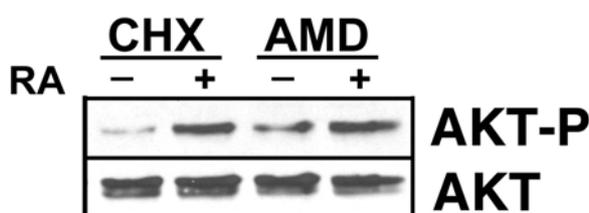


Figura 12. La activación de PI3K/AKT por RA no requiere ni transcripción de nuevos genes ni proteínas de nueva síntesis. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células SH-SY5Y de neuroblastoma pretratadas durante 30 minutos con 1 μ g/ml de Actinomicina D (AMD) o 10 μ g/ml de cicloheximida (CHX), y después tratadas con 1 μ M de RA durante 10 minutos en presencia del inhibidor (+) o no tratadas con RA (-). La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y frente a AKT total (AKT).

Las MAPKs están implicadas en la transducción de señales iniciadas por la unión de factores de crecimiento a sus receptores tirosina kinasa de la membrana. Estos factores inducen una fosforilación rápida y transitoria de las ERKs (Schlessinger, 2000). En algunos casos, estos factores de crecimiento son estímulos mitogénicos muy potentes e

inducen, además de una primera fosforilación rápida de estas kinasas, una segunda onda de fosforilación más prolongada en el tiempo.

Puesto que el tratamiento con RA provocaba una rápida activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT, se planteó la posibilidad de que también

produjera cambios en la fosforilación de las ERKs en células SH-SY5Y. Para abordar esto, se realizó western blot a partir de extractos de células SH-SY5Y tratadas con RA a diferentes tiempos y se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2 en Tirosina 204. Como control la membrana se reincubó con el anticuerpo ERK2, que reconoce tanto la forma fosforilada de ERK2 como la no fosforilada. En la figura 13 se muestra cómo la fosforilación de ERK aumenta considerablemente a los 5 minutos de tratamiento con RA y decae transcurridos 30 minutos del tratamiento. A los 120 minutos vuelve a observarse una cierta elevación de los niveles de ERK-P, aunque menor que la observada a tiempos cortos.

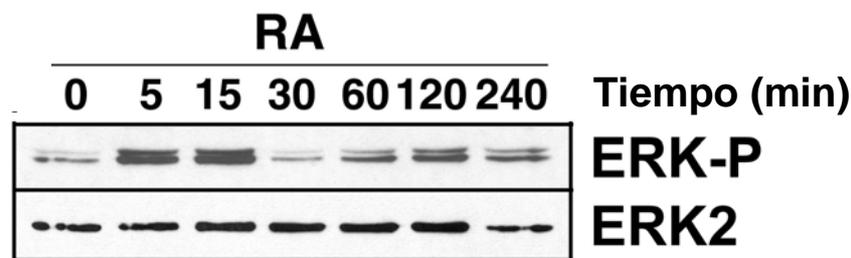


Figura 13. Activación rápida de la vía de señalización ERK1/2 por RA en células SH-SY5Y. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células SH-SY5Y de neuroblastoma tratadas con 1 μ M de RA a los tiempos que se indican en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2 (ERK-P) y frente a ERK total (ERK2).

2. Activación de PI3K/AKT y fosforilación de las MAPKs ERK1/2 inducida por RA en fibroblastos NIH-3T3

A continuación se quiso comprobar si la activación de PI3K/AKT por RA es exclusiva de células de neuroblastoma o es un fenómeno más general. Para ello, se emplearon células NIH-3T3, que poseen niveles apreciables de RAR γ (Figura 14A). Como se observa en la figura 14B, las células NIH-3T3 respondieron al tratamiento con RA con un incremento rápido y transitorio de la fosforilación de AKT, presentando una activación máxima entre 5 y 15 minutos, y un descenso a 30 minutos.

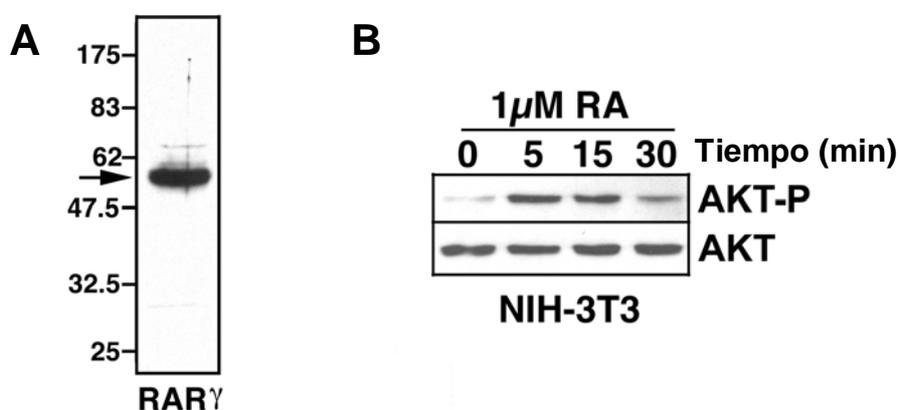


Figura 14. Activación de PI3K/AKT por RA en células NIH-3T3. **A**, Western blot. El carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células NIH-3T3 y fue incubado con el anticuerpo específico frente al receptor RAR γ . **B**, Western blot. Los carriles contienen 25 μ g de extracto total de proteínas de células NIH-3T3 tratadas con 1 μ M de RA a diferentes tiempos, tal y como se indica en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P, y con el anticuerpo frente a AKT total (AKT).

Esta activación no está influida por la presencia de suero, ya que ocurre en células que se han ayunado previamente con 0.5% NCS durante 16 horas antes de la administración de RA (Figura 14B), como en células no ayunadas y mantenidas continuamente en 10% NCS (Figura 15), si bien en este último caso el nivel basal de fosforilación de AKT es más elevado.

Para comprobar si la activación de la ruta PI3K/AKT por RA en estas células se producía a través de un mecanismo no genómico, como el descrito para células de neuroblastoma en el apartado anterior, se realizaron una serie de pretratamientos con inhibidores, previos a la estimulación con RA. Como se muestra en la figura 15, ni el inhibidor de la transcripción, actinomicina D, ni el de la síntesis de proteínas, cicloheximida, bloquearon la activación de AKT por RA. Dado que la interacción de la Tirosina Kinasa Src con el receptor de estrógenos ER es necesaria para la activación de la vía de MAPK (Migliaccio et al., 2000), se analizó si la inhibición de Src provocaba cambios en la activación de la vía de señalización de PI3K por RA. Como se observa en la figura 15, la inhibición de la Tirosina Kinasa Src por su inhibidor específico PP1 no modificó

el estado de activación de PI3K por RA. Como era previsible, la fosforilación de AKT inducida por RA requiere la actividad de PI3K, y fue inhibida por su inhibidor específico LY294002.

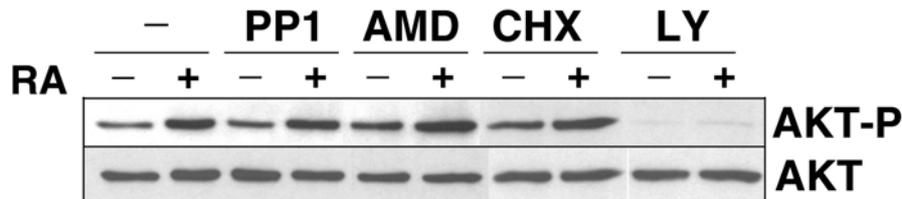


Figura 15. La activación de PI3K/AKT en células NIH-3T3 por RA no requiere ni transcripción de nuevos genes ni proteínas de nueva síntesis. Western blot. Los carriles contienen 25 μ g de extracto total de proteínas de células NIH-3T3 pretratadas durante 30 minutos con 10 μ M de PP1, 1 μ g/ml de Actinomicina D (AMD), 10 μ g/ml de cicloheximida (CHX), o 10 μ M de LY294002 (LY) y después tratadas con 1 μ M de RA durante 15 minutos en presencia del inhibidor (+) o no tratadas con RA (-). La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y frente a AKT total (AKT).

A continuación se comprobó si la vía de señalización de ERK1/2 también respondía al tratamiento por RA en estas células no neurales. Como se observa en la figura 16, las células NIH-3T3 respondieron al tratamiento con RA con un rápido incremento de la fosforilación de ERK.

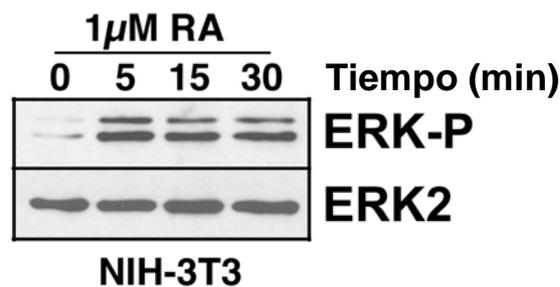


Figura 16. Activación rápida de la vía de señalización de ERK1/2 por RA en células NIH-3T3. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células NIH-3T3 ayunadas previamente con 0.5% NCS durante 16 horas antes de la administración de 1 μ M de RA a los tiempos indicados en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2 (ERK-P), y con el anticuerpo frente a ERK total (ERK2).

3. Implicación del Receptor Nuclear RAR en la activación de PI3K/AKT

Se han descrito una variedad de acciones rápidas no genómicas mediadas por hormonas esteroides y por señales mediadas por receptores nucleares, consistentes en la regulación de señalización intracelular (Losel et al., 2003; Levin, 2005). En esta última década existe una gran controversia sobre la implicación de los receptores nucleares de hormonas en este tipo de acciones. Existen evidencias que sugieren que en estas acciones podrían estar implicados otro tipo de receptores, como el receptor intracelular transmembrana acoplado a proteína G denominado GPR30 (Filardo et al., 2002; Revankar et al., 2005). Sin embargo, cada vez existen más evidencias de que son los receptores nucleares de hormonas los responsables de las acciones no genómicas de las hormonas esteroides, especialmente para el receptor de estrógenos (ER) (Migliaccio et al., 1996; Chambliss et al., 2002; Razandi et al., 2004). Dada la implicación de receptores nucleares en vías de señalización, se quiso establecer la participación del receptor nuclear RAR en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT.

3.1 Ensayos de sobreexpresión

Lo primero que se hizo fue establecer si la sobreexpresión de RAR α afectaba a la activación de PI3K/AKT. Para ello, se generó una línea de células NIH-3T3 que sobreexpresaba el receptor RAR α , a través de un vector retroviral, y se hicieron tratamientos con RA a diferentes tiempos. Como muestra la figura 17, la sobreexpresión de RAR α , no resulta en una mayor activación de AKT por RA, sino que incluso se reduce, en relación a la activación por RA que se produce en la línea control 3T3-LacZ. Aunque parezca sorprendente, no se produce mayor activación de PI3K aunque exista mayor cantidad de RAR α , lo que podría estar indicando un posible paso limitante o saturable en la activación de la vía PI3K/AKT.

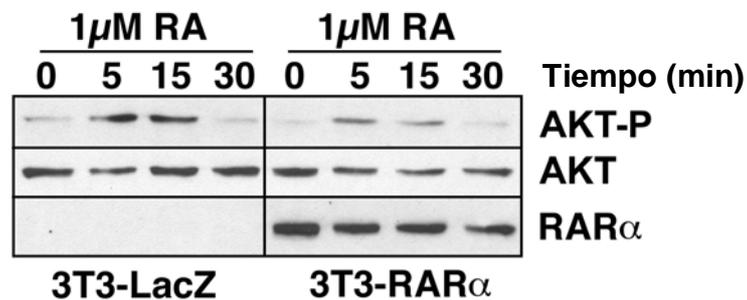


Figura 17. Sobre-expresión de RAR α en células NIH-3T3. Western blot. Los carriles contienen 25 μ g de extracto total de proteínas de la línea celular 3T3-RAR α y de 3T3-LacZ, tratadas con 1 μ M de RA a los tiempos indicados en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P, frente a AKT total (AKT) y frente a RAR α .

Para seguir estudiando la implicación de RAR en la vía de activación de PI3K/AKT se utilizaron células COS-7, que poseen niveles endógenos muy bajos del receptor RAR (Berkenstam et al., 1992). Como se observa en la figura 18A, tras el tratamiento de estas células con RA se observa una respuesta muy débil en la fosforilación de AKT. Sin embargo, tras la transfección transitoria de un vector de expresión para el receptor RAR α , se vio un aumento de la capacidad del RA de activar la vía de PI3K/AKT (Figura 18B).

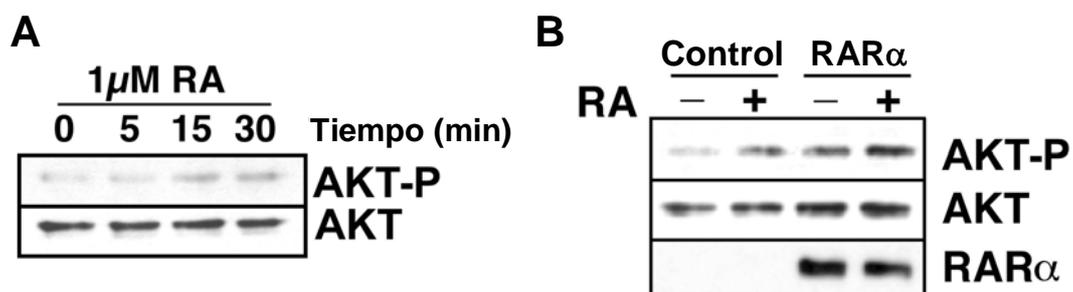


Figura 18. Activación de PI3K/AKT en células COS-7 transfectadas con RAR α . **A**, Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células COS-7 tratadas con 1 μ M de RA a diferentes tiempos indicados en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y frente a AKT total. **B**, Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células COS-7 transfectadas con un vector de expresión para RAR α , y tratadas (+) o no tratadas (-) posteriormente con 1 μ M de RA durante 10 minutos. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P, con el anticuerpo frente a AKT total (AKT) y con el anticuerpo frente a RAR α .

Como se puede observar, este aumento de los niveles de P-AKT en presencia de RA no es muy elevado, en comparación con los niveles de RAR α que se alcanzan en estas células.

3.2 Ensayos farmacológicos

La activación de la vía PI3K/AKT ocurría cuando se aplicaban tratamientos de RA a dosis farmacológicas (1 μ M). Para comprobar si esta activación se producía a dosis más cercanas a las fisiológicas, se llevaron a cabo unos tratamientos en células SH-SY5Y con concentraciones crecientes de RA (0.01-5 μ M). En la figura 19 se puede observar como a una concentración de 10 nM de RA se da un aumento en la fosforilación de AKT, respecto al control, y como este aumento se mantiene en los otros tratamientos de mayor concentración de RA. Es decir, la activación de la vía PI3K/AKT ocurre a concentraciones de RA compatibles con la Kd obtenida para el receptor RAR, en el rango nanomolar (Yang et al., 1991).

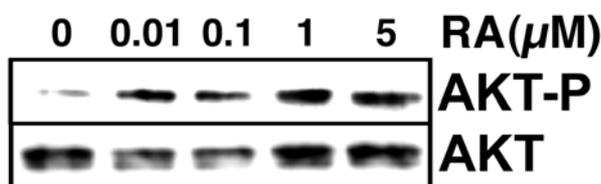


Figura 19. La activación de la vía PI3K/AKT ocurre a concentraciones de RA compatibles con la kd del receptor RAR. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células SH-SY5Y tratadas con concentraciones crecientes de RA durante 15 minutos, tal y como se indica en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y frente a AKT total (AKT).

Lo siguiente que se estudió fue analizar el efecto de diferentes agonistas del RAR sobre la activación de la vía PI3K/AKT. Como se observa en la figura 20, tanto los isómeros de RA, 9-cis-RA y 13-cis-RA, como los retinoides sintéticos TTNPB, Am580, fenretinida (4-HPR), ALRT1550 y LG100567 fueron capaces de activar la fosforilación de AKT en Ser473, lo que constituye una evidencia farmacológica de la implicación de RAR en la activación de PI3K/AKT.

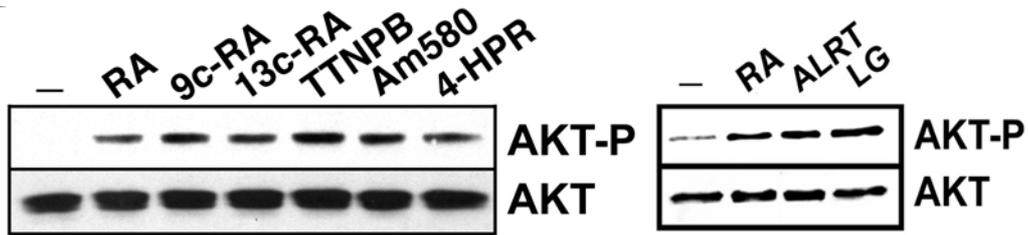


Figura 20. Activación de PI3K/AKT por diferentes agonistas de RAR. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células de neuroblastoma tratadas durante 10 minutos con 1 μ M de todo-trans-RA (RA), 9-cis-RA (9c-RA), 13-cis-RA (13c-RA), TTNPB, Am580, N-(4-Hydroxyphenyl)-retinamida (fenretinida, 4-HPR), ALRT1550 y LG100567. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y frente a AKT total (AKT).

Sorprendentemente el tratamiento con el antagonista AGN193109 no bloqueó la activación de PI3K por RA o TTNPB (Figura 21A), sino más bien se comportó como un agonista, dado que, por sí solo fue capaz de activar la vía PI3K/AKT. Como control, se realizó un Northern blot con RNA de células tratadas con RA en presencia del antagonista AGN193109. Como se observa en la figura 21B, AGN193109 evitó la activación transcripcional de *RAR β* , uno de los principales genes regulados por RA en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

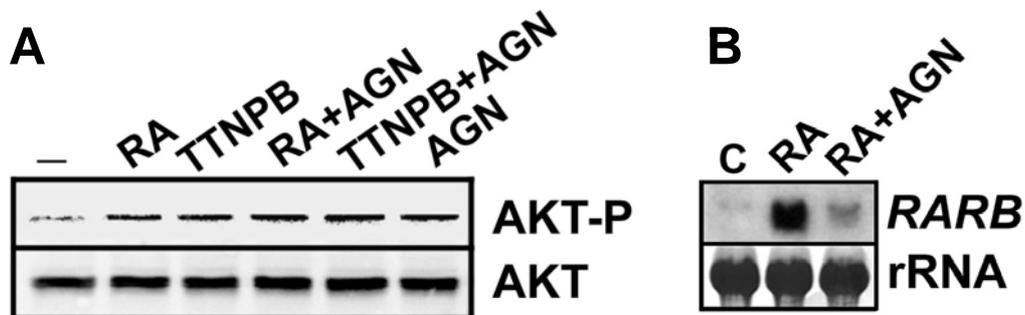


Figura 21. Efecto del antagonista transcripcional de RAR AGN193109 sobre la activación de PI3K por agonistas del RAR α . **A**, Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células de neuroblastoma tratadas durante 10 minutos con 0.5 μ M RA (RA), 0.5 μ M TTNPB (TTNPB), 0.5 μ M RA y 5 μ M AGN193109 (RA+AGN), 0.5 μ M TTNPB y 5 μ M AGN193109 (TTNPB+AGN), y 5 μ M AGN193109 (AGN). La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P, y con el anticuerpo frente a AKT total (AKT). **B**, Northern blot. Cada carril contiene 15 μ g de RNA total extraído de células SH-SY5Y tratadas con 0.5 μ M RA (RA), o 0.5 μ M RA y 5 μ M AGN193109 (RA+AGN) durante 24 h. El blot fue hibridado con una sonda específica de *RAR β* (3 Kb). El ARN ribosómico 28s se muestra como control de carga en el blot teñido con azul de metileno.

Por tanto, parece que AGN193109 presenta un perfil disociado, comportándose como antagonista transcripcional y como agonista para la activación de la vía de PI3K/AKT.

3.3 Ensayos en células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}

Como muestran los resultados del apartado 1 y 2, células que poseen niveles apreciables de receptor RAR, como las células de neuroblastoma SH-SY5Y y las células NIH-3T3, muestran una activación de la vía PI3K en presencia de RA. Por el contrario, en células COS-7 que poseen niveles endógenos de RAR muy bajos, observamos una respuesta muy débil en la activación de PI3K por RA. Sin embargo, tras la transfección transitoria de RAR α , incrementa marcadamente la capacidad de RA de activar la vía de PI3K/AKT. Del mismo modo, no esperaríamos activación de la vía PI3K al utilizar una línea celular en la que no hubiera expresión endógena del receptor RAR. Por ello, se utilizó la línea celular de fibroblastos MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} (Altucci et al., 2005) proveniente de embriones de ratón en los que existe una inactivación simultánea de los genes que codifican los subtipos del receptor RAR (RAR α , RAR β y RAR γ), y se analizó el estado de activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT en presencia de RA. Para ello, se realizó western blot a partir de extractos totales de células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} tratadas con RA a diferentes tiempos y utilizamos un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de AKT. Como control positivo de activación de PI3K, se emplearon extractos de células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} estimuladas durante 10 minutos con 10% de suero tras un ayuno de 16 horas con medio DMEM + 0.5% de suero. Tal y como se observa en la figura 22, en estas células que carecen del receptor RAR, el RA no fue capaz de activar la vía de señalización de PI3K/AKT.

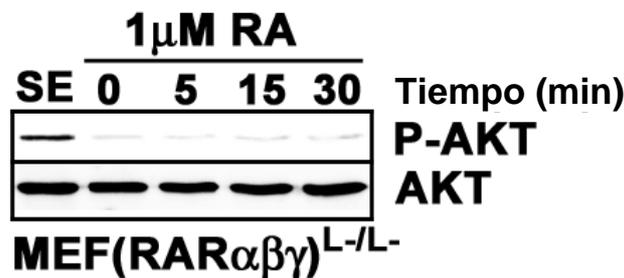


Figura 22. El RA no induce activación de la vía PI3K en células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}. Cada carril contiene 25 μg de extracto total de proteínas de células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} tratadas con 1 μM de RA a los tiempos indicados en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y frente a AKT total (AKT); (SE, células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} estimuladas durante 10 minutos con 10% suero tras un ayuno de 16 horas).

La falta de RAR resulta en la pérdida de la capacidad de activar la vía de PI3K por RA. La demostración de la implicación del receptor RAR requiere que la re-expresión de RAR resulte en la recuperación de esa capacidad. Para ello, se generó una línea estable de células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} que sobreexpresaba el receptor RAR α , a través de un vector retroviral, y se hicieron tratamientos con RA a diferentes tiempos. Como muestra la figura 23, la sobreexpresión de RAR α , incrementó marcadamente la capacidad del RA de activar la vía de PI3K/AKT. Esto corroboraba las evidencias anteriores de la implicación de RAR en la activación de la vía PI3K.

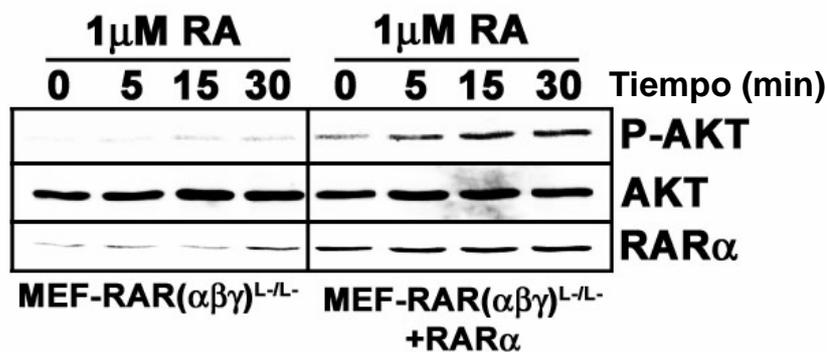


Figura 23. Sobre-expresión de RAR α en células MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}-RAR α . Western blot. Los carriles contienen 25 μg de extracto total de proteínas de la línea celular MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-} y de MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}-RAR α , tratadas con 1 μM de RA a los tiempos indicados en la figura. La membrana se incubó secuencialmente con AKT-P, AKT y RAR α .

3.4 La actividad PI3K está asociada al receptor RAR en presencia de RA

Para más confirmación de la implicación del receptor RAR en la activación de la vía PI3K/AKT, se estudió si el tratamiento con RA de células SH-SY5Y daba lugar a una asociación física entre la actividad PI3K y el receptor RAR α . Para ello, se llevaron a cabo reacciones de inmunoprecipitación con el anticuerpo RAR α , con las que se realizó un ensayo kinasa *in vitro*, en el que se cuantifica la generación de fosfatidilinositol-3-fosfato a partir de fosfatidilinositol y [γ -³²P]-ATP. En la figura 24 se puede observar generación de fosfatidilinositol-3-fosfato tanto en el caso de los extractos inmunoprecipitados con la subunidad p110-PI3K, como en el caso de extractos inmunoprecipitados con RAR α en presencia de RA. Estos resultados, pues, parecen indicar que existe una asociación física entre el receptor RAR y la actividad PI3K, pero únicamente en presencia de RA.

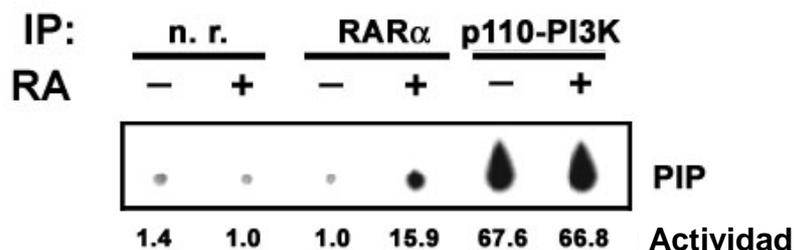


Figura 24. Asociación física en presencia de RA entre el receptor RAR α y la actividad PI3K en células SH-SY5Y. Se presenta un detalle de la autorradiografía de la placa de cromatografía en capa fina, donde se observa la generación de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP) *in vitro*. 150 μ g de proteínas de extractos totales de células SH-SY5Y, tratadas (+) o no tratadas (-) con 1 μ M de RA durante 10 minutos, se incubaron con 5 μ g del anticuerpo RAR α o p110-PI3K. Como control, se realizaron en paralelo reacciones de inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado (n.r.). Los inmunocomplejos se precipitaron con proteína A/G PLUS-Agarosa realizándose, a continuación, ensayos kinasa, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Los datos numéricos de actividad se obtuvieron mediante cuantificación de la señal con el analizador de imagen FLA-5000 Fujifilm.

4.- Papel de la localización intracelular de RAR α en la activación de la vía PI3K/AKT

4.1 Localización de RAR en la membrana plasmática mediante fusión al dominio de Miristilación de *c-Src*

Una de las paradojas de las acciones no genómicas de los Receptores Nucleares es que han de iniciarse en la membrana plasmática, mientras que el receptor, como su nombre indica, es de localización nuclear. Hay evidencias que apoyan la idea de que una pequeña sub-población (en torno al 1-2% para el ER (Razandi et al., 1999)) de receptores podría estar localizada en la membrana plasmática, y podría ser responsable de este tipo de acciones no genómicas (Capiati et al., 2002). Nosotros pensamos que quizás el paso limitante comentado en el apartado 3.1 pudiera ser la presencia del RAR en la membrana plasmática. Se desconoce también si la unión del ligando puede desempeñar un papel en la translocación del receptor nuclear a la membrana plasmática. Para analizar esta cuestión, se generaron receptores quiméricos que contenían una señal de localización en la membrana plasmática (señal de miristilación de *Src*), con el objetivo de dirigir ectópicamente al receptor RAR α a la membrana plasmática.

En células NIH-3T3 se generó una línea estable que sobreexpresaba el receptor *Myr*-RAR α , mediante un vector retroviral. Como control se utilizó la línea 3T3-RAR α , que expresa el receptor RAR α (ver apartado 3.1). Para comprobar la localización de la proteína de fusión, se realizó un experimento de fraccionamiento celular en células 3T3-RAR α y 3T3-*Myr*-RAR α . En la figura 25 se puede observar la distribución de RAR α en ambos tipos de células transfectadas. En ambos tipos celulares, la mayoría de RAR α está en la fracción nuclear, como era de esperar. En las células 3T3-*Myr*-RAR α se detectan cantidades notables de RAR α en la fracción microsomal y en la membrana plasmática, que no se detectan en la línea 3T3-RAR α .

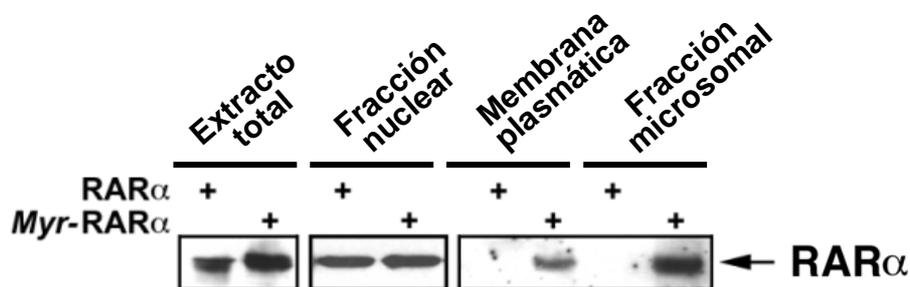


Figura 25. Localización intracelular del RAR α y Myr-RAR α en células NIH-3T3 transfectadas. Western blot de células 3T3-RAR α y 3T3-Myr-RAR α . Los carriles contienen 8 μ g de los diferentes extractos proteicos obtenidos por fraccionamiento subcelular de las células NIH-3T3 transfectadas: extracto total, proteínas de la fracción nuclear, de membrana plasmática y de fracción microsomal. La membrana se incubó con un anticuerpo específico frente al receptor RAR α .

4.2 La proteína de fusión Myr-RAR α se localiza en microdominios de la membrana plasmática (*lipid rafts*)

Dado que los *lipid rafts* son microdominios considerados como plataformas donde confluyen tanto receptores de membrana como sus sistemas efectores facilitando su interacción y consiguiente señalización, se estudió la posible localización del receptor RAR y Myr-RAR en estos microdominios de membrana. Tradicionalmente la presencia de proteínas en *lipid rafts* ha sido analizada aprovechando la característica de los *rafts* de ser insolubles en detergentes no iónicos, pudiendo ser así aislados por flotación en un gradiente de sacarosa. Esta fue la técnica que se utilizó para aislar *lipid rafts* de células NIH-3T3 (Cabrera-Poch et al., 2004), pero con algunas modificaciones. Para ello se lisaron células NIH-3T3 que sobreexpresaban RAR α y Myr-RAR α con tampón que contenía 0.25% Tritón X-100. Los lisados fueron centrifugados 18 h en frío en un gradiente de sacarosa, y se recogieron 10 fracciones de 0.4 ml. Como se puede observar en la figura 26, la caveolina 1, residente en *rafts*, se localiza mayoritariamente en las fracciones 2 y 3. La proteína de fusión MyrRAR α , sí se localiza en *rafts* en células NIH-3T3. Por el contrario, se observa que en células que sobreexpresan el receptor RAR α , éste se acumula en las fracciones de alta densidad.

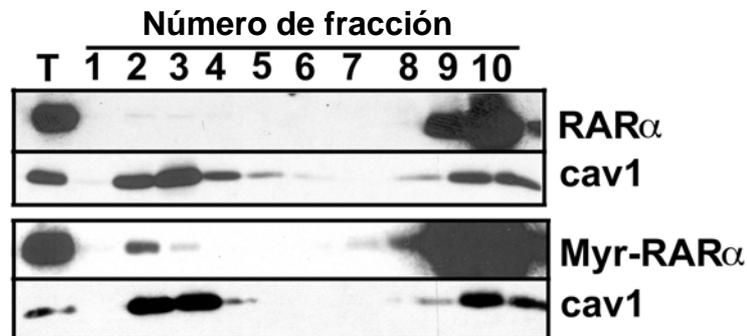


Figura 26. La proteína de fusión Myr-RAR α se localiza en microdominios de la membrana plasmática (*lipid rafts*). Western blot de células NIH-3T3 que sobreexpresan RAR α y Myr-RAR α . Los lisados celulares fueron fraccionados por gradiente de sacarosa. Se recogieron 10 fracciones de 0.4 ml (fracciones 1-10) tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. La membrana se incubó con un anticuerpo específico frente a RAR α y después con un anticuerpo frente a caveolina-1 (cav1) para la detección de las fracciones que contienen *lipid rafts* de baja densidad.

4.3 La expresión dirigida de RAR α en la membrana plasmática incrementa la activación de la vía de señal PI3K/AKT

Tras comprobar que esta proteína de fusión MyrRAR α se localizaba parcialmente en la membrana plasmática, se analizó su potencial de activar la vía de señalización de PI3K/AKT. Se realizaron transfecciones transitorias en células COS-7 con los vectores de expresión pCEFL-RAR α y pCEFL-Myr-RAR α . Como muestra la figura 27, la fosforilación de AKT se incrementa muy notablemente en las células transfectadas con Myr-RAR α , respecto las transfectadas con RAR α . Sorprendentemente, en Myr-RAR α la adición de RA no resulta en un incremento de la fosforilación de AKT, como en el caso de RAR α . Esto indicaba que la localización del receptor RAR α en la membrana plasmática incrementa su capacidad de activar la vía de señalización de PI3K/AKT. Sin embargo, una vez el RAR está localizado en la membrana plasmática, no parece requerir de la unión del ligando para activar PI3K.

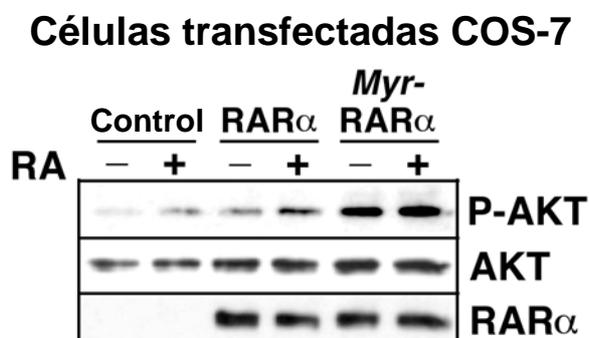


Figura 27. Efecto de la localización del receptor RAR α en la activación de PI3K/AKT. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto de proteínas de células COS-7 transfectadas transitoriamente con un plásmido vector, con el plásmido pCEFL-RAR α o con el plásmido pCEFL-Myr-RAR α , en presencia (+) o ausencia (-) de 1 μ M de RA. La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P, AKT total (AKT), y RAR α para comprobar la correcta transfección.

4.4 La unión de RA induce la translocación del receptor RAR γ a la membrana plasmática

En vista de los resultados anteriores, se planteó la hipótesis de que el RA pudiera jugar un papel en la localización del receptor en la membrana plasmática. Para analizar en más detalle esto, se estudió la localización del receptor endógeno RAR γ en células NIH-3T3 tratadas con RA mediante experimentos de fraccionamiento celular. Los resultados mostraron que, aunque la mayoría del receptor estaba localizado en el núcleo al igual que en las células NIH-3T3 que sobreexpresaban RAR α y Myr-RAR α , el tratamiento con RA producía un incremento muy notable de la presencia de RAR γ en las fracciones de membrana (tanto fracción microsomal como fracción de membrana plasmática) (Figura 28). Esto sugería que la unión del RA inducía la translocación de RAR γ a la membrana plasmática.

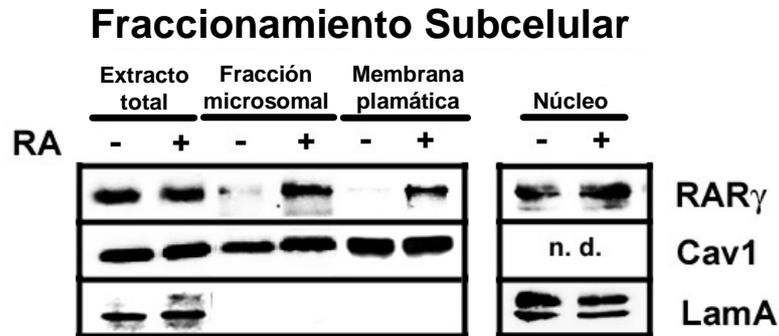


Figura 28. El receptor RAR es translocado a membrana plasmática en células NIH-3T3 tratadas con RA. Western blot. Los extractos totales, fracción nuclear, fracción microsomal y fracción de membrana plasmática se obtuvieron mediante gradientes de sacarosa tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Se cargaron cantidades iguales de extractos proteicos de células tratadas con 1 μ M de RA durante 10 minutos (+) que de células no tratadas (-). La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a RAR γ , caveolina-1 (Cav1) y lamina A (LamA). (n.d., no realizado).

4.5 Análisis de la localización intracelular de RAR mediante fusión con GFP y microscopía confocal

El gen de la GFP (*green fluorescent protein*) ha sido de gran utilidad en el estudio de la localización intracelular de numerosas proteínas. Esto se consigue mediante la construcción de genes quiméricos formados por el gen de la GFP fusionado al gen de la proteína de interés. Con este sistema tratamos de comprobar mediante microscopía confocal la localización de RAR α en membrana plasmática observada en los experimentos de fraccionamiento subcelular. Una vez generada la fusión GFP-RAR α , se realizaron transfecciones transitorias en células COS-7 y se examinaron mediante microscopía confocal. Los resultados de este análisis mostraron que, aunque en la mayoría de células transfectadas, el receptor RAR α presentaba una distribución nuclear, en una minoría de células también se podía observar sobre la zona de membrana plasmática (Figura 29B).

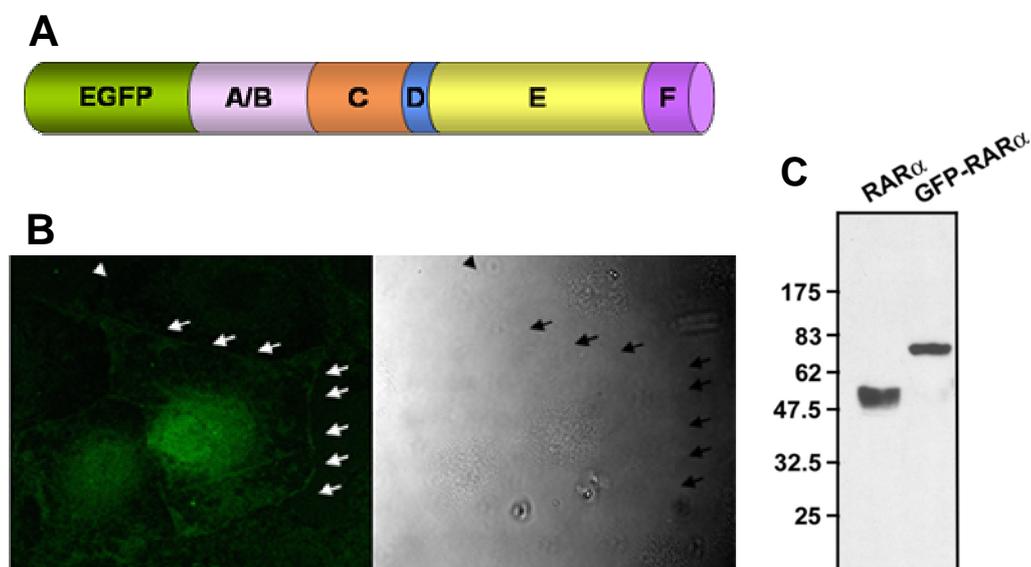


Figura 29. Localización intracelular e inmunodetección de la proteína de fusión GFP-RAR α en células COS-7. **A**, Representación gráfica de la fusión de GFP en el extremo N-terminal de la proteína RAR α . **B**, Microscopía confocal de las células COS-7 transfectadas con el plásmido pEGFP-RAR α . **C**, Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto de proteínas de células COS-7 transfectadas transitoriamente con el plásmido pCEFL-RAR α o con el plásmido pEGFP-RAR α . La membrana se incubó con el anticuerpo específico frente al receptor RAR α .

Sin embargo, no se observó un efecto claro de la adición de RA sobre la localización del receptor RAR en la membrana plasmática. Como comprobación de la correcta expresión de la proteína de fusión GFP-RAR α en las células COS-7, se realizó western blot a partir de extractos de células COS-7 transfectadas con el plásmido pCEFL-RAR α o con el plásmido pEGFP-RAR α (Figura 29C).

4.6 La desorganización del citoesqueleto afecta a la activación de PI3K/AKT por RA

La translocación de RAR a la membrana plasmática debería implicar a componentes del citoesqueleto. Analizamos si la disrupción del citoesqueleto

mediante inhibidores específicos tiene influencia en la activación de PI3K/AKT por RA en células SH-SY5Y. Para ello, se realizaron una serie de pretratamientos en células de neuroblastoma con Colchicina o Nocodazol (inhibidores de microtúbulos) o Citocalasina B (inhibidor selectivo de microfilamentos de actina), antes de ser tratadas con 1 μ M de ácido retinoico durante 10 minutos. Como se muestra en la figura 30, ninguno de los inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, colchicina o nocodazol, bloquearon la activación de la vía de PI3K/AKT por RA. En cambio, las células tratadas con citocalasina B, que desorganiza el esqueleto de actina, aunque presentaban un mayor nivel basal de fosforilación de AKT en células no tratadas con RA, éste no se veía aumentado tras la administración de RA.

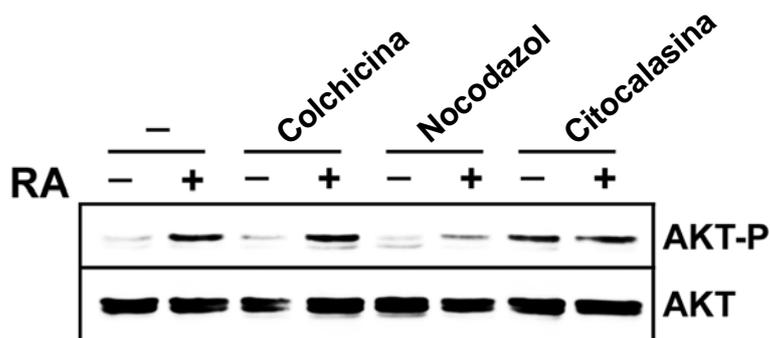


Figura 30. La activación de la vía PI3K/AKT por RA es inhibida por agentes que desorganizan el esqueleto de actina. Western blot. Los carriles contienen 25 μ g de extracto total de proteínas de células SH-SY5Y pretratadas durante 120 minutos con 1 μ M de colchicina y 25 μ M de nocodazol, y durante 10 minutos con citocalasina B. A continuación, las células fueron tratadas con 1 μ M de RA durante 10 minutos en presencia del inhibidor (+) o no tratadas con RA (-). La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y AKT total (AKT).

5. Localización del dominio responsable de la activación de PI3K/AKT en el receptor nuclear RAR

5.1 El dominio C-terminal de RAR es necesario para la activación de la vía de señal PI3K/AKT

Para caracterizar el dominio de RAR implicado en la activación de la vía de PI3K/AKT, se aprovechó la capacidad de *Myr-RAR α* de activar dicha vía independientemente de la presencia de su ligando y se preparó una serie de mutantes de delección de distintos dominios del receptor RAR. En la figura 31 se muestra un esquema de la organización funcional del receptor RAR α , *Myr-RAR α* y de los 3 mutantes de delección, *Myr-RAR α (2-153)*, *Myr-RAR α (154-462)* y *Myr-RAR α (2-390)*.

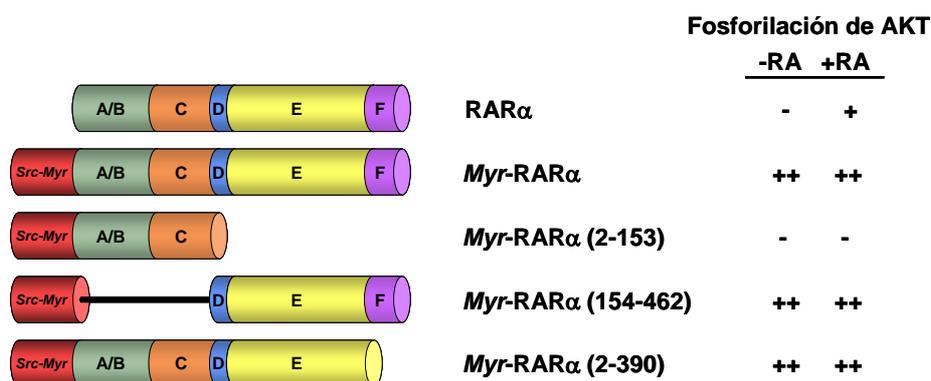


Figura 31. Capacidad de las diferentes construcciones de RAR α de activar la vía PI3K/AKT. A la izquierda de la figura se muestra una representación gráfica de los dominios del receptor RAR α y de los diferentes mutantes de delección. A la derecha se observa la capacidad de estos mutantes de RAR α de activar (+) o no (-) la fosforilación de AKT, en presencia o ausencia de 1 μ M de RA durante 10 minutos.

Se realizaron transfecciones transitorias en células COS-7 con los vectores de expresión para cada una de estas construcciones, y a continuación se trataron

las células con RA. La figura 31 representa un resumen de los resultados obtenidos en estos experimentos.

Como se ha descrito en la figura anterior, la transfección de *Myr-RAR α* produce un incremento notable de la fosforilación de AKT, pero se pierde la capacidad de regulación por RA. Los experimentos con los mutantes *Myr-RAR α (2-153)* y *Myr-RAR α (154-462)* demuestran que la mitad C-terminal del RAR (dominios DEF) está implicada en la activación de la vía PI3K/AKT, aunque independientemente de la presencia de RA.

Reforzando esta última idea, el mutante *Myr-RAR α (2-390)*, que deleciona el dominio F y las hélices 12 y 11 del dominio E y no tiene capacidad de unir RA (Pratt et al., 1990; Kruyt et al., 1992; Tate et al., 1994), es capaz de activar la fosforilación de AKT.

5.2 Mapeo por deleción de la región de RAR implicada en la activación de la vía de señal de PI3K/AKT

Dado que la mitad C-terminal del receptor RAR estaba implicada en la activación de la vía PI3K/AKT, se planteó caracterizar más detalladamente qué zona de la región comprendida entre los aminoácidos 154 y 390 del RAR α era la responsable de tal activación. La capacidad de activación de la vía de PI3K independientemente de la presencia de ligando, que le confiere la señal de localización *Myr* al receptor *Myr-RAR*, nos ha permitido caracterizar más detalladamente la región del receptor implicada en la activación de la vía de PI3K/AKT. Se generaron distintas construcciones con nuevos mutantes de deleción de *Myr-RAR α* . La figura 32 es una representación gráfica de los mutantes de deleción de la región C-terminal, *Myr-RAR α (2-153)*, *Myr-RAR α (2-206)*, *Myr-RAR α (2-282)*, *Myr-RAR α (2-345)*, *Myr-RAR α (2-390)* y del receptor *Myr-RAR α* .

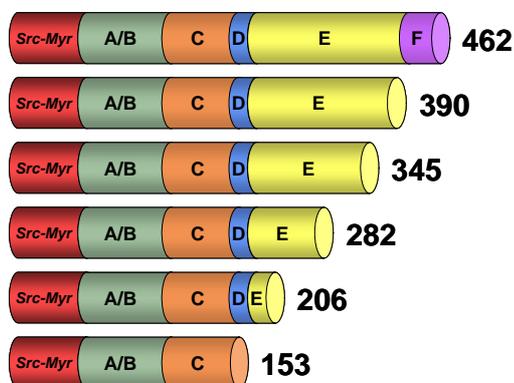


Figura 32. Esquema de los mutantes de delección en el C-terminal de *Myr-RARα*. Esquema de los diferentes mutantes de delección de *RARα* que se clonaron en el vector de expresión pCEFL.

La capacidad de activación de PI3K/AKT de estos mutantes se estudió mediante experimentos de transfección transitoria en células COS-7. Como se puede observar en la figura 33, los mutantes de delección de la región comprendida entre 462-282 presentaban unos niveles similares de fosforilación de AKT. Sin embargo, al deleccionar la región entre los aminoácidos 206 y 282 de *RARα*, la fosforilación disminuía drásticamente, lo que sugería la implicación de esta región en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT.

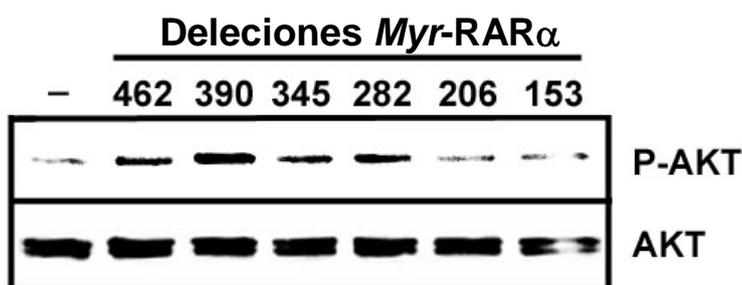


Figura 33. Capacidad de activación de PI3K/AKT de los diferentes mutantes de delección de *RARα*. Western blot. Cada carril contiene 25 μ g de extracto total de proteínas de células COS-7 transfectadas con vectores de expresión para cada una de las delecciones de *RARα*, pCEFL, pCEFL-*Myr-RARα*462, pCEFL-*Myr-RARα*(2-390), pCEFL-*Myr-RARα*(2-345), pCEFL-*Myr-RARα*(2-282), pCEFL-*Myr-RARα*(2-206) y pCEFL-*Myr-RARα*(2-153). La membrana se incubó secuencialmente con el anticuerpo frente a AKT-P y AKT total (AKT).

En esta región del extremo C-terminal, que incluye las hélices H3, H4 y H5 de la estructura tridimensional de RAR, se localiza un motivo muy conservado en todos los miembros de la superfamilia de los Receptores Nucleares de Hormonas (Wurtz et al., 1996) (Figura 34).

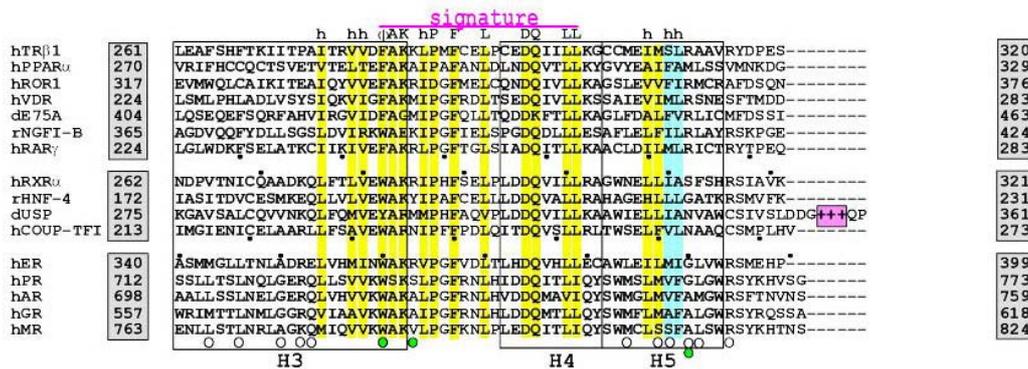


Figura 34. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región que contiene las hélices H3, H4 y H5 de diferentes receptores nucleares. A la izquierda de la figura se muestra un listado de los diferentes receptores alineados. Los números que se encuentran dentro de los recuadros de color gris corresponden al aminoácido inicial y final de la secuencia alineada de cada receptor. Adaptado de Wurtz (Wurtz et al., 1996).

6. Interacciones entre el receptor RAR α y las subunidades de PI3K

Los resultados del apartado 3.4 (Figura 24) sugieren que el mecanismo de activación de la vía PI3K/AKT implica una asociación entre RAR y PI3K. Por ello se planteó estudiar las interacciones entre RAR y las subunidades de PI3K.

6.1 Interacción entre RAR α y la subunidad reguladora p85 de PI3K

Con el objetivo de establecer si existe una interacción física entre RAR y la subunidad reguladora p85 de PI3K, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en células SH-SY5Y. A partir de extractos totales de proteínas de células de neuroblastoma tratadas con RA y no tratadas, se inmunoprecipitó con un anticuerpo específico frente RAR α .

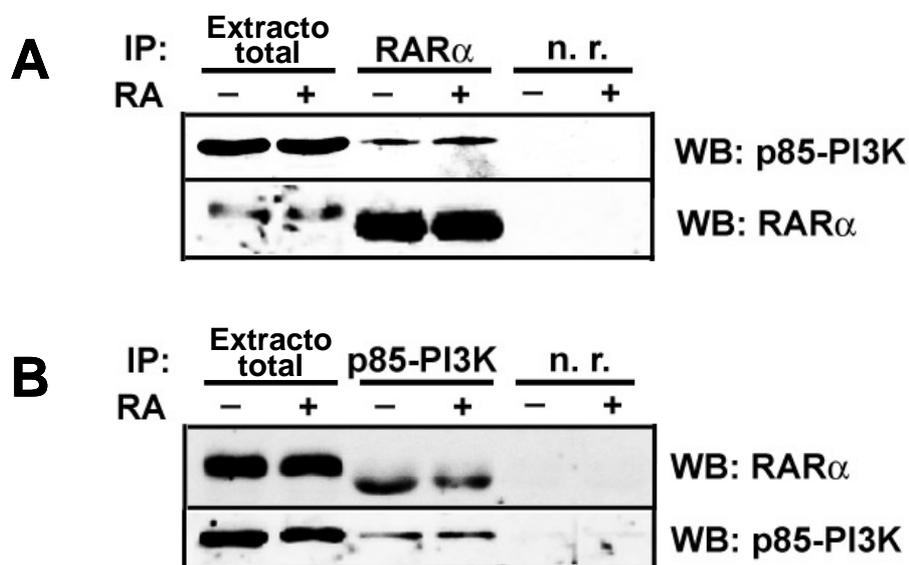


Figura 35 Interacción entre RAR α y p85-PI3K en células SH-SY5Y. Western blot. 150 μ g de proteínas de extractos totales de células SH-SY5Y, tratadas (+) o no tratadas (-) con 1 μ M de RA durante 10 minutos, se incubaron con 5 μ g del anticuerpo RAR α (Figura 34A) o con 5 μ g del anticuerpo p85-PI3K (Figura 35B). Como control, se realizaron en paralelo reacciones de inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado (n.r.). Los inmunocomplejos se precipitaron utilizando las beads anti-rabbit IgG (eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se resuspendieron en tampón de carga con 50mM DTT. La membrana se incubó con anticuerpos frente a p85-PI3K y RAR α , utilizando como anticuerpo secundario *Rabbit Trueblot* (eBioscience). Notar la migración anómala de RAR α (aprox. 50 KDa) en los carriles de inmunoprecipitados, debido a una comigración con la cadena pesada de las IgG (aprox. 50 KDa), la cual en su forma reducida no se detecta con los anticuerpos secundarios TrueBlot.

Tal y como se observa en la figura 35, existe una interacción física constitutiva entre RAR α y la subunidad reguladora p85 de PI3K en células SH-SY5Y, que se puede observar tanto en las inmunoprecipitaciones realizadas con el anticuerpo frente al receptor RAR como en las realizadas con el anticuerpo frente a la subunidad p85-PI3K

Sorprendentemente, esta asociación entre RAR α y p85 se observa independientemente de la presencia de RA, y se puede detectar en extractos nucleares (Figura 36).

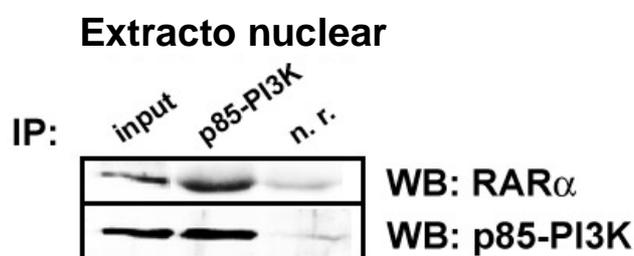


Figura 36. Interacción entre RAR α y p85-PI3K en extractos nucleares de células SH-SY5Y. Western blot. Se incubó 150 μ g de proteínas de extracto nuclear de células de neuroblastoma con 5 μ g del anticuerpo p85-PI3K. Como control, se realizó en paralelo una reacción de inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado (n.r.). Los inmunocomplejos se precipitaron como se indica en la leyenda de la figura 35. La membrana se incubó con anticuerpos frente a RAR α y p85-PI3K, utilizando como anticuerpo secundario *Rabbit Trueblot* (eBioscience). Notar la migración anómala de RAR α (aprox. 50 KDa) en los carriles de inmunoprecipitados, debido a una comigración con la cadena pesada de las IgG (aprox. 50 KDa), la cual en su forma reducida no se detecta con los anticuerpos secundarios TrueBlot.

6.2 La asociación de p110 al complejo RAR-p85-PI3K es dependiente de ligando

En el experimento de inmunoprecipitación realizado con RAR α (Figura 35) se observó la asociación de p110-PI3K al receptor RAR α inducida por RA tras procesar de nuevo la membrana con el anticuerpo frente a la subunidad p110. Resultados similares fueron obtenidos cuando se realizaron las inmunoprecipitaciones utilizando el anticuerpo frente a la subunidad catalítica p110 de PI3K (Figura 37). Estos resultados, en conjunto con los del apartado anterior, sugieren que la unión de RA al receptor RAR regula diferencialmente su interacción con las subunidades de PI3K, de modo que, mientras que RAR interacciona establemente con la subunidad reguladora p85-PI3K, tanto en presencia como en ausencia de RA, la asociación con la subunidad catalítica p110-PI3K se incrementa notablemente tras la adición del ligando.

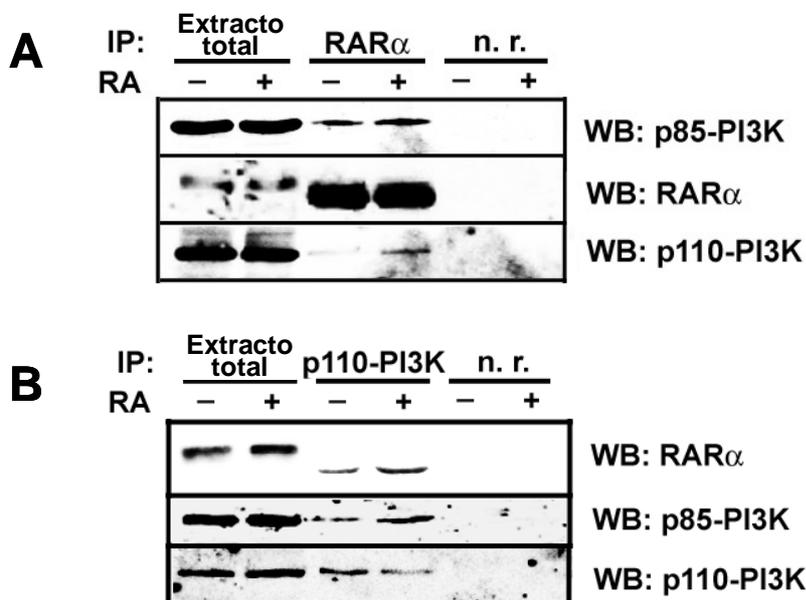


Figura 37. El tratamiento con RA incrementa la asociación de p110-PI3K al complejo RAR α -p85-PI3K en células SH-SY5Y. Western blot. 150 μ g de proteínas de extractos totales de células SH-SY5Y, tratadas (+) o no tratadas (-) con 1 μ M de RA durante 10 minutos, se incubaron con 5 μ g del anticuerpo RAR α (Figura 37A) o con 5 μ g del anticuerpo p110-PI3K (Figura 37B). Como control, se realizaron en paralelo reacciones de inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado (n.r.). Los inmunocomplejos se precipitaron como se indica en la leyenda de la figura 35. La membrana se incubó secuencialmente con anticuerpos frente a p85-PI3K, RAR α , y p110-PI3K (Figura 37A) o frente a RAR α , p85-PI3K y p110-PI3K (Figura 37B) utilizando como anticuerpo secundario *Rabbit Trueblot* (eBioscience). Notar la migración anómala de RAR α (aprox. 50 KDa) en los carriles de inmunoprecipitados, debido a una comigración con la cadena pesada de las IgG (aprox. 50 KDa), la cual en su forma reducida no se detecta con los anticuerpos secundarios TrueBlot.

6.3 La interacción entre p85-PI3K y RAR no parece ser directa

Dado que los resultados mostrados en el apartado 6.2 sugieren una interacción entre la subunidad p85-PI3K y el receptor RAR, lo siguiente que se determinó fue si se trataba de una interacción directa o no. Para llevar a cabo esto, se realizaron ensayos de co-transfección en células COS-7 con los vectores de expresión para RAR α y p85-PI3K. Transcurridas 48h de las transfecciones, se hicieron inmunoprecipitaciones con anticuerpos contra p85-PI3K. Como

muestran los resultados de la figura 38, no existe una interacción entre RAR α y p85-PI3K, lo cual estaría indicando que RAR α y la subunidad p85-PI3K no interactúan directamente sino que forman parte de un complejo de señalización en el que están implicadas otras proteínas, que favorecerían el ensamblaje del complejo.

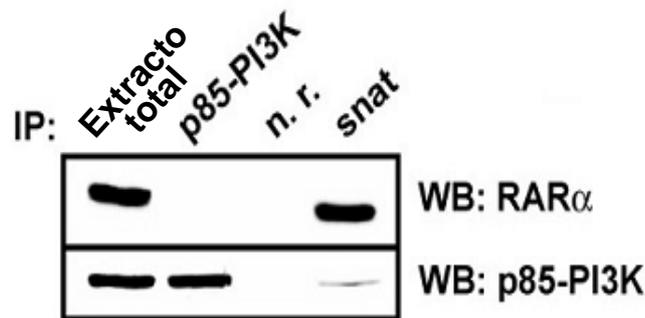


Figura 38. La interacción entre RAR α y p85-PI3K no es directa. Western blot. Células COS-7 co-transfectadas transitoriamente con vectores de expresión para p85-PI3K y para RAR α . Se incubó 150 μ g de proteínas de extractos totales con 5 μ g del anticuerpo p85-PI3K. Como control, se realizó en paralelo una reacción de inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado (n.r.). Los inmunocomplejos se precipitaron como se indica en la leyenda de la figura 35. La membrana se incubó con anticuerpos frente a RAR α y p85-PI3K, utilizando como anticuerpo secundario *Rabbit Trueblot* (eBioscience).

6.4 Ensayo de proteínas candidatas

Dado que en la interacción entre la subunidad p85-PI3K y el receptor RAR intervienen otras proteínas que facilitan la formación del complejo de señalización, se planteó estudiar la composición de dicho complejo. Para ello se buscó en la literatura posibles proteínas candidatas que presentaran interacciones con RAR y p85-PI3K.

En primer lugar nos planteamos estudiar la proteína MNAR (*modulator of nongenomic activity of the estrogen receptor*), proteína descrita como corregulador del receptor nuclear de estrógenos (ER). Se ha visto que la proteína MNAR interactúa con ER y con AR activando la vía de señalización de cSrc y MAPK/ERK (Wong et al., 2002; Unni et al., 2004). A pesar de que no se ha

descrito interacción con el receptor RAR, la elevada conservación entre los miembros de la superfamilia de los Receptores Nucleares de Hormonas, hace factible dicha interacción. Por otro lado, se ha descrito que MNAR también interacciona con la subunidad p85-PI3K (Vadlamudi et al., 2005). Por ello, se estudió si existía una interacción entre MNAR, y el receptor RAR o la subunidad p85-PI3K. Para ello, se realizaron experimentos de co-transfección en células COS-7 con los vectores de expresión para MNAR, p85-PI3K y RAR α , y después se realizaron inmunoprecipitaciones para ver las posibles interacciones. Tal y como se muestra en la figura 39, en nuestras condiciones no se observó ninguna interacción del receptor RAR α o de p85-PI3K con la proteína MNAR.

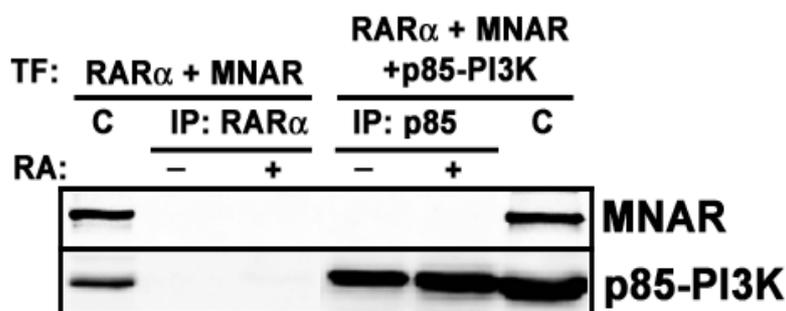


Figura 39. La proteína MNAR no interacciona con RAR α ni con p85-PI3K. Western blot. Células COS-7 co-transfectadas transitoriamente con vectores de expresión para p85-PI3K, RAR α y MNAR. Se incubó 150 μ g de proteínas de extractos totales de células tratadas (+) o no tratadas (-) con 1 μ M de RA durante 10 minutos, con 5 μ g del anticuerpo RAR α o p85-PI3K. Los inmunocomplejos se precipitaron como se indica en la leyenda de la figura 35. La membrana se incubó con anticuerpos frente a MNAR y p85-PI3K, utilizando como anticuerpo secundario *Rabbit Trueblot* (eBioscience). (TF: transfección).

Otra proteína candidata a participar en la formación del complejo de señalización fue la β -catenina, de la cual se había descrito su interacción *in vitro* con RAR (Easwaran et al., 1999) y asociación con p85-PI3K (Espada et al., 2005). Esta proteína ha sido encontrada en tres compartimentos celulares distintos: en membrana (formando parte del complejo de adhesión celular), en citoplasma (libre o asociada a proteínas de la vía de señalización de Wnt) o en el núcleo

(unida a factores de transcripción de la familia Tcf/LEF) (Hlsken y Behrens, 2000). Por este motivo, se propuso estudiar posibles interacciones entre esta proteína, RAR α y p85-PI3K. Para abordar esto, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de extractos de proteínas de células SH-SY5Y utilizando anticuerpos específicos frente a la β -catenina y RAR α . Los resultados del western blot se muestran en la figura 40, y como se puede apreciar se detecta asociación entre β -catenina y RAR α .

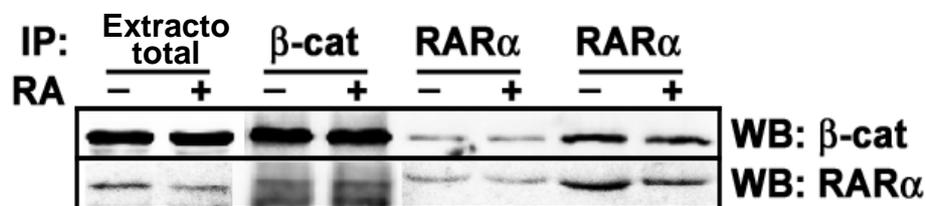


Figura 40. Interacción de β -catenina y RAR α . Western blot. 150 μ g de proteínas de extractos totales de células SH-SY5Y, tratadas (+) o no tratadas (-) con 1 μ M de RA durante 10 minutos, se incubaron con 5 μ g del anticuerpo β -catenina y RAR α . Los inmunocomplejos se precipitaron como se indica en la leyenda de la figura 35. La membrana se incubó con anticuerpos frente a β -catenina y RAR α .

Cuando se realizaron experimentos de co-transfección en células COS-7 con los vectores de expresión para β -catenina, p85-PI3K y RAR α , se observó una interacción marginal entre la proteína β -catenina y p85-PI3K, y entre β -catenina y RAR α . Sin embargo, en las células COS-7 transfectadas con los 3 vectores de expresión no se observó formación del complejo RAR α -p85-PI3K, sino más bien sugería que la presencia conjunta de β -catenina, RAR α y p85 entorpecía su interacción (Figura 41).

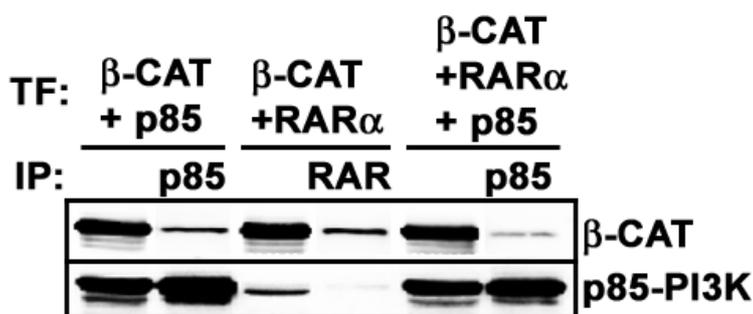


Figura 41. La proteína β -catenina no favorece la formación del complejo RAR α -p85-PI3K. Western blot. Células COS-7 co-transfectadas transitoriamente con vectores de expresión para p85-PI3K, RAR α y β -catenina. Se incubó 150 μ g de proteínas de extractos totales, con 5 μ g del anticuerpo RAR α o p85-PI3K. Los inmunocomplejos se precipitaron como se indica en la leyenda de la figura 35. La membrana se incubó con anticuerpos frente a β -catenina (β -CAT) y p85-PI3K.

7. Estudio de patrones de expresión génica mediante chips de DNA

A través de las vías de señalización se controla la regulación de factores de transcripción y con ello la regulación de genes. Nuestro objetivo es determinar si las acciones sobre las vías de señalización tienen efectos transcripcionales y contribuyen a la respuesta génica que genera el RA. Para probar esta hipótesis, se empleó la tecnología de microarrays de DNA. Se analizaron los perfiles de expresión génica de células de neuroblastoma SH-SY5Y control y células tratadas con ácido retinoico durante 6 horas. Este es un tiempo intermedio entre las acciones clásicas y las acciones rápidas del RA, de forma que podemos detectar tanto genes regulados directamente por el receptor RAR como genes regulados por vías de señalización. Para definir estos cambios transcripcionales se empleó el GeneChip U133A de Affymetrix, que permite analizar la expresión de más de 22.000 sondas entre las que se encuentran 18.400 mRNAs correspondientes a 17.500 genes humanos (Figura 42).

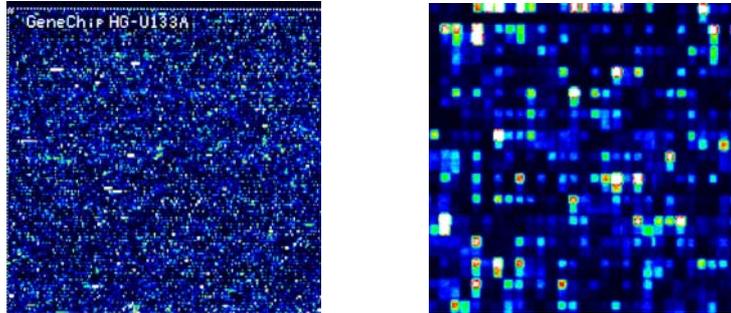


Figura 42. Imagen escaneada de un microarray hibridado (A) y ampliación (B). La presencia de mayor intensidad de color corresponde con una mayor intensidad de hibridación.

Para cada condición experimental, células control y células tratadas con RA, se llevaron a cabo dos réplicas (C1, C2, RA1, RA2). Se realizaron comparaciones 1 a 1 entre los 4 grupos experimentales (C1/RA1, C2/RA1, C1/RA2 y C2/RA2) y únicamente aquellos genes cuyos niveles de mRNA aumentaron o disminuyeron de la misma forma en 3 de las 4 comparaciones se consideraron como genes con una expresión diferencial. Se obtuvieron valores por encima del umbral (P), en al menos uno de los 4 chips, en 13.989 genes.

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el programa *GeneChip Expression Analysis* (Affymetrix Microarray Suite 5.0), con el cual se determina si el gen está presente o ausente y si el nivel de expresión en la muestra experimental está significativamente aumentado o disminuido con respecto a la muestra control. Los valores netos de expresión fueron transformados a \log_2 como índice de cambio en la expresión génica (\log Ratio). Para considerar que un gen presentaba diferencias de expresión entre control y tratadas con RA, se consideró cambio de expresión cuando los ratios de las intensidades eran superiores a 0.75 ($\log_2 \text{ ratio} \geq 0.75$) o inferiores a -0.75 ($\log_2 \text{ ratio} \leq -0.75$). Es decir, como se trabajaba en logaritmo en base 2, se seleccionaron aquellos genes cuyo nivel de expresión fue al menos 1.68 veces superior (regulados positivamente) o 1.68 veces inferior (regulados negativamente), respecto al control.

Se encontraron un total de 82 genes regulados, de ellos 63 regulados positivamente y 19 regulados negativamente.

Resultados

En las siguientes páginas se muestran las tablas de resultados del análisis de microarrays de cDNA. La tabla 2 muestra los genes regulados negativamente por RA y la tabla 3 los genes inducidos o regulados positivamente.

ID Affymetrix	C1	C2	R1	R2	R1vs C1 Ratio Cambio	R1vs C2 Ratio Cambio	R2vs C1 Ratio Cambio	R2vs C2 Ratio Cambio	SÍMBOLO	MEDIA	S.D.
220014_at	P	P	P	P	-1,48	R	-1,28	R	LOC51334	-1,275	0,164
219522_at	P	P	P	P	-0,8	R	-0,87	R	FJX1	-0,813	0,098
219250_s_at	P	P	P	P	-0,83	R	-0,82	R	FLRT3	-0,763	0,072
215767_at	P	P	P	P	-0,76	R	-0,7	R	C2orf10	-0,758	0,073
214786_at	P	P	P	P	-1,45	R	-1,14	R	MAP3K1	-1,285	0,223
214608_s_at	P	P	P	P	-1,42	R	-0,92	R	EYA1	-1,218	0,291
213894_at	P	P	P	P	-0,67	R	-0,74	R	KIAA0960	-0,755	0,070
213496_at	P	P	P	P	-0,93	R	-0,88	R	LPPR4	-0,855	0,062
212188_at	P	P	P	P	-0,66	NC	-0,71	R	KCTD12	-0,785	0,117
211919_s_at	P	P	P	P	-0,82	R	-0,67	R	CXCR4	-0,740	0,093
210095_s_at	P	P	P	A	-0,69	R	-1,16	R	IGFBP3	-0,943	0,248
209988_s_at	P	P	P	P	-0,9	R	-0,79	R	ASCL1	-0,845	0,076
209987_s_at	P	P	P	P	-0,87	R	-0,71	R	ASCL1	-0,908	0,169
209985_s_at	P	P	A	A	-0,91	R	-0,79	R	ASCL1	-0,878	0,139
209603_at	P	P	P	P	-0,97	R	-0,73	R	GATA3	-0,830	0,120
209602_s_at	P	P	P	P	-0,84	R	-0,74	R	GATA3	-0,790	0,070
209278_s_at	P	P	P	P	-1,38	R	-1,44	R	TFPI2	-1,405	0,025
209277_at	P	P	P	P	-1,63	R	-1,35	R	TFPI2	-1,483	0,148
209201_x_at	P	P	P	P	-0,96	R	-0,76	R	CXCR4	-0,835	0,114
208610_s_at	P	P	P	P	-0,31	R	-0,73	R	SRRM2	-0,703	0,303
208016_s_at	P	P	P	P	-1,43	R	-1,22	R	AGTR1	-1,410	0,130
206104_at	P	P	P	P	-0,81	R	-0,62	R	ISL1	-0,778	0,120
205357_s_at	P	P	P	P	-1,2	R	-1,33	R	AGTR1	-1,260	0,108
203789_s_at	P	P	P	P	-1,17	R	-1,05	R	SEMA3C	-1,023	0,121
202431_s_at	P	P	P	P	-1,93	R	-1,38	R	MYC	-1,730	0,303

Tabla 2. Genes reprimidos o regulados negativamente por RA

ID Affymetrix	C1	C2	R1	R2	R1 vs C1 Ratio	Cambio	R1 vs C2 Ratio	Cambio	R2 vs C1 Ratio	Cambio	R2 vs C2 Ratio	Cambio	SÍMBOLO	MEDIA	S.D.
206424_at	A	A	P	P	7,63	I	6,73	I	6,81	I	6,19	I	CYP26A1	6,840	0,594
219825_at	A	A	P	P	5,08	I	4,09	I	4,32	I	3,23	I	CYP26B1	4,180	0,762
202481_at	A	A	P	P	4,59	I	4,52	I	4,45	I	4,4	I	DHRS3	4,490	0,083
219908_at	A	A	P	P	4,15	I	2,22	I	4,45	I	2,14	I	DKK2	3,240	1,231
215771_x_at	P	P	P	P	3,1	I	3,21	I	2,78	I	2,84	I	RET	2,983	0,206
205879_x_at	P	P	P	P	2,91	I	2,79	I	2,72	I	2,59	I	RET	2,753	0,134
206159_at	A	A	P	P	2,74	I	3,09	I	2,45	I	2,78	I	GDF10	2,765	0,262
211421_s_at	P	P	P	P	2,4	I	2,63	I	2,39	I	2,51	I	RET	2,483	0,112
209325_s_at	P	P	P	P	2,18	I	2,32	I	1,88	I	2,08	I	RGS16	2,115	0,185
202575_at	P	P	P	P	2,13	I	2,21	I	2	I	2,01	I	CRABP2	2,088	0,101
215692_s_at	P	P	P	P	2,07	I	2,08	I	1,72	I	1,83	I	MPPED2	1,925	0,179
218559_s_at	A	A	P	P	2,01	I	2,65	I	1,68	I	2,26	I	MAFB	2,150	0,409
209324_s_at	P	P	P	P	1,98	I	2,36	I	1,37	I	1,92	I	RGS16	1,908	0,408
209047_at	P	P	P	P	1,9	I	1,83	I	1,64	I	1,59	I	AQP1	1,740	0,149
208530_s_at	A	A	P	P	1,7	I	2,12	I	1,44	I	1,95	I	RARB	1,803	0,297
201860_s_at	A	A	P	P	1,61	I	2,05	I	1,32	I	1,91	I	PLAT	1,723	0,325
220180_at	P	A	P	P	1,37	I	2,18	I	1,34	I	2,22	I	CCDC68	1,778	0,488
203706_s_at	P	P	P	P	1,55	I	1,72	I	1,46	I	1,63	I	FZD7	1,590	0,111
205604_at	P	P	P	P	1,48	I	1,56	I	1,56	I	1,67	I	HOXD9	1,568	0,078
213260_at	P	P	P	P	1,51	I	1,21	I	2	I	1,56	I	FOXC1	1,570	0,326
205093_at	A	A	P	P	1,51	I	1,18	I	1,45	I	1,18	I	PLEKHA6	1,330	0,175
205080_at	P	P	P	P	1,51	I	1,41	I	1,21	I	0,87	I	RARB	1,250	0,282
201125_s_at	P	P	P	P	1,5	I	1,22	I	1,26	I	1,12	I	ITGB5	1,275	0,161
208893_s_at	A	A	P	P	1,5	I	0,93	I	1,41	I	0,83	I	DUSP6	1,168	0,336
201125_s_at	P	P	P	P	1,5	I	1,22	I	1,26	I	1,12	I	ITGB5	1,275	0,161
218764_at	P	P	P	P	1,49	I	1,47	I	1,39	I	1,41	I	PRKCH	1,440	0,048

Tabla 3. Genes inducidos o regulados positivamente por RA

ID Affymetrix	C1	C2	R1	R2	R1vs C1 Ratio Cambio	R1vs C2 Ratio Cambio	R2vs C1 Ratio Cambio	R2vs C2 Ratio Cambio	SÍMBOLO	MEDIA	S.D.
213139_at	P	P	P	P	1,24	1,46	0,96	1,3	SNAI2	1,240	0,208
221226_s_at	A	A	P	P	1,41	1,03	1,31	0,93	ACCN4	1,170	0,227
213497_at	A	A	P	P	1,38	1,81	1,22	1,45	ABTB2	1,465	0,249
207542_s_at	P	A	P	P	0,99	1,52	0,63	0,98	AGP1	1,030	0,367
205522_at	P	P	P	P	1,29	1,39	1,34	1,48	HOXD4	1,375	0,081
212326_at	A	A	P	P	1,32	1,41	0,95	1,09	VPS13D	1,193	0,210
203705_s_at	P	P	P	P	1,3	1,41	1,08	1,26	FZD7	1,263	0,137
217591_at	P	P	P	P	1,35	1,06	1,06	0,69	SKIL	1,040	0,270
209098_s_at	M	P	P	P	1,24	1,02	1,34	0,99	JAG1	1,148	0,170
214793_at	A	A	P	P	1,22	1,31	1,05	1,11	DUSP7	1,173	0,116
202308_at	P	P	P	P	1,31	1,08	0,63	0,73	SREBF1	0,938	0,314
206099_at	P	M	P	P	1,29	1,15	1,13	0,9	PRKCH	1,118	0,162
213841_at	M	P	P	P	1,04	1,28	0,9	1,22	KIAA0510	1,110	0,173
201369_s_at	P	A	P	P	1,12	1,27	0,87	0,92	ZFP36L2	1,045	0,185
201236_s_at	A	A	P	P	1,26	1,02	0,95	0,74	BTG2	0,993	0,214
205413_at	P	P	P	P	1,25	1,26	1,08	1,07	MPPED2	1,165	0,104
213725_x_at	P	P	P	P	1,25	1,06	1,08	0,93	LOC283824	1,080	0,131
217853_at	P	P	P	P	1,23	1,24	1,06	1,06	TNS3	1,148	0,101
216268_s_at	P	P	P	P	1,03	1,17	0,91	0,98	JAG1	1,023	0,110
220692_at	P	P	P	P	1,16	1,02	1,14	1,02	HSPC047	1,085	0,075
206472_s_at	P	P	P	P	1,13	1,14	1,08	1,14	TLE3	1,123	0,029
217076_s_at	A	P	P	P	1,05	1,14	0,93	0,8	HOXD3	0,980	0,148
211605_s_at	A	A	P	P	0,81	0,4	1,16	0,66	RARA	0,758	0,317
203749_s_at	P	P	P	P	1,05	1,16	0,87	0,93	RARA	1,003	0,129
212724_at	P	P	P	P	1,1	1,07	1,14	1,11	RND3	1,105	0,029
213848_at	P	P	P	P	1,06	1,13	1,04	1,08	DUSP7	1,078	0,039

Tabla 3 (Cont.). Genes inducidos o regulados positivamente por RA

ID Affymetrix	C1	C2	R1	R2	R1vs C1 Ratio	Cambio	R1vs C2 Ratio	Cambio	R2vs C1 Ratio	Cambio	R2vs C2 Ratio	Cambio	SÍMBOLO	MEDIA	S.D.
214958_s_at	A	A	P	P	0,72	I	0,61	I	1,1	I	0,73	I	TMC6	0,790	0,214
206163_at	P	P	P	P	1,11	I	1,03	I	1,04	I	1,02	I	MAB21L1	1,050	0,041
219440_at	P	P	P	P	1,1	I	0,95	I	0,59	I	0,55	I	RAI2	0,798	0,270
212769_at	P	P	P	P	0,97	I	0,9	I	0,99	I	1,1	I	TLE3	0,990	0,083
201367_s_at	M	P	P	P	1,06	I	0,74	I	1,07	I	0,85	I	ZFP36L2	0,930	0,162
212706_at	P	P	P	P	0,99	I	1,1	I	1,04	I	1,04	I	RASA4	1,043	0,045
212770_at	P	P	P	P	1,04	I	0,94	I	0,91	I	0,76	I	TLE3	0,913	0,116
206601_s_at	P	P	P	P	1	I	1,02	I	0,93	I	0,94	I	HOXD3	0,973	0,044
212423_at	M	P	P	P	1	I	0,79	I	0,64	I	0,37	I	C10orf56	0,700	0,265
209099_x_at	P	P	P	P	0,93	I	0,7	I	1	I	0,85	I	JAG1	0,870	0,129
208534_s_at	P	P	P	P	0,91	I	1,01	I	0,76	I	0,81	I	RASA4	0,873	0,111
206460_at	A	A	P	P	1,17	I	1,79	I	0,9	NC	1,11	I	AJAP1	1,243	0,383
213841_at	M	P	P	P	1,04	I	1,28	I	0,9	I	1,22	I	KIAA0510	1,110	0,173
210023_s_at	P	P	P	P	0,95	I	0,69	I	0,84	I	0,7	I	PCGF1	0,795	0,124
222159_at	P	P	P	P	0,94	I	0,9	I	0,78	I	0,71	I	FLJ12996	0,833	0,106
219218_at	P	P	P	P	0,94	I	0,91	I	0,82	I	0,69	I	BAHCC1	0,840	0,112
207410_s_at	P	P	P	P	0,91	I	0,94	I	0,73	I	0,79	I	TLX2	0,843	0,099
210302_s_at	P	P	P	P	0,88	I	0,86	I	0,89	I	0,85	I	MAB21L2	0,870	0,018
212462_at	P	P	P	P	0,88	I	0,99	I	0,6	I	0,77	I	MYST4	0,810	0,166
202241_at	P	P	P	P	0,85	I	0,79	I	0,89	I	0,94	I	TRIB1	0,868	0,063
217591_at	P	P	P	P	1,35	I	1,06	I	1,06	I	0,69	I	SKIL	1,040	0,270
218330_s_at	P	P	P	P	0,77	I	0,93	I	0,78	I	0,96	I	NAV2	0,860	0,099
210612_s_at	A	A	M	A	2,07	I	4,18	I	1,6	I	2,76	NC	SYNJ2	2,653	1,124
219073_s_at	P	P	P	P	0,89	NC	0,66	I	0,98	I	0,95	I	OSBPL10	0,870	0,145

Tabla 2, y 3. Genes expresados diferencialmente por RA en células SH-SY5Y obtenidos utilizando el GeneChip U133A de Affymetrix. En la tabla se indica de izquierda a derecha: número de identificación de Affimetrix (ID Affymetrix), presencia (P) o ausencia (A) del gen en el control 1 (C1), control 2 (C2), ácido retinoico 1 (R1), ácido retinoico 2 (R2). En las comparaciones, los genes pueden estar inducidos (I), reprimidos (R) o sin cambio (NC). Las últimas columnas muestran el nombre del gen (símbolo), la media y la desviación estándar (S.D.)

La consulta de la base de datos de “HUGO Gene Nomenclature Committee”, <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/index.html> sirvió como apoyo para la clasificación de estos genes según las funciones biológicas que desempeñan. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 43.

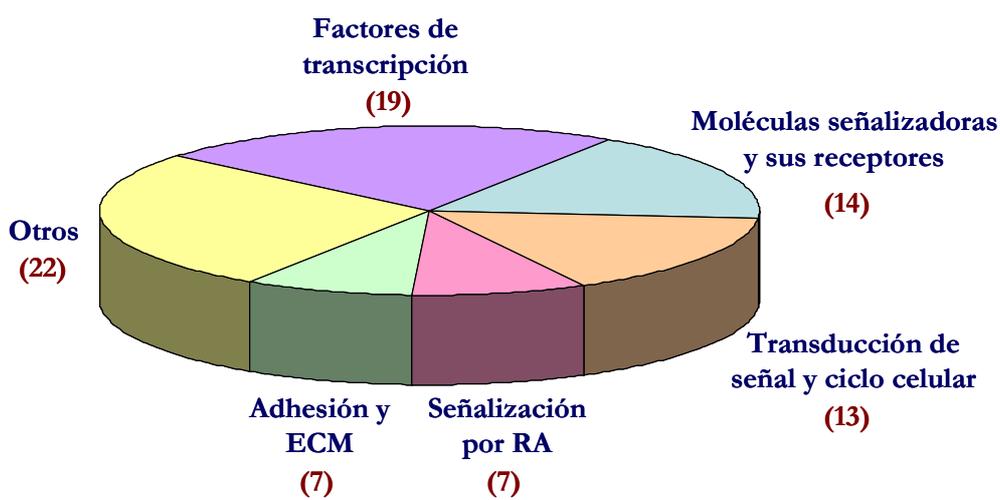


Figura 43. Análisis funcional del total de genes expresados diferencialmente en células tratadas con RA durante 6 horas frente a las células control.

En las siguientes páginas se muestran diversas tablas de resultados del análisis, en las que se han clasificado, según su función biológica, los genes regulados positivamente (en color azul) y negativamente por RA (en color rojo) con respecto a los valores control.

1. Factores de transcripción

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>MAFB</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog B	Kreisler	Interviene en el desarrollo antero-posterior del Sistema Nervioso. Regulado por ERK
<i>HOXD3</i>	Homeobox D3	HOX4A	Interviene en la morfogénesis, migración e invasión
<i>HOXD4</i>	Homeobox D4	HOX4B	Interviene en la morfogénesis
<i>HOXD9</i>	Homeobox D9	HOX4	Interviene en la morfogénesis
<i>RARA</i>	Retinoic acid Receptor, alpha	NR1B1	Regulación directa por RAR, elemento DR2
<i>RARB</i>	Retinoic acid Receptor, beta	NR1B2	Regulación directa por RAR, elemento DR5
<i>PCGF1</i>	polycomb group ring finger 1	NSPC1	Expresado en SNP derivado de cresta neural
<i>TLX2</i>	T-cell leukemia homeobox 2	HOX11L1, NCX	Homeobox expresado en cresta neural y SNP
<i>MYST4</i>	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	MORF	ZnF; Acetil transferasa de histonas. Co-activador/co-represor. Neurogénesis
<i>ZFP36L2</i>	zinc finger protein 36, C3H type-like 2		ZnF; Immediate Early gene, regulado por EGF o PMA
<i>SNAI2</i>	snail homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	slug	Regulado por vías de señal anti-apoptóticas y mitógenos
<i>SREBF1</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 1	SREBP1	Expresión regulada por AKT kinasa
<i>FOXC1</i>	Forkhead box protein C1	FKHL7	Antiproliferativo, supresor de tumores, regulado por TGF β
<i>MAB21L1</i>	mab-21-like 1 (<i>C. elegans</i>)	CAGR	Regulador en <i>C.elegans</i> del destino de células de órgano sensorial. Regulado por TGF β
<i>MAB21L2</i>	mab-21-like 2 (<i>C. elegans</i>)		Regulador en <i>C.elegans</i> del destino de células de órgano sensorial. Regulado por TGF β

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-myc	Regulado negativamente por RA
<i>ASCL1</i>	achaete-scute complex-like 1	ASH1, HASH1, MASH1	bHLH; Interviene en el destino y la diferenciación de neuronas autónomas y olfativas
<i>ISL1</i>	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)		LIM-Homeodomain; Se requiere para la diferenciación de neuronas motoras
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3		Interviene en la diferenciación de varios linajes celulares

2. Moléculas señalizadoras y sus receptores

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>GDF10</i>	Growth and Differentiation factor 10	BMP3B	Expresado en SN; Miembro de la familia del TGF β . Regulado por NF κ B
<i>DKK2</i>	Dickkopf homolog 2		Se asocia con LRP6 para inhibir la señalización por Wnt
<i>FZD7</i>	Frizzled homolog 7		Receptor de Wnt
<i>RET</i>	ret proto-oncogene		Receptor tirosina kinasa de neurotrofinas de tipo GDNF; expresado en cresta neural; regulación directa por RAR
<i>JAG1</i>	Jagged 1		Ligando de Notch
<i>TLE3</i>	Transducin-like enhancer of split 3 homolog		Interviene en diferenciación; Señalización de Notch
<i>C10orf56</i>		FLJ90798	Receptor Tirosina Kinasa tipo Ephrin (guía de axon)
<i>NAV2</i>	Neuron navigator 2	RAINB1, HELAD1	Ortólogo de unc-53 de <i>C. elegans</i> , una molécula de guía axonal. Regulado por RA en neuroblastoma
<i>RARA</i>	Retinoic acid Receptor, alpha	NR1B1	Regulación directa por RAR, elemento DR2
<i>RARB</i>	Retinoic acid Receptor, beta	NR1B2	Regulación directa por RAR, elemento DR5

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>AGTR1</i>	angiotensin II receptor, type 1		GPCR
<i>IGFBP3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3		Regula la disponibilidad de IGF1 e IGF2. Regulado por RA en Teratocarcinoma NT2D
<i>FJX1</i>	four jointed box 1 (Drosophila)		Proteína secretada y expresada en SN. Activada por Notch
<i>CXCR4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	HM89, LAP3, NPYR	Receptor de Chemokinas. GPCR. Interviene en neurogénesis. Regulado por NFκB

3. Transducción de señal y Ciclo Celular

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>BTG2</i>	BTG family member 2	PC3, TIS21	Antiproliferativo. Immediate Early gene
<i>DUSP7</i>	Dual specificity phosphatase 7	MKPX	Tyr/Ser/Tre Fosfatasa Inducible por NGF
<i>DUSP6</i>	Dual specificity phosphatase 6	MKP3	Tyr/Ser/Tre Fosfatasa. Específica de SN. Regulador negativo de ERK, pero no de SAPK/p38
<i>MPPED2</i>	metallophosphoesterase domain containing 2	C11ORF8	Ser/Tre Fosfatasa Interviene en Neurogénesis
<i>TNS3</i>	tensin 3	TENS1	Tirosina Fosfatasa
<i>TRIB1</i>	tribbles homolog 1 (Drosophila)		Regulador MAP Kinasas
<i>PRKCH</i>	Protein kinase C, eta		Activador de p38 SAPK Interviene en la señalización de Wnt
<i>RASA4</i>	RAS p21 protein activator 4	CAPRI	Inhibidor de Ras y MAPK
<i>RGS16</i>	Regulator of G-protein signalling 16		Reduce la señalización a través de Proteínas G y MAPK
<i>RND3</i>	Rho family GTPase 3	RhoE	Interviene en la remodelación del citoesqueleto de actina
<i>SKIL</i>	Ski-like	SNO	Regulado por TGFbeta. Regulador feed-back negativo de TGFβ
<i>FOXC1</i>	Forkhead box protein C1	FKHL7	Antiproliferativo, supresor de tumores, regulado por TGFβ

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>MAP3K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MEKK, MEKK1, MAPKKK1	Activa MEK y JNK Interviene en el control de la apoptosis

4. Señalización y metabolismo del Ácido Retinoico

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>RARA</i>	Retinoic acid Receptor, alpha	NR1B1	Regulación directa por RAR, elemento DR2
<i>RARB</i>	Retinoic acid Receptor, beta	NR1B2	Regulación directa por RAR, elemento DR5
<i>CRABP2</i>	Cellular retinoic acid binding protein 2		Regulación directa por RAR, elementos DR5 y DR1
<i>CYP26A1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	P450RAI-1	RA 4-Hydroxylase. Regulación directa por RAR
<i>CYP26B1</i>	Cytochrome P450 retinoid metabolizing enzyme	CYP26A2	RA 4-Hydroxylase. Regulación directa por RAR
<i>DHRS3</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase 1	SDR1	Regulación directa por RAR. Inducible en neuroblastoma
<i>RAI2</i>	Retinoic-acid induced 2		Regulación directa por RAR

5. Adhesión celular y matriz extracelular

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>PLAT</i>	Plasminogen activator, tissue-type	t-PA	Interviene en crecimiento de neuritas, remodelación, migración, plasticidad y daño neuronal
<i>SNAI2</i>	snail homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	slug	Regula las interacciones epitelio-mesénquima
<i>ITGB5</i>	Integrin beta 5		Receptor de Vitronectina. Interacciones célula-célula/sustrato

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>SEMA3C</i>	semaphorin 3C	SemE	Molécula de guía axonal. Posible inhibidor del crecimiento axonal
<i>TFPI2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	FLJ21164	Inhibidor de Serin-proteasas. Interviene en invasión
<i>FLRT3</i>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3		Interviene en adhesión celular
<i>KIAA0960</i>	KIAA0960 protein		Dominio Trombospondina

6. Otros, incluye genes de función (todavía) desconocida

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>ACCN4</i>	Amiloride-sensitive cation channel 4	ASIC4	Transporte de sodio. Sensor de acidez
<i>TMC6</i>	transmembrane channel-like 6	EVIN1, LAK4-P	Transmembrana, similar a canal iónico
<i>AJAP1</i>	adherens junction associated protein 1	MOT8	Posible oxidoreductasa
<i>AQP1</i>	Aquaporin 1	AQP-CHIP	Canal de agua
<i>CCDC68</i>	CTCL tumor antigen SE57-1	FLJ25368	Función desconocida
<i>SYNJ2</i>	synaptojanin 2	INPP5H	Inositol fosfato 5'-fosfatasa 2; Interviene en el reciclado de vesículas sinápticas.
<i>OSBPL10</i>	oxysterol binding protein-like 10	ORP10	Pleckstrin Homology domain
<i>PLEKHA6</i>	Phosphoinositol 3-phosphate binding protein 3	PEPP3	Pleckstrin-Homology domain
<i>HSPC047</i>	HSPC047 protein		Función desconocida Expresado en CD34+ stem cells
<i>LOC283824</i>	hypothetical protein LOC283824		Función desconocida
<i>FLJ12996</i>	hypothetical protein FLJ12996		Función desconocida
<i>BAHCC1</i>	BAH domain and coiled-coil containing 1	KIAA1447	Función desconocida
<i>C10orf56</i>	hypothetical protein FLJ90798		Función desconocida
<i>KIAA0510</i>	Homo sapiens mRNA, chromosome 1 specific transcript KIAA0510		Función desconocida

<i>VPS13D</i>	vacuolar protein sorting 13 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	FLJ10619	Posible implicación en tráfico intracelular. 1p36.21
<i>ABTB2</i>	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	DKFZP586C1619	Función desconocida

SÍMBOLO	NOMBRE	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
<i>SRRM2</i>	serine/arginine repetitive matrix 2	SRm300	Participa en splicing del mRNA
<i>EYA1</i>	eyes absent homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	BOP	Expresado en riñón y cerebro fetales
<i>KCTD12</i>	hypothetical protein BC013764	PFET1	Canal de potasio controlado por voltaje
<i>LPPR4</i>	plasticity-related gene 1	KIA0455	Fosfatasa de Acido fosfatídico, específica de cerebro. Involucrada en crecimiento axonal y regeneración
<i>LOC51334</i>	mesenchymal stem cell protein DSC54	MGC104614	Función desconocida
<i>C2ORF10</i>	similar to C630007C17Rik protein		Función desconocida

Tabla 4. Clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente por RA en células SH-SY5Y obtenidos utilizando el GeneChip U133A de Affymetrix. En la tabla se indica el símbolo asignado para cada gen, el nombre, otros nombres utilizados para el gen y las observaciones pertinentes para cada uno.

- Genes regulados positivamente
- Genes regulados negativamente

Los resultados muestran que la respuesta transcripcional a RA integra tanto acciones clásicas genómicas (genes regulados directamente por RAR a través de su unión a elementos RARE localizados en su promotor), como acciones atípicas no genómicas (genes cuya regulación depende de la activación de vías de señalización, y que conllevan a la activación de factores de transcripción).

Discusión

El objetivo del presente trabajo es estudiar los aspectos mecánicos de la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT por ácido retinoico. Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que la respuesta a la administración de RA en células SH-SY5Y no sólo se produce a nivel transcripcional, sino que también produce la activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT (López-Carballo et al., 2002). Esta activación es necesaria para la inducción de la diferenciación por RA y pensamos que ocupa un lugar central en el control ejercido por RA sobre el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, por lo que la hemos caracterizado con más detalle.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren un nuevo mecanismo para la activación de la ruta de PI3K/AKT por RA. Hemos demostrado el carácter no genómico de la activación de PI3K, así como la implicación del receptor RAR en este tipo de acciones rápidas del RA. También hemos caracterizado que zona o región del RAR es necesaria para la activación, el papel que desempeña la localización celular del RAR en la capacidad de activación de la vía PI3K/AKT y hemos analizado interacciones físicas entre el receptor RAR y componentes de la vía de transducción de señal PI3K/AKT.

1. La activación de la vía de señalización de PI3K/AKT y MAPKs ERK1/2 por RA se produce a través de un mecanismo rápido no genómico

Mientras que los clásicos efectos transcripcionales del ácido retinoico han sido ampliamente estudiados (Gronemeyer et al., 2004; Lefebvre et al., 2005), existe poca información acerca de los efectos rápidos no genómicos del RA sobre las vías de transducción de señales y sus implicaciones fisiológicas. Durante los últimos años se ha ido acumulando gran cantidad de información sobre las acciones no genómicas de las hormonas esteroideas (Valverde y Parker, 2002; Losel y Wehling, 2003; Simoncini y Genazzani, 2003; Levin, 2005). Se ha demostrado que el estradiol activa PI3K/AKT a través de acciones no genómicas

de su receptor en células endoteliales (Haynes et al., 2000; Simoncini et al., 2000; Hisamoto et al., 2001), en neuronas corticales en cultivo (Honda et al., 2001), y en una línea celular derivada de un tumor mamario (Castoria et al., 2001). Además, se ha demostrado que la activación de PI3K/AKT por la vitamina D₃ a través de una acción no genómica de los receptores de la vitamina D está implicada en la diferenciación de células mieloides (Hmama et al., 1999) y que los corticoesteroides ejercen una acción protectora a nivel cardiovascular mediante un mecanismo no genómico de los receptores de glucocorticoides y la activación PI3K (Hafezi-Moghadam et al., 2002). La activación de PI3K/AKT por RA representa uno de los primeros ejemplos de acciones rápidas no genómicas del RA (López-Carballo et al., 2002). Durante el periodo de realización de este trabajo, se describió que la activación de la vía de PI3K por RA está implicada en la inducción de la transglutaminasa de tejido en células NIH-3T3 (Antonyak et al., 2002). Desde entonces, ha ido en aumento el número de publicaciones describiendo las acciones no genómicas del RA (Carter, 2003; Kambhampati et al., 2003; Cañón et al., 2004; Liou et al., 2005; Pan et al., 2005; Uruno et al., 2005; Bastien et al., 2006; Hughes et al., 2006).

El carácter no genómico de la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT queda establecido por el rápido incremento (en 5 minutos) en la fosforilación de AKT, principal diana de PI3K, en tratamientos con RA de células SH-SY5Y. Esta activación de PI3K/AKT, no se ve afectada por tratamientos con los inhibidores de la transcripción y de la biosíntesis de proteínas. Los estudios en células no neurales, como NIH-3T3, corroboran este carácter no genómico de la activación de PI3K/AKT por RA, e indican además que no es exclusiva de células neurales.

2. Implicación del Receptor Nuclear RAR en la activación de la vía de PI3K/AKT

En esta última década existe una gran controversia sobre la implicación de los receptores nucleares de hormonas en las acciones no genómicas de las

hormonas esteroideas y otros ligandos. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de que los receptores nucleares de hormonas son los responsables de las acciones no genómicas de las hormonas esteroideas, especialmente para el receptor de estrógenos (ER) (Migliaccio et al., 1996; Razandi et al., 1999; Chambliss et al., 2002; Razandi et al., 2004).

Diversos tipos de evidencias apoyan la implicación del receptor nuclear RAR en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT. Por un lado, la asociación que existe entre los niveles de receptor y capacidad de activar PI3K. En células con niveles apreciables de receptor RAR, como SH-SY5Y y fibroblastos NIH-3T3, se produce una activación notable de PI3K en respuesta al tratamiento con RA. Recíprocamente, la falta de receptor RAR en una línea similar a NIH-3T3, de fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratón MEF(RAR $\alpha\beta\gamma$)^{L-/L-}, en los que existe una inactivación simultánea de los genes que codifican los subtipos del receptor RAR (Altucci et al., 2005), resulta en la pérdida de la capacidad de activar la vía de PI3K por RA. Esta capacidad se restaura tras la sobreexpresión del receptor RAR α en estas células. Del mismo modo, las células de la línea COS-7, con niveles muy bajos de RAR, responden muy pobremente en cuanto a la activación de PI3K por RA. Los ensayos de transfección en estas células, refuerzan esta asociación entre los niveles de receptor y activación de PI3K, ya que la transfección transitoria de RAR α incrementa marcadamente la capacidad de activar la vía de PI3K/AKT mediante RA.

Otra evidencia de la implicación del receptor nuclear RAR en la activación de la vía de PI3K se basa en criterios de especificidad farmacológica. Por un lado, la activación de la vía de PI3K/AKT ocurre a concentraciones de RA compatibles con la Kd obtenida para el receptor (Yang et al., 1991). Por otro lado, todos los agonistas de RAR α empleados han sido capaces de activar PI3K/AKT. Aunque el hecho de que el antagonista de RAR AGN193109 no fue capaz de prevenir la activación de PI3K por RA o TTNPB argumentaría en contra de la participación de RAR, AGN193109 por sí solo fue capaz de activar PI3K, sugiriendo un perfil disociado antagonista/agonista, como se ha descrito

para otros compuestos como los moduladores específicos de estrógenos estreno y raloxifeno (Kousteni et al., 2001; Simoncini et al., 2002), o para análogos sintéticos de la vitamina D₃ (Vertino et al., 2005). En cambio el tratamiento de células con RA en presencia del antagonista AGN193109 evita la activación transcripcional de RAR β , uno de los principales genes regulados por RA en células de neuroblastoma SH-SY5Y, corroborando el carácter transcripcional de este antagonista.

Una última evidencia que corrobora la implicación de RAR en la activación de la vía PI3K es la asociación física entre la actividad PI3K y el receptor RAR α tras el tratamiento con RA de células SH-SY5Y, que se ha observado a través de los ensayos quimi-química sobre inmunoprecipitados de RAR. Las interacciones entre RAR y componentes de PI3K se han estudiado con detalle, y serán comentados más adelante.

3. La unión de RA al receptor RAR promueve su translocación a la membrana plasmática

Dado que el receptor RAR, al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, se localiza principalmente en el núcleo, resulta paradójico el hecho de que las acciones rápidas no genómicas de los receptores nucleares se inicien en la membrana plasmática. Este es un punto a tener en cuenta por cualquier modelo que trate de explicar el mecanismo de activación de PI3K por RA.

Nuestros resultados indican, que probablemente existe un paso limitante o saturable en la activación de la vía PI3K/AKT, el cual podría ser la presencia del RAR en la membrana. Para tratar de superar esta supuesta limitación se generó un receptor quimérico que contenía una señal de localización en la membrana plasmática (señal de miristilación de *Srv*). La primera evidencia de la importancia de la localización del receptor en la membrana plasmática la muestran los ensayos

sobreexpresión de esta proteína de fusión *Myr-RAR α* realizados en células COS-7. Estos ensayos revelan que la localización del receptor RAR α en la membrana plasmática incrementa su capacidad de activar la vía de señalización de PI3K/AKT. Sorprendentemente, una vez localizado el receptor en la membrana plasmática, la activación de PI3K no requiere la unión del ligando, ya que en células transfectadas con *Myr-RAR α* , la fosforilación de AKT se produce en ausencia de RA. En apoyo a esto, el mutante *Myr-RAR α (2-390)*, que es defectivo en la unión a RA, cuando es dirigido a la membrana plasmática, es capaz de activar la fosforilación de AKT. Un aumento de la señalización no genómica también se observó cuando se dirigía ER a la membrana plasmática, aunque en este caso era necesaria la administración de hormona (Razandi et al., 2003b; Rai et al., 2005). Recíprocamente, receptores quiméricos de ER que presentan localización reducida en la membrana plasmática, también presentaban una menor actividad no genómica (Kousteni et al., 2001; Razandi et al., 2003a; Acconcia et al., 2005). Todas estas evidencias indican que la presencia del receptor nuclear en la membrana plasmática es básica para llevar a cabo las acciones no genómicas. Sin embargo, todavía no está claro como se produce la asociación del receptor RAR a la membrana plasmática, aunque algunos estudios sugieren que los receptores interactúan con proteínas o lípidos específicos de membrana (Levin, 2005). Al igual que se muestra aquí para RAR, resultados con receptores vitamina de D₃ y andrógenos también sugieren este papel del ligando en la localización del receptor (Lu et al., 2001; Capiati et al., 2002).

Nuestros resultados indican que la unión del ligando controla la localización del receptor, promoviendo la presencia de una subpoblación de RAR en la membrana plasmática. Posiblemente se trate de un pequeño porcentaje, de lo contrario sería detectable mediante microscopía de fluorescencia. No obstante, los mecanismos que explican la redistribución de RAR todavía no están claros y posiblemente son complejos. Esto podría ser la base para la explicación de la relativamente baja activación de la vía PI3K y la escasa presencia de RAR en membrana plasmática en los ensayos de transfección transitoria del receptor RAR α en células COS-7.

4. La región 206-282 del extremo C-terminal de RAR α está implicada en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT

La capacidad de activación de la vía de PI3K independientemente de la presencia de ligando que le confiere la señal de localización *Myr* al receptor *Myr*-RAR α , nos ha permitido caracterizar la región del receptor implicada en la activación de la vía de PI3K/AKT. Los ensayos realizados con los diferentes mutantes de delección de *Myr*-RAR α demuestran que los dominios de la zona C-terminal (DEF) están implicados en activar la fosforilación de AKT, aunque de forma independiente a la presencia de RA. Al caracterizar más detalladamente la región concreta responsable de la activación de la vía de PI3K, se ha demostrado la implicación de la región entre los aminoácidos 206 y 282 de RAR α en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT. Probablemente ésta sea la región “mínima” necesaria para que se produzcan las interacciones que dan lugar a la formación del complejo de señalización. Además, en esta región del extremo C-terminal, que incluye las hélices H3, H4 y H5 de la estructura tridimensional de RAR (*signature domain*), se localiza un motivo muy conservado en todos los miembros de la superfamilia de los Receptores Nucleares de Hormonas (Wurtz et al., 1996). La elevada conservación resultaría lógica ya que la activación de la vía de señalización de PI3K /AKT parece ser una característica conservada de los Receptores Nucleares de Hormonas.

5. El receptor RAR α interactúa con las subunidades de PI3K

La vía de señalización de PI3K ejerce un importante control sobre diferentes respuestas celulares como supervivencia, crecimiento y diferenciación (Katso et al., 2001).

El hecho de que la actividad PI3-kinasa esté asociada al receptor RAR en presencia de RA, como demuestran los resultados del ensayo kinasa *in vitro* de inmunoprecipitados con RAR α , sugería que el mecanismo de activación de la vía

PI3K/AKT implicaba interacción entre RAR y PI3K. Estas interacciones se han descrito en otros receptores, como el ER que puede interaccionar de manera dependiente de ligando con la PI3K, a través de su subunidad reguladora p85, activando la fosforilación de AKT (Simoncini et al., 2000).

En el estudio de la interacciones entre el receptor RAR y las subunidades de la PI3K, hemos demostrado que existe una interacción física constitutiva entre RAR α y la subunidad reguladora p85 de PI3K en células SH-SY5Y, observada tanto en las inmunoprecipitaciones realizadas con el anticuerpo frente al receptor RAR como en las realizadas con el anticuerpo frente a la subunidad reguladora p85-PI3K. Esta asociación entre RAR α y p85 se observa independientemente de la presencia de RA, y se detecta en extractos nucleares. Tras la administración de RA aumenta considerablemente la asociación de la subunidad catalítica p110-PI3K al complejo de señalización RAR-p85-PI3K. Estos resultados, sugieren que la unión de RA a RAR regula diferencialmente su interacción con las subunidades de PI3K, de modo que, mientras que RAR interacciona establemente con la subunidad reguladora p85-PI3K, tanto en presencia como en ausencia de RA, la asociación con la subunidad catalítica p110-PI3K depende de la presencia de ligando. En este contexto, todos estos resultados sugieren que el RA regula la actividad de PI3K controlando la presencia del complejo RAR-p85 en la membrana plasmática, y facilitando el ensamblaje de un complejo de señalización que incluye la subunidad catalítica p110-PI3K.

El impacto de la subunidad reguladora p85 sobre la actividad PI3K es controvertido, y en la literatura existen evidencias tanto de efectos positivos como negativos de p85 sobre la actividad PI3K (Yu et al., 1998; Ueki et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que la formación del heterodímero entre p85 y p110 conlleva un incremento de la actividad PI3K, aunque otra posibilidad ya descrita previamente sería que el reclutamiento de la subunidad p110 a la membrana plasmática, donde se encuentra su sustrato, podría afectar a su activación (Klippel et al., 1996). Recientemente se ha descrito en células de cáncer de mama un mecanismo que implica a la proteína celular de unión al retinol I (CRBP-I) en la regulación de la heterodimerización de la subunidad de PI3K, donde la

señalización por RA tendría efectos negativos sobre la asociación de la subunidad de PI3K y la actividad de PI3K. Sin embargo, la controversia podría residir en los diferentes contextos entre efectos adaptativos a largo plazo (Farias et al., 2005) y los efectos rápidos que hemos analizado aquí.

Para otros receptores nucleares se ha descrito que existe una interacción entre el receptor y la subunidad reguladora p85-PI3K, que es necesaria para la activación de PI3K (Hmama et al., 1999; Simoncini et al., 2000; Hafezi-Moghadam et al., 2002). Nuestros resultados muestran que la asociación entre RAR y p85 no parece ser directa. Esto implica que RAR α y la subunidad p85-PI3K forman parte de un complejo de señalización en el que pueden estar implicadas otras proteínas, que favorezcan el ensamblaje del complejo. En un intento de aproximarnos a la composición de este complejo, nos propusimos comprobar si dos proteínas, MNAR (Modulator of Nongenomic Activity of the estrogen Receptor), también denominada PELP1, y β -catenina, podían formar parte del este complejo de señalización.

La proteína MNAR se ha descrito como co-regulador del receptor nuclear de estrógenos (ER). Se ha descrito que la proteína MNAR interacciona con ER y con AR activando la vía de señalización de cSrc y MAPK/ERK (Wong et al., 2002; Unni et al., 2004), y que se asocia con la subunidad p85-PI3K (Vadlamudi et al., 2005). A pesar de que no se ha descrito interacción con el receptor RAR, la elevada conservación entre los miembros de la superfamilia de los Receptores Nucleares de Hormonas, hace factible dicha interacción. Nuestros resultados no muestran interacción alguna entre MNAR, y el receptor RAR α o la subunidad p85-PI3K en las condiciones ensayadas.

Se han descrito interacciones *in vitro* entre la proteína β -catenina y RAR (Easwaran et al., 1999) y también con p85-PI3K (Espada et al., 2005). Esta proteína se puede localizar en membrana, formando parte del complejo de adhesión celular, en citoplasma, libre o asociada a proteínas de la vía de señalización de Wnt, o en núcleo, unida a factores de transcripción de la familia Tcf/LEF (Hlsken y Behrens, 2000). Los resultados de los ensayos realizados en

células SH-SY5Y con niveles endógenos de estas proteínas, muestran asociación entre β -catenina y RAR α . Sin embargo, en los ensayos de sobreexpresión en células COS-7, se observa una interacción marginal entre β -catenina y p85, y entre β -catenina y RAR, que disminuye cuando se sobreexpresan simultáneamente las 3 proteínas. Por tanto, las proteínas MNAR y β -catenina no parecen participar en la activación de PI3K por RAR.

6. Modelo para la activación de la vía de PI3K por RA

La activación de PI3K/AKT por RA representa uno de los primeros ejemplos de acciones rápidas no genómicas del RA. Los resultados obtenidos nos han permitido postular un modelo para la activación no genómica de PI3K/AKT por RAR (Figura 43), en el cual una subpoblación de RAR forma un complejo estable con la subunidad reguladora p85-PI3K y unas proteínas X que facilitan el ensamblaje. Este complejo está localizado en el núcleo en ausencia de RA. Tras la administración de RA, el complejo que incluye al receptor activado se dirige a la membrana plasmática, facilitándose la asociación entre las subunidades de PI3K, p85 y p110, y promoviendo por tanto la actividad catalítica. Pensamos que quizá este modelo se pueda aplicar a otros miembros de la superfamilia de Receptores Nucleares, especialmente los receptores que pertenecen a la subfamilia de retinoico/hormona tiroidea/vitamina D.

El modelo propuesto en la figura 43 presenta diferencias llamativas respecto al modelo prevalente propuesto para explicar las acciones no genómicas de los receptores de esteroides como el ER (Levin, 2005). En este caso, una subpoblación de receptores de estrógenos residentes en membrana plasmática interacciona con los componentes de la maquinaria de transducción de señales de manera que estas interacciones están bajo control del ligando, tal y como se ha descrito para las interacciones entre ER, GR o AR y p85, la subunidad reguladora de PI3K (Simoncini et al., 2000; Castoria et al., 2001; Hafezi-Moghadam et al., 2002; Sun et al., 2003).

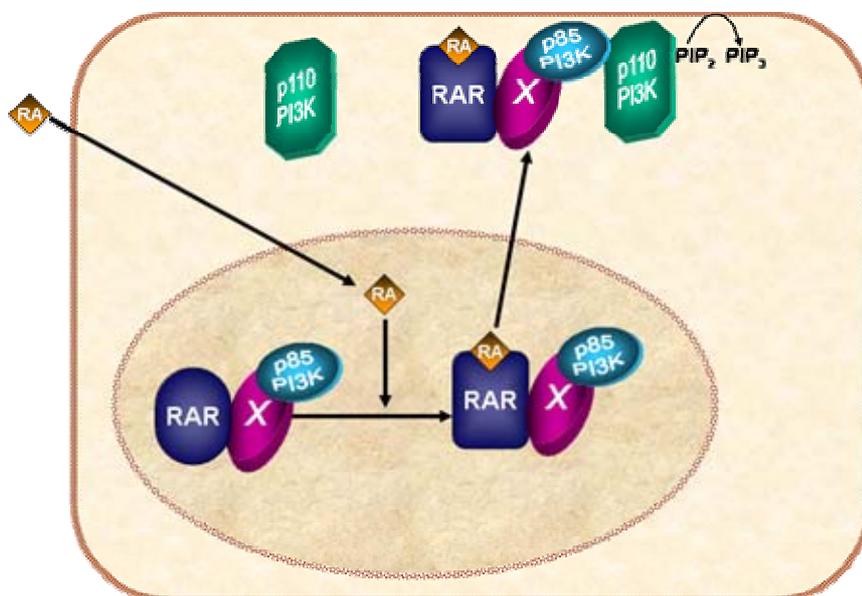


Figura 43. Modelo de activación de PI3K por RA. El receptor RAR, p85-PI3K y una proteína X forman un complejo estable que se localiza en el núcleo en ausencia de RA. La activación de RAR por su ligando específico produce la translocación de este complejo a la membrana plasmática, donde se produce la interacción con la subunidad catalítica p110 que resulta en la activación de PI3K.

Para obtener finalmente la regulación de la actividad de PI3K dependiente de ligando, las diferentes dinámicas de las dos subfamilias de receptores nucleares de hormona y sus peculiaridades podrían imponer diferentes soluciones, lo que originaría estas diferencias. Los receptores vacíos de la subfamilia retinoico/tiroidea son de localización principalmente nuclear y no forman complejos inactivos con hsp90 u otras proteínas. Una interacción estable de p85-PI3K con el receptor, como mostramos aquí para el receptor RAR y como se ha observado para el receptor de la hormona tiroidea (Cao et al., 2005), requeriría un confinamiento estricto del complejo dentro del núcleo para evitar una activación desregulada de PI3K en ausencia de ligando, como ocurre, por ejemplo, con el receptor quimérico *Myr-RAR α* . Tras la activación por ligando, el receptor migra a la membrana plasmática, permitiendo interacciones con los componentes de la

maquinaria de transducción de señales y favoreciendo el reclutamiento de la subunidad catalítica al complejo.

Por el contrario, los receptores de esteroides no unidos al ligando forman complejos inactivos con hsp90 y otras proteínas que mantienen al receptor en una forma inactiva. Además de los receptores que residen en membrana plasmática, el receptor vacío se localiza principalmente en el citoplasma u oscilando entre núcleo y citoplasma, y se traslada al núcleo tras su unión al ligando. Por eso, el receptor de esteroides no unido a ligando sería más accesible para aceptores citoplasmáticos y de membrana o moléculas *scaffold*, y la interacción con p85-PI3K requeriría un estricto control por el ligando a fin de evitar una desregulación de la activación de PI3K por el apo-receptor. Además, parece concebible que las interacciones con hsp90 y/o otras proteínas dentro del complejo del apo-receptor evitaran una interacción con p85-PI3K, la cual únicamente tendría lugar una vez disociado el complejo tras la unión del ligando.

7. La respuesta transcripcional a RA integra tanto las acciones clásicas genómicas como las acciones atípicas no genómicas

Mediante el uso de los “microarrays” de Affymetrix se han analizado los perfiles de expresión génica de células de neuroblastoma SH-SY5Y control y células tratadas con ácido retinoico durante 6 horas. Este es un tiempo intermedio de “compromiso” entre las acciones clásicas y las acciones rápidas del RA, que ha permitido detectar tanto genes regulados directamente por el receptor RAR como genes regulados por vías de señalización (Tabla 5). En esta tabla, se presentan tanto genes regulados directamente por RAR, algunos de los cuales contienen en su promotor los elementos de unión al receptor RAR (DR+1-DR+5), como genes regulados por diversas vías de señalización intracelular, como la vía de MAP kinasas, AKT kinasa o la vía NFκB.

Regulados directamente por RAR		Regulados por vías de señal	
<i>HOXD3</i>	Elemento DR+5	<i>MAFB</i>	Inducido por ERK MAP Kinasa
<i>HOXD4</i>	Elemento DR+5	<i>ZFP36L2</i>	Immediate early gene Regulado por EGF, PMA
<i>TLX2</i>	Elemento DR+2	<i>SNAI2</i>	Regulado por vías anti-apoptóticas
<i>RARA</i>	Elemento DR+2	<i>SREBF1</i>	Regulado por AKT kinasa
<i>RARB</i>	Elemento DR+5	<i>GDF10</i>	Regulado por NF-κB
<i>RET</i>		<i>CXCR4</i>	Regulado por NF-κB
<i>NAV2</i>		<i>BTG2</i>	Immediate early gene Inducible por NGF
<i>CRABP2</i>	Elementos DR+1, DR+5	<i>TRIB1</i>	Regulado por inflamación
<i>CYP26A1</i>	2 Elementos DR+5	<i>DUSP7</i>	Inducible por NGF
<i>CYP26B1</i>		<i>PLAT</i>	Inducible por LPS, IL3, NF-κB
<i>DHRS3</i>			
<i>RAI2</i>			
<i>PLAT</i>	Elemento DR+5		

Tabla 5. Genes regulados directamente por el receptor RAR y genes regulados por vías de señalización en respuesta a RA en células de neuroblastoma humano.

Los resultados muestran que la respuesta transcripcional a RA integra tanto acciones clásicas genómicas (genes regulados directamente por RAR a través de su unión a elementos RARE localizados en su promotor), como las acciones atípicas no genómicas (genes cuya regulación depende de la activación de vías de señalización, y que conllevan a la activación de otros factores de transcripción). Por tanto, una de las consecuencias de la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT por RA en células de neuroblastoma humano es que se incrementa la complejidad de la respuesta transcripcional a RA.

Conclusiones

En esta tesis se ha estudiado el mecanismo de activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT inducida por ácido retinoico (RA). El conjunto de resultados expuestos en el trabajo permite obtener las siguientes conclusiones:

1. La activación de la vía de señalización de PI3K/AKT y MAPKs ERK1/2 por RA se produce a través de un mecanismo rápido no genómico, que no requiere ni transcripción de nuevos genes ni síntesis de proteínas.
2. Esta activación de PI3K/AKT por RA no es exclusiva de células neurales, sino que se trata de un fenómeno más general, tal y como muestran los estudios realizados en células NIH-3T3.
3. El receptor nuclear RAR es el responsable de la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT por RA.
4. La región del extremo C-terminal de RAR α comprendida entre los aminoácidos 206 y 282, está implicada en la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT. Esta región incluye las hélices H3, H4 y H5 de la estructura tridimensional de RAR, donde se localiza un motivo muy conservado en todos los miembros de la superfamilia de los Receptores Nucleares de Hormonas.
5. La unión del ácido retinoico al receptor RAR controla su localización intracelular, promoviendo la presencia de RAR en la membrana plasmática.

6. El receptor RAR interacciona con las subunidades de PI3K de diferente manera. La interacción con la subunidad reguladora p85 es constitutiva y no se altera por la unión del ligando. La activación de RAR por RA produce el reclutamiento de la subunidad catalítica p110-PI3K. Sin embargo, la interacción entre p85-PI3K y RAR no parece ser directa, y otras proteínas todavía desconocidas deben tomar parte de este complejo.

7. Los resultados obtenidos nos permiten proponer un modelo para la activación de PI3K por RA, en el que el RA regula la actividad de PI3K controlando la presencia del complejo RAR-p85 en la membrana plasmática, y facilitando el ensamblaje de un complejo de señalización que incluye la subunidad catalítica p110-PI3K.

8. La respuesta transcripcional a RA integra tanto las acciones clásicas genómicas (genes regulados directamente por RAR a través de su unión a elementos RARE localizados en su promotor), como las acciones atípicas no genómicas (genes cuya regulación depende de la activación de vías de señalización, que conllevan a la activación de factores de transcripción).

Bibliografia

- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P. y Marino, M.** (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* **16**(1): 231-237.
- Alexander, F.** (2000). Neuroblastoma. *Urol Clin North Am* **27**(3): 383-392, vii.
- Alija, A. J., Bresgen, N., Sommerburg, O., Langhans, C. D., Siems, W. y Eckl, P. M.** (2006). {beta}-carotene breakdown products enhance genotoxic effects of oxidative stress in primary rat hepatocytes. *Carcinogenesis*.
- Altucci, L. y Gronemeyer, H.** (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 181-193.
- Altucci, L., Rossin, A., Hirsch, O., Nebbioso, A., Vitoux, D., Wilhelm, E., Guidez, F., De Simone, M., Schiavone, E. M., Grimwade, D., Zelent, A., de The, H. y Gronemeyer, H.** (2005). Retinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor. *Cancer Res* **65**(19): 8754-8765.
- Andrews, P. W.** (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* **103**(2): 285-293.
- Antonyak, M. A., Boehm, J. E. y Cerione, R. A.** (2002). Phosphoinositide 3-kinase activity is required for retinoic acid- induced expression and activation of the tissue transglutaminase. *J Biol Chem* **277**(17): 14712-14716.
- Appel, B. y Eisen, J. S.** (2003). Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron* **40**(3): 461-464.
- Aranda, A. y Pascual, A.** (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**(3): 1269-1304.
- Bagowski, C. P., Xiong, W. y Ferrell, J. E., Jr.** (2001). c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* **276**(2): 1459-1465.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. y Gottlieb, D. I.** (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**(2): 342-357.
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., van der Valk, M., Berns, A. y Murre, C.** (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**(5): 885-892.

- Barber, T., Borrás, E., Torres, L., García, C., Cabezuelo, F., Lloret, A., Pallardó, F. V. y Viña, J. R.** (2000). Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* **29**(1): 1-7.
- Barettino, D., Vivanco Ruiz, M. M. y Stunnenberg, H. G.** (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *Embo J* **13**(13): 3039-3049.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P. y Rochette-Egly, C.** (2000). TFIID interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* **275**(29): 21896-21904.
- Bastien, J., Plassat, J. L., Payrastra, B. y Rochette-Egly, C.** (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is essential for the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Oncogene* **25**(14): 2040-2047.
- Bastien, J. y Rochette-Egly, C.** (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**: 1-16.
- Bennani, Y. L., Marron, K. S., Mais, D. E., Flatten, K., Nadzan, A. M. y Boehm, M. F.** (1998). Synthesis and Characterization of a Highly Potent and Selective Isotopically Labeled Retinoic Acid Receptor Ligand, ALRT1550. *J Org Chem* **63**(3): 543-550.
- Berkenstam, A., Ruiz, M. M., Barettino, D., Horikoshi, M. y Stunnenberg, H. G.** (1992). Cooperativity in transactivation between retinoic acid receptor and TFIID requires an activity analogous to E1A. *Cell* **69**(3): 401-412.
- Boonyaratanakornkit, V., Scott, M. P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S. M., Maller, J. L., Miller, W. T. y Edwards, D. P.** (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* **8**(2): 269-280.
- Bourguet, W., Germain, P. y Gronemeyer, H.** (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* **21**(10): 381-388.
- Breitman, T. R., Collins, S. J. y Keene, B. R.** (1981). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* **57**(6): 1000-1004.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E. y Collins, S. J.** (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2936-2940.

- Brodeur, G. M.** (2002). Commentary on Kaneko et al.: Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol* **24**(8): 608-609.
- Brown, D. A. y Rose, J. K.** (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**(3): 533-544.
- Brunet, A., Datta, S. R. y Greenberg, M. E.** (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 297-305.
- Cabrera-Poch, N., Sánchez-Ruiloba, L., Rodríguez-Martínez, M. y Iglesias, T.** (2004). Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J Biol Chem* **279**(27): 28592-28602.
- Caelles, C., González-Sancho, J. M. y Muñoz, A.** (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* **11**(24): 3351-3364.
- Camisa, C.** (1995). Treatment of severe psoriasis with systemic drugs. *Dermatol Nurs* **7**(2): 107-118; quiz 119-120.
- Cañón, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S. y Aranda, A.** (2004). Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* **15**(12): 5583-5592.
- Cao, X., Kambe, F., Moeller, L. C., Refetoff, S. y Seo, H.** (2005). Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* **19**(1): 102-112.
- Capiati, D., Benassati, S. y Boland, R. L.** (2002). 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *J Cell Biochem* **86**(1): 128-135.
- Carter, C. A.** (2003). Retinoic acid signaling through PI 3-kinase induces differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells. *Exp Mol Pathol* **75**(1): 34-44.
- Castel, V., Cañete, A., Noguera, R., Navarro, S. y Oltra, S.** (2005). [Neuroblastoma.]. *Clin Transl Oncol* **7**(3): 133-145.
- Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M. V. y Auricchio, F.** (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *Embo J* **20**(21): 6050-6059.

- Clarke, N., Germain, P., Altucci, L. y Gronemeyer, H.** (2004). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* **6**(25): 1-23.
- Conlon, R. A.** (1995). Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* **11**(8): 314-319.
- Cross, F. R., Garber, E. A., Pellman, D. y Hanafusa, H.** (1984). A short sequence in the p60src N terminus is required for p60src myristylation and membrane association and for cell transformation. *Mol Cell Biol* **4**(9): 1834-1842.
- Chambliss, K. L. y Shaul, P. W.** (2002). Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* **23**(5): 665-686.
- Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Anderson, R. G., Mendelsohn, M. E. y Shaul, P. W.** (2002). ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* **16**(5): 938-946.
- Chaour, B., Bellon, G., Seite, S., Borel, J. P. y Fourtanier, A.** (1997). All-trans-retinoic acid enhances collagen gene expression in irradiated and non-irradiated hairless mouse skin. *J Photochem Photobiol B* **37**(1-2): 52-59.
- Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D. y Evans, R. M.** (1999). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**(5): 675-686.
- Chen, J. D. y Evans, R. M.** (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**(6548): 454-457.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Church, G. M. y Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 1991-1995.
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A. y Parker, M. G.** (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* **11**(3): 1025-1033.
- de Boland, A. R. y Norman, A. W.** (1998). 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ signaling in chick enterocytes: enhancement of tyrosine phosphorylation and rapid stimulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Cell Biochem* **69**(4): 470-482.
- Dersch, H. y Zile, M. H.** (1993). Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids. *Dev Biol* **160**(2): 424-433.

- Di Domenico, M., Castoria, G., Bilancio, A., Migliaccio, A. y Auricchio, F.** (1996). Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* **56**(19): 4516-4521.
- Diez del Corral, R. y Storey, K. G.** (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* **26**(8): 857-869.
- Dos Santos, E. G., Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Le Moal, V., Giudicelli, Y. y Lacasa, D.** (2002). Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* **143**(3): 930-940.
- Dragnev, K. H., Petty, W. J. y Dmitrovsky, E.** (2003). Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention. *Cancer Biol Ther* **2**(4 Suppl 1): S150-156.
- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. y Greenberg, M. E.** (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**(5300): 661-665.
- Duester, G., Mic, F. A. y Molotkov, A.** (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* **143-144**: 201-210.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. y Chambon, P.** (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *Embo J* **13**(22): 5370-5382.
- Durston, A. J., Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H. F., de Vries, N. J., Heideveld, M. y Nieuwkoop, P. D.** (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**(6229): 140-144.
- Durston, A. J., van der Wees, J., Pijnappel, W. W., Schilthuis, J. G. y Godsave, S. F.** (1997). Retinoid signalling and axial patterning during early vertebrate embryogenesis. *Cell Mol Life Sci* **53**(4): 339-349.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin y Byers, S.** (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* **9**(23): 1415-1418.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. y Comella, J. X.** (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* **75**(3): 991-1003.

- Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S. y Kawashima, H.** (1997). Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **235**(1): 99-102.
- Epstein, J. H.** (1981). Effects of retinoids on ultraviolet-induced carcinogenesis. *J Invest Dermatol* **77**(1): 144-146.
- Epstein, J. H. y Grekin, D. A.** (1981). Inhibition of ultraviolet-induced carcinogenesis by all-trans retinoic acid. *J Invest Dermatol* **76**(3): 178-180.
- Espada, J., Peinado, H., Esteller, M. y Cano, A.** (2005). Direct metabolic regulation of beta-catenin activity by the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-OH kinase. *Exp Cell Res* **305**(2): 409-417.
- Evans, A. E., Gerson, J. y Schnauffer, L.** (1976). Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr* **44**: 49-54.
- Farias, E. F., Marzán, C. y Mira-y-López, R.** (2005). Cellular retinol-binding protein-I inhibits PI3K/Akt signaling through a retinoic acid receptor-dependent mechanism that regulates p85-p110 heterodimerization. *Oncogene* **24**(9): 1598-1606.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., Jr. y Bland, K. I.** (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* **16**(1): 70-84.
- Fisher, G. J. y Voorhees, J. J.** (1996). Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *Faseb J* **10**(9): 1002-1013.
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A. y Sugimoto, C.** (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**(56): 8983-8998.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R. y Cantley, L. C.** (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**(4): 435-437.
- Freedman, L. P.** (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* **97**(1): 5-8.
- Giguere, V.** (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* **20**(5): 689-725.
- Glass, C. K. y Rosenfeld, M. G.** (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**(2): 121-141.

- Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A. y Laudet, V.** (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* **3**(11): 950-964.
- Gudas, L. J.** (1994). Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* **269**(22): 15399-15402.
- Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, E., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Laubach, V. E., Moskowitz, M. A., French, B. A., Ley, K. y Liao, J. K.** (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* **8**(5): 473-479.
- Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L. y Ingraham, H. A.** (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* **3**(4): 521-526.
- Haynes, M. P., Sinha, D., Russell, K. S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C. y Bender, J. R.** (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* **87**(8): 677-682.
- Hill, D. P. y Robertson, K. A.** (1997). Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LA-N-5 after treatment with retinoic acid. *Brain Res Dev Brain Res* **102**(1): 53-67.
- Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N. y Murata, Y.** (2001). Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **276**(5): 3459-3467.
- Hlsken, J. y Behrens, J.** (2000). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **113** (Pt 20): 3545.
- Hmama, Z., Nandan, D., Sly, L., Knutson, K. L., Herrera-Velit, P. y Reiner, N. E.** (1999). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. *J Exp Med* **190**(11): 1583-1594.
- Honda, K., Shimohama, S., Sawada, H., Kihara, T., Nakamizo, T., Shibasaki, H. y Akaike, A.** (2001). Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* **64**(5): 466-475.
- Hong, W. K. y Sporn, M. B.** (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **278**(5340): 1073-1077.

- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. y Rosenfeld, M. G.** (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**(6548): 397-404.
- Hsu, S. L., Hsu, J. W., Liu, M. C., Chen, L. Y. y Chang, C. D.** (2000). Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of p27(Kip1) and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Exp Cell Res* **258**(2): 322-331.
- Huang, E. J. y Reichardt, L. F.** (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* **24**: 677-736.
- Huang, E. J. y Reichardt, L. F.** (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**: 609-642.
- Hughes, P. J., Zhao, Y., Chandraratna, R. A. y Brown, G.** (2006). Retinoid-mediated stimulation of steroid sulfatase activity in myeloid leukemic cell lines requires RARalpha and RXR and involves the phosphoinositide 3-kinase and ERK-MAP kinase pathways. *J Cell Biochem* **97**(2): 327-350.
- Irving, H., Lovat, P. E., Hewson, Q. C., Malcolm, A. J., Pearson, A. D. y Redfern, C. P.** (1998). Retinoid-induced differentiation of neuroblastoma: comparison between LG69, an RXR-selective analogue and 9-cis retinoic acid. *Eur J Cancer* **34**(1): 111-117.
- Izpisua-Belmonte, J. C., Tickle, C., Dolle, P., Wolpert, L. y Duboule, D.** (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* **350**(6319): 585-589.
- Jennings, R. W., LaQuaglia, M. P., Leong, K., Hendren, W. H. y Adzick, N. S.** (1993). Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history. *J Pediatr Surg* **28**(9): 1168-1174.
- Johnson, A. T., Klein, E. S., Gillett, S. J., Wang, L., Song, T. K., Pino, M. E. y Chandraratna, R. A.** (1995). Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. *J Med Chem* **38**(24): 4764-4767.
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A. y Kalnins, V. I.** (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* **94**(2): 253-262.
- Kambhampati, S., Li, Y., Verma, A., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D. K., Parmar, S., Giafis, N., Kalvakolanu, D. V., Rahman, A., Uddin, S., Minucci, S., Tallman, M. S., Fish, E. N. y Plataniias, L. C.** (2003). Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* **278**(35): 32544-32551.

- Kandel, E. S. y Hay, N.** (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* **253**(1): 210-229.
- Kaplan, D. R. y Cooper, E.** (2001). PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nat Neurosci* **4**(1): 5-7.
- Kaplan, D. R. y Miller, F. D.** (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **10**(3): 381-391.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J. y Waterfield, M. D.** (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 615-675.
- Kessel, M. y Gruss, P.** (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**(1): 89-104.
- Kim, Y. S., MacDonald, P. N., Dedhar, S. y Hruska, K. A.** (1996). Association of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-occupied vitamin D receptors with cellular membrane acceptance sites. *Endocrinology* **137**(9): 3649-3658.
- Kligman, L. H., Duo, C. H. y Kligman, A. M.** (1984). Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet damaged dermal connective tissue. *Connect Tissue Res* **12**(2): 139-150.
- Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W. M., Apell, G., Escobedo, M. A. y Williams, L. T.** (1996). Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol* **16**(8): 4117-4127.
- Kolch, W.** (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G. B., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Roberson, P. K., Weinstein, R. S., Jilka, R. L. y Manolagas, S. C.** (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* **104**(5): 719-730.
- Kruyt, F. A., van der Veer, L. J., Mader, S., van den Brink, C. E., Feijen, A., Jonk, L. J., Kruijer, W. y van der Saag, P. T.** (1992). Retinoic acid resistance of the variant embryonal carcinoma cell line RAC65 is caused by expression of a truncated RAR alpha. *Differentiation* **49**(1): 27-37.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. y Glass, C. K.** (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**(6548): 451-454.

- Lal, L., Li, Y., Smith, J., Sassano, A., Uddin, S., Parmar, S., Tallman, M. S., Minucci, S., Hay, N. y Plataniias, L. C. (2005). Activation of the p70 S6 kinase by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **105**(4): 1669-1677.
- Lammer, E. J., Chen, D. T., Hoar, R. M., Agnish, N. D., Benke, P. J., Braun, J. T., Curry, C. J., Fernhoff, P. M., Grix, A. W., Jr., Lott, I. T. et al. (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* **313**(14): 837-841.
- Lane, M. A. y Bailey, S. J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* **75**(4): 275-293.
- Leever, S. J., Vanhaesebroeck, B. y Waterfield, M. D. (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 219-225.
- Lefebvre, P., Martín, P. J., Flajollet, S., Dedieu, S., Billaut, X. y Lefebvre, B. (2005). Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm* **70**: 199-264.
- Levin, E. R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* **19**(8): 1951-1959.
- Li, J. J., Dong, Z., Dawson, M. I. y Colburn, N. H. (1996). Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res* **56**(3): 483-489.
- Liou, J. C., Ho, S. Y., Shen, M. R., Liao, Y. P., Chiu, W. T. y Kang, K. H. (2005). A rapid, nongenomic pathway facilitates the synaptic transmission induced by retinoic acid at the developing synapse. *J Cell Sci* **118**(Pt 20): 4721-4730.
- López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P. y Baretino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **277**(28): 25297-25304.
- Losel, R. y Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(1): 46-56.
- Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Haseroth, K. y Wehling, M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* **83**(3): 965-1016.
- Lotan, R. y Nicolson, G. L. (1977). Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the growth of untransformed, transformed, and tumor cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* **59**(6): 1717-1722.

- Lu, M. L., Schneider, M. C., Zheng, Y., Zhang, X. y Richie, J. P.** (2001). Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Biol Chem* **276**(16): 13442-13451.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. y Sigler, P. B.** (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**(6335): 497-505.
- Maden, M.** (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 843-853.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I. y Zile, M.** (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol* **6**(4): 417-426.
- Maden, M., Gale, E. y Zile, M.** (1998). The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J Nutr* **128**(2 Suppl): 471S-475S.
- Malik, S. y Roeder, R. G.** (2000). Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* **25**(6): 277-283.
- Mangelsdorf, D. J. y Evans, R. M.** (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**(6): 841-850.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. y Evans R. M.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**(6): 835-839.
- Mark, M., Ghyselinck, N. B. y Chambon, P.** (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 451-480.
- Marte, B. M. y Downward, J.** (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* **22**(9): 355-358.
- Mason, K. E.** (1935). Foetal death, prolonged gestation, and difficult parturition in the rat as a result of vitamin A deficiency. *Am J Anat* **57**: 303-349.
- Matsuo, T., Seth, P. y Thiele, C. J.** (2001). Increased expression of p27Kip1 arrests neuroblastoma cell growth. *Med Pediatr Oncol* **36**(1): 97-99.
- Matsuo, T. y Thiele, C. J.** (1998). p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* **16**(25): 3337-3343.

- Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Seeger, R. C., Stram, D. O., Harris, R. E., Ramsay, N. K., Swift, P., Shimada, H., Black, C. T., Brodeur, G. M., Gerbing, R. B. y Reynolds, C. P.** (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**(16): 1165-1173.
- McBroom, L. D., Flock, G. y Giguere, V.** (1995). The nonconserved hinge region and distinct amino-terminal domains of the ROR alpha orphan nuclear receptor isoforms are required for proper DNA bending and ROR alpha-DNA interactions. *Mol Cell Biol* **15**(2): 796-808.
- McCaffery, P. J., Adams, J., Maden, M. y Rosa-Molinar, E.** (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* **18**(3): 457-472.
- McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. y O'Malley, B. W.** (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**(1-6): 3-12.
- Means, A. L. y Gudas, L. J.** (1995). The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Biochem* **64**: 201-233.
- Melino, G., Piacentini, M., Patel, K., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piredda, L. y Kemshead, J. T.** (1991). Retinoic acid and alpha-difluoromethylornithine induce different expression of neural-specific cell adhesion molecules in differentiating neuroblastoma cells. *Prog Clin Biol Res* **366**: 283-291.
- Metivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hubner, M. R., Brand, H., Penot, G., Manu, D., Denger, S., Reid, G., Kos, M., Russell, R. B., Kah, O., Pakdel, F. y Gannon, F.** (2002). A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* **10**(5): 1019-1032.
- Metzger, S., Leff, T. y Breslow, J. L.** (1990). Nuclear factors AF-1 and C/EBP bind to the human ApoB gene promoter and modulate its transcriptional activity in hepatic cells. *J Biol Chem* **265**(17): 9978-9983.
- Mey, J. y McCaffery, P.** (2004). Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist* **10**(5): 409-421.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C. y Auricchio, F.** (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J* **19**(20): 5406-5417.

- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. y Auricchio, F.** (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol- receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* **15**(6): 1292-1300.
- Miller, W. H., Jr.** (1998). The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* **83**(8): 1471-1482.
- Miller, W. H., Jr., Moy, D., Li, A., Grippo, J. F. y Dmitrovsky, E.** (1990). Retinoic acid induces down-regulation of several growth factors and proto-oncogenes in a human embryonal cancer cell line. *Oncogene* **5**(4): 511-517.
- Montano, M. M., Muller, V., Trobaugh, A. y Katzenellenbogen, B. S.** (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* **9**(7): 814-825.
- Moras, D. y Gronemeyer, H.** (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**(3): 384-391.
- Morgenstern, J. P. y Land, H.** (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**(12): 3587-3596.
- Morriss-Kay, G. M., Murphy, P., Hill, R. E. y Davidson, D. R.** (1991). Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. *Embo J* **10**(10): 2985-2995.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. y Chambon, P.** (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *Embo J* **12**(6): 2349-2360.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P. y Chambon, P.** (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post- implantation development. *Nat Genet* **21**(4): 444-448.
- Niles, R. M.** (2004). Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* **555**(1-2): 81-96.
- Norman, A. W., Okamura, W. H., Hammond, M. W., Bishop, J. E., Dormanen, M. C., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A. L., Daane, E., Houry, R. y Farach-Carson, M. C.** (1997). Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6- s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol Endocrinol* **11**(10): 1518-1531.

- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S. y Hammar, S.** (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**(18): 1150-1155.
- Pahlman, S., Hoehner, J. C., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E. y Söderholm, H.** (1995). Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* **4**: 453-458.
- Pan, J., Kao, Y. L., Joshi, S., Jeetendran, S., Dipette, D. y Singh, U. S.** (2005). Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **93**(3): 571-583.
- Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K. y Rosenfeld, M. G.** (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13**(24): 3198-3208.
- Pratt, M. A., Kralova, J. y McBurney, M. W.** (1990). A dominant negative mutation of the alpha retinoic acid receptor gene in a retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cell. *Mol Cell Biol* **10**(12): 6445-6453.
- Rai, D., Frolova, A., Frasor, J., Carpenter, A. E. y Katzenellenbogen, B. S.** (2005). Distinctive actions of membrane-targeted versus nuclear localized estrogen receptors in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **19**(6): 1606-1617.
- Razandi, M., Alton, G., Pedram, A., Ghonshani, S., Webb, P. y Levin, E. R.** (2003a). Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **23**(5): 1633-1646.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L. y Levin, E. R.** (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* **13**(2): 307-319.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L. y Levin, E. R.** (2004). Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* **18**(12): 2854-2865.
- Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T. y Levin, E. R.** (2003b). Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* **278**(4): 2701-2712.

- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. y Moras, D.** (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all- trans retinoic acid. *Nature* **378**(6558): 681-689.
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. y Prossnitz, E. R.** (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**(5715): 1625-1630.
- Reynolds, C. P., Kane, D. J., Einhorn, P. A., Matthay, K. K., Crouse, V. L., Wilbur, J. R., Shurin, S. B. y Seeger, R. C.** (1991). Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* **366**: 203-211.
- Reynolds, C. P. y Maples, J.** (1985). Modulation of cell surface antigens accompanies morphological differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Prog Clin Biol Res* **175**: 13-37.
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G. y Maurer, B. J.** (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* **197**(1-2): 185-192.
- Rochette-Egly, C.** (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* **15**(4): 355-366.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M. y Chambon, P.** (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**(1): 97-107.
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C. y De Luca, L. M.** (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* **80**(3): 1021-1054.
- Sambrook, J. C., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaeffer, H. J. y Weber, M. J.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2435-2444.
- Scheid, M. P., Marignani, P. A. y Woodgett, J. R.** (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* **22**(17): 6247-6260.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**(2): 211-225.
- Schor, N. F.** (1999). Neuroblastoma as a neurobiological disease. *J Neurooncol* **41**(2): 159-166.
- Schule, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M. y Evans, R. M.** (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14): 6092-6096.

- Sidell, N.** (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* **68**(4): 589-596.
- Sidell, N., Altman, A., Haussler, M. R. y Seeger, R. C.** (1983). Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* **148**(1): 21-30.
- Simoncini, T. y Genazzani, A. R.** (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* **148**(3): 281-292.
- Simoncini, T., Genazzani, A. R. y Liao, J. K.** (2002). Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* **105**(11): 1368-1373.
- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W. y Liao, J. K.** (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**(6803): 538-541.
- Slager, H. G., Van Inzen, W., Freund, E., Van den Eijnden-Van Raaij, A. J. y Mummery, C. L.** (1993). Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* **14**(3): 212-224.
- Smith, C. L. y O'Malley, B. W.** (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* **25**(1): 45-71.
- Song, X., Bishop, J. E., Okamura, W. H. y Norman, A. W.** (1998). Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in promyelocytic NB4 leukemia cells: a structure-function study. *Endocrinology* **139**(2): 457-465.
- Soprano, D. R., Qin, P. y Soprano, K. J.** (2004). Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* **24**: 201-221.
- Strickland, S. y Mahdavi, V.** (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**(2): 393-403.
- Sun, M., Yang, L., Feldman, R. I., Sun, X. M., Bhalla, K. N., Jove, R., Nicosia, S. V. y Cheng, J. Q.** (2003). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem* **278**(44): 42992-43000.
- Sun, S. Y. y Lotan, R.** (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* **41**(1): 41-55.

- Suzuki, Y., Hruska, K. A., Reid, I., Alvarez, U. M. y Avioli, L. V. (1989). Characterization of phospholipase C activity of the plasma membrane and cytosol of an osteoblast-like cell line. *Am J Med Sci* **297**(3): 135-144.
- Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Curry, D. B., Chang, Z., Dean, D. D. y Boyan, B. D. (1998). 1,25(OH)₂D₃ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-dependent pathways involving phospholipase A₂ and phospholipase C in growth zone chondrocytes. *J Bone Miner Res* **13**(4): 559-569.
- Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Ellis, E. B., Helm, S. H., Gomez, R., Dean, D. D. y Boyan, B. D. (1996). Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃. *J Cell Physiol* **167**(3): 380-393.
- Tanti, J. F., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffey, P. J., Van Obberghen, E. y Le Marchand-Brustel, Y. (1997). Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* **138**(5): 2005-2010.
- Tate, B. F., Allenby, G., Janocha, R., Kazmer, S., Speck, J., Sturzenbecker, L. J., Abarzua, P., Levin, A. A. y Grippo, J. F. (1994). Distinct binding determinants for 9-cis retinoic acid are located within AF-2 of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol* **14**(4): 2323-2330.
- Thiele, C. J., Reynolds, C. P. y Israel, M. A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* **313**(6001): 404-406.
- Thompson, C. C. y Evans, R. M. (1989). Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10): 3494-3498.
- Thompson, J. N., Howell, J. M., Pitt, G. A. y McLaughlin, C. I. (1969). The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br J Nutr* **23**(3): 471-490.
- Tremblay, G. B., Bergeron, D. y Giguere, V. (2001). 4-Hydroxytamoxifen Is an Isoform-Specific Inhibitor of Orphan Estrogen- Receptor-Related (ERR) Nuclear Receptors beta and gamma. *Endocrinology* **142**(10): 4572-4575.
- Truckenmiller, M. E., Vawter, M. P., Cheadle, C., Coggiano, M., Donovan, D. M., Freed, W. J. y Becker, K. G. (2001). Gene expression profile in early stage of retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Restor Neurol Neurosci* **18**(2-3): 67-80.

- Tsokos, M., Scarpa, S., Ross, R. A. y Triche, T. J.** (1987). Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix proteins. *Am J Pathol* **128**(3): 484-496.
- Tsukahara, K., Takema, Y., Fujimura, T., Moriwaki, S., Kitahara, T., Imayama, S. y Imokawa, G.** (1999). All-trans retinoic acid promotes the repair of tortuosity of elastic fibres in rat skin. *Br J Dermatol* **140**(6): 1048-1053.
- Twal, W., Roze, L. y Zile, M. H.** (1995). Anti-retinoic acid monoclonal antibody localizes all-trans-retinoic acid in target cells and blocks normal development in early quail embryo. *Dev Biol* **168**(2): 225-234.
- Ueki, K., Fruman, D. A., Brachmann, S. M., Tseng, Y. H., Cantley, L. C. y Kahn, C. R.** (2002). Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol* **22**(3): 965-977.
- Unni, E., Sun, S., Nan, B., McPhaul, M. J., Cheskis, B., Mancini, M. A. y Marcelli, M.** (2004). Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res* **64**(19): 7156-7168.
- Urano, A., Sugawara, A., Kanatsuka, H., Kagechika, H., Saito, A., Sato, K., Kudo, M., Takeuchi, K. y Ito, S.** (2005). Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* **112**(5): 727-736.
- Vadlamudi, R. K., Manavathi, B., Balasenthil, S., Nair, S. S., Yang, Z., Sahin, A. A. y Kumar, R.** (2005). Functional implications of altered subcellular localization of PELP1 in breast cancer cells. *Cancer Res* **65**(17): 7724-7732.
- Valverde, M. A. y Parker, M. G.** (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem Sci* **27**(4): 172-173.
- Vertino, A. M., Bula, C. M., Chen, J. R., Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Kousteni, S., Norman, A. W. y Manolagas, S. C.** (2005). Nongenotropic, anti-apoptotic signaling of 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. Mediation by Src, phosphatidylinositol 3-, and JNK kinases. *J Biol Chem* **280**(14): 14130-14137.
- Virtamo, J., Pietinen, P., Huttunen, J. K., Korhonen, P., Malila, N., Virtanen, M. J., Albanes, D., Taylor, P. R. y Albert, P.** (2003). Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. *Jama* **290**(4): 476-485.

- Vivanco, I. y Sawyers, C. L.** (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Wali, R. K., Baum, C. L., Sitrin, M. D. y Brasitus, T. A.** (1990). 1,25(OH)₂ vitamin D₃ stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest* **85**(4): 1296-1303.
- Watters, J. J., Campbell, J. S., Cunningham, M. J., Krebs, E. G. y Dorsa, D. M.** (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**(9): 4030-4033.
- Wehling, M., Spes, C. H., Win, N., Janson, C. P., Schmidt, B. M., Theisen, K. y Christ, M.** (1998). Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(10): 3517-3522.
- Wilson, J. G., Roth, C. B. y Warkany, J.** (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. *Am J Anat* **92**: 189-217.
- Windhorst, D. B.** (1982). The use of isotretinoin in disorders of keratinization. *J Am Acad Dermatol* **6**(4 Pt 2 Suppl): 708-709.
- Wolbach, S. B. y Howe, P. R.** (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. *J. Exp. Med.* **42**: 753-777.
- Wong, C. W., McNally, C., Nickbarg, E., Komm, B. S. y Cheskis, B. J.** (2002). Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14783-14788.
- Wuarin, L. y Sidell, N.** (1991). Differential susceptibilities of spinal cord neurons to retinoic acid- induced survival and differentiation. *Dev Biol* **144**(2): 429-435.
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. y Gronemeyer, H.** (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* **3**(1): 87-94.
- Yang-Yen, H. F., Zhang, X. K., Graupner, G., Tzukerman, M., Sakamoto, B., Karin, M. y Pfahl, M.** (1991). Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. *New Biol* **3**(12): 1206-1219.
- Yang, N., Schule, R., Mangelsdorf, D. J. y Evans, R. M.** (1991). Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3559-3563.

- Yu, J., Wjasow, C. y Backer, J. M.** (1998). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* **273**(46): 30199-30203.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. y Gronemeyer, H.** (1994). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *Embo J* **13**(6): 1414-1424.
- Zhang, L., Nadzan, A. M., Heyman, R. A., Love, D. L., Mais, D. E., Croston, G., Lamph, W. W. y Boehm, M. F.** (1996). Discovery of novel retinoic acid receptor agonists having potent antiproliferative activity in cervical cancer cells. *J Med Chem* **39**(14): 2659-2663.
- Zhao, Q., Tao, J., Zhu, Q., Jia, P. M., Dou, A. X., Li, X., Cheng, F., Waxman, S., Chen, G. Q., Chen, S. J., Lanotte, M., Chen, Z. y Tong, J. H.** (2004). Rapid induction of cAMP/PKA pathway during retinoic acid-induced acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Leukemia* **18**(2): 285-292.
- Zhou, H., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. y Pittman, R. N.** (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**(26): 16568-16575.
- Zile, M. H.** (1998). Vitamin A and embryonic development: an overview. *J Nutr* **128**(2 Suppl): 455S-458S.
- Zwick, E., Bange, J. y Ullrich, A.** (2002). Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* **8**(1): 17-23.