



**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES  
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA  
Trabajo de Fin de Grado  
Curso 2023-2024**



# **LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ER $\beta$ EN LÍNEAS CELULARES SECRETORAS DE INSULINA**

**Autor: Mario Prieto Sanchís**

**Tutor: Ángel Nadal Navajas**

**Cotutora: Cristina Quereda Galvañ**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA SANITARIA DE ELCHE**



# Índice

Resumen .....	I
Abreviaturas .....	II
1. Introducción .....	1
1.1 La célula $\beta$ -pancreática .....	1
1.2 Secreción de insulina inducida por glucosa .....	1
1.3 Estrógenos .....	2
1.4 Receptores de estrógenos .....	3
1.5 Estructura de ER $\beta$ .....	4
1.6 Mecanismos de señalización de ER $\beta$ .....	6
2. Antecedentes y objetivos .....	8
3. Materiales y métodos.....	9
3.1 Cultivo celular de la línea productora de insulina INS-1E .....	9
3.2 Protocolo de silenciamiento de ER $\beta$ .....	9
3.3 Sobreexpresión de ER $\beta$ en INS-1E.....	10
3.4 Extracción de proteínas totales .....	11
3.5 Cuantificación de proteínas.....	11
3.6 Western Blot.....	12
3.7 Inmunocitoquímica .....	13
3.8 Coeficiente de Manders.....	15
4. Resultados.....	15
4.1 Inmunolocalización de ER $\beta$ en la línea celular INS-1E .....	15
4.2 Silenciamiento de ER $\beta$ en la línea celular INS-1E.....	18
4.3. Inmunolocalización de ER $\beta$ silenciado en la línea celular INS-1E .....	20
4.4 Sobreexpresión de ER $\beta$ en la línea celular INS-1E .....	23
4.5 Inmunolocalización de ER $\beta$ sobreexpresado en la línea celular INS-1E.....	24
5. Discusión .....	30
6. Conclusiones y proyecciones futuras.....	32
7. Bibliografía.....	33

## Resumen

La diabetes mellitus de tipo 2 se caracteriza por la incapacidad del paciente de regular los niveles de glucosa en sangre, que puede deberse a una disfunción en la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas o a la resistencia de los tejidos diana a la insulina. Se ha observado que el 17- $\beta$  estradiol (E2) aumenta la secreción de insulina en respuesta a glucosa en el islote de Langerhans pancreático, actuando a través de los receptores de estrógenos. Además, los estrógenos están relacionados con la mejora de la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo.

En este trabajo de investigación, se ha estudiado la expresión y localización del receptor de estrógenos ER $\beta$  en el núcleo, en el complejo de Golgi, retículo endoplasmático y mitocondrias en la línea celular INS-1E de células- $\beta$  pancreáticas de rata. Además, hemos puesto a punto el silenciamiento de ER $\beta$ , mediante siRNAs, y la sobreexpresión de ER $\beta$ , por medio de un plásmido de sobreexpresión, para posibles estudios futuros de pérdida y ganancia de función. Hemos estudiado cómo afectan estas técnicas a la localización celular de ER $\beta$  en las células INS-1E, obteniendo hallazgos significativos sobre su distribución subcelular.

**Palabras clave:** célula beta, receptor de estrógenos beta, línea celular INS-1E, 17 $\beta$ -estradiol



## Abstract

Type 2 diabetes mellitus is characterized by the patient's inability to regulate blood glucose levels, which may be due to dysfunction in insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells or insulin resistance in target tissues. It has been observed that 17- $\beta$  estradiol (E2) increases glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of Langerhans by acting through estrogen receptors. Additionally, estrogens are associated with improved insulin sensitivity in skeletal muscle, liver, and adipose tissue.

In this research work, the expression and localization of the estrogen receptor ER $\beta$  in the nucleus, Golgi complex, endoplasmic reticulum, and mitochondria in the rat pancreatic  $\beta$ -cell line INS-1E were studied. Furthermore, we have established the silencing of ER $\beta$ , via siRNAs, and overexpression of ER $\beta$ , through an overexpression plasmid, for potential future studies of loss and gain of function. We have studied how these techniques affect the cellular localization of ER $\beta$  in INS-1E cells, obtaining significant findings regarding its subcellular distribution.

**Keywords:** beta cell, estrogen receptor beta, INS-1E cell line, 17 $\beta$ -estradiol

## Abreviaturas

**Aa:** Aminoácido

**ADP:** *Adenosine diphosphate*. Adenosín difosfato

**AF1:** *Activation function 1*. Función de activación 1

**AF2:** *Activation function 2*. Función de activación 2

**AMPC:** *Cyclic adenosine monophosphate*. Adenosín monofosfato cíclico

**AR:** *Androgen receptor*. Receptor de andrógenos

**ATP:** *Adenosine triphosphate*. Adenosín trifosfato

**BCA:** *Bicinchoninic acid*. Ácido bicinconínico

**BSA:** *Bovine serum albumin*. Albúmina de suero bovino

**[Ca<sup>2+</sup>]:** Concentración de calcio intracelular

**DBD:** *DNA binding domain*. Dominio de unión a ADN

**DNA:** *Deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico

**E2:** 17β-estradiol

**EGFP:** *Enhanced Green fluorescent protein*. Proteína fluorescente verde mejorada.

**ER:** *Estrogen receptor*. Receptor de estrógenos

**ERα:** *Estrogen receptor alpha*. Receptor de estrógenos alfa

**ERβ:** *Estrogen receptor beta*. Receptor de estrógenos beta

**ERE:** *Estrogen response elements*. Elementos de respuesta a estrógenos

**K<sub>ATP</sub>:** Canales de potasio dependientes de ATP

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*. Proteína fluorescente verde

**GIP:** *Gastric inhibitor polipeptide*. Polipéptido inhibidor gástrico

**GM130:** *Golgi marker 130*. Marcador de Golgi 130

**GMPc:** *Cyclic guanosine monophosphate*. Guanosina monofosfato cíclica

**GPGR:** *G protein-coupled estrogen receptor*. Receptor de estrógenos acoplado a proteína G

**GR:** *Glucocorticoid receptor*. Receptor de glucocorticoides

**GLP1:** *Glucagon-like peptide receptor*. Péptido 1 similar a glucagón

**GK:** *Glucokinase*. Glucoquinasa

**GSIS:** *Glucose stimulated insulin secretion*. Secreción de insulina estimulada por glucosa

**HSP:** *Heat shock protein*. Proteína de choque térmico

**LBD:** *Ligand binding domain*. Dominio de unión a ADN

**MAPK:** *Mitogen-activated protein kinases*. proteínas quinasas activadas por mitógenos

**mRNA:** *Messenger RNA*. ARN mensajero

**NLS:** *Nuclear localization signal*. Señal de localización nuclear

**NR:** *Nuclear receptor*. Receptor nuclear

**PA:** *Palmitic acid*. Ácido palmítico

**PATs:** Palmitoiltransferasas

**PBS:** *Phosphate-buffered saline*. Tampón fosfato salino

**PFA:** *Paraformaldehyde*. Paraformaldehído

**PI3K:** *Phosphatidylinositol-3-kinases*. Fosfatidilinositol-3-quinasa

**PKG:** *Protein kinase G*. Proteína quinasa G

**RNA:** *Ribonucleic acid*. Ácido ribonucleico

**RPMI 1640:** *Roswell Park Memorial Institute 1640*.

**siRNA:** *small interfering RNA*. ARN pequeño de interferencia.

**SUR1:** *Sulfonylurea receptor 1*. Receptor de sulfonilurea 1

**TBS:** *Tris-buffered saline*. Solución salina tamponada con Tris.

**TBS-T:** *Tris-buffered saline with Tween 20*. Solución salina tamponada con Tris, con Tween 20

**TCA:** *Tricarboxylic acid cycle*. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

**VGCC:** *Voltage-gated calcium channels*. Canales de calcio dependientes de voltaje

# 1. Introducción

## 1.1 La célula $\beta$ -pancreática

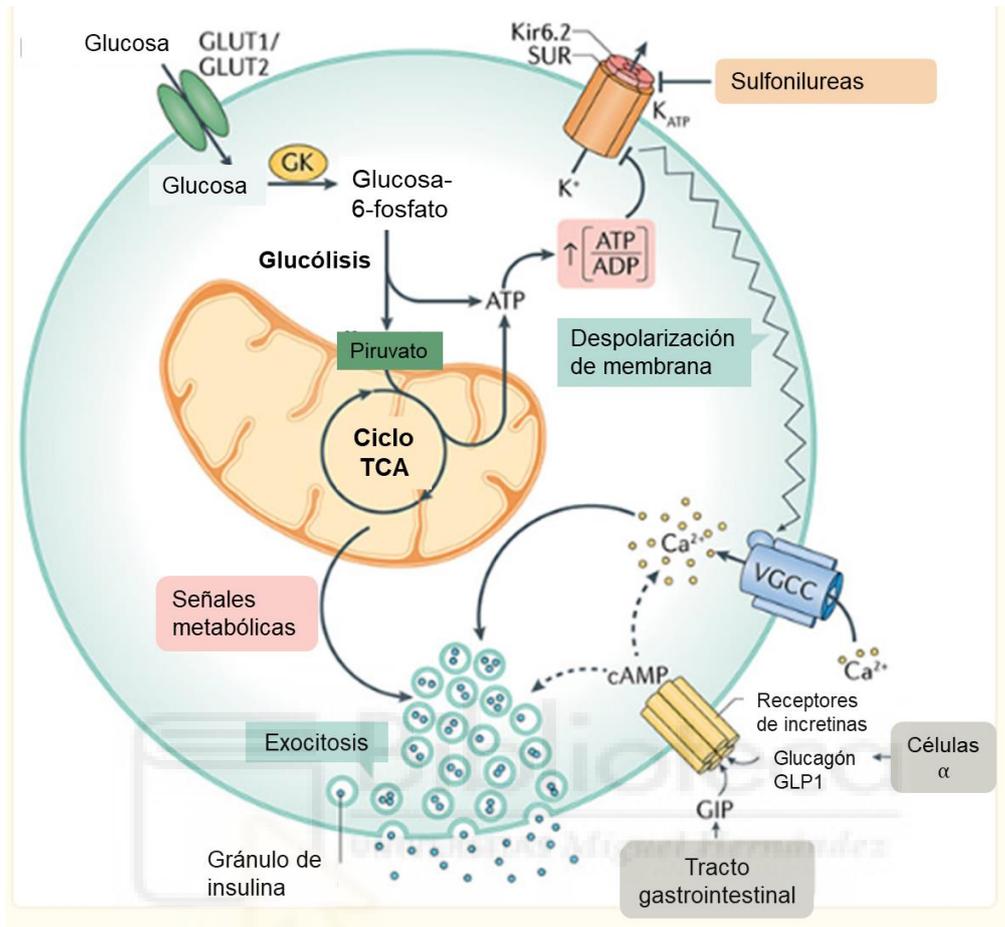
Las células- $\beta$  se encuentran en el interior de los islotes de Langerhans, localizados en el páncreas y se encargan de la producción y secreción de la insulina. Los islotes de Langerhans están formados por cinco tipos celulares, las células- $\alpha$  productoras de glucagón, las células- $\delta$  productoras de somatostatina, células- $\gamma$  o PP productoras de los polipéptidos pancreáticos, las células- $\epsilon$  productoras de ghrelina y las células- $\beta$ . Estas últimas son el componente mayoritario de los islotes ocupando un alrededor de un 65-90% en los islotes de roedores y un 50-55% en los humanos. Los fallos en la fisiología de estas células pueden llevar a afecciones como la diabetes mellitus, caracterizada por una elevación de niveles de glucosa en sangre<sup>1</sup>.

Cuando las células- $\beta$  no funcionan correctamente o son insuficientes en número, la capacidad del cuerpo para regular los niveles de glucosa en sangre se ve comprometida. En la diabetes tipo 1 el sistema inmunológico ataca y destruye las células- $\beta$ , ocasionando una falta de producción de insulina. En el caso de la diabetes tipo 2, que afecta al 90% de las personas diagnosticadas como diabéticas, los tejidos se vuelven menos sensibles a la insulina y, además, las células- $\beta$  no producen la suficiente insulina para satisfacer las demandas y acaban entrando en un proceso de desdiferenciación, agotamiento o apoptosis, lo que lleva a una elevación crónica de los niveles de glucosa en sangre<sup>2</sup>.

## 1.2 Secreción de insulina inducida por glucosa

El mecanismo por el cual se produce la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) requiere de la entrada inicial de la glucosa extracelular en la célula a través del transportador GLUT1 en humanos, o GLUT2 en roedores, asociado a la glucoquinasa (GK). Una vez en el citoplasma celular, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato por la GK, quedando atrapada en el interior celular<sup>3</sup>. Posteriormente, la glucosa-6-fosfato se metaboliza por la vía glucolítica, liberando moléculas de ATP al formar piruvato que se oxida en la mitocondria por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) generando más moléculas de ATP. El incremento de la relación ATP:ADP ocasiona el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (canales  $K_{ATP}$ ), los cuales se encargan de mantener el potencial de reposo de las células- $\beta$ <sup>4,5</sup>, despolarizando la membrana y consecuentemente, abriendo los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VGCC) aumentando la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). De este modo, se activan una serie de proteínas quinasas que interaccionan con la vía exocítica celular desencadenando la liberación de la insulina al medio extracelular (Figura 1)<sup>3,6</sup>. Se ha comprobado que concentraciones de glucosa superiores a 6 mM son suficientes para que se alcance el potencial de despolarización de la membrana plasmática y generar potenciales de acción<sup>7</sup>, que pueden manifestarse en forma de ráfagas oscilatorias, especialmente con concentraciones de 5-15 mM

de glucosa, o exhibiendo una actividad más continua y picos sostenidos con concentraciones superiores a 16 mM de glucosa<sup>4</sup>.



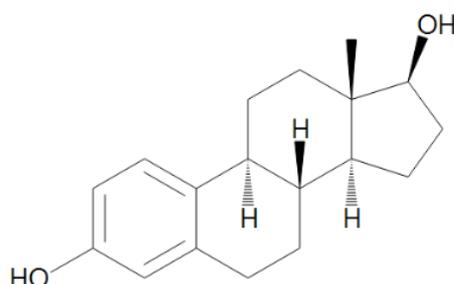
**Figura 1. Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS).** El aumento de glucosa extracelular provoca la entrada de glucosa al interior de las células-β por mediación del transportador GLUT1 (humanos) o GLUT2 (roedores), donde es fosforilada por la GK y se metaboliza mediante la glucólisis, produciendo una elevación de la relación ATP:ADP en el citoplasma. Este aumento de ATP implica el cierre de los canales K<sub>ATP</sub>, lo que conduce a la despolarización de la membrana. Consecuentemente, se abren los VGCC que inducen un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, desencadenando la exocitosis de los gránulos de insulina. Adicionalmente, la despolarización de la membrana promueve mecanismos de señalización metabólica mediados por el receptor de incretinas que contribuyen a la amplificación de la secreción de insulina (flechas discontinuas), donde participan el AMP cíclico (AMPC), el polipéptido inhibitor gástrico (GIP) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP1). Figura modificada de *Campbell et al., 2022*<sup>3</sup>.

### 1.3 Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas que tienen una estructura química derivada del ciclopentanoperhidrofenantreno. Son moléculas liposolubles que difunden fácilmente a través de las membranas y se sintetizan mayoritariamente en los ovarios, pero también en las glándulas suprarrenales, el tejido adiposo, el cerebro y los testículos<sup>8,9</sup>.

Los estrógenos naturales son considerados las hormonas femeninas más importantes ya que están involucrados en multitud de procesos clave en el desarrollo sexual femenino. Además, afectan a la distribución de la grasa e inducen la secreción en las glándulas sebáceas. En cambio, los estrógenos sintetizados en los testículos y las glándulas adrenales participan también en el desarrollo sexual masculino<sup>8</sup>.

El estrógeno más importante es el 17- $\beta$  estradiol (E2) ya que, además de ser clave en el desarrollo sexual del individuo, también actúa en muchos órganos, como el páncreas endocrino, el cerebro, el hígado y el hueso, y sistemas, como el esquelético, el muscular, el inmunológico y el cardiovascular<sup>10</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Estructura química del 17- $\beta$  estradiol.** Figura extraída de la web LGC standards.

Las acciones que ejercen los estrógenos en el músculo esquelético, hígado, sistema inmunitario y tejido adiposo están implicadas tanto en la mejora de la respuesta a la insulina, como en la prevención de acumulación de grasas e inflamación. En el caso de las células- $\beta$ , la actividad de los estrógenos también regula la secreción de insulina, el equilibrio de nutrientes y la supervivencia celular. La carencia de estrógenos favorece la disfunción metabólica, aumentando el riesgo de obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2<sup>11</sup>.

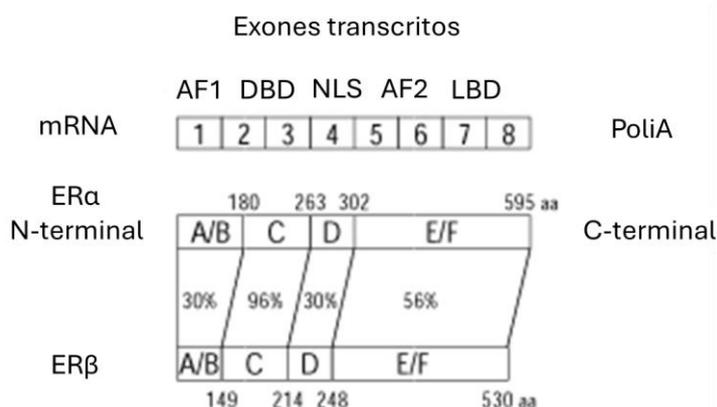
## 1.4 Receptores de estrógenos

Los receptores de estrógenos (ER) forman parte de una superfamilia de receptores nucleares (NR) que abarca seis subfamilias<sup>12</sup>. La subfamilia 3 engloba a los receptores de estrógenos, andrógenos, progesterona, mineralocorticoides y EERalpha, beta and gamma<sup>12</sup>. Existen tres tipos de receptores de estrógenos (ER) que llevan a cabo la señalización celular de los estrógenos, dos de ellos nucleares, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , y un receptor transmembrana acoplado a proteína G (GPER)<sup>13</sup>. De este último se ha descrito que puede regular la expresión génica de factores de transcripción por activación de proteínas que cambian su actividad<sup>14</sup>. Con respecto a ER $\alpha$  y ER $\beta$ , estos tienen funciones importantes en el metabolismo glucídico y lipídico, expresándose en adipocitos, músculo esquelético, hígado y páncreas endocrino. En este trabajo nos centraremos en ER $\beta$ .

## 1.5 Estructura de ER $\beta$

La proteína ER $\beta$  humana está codificada por el gen *ESR2* y está compuesta por seis dominios funcionales. El dominio A/B corresponde con el extremo N-terminal y no se conserva evolutivamente, siendo el más variable tanto en su secuencia como en su longitud<sup>8</sup>. Este dominio tiene la función de activación 1 (AF1), independiente de ligandos, implicada en interacciones proteína-proteína y en la activación de la expresión génica a nivel transcripcional<sup>14</sup>. El dominio C o dominio de unión a DNA (DBD), es el más conservado en la evolución y está involucrado en el reconocimiento y unión al DNA. Contiene una estructura de dos dedos de zinc que desempeña un papel importante en la dimerización del receptor y en la unión de este a secuencias específicas de DNA<sup>14</sup>. En el dominio D se sitúan las señales de localización nuclear (NLS) y de unión a factores de transcripción. La unión ligando-receptor se produce a través del dominio E o dominio de unión a ligando (LBD). Este dominio, que se encuentra próximo al extremo C-terminal, se encarga de la unión del receptor con el ligando, de su dimerización, translocación nuclear y de la transactivación de la expresión génica. El LBD también alberga la función de activación 2 (AF2), una región compleja implicada en la transcripción de genes, cuya estructura y función están reguladas por la unión de los ligandos<sup>8,14,15</sup>. Por último está el dominio F, que es la región situada en el extremo C-terminal, la cual presenta una estructura aminoacídica altamente variable y se encuentra poco descrita. No obstante, se ha propuesto que esta región interviene en la respuesta diferencial del receptor en función de si este se encuentra unido a un agonista o a un antagonista en el LBD, siendo importante en la transcripción mediada por E2<sup>16</sup>.

Es importante mencionar que ER $\alpha$  y ER $\beta$  presentan alrededor de un 45% de homología total en su estructura, conteniendo la misma región funcional con un 96% de homología en el DBD y un 56% en el LBD (Figura 3)<sup>15</sup>. Además, la afinidad de ambos receptores por E2 es similar.



**Figura 3. Estructura del mRNA y de las proteínas de los receptores de estrógenos.** Los números del interior del mRNA corresponden a los exones y las siglas exteriores a los dominios funcionales. En las proteínas, las letras del interior corresponden a los diferentes dominios estructurales de los receptores y los números del exterior señalan el número de aminoácidos. Los porcentajes representan el grado de homología entre los dominios estructurales de ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Abreviaturas: AF1, función de activación 1; AF2, función de activación 2; DBD, dominio de unión a DNA; LBD, dominio de unión a ligando; NLS, señal de localización nuclear; aa, aminoácido. Figura modificada de *Barrón-González A et al., 2001*<sup>15</sup>.

Actualmente, hay catalogadas 5 isoformas de ER $\beta$  en rata y 9 isoformas en humanos, las cuales son producidas por procesamiento alternativo. Dado que nuestro trabajo está enfocado en la utilización de la línea INS-1E, que procede de rata, nos centraremos en las isoformas de esta especie (Figura 4). La isoforma canónica ER $\beta$ 1 tiene un peso molecular de aproximadamente 59 kDa. Esta, se une a los estrógenos con una afinidad similar a la de ER $\alpha$  y activa la expresión de genes, que contienen elementos de respuesta a estrógenos (ERE), de una manera dependiente de estrógenos. La isoforma ER $\beta$ 2, tiene un peso molecular de 61 kDa, carece dominio de unión a ligando y se trata de un regulador negativo dominante de la acción de los estrógenos<sup>17</sup>. Las isoformas ER $\beta$ 3 y ER $\beta$ 4, con un peso molecular de 54 y 56 kDa, respectivamente, son ambas incapaces de unirse al DNA y activar la transcripción debido al truncamiento del dominio de unión a DNA<sup>18</sup>. De la isoforma ER $\beta$ 5 sabemos que es la de menor peso molecular, 47 kDa.

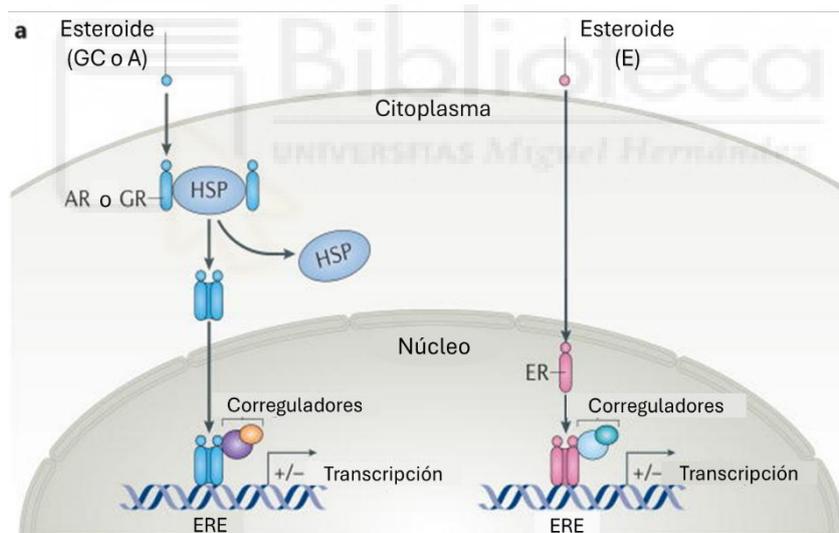


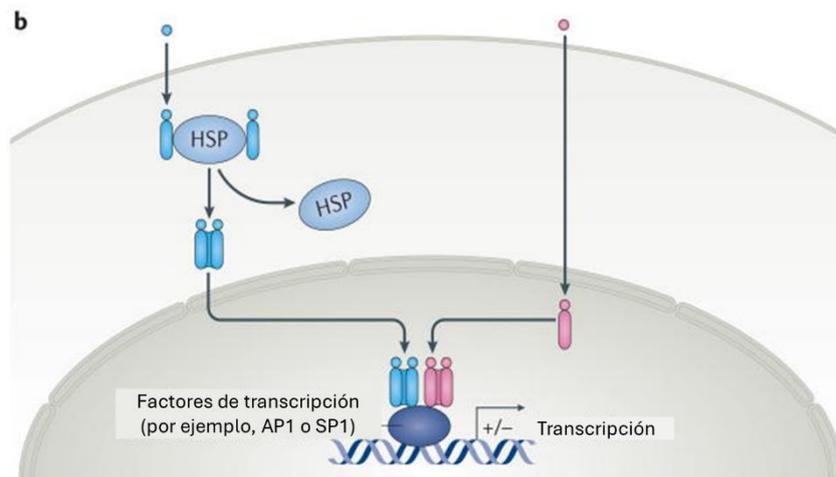
**Figura 4. Alineamiento de las distintas isoformas de ER $\beta$  de rata.** La isoforma canónica ER $\beta$ 1 está compuesta por un total de 530 aas. La isoforma ER $\beta$ 2 posee una inserción de aas en el LBD, por lo que es la isoforma más larga con un total de 548 aas. ER $\beta$ 3 presenta una delección de aas en el dominio DBD, estando constituido por 491 aas. La isoforma ER $\beta$ 4 tiene la misma delección en el DBD que ER $\beta$ 3 y la misma inserción en el LBD que ER $\beta$ 2, quedándose con un total de 509 aas. Por último, ER $\beta$ 5 tiene una gran delección que abarca parte del DBD hasta parte del LBD, siendo esta la isoforma de menor tamaño con 430 aas. Los asteriscos negros indican que el aa coincide en las 5 isoformas. Figura de elaboración propia a partir de las herramientas bioinformáticas Clustal Omega e InterPro, y las bases de datos UniProtKB y NCBI Entrez Protein.

## 1.6 Mecanismos de señalización de ER $\beta$

### A. Vía clásica o iniciada en el núcleo

La vía clásica de señalización implica la unión de E2 a ER $\beta$  en el citoplasma o en el núcleo celular. Los ER $\beta$  inactivos se encuentran mayoritariamente en el núcleo, pero también hay una fracción en el citoplasma donde están asociados a varias chaperonas, conocidas como "heat shock protein" (HSP), formando un complejo. Tras la unión del ligando a los ER $\beta$  ubicados en el núcleo, estos dimerizan formando homodímeros ER $\beta\beta$  y heterodímeros ER $\alpha\beta$ . Estos dímeros interactúan con secuencias palindrómicas específicas del DNA, más concretamente con los ERE que se encuentran en los promotores de los genes diana, regulando la maquinaria de transcripción. En cambio, cuando se unen estrógenos a los ER $\beta$  ubicados en el citoplasma, estos se disocian de las HSP, se translocan al núcleo y acaban dimerizando para llevar a cabo la regulación de la transcripción descrita anteriormente. Los dímeros pueden interactuar directamente sobre la secuencia de DNA o indirectamente por medio de factores de transcripción (Figura 5)<sup>10,19</sup>. Por tanto, el mecanismo de señalización clásico está implicado principalmente con la modulación de la expresión génica a nivel transcripcional. Estos mecanismos son lentos y se necesitan al menos 20-30 minutos para detectar un efecto celular<sup>19</sup>.





**Figura 5. Señalización nuclear de los ER.** a) Regulación directa de la transcripción génica mediada por los ER, así como también por los receptores de glucocorticoides (GR) y de andrógenos (AR), al unirse a los ERE del DNA. b) Regulación indirecta de la transcripción génica mediada por los ER, GR y AR al unirse a factores de transcripción que interaccionan con el DNA. Figura modificada de *Ellis R. Levin et al., 2016*<sup>20</sup>.

### B. Vía no clásica o iniciada fuera del núcleo

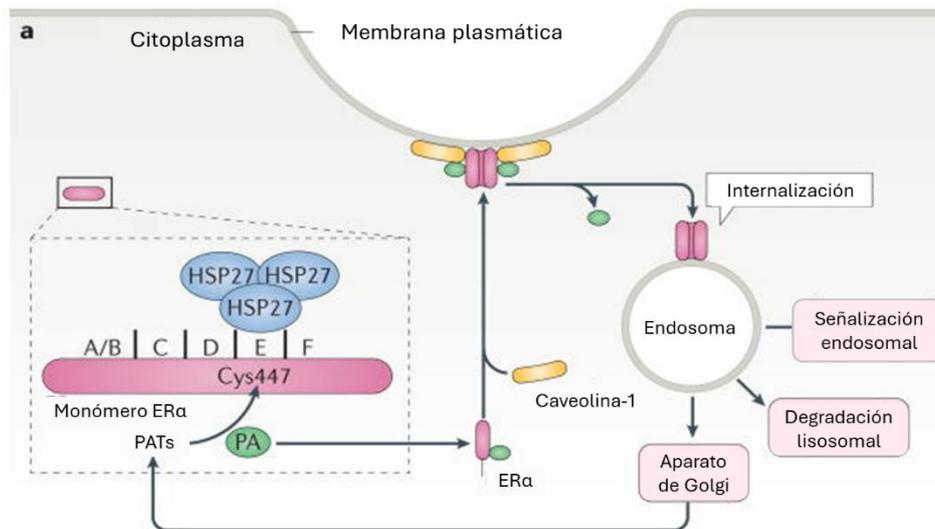
Por otra parte, se sabe que el E2 es capaz de producir respuestas celulares rápidas que actúan en pocos minutos o incluso segundos, debido a que existen ER extranucleares asociados a la membrana plasmática<sup>20</sup>. La localización de estos receptores en la membrana plasmática se debe a la palmitoilación, una modificación postraduccional que consiste en la unión covalente de un ácido palmítico a una proteína por mediación de las palmitoiltransferasas (PATs). En el caso de los ER, estos son palmitoilados en el complejo de Golgi y las PATs incorporan el ácido palmítico a una cisteína (Cys) (Cys447 en ER $\alpha$  y Cys418 en ER $\beta$ ) perteneciente a un motivo de 9 aminoácidos, similar en ER $\alpha$  y ER $\beta$ , que se encuentra en el dominio E de los ER. De este modo, los ER monoméricos unidos a HSP se encuentran en el complejo de Golgi y son palmitoilados, pasan al citoplasma, donde se asocian con la caveolina-1, quien los dirige a las caveolas de la membrana plasmática celular<sup>20,21,22</sup>. Una vez en la membrana, el E2 se une a los ER desencadenando una modulación de cascadas de señalización intracelular como la MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) ó AMPc. Además, en las células- $\beta$ , se ha visto que, en sinergia con la glucosa, cuando el E2 se une a un receptor de membrana, cierra los  $K_{ATP}$  y, como consecuencia, se potencia la señal de calcio, potenciando la secreción de insulina<sup>23</sup>. Este proceso está mediado por la vía de señalización del GMPc (guanosín monofosfato cíclico) y PKG (proteína quinasa G)<sup>19</sup>.

Una vez han señalizado, los ER se despalmitoilan y se internalizan en el endosoma, lo que puede desembocar en una señalización endosómica alternativa, en la degradación lisosomal de los receptores o bien en la translocación de estos al Golgi para que se vuelva a palmitoilar<sup>20</sup>.

El mecanismo de palmitoilación más estudiado es el de ER $\alpha$  (Figura 6)<sup>20</sup>, pero se ha demostrado que ER $\beta$  también depende de la palmitoilación para localizarse en la membrana y que parece

seguir un mecanismo similar, ya que al utilizar inhibidores de PATs ER $\beta$  deja de localizarse en la membrana y de interactuar con la caveolina-1<sup>24</sup>.

No obstante, todavía se sabe poco sobre esta vía de señalización.



**Figura 6. Palmitoilación de ER $\alpha$ .** En el complejo de Golgi, las palmitoiltransferasas añaden ácido palmítico (PA) en la Cys447 del motivo de 9 aas presente en el dominio E de ER $\alpha$  unido a HSP27. ER $\alpha$  se disocia de HSP27 y se une a la caveolina-1. Seguidamente se transloca a la membrana, donde participa en la señalización, se despalmiteila y se internaliza en el endosoma. Esto puede dar lugar a una señalización endosómica alternativa, a la degradación lisosomal del receptor o a la translocación del receptor al aparato de Golgi para volver a ser palmitoilado. Figura modificada de *Ellis R. Levin et al., 2016*<sup>20</sup>.

## 2. Antecedentes y objetivos

El 17- $\beta$  estradiol (E2) aumenta la secreción de insulina en respuesta a glucosa en el islote de Langerhans pancreático de ratón. En condiciones fisiológicas, la estimulación con E2 potencia un 30% la secreción de insulina producida por 8mM glucosa en células beta. Este efecto no se bloquea por la utilización de inhibidores de la síntesis proteica y de RNA, lo que indica que se debe a una señal rápida, mediada por un mecanismo no genómico<sup>23</sup>. El E2 actúa a través de los receptores de estrógenos presentes en la célula- $\beta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER.

El objetivo de este trabajo es determinar la localización celular de ER $\beta$  en la línea celular beta pancreática INS-1E, así como el efecto sobre la localización de su silenciamiento y su sobreexpresión.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Cultivo celular de la línea productora de insulina INS-1E

Para realizar este trabajo se ha utilizado la línea INS-1E, una línea inmortal de célula- $\beta$  pancreática de rata. Es un clon derivado de la línea original INS-1, que proviene de un insulinoma inducido por irradiación con Rayos X en ratas macho<sup>25</sup>. Estas células se cultivaron en medio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) suplementado con GlutaMAX™ (Gibco, 6170-010), suero fetal bovino (FBS) inactivado al 5% (Hyclone, SV3160.03), HEPES 1 M (Gibco, 15630-056), piruvato sódico 100 mM (Gibco, 11360-039), penicilina-estreptomicina (P/S) 10000 u/mL (Gibco, 15140-122) y ( $\beta$ -ME) 50 mM (Gibco, 31350-010), a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

Las células se mantuvieron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> hasta llegar a una confluencia adecuada. Llegado ese punto, debe realizarse el pase celular, despegando las células del frasco mediante tripsinización, utilizando tripsina-EDTA al 0,05% (Gibco) durante 3 minutos a 37°C. Después, la tripsina se neutraliza con medio fresco de cultivo. La mezcla celular se transfiere a un tubo de 15 mL (Falcon) y se centrifuga a 200 rcf durante 7 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en 5 mL de medio de cultivo. Para determinar la concentración celular por mL, se realiza un recuento celular utilizando la cámara de Neubauer. Para ello, se toma una muestra de 10  $\mu$ L de la suspensión celular y se cuentan las células en los 4 cuadrantes de la cámara en el microscopio. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ total células contadas}}{4} \times 10000 = \frac{N^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}}$$

Finalmente, se sembraron 1,5 millones de células/mL en frascos de 25 cm<sup>2</sup> para el mantenimiento del cultivo celular y 100.000 o 150.000 células/pocillo (según el experimento) en placas de 24 pocillos.

#### 3.2 Protocolo de silenciamiento de ER $\beta$

El silenciamiento génico mediante la utilización de pequeños fragmentos de RNA de interferencia (siRNA) es un proceso a partir del cual podemos inhibir la expresión de genes concretos. Los siRNAs actúan guiando el corte endonucleolítico del mRNA por nucleasas impidiendo, así, la traducción de estos. En nuestro caso, hemos utilizado siRNA monocatenario complementario al mRNA transcrito del gen *ESR2*, cuya función es dirigir la degradación de dicho mRNA al complementarse a él.

En este caso hemos realizado un doble silenciamiento para aumentar el rendimiento. Como control hemos utilizado un siRNA control comercial (Invitrogen, 4390843) que contiene secuencias aleatorias de siRNA y para silenciar hemos usado siRNA constituido por un fragmento

de la secuencia complementaria del mRNA transcrito del gen *ESR2* (Invitrogen, 145910), los cuales vienen a una concentración stock de 20  $\mu$ M y deben almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para llevar a cabo el silenciamiento de ER $\beta$  en la línea celular INS-1E necesitamos: 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos con 500  $\mu$ L de medio de cultivo (ver apartado 3.1); Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, 13778-075), que es un agente de transfección basado en nanopartículas lipídicas que interactúan con los siRNAs formando complejos lipídicos que permiten su entrada en la célula; medio Opti-MEM, que es un medio de cultivo específico que ayuda a mejorar la eficacia y la especificidad del proceso, al contener nutrientes y factores que favorecen la supervivencia celular y la eficiencia de transfección al facilitar la entrada de los siRNAs; y medio de transfección, que es igual que el medio de cultivo de INS-1E pero sin suero ni antibiótico para optimizar la transfección.

Preparamos en un tubo Eppendorf una dilución 1:50 de Lipofectamina RNAiMAX (1  $\mu$ L/pocillo) en medio Opti-MEM (50  $\mu$ L/pocillo). Al mismo tiempo, preparamos en otros dos tubos Eppendorf una dilución 1:66 del siRNA control (0,75  $\mu$ L/pocillo) y otra del siRNA de ER $\beta$  (0,75  $\mu$ L/pocillo) en medio Opti-MEM, obteniendo una concentración de 300 nM de siRNA. Tras 5 minutos de incubación, mezclamos el mismo volumen de medio Opti-MEM + Lipofectamina RNAiMAX con cada preparación de medio Opti-MEM + siRNA, y dejamos incubando 20 minutos más. Una vez transcurrido el tiempo, añadimos el volumen restante, para llegar a 500  $\mu$ L de volumen total por pocillo, obteniendo una concentración de 30 nM de siRNA, el medio de transfección. Tras esto, ponemos 500  $\mu$ L de la mezcla final en cada pocillo y lo dejamos incubando durante 18 horas.

Transcurridas las 18 horas, cambiamos el medio de las células y añadimos medio de transfección nuevo. Tras 24 h realizamos el segundo silenciamiento repitiendo los pasos que hemos descrito anteriormente, y a las 18 horas volvemos a cambiar el medio, pero esta vez añadimos medio RPMI 1640 y GlutaMAX con antibiótico y suero. A las 72 horas del segundo silenciamiento se para el experimento para recoger las muestras, bien para extracción de proteínas o para inmunocitoquímica.

### 3.3 Sobreexpresión de ER $\beta$ en INS-1E

La sobreexpresión génica es un proceso a partir del cual se incrementa de manera significativa la expresión de un gen específico, mediante la introducción exógena de DNA o RNA que contenga la misma secuencia del gen de interés. En nuestro caso, hemos inducido la sobreexpresión de ER $\beta$  mediante la introducción exógena de un plásmido de fusión a la proteína fluorescente verde (GFP) que contiene la secuencia del gen *ESR2* (BD Biosciences Clontech, 6084-1).

En la sobreexpresión de ER $\beta$  se realizó un control donde solamente se trataba a las células con lipofectamina, un control donde se transfectaba con el plásmido que contiene únicamente el gen

que codifica la GFP, y una transfección con el plásmido que contiene el gen de la GFP fusionado al gen *ESR2*.

Para llevarlo a cabo necesitamos: 150.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos con 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (ver apartado 3.1.1); Lipofectamina 2000; medio Opti-MEM; y medio de transfección.

Preparamos en un tubo Eppendorf una dilución con Lipofectamina 2000 (1,4  $\mu\text{L}$ /pocillo) en medio Opti-MEM (50  $\mu\text{L}$ /pocillo). Paralelamente, preparamos en otros tres tubos Eppendorf, en dos de ellos ponemos GFP en uno (0,6  $\mu\text{L}$ /pocillo) y GFP + plásmido (0,6  $\mu\text{L}$ /pocillo) en el otro con medio Opti-MEM (50  $\mu\text{L}$ /pocillo), y en el tubo restante ponemos únicamente medio Opti-MEM. Dejamos incubando 5 minutos. Después echamos un tercio de la solución con medio Opti-MEM + Lipofectamina 2000 en cada una de las tres disoluciones, y dejamos incubando 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, añadimos el medio de transfección y, tras esto, ponemos 500  $\mu\text{L}$  en cada pocillo y lo dejamos incubando durante 18 horas.

Transcurridas las 18 horas, procedemos a cambiar el medio de las células y añadimos el medio RPMI 1640 y GlutaMAX con antibiótico y suero.

### 3.4 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales de la muestra celulares preparamos tampón RIPA con inhibidores de proteasas. Este tampón se prepara en agua mQ con Tris-HCl 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; NP40 al 1%; SDS al 0,1%; DOC al 0,5%; inhibidores de proteasas al 25X.

A continuación, quitamos el medio de cultivo de la placa de 24 pocillos donde tenemos las células y ponemos 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de RIPA. Tras esto, almacenamos la placa a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Finalmente rascamos los pocillos obteniendo la muestra para su cuantificación.

### 3.5 Cuantificación de proteínas

Cuantificamos la concentración de proteínas totales diluida 10 veces en tampón RIPA. Para ello, utilizamos el método del ácido bicinonínico (BCA) con el kit BCA Protein Assay® (Thermo Fisher Scientific, 23225), siguiendo las indicaciones del fabricante, en placas de 96 pocillos. Para obtener la curva de calibrado, empleamos albúmina de suero bovino (BSA) diluida en el mismo tampón de extracción como proteína patrón. Añadimos 200  $\mu\text{L}$  de reactivo BCA a cada pocillo con 10  $\mu\text{L}$  de muestra o proteína patrón. Este reactivo se compone de 50 volúmenes de reactivo A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , BCA y  $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$  en NaOH 0,1 M) y un volumen de reactivo B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 4%). Finalmente, medimos la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro-fluorímetro GENios Microplate Reader® (TECAN; Männedorf, Suiza). Las muestras de proteína se alicuotan y se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## 3.6 Western Blot

El Western Blot es una técnica basada en la detección y análisis de proteínas específicas de una muestra. En nuestro caso, queríamos observar las diferencias entre el nivel de proteína basal de ER $\beta$  con respecto a su sobreexpresión y silenciamiento.

Para llevar a cabo el Western Blot, seguimos el siguiente protocolo:

### 1º Preparación del gel de poliacrilamida al 10%

- En un tubo, añadimos agua destilada; Trizma Base a pH 8,8 y una concentración de 0,37M (Sigma, T1503); SDS al 1% (Panreac AppliChem, A2572); acrilamida al 30% (Bio-Rad, 1610156). Por último, se echa el persulfato amónico al 1% y TEMED (tetrametiletilendiamina) al 0,5% (Bio-Rad, 1610800), ya que estos son los agentes que van a iniciar la polimerización del gel.
- Homogenizamos bien y rellenamos cada cristal.
- Añadimos isopropanol para que el gel se quede lo más recto posible y dejamos el gel en reposo un mínimo de 40 minutos para que polimerice.
- Quitamos el isopropanol.
- Preparamos el gel concentrador que se prepara de la misma manera que el anterior, pero cambiando el buffer, que en este caso es Trizma Base a pH 6,8 y a una concentración de 0,5 M.
- Una vez puesto el gel concentrador, colocamos el peine.

### 2º Electroforesis en gel:

- Colocamos el gel de poliacrilamida en el soporte y añadimos running buffer 1X (Trizma Base, Glicina (Panreac AppliChem, A1067) y SDS).
- Quitamos el peine y cargamos las muestras junto con un marcador de peso molecular a los pozos del gel.
- Realizamos la electroforesis aplicando un voltaje de 100V durante 10 minutos y luego subimos a 130 V y lo dejamos constante durante 45 minutos, aproximadamente, hasta que las proteínas se separen según su peso.

### 3º Transferencia a membrana:

- Preparamos el sistema de transferencia electroforética: Para ello, se coloca sobre la placa negra del soporte una esponja humedecida con el buffer de transferencia, seguido de un trozo de papel 3MM (Whatman™, 3030-917) también humedecido, después ponemos el gel, la membrana de polivinilideno (PVDF) (Fisher Scientific, 15259894) encima del gel e hidratada durante 5-10 segundos en metanol y luego, de nuevo, papel 3MM, otra esponja humedecida y cerramos el soporte.
- Colocamos el soporte en el sistema de transferencia electroforética y añadimos el buffer de transferencia (Trizma Base y Glicina). Este proceso genera una gran cantidad de

calor, por lo que para evitar el sobrecalentamiento la cuba electroforética se encuentra envuelta con hielo y en su interior, además, colocamos un bloque de hielo.

- Iniciamos la electroforesis con un voltaje constante a 90 V durante 90 minutos
- Pasado ese tiempo, se habrán transferido las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa.

#### 4º Bloqueo e incubación con anticuerpos primarios:

- Preparamos la solución de bloqueo. Esta se trata de leche al 5%, que se prepara disolviendo leche en polvo en Tris buffer salino con Tween-20 (TBS-T), una solución tamponada que facilita el lavado de membranas.
- Añadimos la leche al 5% a la membrana y dejamos bloqueando durante 1 hora. La finalidad es prevenir la unión no específica de los anticuerpos y reducir el ruido de fondo.
- Transcurrida la hora, quitamos la leche y hacemos 3 lavados de 10 minutos con TBS-T.
- Añadimos el anticuerpo primario de ER $\beta$ . Este ha sido preparado diluyéndolo a 1:2000 en TBS-T y añadiendo, además BSA al 5% y azida al 0,01%.
- Dejamos incubando la membrana con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés durante la noche a 4°C.

#### 5º Incubación con anticuerpos secundarios

- Quitamos la solución con los anticuerpos primarios y realizamos un lavado rápido con TBS-T seguido de 3 lavados de 10 minutos para eliminar los anticuerpos primarios que no se han unido.
- Añadimos el anticuerpo secundario, el cual ha sido preparado a una dilución 1:5000. La dilución se hace en leche al 5%.
- Dejamos incubando la membrana con los anticuerpos secundarios durante 1 hora.
- Transcurrida la hora, realizamos un lavado rápido con TBS-T seguido de 3 lavados de 10 minutos para eliminar los anticuerpos secundarios que no se han unido.
- Añadimos TBS

#### 6º Revelamos las membranas

- Obtenemos las imágenes mediante quimioluminiscencia, utilizando como sustrato de la reacción el reactivo SuperSignal West Femto (Thermoscientific,46641) y como detector de la señal el ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories).

## 3.7 Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica a partir de la cual se aprovecha la especificidad de un anticuerpo para identificar y localizar de manera específica proteínas en células en cultivo. En términos generales, se basa en la utilización de anticuerpos primarios que han sido diseñados para reconocer una proteína concreta, seguido de la aplicación de anticuerpos secundarios marcados que emiten una señal visible al interaccionar con el anticuerpo primario. Estos

marcadores suelen ser fluoróforos o enzimas. En este caso, los anticuerpos secundarios utilizados están marcados con un fluoróforo.

Previamente a este experimento, habremos tratado dos pocillos de nuestra placa con MitoTracker (Invitrogen, M7512), un agente químico que es oxidado en la mitocondria dando lugar a un producto que sirve como marcador fluorescente mitocondrial. Este se aplicó sobre las células en cultivo a 100 nM en medio de transfección durante 40 minutos.

En primer lugar, cultivamos 150.000 células (para la expresión basal y la sobreexpresión de ER $\beta$ ) y 100.000 células (para la infraexpresión de ER $\beta$ ) de la línea INS-1E por cada pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos redondo estéril Menzel® en su base, y se incubaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C. Tras observar una confluencia adecuada de las células adheridas a lo cubreobjetos o tras haber aplicado los protocolos de infraexpresión y sobreexpresión de ER $\beta$ , fijamos las células con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón de fosfatos (PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, lavamos repetidas veces las células con PBS y permeabilizamos con Triton® X-100 al 0,2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, para que los anticuerpos tengan acceso al interior celular y se puedan unir a las proteínas de interés. Posteriormente, lavamos repetidas veces las células con PBS e incubamos en una cámara húmeda los cubreobjetos en solución de bloqueo BSA al 1% + PBS con Tritón X-100 al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de evitar la unión inespecífica de anticuerpos a epítomos de las células. Seguidamente, los cubreobjetos se incubaron en una cámara húmeda con los anticuerpos primarios durante 16 horas a 4 °C. Como controles negativos, se incubaron en paralelo cubreobjetos en solución de bloqueo omitiéndose los anticuerpos primarios, con el fin de comprobar que la inmunorreactividad observada era específica de estos. Los anticuerpos primarios utilizados han sido el anticuerpo monoclonal de ratón de ER $\beta$  14C8 (Invitrogen, MA1-23217) diluido a 1:200 en BSA, el anticuerpo policlonal de conejo GM130 (Invitrogen, PA5-85643), marcador del complejo de Golgi, y el anticuerpo policlonal de conejo KDEL (Invitrogen, PA1-013), marcador del retículo endoplásmico, ambos diluidos a 1:100 en BSA. Cabe mencionar, que para marcar las mitocondrias no utilizamos un anticuerpo, sino que usamos MitoTracker (Invitrogen, M7512).

Transcurridas las 16 horas, lavamos durante 10 minutos 3 veces con PBS, añadimos los anticuerpos secundarios e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la fotodegradación del marcador fluorescente. Los anticuerpos secundarios utilizados, diluidos a 1:500 en BSA, han sido: anti-ratón Alexa Fluor® 555 (Thermo Fisher Scientific, A32727); anti-conejo Alexa Fluor™ Plus 488 (Thermo Fisher Scientific, A32731); y anti-ratón Alexa Fluor® 647 (Thermo Fisher Scientific, A32728TR). Por último, lavamos durante 10 minutos 3 veces con PBS, añadimos el colorante de DNA llamado Hoechst (10  $\mu$ g/mL) diluido a 1:1000 en PBS, con la finalidad de teñir los núcleos celulares, e incubamos durante 10 minutos. Tras esto, lavamos repetidas veces con PBS, montamos las muestras en los portaobjetos y lo dejamos secar. Las muestras las visualizamos en el microscopio confocal LSM900 con Airyscan 2.

### 3.8 Coeficiente de Manders

El coeficiente de Manders, es un método estadístico que cuantifica la posible colocalización entre dos marcadores fluorescentes en una imagen. Se obtienen dos valores diferentes (Figura 7):  $M_1$ , definido como la relación entre la suma de píxeles con señal del canal rojo que coinciden con píxeles con señal del canal verde (o azul para los análisis de colocalización con Hoechst) y los píxeles totales con señal del canal rojo; y  $M_2$ , definido como la relación entre la suma de píxeles con señal del canal verde (o azul para los análisis de colocalización con Hoechst) que coinciden con píxeles con señal del canal rojo y los píxeles totales con señal del canal verde (o azul)<sup>26</sup>.

$$\mathbf{A} \quad M_1 = \frac{\sum_i R_{i, \text{coloc}}}{\sum_i R_i} \quad \mathbf{B} \quad M_2 = \frac{\sum_i G_{i, \text{coloc}}}{\sum_i G_i}$$

**Figura 7. A)** Expresión matemática del coeficiente  $M_1$  de colocalización de Manders, donde  $R_{i, \text{coloc}}$  representa los píxeles con señal roja que se colocalizan con píxeles con señal verde y  $R_i$  simboliza los píxeles totales con señal roja. **B)** Expresión matemática del coeficiente  $M_2$  de colocalización de Manders, donde  $G_{i, \text{coloc}}$  representa los píxeles con señal verde que se colocalizan con píxeles con señal roja y  $G_i$  simboliza los píxeles totales con señal verde. Imagen obtenida a partir de *Manders et al., 1993*<sup>26</sup>.

Los valores varían de 0 a 1. De estos, un valor cercano a 1 indica una alta colocalización, mientras que un valor cercano a 0 indica una baja colocalización. Más concretamente, el intervalo que se estableció para determinar mejor la colocalización es el siguiente: colocalización no detectable (0-0,2), colocalización baja (0,2-0,4), colocalización media (0,4-0,6), colocalización alta (0,6-0,8) y colocalización muy alta (0,8-1)<sup>27</sup>.

## 4. Resultados

### 4.1 Inmunolocalización de ER $\beta$ en la línea celular INS-1E

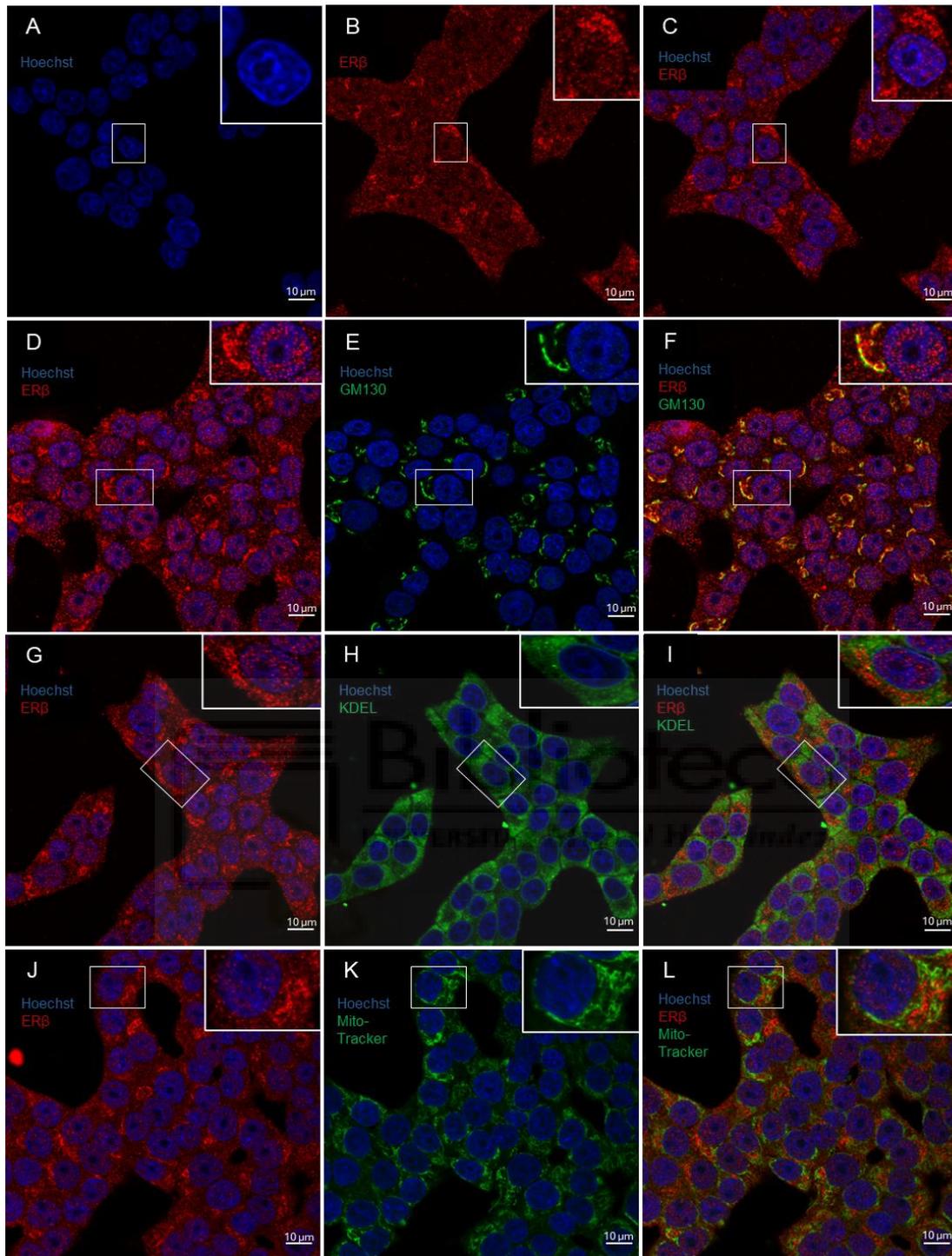
En primer lugar, estudiamos la expresión y localización subcelular del receptor ER $\beta$  en la línea de células- $\beta$  pancreáticas INS-1E, realizando una inmunotinción simple con un anticuerpo específico contra esta proteína y un marcaje de los núcleos con el colorante fluorescente Hoechst (Figura 8A-C). La visualización utilizando el microscopio confocal reveló la presencia de ER $\beta$  tanto en el citoplasma como en el núcleo de estas células. Con el fin de cuantificar el porcentaje de ER $\beta$  que se localiza en núcleo calculamos el coeficiente de Manders para la colocalización de ER $\beta$  y Hoestch. Los valores del coeficiente de Manders fueron  $M_1=0,42 \pm 0,07$  y  $M_2=0,27 \pm 0,02$ . El valor  $M_1$  indica que aproximadamente el 42% de los píxeles rojos que marcan ER $\beta$  coinciden con píxeles azules que señalan el núcleo celular, indicando que ER $\beta$  se localiza parcialmente en el núcleo de estas células. El coeficiente  $M_2$  sugiere que el 27% de los píxeles

azules de los núcleos colocalizan con píxeles rojos de ER $\beta$ , lo que indica una colocalización baja entre ER $\beta$  y el Hoechst y la expresión de la mayoría de ER $\beta$  fuera del núcleo (Figura 8A-C).

A continuación, procedimos a estudiar la localización subcelular de la señal de ER $\beta$  detectada en el citoplasma de estas células. Para ello, realizamos primero un doble inmunomarcaje utilizando anticuerpos específicos contra ER $\beta$  y el marcador del complejo de Golgi GM130, que es una proteína estructural de membrana perteneciente al *cis*-Golgi que permite mantener la estructura de dicho complejo y facilita la fusión de vesículas a su membrana, (Figura 8D-F). Como resultado se obtuvieron unos coeficientes de Manders,  $M1=0.22 \pm 0,01$  y  $M2=0.69 \pm 0,03$ , indicando que el 22% de la señal de ER $\beta$  colocalizaba con píxeles verdes que marcan el complejo de Golgi, mientras que el 69% de la señal del complejo de Golgi coincidía con los píxeles rojos de ER $\beta$ . Esto sugiere una localización parcial de ER $\beta$  en este orgánulo, además de una alta colocalización entre ambas proteínas.

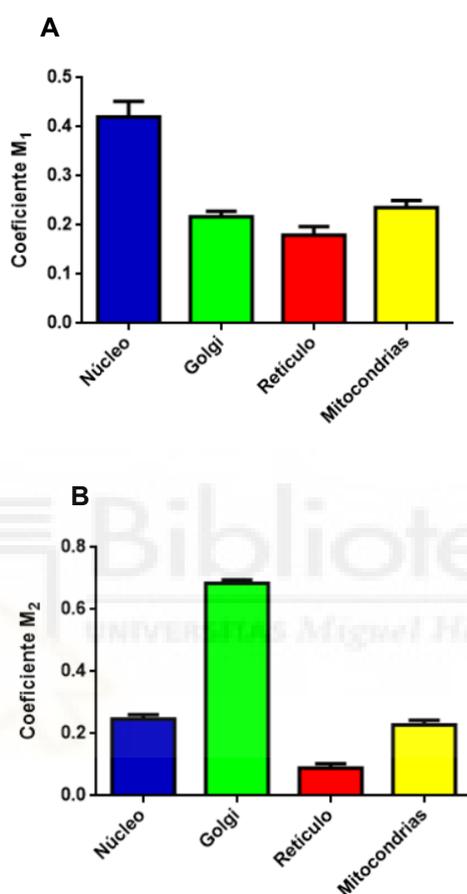
Con el objeto de investigar la presencia de ER $\beta$  en el retículo endoplásmico, se realizó una doble inmunotinción utilizando anticuerpos específicos contra ER $\beta$  y el marcador de dicho orgánulo KDEL, el cual se trata de una secuencia señal presente en numerosas proteínas localizadas en el lumen del retículo endoplásmico que impide que estas sean secretadas al medio extracelular. Los valores del coeficiente de Manders obtenidos,  $M1=0,18 \pm 0,04$  y  $M2=0,09 \pm 0,03$  indican que ER $\beta$  no se detecta en el retículo endoplasmático (Figura 8G-I).

Por último, estudiamos la presencia de ER $\beta$  en las mitocondrias, realizando una inmunotinción simple con un anticuerpo específico contra ER $\beta$  y una tinción de las mitocondrias con MitoTracker. Los valores del coeficiente de Manders obtenidos,  $M1=0,24 \pm 0,03$  y  $M2=0,23 \pm 0,03$  indican una localización parcial de ER $\beta$  en las mitocondrias con una colocalización baja (Figura 8J-K).



**Figura 8. Inmunolocalización de ER $\beta$  en la línea celular INS-1E.** Se muestran células INS-1E en cultivo inmunomarcadas para la proteína ER $\beta$ . **A)** Tinción de los núcleos celulares con Hoechst (azul). **B)** Inmunotinción para ER $\beta$  (rojo). **C, D, G, J)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  y tinción de los núcleos. **E)** Inmunotinción para el marcador del complejo de Golgi GM130 (verde), y tinción de núcleos. **F)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y GM130, y tinción de los núcleos. **H)** Inmunotinción para el marcador del retículo endoplásmico KDEL (verde), y tinción de núcleos. **I)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y KDEL, y tinción de los núcleos. **K)** Tinción de las mitocondrias con MitoTracker (verde), y tinción de núcleos. **L)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  y doble tinción de las mitocondrias y los núcleos. Escala: 10 $\mu$ m.

En resumen, la expresión y localización subcelular del receptor ER $\beta$  a nivel basal en las células- $\beta$  pancreáticas INS-1E revela que esta proteína se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo. La colocalización con Hoechst muestra que ER $\beta$  se encuentra parcialmente en el núcleo, con una colocalización baja. Con respecto al complejo de Golgi, existe una colocalización alta de ER $\beta$  y GM130. Sin embargo, no se observa presencia significativa de ER $\beta$  en el retículo endoplásmico. Finalmente, ER $\beta$  se localiza parcialmente en las mitocondrias, aunque con una colocalización baja entre ER $\beta$  y MitoTracker (Figura 9).

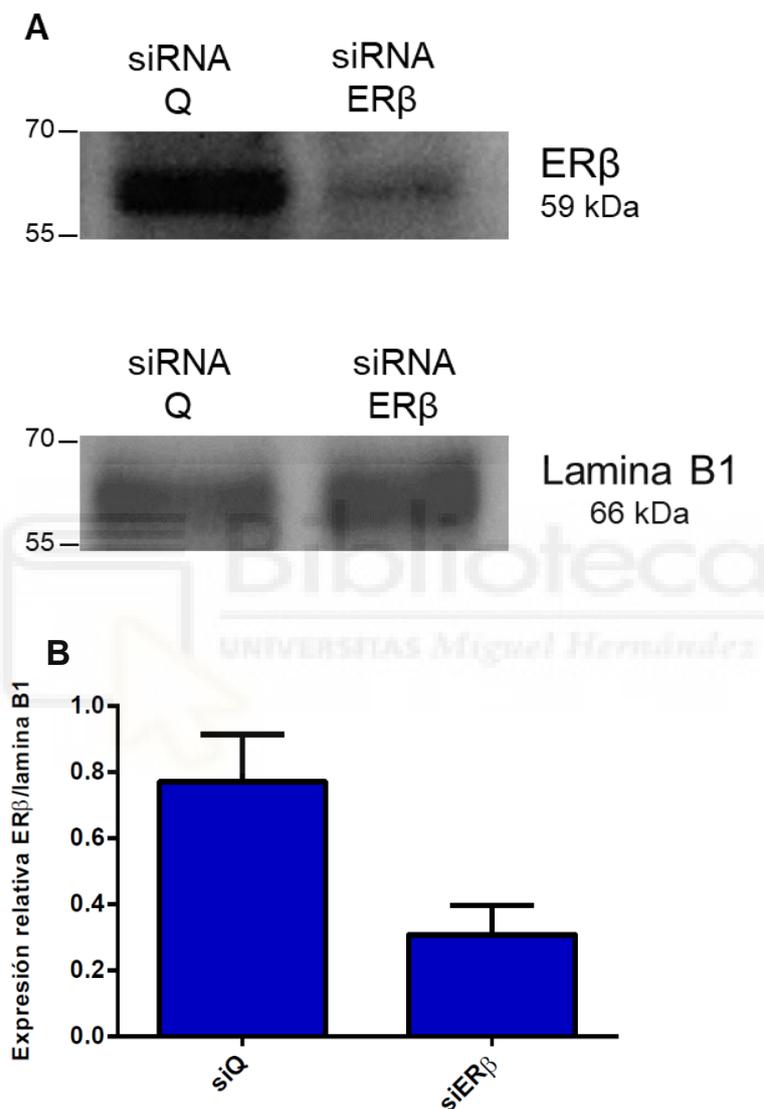


**Figura 9. Análisis del coeficiente de colocalización de Manders de ER $\beta$  basal en el núcleo y en distintos orgánulos en la línea celular INS-1E. A) Coeficiente de Manders M<sub>1</sub>. B) Coeficiente de Manders M<sub>2</sub>.**

## 4.2 Silenciamiento de ER $\beta$ en la línea celular INS-1E

El objetivo de los siguientes experimentos fue poner a punto el silenciamiento de ER $\beta$  para realizar posteriormente estudios de pérdida de función en la fisiología de la célula- $\beta$  (INS-1E). Para ello seguimos el protocolo que se ha descrito en la Sección de Materiales y Métodos. Para visualizar la cantidad de ER $\beta$  expresada en condiciones control y después del tratamiento con siRNA se realizó un Western Blot (Figura 10A). Para obtener este Western Blot, se realizó un doble silenciamiento de ER $\beta$  en las INS-1E, y tras 72 h después del segundo silenciamiento se

realizó una extracción de proteínas totales. Los resultados de la cuantificación de la señal de ER $\beta$  obtenida en el Western Blot mostraron una reducción en los niveles de expresión de ER $\beta$  en las células transfectadas con siRNAs específicos de ER $\beta$  de rata en comparación con las células control transfectadas con siRNAs aleatorios (siRNA Q). Este análisis confirmó la eficacia del silenciamiento, ya que los niveles de ER $\beta$  se redujeron aproximadamente a la mitad en las células silenciadas (Figura 10B).



**Figura 10. Silenciamiento de ER $\beta$  en la línea celular INS-1E. A)** Análisis mediante Western Blot del silenciamiento de ER $\beta$ , utilizando anticuerpos contra ER $\beta$  y lamina B1 (proteína nuclear endógena control). **B)** Gráfica de la expresión relativa de ER $\beta$  frente a la lamina B1.

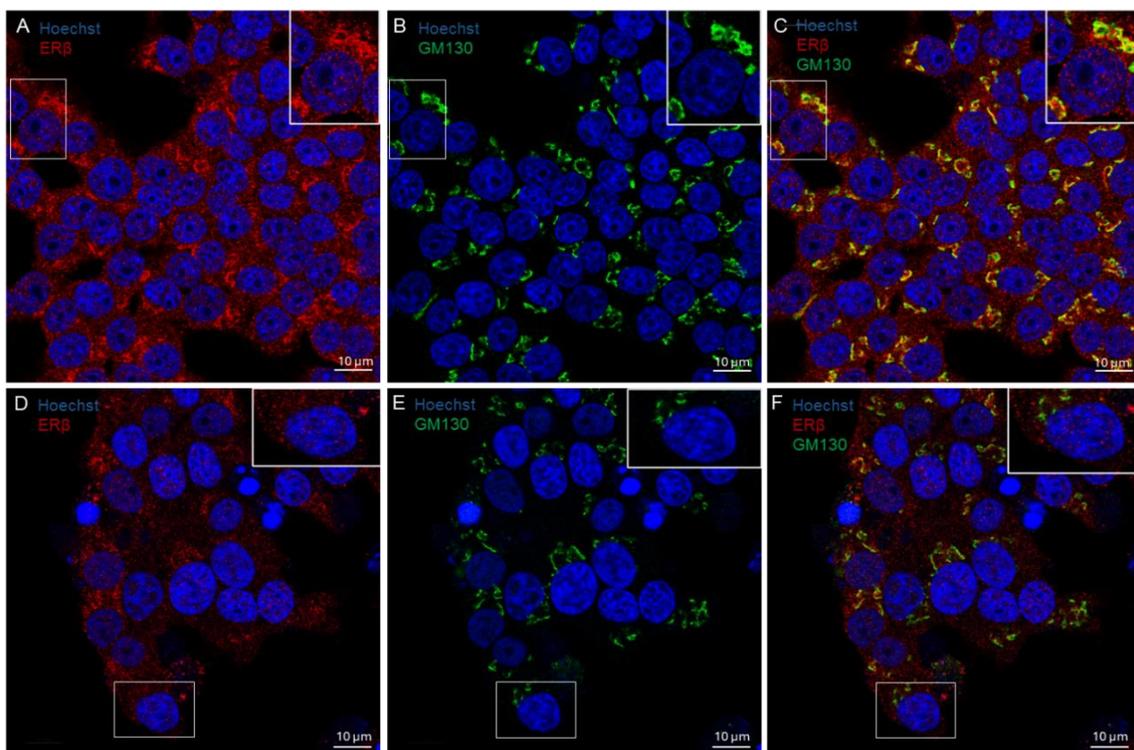
### 4.3. Inmunolocalización de ERβ silenciado en la línea celular INS-1E

También estudiamos la expresión y localización subcelular del receptor ERβ en la línea INS-1E de células-β pancreáticas tras el silenciamiento de ERβ mediante siRNA. Realizamos una inmunotinción simple con un anticuerpo específico contra esta proteína y una tinción de los núcleos con Hoechst (Figuras 11, 12, 13). Los valores del coeficiente de Manders fueron:

Coeficiente de Manders (ERβ y Hoechst)	
Células control	Células silenciadas
<b>M<sub>1</sub>=0,44 ± 0,05</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,20 ± 0,07</b>
<b>M<sub>2</sub>=0,26 ± 0,03</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,11 ± 0,04</b>

A continuación, estudiamos la localización subcelular de ERβ en el citoplasma de estas células. Para ello, realizamos primero un doble inmunomarcaje utilizando anticuerpos específicos contra ERβ y el marcador del complejo de Golgi GM130 (Figura 11). Estos fueron los valores del coeficiente:

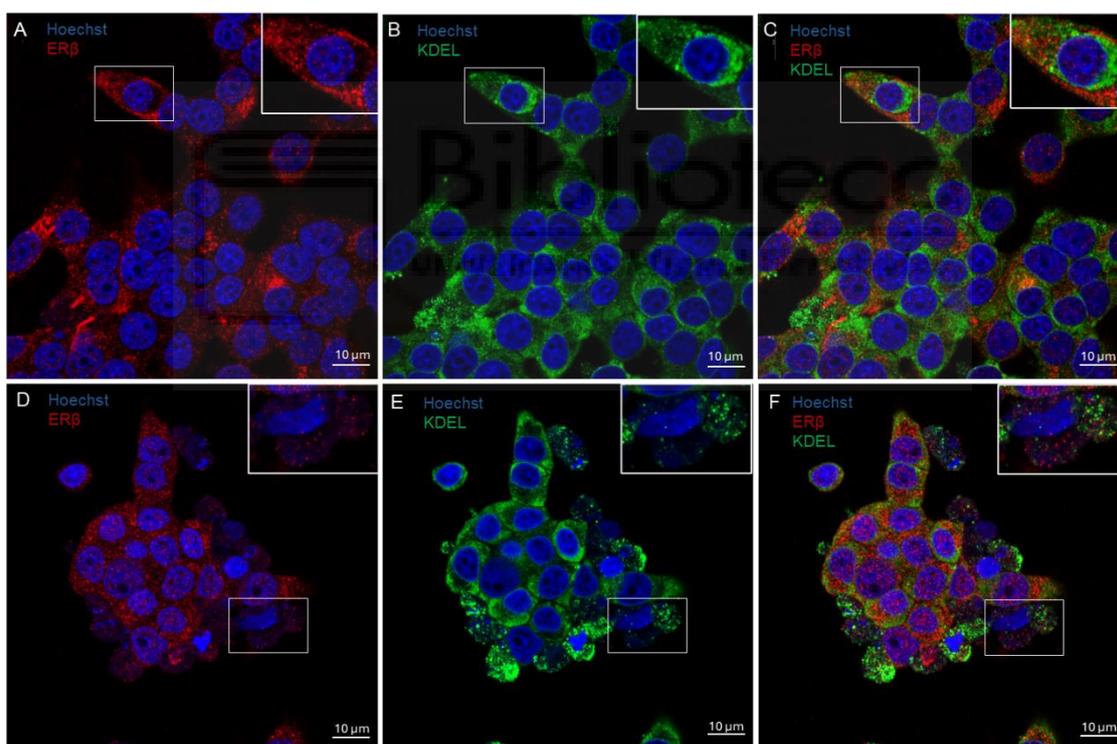
Coeficiente de Manders (ERβ y GM130)	
Células control	Células silenciadas
<b>M<sub>1</sub>=0.24 ± 0,02</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,09 ± 0,02</b>
<b>M<sub>2</sub>=0.67 ± 0,04</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,14 ± 0,02</b>



**Figura 11. Inmunolocalización de ER $\beta$  y el complejo de Golgi en la línea celular INS-1E con ER $\beta$  silenciado.** Se muestran células INS-1E control (A-C) y silenciadas (D-F) en cultivo inmunomarcadas para la proteína ER $\beta$ . **A, C)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  (rojo) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul). **B, D)** Inmunotinción para el marcador del complejo de Golgi GM130 (verde), y tinción de núcleos. **C, F)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y GM130, y tinción de los núcleos. Escala: 10 $\mu$ m.

Después estudiamos la presencia de ER $\beta$  en el retículo endoplásmico. Para ello, se realizó una doble inmunotinción utilizando anticuerpos específicos contra ER $\beta$  y el marcador de dicho orgánulo, KDEL (Figura 12). Los valores del coeficiente de Manders obtenidos fueron:

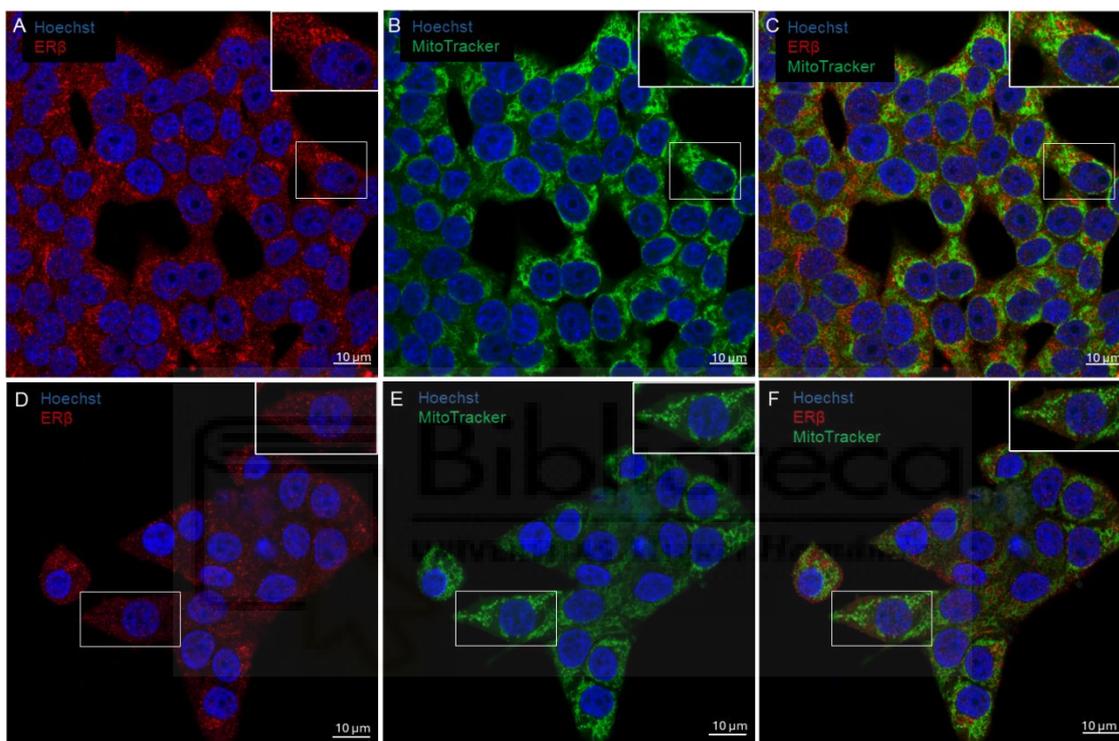
Coeficiente de Manders (ER $\beta$ y KDEL)	
Células control	Células silenciadas
<b>M<sub>1</sub>=0,17 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,19 <math>\pm</math> 0,02</b>
<b>M<sub>2</sub>=0,08 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,06 <math>\pm</math> 0,01</b>



**Figura 12. Inmunolocalización de ER $\beta$  y el retículo endoplásmico en la línea celular INS-1E con ER $\beta$  silenciado.** Se muestran células INS-1E control (A-C) y silenciadas (D-F) en cultivo inmunomarcadas para la proteína ER $\beta$ . **A, C)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  (rojo) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul). **B, D)** Inmunotinción para el marcador del retículo endoplásmico KDEL (verde), y tinción de núcleos. **C, F)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y KDEL, y tinción de los núcleos. Escala: 10 $\mu$ m.

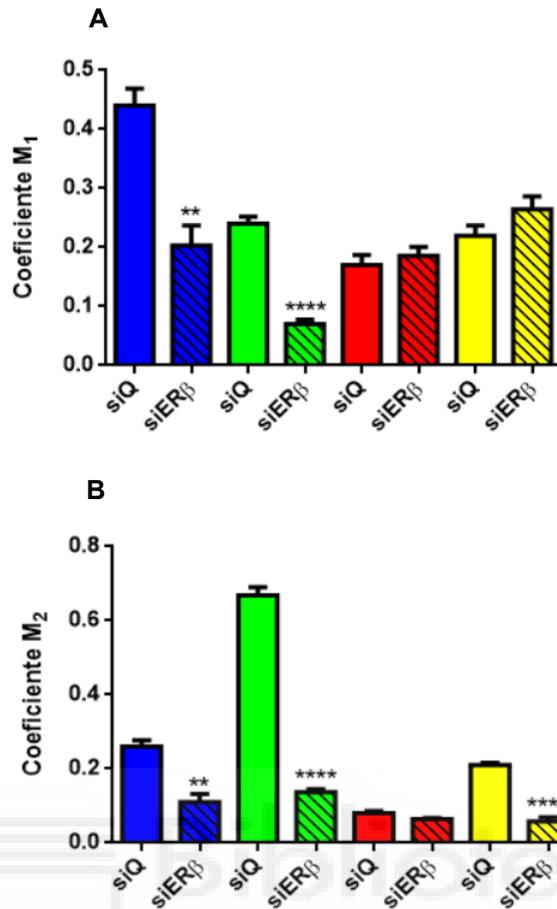
Por último, estudiamos la presencia de ER $\beta$  en las mitocondrias, realizando una inmunotinción simple con un anticuerpo específico contra ER $\beta$  y una tinción de las mitocondrias con MitoTracker (Figura 13). Los valores del coeficiente de Manders obtenidos fueron:

Coeficiente de Manders (ER $\beta$ y MitoTracker)	
Células control	Células silenciadas
<b>M<sub>1</sub>=0,22 ± 0,03</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,26 ± 0,04</b>
<b>M<sub>2</sub>=0,21 ± 0,01</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,06 ± 0,02</b>



**Figura 13. Inmunolocalización de ER $\beta$  y las mitocondrias en la línea celular INS-1E con ER $\beta$  silenciado.** Se muestran células INS-1E control (A-C) y silenciadas (D-F) en cultivo inmunomarcadas para la proteína ER $\beta$ . **A, C)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  (rojo) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul). **B, D)** Inmunotinción para el marcador mitocondrial MitoTracker (verde), y tinción de núcleos. **C, F)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y Mitotracker, y tinción de los núcleos. Escala: 10 $\mu$ m.

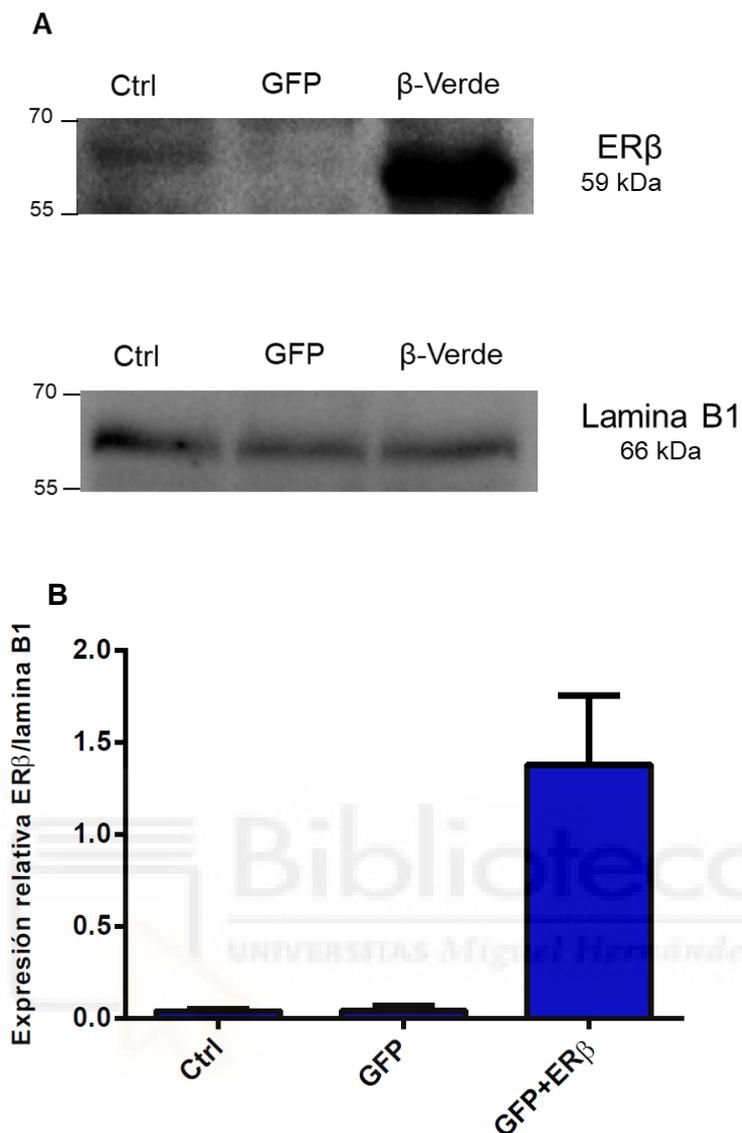
En resumen, el silenciamiento de ER $\beta$  resultó en una disminución significativa de la localización del receptor en todos los orgánulos estudiados. En particular, la colocalización con GM130, inicialmente alta en las células control, se redujo drásticamente a niveles prácticamente nulos. En el núcleo celular y las mitocondrias, la colocalización de ER $\beta$  con el Hoechst y de ER $\beta$  con el MitoTracker, respectivamente, pasó de baja a inexistente, mientras que en el retículo endoplásmico apenas se observaron diferencias con respecto al control (Figura 14).



**Figura 14. Análisis del coeficiente de colocación de Manders de ER $\beta$  silenciado en el núcleo y en distintos orgánulos en la línea celular INS-1E. A) Coeficiente de Manders M<sub>1</sub>. B) Coeficiente de Manders M<sub>2</sub>. El color azul hace referencia al núcleo, el verde al complejo de Golgi, el rojo al retículo endoplasmático y el amarillo a las mitocondrias.**

#### 4.4 Sobreexpresión de ER $\beta$ en la línea celular INS-1E

Con el fin de analizar posteriormente el efecto de la ganancia de función de ER $\beta$  en la fisiología de las células INS-1E, se analizó mediante Western Blot la sobreexpresión de ER $\beta$  en la línea celular INS-1E de células beta de rata (Figura 15A). Para ello, se llevó a cabo una transfección con un plásmido de sobreexpresión con la secuencia codificante de ER $\beta$  en esta línea celular. Tras 72h de la transfección, realizamos una extracción de proteínas totales. Los resultados de la cuantificación de la señal de ER $\beta$  obtenida en el Western Blot mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de ER $\beta$  en las células transfectadas con dicho plásmido en comparación con las células control (a las que únicamente se les añadió la lipofectamina necesaria para la transfección) y las células transfectadas con un plásmido de sobreexpresión de GFP (que muestra que la sobreexpresión individual de esta proteína no afecta la expresión basal de ER $\beta$ ). Este análisis confirmó la eficacia de la sobreexpresión, ya que los niveles de ER $\beta$  aumentaron una media de 37 veces (Figura 15B).



**Figura 15. Sobreexpresión de ER $\beta$  en la línea celular INS-1E. A)** Análisis mediante Western Blot de la sobreexpresión de ER $\beta$ , utilizando anticuerpos contra ER $\beta$  y lamina B1 (proteína nuclear endógena control). **B)** Gráfica de la expresión relativa de ER $\beta$  frente a la lamina B1.

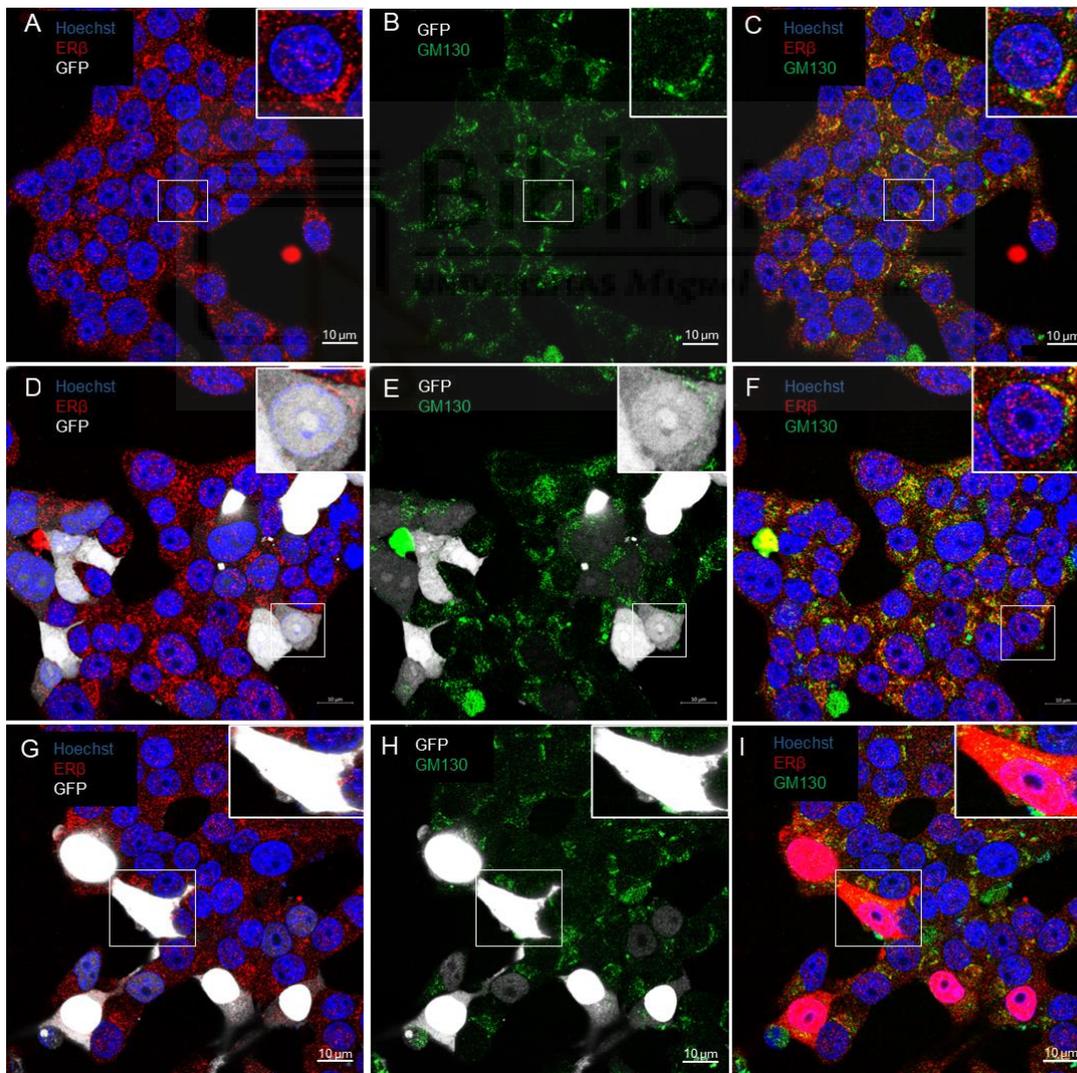
## 4.5 Inmunolocalización de ER $\beta$ sobreexpresado en la línea celular INS-1E

Con el fin de evaluar la expresión y localización subcelular del receptor ER $\beta$  en la línea INS-1E de células- $\beta$  pancreáticas que sobreexpresan ER $\beta$ , realizamos una inmunotinción con un anticuerpo específico contra ER $\beta$  y teñimos los núcleos con Hoechst (Figuras 16, 17, 18). Se obtuvieron los siguientes valores del coeficiente de Manders:

Coeficiente de Manders (ER $\beta$ y Hoechst)		
Células control	Células control GFP	Células sobreexpresadas
<b>M<sub>1</sub>=0,41 ± 0,05</b>	<b>M<sub>1</sub>=0.44 ± 0,02</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,72 ± 0,13</b>
<b>M<sub>2</sub>=0,29 ± 0,03</b>	<b>M<sub>2</sub>=0.31 ± 0,03</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,94 ± 0,07</b>

Luego, estudiamos la localización subcelular de ER $\beta$  en el citoplasma. Para ello, realizamos un doble inmunomarcaje utilizando anticuerpos específicos contra ER $\beta$  y el marcador del complejo de Golgi GM130 (Figura 16). Los resultados fueron:

Coeficiente de Manders (ER $\beta$ y GM130)		
Células control	Células control GFP	Células sobreexpresadas
<b>M<sub>1</sub>=0.22 ± 0,02</b>	<b>M<sub>1</sub>=0.25 ± 0,01</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,05 ± 0,01</b>
<b>M<sub>2</sub>=0.64 ± 0,04</b>	<b>M<sub>2</sub>=0.67 ± 0,03</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,62 ± 0,09</b>

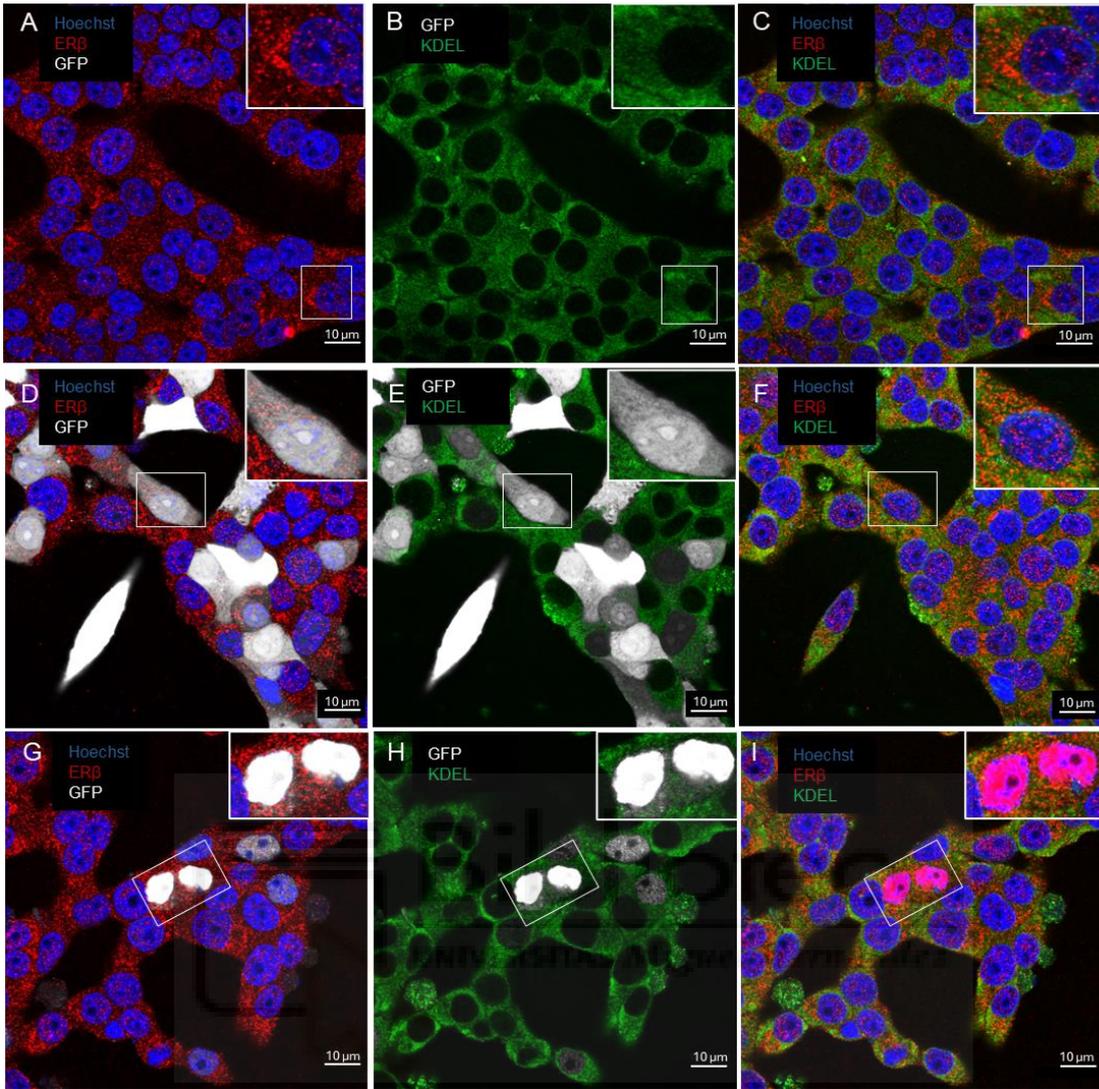


**Figura 16. Inmunolocalización de ERβ y el complejo de Golgi en la línea celular INS-1E con ERβ sobreexpresado.** Se muestran células INS-1E control (A-C), sobreexpresadas con GFP (D-F), y sobreexpresadas con ERβ (G-I) en cultivo inmunomarcadas para la proteína ERβ. **A)** Inmunomarcaje para ERβ (rojo) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul). **B)** Inmunotinción para el marcador del complejo de Golgi GM130 (verde). **C)** Doble inmunomarcaje para ERβ y GM130, y tinción de los núcleos. **D, G)** Inmunomarcaje para ERβ, tinción de los núcleos y fluorescencia de la proteína GFP (blanco). **E, H)** Inmunotinción para el marcador del complejo de Golgi GM130 y fluorescencia de la proteína GFP. **F, I)** Doble inmunomarcaje para ERβ y GM130, tinción de los núcleos y fluorescencia de la proteína GFP. Escala: 10µm.

Para investigar la presencia de ERβ en el retículo endoplásmico, realizamos una doble inmunotinción utilizando anticuerpos específicos contra ERβ y el marcador KDEL (Figura 17). Los valores del coeficiente obtenidos fueron:

Coeficiente de Manders (ERβ y KDEL)		
Células control	Células control GFP	Células sobreexpresadas
<b>M<sub>1</sub>=0,20 ± 0,02</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,19 ± 0,04</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,13 ± 0,03</b>
<b>M<sub>2</sub>=0,09 ± 0,03</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,08 ± 0,02</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,36 ± 0,04</b>

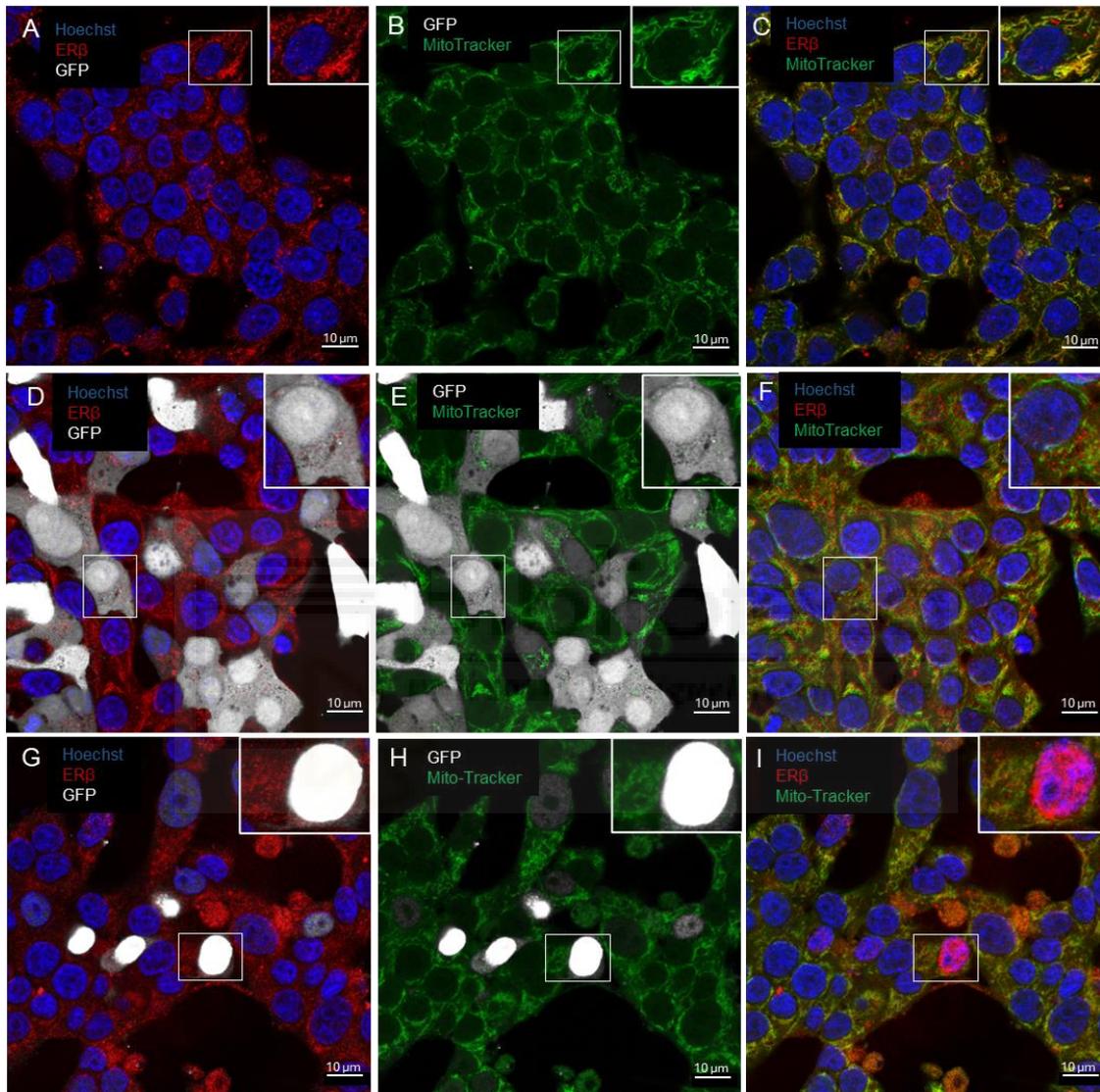




**Figura 17. Inmunolocalización de ER $\beta$  y el retículo endoplasmático en la línea celular INS-1E con ER $\beta$  sobreexpresado.** Se muestran células INS-1E control (A-C), sobreexpresadas con GFP (D-F), y sobreexpresadas con ER $\beta$  (G-I) en cultivo inmunomarcadas para la proteína ER $\beta$ . **A)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  (rojo) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul). **B)** Inmunotinción para el marcador del retículo endoplasmático KDEL (verde). **C)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y KDEL, y tinción de los núcleos. **D, G)** Inmunomarcaje para ER $\beta$ , tinción de los núcleos y fluorescencia de la proteína GFP (blanco). **E, H)** Inmunotinción para el marcador del retículo endoplasmático KDEL y fluorescencia de la proteína GFP. **F, I)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y KDEL, tinción de los núcleos y fluorescencia de la proteína GFP. Escala: 10 $\mu$ m.

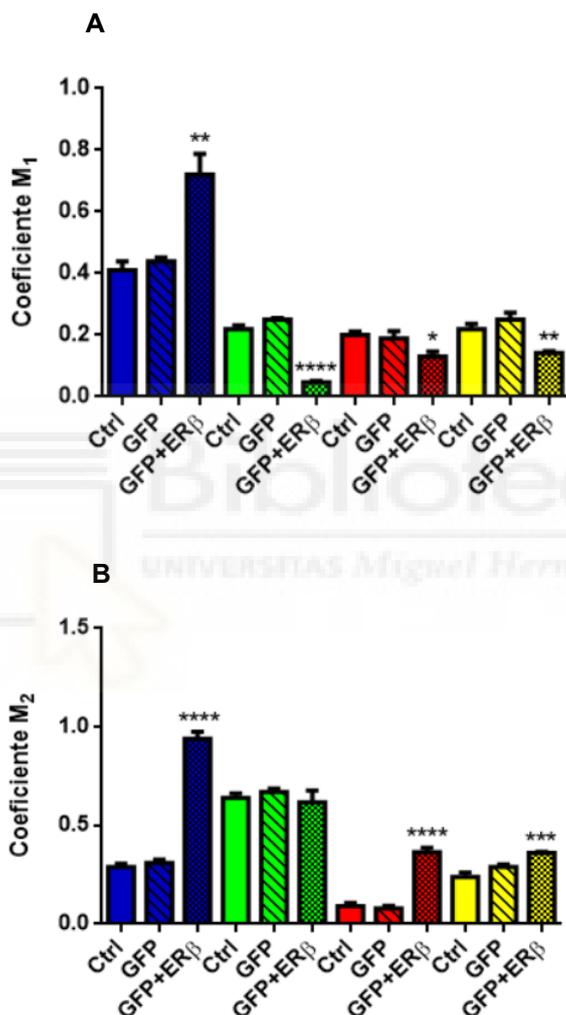
Finalmente, evaluamos la presencia de ER $\beta$  en las mitocondrias, realizando una inmunotinción con un anticuerpo específico contra ER $\beta$  y una tinción de las mitocondrias con MitoTracker (Figura 18). Los valores obtenidos fueron:

Coeficiente de Manders (ER $\beta$ y MitoTracker)		
Células control	Células control GFP	Células sobreexpresadas
<b>M<sub>1</sub>=0,22 ± 0,03</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,25 ± 0,04</b>	<b>M<sub>1</sub>=0,14 ± 0,01</b>
<b>M<sub>2</sub>=0,24 ± 0,04</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,29 ± 0,02</b>	<b>M<sub>2</sub>=0,36 ± 0,01</b>



**Figura 18. Inmunolocalización de ER $\beta$  y las mitocondrias en la línea celular INS-1E con ER $\beta$  sobreexpresado.** Se muestran células INS-1E control (A-C), sobreexpresadas con GFP (D-F), y sobreexpresadas con ER $\beta$  (G-I) en cultivo inmunomarcadas para la proteína ER $\beta$ . **A)** Inmunomarcaje para ER $\beta$  (rojo) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul). **B)** Inmunotinción para el marcador mitocondrial MitoTracker (verde). **C)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y MitoTracker, y tinción de los núcleos. **D, G)** Inmunomarcaje para ER $\beta$ , tinción de los núcleos y fluorescencia de la proteína GFP (blanco). **E, H)** Inmunotinción para el marcador mitocondrial MitoTracker y fluorescencia de la proteína GFP. **F, I)** Doble inmunomarcaje para ER $\beta$  y MitoTracker, tinción de los núcleos y fluorescencia de la proteína GFP. Escala: 10 $\mu$ m.

En resumen, la sobreexpresión de ER $\beta$  resultó en un aumento de la localización del receptor en todos los orgánulos estudiados. Destacó un aumento significativo de la expresión de ER $\beta$  en el núcleo celular, donde la colocalización entre el receptor y el Hoechst pasó de ser baja en condiciones basales a muy alta. En el retículo endoplásmico, la colocalización entre ER $\beta$  y el marcador de dicho orgánulo KDEL aumentó de nula a baja. También se observó un ligero incremento de la expresión de ER $\beta$  en las mitocondrias, mientras que en el complejo de Golgi la colocalización entre el receptor estudiado y el marcador GM130 no mostró grandes variaciones (Figura 19).



**Figura 19. Análisis del coeficiente de colocalización de Manders de ER $\beta$  sobreexpresado en el núcleo y en distintos orgánulos en la línea celular INS-1E. A) Coeficiente de Manders M<sub>1</sub>. B) Coeficiente de Manders M<sub>2</sub>. El color azul hace referencia al núcleo, el verde al complejo de Golgi, el rojo al retículo endoplasmático y el amarillo a las mitocondrias.**

## 5. Discusión

Los receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$ , son esenciales en la regulación de funciones celulares clave como la proliferación, diferenciación y apoptosis<sup>21</sup>. Estos receptores actúan por medio de un mecanismo genómico también conocido como vía clásica, en la cual estos receptores dimerizados y heterodimerizados interactúan en el núcleo directamente con el DNA o indirectamente a través de factores de transcripción; o bien, por un mecanismo no genómico o vía no clásica, mediada por ER extranucleares que están anclados a la membrana plasmática<sup>19</sup>.

En las células- $\beta$  pancreáticas, estos receptores juegan un papel crucial en la regulación de la secreción de insulina y en la respuesta a señales hormonales y metabólicas. Estudios previos han demostrado que el E2, al unirse a estos receptores, desencadena un incremento de la secreción de insulina en respuesta a glucosa en los islotes pancreáticos de Langerhans<sup>23</sup>. Este efecto no se ve afectado por inhibidores de la síntesis de proteínas y RNA, lo que sugiere que se trata de una señal rápida mediada por los receptores de estrógenos ubicados en la membrana plasmática desencadenando el mecanismo no genómico<sup>23</sup>. En concreto, la localización de ER $\alpha$  en la membrana plasmática se debe a la palmitoilación que sufre en el complejo de Golgi (explicado en el apartado 1.6)<sup>20</sup>. No obstante, sobre este proceso en ER $\beta$  se ha estudiado poco y no se conoce con exactitud si sigue el mismo proceso que ER $\alpha$ .

La glucosa estimula la secreción de insulina por parte de la célula- $\beta$ , pero también estimula la síntesis de insulina para reponer los gránulos en los que esta se almacena. El efecto de la glucosa en la traducción de proteínas aumenta la carga de plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico de la célula, lo que puede inducir, transitoriamente, estrés en dicho orgánulo, una condición en la que la capacidad de plegamiento de proteínas de este orgánulo es insuficiente con respecto al nivel de proteínas que se van sintetizando, lo que ocasiona una acumulación de proteínas mal plegadas. Esto provoca una reducción en la eficiencia de la traducción para disminuir la carga de proteínas secretoras, y se induce la actividad de las chaperonas. El estrés en el retículo endoplasmático es, probablemente, una situación fisiológica que la célula  $\beta$  experimenta de manera transitoria después de la alimentación<sup>28</sup>.

Por otra parte, en células tumorales se ha demostrado que ER $\beta$  también se localiza en las mitocondrias afectando a la señalización antiapoptótica y estimulando el mecanismo mitocondrial para satisfacer las altas demandas de energía que presentan los procesos de proliferación, supervivencia y transformación celular<sup>29</sup>.

Con todo esto y debido al menor conocimiento que se tiene de ER $\beta$  con respecto a ER $\alpha$ , en el presente trabajo nos hemos centrado, en primer lugar, en determinar la expresión y localización de ER $\beta$  en el núcleo, complejo de Golgi, retículo endoplasmático y mitocondrias en la línea celular INS-1E, procedente de un insulinoma.

Para analizar la colocalización de ER $\beta$  con el núcleo y los orgánulos antes mencionados, llevamos a cabo inmunotinciones con anticuerpos específicos contra ER $\beta$ , GM130 (marcador de

Golgi) y KDEL (marcador de retículo endoplasmático). Las mitocondrias las marcamos con MitoTracker y los núcleos celulares con el colorante de DNA llamado Hoechst.

Los resultados obtenidos mostraron que una proporción notable de la señal de ER $\beta$  se encontraba en el núcleo (Figura 9A), aunque la colocalización de este receptor con el Hoechst resultó ser baja (Figura 9B). Acerca del complejo de Golgi, se vio que parte de la señal de ER $\beta$  se encontraba en este orgánulo y la colocalización de este receptor con GM130 fue alta (Figura 9B). Este hallazgo indica una alta presencia de ER $\beta$  en el complejo de Golgi, lo que sugiere que ER $\beta$  podría seguir el mismo proceso, o similar, de palmitoilación que ER $\alpha$ <sup>20</sup>. Con respecto al retículo endoplasmático, vimos que existe señal de ER $\beta$  en él (Figura 9A), pero la colocalización de ER $\beta$  con el marcador KDEL resultó ser nula (Figura 9B), por lo que no se determinó presencia de ER $\beta$  en dicho orgánulo. Además, en nuestros resultados, pudimos observar que parte de la señal de ER $\beta$  se localiza en las mitocondrias (Figura 9A), siendo la colocalización de ER $\beta$  con el marcador de las mitocondrias baja (Figura 9B). Dado que las células INS-1E, utilizadas para estos experimentos, proceden de un insulinoma de rata, la localización de ER $\beta$  en las mitocondrias podría estar ejerciendo un papel sobre la señalización antiapoptótica y estimulando el mecanismo mitocondrial necesario para llevar a cabo los procesos de proliferación, supervivencia y transformación celular, tal y como ya se ha descrito previamente en células tumorales<sup>29</sup>.

Por otro lado, para poder estudiar en un futuro el papel de ER $\beta$  en la célula- $\beta$  pancreática y el efecto de la pérdida y ganancia de función de dicho receptor, en este trabajo hemos puesto a punto el silenciamiento y la sobreexpresión de ER $\beta$  en INS-1E. Además, hemos determinado el efecto de estas técnicas sobre la expresión y localización de ER $\beta$  en el núcleo, complejo de Golgi, retículo endoplasmático y mitocondrias en dicha línea celular.

En primer lugar, tras el silenciamiento de ER $\beta$  pudimos observar en las mismas condiciones del cultivo celular que la confluencia de las células bajaba con respecto al cultivo de las células control, lo que sugiere que la expresión de ER $\beta$  en INS-1E es importante para la supervivencia y proliferación de estas células. Esto corrobora los resultados de otros estudios ya realizados<sup>30</sup>.

Respecto a la expresión de ER $\beta$  obtuvimos una reducción de aproximadamente el 50% (Figura 10) que se reflejaba en una reducción global de la expresión de ER $\beta$  en el núcleo y en los orgánulos en la línea celular INS-1E (Figura 14A). Esta reducción de su expresión afectó significativamente a la localización de ER $\beta$  en el complejo de Golgi, ya que la colocalización entre este receptor y GM130 pasó de ser alta, en la expresión de las células control, a ser nula (Figura 14B). Con respecto a la localización de ER $\beta$  en el núcleo celular y en las mitocondrias, pudimos observar como el silenciamiento del receptor también afecta ya que la colocalización de ER $\beta$  con el marcador nuclear y el mitocondrial pasó de ser baja, en los controles, a ser nula (Figura 14B). Finalmente, acerca de la localización de ER $\beta$  en el retículo endoplasmático no observamos diferencias ya que la colocalización entre ER $\beta$  y KDEL es nula tanto a nivel basal como tras el silenciamiento (Figura 14B).

En el caso de la sobreexpresión, obtuvimos un aumento de la expresión de ER $\beta$  de unas 37 veces (Figura 15), que se reflejaba en un aumento de este receptor en la célula, afectando sobre todo a su localización en el núcleo (Figura 19A), donde la colocalización pasa de ser baja, en los controles, a ser, prácticamente, total entre ER $\beta$  y Hoechst (Figura 19B). Acerca de los orgánulos estudiados, hemos observado un aumento de este receptor en el retículo endoplasmático ya que la colocalización entre ER $\beta$  y KDEL pasó de ser nula, en los controles, a ser baja (Figura 19B). En las mitocondrias también observamos un ligero aumento de ER $\beta$ , pero en el complejo de Golgi el coeficiente de Manders apenas variaba entre la expresión de ER $\beta$  en las células control y en las células sobreexpresadas (Figura 19B).

En definitiva, las técnicas de silenciamiento y sobreexpresión desarrolladas abren nuevas oportunidades para estudiar la pérdida y ganancia de función de ER $\beta$ . Es probable que, en los experimentos de pérdida de función, la reducción de ER $\beta$  en el complejo de Golgi sea la principal responsable de las diferencias observadas respecto a los controles. Por otro lado, en los experimentos de ganancia de función, el aumento de ER $\beta$  en el núcleo será el factor dominante que explique las variaciones encontradas. Además, es importante que ese tipo de experimentos no se haga solo en este tipo de línea celular, puesto que procede de un insulinoma y es posible que no esté reproduciendo fielmente las condiciones normales de las células- $\beta$  pancreáticas.

## 6. Conclusiones y proyecciones futuras

1. En la línea celular INS-1E, el receptor de estrógenos ER $\beta$  se localiza en el núcleo. Adicionalmente, ER $\beta$  se localiza en los siguientes orgánulos: en el complejo de Golgi y en las mitocondrias.
2. El silenciamiento de ER $\beta$ , mediante la utilización de siRNAs, promueve la muerte celular en células INS-1E en cultivo, lo que sugiere una gran importancia de ER $\beta$  en la supervivencia de estas células tumorigénicas.
3. El silenciamiento de ER $\beta$  disminuye significativamente la localización de este receptor en el núcleo, complejo de Golgi y mitocondrias en INS-1E.
4. La sobreexpresión de ER $\beta$ , mediante la utilización de un plásmido de sobreexpresión, incrementa significativamente la localización de este receptor en el núcleo, retículo endoplásmico y mitocondrias en células INS-1E

### • Proyecciones Futuras

Para profundizar en los mecanismos mediante los cuales ER $\beta$  regula la función celular, sería conveniente llevar a cabo estudios funcionales adicionales de este receptor. Estos podrían incluir análisis detallados de la expresión génica y de las vías de señalización específicas mediante experimentos de pérdida y ganancia de función de ER $\beta$ , llevados a cabo a través de técnicas de

silenciamiento y sobreexpresión de dicho receptor como los que se han desarrollado en este trabajo, en varios modelos de célula- $\beta$  pancreática. Esto proporcionaría una visión más completa sobre la función de ER $\beta$  y su relevancia en diversos contextos fisiológicos, sentando las bases para futuras investigaciones que podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y una mejor comprensión de la biología de las células- $\beta$  pancreáticas.

## 7. Bibliografía

1. Da Silva Xavier G. The cells of the islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*. (2018).
2. Babiloni-Chust I. Papel de los receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$  y el receptor acoplado a proteínas G (GPER) en la viabilidad de la célula  $\beta$  (Tesis Doctoral). *Universidad Miguel Hernández de Elche, España* (2023).
3. Campbell J.E., Newgard C.B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature*. **22**, 142-158 (2021).
4. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. **312**, 446-448 (1984).
5. Dunne MJ, Petersen OH. Intracellular ADP activates K<sup>+</sup> channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett*. **208**, 59-62 (1986).
6. Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, Sharp GWG. Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic  $\beta$  cell. *Trends Pharmacol. Sci*. **19**, 496-499 (1998).
7. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. **54**, 87-143 (1989).
8. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol. Cell. Endocrinol*. **355**, 201-207 (2012).
9. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase: a brief overview. *Annu. Rev. Physiol*. **64**, 93-127 (2002).
10. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr. Rev*. **34**, 309-338 (2013).

11. Pedram A., Razandi M., Sainson R.C.A, Kim J.K., Hughes C.C., Levin E.R. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **282**, 22278-22288 (2007).
12. Hui Wen Ng, Perkins R, Tong W, Hong H. Versatility or promiscuity: the estrogen receptors, control of ligand selectivity and an update on subtype selective ligands. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **11**, 8709-8742 (2014)
13. Romano, S. N., Gorelick, D. A. Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *General and Comparative Endocrinology.* **261**, 190–197 (2018).
14. Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J.A. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews.* **81**, 1535-1565 (2001).
15. Barrón-González A, Arias-Martínez J, Castro-Romero I. Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud Publica Mex.* **43**, 577-584 (2001).
16. Arao Y. and Korach K.S. The F domain of estrogen receptor alpha is involved in species-specific, tamoxifen-mediated transactivation. *JBC.* **22**, 8495-8507 (2018).
17. Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H. A Novel Isoform of Rat Estrogen Receptor Beta with 18 Amino Acid Insertion in the Ligand Binding Domain as a Putative Dominant Negative Regulator of Estrogen Action. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **246**, 142-147 (1998).
18. Petersen D.N., Tkalcevic G.T., Koza-Taylor P.H., Turi T.G., Brown T.A. Identification of Estrogen Receptor  $\beta$ 2, A Functional Variant of Estrogen Receptor  $\beta$  Expressed in Normal Rat Tissues. *The Endocrine Society.* **139**, 1082-1092 (1998).
19. Ropero Lara AB. Caracterización del receptor y de los mecanismos de señalización implicados en el efecto no genómico del 17beta-estradiol en el islote de Langerhans de ratón [dissertation]. *San Juan: Universidad Miguel Hernández de Elche* (2001).
20. Ellis R. Levin & Hammes. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 783-797 (2016).
21. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev.* American Physiological Society. **87**, 905-931 (2007).

22. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, and Marino M. Palmitoylation-dependent Estrogen Receptor  $\alpha$  Membrane Localization: Regulation by 17 $\beta$ -Estradiol. *Molecular Biology of the Cell*. **16**, 231-237 (2005).
23. Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C. Rapid insulinotropic effect of 17 $\beta$ -estradiol via a plasma membrane receptor. *The FASEB Journal*. **13**, 1341-1348 (1998).
24. Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M. Role of Er $\beta$  palmitoilation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocrine-related Cancer*. **14**, 153-167 (2007).
25. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., & Wollheim, C. B. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*. **130**, 167-178 (1992).
26. Manders E.M.M, Verbeek F.J and Aten J.A. Measurement of co-localization of objects in dual colour confocal images. *Journal of Microscopy*. **169**, 375-382 (1993).
27. Luo T, Mitra S, McBride JW. *Ehrlichia chaffeensis* TRP75 Interacts with Host Cell Targets Involved in Homeostasis, Cytoskeleton Organization, and Apoptosis Regulation To Promote Infection. *mSphere*. **3**, 00147-18 (2018).
28. Hartley T, Siva M, Lai E, Teodoro T, Zhang L, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress response in an INS1 pancreatic b-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin. *BMC Cell Biology*. (2010)
29. Liao T.L, Tzeng C.R, Yu C.L, Wang Y.P, Kao S.H. Estrogen receptor- $\beta$  in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1350**, 52-60 (2015).
30. Babiloni-Chust I, dos Santos R.S, Medina-Gali RM, Pérez Serna A, Encinar J.A, Martínez-Pinna J, Gustafsson J.A, Marroquí L, Nadal A. G protein-coupled estrogen receptor activation by bisphenol-A disrupts the protection from apoptosis conferred by the Strogen receptor ER and ER in pancreatic beta cells. *Elsevier*. **164** (2022)